紫苏精油纳米乳的处方工艺研究与初步质量评价

钟　钰，胡鹏翼*，郑　琴*，况宛宛，刘姗姗，朱丽云，帅书苑，杨　明
江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室，创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室，江西 南昌 330004

摘　要：目的　采用紫苏 *Perilla frutescens* 为模型药，制备紫苏精油纳米乳，进行处方工艺研究与初步质量评价。**方法**　根据紫苏精油在各辅料中的溶解量确定助表面活性剂，采用亲水亲油平衡值（HLB）值法初步筛选适宜水包油型（O/W）纳米乳的表面活性剂，进一步筛选具备用量安全性的表面活性剂，确定纳米乳处方组成。通过绘制伪三元相图，综合比较纳米乳区域大小、载药量、含水量，以及电导率、黏度、粒径及分布、稳定性等优化处方；研究对优化处方工艺的紫苏精油纳米乳的外观质量与形态、相关理化性质（黏度、pH 值、电导率、Zeta 电位、粒径及分布）、稳定性、体外渗透性以及鼻黏膜刺激性进行考察。**结果**　优化的紫苏精油纳米乳处方为 14.3%紫苏精油-9.5% Transcutol P-19.1% Labrasol-57.1%水；根据优化的处方制备的紫苏精油纳米乳均一、透明、澄清，流动性良好，黏度（3.68±0.17）mPa·s；pH 值为 6.18±0.03，电导率为（109.61±0.89）μS/cm，Zeta 电位为（−7.08±1.82）mV；平均粒径为（49.98±1.55）nm；透射电镜实验结果表明，紫苏精油纳米乳乳滴为球形，粒径大小均在 100 nm 以内；紫苏精油纳米乳具备离心稳定性、稀释稳定性、长期稳定性以及温度稳定性；于常温未密封的条件下储存 1 个月与 6 个月后紫苏精油纳米乳与紫苏精油的平均紫苏醛含量变化百分比分别为 1.8%和 17.48%；鼻黏膜刺激性实验结果表明，紫苏精油纳米乳给药组与空白生理盐水组无显著差异。**结论**　研究制备优化处方工艺的紫苏精油纳米乳，其外观形态、相关理化性质符合纳米乳质量要求，具备药物稳定性、药物渗透性以及安全性。

关键词：紫苏；精油；纳米乳；伪三元相图；药物稳定性；质量评价；刺激性
中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2020)22 - 5714 - 09
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.007

Study on prescription process of nanoemulsion of *Perilla frutescens* essential oil and preliminary quality evaluation

ZHONG Yu, HU Peng-yi, ZHENG Qin, KUANG Wan-wan, LIU Shan-shan, ZHU Li-yun, SHUAI Shu-yuan, YANG Ming
Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, State Key Laboratory of Innovation Drug and Effcient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective　Using *Perilla frutescens* as a model drug, the nanoemulsion of *Perilla frutescens* essential oil (PFEO) were prepared, and the formulation process research and preliminary quality evaluation were carried out. **Methods**　The cosurfactants were determined according to the amount of PFEO dissolved in various excipients. The HLB value method was used to preliminarily screen surfactants suitable for oil-in-water (O/W) nanoemulsions, and the surfactants with dosage safety were further screened to determine the composition of nanoemulsion formulations. By drawing a pseudo-ternary phase diagram, the nanoemulsion region size, drug loading, water content, and conductivity, viscosity, particle size, distribution, and stability was comprehensively compared to optimize the prescription. This study investigated the appearance, physicochemical properties (viscosity, pH value, conductivity,

收稿日期：2020-06-23
基金项目：江西省科技创新人才重点项目（“5511”工程专项）（20171BCB18001）；中药精油关键技术与中医香疗健康产品研发及产业化项目（20194ABC28009）；江西省一流学科项目（JXSYLXK- ZHYA0091）；江西省一流学科项目（JXSYLXK-ZHYA0092）；江西省大学生创新创业训练计划项目（S202010412062，S202010412052）
作者简介：钟　钰（1994—），在读硕士，研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791)87118658　E-mail: yubaoai1019@163.com
***通信作者**　胡鹏翼，副教授，硕士生导师，研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791)87118658　E-mail: hpy820515@126.com
郑　琴，教授，博士生导师，研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791)87118658　E-mail: zhengqin912006@163.com

electrical conductivity, particle size, Zeta potential), stability, *in vitro* permeability properties and nasal mucosa irritation of the nanoemulsion of PFEO. **Results** The final optimized nanoemulsion formulation was 14.3% PFEO-9.5% Transcutol P-19.1% Labrasol-57.1% water. The nanoemulsion of PFEO prepared according to the optimized prescription was uniform, transparent, clear, with good fluidity. The viscosity was (3.68 ± 0.17) mPa·s, pH value was (6.18 ± 0.03), the electrical conductivity was (109.61 ± 0.89) μS/cm, the Zeta potential was (−7.08 ± 1.82) mV, and the particle size was (49.98 ± 1.55) nm. The results of transmission electron microscope experiment showed that, the droplets of PFEO nanoemulsion were spherical with the particle size within 100 nm. The stability test results showed that the nanoemulsion of PFEO had centrifugal stability, dilution stability, long-term stability and temperature stability. After storage at room temperature and unsealed for one month and six months, the percentage change of the average perillaldehyde content of PFEO nanoemulsion and PFEO was 1.8% and 17.48%, respectively. The nasal mucosal irritation test results showed that the PFEO nanoemulsion administration group had no significant difference from the blank saline group. **Conclusion** The appearance and related physical and chemical properties of PFEO nanoemulsion prepared by optimized prescription process meet the quality requirements of nanoemulsion, with drug stability, drug permeability and safety.

