

茶皂素为乳化剂制备黄芩苷纳米乳及其促小鼠毛发生长的药效学研究

陈莉萍^{1,2}, 李小芳^{2*}, 何春容¹, 洪雪梅¹, 肖 女³

1. 西华大学, 四川 成都 610039

2. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

3. 西部战区总医院, 四川 成都 610083

摘要: 目的 以茶皂素为天然乳化剂制备黄芩苷纳米乳 (baicalin nanoemulsion, Bai-NE), 并探究其对 C57BL/6 小鼠毛发生长的促进作用。方法 采用超声乳化法制备 Bai-NE, 利用单因素实验法对 Bai-NE 的处方和制备工艺进行优化, 并对最优处方和工艺制备的 Bai-NE 进行理化性质和稳定性考察。以 C57BL/6 小鼠为研究对象, 评价 Bai-NE 对毛发生长的促进作用。结果 Bai-NE 的最佳处方为茶皂素用量为 0.5%, 油相用量为 5%, 最佳制备工艺为超声功率 180 W, 超声时间 10 min, 超声次数 1 次。制得的 Bai-NE 为 O/W 型乳液, 外观均一, 平均粒径为 (225.1 ± 0.6) nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.082 ± 0.031 , 载药量为 1.10 mg/g, pH 值为 7.25 ± 0.20 。稳定性结果显示, Bai-NE 具有良好的离心稳定性和储存稳定性。Bai-NE 能显著促进 C57BL/6 小鼠的毛发生长。结论 茶皂素可作为一种潜在的天然乳化剂用于 Bai-NE 的制备, 制备的 Bai-NE 对 C57BL/6 小鼠的毛发生长有促进作用。

关键词: 茶皂素; 黄芩苷; 纳米乳; 脂溢性脱发; 药效学; 超声乳化法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0561-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.023

Preparation of baicalin nanoemulsion with tea saponin as natural emulsifier and its pharmacodynamic study on promoting hair growth of C57BL/6 mice

CHEN Li-ping^{1,2}, LI Xiao-fang², HE Chun-rong¹, HONG Xue-mei¹, XIAO Nyu³

1. Xihua University, Chengdu 610039, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

3. Western Theater General Hospital, Chengdu 610083, China

Abstract: Objective To prepare baicalin nanoemulsion (Bai-NE) using tea saponins (TS) as a natural emulsifier, and to explore the promoting effect of Bai-NE on the hair growth of C57BL/6 mice. **Methods** The Bai-NE was prepared by phacoemulsification. The optimal prescription and process parameters were screened out by single factor test, and the physicochemical property and stability of the Bai-NE prepared by the optimal prescription and process parameters were studied. C57BL/6 mice were used to evaluate the effect of the Bai-NE on hair growth. **Results** The best prescription of the Bai-NE was 0.5% of tea saponin and 5% of oil phase. The best preparation technology was ultrasonic power 180 W, ultrasonic time 10 min and ultrasonic frequency one time. The prepared Bai-NE is an O/W lotion with uniform appearance, mean particle size of (225.1 ± 0.6) nm, polydispersity index (PDI) of 0.082 ± 0.031 , drug loading of 1.10 mg/g, and pH of 7.25 ± 0.20 . The stability results showed that the Bai-NE had good centrifugal stability and storage stability. Bai-NE can significantly promote the hair growth of C57BL/6 mice. **Conclusion** Tea saponin can be used as a potential natural emulsifier for the preparation of Bai-NE, which can promote the hair growth of C57BL/6 mice.

Key words: tea saponin; baicalin; nanoemulsion; seborrheic alopecia; pharmacodynamics; ultrasonic emulsification

脂溢性脱发 (seborrheic alopecia, SA), 又称 主要病因的特征性脱发^[1], 也是最常见的脱发类型。雄激素源性脱发, 是具有一定遗传性的以雄激素为 SA 的男女症状存在一定差异, 男性患者主要表现

收稿日期: 2022-08-20

基金项目: 四川省科技计划项目 (2020YFS0463); 四川省中医药管理局科学技术研究专项项目 (2021MS115); 四川中医药大健康产业发展与乡村振兴研究中心资助项目 (DJKZC202202)

作者简介: 陈莉萍 (1991—), 女, 讲师, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。Tel: 15184471605 E-mail: 2876733778@qq.com

*通信作者: 李小芳, 女, 博士, 教授, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: lixiaofang918@163.com

为前额两侧头发变细变稀疏,前额发际线变高,而女性患者一般表现为头顶头发大量脱落,同时可能出现头皮油脂分泌增多、头皮屑增多以及头皮瘙痒等症状^[2]。脱发会在一定程度上影响人的外在形象,增加心理负担,加重精神压力,甚至出现焦虑或抑郁等情况。随着社会压力的增加,脱发的发病率逐渐上升并越来越年轻化。

