

## 茶皂素稳定的芹菜素纳米乳制备及其体外释放研究

张旭敏, 谢 龙, 赵雨芯, 李芝蓓, 李小芳\*

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 以茶皂素为天然乳化剂制备芹菜素纳米乳液 (AP-NE), 并对其进行稳定性和体外释放特性的考察, 以期获得新型绿色的纳米制剂。方法 采用高速剪切结合高压均质技术制备 AP-NE, 以平均粒径和分散指数 (PDI) 为自变量, 运用总评归一值 (OD) 法对数据进行处理, 采用 Box-Behnken 效应面法优化处方并进行验证, 并对最优处方制备的 AP-NE 进行理化性质和体外释放特性考察。结果 优化结果表明 AP-NE 的最优制备处方为芹菜素质量分数 0.40%、茶皂素质量浓度 2.0 mg/mL、油相用量 (蓖麻油-辛酸甘油酯 1:3) 3 mL; 测得 AP-NE 的平均粒径为  $(259.5 \pm 3.6)$  nm、PDI 为  $0.103 \pm 0.005$ 、 $\zeta$  电位为  $(-35.81 \pm 0.42)$  mV、电导率为  $(88.60 \pm 1.00)$   $\mu$ S/cm, pH 为  $7.37 \pm 0.08$ , 溶解度为  $(128.12 \pm 1.35)$   $\mu$ g/mL, 载药量为  $(5.77 \pm 0.08)$  %, 浊度为  $(99.45 \pm 1.69)$   $\text{cm}^{-1}$  ( $n=3$ ); 经染色法鉴别为 O/W 乳液, 透射电子显微镜观察乳滴不粘连, 大小均一, 呈圆球状; 稳定性试验表明 AP-NE 稳定性良好; 体外释放研究表明 AP-NE 中芹菜素的释放具有缓慢和持续的趋势。结论 以茶皂素作为乳化剂制备的纳米乳可明显提高芹菜素的溶解度和稳定性, 是一种潜在的可提高药物有效性的新型纳米制剂。

**关键词:** 芹菜素; 纳米乳; 茶皂素; 高速剪切-高压均质技术; Box-Behnken 效应面法; 理化性质; 稳定性; 体外释放

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)17-5348-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.011

## Preparation and *in vitro* release of tea saponin-stabilized apigenin nanoemulsion

ZHANG Xu-min, XIE Long, ZHAO Yu-xin, LI Zhi-bei, LI Xiao-fang

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, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To prepare apigenin nanoemulsion (AP-NE) with tea saponin as natural emulsifier, and investigate its stability and release characteristics *in vitro*, in order to obtain a new green nano-formulation. **Methods** AP-NE was prepared by high-speed shearing combined with high-pressure homogenization technology. The average particle size and polydispersity index (PDI) were used as independent variables, and the data were processed by the overall desirability value (OD) method. The formulation was optimized and verified by Box-Behnken effect surface method, and the physicochemical properties and *in vitro* release characteristics of AP-NE prepared with the optimal formulation were investigated. **Results** The optimal prescription of AP-NE was as follows: apigenin at a concentration of 0.40%, tea saponin at a concentration of 2.0 mg/mL, oil phase (castor oil: caprylic capric triglyceride = 1:3) in an amount of 3 mL; The measured average particle size of AP-NE was  $(259.5 \pm 3.6)$  nm, PDI was  $0.103 \pm 0.005$ ,  $\zeta$  potential was  $(-35.81 \pm 0.42)$  mV, conductivity was  $(88.60 \pm 1.00)$   $\mu$ S/cm, and pH was  $7.37 \pm 0.08$ , solubility was  $(128.12 \pm 1.35)$   $\mu$ g/mL, drug loading was  $(5.77 \pm 0.08)$  %, turbidity was  $(99.45 \pm 1.69)$   $\text{cm}^{-1}$  ( $n=3$ ); it was identified as O/W emulsion by staining method, TEM observed that the milk droplets were non-adherent, uniform in size and spherical; stability test showed that AP-NE had good stability; *in vitro* release study showed that the release of apigenin from AP-NE had a slow and continuous trend. **Conclusion** Nanoemulsion prepared with tea saponin as emulsifier can greatly improve the solubility and stability of apigenin, and it is a

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 四川省科技厅科研项目 (CN) (2020095); 四川省科技厅科研项目 (2019YFS0113)

作者简介: 张旭敏 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型、新制剂、新技术。

Tel: 18328757648 E-mail: zhangxumin97@stu.cdutcm.edu.cn

\*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: lixiaofang@cdutcm.edu.cn

potential new nano-formulation that can improve drug effectiveness.