Key words: *Perilla frutescens* (L.) Britt.; essential oil; nanoemulsion; pseudo-ternary phase diagram; drug stability; quality evaluation; irritability

紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt.含有丰富的挥发油类成分，中药药理学指出，紫苏具有理气解郁、行气止痛的功效[1]，因此紫苏精油对抑郁症等疾病可能具有潜在的治疗作用。研究发现，紫苏精油能够改善慢性轻度不可预见性的应激（CUMS）诱导的抑郁样行为，其机制为调控海马脑源性神经营养因子（BDNF）的表达[2]。紫苏精油对 CUMS 诱导的抑郁小鼠具有显著的抗抑郁作用，其机制可能与调控 5-羟色胺能系统以及抗炎作用有关[3]。紫苏精油是一种亲脂性药物，为油状液体，主要缺点是具有高挥发性，药物稳定性较低[4-5]，因而不易长期储存，如保存不当将使其药用活性成分含量降低或丧失。因此，研究改善与提升紫苏精油药物稳定性的途径，对于紫苏精油的基础研究、产品开发以及临床应用具有重要意义。研究表明，纳米乳具有抗沉降、乳析的动力学稳定性，能够提升紫苏精油的药物稳定性[6-7]。因而将紫苏精油作为纳米乳油相，通过将紫苏精油封装在纳米乳中保护紫苏精油免受环境因素的降解[8]，防止紫苏精油在储存和应用过程中药效降低或丧失[9]。纳米乳给药系统具有药物渗透性，包载紫苏精油药物活性成分通过鼻腔给药经嗅觉通路（嗅黏膜上皮通路、嗅神经通路）能够到达中枢神经系统发挥治疗作用[10-11]。本实验研制紫苏精油纳米乳目的在于提高紫苏精油的药物稳定性与药物渗透性，为紫苏精油纳米乳制剂的研发与治疗抑郁症等疾病的临床应用提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SD 大鼠，雄性，体质量 220～240 g，江西中医药大学动物实验动物中心提供，实验动物许可证号 SCXK（赣）2013-0020。经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查通过，批准号 JZLLSC2018-0037。

1.2 主要药品与试剂

紫苏叶，江西樟树天齐堂中药饮片有限公司，批号 1812008，经江西中医药大学药学院刘荣华教授鉴定为唇形科紫苏属植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt.的干燥叶；紫苏醛对照品，HPLC 峰面积归一化法测得质量分数为 99.21%，Solarbio 公司，批号 519A022；二乙二醇单乙基醚（Transcutol P）、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯（Labrasol）、聚乙二醇 200（PEG 200）、聚乙二醇 400（PEG 400）、聚氧乙烯蓖麻油（Cremephor EL，CEL）、聚氧乙烯氢化蓖麻油（Cremephor RH 40，RH40）、泊洛沙姆 407、聚山梨酯-80、PBS 缓冲液（批号 20190505），Solarbio 公司；无水乙醇、1,2-丙二醇、丙三醇、磷钨酸、去氧胆酸钠均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；液相用甲醇为色谱纯；蒸馏水为自制双蒸水。

1.3 主要设备及仪器

Agilent 7890A 气相色谱-5975 质谱联用仪、Agilent1260 HPLC 系统化学工作站，美国 Agilent 公司；色谱柱为 Dikma ODS 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），美国 Phenomenex 公司；Nano-S 马尔文纳米粒度仪和 Zeta 电位分析仪，英国 Malvern 公司；B11-3 型恒温磁力搅拌器，上海司乐仪器有限公司；MCR101 型流变仪，奥地利 Anton Paar 公司；DDS-307A 型电导率仪，上海精密科学仪器有限公司；KQ5200B 超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；EL104 电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；Tecnai G2 Spirit TWIN 透射电子显微镜

（TEM），美国 FEI 公司；TT-6D Franz 扩散池，天津正通科技有限公司；TK-20B 扩散试验仪，上海鍇凯科技贸易有限公司。

2　方法与结果

2.1　紫苏精油的制备

取紫苏叶适量，精密称取紫苏叶，采用水蒸气蒸馏法，参考《中国药典》2015 年版挥发油甲法进行挥发油提取，收集紫苏精油。采用 GC-MS 分析紫苏精油的主要化学成分，其中含量最高的是紫苏醛，占比为 54.37%，备用。

2.2　紫苏醛 HPLC 含量测定方法学考察

2.2.1　HPLC 色谱条件　色谱柱为 Dikma ODS 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-水（80∶20）；柱温 25 ℃；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 230 nm；进样量 10 μL。

2.2.2　对照品溶液制备　精密称取 60.5 μg 紫苏醛对照品至 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇超声溶解，定容至刻度，摇匀，配制成紫苏醛质量浓度为 605 μg/mL 的溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液，即得对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液制备　精密吸取 1 mL 紫苏精油至 100 mL 棕色量瓶中，加入适量甲醇，超声 30 min 后，静置 10 min，用甲醇定容至 100 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液，即得供试品溶液。

2.2.4　专属性考察　分别取对照品溶液与供试品溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液加入样品瓶，采用 HPLC 法，按“2.2.1”项色谱条件，测定对照品（紫苏醛）和供试品（紫苏精油）的特征峰色谱图，记录保留时间。结果如图 1 所示，紫苏醛对照品峰形良好；紫苏精油在紫苏醛峰处无干扰。