黄芩是中医药治疗 SA 常用的组方药,黄芩苷是黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的主要成分,研究表明,黄芩苷具有广谱抗菌、抗炎、抗氧化及抗病毒等功效^[3-6]。此外,还发现黄芩苷可通过增加毛乳头细胞分泌血管内皮生长因子来促进毛发的生长^[7]。但是黄芩苷水溶性较差,生物利用度也低,导致黄芩苷的临床使用十分受限。

皂苷是天然表面活性剂的重要来源之一,常被用作稳定剂或乳化剂应用于医药研究领域^[8-9]。茶皂素是从茶籽粕中提取出的五环三萜类化合物,具有良好的分散、稳定、乳化和润湿的性能^[10],还具有抗菌、抗氧化等功效,在医药、农业和日化等领域得到了广泛的应用^[11-15]。纳米乳是一种热力学不稳定的胶体分散体系,乳滴大小通常在 10~100 nm。近几年,纳米乳也因其可提高生物利用度等优点在药品、食品等多个领域得到了迅速的发展,成为许多水溶性差的药物剂型探究的方向^[16-18]。乳化剂是纳米乳形成的关键处方因素,目前常用乳化剂为合成的表面活性剂,但长期大量使用合成表面活性剂可能会存在一定的生物安全隐患,比如对皮肤角质层结构产生不可逆的改变等^[19-20],因此寻找新型绿色安全的表面活性剂成为了新的研究方向,纳米乳作为良好的天然表面活性剂,具有成为制备纳米乳所需乳化剂的潜力。

本研究以茶皂素为天然乳化剂制备黄芩苷纳米乳 (baicalin nanoemulsion, Bai-NE),探索其作为天然乳化剂制备纳米乳的可能性,并对制备得到的 Bai-NE 促 C57BL/6 小鼠毛发生长的药效学进行初步研究,为开发用于治疗脱发的黄芩苷绿色新剂型奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20 型高效液相色谱仪,日本岛津仪器有限公司;Zetasizer Nano ZS 激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;SCIENTZ-IIID 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;MS-H-Pro ALCD

型数显加热圆盘磁力搅拌器,大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;FEI Tecnai G2 F20 型透射电子显微镜 (TEM),美国 FEI 公司;LHH-150SD 型药品稳定性试验箱,上海齐欣科学仪器有限公司;91501 型游标卡尺,北京能克工程有限公司。

1.2 材料

棕榈酸异丙酯 (PI)、辛酸甘油酯 (ODO)、肉豆蔻酸异丙酯 (IPM)、中链甘油三酯 (MCT) 均购于辽宁新兴药业股份有限公司;聚乙二醇 (PEG) 400、聚山梨酯 80 (T80)、甲醇 (色谱级) 购于成都思为科学仪器有限公司;黄芩苷对照品 (批号 MUST-21030107,质量分数 99.81%) 购于成都曼斯特生物科技有限公司;黄芩苷原料药 (批号 XC20210212,质量分数 98.5%)、茶皂素 (批号 XC20210129,质量分数 90%) 购于西安小草植物科技公司。米诺地尔搽剂 (达霏欣),批号 20210533,山西振东安特生物制药有限公司。

1.3 动物

C57BL/6 小鼠,雌性,5 周龄,40 只,体质量 (20±2) g,由北京斯贝福生物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010,实验动物质量合格证号 110324200104357141,实验动物使用许可证号为 SYXK (川) 2014-124 (成都中医药大学),动物饲养条件:温度 (23±2) °C,相对湿度为 (55±10) %,动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准 (备案文号 2019-28)。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Comatex C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (85:15);体积流量 0.5 mL/min;检测波长 276 nm;柱温 30 °C;进样体积 10 μL;保留时间为 5.5 min。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称定黄芩苷对照品 15.60 mg 于 50 mL 量瓶中,加甲醇制成含黄芩苷 312.0 μg/mL 的溶液,即得对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密量取黄芩苷纳米乳 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加入甲醇超声使其破乳溶解,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

取不含黄芩苷的空白纳米乳,按黄芩苷纳米乳供试品溶液制备方法制备供试品溶液,即得阴性对照品溶液。

2.1.4 专属性考察 分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液进样，记录 3 个样品的色谱图，结果表明制剂体系中的辅料对黄芩苷的测定没有干扰，色谱图见图 1。

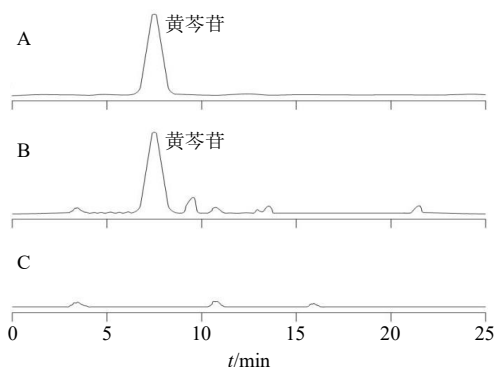


图 1 黄芩苷对照品 (A)、Bai-NE 样品 (B)、空白纳米乳 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagrams of baicalin reference substance (A), Bai-NE sample (B), and blank nanoemulsion (C)