**Key words:** apigenin; nanoemulsion; tea saponin; high-speed shear-high pressure homogenization technology; Box-Behnken effect surface method; physicochemical properties; stability; *in vitro* release

芹菜素 (apigenin), 又称芹黄素、洋芹素, 是一种天然植物黄酮, 大量存在于常见的水果和蔬菜中, 例如橙子、柚子、芹菜、欧芹、洋葱、百里香、薄荷、橄榄、甘菊和麦牙菜中, 被认为是一种具有抗炎、抗氧化和抗癌作用的生物活性类黄酮<sup>[1-4]</sup>。然而, 由于芹菜素在水中溶解度低, 最大溶解度为 2.16  $\mu\text{g/mL}$ , 且肠通透性高, 被归为生物药剂学分类系统 (Biopharmaceutics Classification System, BCS) 的 II 类药物<sup>[5]</sup>, 严重影响其口服生物利用度进而影响其临床疗效的发挥。目前, 为了改善芹菜素溶解度和生物利用度低的问题, 大量学者引入了多种新型的制剂, 例如纳米晶<sup>[6-7]</sup>、纳米粒<sup>[8-9]</sup>、醇质体<sup>[10]</sup>、胶束<sup>[11]</sup>、纳米囊<sup>[12]</sup>、乳剂<sup>[13-14]</sup>, 这些制剂存在载药量低, 加入大量合成辅料使安全性降低等问题。

纳米乳作为一种新型载体, 其内部同时存在亲水和亲油区域, 可以形成牢固的油水界面膜, 能显著改善难溶性药物的溶解性和生物利用度, 为解决中药难溶性有效成分和有效部位的成药性问题提供了新思路<sup>[15]</sup>。然而, 合成类表面活性剂的加入给制剂临床上的使用带来了安全隐患, 例如聚山梨酯-80 会导致严重的神经毒性、肾毒性或细胞毒性, 长期使用会对人体产生毒副作用<sup>[16]</sup>。

茶皂素分子是由疏水性的苷元和亲水性的糖体以及有机酸 3 部分构成, 由于其糖体、有机酸及配基上的羟基是亲水基团, 同时五元环配基主体为疏水基团, 因此, 茶皂素可作为一种天然非离子型表面活性剂<sup>[17-18]</sup>, 近年来已被应用于多种研究<sup>[16,19-22]</sup>之中。本实验以天然表面活性剂茶皂素为乳化剂制备芹菜素纳米乳 (apigenin nanoemulsion, AP-NE), 旨在提高芹菜素的溶解度和生物利用度, 并探索茶皂素作为天然稳定剂的可能。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; AH100D 型高压均质机, 加拿大 ATS 公司; NICOMP 380ZLS 型激光粒度测定仪, 美国 PSS 粒度仪公司; DDS-11C 型电导率仪、pHs-2F pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; C25 型实验室分散乳化均质机, 上海恒川机械设备有限公司; XMI9007-8 型智能温湿度仪, 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; KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; UV-6100 型紫外分光光度仪, 上海美谱达仪器有限公司; JEM 1200EX 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司。

### 1.2 材料

芹菜素对照品 (批号 MUST-21030615, 质量分数 98.03%), 成都曼斯特生物科技有限公司; 芹菜素 (批号 GL20201223, 质量分数 98.30%)、茶皂素 (批号 GL20200429, 质量分数 90.31%), 西安小草植物科技有限责任公司; 辛酸酸甘油酯 (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、蓖麻油、甲醇, 均为分析纯, 成都市科隆化学品有限公司; 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; 聚山梨酯-80、磷酸 (GR 级), 成都市科隆化工试剂厂; 透析袋 MD34-5m (截留相对分子质量 8000~14 000), 成都诺舟生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 AP-NE 的制备

采用高速剪切结合高压均质法制备 AP-NE<sup>[23]</sup>。精密称取处方量的芹菜素原料药, 加入油相, 超声使其充分混匀。另精密称取处方量的茶皂素, 加入去离子水, 超声使其充分溶解, 作为水相。将水相转入油相中, 置于转速为 19 000 r/min 的高速剪切机下进行剪切 2 min, 制得粗乳液, 将粗乳液在 100 MPa 压力条件下进行高压均质 6 次, 即得 AP-NE。

在不加原料药的条件下, 按 AP-NE 的制备方法制备, 即得空白纳米乳。

### 2.2 芹菜素的测定

参考文献方法<sup>[4,8]</sup>进行。

**2.2.1 色谱条件<sup>[8]</sup>** 色谱柱为 Comatex-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 检测波长 337 nm; 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (62:38); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 对照品溶液的制备<sup>[23]</sup>** 精密称取芹菜素对照品 5.32 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇溶解, 超声, 定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 106.40  $\mu\text{g/mL}$  的芹菜素对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密量取芹菜素纳米乳液 (AP-NE) 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声 30 min 破乳后, 静置 10 min, 用甲醇定容, 用微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

**2.3 乳液分层指数的计算**

将制得的 AP-NE 装于玻璃瓶中, 室温静置, 定时观察分层、絮凝、沉淀等现象, 记录乳液层高度, 计算乳液分层指数<sup>[23]</sup>。

$$\text{分层指数} = 1 - H_t/H_0$$

$H_t$ 、 $H_0$  分别为  $t$ 、0 时刻乳液层的高度

**2.4 Box-Behnken 响应面法优化 AP-NE 处方**

**2.4.1 Box-Behnken 设计试验** 在前期单因素试验<sup>[4]</sup>的基础上, 以芹菜素质量分数 ( $X_1$ )、茶皂素质量浓度 ( $X_2$ )、油相用量 ( $X_3$ ) 为影响因素, 分别以 AP-NE 的平均粒径 ( $Y_1$ ) 和 PDI ( $Y_2$ ) 的总评归一值 (overall desirability, OD) 为评价指标, 采用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 效应面法进行试验设计<sup>[24-25]</sup>。因素与水平及试验安排与结果见表 1。由于 2 个指标值均越小越好, 因此选用公式  $OD = (d_1 d_2 \cdots d_n)^{1/n}$  以及  $d_i = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$  对 OD 值进行计算。