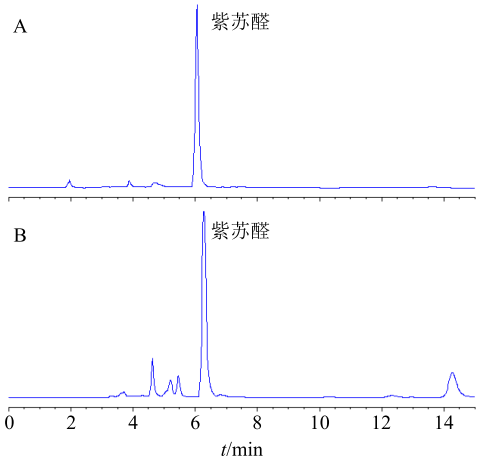


图 1　紫苏醛对照品 (A) 和紫苏精油样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1　HPLC of perillaldehyde reference substance (A) and PFEO (B)

2.2.5　线性关系考察　精密吸取紫苏醛对照品溶液 0.05、0.10、0.30、0.50、1.00、2.00、3.00 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加入甲醇后超声溶解，定容至刻度，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液加入样品瓶，配制成质量浓度分别为 3.025、6.050、18.150、30.250、60.500、121.000、181.500 μg/mL 的紫苏醛对照品溶液。按“2.1.1”项色谱条件进样，测定峰面积，以峰面积（y）对质量浓度（x）进行线性回归，得回归方程 $y=28.454\ x+96.869$，$r=0.999$，结果表明紫苏醛在 3.025～181.500 μg/mL，峰面积与质量浓度呈良好的线性关系。

2.2.6　精密度试验　取紫苏醛对照品溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液加入样品瓶，按“2.2.1”项色谱条件，重复进样 6 次，记录紫苏醛的峰面积，计算其 RSD 值为 0.18%，结果表明仪器精密度良好。

2.2.7　稳定性试验　取供试品溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液加入样品瓶，按“2.1.1”项色谱条件，分别于室温下放置 0、0.5、1、3、6、12 h 的供试品溶液进样，测定紫苏醛峰面积，计算其 RSD 值为 0.84%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.8　重复性试验　分别取 6 份紫苏精油，按“2.2.3”项下方法制得 6 份供试品溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液加入样品瓶，按“2.1.1”项色谱条件，测定紫苏醛峰面积，计算紫苏醛含量，结果其 RSD 值为 1.50%，表明该 HPLC 方法重复性良好。

2.2.9　加样回收率试验　精密量取已测定紫苏醛含量的紫苏精油共 6 份，分别加入一定量已知质量浓度的对照品溶液，加甲醇稀释至刻度，超声溶解混匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液加入样品瓶，按“2.2.1”项色谱条件测定紫苏醛峰面积，计算紫苏醛含量与加样回收率，平均加样回收率为 98.62%，RSD 值为 0.73%，表明该 HPLC 方法紫苏醛具有较好的加样回收率。

2.2.10　紫苏精油样品中紫苏醛含量测定　按“2.2.3”项方法制备供试品溶液，0.22 μm 微孔滤膜过滤后取续滤液加入样品瓶，按“2.2.1”项色谱条件进样，测定紫苏醛峰面积，计算出样品中紫苏醛的含量，换算得到紫苏精油样品中紫苏醛质量浓度。结果表明，样品（紫苏精油稀释 100 倍）中紫苏醛质量浓度为（20.395 2±0.364 7）μg/mL（$n=6$），

RSD 为 1.79%，即紫苏精油中紫苏醛质量浓度为（2 039.52±36.47）μg/mL（n=6）。

2.3 纳米乳处方的筛选

2.3.1 油相的筛选 通过预实验的研究发现，选用紫苏精油作为纳米乳油相能够形成均一、透明、流动性好的纳米乳，且能够提高载药量，因此本实验单独采用紫苏精油作为纳米乳的油相。

2.3.2 助表面活性剂的筛选 测定紫苏精油中紫苏醛分别在 PEG 200、PEG 400、Transcutol P、乙醇、1,2-丙二醇、丙三醇常用助表面活性剂中的溶解量。各取 6 mL 紫苏精油，分别加入 3 mL 上述各助表面活性剂，磁力搅拌混匀，超声溶解，待紫苏醛充分溶解在助表面活性剂中，于 8 000 r/min 离心 15 min，吸取助表面活性剂层溶液，稀释适当倍数，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液加入进样瓶，按“2.2.10”项方法测定各表面活性剂样品溶液中紫苏醛的含量，筛选其中对紫苏精油主要成分紫苏醛最大溶解量的药用辅料作为紫苏精油纳米乳的助表面活性剂。结果表明，紫苏精油在 Transcutol P、PEG 200、丙三醇、PEG 400、1,2-丙二醇、乙醇中的溶解度分别为 2 503.56、1 611.88、463.67、1 866.62、844.30、1 924.45 μg/mL。可见，紫苏醛在 Transcutol P 中的溶解度最大，从纳米乳的载药量角度考虑，因而选取对紫苏精油主要成分紫苏醛溶解量最大的 Transcutol P 为纳米乳的助表面活性剂。