2.1.5 线性关系考察 分别量取黄芩苷对照品溶液 10.0、5.0、3.0、2.0、0.5 mL 于 25 mL 量瓶中，加入甲醇，摇匀，定容，按“2.1.1”项下色谱条件测定，以进样质量浓度作为横坐标 (X)，所得峰面积作为纵坐标 (Y)，得回归方程为黄芩苷 $Y=51\,488X-44\,495$ ， $R^2=0.999\,1$ ，结果表明黄芩苷在 6.24~124.80 $\mu\text{g/mL}$ 具有良好的线性关系。

2.1.6 黄芩苷原料药中黄芩苷的测定 分别精密称取黄芩苷原料药 10.4、10.6、10.6 mg 于 50 mL 量瓶中，用甲醇溶解定容，然后分别取 2 mL 于 25 mL 量瓶中，加甲醇混匀定容，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液，按照“2.1.1”项下色谱条件进样 10 μL ，计算其中黄芩苷的含量。由结果可知，黄芩苷原料药中黄芩苷的平均质量分数为 98.5%。

2.2 Bai-NE 的制备

Bai-NE 制备方法选用超声乳化法，精密称取适量黄芩苷原料药，加入油相，用磁力搅拌器搅拌使原料药全部溶于油相中，再加入处方量的茶皂素，继续搅拌至均匀，用注射器逐滴加入超纯水，磁力搅拌一段时间后，超声使其充分混匀，即得到 Bai-NE。

2.3 平均粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 的测定

将 1 mL 纳米乳液用超纯水稀释至 50 mL，取 2 mL 液体在样品池中，使用激光粒度仪在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时进行测定，测定结果为平行测定 3 次的均值。

2.4 Bai-NE 的处方筛选

2.4.1 油相种类的筛选 准确称取黄芩苷 10.0 mg，置于 10 mL 具塞玻璃试管中，分别加入 3 mL 备选油相 (IPM、PI、ODO、MCT)，涡旋混合 10 min 后超声助溶 4 h，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水中平衡 1 h，以 3000 r/min 的速度离心 (离心半径 10 cm) 15 min，取上清液 1 mL 于 25 mL 量瓶中，加入甲醇超声后定容，按“2.1.1”项下色谱条件测定其中黄芩苷的含量。准确称取处方量黄芩苷原料药，分别加入备选油相，按照“2.2”项下方法制备 Bai-NE，室温静置 30 min，测定 Bai-NE 的平均粒径和 PDI。结果如表 1 所示，黄芩苷在 MCT 中溶解度最大；PI、ODO 为油相制备的 Bai-NE 粒径太大，IPM 为油相制备的 Bai-NE 粒径虽然小，但是 PDI 较大，MCT 为油相制备的 Bai-NE 的粒径和 PDI 均较小，且对黄芩苷溶解度最高，故选择 MCT 作为 Bai-NE 的油相。

2.4.2 油相用量的筛选 以 MCT 作为油相制备 Bai-NE，以平均粒径和 PDI 作为指标考察油相不同用量 (1%、3%、5%、7%、9%) 对 Bai-NE 的影响。结果如表 2 所示，随着油相用量的增加，粒径不断变大，但 PDI 出现先变小后变大的趋势，结合平均粒径、PDI 测定结果，确定 MCT 用量为 5%。

2.4.3 茶皂素用量对 Bai-NE 的影响 精密称取处方量的黄芩苷原料药于烧杯中，加入 5% MCT，分别加入 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8% 的茶皂素，按照“2.2”项下方法制备

表 1 油相种类对黄芩苷溶解度和 Bai-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

油相	溶解度/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均粒径/nm	PDI
IPM	2.476	232.7 ± 2.0	0.242 ± 0.019
PI	1.898	274.7 ± 2.5	0.115 ± 0.012
ODO	2.044	252.2 ± 3.0	0.102 ± 0.096
MCT	2.635	235.5 ± 3.2	0.077 ± 0.043

表 2 油相用量对 Bai-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of oil dosage on Bai-NE ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

油相用量/%	平均粒径/nm	PDI
1	188.9 ± 2.1	0.133 ± 0.132
3	209.6 ± 2.6	0.087 ± 0.065
5	224.2 ± 1.8	0.078 ± 0.042
7	234.8 ± 3.5	0.979 ± 0.091
9	249.6 ± 4.6	0.113 ± 0.008

