

银耳多糖为乳化剂制备槲皮素微乳研究

王君文¹, 尹启蒙¹, 李学艳¹, 易金玉¹, 黄莹颖¹, 吴文惠^{1, 2, 3, 4}, 张朝燕^{1, 2, 3, 4*}

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2. 国家淡水水产品加工技术研发分中心, 上海 201306

3. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

4. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306

摘要: 目的 研究以银耳多糖为乳化剂的槲皮素微乳处方和制备工艺。方法 通过溶解度考察、配伍试验和伪三元相图的绘制优选微乳处方; 采用银耳多糖为天然乳化剂, 以油相、混合乳化剂及助乳化剂比例为考察因素, 粒径、载药量及多分散指数(PDI)为评价指标, 采用星点设计-效应面法优化槲皮素微乳处方并对其性质、溶出度及稳定性进行评价。结果 槲皮素微乳处方中油相为三乙酸甘油酯(36%)、乳化剂为银耳多糖(23%)和聚山梨酯 80(23%), 助乳化剂为 PEG400(18%); 所得微乳外观均一透明, 乳化后平均粒径为 (25.04 ± 0.94) nm, Zeta 电位为 (-13.20 ± 0.68) mV, PDI 为 0.311 ± 0.030 , 载药量为 (30.17 ± 1.02) mg/g; 溶出度实验表明, 槲皮素 60 min 在人工肠液和人工胃液的累积溶出度为 87.95% 和 70.47%; 储存稳定性实验、高速离心和高温实验结果表明, 微乳的质量稳定。结论 槲皮素微乳制备工艺简单, 可以增加槲皮素的溶解度和溶出度, 为相关制剂的进一步研究与开发提供参考。

关键词: 槲皮素; 银耳多糖; 微乳; 伪三元相图; 星点设计-效应面法; 溶出度; 稳定性

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)02-0378-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.010

Preparation of quercetin microemulsion with *Tremella fuciformis* polysaccharide as emulsifier

WANG Jun-wen¹, YI Qi-meng¹, LI Xue-yan¹, YI Jin-yu¹, HUANG Ying-ying¹, WU Wen-hui^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Chao-yan^{1, 2, 3, 4}

1. Food Science School, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. National Freshwater Aquatic Products Processing Technology R&D Center, Shanghai 201306, China

3. Shanghai Seawater Product Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China

4. Ministry of Agriculture Aquatic Product Storage Quality and Safety Risk Assessment Laboratory, Shanghai 201306, China

Abstract: Objective To study the prescription and preparation process of quercetin microemulsion containing *Tremella fuciformis* polysaccharide as emulsifier. **Methods** The prescription was optimized through solubility investigation, compatibility test and ternary phase diagram method. *T. fuciformis* polysaccharide was used as natural emulsifier, the ratio of oil phase, mixed emulsifier and co-emulsifier were used as the examination factors, and particle size, drug loading capacity and polydispersity index (PDI) were used as evaluation indicators. The central composite design-response surface method was used to optimize the formulation of quercetin microemulsion and evaluate its properties, dissolution and stability. **Results** The oil phase of the quercetin microemulsion prescription was glycerol triacetate (36%), the emulsifier was *T. fuciformis* polysaccharide (23%) and T80 (23%), and the co-emulsifier was PEG400 (18%); The resulting microemulsion had uniform and transparent appearance; The average particle size was (25.04 ± 0.94) nm, the potential was (-13.20 ± 0.68) mV, the PDI was 0.311 ± 0.030 , and the drug loading was (30.17 ± 1.02) mg/g. The

收稿日期: 2020-09-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(81750110548)

作者简介: 王君文(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。

Tel: 16621525121 E-mail: wendywww1996@163.com

*通信作者: 张朝燕, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。

Tel: 15692165855 E-mail: chyzhang@shou.edu.cn

dissolution test showed that the cumulative dissolution rate of quercetin in simulated intestinal fluid and simulated gastric fluid at 60 min was 87.95% and 70.47%. Preliminary stability test, high-speed centrifugation and high-temperature test results showed that the quality of microemulsion was stable. **Conclusion** The preparation process of quercetin microemulsion is simple, which can increase the solubility and dissolution of quercetin, and provide reference for further research and development of related preparations.

Key words: quercetin; *Tremella fuciformis* polysaccharide; microemulsion; pseudo-ternary phase diagram; central composite design-response surface method; dissolution; stability

槲皮素是一种黄酮类化合物, 具有抗病毒、抗氧化、抗癌、抗炎、抗菌、心血管系统保护等多种功能^[1-2], 并且无致癌、致死等反应^[3]。但槲皮素的水溶性极差, 仅为 15.86 $\mu\text{g/mL}$ ^[4-5]。口服吸收差、生物利用度低是槲皮素主要的缺点。而微乳是水、油、乳化剂和助乳化剂按适当的比例混合, 自发形成的各向同性, 透明, 热力学稳定的分散体系^[6], 可以提高难溶性物质的溶解度, 增加药物与胃肠道的接触面积, 促进药物的吸收。

