

星点设计-效应面法优化基于甘草酸的葛根素纳米乳及其体外释放研究

张琳琳, 李小芳*, 谢 龙, 宋佳文, 廖艳梅, 仲 粒

成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

摘 要: **目的** 以甘草酸为天然稳定剂制备葛根素纳米乳 (Pue-NE), 并考察其体外释放特性。**方法** 采用高速剪切联合高压均质法制备 Pue-NE, 以平均粒径和分散指数 (PDI) 为自变量, 运用总评归一值 (OD) 为评价指标进行数据处理, 采用星点设计-效应面法优化处方, 并对最优处方制备的 Pue-NE 进行理化性质和释放特性考察。**结果** Pue-NE 的最佳处方为葛根素质量浓度 5.0 mg/mL, 甘草酸质量浓度 1.75 mg/mL, 辛酸甘油酯用量 3.5 mL。Pue-NE 平均粒径为 (184.5 ± 0.8) nm、PDI 为 0.088 ± 0.002 、Zeta 电位为 (10.56 ± 0.35) mV、电导率为 (98.3 ± 0.4) μ S/cm、pH 为 6.750 ± 0.005 、溶解度为 (4.970 ± 0.008) mg/mL、载药量为 $(99.4 \pm 0.2)\%$ 、浊度为 (24.3 ± 1.0) cm^{-1} ($n=3$)。经染色法鉴别为 O/W 型乳液, 透射电镜扫描结果显示液滴呈大小均匀的圆球形。稳定性结果表明, Pue-NE 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 储存稳定性良好。体外释放结果表明, 24 h 内 Pue-NE 在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中释放度最大。**结论** 以甘草酸为天然稳定剂制备 Pue-NE 不仅制备方法简便, 还可有效替代传统化学合成稳定剂的使用, 改善葛根素的溶解性。

关键词: 纳米乳; 葛根素; 甘草酸; 天然稳定剂; 星点设计-效应面法; 总评归一法; 体外释放; 高速剪切联合高压均质法; 浊度; 溶解度; O/W 型乳液; 稳定性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)12-3180-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.009

Optimization of puerarin nanoemulsion based on glycyrrhizic acid by central composite design-response surface method and its *in vitro* release studies

ZHANG Lin-lin, LI Xiao-fang, XIE Long, SONG Jia-wen, LIAO Yan-mei, ZHONG Li

College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, State Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective Puerarin nanoemulsion (Pue-NE) was prepared with glycyrrhizic acid as a natural stabilizer, and its release characteristics *in vitro* were investigated. **Methods** Data processing was performed using particle size and polydispersity index (PDI) as independent variables, and using the overall desirability (OD) as the evaluation index. The central composite design-response surface method was used to optimize the prescription, and the physical and chemical properties and release characteristics of Pue-NE prepared by the optimal prescription were investigated. **Results** The best prescription for Pue-NE is puerarin at a concentration of 5.0 mg/mL, glycyrrhizic acid at a concentration of 1.75 mg/mL, and caprylic glyceride in an amount of 3.5 mL. The average particle size of the nanoemulsion is (184.5 ± 0.8) nm, the PDI is 0.088 ± 0.002 , the zeta potential is (10.56 ± 0.35) mv, the conductivity is (98.3 ± 0.4) μ S/cm, pH is 6.750 ± 0.005 , solubility (4.970 ± 0.008) mg/mL, drug loading is $(99.4 \pm 0.2)\%$, turbidity (24.3 ± 1.0) cm^{-1} ($n=3$). It was identified as O/W emulsion by dyeing method. TEM scanning results show that the droplets are spherical and uniform in size and the stability results showed that Pue-NE has good storage stability at 25 $^{\circ}\text{C}$. *In vitro* release results showed that Pue-NE has the greatest release in phosphate buffered pH 6.8 within 24 hours. **Conclusion** The preparation of Pue-NE with glycyrrhizic acid as a natural stabilizer is not only simple and convenient, but also can effectively replace the use of traditional chemical synthetic stabilizers and

收稿日期: 2019-12-25

基金项目: 四川省科技厅科研项目 (2019YFS0113); 国家中医药管理局项目 (2018ZY03002)

作者简介: 张琳琳 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型、新制剂、新技术。Tel: 18434371727 E-mail: 3127961652@qq.com

*通信作者 李小芳 (1964—), 女, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型、新制剂、新技术。Tel: 13808195110 E-mail: lixiaofang918@163.com

improve the solubility of puerarin.