Bai-NE, 分别测量 8 组 Bai-NE 的平均粒径和 PDI。结果如表 3 所示, 随着茶皂素乳化剂剂量的增加, 粒径逐渐减小, 但当茶皂素用量达到 0.5% 左右, 减小趋势变缓。Bai-NE 的 PDI 呈现先减小后增大的趋势, 结合平均粒径和 PDI 测定结果, 最终确定茶皂素用量为 0.5%。

表 3 茶皂素用量对 Bai-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of tea saponin dosage on Bai-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

茶皂素用量/%	平均粒径/nm	PDI
0.1	352.6 $\pm$ 5.6	0.559 $\pm$ 0.148
0.2	296.1 $\pm$ 2.6	0.273 $\pm$ 0.032
0.3	264.5 $\pm$ 8.4	0.204 $\pm$ 0.085
0.4	251.5 $\pm$ 4.7	0.094 $\pm$ 0.103
0.5	230.4 $\pm$ 1.8	0.079 $\pm$ 0.059
0.6	199.9 $\pm$ 4.2	0.136 $\pm$ 0.136
0.7	193.5 $\pm$ 3.6	0.152 $\pm$ 0.084
0.8	188.1 $\pm$ 3.2	0.196 $\pm$ 0.011

2.4.4 超声功率的确定 精密称取处方量的黄芩苷原料药于烧杯中, 加入 5% 的 MCT, 用磁力搅拌器搅拌使原料药全部溶于油相中, 再加入 0.5% 的茶皂素, 按照“2.2”项下方法制备 Bai-NE, 以平均粒径和 PDI 为指标考察不同超声功率 (150、180、210 W) 对 Bai-NE 的影响。结果如表 4 所示, 当超声功率为 180 W 时, Bai-NE 的平均粒径和 PDI 都较小, 当超声功率达到 210 W 时, 粒径稍微增加, 这可能与超声功率过高产生较多泡沫有关。最终确定超声功率为 180 W。

2.4.5 超声时间和超声次数的确定 精密称取处方量的黄芩苷原料药于烧杯中, 加入 5% 的 MCT, 用磁力搅拌器搅拌使原料药全部溶于油相中, 再加入 0.5% 的茶皂素, 按照“2.2”项下方法制备 Bai-NE, 以平均粒径和 PDI 为指标考察不同超声时间 (5、10、15 min) 和超声次数 (1、2、3 次) 对 Bai-NE 的影响。结果如表 5 所示, 随着超声时间的增加, Bai-NE 的平均粒径和 PDI 都逐步减小, 但超声时间

表 4 超声功率对 Bai-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of ultrasonic power on Bai-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	平均粒径/nm	PDI
150	261.9 $\pm$ 1.1	0.171 $\pm$ 0.075
180	229.6 $\pm$ 1.6	0.085 $\pm$ 0.059
210	232.6 $\pm$ 0.9	0.155 $\pm$ 0.008

表 5 超声时间对 Bai-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of ultrasonic time on Bai-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	平均粒径/nm	PDI
5	253.4 $\pm$ 0.7	0.215 $\pm$ 0.152
10	233.7 $\pm$ 1.5	0.085 $\pm$ 0.079
15	230.4 $\pm$ 1.3	0.079 $\pm$ 0.118

10、15 min 时, Bai-NE 的平均粒径和 PDI 差别很小, 结合实验成本考虑, 最终确定超声时间为 10 min。在超声次数的考察实验中发现, 超声次数 1、2、3 次时 Bai-NE 的平均粒径分别为 (223.6 $\pm$ 1.2)、(222.1 $\pm$ 1.9)、(220.9 $\pm$ 0.7) nm, PDI 分别为 0.082 $\pm$ 0.133、0.077 $\pm$ 0.207、0.069 $\pm$ 0.084, 可见随着超声次数的增加, Bai-NE 的平均粒径和 PDI 都逐步减小, 但减小趋势平缓, 差异很小, 考虑仪器耗损等情况, 最终确定超声次数为 1 次。

2.4.6 验证实验 根据上述实验得到的最佳处方为茶皂素用量 0.5%, 油相用量 5%; 最佳制备工艺为超声功率 180 W, 超声时间 10 min, 超声次数 1 次。平行制备 3 批 Bai-NE, 测定 Bai-NE 的平均粒径和 PDI, 结果见表 6, 按照单因素考察得到的最优处方和工艺制备得到的 Bai-NE 粒径较小且大小均一, Bai-NE 的 PDI 小于 0.5, 说明相对分子质量分布较为均匀, 符合要求。

表 6 制备工艺的验证实验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Validation experiments for preparation process ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	平均粒径/nm	PDI
1	223.4 $\pm$ 2.0	0.072 $\pm$ 0.056
2	224.3 $\pm$ 1.1	0.075 $\pm$ 0.039
3	233.6 $\pm$ 1.8	0.087 $\pm$ 0.071