2.3.3 表面活性剂的选择 实验制备的紫苏精油纳米乳为水包油型（O/W）纳米乳，首先采用亲水亲油平衡值（hydrophile-lipophile balance，HLB）法初步筛选表面活性剂，由于最适宜的水包油型（O/W）纳米乳的表面活性剂的 HLB 值为 8～18，因此初步选取聚山梨酯-80、Labrasol、泊洛沙姆 407、CEL、RH40 为表面活性剂考察对象。此外，纳米乳的制备需要符合安全性要求，提高载药量，应减小表面活性剂的用量，因而本实验筛选能够形成纳米乳且具备最少表面活性剂用量（MS_{min}）的表面活性剂。首先将油相紫苏精油与助表面活性剂按质量比 1∶2 混合均匀，再往紫苏精油与助表面活性剂混合体系中逐滴加入上述各表面活性剂，磁力搅拌混匀，取 0.1 mL 稀释 100 倍，观察油/水混合体系浑浊或澄清的状态，并测定粒径，记录形成纳米乳所需各表面活性剂的 MS_{min}，计算各表面活性剂在混合体系中所占的质量分数[12]。结果（表 1）表明能够形成紫苏精油纳米乳的 Labrasol、RH40 的 MS_{min} 分别在混合体系中所占质量分数为 14.28%、21.25%。以 MS_{min} 为考察对象，Labrasol 的 MS_{min} 在形成的纳米乳体系中所加入比例最小，因此在初步筛选的表面活性剂中 Labrasol 加入量最少即可形成纳米乳体系，使纳米乳体系能够具备较好的安全性的同时提高载药量，并且形成的纳米乳粒径最小，符合纳米乳的制备工艺要求，因此确定纳米乳表面活性剂为 Labrasol。

表 1 表面活性剂的筛选试验结果

Table 1 Results of surfactant screening experiments

表面活性剂	性状	粒径/nm
泊洛沙姆 407	浑浊	不能形成纳米乳
聚山梨酯-80	浑浊	不能形成纳米乳
Labrasol	澄清	121.2±1.26
CEL	浑浊	不能形成纳米乳
RH40	澄清	198.3±2.11

2.3.4 伪三元相图的绘制 首先配制不同 K_m 值（表面活性剂与助表面活性剂的质量比）分别为 1∶2、1∶1、2∶1、3∶1 的混合表面活性剂（表面活性剂与助表面活性剂混合物，S_{mix}），磁力搅拌混匀；将油相紫苏精油与 S_{mix} 分别按 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 的质量比例混合，磁力搅拌混匀；在室温的条件下，往混合体系中逐滴加水，磁力搅拌混匀；记录混合体系由澄清变为浑浊或由浑浊变为澄清的临界点的油相、表面活性剂、助表面活性剂、水相的比例，采用 Origin 2017 pro 软件绘制伪三元相图，并确定纳米乳区域。

2.3.5 优化纳米乳处方的确定 筛选纳米乳区域最大的伪三元相图，确定优化纳米乳处方的 K_m 值，在该 K_m 值的伪三元相图纳米乳区域中初步选取 5 个纳米乳的处方，每个处方平行配制纳米乳 3 份，分别对初步选取的 5 个纳米乳处方的电导率、黏度、粒径以及稳定性进行综合考察与比较。为了符合纳米乳安全性要求，减少药物辅料用量、提高载药量，综合多因素考虑确定优化纳米乳处方[12]。如图 2 所示，结果表明，伪三元相图中 K_m 值 0.5、1.0、2.0 纳米乳区域面积（图中阴影区域 A 区）呈增加的趋势，K_m 值由 2.0 增加到 3.0 纳米乳区域呈减小的趋势，伪三元相图中 K_m=2.0 时的纳米乳区域面积最大，故确定优化纳米乳处方的 K_m 值为 2.0，即表面活性剂与助表面活性剂的用量比值为 2.0。初步筛选 K_m 为 2 时伪三元相图纳米乳区域中 5 个处方，由表