微乳体系中乳化剂的使用至关重要, 乳化剂能够改善乳液中各种构成相之间的表面张力, 使之形成均匀稳定的分散体系。近年来, 银耳多糖作为一种天然的乳化剂, 其乳化性被学者们广泛研究。黄晓德等^[7]研究了不同温度、银耳多糖浓度、pH、NaCl 浓度条件下, 银耳多糖对桉叶油的乳化能力。结果表明, 银耳多糖对桉叶油有较好的乳化性。Zhang 等^[8]在比较银耳多糖、魔芋胶和阿拉伯胶的乳化性时, 发现银耳多糖具有更好的乳化稳定性, 可较长时间保持乳化效果。张珊珊等^[9]将银耳多糖作为一种乳化剂和增稠剂添加到花生蛋白饮料中, 所制备的花生蛋白饮料体系稳定, 稠度和黏度与市售相当。但目前, 尚未有报道将银耳多糖作为乳化剂来制备微乳的方法。因此, 本实验以槲皮素为原料药, 以银耳多糖为天然乳化剂, 和合成乳化剂聚山梨酯 80 (T80) 混合使用, 来制备槲皮素微乳。然后通过星点设计-效应面法优化处方, 以期增大槲皮素的溶解度, 为相关新剂型的研究奠定基础, 同时为银耳多糖应用于微乳乳化剂中提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ZEN3600 型纳米粒度仪, 英国 Malvern 公司; 85-2 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; H1650 离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; RCZ-8 型药物溶出度仪, 上海黄海药检仪器有限公司; BSA224S 型电子分析天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; XW-80A 型旋涡混合仪, 海门市其林贝尔仪器有限公司; L-2130 液相色谱仪, 日立高新技

术集团; TECNAI F30 透射电子显微镜 (TEM), 美国 FEI 公司。

1.2 试剂

槲皮素原料药(批号 117-39-5, 质量分数 96%)、聚乙二醇 800 (PEG800)、普鲁兰多糖, 九鼎化学科技有限公司; 槲皮素对照品, 批号 117-39-5, 质量分数 98.5%, 上海晶纯生化科技股份有限公司; 银耳多糖, 批号 SQYE20190916, 质量分数 70%, 西安圣青生物科技有限公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶, 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸二氢钾、氢氧化钠, 上海凌峰化学试剂有限公司; 聚乙二醇 400 (PEG400), 兰拓生物科技有限公司; 阿拉伯胶, 阿拉丁生化科技股份有限公司; 海藻多糖, 索莱宝生物科技有限公司; 00 号透明胶囊壳, 江苏长禾胶囊有限公司; 油酸乙酯、三乙酸甘油酯、蓖麻油、大豆油、橄榄油、聚山梨酯 20 (T20)、T80、乙醇, 均购于麦克林试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 银耳多糖的乳化性

银耳多糖的乳化性测定参照文献方法^[10], 分别称取 5 mg 银耳多糖、阿拉伯胶、普鲁兰多糖、海藻多糖, 加入 100 mL 的蒸馏水, 不断搅拌, 配制成 5 mg/mL 的溶液, 分别取 50 mL 溶液与等体积的三乙酸甘油酯混合, 5000 r/min 下均质 1 min, 将液体转移至 10 mL 离心管中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min 后冷却至室温, 于 5000 r/min 离心 5 min, 观察离心管内乳浊液的乳化情况。按照以下公式计算样品的乳化性 (ES)。结果如表 1 所示, 银耳多糖的 ES 值要大于阿拉伯胶、普鲁兰多糖、海藻多糖。表明, 银耳多糖的乳化性要优于阿拉伯胶、普鲁兰多糖和海藻多糖。所以, 将银耳多糖作为微乳的乳化剂具有一定的可行性。

表 1 样品的乳化性比较

Table 1 Comparison of emulsification of samples

样品	ES 值/%	样品	ES 值/%
银耳多糖	60.30 $\pm$ 2.00	普鲁兰多糖	46.67 $\pm$ 1.50
阿拉伯胶	53.33 $\pm$ 1.20	海藻多糖	20.10 $\pm$ 1.80

$$ES=h/H$$

h 为乳化层高度, H 为离心管内液体总高度

2.2 槲皮素的含量测定

2.2.1 色谱条件^[11] Waters C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液 (60:40); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 374 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 色谱图见图 1。

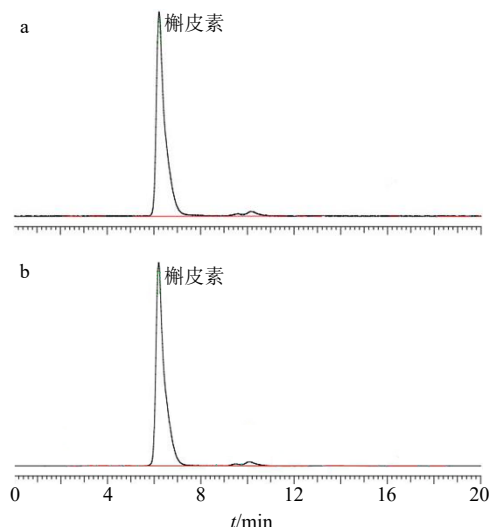


图 1 槲皮素对照品 (a) 和微乳样品 (b) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of quercetin reference substance (a) and microemulsion sample (b)