**2.4.2 数学模型拟合及分析** 基于以上数据, 使用

Design-Expert 8.0.6 软件对 OD 值进行多元回归二次多项式拟合, 得到回归方程  $OD = 0.83 - 0.092 X_1 + 0.030 X_2 + 0.069 X_3 + 0.190 X_1 X_2 + 0.200 X_1 X_3 + 0.013 X_2 X_3 - 0.400 X_1^2 - 0.058 X_2^2 - 0.094 X_3^2$ ,  $R^2 = 0.978 9$ ,  $P < 0.000 1$ 。

方差分析结果 (表 2) 表明该模型的  $P$  值小于 0.000 1, 表明该模型有意义, 可用于优化 AP-NE 的制备工艺。回归方程的拟合决定系数  $R^2$  为 0.978 9 > 0.95, 表明实测值与预测值之间存在高度的相关性, 能准确预测实验结果; 其校正决定系数 ( $R_{\text{adj}}^2$ ) = 0.951 8, 表明模型响应值的变化有 95.18% 来源于本实验所选自变量, 实验误差较小, 试验方法可靠。以上数据表明, 该模型可用于预测和分析 AP-NE 的最佳制备工艺。

**2.4.3 响应面优化与预测** 根据拟合结果, 绘制三维效应曲线图, 预测 AP-NE 的最佳制备处方工艺, 结果见图 1。基于 Box-Behnken 响应面, 通过 Design-Expert 8.0.6 软件预测优化后的最优处方为芹菜素质量分数 0.40%, 茶皂素质量浓度 2.04 mg/mL, 油相用量为 2.98 mL, 最优配方的 OD 预测值为 0.842。为使测定结果更加准确, 优化处方修改为 AP 质量

表 1 响应面试验设计及结果

Table 1 Arrangement and results of response surface test

编号	$X_1/\%$	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_3/\text{mL}$	$Y_1/\text{nm}$	$Y_2$	OD	编号	$X_1/\%$	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_3/\text{mL}$	$Y_1/\text{nm}$	$Y_2$	OD
1	0.30 (-1)	1.75 (-1)	2.40 (0)	252.2	0.198	0.597	10	0.30 (-1)	2.00 (0)	0.60 (-1)	282.7	0.162	0.547
2	0.40 (0)	2.25 (+1)	0.60 (-1)	294.8	0.101	0.573	11	0.50 (+1)	1.75 (-1)	2.40 (0)	262.3	0.289	0.000
3	0.40 (0)	1.75 (-1)	4.20 (+1)	262.4	0.123	0.750	12	0.40 (0)	2.00 (0)	2.40 (0)	254.8	0.129	0.778
4	0.30 (-1)	2.00 (0)	4.20 (+1)	320.6	0.129	0.263	13	0.40 (0)	1.75 (-1)	0.60 (-1)	272.9	0.155	0.619
5	0.50 (+1)	2.25 (+1)	2.40 (0)	302.1	0.095	0.516	14	0.50 (+1)	2.00 (0)	4.20 (+1)	274.5	0.191	0.522
6	0.30 (-1)	2.25 (+1)	2.40 (0)	285.2	0.230	0.363	15	0.40 (0)	2.00 (0)	2.40 (0)	253.4	0.093	0.869
7	0.40 (0)	2.00 (0)	2.40 (0)	251.7	0.135	0.779	16	0.40 (0)	2.25 (+1)	4.20 (+1)	284.9	0.035	0.756
8	0.40 (0)	2.00 (0)	2.40 (0)	260.0	0.090	0.836	17	0.50 (+1)	2.00 (0)	0.60 (-1)	329.1	0.088	0.000
9	0.40 (0)	2.00 (0)	2.40 (0)	252.3	0.095	0.871							

表 2 OD 回归方程的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation of OD

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.170	9	0.130	36.08	<0.000 1	$X_1^2$	0.670	1	0.670	185.73	<0.000 1
$X_1$	0.067	1	0.067	18.53	0.003 5	$X_2^2$	0.014	1	0.014	3.92	0.088 2
$X_2$	$7.293 \times 10^{-3}$	1	$7.293 \times 10^{-3}$	2.02	0.198 6	$X_3^2$	0.037	1	0.037	10.27	0.015 0
$X_3$	0.038	1	0.038	10.52	0.014 2	残差	0.025	7	$3.617 \times 10^{-3}$		
$X_1 X_2$	0.140	1	0.140	38.86	0.000 4	失拟项	0.017	3	$5.606 \times 10^{-3}$	2.64	0.186 0
$X_1 X_3$	0.160	1	0.160	44.92	0.000 3	纯误差	$8.500 \times 10^{-3}$	4	$2.125 \times 10^{-3}$		
$X_2 X_3$	$6.611 \times 10^{-4}$	1	$6.611 \times 10^{-4}$	0.18	0.681 8	总离差	1.200	16			