Key words: nanoemulsion; puerarin; glycyrrhizic acid; natural stabilizer; central composite design-response surface method; overall desirability method; *in vitro* release; high-speed shearing combined with high-pressure homogenization; turbidity; solubility; O/W emulsion; stability

葛根素 (puerarin, Pue) 又名葛根黄酮, 是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *Pueraria edulis* Pamp. 的块根中提取得到的一种黄酮苷, 也是中药葛根的主要有效成分之一。药理学研究表明, 葛根素具有多重药理作用^[1-10]。但其水溶性低、膜渗透性差、半衰期短、P 糖蛋白的外排作用以及肠首过代谢效应等导致其口服生物利用度不佳^[9,11], 限制了临床应用。药学工作者已经开展了葛根素的新型制剂研究, 如磷脂复合物、胶束、脂质体、自微乳、微乳、固体分散体等^[12-14]。尽管这些新型制剂在一定程度上改善了葛根素的口服生物利用度, 但也存在一定缺陷, 如磷脂复合物容易残留有机溶剂^[15], 胶束和脂质体容易发生药物泄露等^[16-18], 自微乳^[19]、微乳^[20]和固体分散体^[21]中大量辅料的使用, 影响制剂的安全性和疗效^[22]。

纳米乳 (nanoemulsion, NE) 是由水相、油相、表面活性剂及助表面活性剂组成的透明或半透明分散体, 其作为一种小粒径新型载体, 目前已被广泛用于难溶性成分的增溶、增效减毒研究^[23-26]。研究表明纳米乳可改善难溶性药物的溶解性和生物利用度^[27], 但目前的制剂研究中多使用化学合成表面活性剂, 长期使用会对人体产生毒副作用^[28-29]。

本课题以天然表面活性剂甘草酸为稳定剂^[30]制备葛根素纳米乳 (puerarin nanoemulsion, Pue-NE), 旨在提高葛根素的溶解性和口服生物利用度。此外, 用天然稳定剂替代传统化学合成表面活性剂, 可降低纳米乳的毒性, 改善纳米乳制剂的安全性, 为开发绿色新型的纳米乳制剂提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; C25 实验室分散乳化均质机, 上海恒川机械设备有限公司; AH100D 高压均质机, 加拿大 ATS 公司; NICOMP 380ZLS 型激光粒度测定仪, 美国 PSS 粒度仪公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; DDS-11C 电导率仪, PHs-2F pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; XMI9007-8 智能温湿度仪, 重庆英博实验仪器有限公司; 80-1 型离心沉淀器, 江苏正

基仪器有限公司; UV-6100 型紫外分光光度仪, 上海美谱达仪器有限公司; Tecnai G2 型透射电子显微镜 (TEM), 美国 Fei 公司。

1.2 材料

葛根素对照品 (批号 MUST-19042007, 质量分数 99.71%), 成都曼斯特生物科技有限公司; 葛根素 (批号 GL20190420, 质量分数 98%)、甘草酸 (批号 GB20181108, 质量分数 98%), 西安小草植物科技有限责任公司; 辛酸甘油酯 (CT, 食品级)、肉豆蔻酸异丙酯 (IPM, 日化级)、棕榈酸异丙酯 (PI, 日化级), 山东优索化工科技有限公司; 油酸 (OC)、蓖麻油 (CO)、甲醇, 均为分析纯, 成都市科隆化学有限公司; 油酸乙酯 (批号 20180926, 质量分数 98.0%~100.0%), 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司; 普通型透析袋 MD1444-5m (8 000~14 000), 上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 葛根素含量测定

2.1.1 色谱条件^[31-32] 色谱柱为 Agilent EP-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (25:75); 检测波长 250 nm; 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 min/mL; 进样体积 5 μL。

2.1.2 溶液的配制^[33] 精密称取葛根素对照品 10.5 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声溶解并定容至刻度线, 配制质量浓度为 210 μg/mL 的葛根素对照品溶液。

精密吸取 Pue-NE 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声 5 min 破乳后, 静置, 甲醇定容至刻度线, 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

取空白纳米乳溶液按供试品溶液配制方法制备阴性对照溶液。

2.1.3 专属性考察 分别将对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液进样高效液相色谱仪, 记录各进样色谱图, 结果见图 1, 葛根素在供试品溶液和对照品溶液中的出峰位置一致, 样品中其他成分对葛根素含量测定无影响。

2.1.4 线性关系考察 精密配制质量浓度为 21.0、63.0、105.0、147.0、189.0、231.0 μg/mL 的葛根素对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 进样 5 μL,