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取槲皮素 15 mg 于 50 mL 量瓶中, 甲醇溶解稀释, 配制质量浓度为 300 μg/mL 的对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密量取微乳适量, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇超声破乳溶解并定容, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 分别取对照品溶液, 甲醇稀释配制质量浓度分别为 6、15、30、60、150、300 μg/mL 的系列槲皮素对照品溶液。在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=23.546 X+2.343 1$, $R^2=0.999 1$, 线性范围为 6~300 μg/mL。

2.3 槲皮素在辅料中溶解度测定^[12]

采用振摇法测定槲皮素在油相 (油酸乙酯、三乙酸甘油酯、蓖麻油、大豆油、橄榄油)、乳化剂 (T80、银耳多糖、T20) 和助乳化剂 (乙醇、丙三醇、PEG400、PEG800) 中的饱和溶解度。精密称取上述辅料各 2 g 于西林瓶中, 加入过量的槲皮素, 涡旋混合 1 min 后, 37 °C 下连续振荡 24 h, 于 5000 r/min

离心 15 min, 取上清液用甲醇稀释, 按照“2.2”项方法测定槲皮素的质量浓度。

原则上采取对槲皮素有较高溶解度的油相、乳化剂、助乳化剂作为微乳的组成成分, 以防止在储存过程中药物析出结晶^[13]。槲皮素在各种油相、乳化剂和助乳化剂中的饱和溶解度如表 2 所示。在筛选的油相中, 槲皮素在蓖麻油和三乙酸甘油酯中的溶解度最高, 分别为 2.31、2.08 mg/mL; 在筛选的乳化剂中, 在 T20 中的溶解度最高, 为 24.12 mg/mL; 在筛选的助乳化剂中, 在 PEG400 和 PEG800 中溶解度最高, 分别为 166.28、72.37 mg/mL。基于结果, 最终选择蓖麻油和三乙酸甘油酯作为油相, PEG400 和 PEG800 作为助乳化剂进一步用于处方的筛选。

表 2 槲皮素溶解度测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Results of solubility determination of quercetin ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组成	辅料	溶解度/(mg·g ⁻¹)
油相	油酸乙酯	0.16±0.02
	三乙酸甘油酯	2.08±0.11
	蓖麻油	2.31±0.21
	大豆油	1.03±0.07
	橄榄油	0.29±0.01
乳化剂	T80	10.51±0.10
	银耳多糖	1.67±0.14
	T20	24.12±0.51
助乳化剂	乙醇	4.80±0.12
	丙三醇	分层
	PEG800	72.37±0.82
	PEG400	166.28±1.14

2.4 配伍试验

2.4.1 油相与乳化剂的筛选 分别将油相 (蓖麻油、三乙酸甘油酯) 与乳化剂 (T80、银耳多糖、T20) 按照质量比为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5 涡旋混合 5 min, 室温下静置, 取空白微乳 1 g, 滴入 100 mL 的蒸馏水, 100 r/min 磁力搅拌, 观察乳化情况, 根据目测评价标准进行等级分类^[13]。结果显示, 在考察的用量比例范围之内, 三乙酸甘油酯与 T80、银耳多糖、T20 配伍后相容性和乳化性能均较好, 而蓖麻油与乳化剂配伍后相容性和乳化性能较差, 形成白色凝胶物状, 因此选择三乙酸甘油酯作为油相。因现有的合成乳化剂中不管用于何种给药途径, 均不同程度地出现各种毒性^[14-15], 聚山梨酯类中

T20 的毒性大于 T80，因此选用 T80 和银耳多糖作为乳化剂。

2.4.2 助乳化剂的筛选 分别将银耳多糖和 T80 与 PEG400 和 PEG800 按质量比 1:1 混合，再将混合物与油相按质量比 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5 涡旋混合 5 min，室温下静置，取空白微乳 1 g，滴入 100 mL 的蒸馏水，100 r/min 磁力搅拌，观察助乳化剂乳化情况。结果显示，PEG400 和 PEG800 助乳化性能相似，因 PEG400 的载药量较大，且具有与各种溶剂的广泛相容性，是很好的溶剂和增溶剂，所以选择 PEG400 作为助乳化剂。

2.5 伪三元相图的绘制^[16]