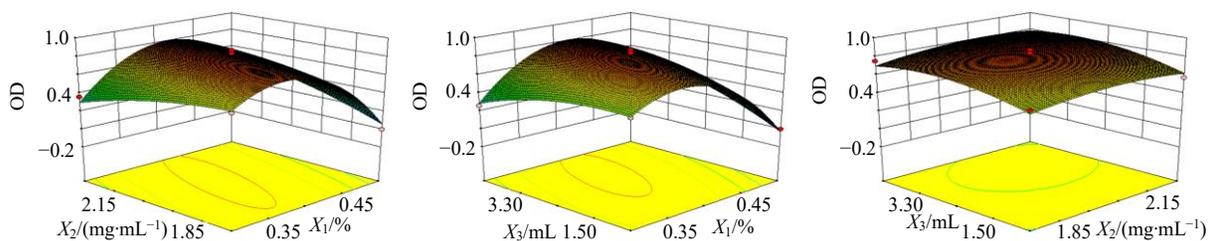


图1  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 对OD值影响的效应曲面图

Fig. 1 Curves of effect of  $X_1$ ,  $X_2$ , and  $X_3$  on OD value

分数 0.40%，茶皂素质量浓度 2.00 mg/mL，油相用量 3.00 mL。

**2.4.4 处方验证试验** 结合既定的工艺参数，根据上述修正后的最佳处方，平行制备 3 批 AP-NE，测得平均粒径、PDI 和 OD 值见下表 3。各实测值与预测值接近，说明采用总评归一法得到的回归方程预测性良好，处方的优化较为理想。

表3 验证试验 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Verification test ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

批次	粒径/nm	PDI	OD 值
1	259.5±3.6	0.103±0.005	0.811±0.003
2	261.7±4.2	0.099±0.004	0.807±0.007
3	260.3±2.9	0.105±0.003	0.802±0.006

## 2.5 理化性质考察

**2.5.1 AP-NE 类型的鉴别 (染色法)** 利用油溶性染料苏丹 III (红色) 和水溶性染料亚甲基蓝 (蓝色) 在纳米乳中扩散的快慢来判断纳米乳的类型<sup>[26-27]</sup>。取等量的 AP-NE 于 2 支试管中，分别加入适量且等量的亚甲基蓝和苏丹 III，结果显示，亚甲基蓝在 AP-NE 中的扩散速度快于苏丹 III，表明 AP-NE 为 O/W 型纳米乳。

**2.5.2 AP-NE 的微观形貌** 取适量纳米乳，用蒸馏水稀释至适当浓度，滴于覆有支撑膜的铜网上。静置 10 min 后，用滤纸吸去多余的液体，然后加入 3% 磷酸钨溶液 (pH 7.0) 负染 90 s，再用滤纸吸去多余的液体。自然蒸发后，用 TEM 分别在 100 nm 和 200 nm 的尺寸下观察 AP-NE 的微观形貌，结果见图 2，AP-NE 呈圆球形，大小均匀，乳滴之间无粘连，成型性好。

**2.5.3 溶解度的测定** 采用 HPLC 法测得 AP-NE 中芹菜素的溶解度为 (128.12±1.35) μg/mL，与未加乳化剂的阴性对照纳米乳的溶解度 (34.81±0.25) μg/mL 相比，增加了 2.68 倍；AP-NE 平均载药量为 (5.77±0.08)%，包封率为 (91.32±0.93)% ( $n=3$ )。

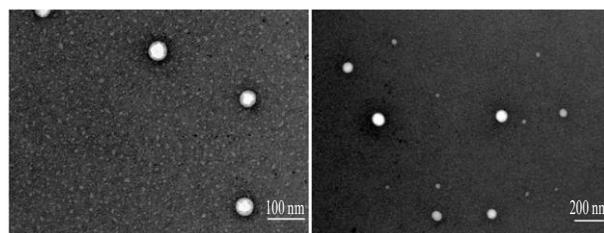


图2 AP-NE 的 TEM 图

Fig. 2 TEM images of AP-NE

**2.5.4 pH 值的测定** 按最优处方制备新鲜的 AP-NE，室温下采用 pH 计测定其 pH 值，重复 3 次，求平均值，结果为 7.37±0.07 ( $n=3$ )。

**2.5.5 电导率的测定** 按最优处方制备新鲜的 AP-NE，室温下采用电导率仪测定其电导率，重复 3 次，求平均值，结果为 (88.60±1.14) μS/cm ( $n=3$ )。

**2.5.6 ζ 电位的测定** 按最优处方制备新鲜的 AP-NE，采用激光粒度测定仪测定其 ζ 电位，重复 3 次，求平均值，结果为 (-35.81±0.38) mV ( $n=3$ )。

**2.5.7 浊度的测定**<sup>[28]</sup> 按最优处方制备新鲜的 AP-NE，精密吸取适量的纳米乳于 50 mL 量瓶中，用去离子水稀释 1000 倍，采用紫外分光光度法在 680 nm 下测定其透光率，重复 3 次，求平均值，光程长为 1 cm，根据公式计算得其浊度为 (99.45±1.69) cm<sup>-1</sup> ( $n=3$ )。