2.5 理化性质考察

2.5.1 Bai-NE 类型鉴别 纳米乳的常规结构类型一般包括水包油 (O/W) 型、油包水 (W/O) 型和双连续相型 3 种。采用染色法鉴定 Bai-NE 的类型, 取 2 份 Bai-NE, 分别加入适量的水溶性染料亚甲基蓝和油溶性染料苏丹红, 静置观察染料在溶液中的扩散速度。结果见图 2, 亚甲基蓝的扩散速度明显快于苏丹红, 说明制备的 Bai-NE 为 O/W 型乳液。

2.5.2 Bai-NE 的外观形态 制备的 Bai-NE 在自然光下观察, 其外观呈橙黄色, 4 ℃ 时澄清度略低, 25 ℃ 时澄清透明, 流动性较好。将复合纳米乳用超纯水稀释 50 倍后, 所得液体为澄清、透明的淡黄色

液体。结果见图 3。

2.5.3 Bai-NE 的微观形态 适量 Bai-NE，用蒸馏水稀释，取适量液体置于碳涂层铜网上，滤纸吸干铜网边缘液体。取 1% 磷钨酸溶液对 Bai-NE 负染 30 min，自然晾干，在透射电镜下观察。结果见图 4，Bai-NE 经蒸馏水稀释后呈圆球形，大小分布较均匀，乳滴之间无黏连。

2.5.4 Bai-NE 的粒径和 PDI 将 1 mL Bai-NE 用 50 mL 超纯水稀释后，取 2 mL 液体在样品池中，使用仪器在 25 ℃ 时进行测定。PDI 表示的乳液粒径分布的宽窄，其值越小，表明粒径分布越均匀，稳定

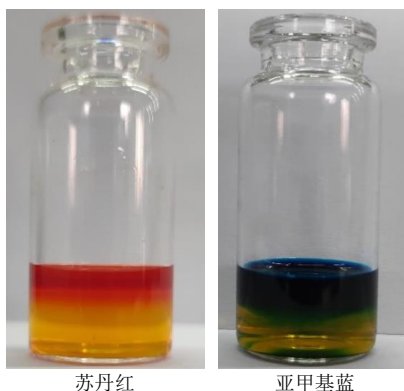


图 2 Bai-NE 类型的鉴别

Fig. 2 Identification of types of Bai-NE



图 3 Bai-NE 的外观形态

Fig. 3 Appearance of Bai-NE

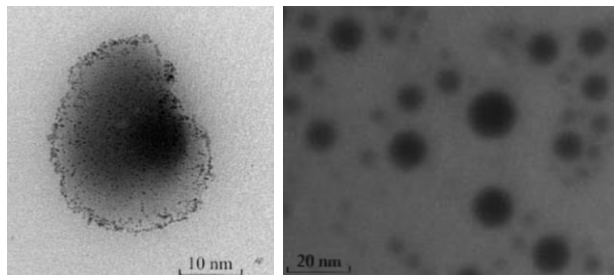


图 4 Bai-NE 的透射电镜图

Fig. 4 TEM of Bai-NE

性越好。结果表明粒径平均值为 (225.1 ± 0.6) nm，PDI 为 0.082 ± 0.031 。说明 Bai-NE 乳粒径小，分布较窄，体系较稳定。

2.5.5 Bai-NE 的载药量 精密称取 Bai-NE 0.5 g (M_1)，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容，超声使其破乳，混匀，按照“2.1.1”项下色谱条件测得黄芩苷含量为 M_2 ，则载药量 = M_2/M_1 ，经计算，得 Bai-NE 载药量为 1.10 mg/g。

2.5.6 Bai-NE 的 pH 分别取 3 批制备好的 Bai-NE 适量，室温下采用 pH 计分别测定 Bai-NE 的 pH 值，结果为 7.25 ± 0.20 。

2.5.7 Bai-NE 的离心稳定性 取 2 mL Bai-NE 于离心管中，以 10 000 r/min 离心（离心半径 10 cm）30 min，离心半径 10 cm，观察其外观形态。实验结果如图 5 所示，Bai-NE 离心后仍保持澄清透明均一，未发现聚结、分层和破乳现象，表明以茶皂素为天然乳化剂制备的 Bai-NE 有着良好的离心稳定性。

2.5.8 Bai-NE 的储存稳定性 平行制备 3 批样品，密封于西林瓶中，常温下避光储存 60 d，在第 5、10、30、60 天时观察 Bai-NE 的外观形态，并测定 Bai-NE 的粒径变化以及黄芩苷的含量变化。测定结果见表 7。由结果可知，在常温避光的环境条件下，Bai-NE 的外观形态变化较小，粒径出现少量增长，