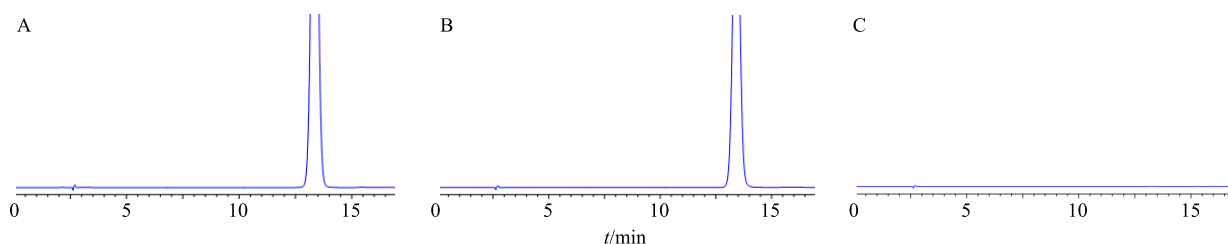


图 1 葛根素对照品 (A)、Pue-NE 样品 (B) 和阴性对照溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of Pue reference substance (A), Pue-NE sample (B) and negative control solution (C)

以葛根素对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 得回归方程为 $Y=17.993 X+16.591$, $r^2=0.999 4$, 结果表明葛根素在 $21.0\sim 231.0\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.5 精密度考察 精密吸取葛根素质量浓度为 $189.0\ \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 进样 $5\ \mu\text{L}$, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算标准偏差 (SD) 为 3.85, 相对标准偏差 RSD 为 0.11%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批新鲜制备的 Pue-NE 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 进样 $5\ \mu\text{L}$, 记录峰面积, 计算葛根素质量浓度的 RSD 为 0.33%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取新鲜制备的 Pue-NE, 按“2.1.2”项下方法 8 制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别在制备后的 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样 $5\ \mu\text{L}$, 记录峰面积, 计算其 RSD 为 2.21%, 表明 Pue-NE 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取已知质量分数的 Pue-NE $1\ \text{mL}$ 于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 平行操作 9 份, 分别精密加入 $2\ \text{mL}$ 质量浓度为 63.0 、 105.0 、 $147.0\ \mu\text{g/mL}$ 的葛根素对照品溶液, 各 3 份, 加适量甲醇超声溶解并定容至刻度线, 制得含低、中、高质量浓度葛根素的供试品溶液, 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.1.1”项下色谱条件进样 $5\ \mu\text{L}$, 记录峰面积, 计算低、中、高不同质量浓度的平均加样回收率分别为 95.84%、97.87%、99.36%, RSD 依次为 0.46%、0.43%、0.22%, 表明该方法准确性良好。

2.2 NE 的制备

精密称取一定量的葛根素原料药, 加入到体积分数为 5% 的 CT 中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为油相; 精密称取 $160\ \text{mg}$ 甘草酸加入到 $80\ \text{mL}$ 的去离子水中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为

水相。将水相转入油相, 置于一定转速的高速剪切机下剪切 2 min 后, 转入高压均质机中于 $100\ \text{MPa}$ 下均质 6 次, 即得 Pue-NE。

在不加原料药的条件下, 按 Pue-NE 的制备方法制备, 即得空白纳米乳。

2.3 Pue-NE 制备参数的单因素考察

2.3.1 葛根素质量浓度 精密称取不同质量的葛根素原料药, 按“2.2”项下方法制备 Pue-NE, 对葛根素质量浓度进行筛选, 结果见表 1。综合考虑 Pue-NE 的平均粒径和多分散指数 (PDI), 确定葛根素质量浓度为 $5.0\ \text{mg/mL}$ 。

表 1 葛根素质量浓度对 Pue-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Effect of the concentration of puerarin on average particle size and PDI of Pue-NE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

葛根素/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	平均粒径/nm	PDI
1.25	190.4 ± 1.2	0.174 ± 0.033
2.50	188.3 ± 2.1	0.151 ± 0.031
3.75	187.1 ± 7.8	0.133 ± 0.018
5.00	184.3 ± 2.0	0.114 ± 0.027
6.25	186.9 ± 7.7	0.124 ± 0.011
7.50	192.1 ± 3.8	0.135 ± 0.012

2.3.2 高速剪切转速 精密称取 $400\ \text{mg}$ 的葛根素原料药, 在不同的高速剪切转速下, 按“2.2”项下方法制备 Pue-NE, 对高速剪切转速进行筛选, 结果见表 2。综合考虑 Pue-NE 的平均粒径和 PDI, 确定高速剪切转速为 $19\ 000\ \text{r/min}$ 。

2.4 响应面法优化 Pue-NE 处方

2.4.1 星点设计 (central composite design, CCD) 试验^[34] 在前期试验的基础上, 以葛根素质量浓度 (A)、甘草酸质量浓度 (B)、CT 用量 (C) 为影响因素, 分别以 Pue-NE 的平均粒径 (Y_1) 和 PDI (Y_2) 的总评归一值 (OD) 为评价指标, 采用 3 因素 3 水平的 CCD-效应面法进行试验设计。因素与水平及试验安排与结果见表 3。