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

$\tau$  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

## 2.6 离心稳定性考察

按最佳制备工艺制备 2 组新鲜的 AP-NE，I 组为加了乳化剂茶皂素的纳米乳液，II 组为不加乳化剂茶皂素的纳米乳液。室温下精密吸取 8 mL 于离心管中，在 4000 r/min 下离心 60 min，观察纳米乳的外观形态，以离心前、后吸光度 ( $A$ ) 值的变化表征其离心稳定性，计算离心稳定常数 ( $K$ )<sup>[29]</sup>。

**2.6.1 外观** 离心结果显示 AP-NE 仍为乳白色均

一状态, 未发生聚集、凝结、相分离和破乳现象, 表明 AP-NE 稳定性良好。

**2.6.2 K 值的计算** 按最优处方制备新鲜的 AP-NE, 于离心前测定乳液的 A 值记为 A<sub>0</sub>, 离心后测定上清液的 A 值记为 A<sub>1</sub>, 平行测定 3 次。根据公式  $K=A_1/A_0$  计算 K 值, K 值越大, 表明离心稳定性越好。离心稳定性结果如表 4 所示, I 组离心稳定性远远优于 II 组, 表明 AP-NE 在上述离心条件下含量、性质保持稳定, 离心稳定性良好, 且乳化剂茶皂素可以提高纳米乳的稳定性。

表 4 离心稳定性结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 4 Results of centrifugal stability ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

组别	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	K/%
I	0.479±0.001	0.465±0.001	97.08
II	0.352±0.001	0.256±0.000	72.73

**2.7 温度和光照稳定性考察**

分别制备 2 组 AP-NE, I 组为以最佳工艺制备的 AP-NE, II 组为不加乳化剂茶皂素制备的 AP-NE, 分别于 4、25、60 °C, (4500±500) lx 的药品稳定性试验箱中放置 20 d 以上, 分别在第 0、5、10、15、20 天进行取样考察, 分析在不同温度和光照条件下乳剂粒径、PDI、浊度、含量变化率、乳液分层指数等参数变化。

表 5 显示了从纳米乳液分层指数变化角度的稳

定性结果。可以明显看出, I 组和 II 组纳米乳在 60 °C 保存 20 d 后分层指数明显增加, 分别达到 2.86%、14.26%, 且 2 组纳米乳在储存 20 d 后分层指数变化趋势均为 60 °C > 25 °C > 强光 > 4 °C。另外, I 组纳米乳在强光照射条件下稳定性较好。

表 5 不同温度和强光对 AP-NE 的分层指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 5 Effects of different temperature and bright light on stratified index of AP-NE ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

t/d	I 组分层指数/%				II 组分层指数/%			
	4 °C	25 °C	60 °C	强光	4 °C	25 °C	60 °C	强光
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0.22	0.16	0.75	1.47	2.14	1.91
10	0.81	1.32	1.71	0.74	1.18	1.85	3.97	3.87
15	0.91	1.76	2.11	1.30	4.86	6.86	11.43	8.21
20	1.69	1.94	2.86	1.79	8.52	12.05	14.26	10.95

表 6、7 分别展示了不同环境分别对 2 组纳米乳液粒径、浊度和含量变化率的影响。温度稳定性试验结果表明, 在粒径方面上, 除 60 °C 外, I 组纳米乳液在不同环境胁迫下在 260 nm 左右稳定 20 d。这可能与 ζ 电位相对较高且恒定的绝对值密切相关, 从而导致强烈的静电排斥以维持系统的稳定性; 而 II 组粒径呈现不同程度的增长趋势, 其中 60 °C 组增长最为明显, 在 20 d 后粒径增长率达到 26.67%,

表 6 不同温度和强光对 I 组 (含茶皂素) AP-NE 稳定性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 6 Effects of different temperature and bright light on stability of AP-NE (I) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

t/d	粒径/nm				浊度/cm <sup>-1</sup>				含量变化率/%			
	4 °C	25 °C	60 °C	强光	4 °C	25 °C	60 °C	强光	4 °C	25 °C	60 °C	强光
0	259.0	259.7	259.2	259.4	99.82	100.93	103.21	99.82	0	0	0	0
5	260.7	259.8	263.9	263.6	91.02	124.43	118.78	96.51	5.97	2.51	17.55	2.18
10	261.3	261.1	265.5	261.7	88.83	116.53	103.14	115.41	8.81	5.45	23.26	10.22
15	261.7	261.4	268.8	269.6	97.61	114.29	107.59	125.03	12.67	15.59	39.33	12.29
20	262.9	264.2	277.5	267.4	93.21	123.30	140.41	123.30	17.26	18.59	40.83	10.28

表 7 不同温度和强光对 II 组 (不含茶皂素) AP-NE 稳定性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 7 Effects of different temperature and bright light on stability of AP-NE (II) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

t/d	粒径/nm				浊度/cm <sup>-1</sup>				含量变化率/%			
	4 °C	25 °C	60 °C	强光	4 °C	25 °C	60 °C	强光	4 °C	25 °C	60 °C	强光
0	414.7	416.0	422.2	419.6	270.50	271.81	271.81	270.50	0	0	0	0
5	416.2	418.3	432.6	420.7	301.11	310.61	316.08	313.34	6.97	8.22	21.94	7.62
10	420.6	420.5	456.7	435.3	343.90	350.98	350.98	348.14	34.73	38.01	51.27	42.36
15	421.2	425.4	480.0	440.9	279.71	265.27	251.03	262.66	52.47	60.28	69.19	56.35
20	456.9	461.2	534.8	471.2	218.16	221.89	194.80	219.40	67.30	65.59	73.07	62.54