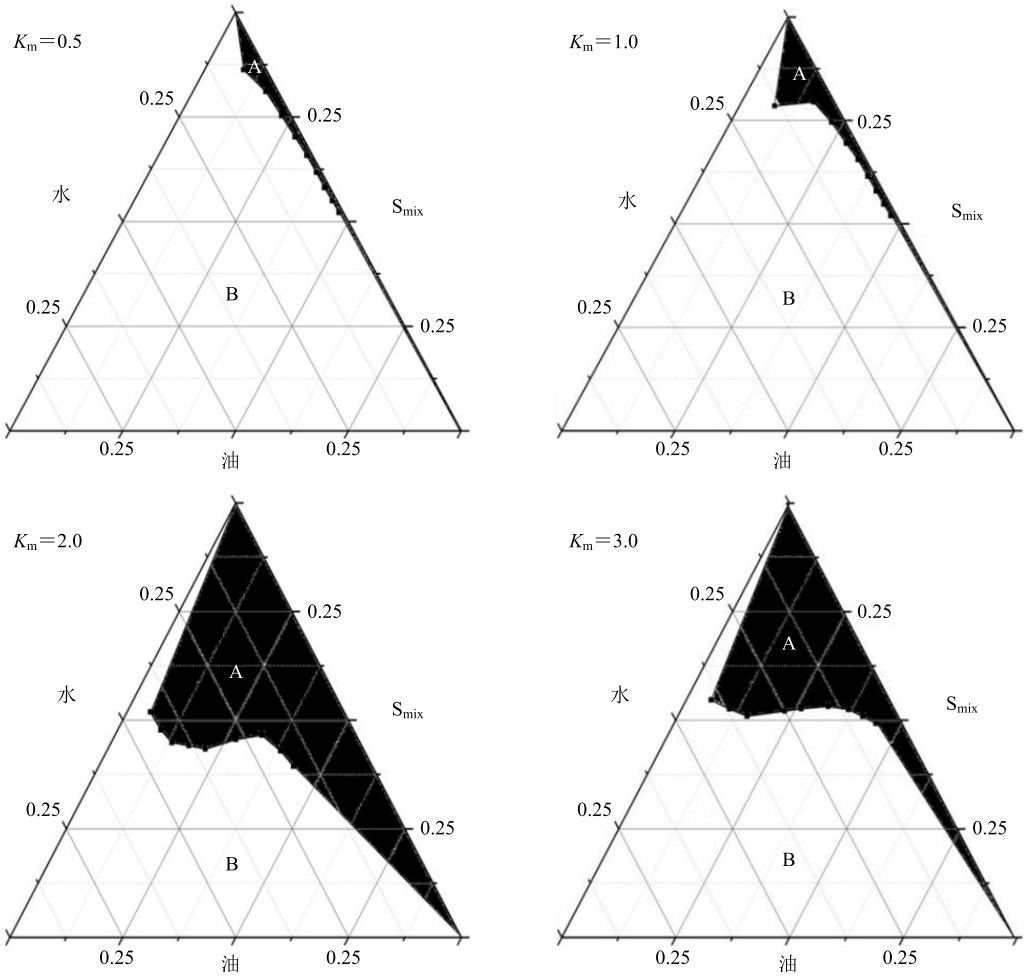


图 2　不同 K_m 值处方纳米乳伪三元相图分析结果

Fig. 2　Analysis results of pseudo-ternary phase diagrams of prescription nanoemulsions with different K_m values

2 结果可知，初步筛选的各处方纳米乳的电导率、黏度相近；稳定性考察结果表明，各处方纳米乳放置 3 个月后，处方 1～3 较处方 4 纳米乳的粒径变化小，提示处方 4 的稳定性较 1～3 处方弱；处方 5 放置 3 个月后呈浑浊体系，说明纳米乳体系结构膜已破坏，纳米乳转变为普通乳，提示处方 5 的稳定性较差。结果表明，综合考察纳米乳的安全性，符合减少辅料用量、提高载药量的制备工艺要求，确定优化处方为处方 1，即 14.3%紫苏精油-9.5% Transcutol P-19.0% Labrasol-57.1%水。

2.3.6　紫苏精油纳米乳制备工艺验证　称取 2 g 表面活性剂 Labrasol，1 g 助表面活性剂 Transcutol P（优化处方比例的 19.1% Labrasol 和 9.5% Transcutol P），磁力搅拌混匀，往混合体系中逐滴加入 1.5 g 紫苏精油（优化处方比例的 14.3%紫苏精油），磁力搅拌混匀，再往混合体系中逐滴加入优化处方比例的蒸馏水 6 g（最优处方比例 57.1%的蒸馏水），磁力搅拌混匀，直至形成均一、透明、稳定、流动性

表 2　处方的电导率、黏度、粒径以及稳定性的考察结果（$\bar{x} \pm s$, n = 3）

Table 2　Investigation results of conductivity, viscosity, particle size and stability of prescription ($\bar{x} \pm s$, n =3)

处方（油-S_{mix}-水）	电导率/(μS·cm^{-1})	黏度/(mPa·s)	粒径/nm	放置 3 个月（稳定性）的粒径/nm
1 (14.3∶28.6∶57.1)	112.83±0.63	3.79±0.50	50.28±1.56	51.67±1.02
2 (11.8∶29.4∶58.8)	127.03±0.60	3.65±0.26	65.42±1.84	67.11±1.30
3 (10∶30∶60)	123.19±0.58	3.11±0.09	97.85±1.51	99.28±1.48
4 (9.3∶34.9∶55.8)	130.79±0.35	2.51±0.07	92.37±1.44	96.43±0.95
5 (6∶36.2∶57.8)	135.91±0.60	2.61±0.01	120.21±1.62	浑浊（粒径大于 100 nm）

好的纳米乳，即得紫苏精油纳米乳，平行制备 3 批紫苏精油纳米乳。

2.4 紫苏精油纳米乳的外观质量与相关理化性质

考察优化处方制备的紫苏精油纳米乳的外观质量，测定黏度、pH 值、电导率、Zeta 电位以及粒径分布。根据优化处方制备的紫苏精油纳米乳的外观均一、透明、澄清（图 3），流动性良好，黏度为（3.68±0.17）mPa·s（n=3）；pH 值为 6.18±0.03（n=3），电导率为（109.61±0.89）μS/cm（n=3），Zeta 电位为（−27.08±1.82）mV（n=3）；紫苏精油纳米乳的平均粒径为（49.98±1.55）nm（n=3），多分散系数（PDI）为 0.200±0.011（n=3），呈正态分布。

图 3 紫苏精油纳米乳外观质量

Fig. 3 Appearance quality of PFEO nanoemulsion

2.5 紫苏精油纳米乳的外观形态

采用 TEM 对紫苏精油纳米乳的形态进行观察。将紫苏精油纳米乳进行染色制片。将载有支持膜的铜网置于蜡板上，在膜上滴加紫苏精油纳米乳 5 μL，自然晾干，再滴加 2%磷钨酸 5 μL 滴，自然晾干，用滤纸吸走多余的液体，置于 TEM 下观察并拍照。结果如图 4 所示，TEM 拍照结果显示，紫苏精油纳米乳乳滴为球形，外观圆整，粒径大小均在 100 nm 内。