表 2 高速剪切转速对 Pue-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of high-speed shearing speed on average particle size and PDI of Pue-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

转速/(r·min ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
10 000	200.0±2.4	0.183±0.017
13 000	198.1±5.3	0.172±0.007
16 000	195.7±3.5	0.169±0.039
19 000	182.0±3.2	0.104±0.022
22 000	188.7±3.3	0.111±0.005
25 000	195.1±7.5	0.126±0.033

表 3 响应面试验因素与水平及安排与结果

Table 3 Factors and levels of response surface test and arrangement and results

编号	A/(mg·mL ⁻¹)	B/(mg·mL ⁻¹)	C/mL	Y ₁ /nm	Y ₂	OD
1	4.375 (-1)	2.25 (+1)	4.0 (0)	191.5	0.119	0.397
2	5 (0)	1.75 (-1)	4.5 (+1)	198.3	0.101	0.320
3	5 (0)	2.00 (0)	4.0 (0)	192.7	0.119	0.371
4	5 (0)	2.00 (0)	4.0 (0)	193.8	0.117	0.369
5	5 (0)	2.25 (+1)	3.5 (-1)	197.5	0.114	0.281
6	5.625 (+1)	2.00 (0)	4.5 (+1)	192.0	0.095	0.636
7	5.625 (+1)	2.00 (0)	3.5 (-1)	190.0	0.113	0.510
8	5.625 (+1)	2.25 (+1)	4.0 (0)	201.0	0.133	0.000
9	4.375 (-1)	2.00 (0)	4.5 (+1)	192.3	0.103	0.556
10	5 (0)	2.00 (0)	4.0 (0)	192.5	0.111	0.470
11	4.375 (-1)	2.00 (0)	3.5 (-1)	189.5	0.090	0.765
12	5 (0)	2.25 (+1)	4.5 (+1)	188.4	0.085	0.846
13	5 (0)	2.00 (0)	4.0 (0)	193.3	0.120	0.344
14	4.375 (-1)	1.75 (-1)	4.0 (0)	200.1	0.114	0.142
15	5.625 (+1)	1.75 (-1)	4.0 (0)	190.6	0.125	0.314
16	5 (0)	2.00 (0)	4.0 (0)	194.2	0.116	0.370
17	5 (0)	1.75 (-1)	3.5 (-1)	183.4	0.088	0.968

$$OD = (d_1 \times d_2 \cdots \times d_n)^{1/n}$$

$$d_i = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

d 为各指标归一值, n 为指标数, Y_i 为实验值, $Y_{\max}$ 和 $Y_{\min}$

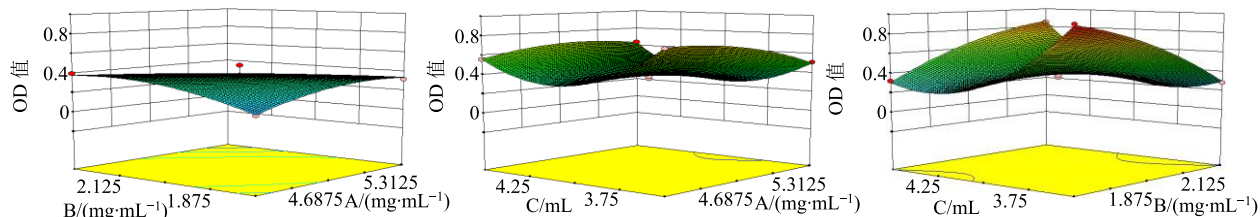


图 2 葛根素质量浓度 (A)、甘草酸质量浓度 (B)、CT 用量 (C) 对 OD 值影响的效应曲面图

Fig. 2 Curves of effect of puerarin concentration (A), glycyrrhizic acid concentration (B), and capric acid glyceride dosage (C) on OD value

分别为每一指标在各自所有试验中的最大值与最小值

2.4.2 模型拟合 应用 Design-Expert 8.0.6 软件, 对 OD 值进行多元回归 2 次多项式拟合, 得到回归方程 $Y_{OD} = 0.38 - 0.050 A - 0.027 B - 0.021 C - 0.14 AB + 0.084 AC + 0.30 BC - 0.079 A^2 - 0.092 B^2 + 0.31 C^2$, 方差分析结果表明, 回归模型 $P < 0.000 1$, 失拟项水平不显著 ($P > 0.05$), 说明模型拟合良好; 回归方程拟合决定系数 r^2 为 0.988 4, 预测决定系数 (r_{pred}^2) 为 0.957 9, 校正决定系数 (r_{adj}^2) 为 0.973 6, 说明该模型可以解释 97.36% 的响应值变异, 且方程拟合程度较好。模型变异系数为 $8.88\% < 10\%$, 表明模型准确度高。精密度值是有效信号与噪音的比值, 为 $31.355 > 4$, 说明模型合理, 表明该模型可用于设计分析。