这是因为纳米乳液为热力学不稳定体系，随着温度的升高，分子运动速率逐渐加快，增大了粒子间相互碰撞的几率，从而使粒径加大，而茶皂素可以有效缓解高温所致的聚集现象的发生。

浊度方面，由表 6 可以看出，I 组纳米乳在 4 °C 和 25 °C 条件下，纳米乳液的浊度没有随着储存时间的延长而发生显著变化，而 60 °C 组纳米乳液的浊度呈逐渐增加的趋势，特别是存放 20 d 后，浊度增长速度达到 34.55%。这可能是由于在高温条件下较长的储存时间会导致乳化剂亲水端的脱水和较低的界面张力，导致颗粒聚集增加，乳液体系浑浊，最终导致浊度增加。

此外，表面活性剂脱水降低了油滴之间的空间排斥，从而使油滴更靠近并聚结<sup>[30]</sup>；而 II 组纳米乳各条件下浊度均呈现先增大后减小的趋势，这可能是由于纳米乳在储存初期由于不存在乳化剂，粒子间相互碰撞聚集，导致乳液体系变浑浊，浊度增大，继续放置储存，乳液因分层沉降从而使透明度增大，浊度降低。此外，含量变化率越低，稳定性越好。2 组纳米乳在 60 °C 下储存 20 d 后芹菜素含量的变化率均远高于 4 °C 和 25 °C 条件下的变化率，且 II 组纳米乳在各条件下储存 15 d 后含量变化率均达到 50% 以上。综上所述，温度稳定性测试表明，I 组纳米乳在各项条件下的各项指标均优于 II 组，表明茶皂素可以在一定程度上起到稳定纳米乳液的作用，且纳米乳液最好在 25 °C 以下保存。另外，茶皂素乳化的纳米乳液在强光条件下，考察期间各项指标均无明显变化，说明该纳米乳液体系在该条件下较为稳定。

### 2.8 短期储存稳定性考察

按优化后的处方平行制备 3 批新鲜的 AP-NE，乳剂室温保存 40 d，分别在第 0、5、10、15、20、25、30、35、40 天进行取样考察，以粒径、PDI、浊度、ζ 电位和乳液分层指数等指标评价其短期稳定性。40 d 短期稳定性测试结果如表 8 所示。结果表明，40 d 内茶皂素乳化的 AP-NE 具有良好的稳定性，在 40 d 的储存期内没有出现明显的分层、絮凝、聚集等不稳定现象。粒径和浊度分别保持在 260 nm 和 105 cm<sup>-1</sup> 左右，而 PDI 始终在 0.09~0.15 波动。

此外，ζ 电位大致表征了乳液颗粒的表面电荷。高绝对值会导致粒子之间的排斥力，这可能会提高多相系统的物理稳定性<sup>[31]</sup>。ζ 电位的绝对值较高，维持在 33 mV 左右，这可能是纳米乳液体系稳定的

表 8 AP-NE 在 40 d 内的粒径、PDI、ζ 电位和浊度的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Changes in particle size, PDI, ζ potential and turbidity of AP-NE within 40 d ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

t/d	粒径	PDI	ζ 电位/mV	浊度/cm <sup>-1</sup>
0	259.8	0.105	-35.97	106.51
5	255.0	0.122	-32.22	102.05
10	260.2	0.095	-32.95	108.78
15	261.9	0.101	-34.50	103.53
20	266.8	0.145	-32.19	108.97
25	260.4	0.128	-27.08	108.97
30	258.6	0.142	-29.41	105.56
35	266.0	0.106	-32.50	109.91
40	263.0	0.143	-32.55	109.26

重要原因。

### 2.9 体外释放度考察

精密吸取 AP-NE 5 mL，置于预先处理好的透析袋中，透析袋两端用夹子固定，以磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4) 和 1% 聚山梨酯-80 用作释放介质，然后放入装有 50 mL 释放介质的烧杯中，透析袋完全没入液面以下，同时以芹菜素对照品溶液作为对照。在 37 °C 的环境温度下，将其在恒温摇床中以 100 r/min 的恒定速度搅拌 3 d。分别于 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24、36、48、60、72 h 末从烧杯中取出 2 mL 透析液，并补充等温等量的新鲜透析介质保持水槽状态，样品经微孔滤膜滤过后，按“2.2.1”项下色谱条件进样，测定芹菜素的质量浓度，根据下式计算芹菜素的累积释放率并绘制累积释放曲线，结果见图 3。

使用动力学模型分析纳米乳中药物的释放数据，动力学分析结果见表 9。

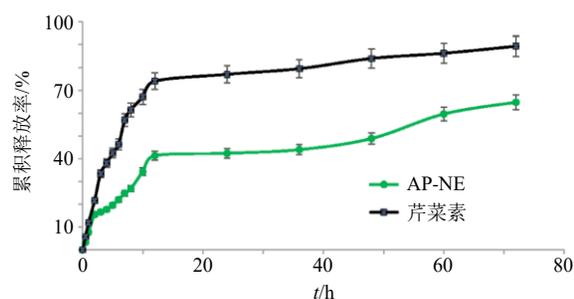


图 3 对照品溶液和 AP-NE 中 AP 在含有 1% 聚山梨酯-80 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4) 中的累积释放率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 3 Cumulative release rate of AP from coarse drug solution and AP-NE in phosphate buffer saline (pH 7.4) containing 1% polysorbate-80 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