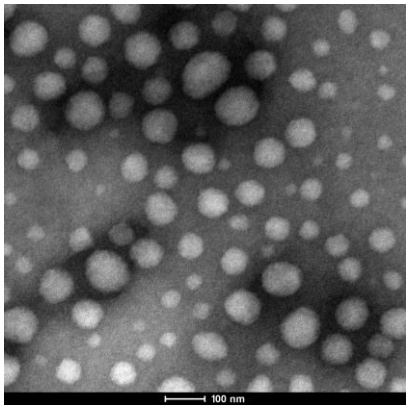


图 4 紫苏精油纳米乳的外观形态

Fig. 4 Morphology of PFEO nanoemulsion

2.6 紫苏精油纳米乳的稳定性考察

2.6.1 离心稳定性 将紫苏精油纳米乳在 8 000 r/min 的转速下离心 20 min，观察离心后其外观是否有变化，离心后纳米乳是否分层。结果表明，紫苏精油纳米乳离心后仍然澄清透明，未产生分层、破乳现象。

2.6.2 稀释稳定性 将紫苏精油纳米乳与蒸馏水按 100、200、1 000 倍的比例稀释后，未观察到分层现象，表明纳米乳具有良好的稀释稳定性。

2.6.3 长期稳定性 取紫苏精油纳米乳密封于样品瓶中，于常温放置 6 个月，分别在 1、3、6 个月后观察其外观和粒径变化情况。由表 3 可见，紫苏精油纳米乳在室温下长期放置 1、3、6 个月的外观形态、粒径均保持良好，未见分层、破乳现象，因此紫苏精油纳米乳具有长期稳定性。

表 3 长期稳定性考察（$\bar{x} \pm s$, n = 3）

Table 3 Long-term storage stability inspection ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

储存时间/月	外观	粒径/nm
1	澄清透明、未见分层以及破乳	51.38±1.73
3	澄清透明、未见分层以及破乳	52.67±2.39
6	澄清透明、未见分层以及破乳	55.92±2.81

2.6.4 温度稳定性 将紫苏精油纳米乳置于密闭器皿中，于 4、25、37 ℃不同温度条件下放置，观察其外观和粒径变化情况。由表 4 可见，将紫苏精油纳米乳置于密闭器皿中，于 4、25、37 ℃不同温度条件下放置的外观形态、粒径均保持良好，未见分层、破乳现象，因此紫苏精油纳米乳具有温度稳定性。

表 4 温度稳定性考察（$\bar{x} \pm s$, n = 3）

Table 4 Investigation of temperature stability ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

温度/℃	外观	粒径/nm
4	澄清透明、未见分层以及破乳	56.41±3.15
25	澄清透明、未见分层以及破乳	52.27±2.43
37	澄清透明、未见分层以及破乳	57.51±3.46

2.7 紫苏精油纳米乳与紫苏精油的紫苏醛含量稳定性比较

分别将紫苏精油纳米乳与紫苏精油置于样品瓶中，于常温未密封的条件下储存 6 个月，在 1、6 个月测定紫苏醛含量。按“2.2.3”项方法制备供试品溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液，按“2.2.1”项色谱条件进样，测定紫苏醛的含量。

研究结果表明，常温未密封的条件下储存 1 个月紫苏精油纳米乳中紫苏醛质量浓度为（770.05±29.22）μg/mL（n=3），储存 6 个月紫苏醛质量浓度（755.93±29.59）μg/mL（n=3），紫苏醛含量下降 1.8%；储存 1 个月紫苏精油中紫苏醛质量浓度为（2 042.67±53.18）μg/mL（n=3），储存 6 个月紫苏醛质量浓度为（1 685.67±48.99）μg/mL（n=3），紫苏醛含量下降 17.48%。因而紫苏精油纳米乳相对于紫苏精油具备较高的药物稳定性。

2.8　体外渗透性能考察

取同一批紫苏精油纳米乳各 2 mL，平行 5 组，分别加入 Franz 扩散池，渗透膜为透析袋，厚度均一，扩散室的有效扩散面积为 1.77 cm^2，接收室的体积为 12 mL，接收介质为 PBS 缓冲液，于 32 ℃、200 r/min 实验，分别于 1、2、4、6、8、10、12 h 吸取 1 mL 接收液，同时在接收室补加 1 mL PBS 缓冲液，将吸取的 1 mL 接收液 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，参照“2.2.10”项下方法，测定接收液中指标成分紫苏醛的含量，绘制紫苏精油纳米乳体外渗透动力学曲线，拟合动力学参数，比较单位面积累积渗透量（Q_n）和体外渗透动力学参数稳态渗透速率（J_s）[13]。

$$Q_n = C_n / A$$

$$J_s = C_n / A$$

$$C_n = C_{ni} + V_0 / V \sum_{i=1}^{n-1} C_{ps}$$

Q 为药物的累积渗透量，Q_n 为 t 时间单位面积累积渗透量，A 有效扩散面积，V 为接收液的总体积，V_0 为每次取样体积，C_{ni} 为 t 时间药物的实测质量浓度，C_{ps} 为 t 时前药物的实测质量浓度，C_n 为 t 时间药物的校正质量浓度

如图 5 所示，体外渗透动力学参数 J_s（6～12 h）为（259.67±15.57）μg/(cm^2·h)，12 h 单位面积累积渗透量 Q_{12} 为（7 260.74±380.78）μg/cm^2，可以看出，紫苏精油纳米乳具备药物渗透性。