通过伪三元相图确定银耳多糖和 T80 比例，将银耳多糖和 T80 以 1:1、2:1、1:2 混匀，再与

PEG400 按 1:1 混匀，然后按质量比 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1，加入三乙酸甘油酯，磁力搅拌条件下，滴加蒸馏水至形成澄清透明的微乳，记录临界变化的加水量。通过 Origin 9.1 软件将临界点时三乙酸甘油酯、银耳多糖、T80、水各自质量分数绘制成伪三元相图，其 3 个顶点分别为油相、混合乳化剂、水。将能形成澄清或带有蓝色乳光的实验点定为伪三元相图中可形成微乳的处方点，连接这些点与水相顶点形成的封闭区域，即为微乳区^[16]，结果见图 2，微乳区域面积越大，可形成微乳的处方越佳，最终确定银耳多糖和 T80 最佳比例为 1:1。

2.6 星点设计-效应面法优化处方

2.6.1 试验设计 星点设计是效应曲面中常用的

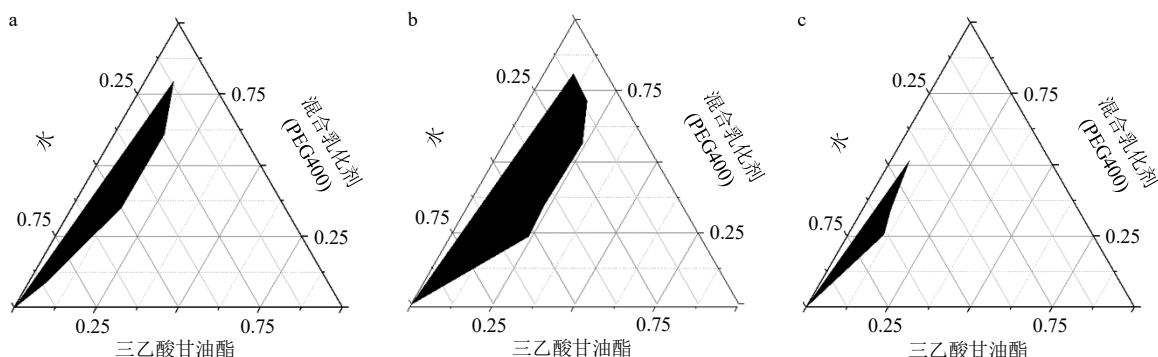


图 2 银耳多糖与 T80 不同比例 (1:2, a; 1:1, b; 2:1, c) 的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagrams for *Tremella fuciformis* polysaccharide and T80

设计方法，具有试验次数少、精度高等特点，其应用较为成熟^[17-18]。本研究选择对微乳形成有显著影响的 2 个因素作为考察指标，即油相质量分数(X_1)、混合乳化剂与助乳化剂的比例 K_m (X_2)，油相质量比范围为 10%~40%， K_m 值为 0.5~3.0，两因素的对应水平见表 3。以微乳的载药量、粒径以及粒径的 PDI 为指标，确定最优处方。按照表 4 中处方比例精密称取油相、混合乳化剂、助乳化剂，涡旋混匀 1 min，得空白微乳。精密称取空白微乳 2 g，加入过量的槲皮素，涡旋混匀 1 min，37 °C 下连续振荡 24 h，得槲皮素微乳。精密称取槲皮素微乳 1 g，

表 3 因素与水平

Table 3 Factors and levels

变量	水平				
	-1.414	-1	0	1	+1.414
$X_1/\%$	10.00	14.39	25.00	35.61	40.00
X_2	0.50	0.87	1.75	2.63	3.00

表 4 星点设计与结果

Table 4 Composition of preparations used in central composition design experimental responses and results of central composite design

编号	$X_1/\%$	X_2	载药量/(mg·g ⁻¹)	粒径/nm	PDI
1	40.00	1.75	16.21	50.58	0.771
2	35.61	2.63	33.98	23.06	0.311
3	25.00	3.00	10.38	25.04	0.151
4	14.39	2.63	19.59	16.49	0.161
5	25.00	1.75	30.74	24.23	0.451
6	25.00	1.75	30.22	24.04	0.412
7	25.00	1.75	30.74	19.16	0.415
8	25.00	1.75	34.90	19.59	0.479
9	25.00	1.75	28.27	18.44	0.487
10	25.00	0.50	83.40	76.33	0.529
11	35.61	0.87	12.97	79.80	0.624
12	10.00	1.75	95.67	12.50	0.247
13	14.39	0.87	145.07	44.91	0.259

加 37 ℃ 水 10 mL, 100 r/min 磁力搅拌至乳化完全, 纳米粒度仪测定粒径和 PDI。精密称取槲皮素微乳 0.5 g, 5000 r/min 离心 15 min, 取上清液用甲醇稀释至适宜质量浓度, 按照“2.2”项的方法进行测定, 计算载药量。