表 9 AP-NE 释放研究中芹菜素的动力学模型

Table 9 Kinetic model of apigenin in AP-NE release studies

拟合模型	方程	R <sup>2</sup>
零级动力学	$Q=0.760 t+15.405$	0.807
一级动力学	$\ln Q=54.616-0.093 t$	0.933
Higuchi	$Q=7.273 t^{1/2}+4.062$	0.940
Ritger-Peppas	$\ln Q=0.402 \ln t+11.350$	0.955

$$Q_n=(V_0C_t+V\sum_{n=1}^{t-1}C_t)/W$$

$Q_n$  为药物不同时刻的累积释放率,  $t$  为不同时刻,  $V_0$  为释放介质的总体积,  $C_t$  为不同时刻测得的药物质量浓度,  $V$  为每次取样体积,  $W$  为投入药物总质量

从图 3 中可以清楚地看出, 与 AP-NE 相比, 对照品溶液中芹菜素的释放速度要快得多。在前 12 h 内, (73.94±1.58)% 的芹菜素从游离溶液中释放出来, 而 (41.25±0.46)% 的芹菜素从 AP-NE 中释放出来。该成分从纳米乳中缓慢释放可能是由于茶皂素稳定的 AP-NE 的强包封作用, 它为模拟胃肠道条件下的药物提供了保护屏障。

从表 9 中可观察到, 与零级释放模型 ( $R^2=0.807$ ) 相比, 一级动力学模型具有更好的拟合 ( $R^2=0.933$ ), 这表明纳米乳液的药物释放过程取决于浓度。Higuchi 和 Ritger-Peppas 模型很好地拟合了实验数据, 相关系数在 0.940~0.955, 表明药物从纳米乳液中的释放涉及多种机制, 例如指数 ( $n$ ) 小于 0.5 的菲克释放机制<sup>[32]</sup>。从该释放研究中发现, 茶皂素稳定的 AP-NE 中的芹菜素遵循缓释模式, 可以在更长的时间内发挥治疗作用。

### 3 讨论

根据能量获得方式的不同将制备纳米乳的方法分为高能乳化法和低能乳化法<sup>[33]</sup>, 本实验着眼于采用高能乳化法, 即高速剪切结合高压均质技术, 以天然表面活性剂茶皂素为乳化剂制备 AP-NE, 以期改善芹菜素的溶解度, 克服其口服利用度低和给药不稳定的问题, 并探究茶皂素作为天然乳化剂形成和稳定芹菜素纳米乳的潜力。研究表明 AP-NE 中芹菜素的溶解度为 (128.12±1.35) μg/mL, 与芹菜素在水中的溶解度 2.16 μg/mL 相比, 增加了 58.31 倍; 与未加乳化剂的阴性对照纳米乳的溶解度 (34.81±0.25) μg/mL 相比, 增加了 2.68 倍。此外, 体外释放试验表明 AP-NE 可有助于改善芹菜素的口服生物利用度。

温度和光照稳定性试验中, 在强光条件以及不同的温度条件下, 随着储存时间的延长, I 组的各项指标都在不同程度上优于 II 组, 表明茶皂素可以在一定程度上起到稳定纳米乳液的作用。I 组中, 光照稳定性试验表明, 在强光照射 (4500±500) lx 条件下 AP-NE 含量和性质保持稳定; 温度稳定性试验表明, 高温 60 °C 导致乳液分层指数、浊度和含量变化率发生明显的增长, 而温度低于 25 °C 组指标均无明显的变化, 说明纳米乳液最好在 25 °C 以下保存。另外, 茶皂素稳定的纳米乳液在 40 d 内的储存稳定性良好。

总体而言, 本研究揭示了茶皂素作为天然乳化剂形成纳米乳来包封水不溶性药物芹菜素的可能性, 但茶皂素的安全性和生物相容性, 以及制剂的安全性和体内药理学评价仍需进一步开展。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Byun S, Park J, Lee E, *et al.* Src kinase is a direct target of apigenin against UVB-induced skin inflammation [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(2): 397-405.
- [2] Huang C S, Lii C K, Lin A H, *et al.* Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(1): 167-178.
- [3] Wu D G, Yu P, Li J W, *et al.* Apigenin potentiates the growth inhibitory effects by IKK-β-mediated NF-κB activation in pancreatic cancer cells [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(1): 157-164.
- [4] 张旭敏, 李小芳, 刘凯, 等. 芹菜素纳米乳液的制备及其在人工胃肠液中的稳定性研究 [J]. *中药与临床*, 2022, 13(2): 21-27.
- [5] Zhang J J, Liu D P, Huang Y T, *et al.* Biopharmaceutics classification and intestinal absorption study of apigenin [J]. *Int J Pharm*, 2012, 436(1/2): 311-317.
- [6] Al Shaal L, Shegokar R, Müller R H. Production and characterization of antioxidant apigenin nanocrystals as a novel UV skin protective formulation [J]. *Int J Pharm*, 2011, 420(1): 133-140.
- [7] Zhang J J, Huang Y T, Liu D P, *et al.* Preparation of apigenin nanocrystals using supercritical antisolvent process for dissolution and bioavailability enhancement [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48(4/5): 740-747.
- [8] Das S, Das J, Samadder A, *et al.* Strategic formulation of apigenin-loaded PLGA nanoparticles for intracellular trafficking, DNA targeting and improved therapeutic