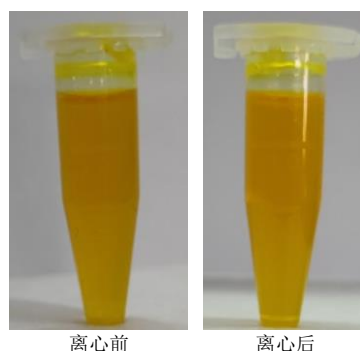


图 5 Bai-NE 离心稳定性

Fig. 5 Centrifugal stability of Bai-NE

表 7 Bai-NE 的储存稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Storage stability of Bai-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

取样 时间/d	纳米乳外观形态	平均粒径/ nm	黄芩苷 变化率/%
0	橙黄色，澄澈透明	220.80 ± 0.22	—
5	橙黄色，澄澈透明	221.90 ± 0.36	0.19
10	橙黄色，澄澈透明	223.80 ± 0.45	0.31
30	橙黄色，澄澈透明	227.30 ± 0.62	0.75
60	橙黄色，略显浑浊	232.10 ± 0.97	0.98

黄芩苷的含量变化也较小,证明茶皂素作为天然乳化剂可以用于制备储存稳定性良好的 Bai-NE。

2.6 促 C57BL/6 小鼠毛发生长的药效学研究

2.6.1 C57BL/6 小鼠脱毛实验 将 C57BL/6 小鼠分别放置于灭菌后的笼子中,饲养 1 周让小鼠充分适应实验环境。1 周后,用剪刀先将各组小鼠背部脊柱两侧 (3 cm×4 cm) 毛发剪短,取适量脱毛膏均匀涂抹于剪毛部位,5 min 后,使用生理盐水洗去残留余毛,确认脱毛区域皮肤呈粉色,没有受损,表明小鼠背部毛囊处于静止期。

2.6.2 分组与给药 将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分成 4 组,每组 10 只,将 4 组小鼠分别命名为空白 NE 组、黄芩苷溶液 (1.10 mg/g) 组、Bai-NE (1.10 mg/g) 组、阳性对照组 (米诺地尔)。小鼠脱毛后,第 2 天开始给药,每天外用涂抹给药 3 次,连续给药 28 d,停药后处死小鼠。

2.6.3 不同给药天数小鼠毛发生长情况 给药后的第 1、7、14、28 天分别对各组小鼠脱毛部位进行拍照,记录脱毛区域皮肤颜色变化情况以及毛发生长情况。结果如图 6 所示,给药 7 d 后,空白 NE 小鼠背部颜色无变化,黄芩苷溶液组小部分区域变灰,

Bai-NE 组、阳性对照组几乎全部变灰;给药 14 d 后,空白 NE 组小鼠背部皮肤几乎全部变灰,小区域皮肤开始变黑长毛,黄芩苷溶液组较大区域皮肤变黑,Bai-NE 组和阳性对照组皮肤几乎全部变黑,长出较多较浓密的毛发;给药 28 d 后,空白 NE 组皮肤全部变黑,大部分区域长毛,但毛发较浅,黄芩苷溶液组皮肤全部变黑,大部分区域长毛,毛发较空白 NE 组更长更密,Bai-NE 组和阳性对照组小鼠背部区域全部变黑、长毛,毛发较长较密,表明 Bai-NE 组能够明显促进小鼠毛发生长,且促进作用优于同浓度的黄芩苷溶液组。

2.6.4 各组新生毛发长度测定 给药后 14、28 d,分别取各组小鼠背部毛发 5 根,使用游标卡尺观察测量、记录,以毛发最两端距离记为毛发长度,取平均值。结果见表 8。与空白 NE 组相比,阳性对照组、黄芩苷溶液组、Bai-NE 组小鼠毛发长度均明显变长,且具有显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。其中 Bai-NE 组的新生毛发明显长于同质量浓度的黄芩苷溶液组 ($P<0.05$),表明纳米乳确实能够促进药物的透皮特性。

表 8 小鼠新生毛发长度 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 8 Length of newborn hair in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	新生毛发长度/mm	
	14 d	28 d
空白 NE	2.14 ± 0.21	7.51 ± 0.35
黄芩苷溶液	$2.59 \pm 0.21^*$	$8.18 \pm 0.18^*$
Bai-NE	$3.34 \pm 0.23^{***\#}$	$9.15 \pm 0.25^{***\#}$
阳性对照	$3.51 \pm 0.19^{**}$	$9.40 \pm 0.27^{**}$

与空白 NE 组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$; 与黄芩苷溶液组比较: $^{\#}P<0.05$

$^{**}P<0.05$ $^{***}P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs baicalin group

3 讨论

超声乳化法是高能乳化法中较常用的方法,能有效减小纳米乳的乳滴大小。乳化过程中,超声探头提供能量,在与液体接触时,会形成机械振动,产生界面波,将分散相分解为连续相,再通过压力波动将微气泡压缩成更小的液滴^[21]。但此方法存在一定的缺陷,其只适合在实验室环境下进行小批量的制作,无法进行大批量的生产^[22]。