2.6.2 模型拟合和方差分析 使用 Design-Expert 8.0 软件对数据进行多元回归线性拟合, 得到 2 次多项式方程 $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_1X_2+b_4X_1^2+b_5X_2^2$; 而以载药量、粒径和 PDI 对数据进行拟合得到的回归方程分别为 $Y_1=29.99-29.14X_1-25.77X_2+36.23X_1X_2+13.86X_1^2+8.52X_2^2$, $R^2=0.9989$, $R^2_{adj}=0.9974$, $P<0.0001$; $Y_2=21.09+11.90X_1-19.70X_2-7.13X_1X_2+5.22X_1^2+14.80X_2^2$, $R^2=0.9803$, $R^2_{adj}=0.9607$, $P<0.01$; $Y_3=0.45+0.16X_1-0.12X_2-0.054X_1X_2+8.66X_1^2-0.076X_2^2$, $R^2=0.9587$, $R^2_{adj}=0.9503$, $P<0.01$ 。再进行方差分析, 可知各模型 $P<0.01$, 模型水平显著; 失拟项 $P>0.05$, 相对于纯水平误差并不显著; R^2 、 R^2_{adj} 均 >0.95 。表明 2 次多项式拟合结果较好, 具有代表性, 能客观准确地根据自变量的变化进行预测^[12]。

2.6.3 效应面分析 由图 3-a 可知, 随着油相比的增加, 微乳的载药量显著降低; 当油相比比例一定

时, 微乳的载药量随着 K_m (混合乳化剂/助乳化剂) 值的增加而减小, 原因可能是 K_m 值越小, PEG400 的含量越高, 载药量越大。由图 3-b 可知, 乳化后的粒径随着油相比的增加而增大, 适当地减少油相的比例, 增加乳化剂的含量可使微乳的粒径减小。由图 3-c 可知, K_m 值越大, 乳化剂含量越高, PDI 值越小, 微乳体系越稳定。根据拟合方程, Design-Expert 8.0 软件三维效应面图综合分析结果, 在实验室范围内以载药量大小、粒径和 PDI 为原则, 确定最优处方油相 (三乙酸甘油酯)、乳化剂 (银耳多糖-T80 1:1)、助乳化剂 (PEG400) 质量比为 36:46:18, 即 $X_1=35.61$, $X_2=2.63$ 。

2.6.4 最佳处方验证 最佳处方油相 (三乙酸甘油酯)、乳化剂 (银耳多糖-T80 1:1) 和助乳化剂 (PEG400) 的比例为 36:46:18。测得的平均粒径为 (25.04 ± 0.94) nm, PDI 值为 0.311 ± 0.030 , 最大载药量为 (30.17 ± 1.02) mg/g。结果见表 5, 可知实际值与预测值相当, 所建模型预测性良好。

2.7 处方质量评价

2.7.1 外观和形态 在室温 (20 ℃) 下, 槲皮素微乳呈现黄色。将微乳浓缩液用蒸馏水稀释 100 倍后, 可得澄清透明的黄色溶液。取槲皮素微乳适量,

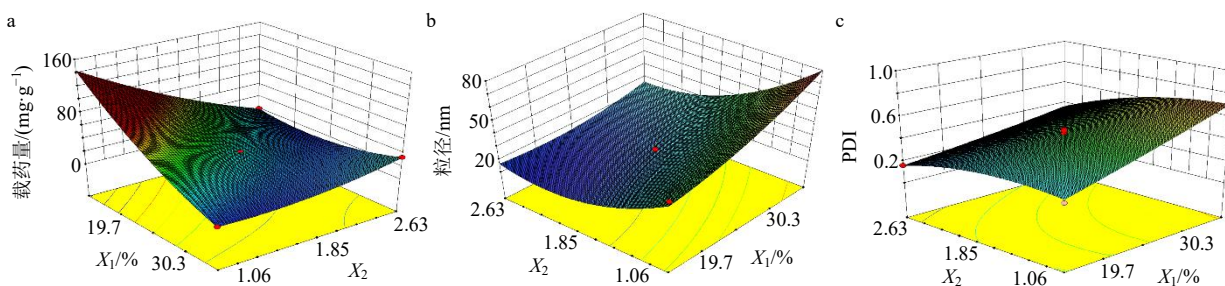


图 3 因素 X_1 、 X_2 对槲皮素微乳处方载药量 (a)、粒径 (b) 和 PDI (c) 影响的效应面

Fig. 3 Response surface plots of effect of factors on formulation of microemulsion of quercetin

表 5 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Results of verification tests ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

指标	检测值	预测值	相对偏差/%
平均粒径/nm	25.04 ± 0.94	26.19	-4.39
PDI	0.311 ± 0.030	0.35	-11.14
载药量/(mg·g ⁻¹)	30.17 ± 1.02	32.93	-8.38

37 ℃ 水稀释 100 倍, 取适量微乳滴在铜网上, 10 min 后, 用滤纸吸去多余液体, 2% 磷钨酸溶液负染色 2 min, 晾干后, 于透射电镜下观察^[13], 结果显示, 微乳液滴较小, 呈球形 (图 4)。