- effects in skin melanoma *in vitro* [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 223(2): 124-138.
- [9] Wu W W, Zu Y G, Wang L, *et al.* Preparation, characterization and antitumor activity evaluation of apigenin nanoparticles by the liquid antisolvent precipitation technique [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 1713-1720.
- [10] Shen L N, Zhang Y T, Wang Q, *et al.* Enhanced *in vitro* and *in vivo* skin deposition of apigenin delivered using ethosomes [J]. *Int J Pharm*, 2014, 460(1/2): 280-288.
- [11] Zhai Y J, Guo S S, Liu C H, *et al.* Preparation and *in vitro* evaluation of apigenin-loaded polymeric micelles [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2013, 429: 24-30.
- [12] Ding B Y, Chen H, Wang C, *et al.* Preparation and *in vitro* evaluation of apigenin loaded lipid nanocapsules [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13(10): 6546-6552.
- [13] Kim B K, Cho A R, Park D J. Enhancing oral bioavailability using preparations of apigenin-loaded W/O/W emulsions: *In vitro* and *in vivo* evaluations [J]. *Food Chem*, 2016, 206: 85-91.
- [14] Zhao X, Wang Z N, Li X P. Preparation, *in-vitro* release and antioxidant potential of formulation of apigenin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin modified microemulsion [J]. *J Inclusion Phenom Macrocycl Chem*, 2016, 86(1/2): 93-102.
- [15] Shakeel F, Faisal M S. Nanoemulsion: a promising tool for solubility and dissolution enhancement of celecoxib [J]. *Pharm Dev Technol*, 2010, 15(1): 53-56.
- [16] Long J Y, Song J W, Zhang X M, *et al.* Tea saponins as natural stabilizers for the production of hesperidin nanosuspensions [J]. *Int J Pharm*, 2020, 583: 119406.
- [17] 郭霞, 许荣年, 秦志荣. 新型非离子表面活性剂茶皂素的研究进展 [J]. 中国洗涤用品工业, 2011(2): 43-46.
- [18] 谢秋英, 黄玉英, 宋振荣. 茶皂素的提取纯化及成品中茶皂素含量的测定 [J]. 福建水产, 2010, 32(2): 14-17.
- [19] Deng M, Chen H J, Xie L, *et al.* Tea saponins as natural emulsifiers and cryoprotectants to prepare silymarin nanoemulsion [J]. *LWT*, 2022, 156: 113042.
- [20] Ma M J, Yuan Y K, Yang S, *et al.* Fabrication and characterization of zein/tea saponin composite nanoparticles as delivery vehicles of lutein [J]. *LWT*, 2020, 125: 109270.
- [21] Sun Y, Zou M T, Li C Y, *et al.* The solubilization of naphthalene using tea saponin as a biosurfactant: Effect of temperature [J]. *J Mol Liq*, 2021, 335: 116475.
- [22] Yuan Y K, Xiao J Z, Zhang P Y, *et al.* Development of pH-driven zein/tea saponin composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of curcumin [J]. *Food Chem*, 2021, 364: 130401.
- [23] 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): 2312-2318.
- [24] Song J W, Long J Y, Xie L, *et al.* Solubilization and changes of physicochemical properties of baicalin by nano sponge, and toxicity of zebrafish liver [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2020, 60: 102003.
- [25] 谢青璇, 李小芳, 谢龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1614-1622.
- [26] 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.
- [27] 张琳琳, 李小芳, 谢龙, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3180-3186.
- [28] Liao Y M, Zhong L, Liu L N, *et al.* Comparison of surfactants at solubilizing, forming and stabilizing nanoemulsion of hesperidin [J]. *J Food Eng*, 2020, 281: 110000.
- [29] 姚艳玉, 马培华, 曾庆晗, 等. 油相种类对姜黄素纳米乳液稳定性的影响 [J]. 食品科技, 2017, 42(9): 238-242.
- [30] Saberi A H, Fang Y, McClements D J. Stabilization of vitamin E-enriched nanoemulsions: Influence of post-homogenization cosurfactant addition [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(7): 1625-1633.
- [31] Sari T P, Mann B, Kumar R, *et al.* Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin [J]. *Food Hydrocoll*, 2015, 43: 540-546.
- [32] Gadkari P V, Shashidhar M G and Balaraman M. Delivery of green tea catechins through oil-in-water (O/W) nanoemulsion and assessment of storage stability [J]. *J Food Eng*, 2017, 199: 65-76.
- [33] 陈雯烨, 王志高, 鞠兴荣, 等. 纳米乳的研究进展与潜在局限性 [J]. 粮食科技与经济, 2020, 45(3): 79-83.

[责任编辑 郑礼胜]