2.4.3 CCD 效应面处方优化 根据平均粒径和 PDI 越小, OD 值越大的标准, 结合效应面图 (图 2), 预测出最优处方葛根素质量浓度为 5.02 mg/mL, 甘草酸质量浓度为 1.75 mg/mL, CT 用量为 3.5 mL, OD 预测值 0.955。为使测定结果更加准确, 修正最优处方为葛根素质量浓度 5 mg/mL, 甘草酸质量浓度 1.75 mg/mL, CT 3.5 mL。

2.5 验证工艺

根据上述修正的最优处方, 平行制备 3 批 Pue-NE, 测得平均粒径为 (184.5 ± 0.8) nm, PDI 为 0.088 ± 0.002 , 平均 OD 值为 0.941 ± 0.009 , 与预测值比较结果见表 4, 各实测值与预测值接近, 表明采用总评归一值法得到的回归方程预测性良好, 且具有良好的重现性。

2.6 理化性质考察

2.6.1 Pue-NE 类型的鉴别^[35] 采用染色法进行乳剂类型的鉴别。取等量的 Pue-NE 于 2 支试管中, 分别加入适量且等量的亚甲基蓝 (水溶性染料) 和苏丹红 III (油溶性染料), 比较 2 种染料在 Pue-NE 中的扩散快慢。结果显示, 亚甲基蓝在 Pue-NE 中的扩散速度快于苏丹红 III, 表明 Pue-NE 为 O/W 型

表4 处方优化的验证实验 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Verification test of optimal prescription ($\bar{x} \pm s, n=3$)

评价指标	预测值	实测值	偏差/%
粒径/nm	183.7	184.5±0.8	-0.44
PDI	0.087	0.088±0.002	-1.15
OD 值	0.955	0.941±0.009	1.47

纳米乳。

2.6.2 Pue-NE 的微观形貌 取 Pue-NE 适量, 加入蒸馏水稀释数倍后滴加到铜网表面, 用滤纸吸去多余液体, 以 2% 磷钨酸溶液 (pH 7) 负染 5 min, 滤纸吸去多余液体, 自然晾干, 分别在 50 nm 和 100 nm 尺寸下用 TEM 观察 Pue-NE 的微观形貌, 结果见图 3, Pue-NE 呈圆球形, 大小均匀, 乳滴之间无粘连, 成型性好。

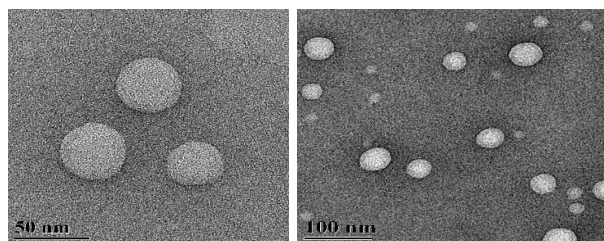


图3 Pue-NE 的 TEM 形态图

Fig. 3 TEM chromatogram of Pue-NE

2.6.3 溶解度测定 采用 HPLC 法测得 Pue-NE 中葛根素的溶解度为 (4.970±0.008) mg/mL, 平均载药量为 (99.4±0.2) % ($n=3$)。

2.6.4 pH 值的测定 按优化后的处方平行制备 3 批新鲜的 Pue-NE, 室温下采用 pH 计测定其 pH 值, 结果为 6.750±0.005 ($n=3$)。

2.6.5 电导率的测定 按优化后的处方平行制备 3 批新鲜的 Pue-NE, 室温下采用电导率仪测得其电导率为 (98.3±0.4) $\mu\text{S}/\text{cm}$ ($n=3$)。

2.6.6 Zeta 电位的测定 按优化后的处方制备新鲜的 Pue-NE, 经粒径仪测得其 Zeta 电位为 (10.56±

0.35) mV ($n=3$)。

2.6.7 浊度的测定^[36-37] 按优化后的处方制备新鲜的 Pue-NE, 精密吸取适量的纳米乳于 50 mL 量瓶中, 用去离子水稀释 1 000 倍, 采用紫外分光光度法在 680 nm 下测定其透光率, 光程长为 1 cm, 平行测定 3 次, 根据公式计算得其浊度为 (24.3±1.0) cm^{-1} ($n=3$)。

$$\tau = v/l \ln(I_0/I) = v/l \ln(1/T)$$

τ 为浊度, l 为光程长, v 为稀释倍数, I_0 为光透过参比测试样后照射到光电转换器上的强度, I 为光透过被测试样后照射到光电转换器上的强度, T 为透光率