2.7.2 粒径、PDI 和 Zeta 电位 取槲皮素微乳 0.1 g

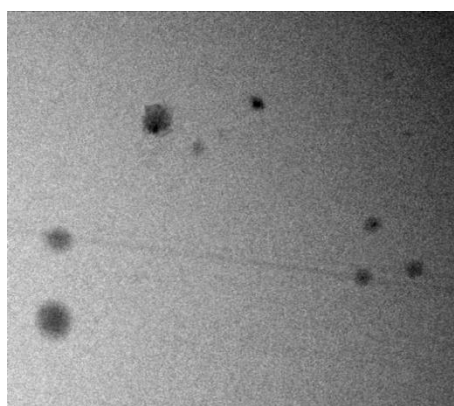


图 4 槲皮素微乳 TEM 图 (100 nm)

Fig. 4 TEM of quercetin microemulsion (100 nm)

加入 10 mL 水中, 搅拌均匀, 取 1 mL 加入样品池, 轻轻震摇, 放入 ZEN3600 型纳米粒度仪中, 测定粒径分布及 Zeta 电位。每份样品测定 3 次, 取平均值。结果显示, 槲皮素微乳的平均粒径为 (25.04 ± 0.94) nm, PDI 值为 0.311 ± 0.030 , Zeta 电位值为 (-13.20 ± 0.68) mV。表明所制备的微乳粒径较小, 分布较窄, 体系较稳定。

2.8 溶出度评价

溶出度的测定方法参照文献报道^[11], 分别以人工胃液 (simulated gastric fluid, SGF)、人工肠液 (simulated intestinal fluid, SIF)、水作为溶出介质, 体积均为 500 mL, 温度为 (37.0 ± 0.5) °C, 搅拌桨转速为 (50 ± 1) r/min。将 1 g 槲皮素微乳 (30 mg 槲皮素原料药) 放入 00 号透明胶囊壳中, 开启仪器, 分别在 5、10、20、30、45、60 min 取出溶出介质 5 mL, 同时补足等温等体积溶出介质, 按照“2.2”项的方法, 测定槲皮素的含量。同法, 将 30 mg 原料药加入透明胶囊壳中, 按照上述操作测槲皮素原料药累积溶出率, 绘制溶出曲线, 结果见图 5。由图可知, SIF 和 SGF 可以显著提高药物的溶出速率, 10 min 时药物已基本溶出。60 min 时, 槲皮素微乳在 SIF、SGF、水中溶出速率已达到 87.95%、70.47%、29.62%, 而槲皮素原料药在 SIF、SGF、水中的溶出速率仅为 20.09%、13.91%、9.13%。在 SIF、SGF、水中, 以微乳的形式, 槲皮素的溶出速率分别提高了 67.86%、56.56%、20.49%, 溶出度实验表明微乳可有效提高槲皮素的溶出速率。

2.9 稳定性实验

稳定性实验参照国家食品药品监督管理局于 2006 年颁布的《中药、天然药物稳定性研究技术指

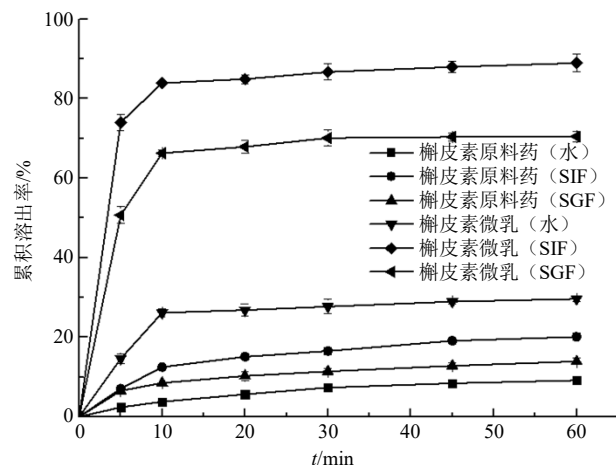


图 5 槲皮素溶出曲线

Fig. 5 Dissolution curves for quercetin

导原则》。

2.9.1 储存稳定性实验 将微乳常温放置 60 d, 分别于第 0、1、3、7、15、30、60 d 测定微乳的粒径、电位、PDI、载药量, 结果见表 6。30 d 时, 微乳的粒径、电位、PDI、载药量变化趋于稳定, 且微乳外观澄清透明, 无分层现象。储存稳定性实验表明, 所制备的微乳体系较稳定。

表 6 槲皮素微乳的稳定性

Table 6 Stability of quercetin microemulsion

t/d	粒径/nm	电位/mV	PDI	载药量/(mg·g ⁻¹)
0	25.04±0.94	-13.2±0.68	0.311±0.03	30.17±1.02
1	25.22±0.52	-13.0±1.05	0.311±0.05	30.16±0.98
3	25.97±1.73	-11.9±1.29	0.315±0.02	30.10±1.56
7	26.15±1.56	-11.1±1.00	0.320±0.01	29.86±1.32
15	28.15±0.99	-9.40±1.26	0.325±0.02	29.00±1.24
30	28.76±1.32	-9.15±0.98	0.326±0.03	28.90±1.26
60	28.77±1.36	-9.13±0.68	0.328±0.02	28.89±1.04