本实验制备的 Bai-NE 使用茶皂素作为天然乳化剂,能够克服合成表面活性剂带来的潜在毒性问题。目前研究表明茶皂素是使用安全且具有良好生物活性的物质,常作工业乳化剂应用于食品、医疗、

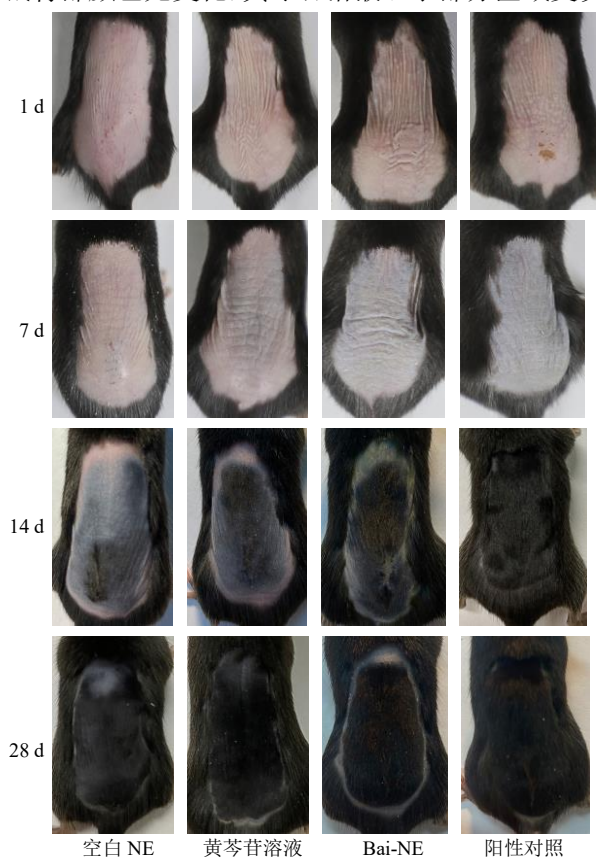


图 6 不同给药天数小鼠毛发生长情况

Fig. 6 Hair growth of mice in different administration days

化工、农药等领域^[23-24],还可作为稳定剂应用于纳米混悬剂的制备中^[25]。乳化剂常见作用机制包括降低界面张力、在分散相表面形成保护膜和形成双电层^[26-27],本实验结果显示,茶皂素作为天然乳化剂代替传统合成乳化剂制备纳米乳是可行的,但茶皂素具体的乳化作用机制还有待研究。

C57BL/6 小鼠皮肤颜色会随其毛囊生长周期变化而变化,小鼠皮肤为粉红色时,毛囊处于静止期,随着毛囊逐步进入生长期后,小鼠皮肤转变为灰色,当小鼠背部皮肤开始长出毛发时,小鼠皮肤转变为黑色^[28-29],因此,毛发生长实验大多选择 C57BL/6 小鼠作为实验动物。目前,在毛发生长研究中,尚无公认的脱毛造模制备方法^[30-31],目前一般采用物理脱毛和化学脱毛 2 种方式,根据本研究预实验结果可知,物理脱毛存在刮毛区域皮肤受损严重、毛发处理不干净等缺点,其中刮毛区域受伤皮肤基本需 3~6 d 才能好转。化学脱毛方法主要是依托硫化钠和脱毛膏进行脱毛,脱毛膏脱毛具有皮肤受损较小、操作便捷等特点,因此本研究最终选择脱毛膏脱毛造模。