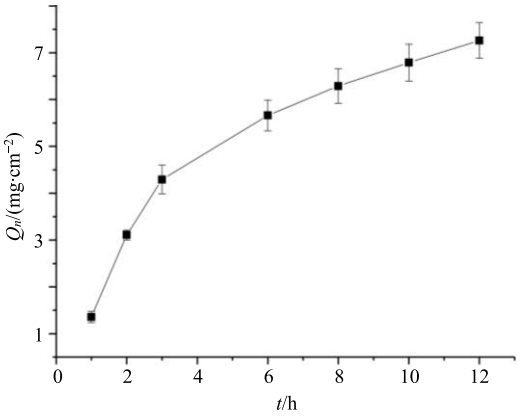


图 5　紫苏精油纳米乳体外渗透动力学曲线

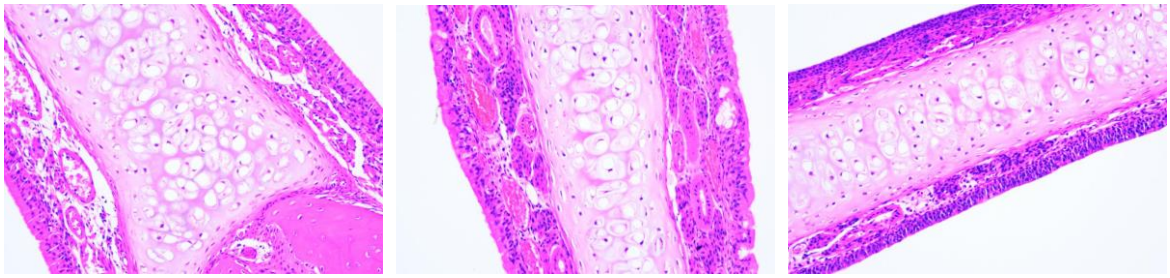
Fig. 5　Permeability kinetics curve of PFEO nanoemulsion

2.9　鼻腔黏膜刺激性实验

采用 SD 大鼠 12 只，雌雄各半，随机分组，分别为空白生理盐水组、阳性药 1%去氧胆酸钠组以及紫苏精油纳米乳给药组，每组 4 只。各组大鼠均采用连有塑料软管的微量注射器定量向左右鼻孔各注入 50 μL 药液（生理盐水），连续给药 7 d，每天给药 1 次。于末次给药后，采用 10%的水合氯醛 ip 麻醉大鼠，脱颈处死，取鼻中隔黏膜组织，4%多聚甲醛中固定，制备 HE 染色切片后，显微镜下观察并拍照，结果见图 6。可见，阳性药 1%去氧胆酸钠组的大鼠鼻腔黏膜出现大量的破损与炎症细胞浸润（炎症细胞通常细胞核较大，细胞核被苏木精染成鲜明的蓝色）；紫苏精油纳米乳给药组与空白生理盐水组比较无显著差异，大鼠鼻腔黏膜未出现显著的破损与炎症细胞浸润，因此紫苏精油纳米乳无显著的鼻黏膜刺激性，具备较好安全性。

3　讨论

本实验的研究目的在于筛选优化的紫苏精油纳米乳处方，研究纳米乳体系的最常用与最基本的方式是绘制伪三元相图，伪三元相图中纳米乳区域面积与纳米乳体系的载药量（油相）、表面活性剂、助表面活性剂以及含水量密切相关。因此本研究选择



空白　　紫苏精油纳米乳　　1%去氧胆酸钠

图 6　各组大鼠鼻腔黏膜 HE 染色图 (放大倍数×200)

Fig. 6　HE staining of nasal mucosa of each group of rats (magnification factor × 200)

伪三元相图为主要考察对象，筛选紫苏精油纳米乳的各相组分（油相、表明活性剂、助表面活性剂以及水）。初步选取 K_m 值最优的伪三元相图（伪三元相图中纳米乳区域面积最大）的 5 个处方。电导率、黏度、粒径及分布、稳定性是优化纳米乳处方的重要影响因素，因此综合考察上述影响紫苏精油纳米乳形成的主要因素优化处方的配比，确定紫苏精油纳米乳的优化处方。

从提高药物载药量的角度考虑，本研究直接以紫苏精油作为纳米乳处方的油相，筛选对主药紫苏精油（以紫苏醛为考察指标）溶解性好的 Transcutol P 为助表面活性剂。Transcutol P 作为助表面活性剂可扩大形成纳米乳区域，辅助表面活性剂形成柔性界面膜[13-14]。表面活性剂与助表面活性剂具有促渗透作用，但是随着表面活性剂与助表面活性剂用量的增加，易产生机体刺激性等安全性问题，因而优化处方应考虑表面活性剂与助表面活性剂的用量安全性[15]。本实验筛选能够形成紫苏精油纳米乳且用量最少的表面活性剂 Labrasol，属于非离子型表面活性剂，HLB 值在 8～18，符合制备 O/W 型纳米乳的要求，具备较高的药用辅料的用量安全性；同时，Labrasol 具备较高的 HLB 值 14，可降低界面张力并在油相与水相间形成界面膜，快速形成粒径小的水包油乳滴。此外，从药用辅料的安全性角度看，紫苏精油纳米乳的助表面活性剂 Transcutol P 与表面活性剂 Labrasol 为常用的口服、局部给药、透皮给药制剂的药用辅料，因此它们均具备较高的安全性。