2.7 离心稳定性考察

按优化后的处方制备新鲜的 Pue-NE, 室温下精密取 8 mL 于离心管中, 在 4 000 r/min 下离心 60 min, 观察 Pue-NE 的外观, 并测定纳米乳离心前、后的吸光度值 (A), 计算离心稳定常数 (K)。

2.7.1 外观 离心结果显示 Pue-NE 仍为乳白色均一状态, 未发生聚集、凝结、相分离和破乳, 表明 Pue-NE 稳定性良好。

2.7.2 K 值 按优化后的处方制备新鲜的 Pue-NE, 于离心前测定乳液的 A 值记为 A_0 , 离心后测定上清液的 A 值记为 A_1 , 平行测定 3 次, 根据公式 $K=A_1/A_0$ 计算 K 值, K 值越大, 表明 Pue-NE 的离心稳定性越好。计算结果分别为 $A_0=0.273\pm0.001$, $A_1=0.263\pm0.001$, $K=96.3\%$, 表明离心对 Pue-NE 的稳定性没有太大影响, Pue-NE 的离心稳定性良好。

2.8 储存稳定性考察^[38-39]

按优化后的处方平行制备 3 批新鲜的 Pue-NE, 分别于 4、25、60 $^{\circ}\text{C}$ 的药品稳定性试验箱中放置 20 d, 分别在第 0、5、10、15、20 天进行取样, 考察纳米乳的平均粒径、浊度及质量浓度的变化。结果见表 5。

2.9 体外释放度考察^[40-41]

精密吸取 Pue-NE 1 mL, 置于预先处理好的透

表5 Pue-NE 的储存稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Results of storage stability of Pue-NE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	粒径/nm			浊度/ cm^{-1}			质量浓度变化率/%		
	4 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$
0	180.9±2.2	182.4±1.2	183.0±2.8	17.1±1.8	24.3±1.0	17.8±1.2	0	0	0
5	184.1±5.0	183.4±2.3	195.1±4.0	13.1±1.8	15.1±3.5	17.5±2.4	6.1±0.0	1.8±0.0	8.9±0.0
10	186.1±1.2	193.6±1.2	203.3±1.6	22.2±1.1	35.6±1.1	29.1±0.6	4.6±0.0	1.5±0.0	6.4±0.0
15	185.8±4.6	192.0±4.7	195.1±3.2	24.6±0.6	36.0±2.1	40.1±2.2	0.5±0.0	0.3±0.0	5.9±0.0
20	192.5±1.0	188.9±2.7	200.2±1.8	19.5±0.6	25.7±4.3	31.5±1.0	2.7±0.0	0.8±0.0	3.8±0.0

析袋中,透析袋2端用棉线扎紧,平行制备3份,分别放入盛有100 mL的pH 1.2的盐酸溶液、pH 6.8的磷酸盐缓冲液(PBS)和蒸馏水的锥形瓶中,使透析袋完全浸没在液面之下,分别于0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、24 h末从锥形瓶中吸取透析液2 mL,并补足等温(37 °C)等量的透析介质,样品经微孔滤膜滤过后,按“2.1.1”项下方法进样5 μ L,测定葛根素的质量浓度,并绘制累积释放曲线,结果见图4。

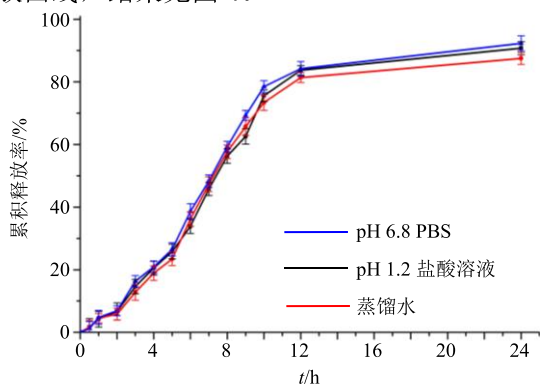


图4 Pue-NE在不同释放介质中的体外释放曲线($n=3$)
Fig. 4 *In vitro* release curves of Pue-NE in different release media ($n=3$)

3 讨论

课题组采用高速剪切联合高压均质法成功制备了以甘草酸为稳定剂的Pue-NE,具有简便快捷,制得成品粒径小、重现性好的优点。研究表明葛根素的溶解度为4.576 mg/mL^[42],含量测定结果显示Pue-NE中葛根素的溶解度为4.970 mg/mL,载药量达到99.4%,表明Pue-NE比原料药提高了0.1倍的溶解度。此外,体外累积释放率达到92%,可改善葛根素的口服生物利用度。