本实验探究以茶皂素作为天然乳化剂制备 Bai-NE 的可能性,对制得的 Bai-NE 进行理化性质和稳定性考察,并结合动物实验验证了 Bai-NE 对 C57BL/6 小鼠的毛发生长促进作用。结果显示, Bai-NE 外观均一,相关理化性质均符合要求,还具有良好的离心稳定性和储存稳定性,对 C57BL/6 小鼠的毛发生长也表现出较好的促进作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nestor M S, Ablon G, Gade A, *et al.* Treatment options for androgenetic alopecia: Efficacy, side effects, compliance, financial considerations, and ethics [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2021, 20(12): 3759-3781.
- [2] 赵辨. 中国临床皮肤病学 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2009: 1185-1186.
- [3] 龙宇, 向燕, 谭裕君, 等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [4] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, *et al.* Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 131: 68-80.
- [5] 姜玉勤, 陆迅, 孙晓怡, 等. 装载黄芩苷的溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶的制备及表征 [J]. *中草药*, 2021, 52(13): 3831-3840.
- [6] 陈冉, 王婷婷, 李开铃, 等. 免疫调节抗病毒中药的特性与应用 [J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1412-1426.
- [7] 朱海琴, 范卫新, 张卉. 黄芩苷对人毛囊生长和毛乳头细胞分泌血管内皮生长因子的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2007, 40(7): 416-418.
- [8] Dammak I, Sobral P J D A, Aquino A, *et al.* Nanoemulsions: Using emulsifiers from natural sources replacing synthetic ones-A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19(5): 2721-2746.
- [9] Chen Y C, Liu Y, Xu J N, *et al.* A natural triterpenoid saponin as multifunctional stabilizer for drug nanosuspension powder [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2017, 18(7): 2744-2753.
- [10] 蔡京荣, 吕佳佳. 天然表面活性剂茶皂素研究概况 [J]. *中国洗涤用品工业*, 2018(12): 83-88.
- [11] 许义辉, 王爽, 许帅辉, 等. 茶皂素提取技术及生物活性的相关分析 [J]. *中国食品*, 2022(11): 130-132.
- [12] Ma Y, Gao Y X, Zhao X, *et al.* A natural triterpene saponin-based Pickering emulsion [J]. *Chemistry*, 2018, 24(45): 11703-11710.
- [13] Bezerra K G O, Rufino R D, Luna J M, *et al.* Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34(6): 1482-1493.
- [14] Nowrouzi I, Mohammadi A H, Manshad A K. Water-oil interfacial tension (IFT) reduction and wettability alteration in surfactant flooding process using extracted saponin from *Anabasis setifera* plant [J]. *J Petroleum Sci Eng*, 2020, 189: 106901.
- [15] Zhu Z B, Wen Y, Yi J H, *et al.* Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, *Quillaja* saponin, and Tween 80 [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 536: 80-87.
- [16] Mohamad S A, Safwat M A, Elrehany M, *et al.* A novel nasal co-loaded loratadine and sulpiride nanoemulsion with improved downregulation of TNF- α , TGF- β and IL-1 in rabbit models of ovalbumin-induced allergic rhinitis [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 229-239.
- [17] Falleh H, Jemaa M B, Neves M A, *et al.* Formulation, physicochemical characterization, and anti-*E. coli* activity of food-grade nanoemulsions incorporating clove, cinnamon, and lavender essential oils [J]. *Food Chem*, 2021, 359: 129963.
- [18] Akkol E K, Tatlı I I, Karatoprak G Ş, *et al.* Is emodin with anticancer effects completely innocent? two sides of the coin [J]. *Cancers*, 2021, 13(11): 2733.
- [19] Walia N, Chen L Y. Pea protein based vitamin D nanoemulsions: Fabrication, stability and *in vitro* study

- using Caco-2 cells [J]. *Food Chem*, 2020, 305: 125475.
- [20] Yang Y, Leser M E, Sher A A, *et al.* Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: *Quillaja* saponin (Q-Naturale®) [J]. *Food Hydrocoll*, 2013, 30(2): 589-596.
- [21] Jaiswal M, Dudhe R, Sharma P K. Nanoemulsion: An advanced mode of drug delivery system [J]. *3 Biotech*, 2015, 5(2): 123-127.
- [22] Azmi N A N, Elgharbawy A A M, Motlagh S R, *et al.* Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics [J]. *Processes*, 2019, 7(9): 617.
- [23] 文莉, 芦苇, 蒋倩, 等. 茶皂素毒性刺激性试验及抑菌作用研究 [J]. *中国油脂*, 2011, 36(6): 58-60.
- [24] 岳翠男, 江新风, 李延升, 等. 茶皂素提取技术及生物活性研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7): 326-331.
- [25] 龙家英, 李小芳, 王娴, 等. 茶皂素用于稳定橙皮苷纳米混悬剂及其机制研究 [J]. *药学报*, 2021, 56(11): 3159-3165.
- [26] 张军, 詹结钊. 乳化剂的性能和作用机理及其在化妆品配方中的应用 [J]. *科学技术创新*, 2018(21): 26-27.
- [27] 牛福利, 郭建来, 胡迎利. 乳化剂的作用机理及其在饲料工业中的应用研究进展 [J]. *饲料工业*, 2013, 34(7): 13-16.
- [28] Ellis J A, Stebbing M, Harrap S B. Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(3): 452-455.
- [29] Porter R M. Mouse models for human hair loss disorders [J]. *J Anat*, 2003, 202(1): 125-131.
- [30] Tu J B, Yang Z Q, He X J, *et al.* Effect of ethosomal minoxidil on dermal delivery and hair cycle of C57BL/6 mice [J]. *J Dermatol Sci*, 2007, 45(2): 135-137.
- [31] 金建波, 章建华. 脱发实验模型及其药物治疗学现状. 中国临床药理学与治疗学现状 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(1): 115-120.

[责任编辑 郑礼胜]