2.9.2 高速离心实验 取微乳 1 g 于 10 000 r/min 离心 15 min, 离心后微乳外观澄清透明, 无沉淀, 无分层现象。

2.9.3 温度对微乳稳定性的影响 将 4 份等量微乳分装玻璃瓶中, 拧紧瓶盖。分别于 70、80、90、100 °C 下水浴加热 30 min 后, 冷却至室温。24 h 后观察微乳的外观、测定微乳的粒径及粒径分布、Zeta 电位及药物含量有无变化^[19]。结果显示, 外观上微乳未出现分层、沉淀等现象; 70~100 °C 处理后微乳的粒径由 25.04 nm 增大到 35.78 nm, 粒径分布图上微乳仍然呈现单峰, 但微乳的体积分数减小, 微乳的数量分布略有缩小 (图 6), 可能热处理使粒子对乳化剂的吸附作用减弱, 乳胶粒周围的双电层减薄, 粒子聚并增多。

不同加热处理后微乳 Zeta 电位和槲皮素的质量分数变化如图 7 所示, 电位由 -13.2 mV 上升到 -9.11 mV; 而微乳中槲皮素的质量分数由 76.5% 降到 74.37%, 降低 2.13%。结果表明乳液经过热处理后仍然维持较好的贮藏稳定性, 所制备的微乳体系较为稳定。

3 讨论

微乳处方的筛选关键在于合适的油相、乳化剂和助乳化剂。其中, 油相的种类影响微乳的乳化效果, 而本实验选择的三乙酸甘油酯与乳化剂和助乳化剂的配伍效果较好。乳化剂的种类和用量将影响

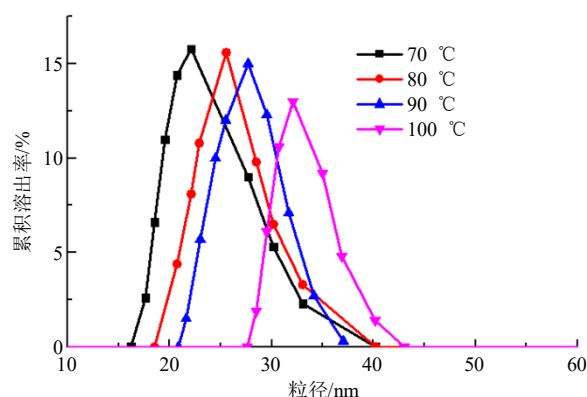


图 6 不同温度处理后微乳的粒径分布图

Fig. 6 Particle size distribution of microemulsion after different temperature treatments

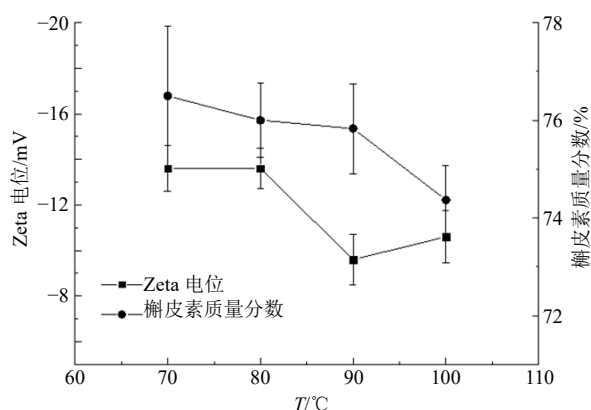


图 7 不同温度处理后微乳的 Zeta 电位和槲皮素质量分数

Fig. 7 Zeta potential and quercetin mass fraction of microemulsion after treatment at different temperatures

乳滴的粒径,进而影响微乳的稳定性。高 HLB 的乳化剂可以促进水包油型微乳的形成及促进其在水中的扩散。本实验选择的 T80 具有较高的 HLB 值 (15.0), 可以抑制 P-糖蛋白对药物的外排作用^[20], 促进药物的吸收。而天然乳化剂银耳多糖具有一定的分子极性, 可以与油滴微表面以范德华力的形式相互结合, 防止液滴之间的聚合^[21], 且多糖具有一定的黏度, 可以削弱油滴分子之间因布朗运动而造成的自动聚合^[22], 有效提高乳液的稳定性。本实验筛选的助乳化剂 PEG400 已广泛应用于食品、药品领域, 具有安全性高、稳定性好等优点, 且槲皮素在其中的溶解度最高, 选择其作为助乳化剂对提高微乳的载药量及稳定性具有重要意义。

传统微乳中乳化剂浓度过高引起的毒性是限制其应用的主要因素之一。所以, 有研究学者使用天然乳化剂阿拉伯胶来制备微乳。陈莉等^[23]研究阿拉伯胶对绿原酸自微乳体内外性能的影响。结果表