储存稳定性试验结果显示,第20天时,4 °C条件下的粒径增长率为6.4%,浊度变化率为14.0%,质量浓度变化率为2.7%;25 °C条件下的粒径增长率为3.6%,浊度变化率为5.8%,质量浓度变化率为0.8%;60 °C条件下的粒径增长率为9.4%,浊度变化率为77.0%,质量浓度变化率为3.8%。

分析稳定性试验结果,这是因为纳米乳是热力学不稳定体系,随着温度升高,分子运动速率加快,粒子之间会相互碰撞聚集;其次,升高温度会使甘草酸结构中的亲水基团脱水,不能形成稳定的胶束增溶体系,影响纳米乳的稳定性,最终导致纳米乳粒径和浊度增大,含量降低。另外,长时间低温储存会降低乳滴之间的分子热运动和布朗运动,使得

体系动力学稳定性降低^[43],导致乳滴不能克服重力作用,发生聚合、沉降,表现出粒径和浊度变大,含量降低。综合分析25 °C时,Pue-NE体系较为稳定,利于储存。

体外释放结果表明,24 h内Pue-NE在pH 6.8的PBS中累积释放度最大达到92%,与文献报道一致^[44]。这是因为甘草酸结构中含有羧基,呈酸性,在强酸性条件下对甘草酸的溶出抑制作用较大,使得释放介质中甘草酸质量浓度较低,降低其对葛根素的增溶作用,葛根素溶出度较小;再者,蒸馏水中的离子强度低于PBS中的,而离子强度增大会降低纳米乳的稳定性^[45],促进葛根素的溶出,所以蒸馏水中葛根素的溶出度低于PBS中的。此外,为进一步明确Pue-NE的安全性问题,课题组后续会开展动物实验,对Pue-NE的体内安全性进行评价。

参考文献

- [1] 任正肖,车萍,李紫薇,等.葛根素药理作用研究进展[J].山东化工,2019,48(19):74-75.
- [2] 黄亚光,王金凤,杜利鹏,等.葛根素调节AMPK-mTOR信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究[J].中草药,2019,50(13):3127-3133.
- [3] 蒋睿果,毕丹.葛根素注射液联合长春西汀治疗突发性耳聋的临床研究[J].现代药物与临床,2019,34(5):1430-1434.
- [4] Sun Y J, Zhang H M, Cheng M, et al. New hepatoprotective isoflavone glucosides from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(24): 3485-3492.
- [5] Zhang X D, Liu Q, Zhang C, et al. Puerarin prevents progression of experimental hypoxia-induced pulmonary hypertension via inhibition of autophagy [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 141(2): 97-105.
- [6] Hao C H, Wang W T, Shao M X, et al. Effects of puerarin on experimental model of retinal vein occlusion in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(2): 110-114.
- [7] Liang T, Xu X, Ye D, et al. Caspase/AIF/apoptosis pathway: A new target of puerarin for diabetes mellitus therapy [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(5): 4787-4797.
- [8] Wei S Y, Chen Y, Xu X Y. Progress on the pharmacological research of puerarin: A review [J]. *Chin J Nat Medicines*, 2014, 12(6): 407-414.
- [9] 万小敏,丁宇翔,赵兵杰,等.载葛根素的PEG修饰介孔硅纳米粒的制备及其对急性心肌梗死大鼠的保护作用[J].中草药,2018,49(8):1789-1795.
- [10] 王翠.葛根素注射液联合巴曲酶治疗突发性耳聋的临床疗效观察[J].药物评价研究,2018,41(11):