伪三元相图的绘制结果表明，K_m 值由 0.5、1.0、2.0 纳米乳区域呈增加趋势，K_m 值由 2.0 增加到 3.0 纳米乳区域呈减小的趋势，故确定优化纳米乳处方的 K_m 值为 2.0，即表面活性剂/助表面活性剂的用量配比为 2∶1。初步筛选 K_m 值为 2 的伪三元相图中纳米乳区域的 5 个纳米乳处方，比较形成纳米乳的电导率、黏度、粒径、稳定性，综合考虑纳米乳载药量与安全性要求，筛选出优化的纳米乳处方为 14.3%紫苏精油-9.5% Transcutol P-19.1% Labrasol-57.1%水。本实验将紫苏精油作为纳米乳的油相，减少表面活性剂与助表面活性剂的用量，目的在于提高紫苏精油的药物稳定性，提高紫苏精油纳米乳的载药量与安全性。

本研究对优化处方工艺的紫苏精油纳米乳的外观质量与形态、相关理化性质（黏度、pH 值、电导率、Zeta 电位、粒径及分布）、稳定性、体外渗透性以及鼻黏膜刺激性进行考察。结果表明，优化处方工艺的紫苏精油纳米乳的外观均一、透明、澄清、流动性良好，相关理化性质符合纳米乳质量要求，具备药物稳定性、药物渗透性以及安全性。Zeta 电位是用来表示微粒表面荷电性质与荷电大小的物理量，是衡量微粒系统物理稳定性的重要指标之一；Zeta 电位的绝对值越大，表示微粒表面所带电量越多，聚集时需要克服的能量越大，体系越稳定。一般认为 Zeta 电位绝对值在 20～45 mV 的乳剂较为稳定[16]，研究结果表明紫苏精油纳米乳体系具有稳定性。药物实现中枢神经系统的靶向性的主要障碍是血脑屏障（BBB）的存在，鼻粘膜中的嗅静脉提供鼻与脑之间的通道。

紫苏精油纳米乳的给药途径是鼻腔给药，纳米粒径的液滴具有药物渗透性，通过嗅黏膜支持细胞或神经元细胞的各种内吞途径，经嗅神经元的细胞外转运至大脑组织[17]，避免首过效应，增加到达中枢神经系统的药物剂量。此外，由于其纳米粒径的液滴能够包载药物活性成分跨越生物膜，使药物活性成分粒子同样为纳米粒径分布，具有生物相容性，增加药物粒子的化学势和比表面积，从而提高药物的治疗效应与生物利用度[18]。研究表明，紫苏精油纳米乳能够改善紫苏精油药物稳定性较低等问题，为今后紫苏精油纳米乳的药效学与作用机制等研究提供理论依据，并为紫苏精油治疗抑郁症等疾病的产品开发与临床应用提供理论基础。

参考文献

[1] 何育佩, 郝二伟, 谢金玲, 等. 紫苏药理作用及其化学物质基础研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3957-3968.

[2] Yi L T, Li J, Geng D, *et al*. Essential oil of *Perilla frutescens*-induced change in hippocampal expression of brain-derived neurotrophic factor in chronic unpredictable mild stress in mice [J]. *J Ethnopharmacol,* 2013, 147(1): 245-253.

[3] Ji W W, Li R P, Li M, *et al*. Antidepressant-like effect of essential oil of *Perilla frutescens* in a chronic, unpredictable, mild stress-induced depression model mice [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(10): 753-759

[4] 杨 波, 周 阳, 王福玲, 等. 纳米载药系统在中药挥发油中的研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(1): 46-49.

[5] Cui H, Li W, Li C *et al*. Intelligent release of cinnamon oil from engineered proteoliposome via stimulation of *Bacillus cereus* protease [J]. *Food Control*, 2016, 67: 68-74.

[6] 汤友军, 鲁晓翔. 植物精油稳定性的改善及其在食品中应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 353-357.

[7] 邓伶俐, 余立意, 买尔哈巴·塔西帕拉提, 等. 纳米乳液与微乳液的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 173-180.

[8] Chang Y, Mclandsborough L, Mcclements D J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate) [J]. *Food Chem*, 2015, 172: 298-304.

[9] 李 丽, 魏建层, 梁纪军, 等. 裸花紫珠挥发油微乳的制备 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(36): 4089-4091.

[10] 吴 慧, 吴闻哲. 经鼻给药增加药物脑靶向的制剂方法 [J]. 世界临床药物, 2015, 36(1): 50-55.

[11] 刘建春, 杨婉芳, 季新燕, 等. 中药鼻腔给药的脑靶向性探讨 [J]. 中医杂志, 2014, 55(15): 1284-1287.

[12] 李绍林, 段 启, 赵珍东, 等. 石菖蒲挥发油微乳鼻喷剂的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1935-1941.

[13] 吴顺芹, 李三鸣, 郎轶咏, 等. 水包油型微乳形成因素的考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 81-82.

[14] Akula S, Gurram A K, Devireddy S R. Self-microemulsifying drug delivery systems: An attractive strategy for enhanced therapeutic profile [J]. *Int Sch Res Notices*, 2014, 2014: 1-11.

[15] 马天伟, 赵子明. 止吐复方纳米乳的制备及其体外透皮性能研究 [J]. 医学综述, 2019, 25(22): 4573-4579.

[16] 樊丽雅, 郑春丽, 朱家壁. 天然维生素 E 纳米乳的制备及其性质考察 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(10): 866-870.

[17] Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs [J]. *Int J Pharm*, 2009, 379(1): 146-157.

[18] Sessa M, Balestrieri M L, Ferrari G, *et al*. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems [J]. *Food Chem*, 2014, 147: 42-50.