明, 含阿拉伯胶的新型绿原酸自微乳在十二指肠、空肠、回肠的吸收量增加, 新型绿原酸自微乳可以促进绿原酸在小肠的吸收。黄嗣航等^[24]在对比含有阿拉伯胶的新型葛根素自微乳和传统自微乳性能中发现, 新型葛根素自微乳和传统自微乳性的自乳化速率基本一致, 含阿拉伯胶的自微乳对葛根素的促进吸收效果优于传统自微乳。而阿拉伯胶和银耳多糖属于天然乳化剂, 且都具有葡萄糖醛酸等结构。所以, 含银耳多糖的槲皮素微乳可能比传统的槲皮素微乳吸收效果更好, 在体内应用方面具有一定的发展前景。

溶出度实验是模拟药物在体内溶出的关键步骤。在溶出度实验中, 在 SIF、SGF 60 min 时槲皮素的累积释放率可达到 87.95%、70.47%, 相较于槲皮素原料药, 槲皮素微乳呈现释放率高的特点。因此, 本研究成功制备了含天然乳化剂银耳多糖的槲皮素微乳, 降低了 T80 的一半用量, 提高了槲皮素的溶出度, 具有一定的实用价值和经济价值, 为天然药物的研究应用提供了新的思路, 后续将从其药效、临床应用等方面开展研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li Y, Deng Y, Tang Y, *et al.* Quercetin protects rat hepatocytes from oxidative damage induced by ethanol and iron by maintaining intercellular liable iron pool [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(5): 534-541.
- [2] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素磺酸化衍生物合成及其体内外抗肿瘤研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(11): 1945-1950.
- [3] 谭启. 槲皮素磷脂-壳聚糖纳米粒制剂及其经皮给药的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [4] 平其能. 中药成分的胃肠转运与剂型设计 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 424-426.
- [5] 邓卓丹, 陈文学, 兰思琪, 等. 玉米醇溶蛋白-卵磷脂-槲皮素纳米颗粒的制备与抗氧化特性 [J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(23): 103-108.
- [6] Baxamusa S, Ehrmann P, Ong J. Acoustic activation of water-in-oil microemulsions for controlled salt dissolution [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2018, 529: 366-374.
- [7] 黄晓德, 钱骅, 赵伯涛, 等. 银耳粗多糖对桉叶油的乳化性研究 [J]. *中国野生植物资源*, 2014, 33(1): 9-11.
- [8] Zhang J, Zhang Y K, Liu Y, *et al.* Emulsifying properties of *Tremella fuciformis*: A novel promising food emulsifier [J]. *Int J Food Eng*, 2019, 15(3/4).
- [9] 张姗姗, 吴琼, 王冰聪. 银耳多糖对花生蛋白饮料稳定

- 性的影响 [J]. 食品科技, 2017, 42(7): 200-204.
- [10] 王艺涵, 吴琴, 迟原龙, 等. 酸碱法和酶法辅助提取银耳粗多糖的特性研究 [J]. 食品科技, 2019, 44(4): 200-204.
- [11] 胡英, 陈海靓, 梁文权. 槲皮素自乳化释药系统的制备和质量评价 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 805-807.
- [12] 马祖兵, 李小芳, 谢龙, 等. 大黄素-桂皮醛自微乳的制备及体外评价 [J]. 中成药, 2019, 41(1): 1-7.
- [13] 张小飞, 果秋婷, 邹俊波, 等. 黄芪甲苷自乳化释药系统的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3037-3043.
- [14] Fatouros D G, Karpf D M, Nielsen F S, *et al.* Clinical studies with oral lipid based formulations of poorly soluble compounds [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2007, 3(4): 591-604.
- [15] Patel A R, Vavia P R. Preparation and *in vivo* evaluation of SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery system) containing fenofibrate [J]. *AAPS J*, 2007, 9(3): E344-E352.
- [16] 赵惠茹, 史洋, 陈红, 等. 芦丁自微乳处方的优化 [J]. 中成药, 2019, 41(1): 23-26.
- [17] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用 [J]. 国外医学: 药学分册, 2000, 27(5): 292-298.
- [18] 江兴龙. 葛根素自微乳化释药系统及其固体化研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
- [19] 张云天. 青砖茶多糖的理化特性及乳化活性研究 [D]. 武汉: 湖北工业大学, 2018.
- [20] Rao Z C, Si L Q, Guan Y B, *et al.* Inhibitive effect of cremophor RH40 or tween 80-based self-microemulsifying drug delivery system on cytochrome P450 3A enzymes in murine hepatocytes [J]. *Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban*, 2010, 30(5): 562-568.
- [21] 张伟玲, 刘晓娟. 槲皮素自微乳制剂的制备 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2016, 54(3): 41-44, 49.
- [22] 倪石磊. 槲皮素微纳米载体的制备与评价 [D]. 南京: 东南大学, 2015.
- [23] 陈莉, 侯成贤, 杨燕飞. 天然乳化剂阿拉伯胶对绿原酸自微乳体内性能的影响 [J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3502-3505.
- [24] 黄嗣航, 龙晓英, 袁飞, 等. 含天然乳化剂的新型葛根素自微乳与传统自微乳体内性能的对比较研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(17): 1530-1534.

[责任编辑 郑礼胜]