- 2061-2064.
- [11] 吴文婷, 邹斌, 李文栋, 等. 葛根素口服给药的药剂学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(19): 4134-4141.
- [12] 翟羽佳, 李凌冰. 葛根素纳米制剂的研究进展 [J]. 药学研究, 2016, 35(2): 97-99.
- [13] 翟美芳, 于莲. 葛根制剂研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(3): 232-236.
- [14] 龙凯花, 韩升笑, 胡晓佳, 等. 葛根素新型给药系统的研究进展 [J]. 辽宁化工, 2019, 48(5): 418-420.
- [15] 管雅文, 姚秋娥, 赵语, 等. 磷脂复合物技术在药物研究中的应用 [J]. 转化医学电子杂志, 2017, 4(11): 17-22.
- [16] Langridge T D, Gemeinhart R A. Toward understanding polymer micelle stability: Density ultracentrifugation offers insight into polymer micelle stability in human fluids [J]. *J Control Release*, 2019, 12(38): 157-167.
- [17] 李因文, 田润, 王晓红, 等. 聚合物胶束纳米药物的研究进展 [J]. 高分子材料科学与工程, 2020, 36(1): 167-174.
- [18] 王建娜, 成日青, 萨仁高娃, 等. 脂质体作为药物载体的研究进展 [J]. 中南药学, 2019, 17(9): 1492-1498.
- [19] 蔡晓婧, 张华. 中药自微乳化释药系统的研究进展 [J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3586-3589.
- [20] 李法威, 付京, 李萍. 微乳技术在中药分析中的研究进展 [J]. 中国药物经济学, 2018, 13(6): 109-112.
- [21] 付亭亭, 左文宝, 郭钰铄, 等. 固体分散体的释药机制及其物理稳定性研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(3): 275-280.
- [22] 张卉. 药用辅料对药品安全性的影响 [J]. 生物化工, 2017, 3(6): 118-120.
- [23] 张琳琳, 李小芳, 宋佳文, 等. 甘草酸为稳定剂的葛根素纳米乳冻干粉的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2929-2936.
- [24] 张燕芳, 顾艳丽, 乌日娜, 等. 中药提取物纳米乳及其药代动力学研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 34-38.
- [25] Li T, Huang J, Wang Q, *et al.* Resveratrol and linseed oil co-delivered in O/W nanoemulsions: Preparation and characterization [J]. *Integr Ferroelectr*, 2018, 190(1): 101-111.
- [26] 廖艳梅, 李小芳, 刘罗娜, 等. 纳米乳液在中药制剂领域的研究进展 [J]. 中药与临床, 2019, 10(Z1): 50-56.
- [27] 纪倩, 陈敬华. 纳米乳的研究进展及应用 [J]. 今日药学, 2017, 27(12): 859-864.
- [28] 李艳萍, 张志荣. 纳米乳的研究进展及其应用 [J]. 华西药学期刊, 2010, 25(4): 485-488.
- [29] Dasgupta N, Ranjan S, Gandhi M. Nanoemulsion ingredients and components [J]. *Environ Chem Lett*, 2018, 17(2): 917-928.
- [30] 唐海龙, 李小芳, 龙家英, 等. 以甘草酸为稳定剂制备水飞蓟素纳米混悬剂及稳定机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 971-977.
- [31] 唐瑜, 吕紫璇. 鸢都感冒颗粒中葛根素定量研究 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(71): 136-138.
- [32] Zhang Y F, Yuan J, Wang Y, *et al.* LC-MS/MS determination and pharmacokinetics study of puerarin and daidzein in rat plasma after oral administration of Gegenqinlian decoction and *Radix Puerariae* extract [J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(39): 241-248.
- [33] 牛莉, 于泓苓. 探讨感冒胶囊中葛根素的含量测定及其制剂分析 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(22): 37-38.
- [34] 赵甜甜, 李小芳, 孙强, 等. CCD 效应面结合多指标法优化黄芩总黄酮纳米混悬剂处方及其体外溶出研究 [J]. 中药材, 2018, 41(12): 2866-2870.
- [35] 何文, 吴文英. O/W 型硝苯地平透皮纳米乳的制备及质量评价 [J]. 中国药师, 2017, 20(4): 668-673.
- [36] 廖艳梅, 李小芳, 刘罗娜, 等. 橙皮苷纳米乳液的制备及其稳定性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 61-67.
- [37] Agustsson J, Akermann O, Barry D A, *et al.* Non-contact assessment of COD and turbidity concentrations in water using diffuse reflectance UV-Vis spectroscopy [J]. *Environ Sci-Proc Imp*, 2014, 16(8): 1897-1902.
- [38] 魏玉, 康冰亚, 张明昊, 等. 紫草素纳米乳的制备及其稳定性考察 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(12): 122-125.
- [39] Mazzarino L, Da Silva Pitz H, Lorenzen Voyten A P, *et al.* Jaboticaba (*Plinia peruviana*) extract nanoemulsions: Development, stability, and *in vitro* antioxidant activity [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 44(4): 643-651.
- [40] 赵惠茹, 范可可, 靖会, 等. pH 对芸香苷纳米乳的体外释放和稳定性的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(22): 26-29.
- [41] Quan S, Lin Y, Xue L C, *et al.* Evaluation of release behaviors of pyridostigmine bromide nanoemulsion *in vitro* [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2015, 35(2): 132-135.
- [42] 王展. 制剂新技术提高葛根素溶解性能的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [43] 陈良红, 李琼, 刘晓慧, 等. 纳米乳液的研究进展 [J]. 日用化学工业, 2013, 43(5): 377-381.
- [44] 刘晓微, 卓虹伊, 徐霞, 等. 基于甘草酸增溶作用的葛根素分散片研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1350-1356.
- [45] 甘凌. 负载植物甾醇纳米乳液的制备及其稳定性研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.