

白及多糖和甘草酸共稳定的青藤碱纳米乳的制备及其体外抗炎评价

但武龙^{1,2}, 杨菁¹, 陈智勇^{1,2}, 陈滕^{1,2}, 俸婷婷^{1,2}, 朱月^{1,2}, 周英^{1,2}, 汪祖华^{1,2*}

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州省现代中药创制全省重点实验室, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 制备白及多糖/甘草酸共稳定的青藤碱纳米乳 (sinomenine nanoemulsion, Sin-NE), 并系统表征其性质, 考察其稳定性与释药行为, 进而通过体外实验评价其抗炎效果。 **方法** 采用超声乳化法制备 Sin-NE, 观测其形貌、粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位, 单因素实验和正交试验筛选最佳处方并进行处方验证, 测量其 pH 值、浊度、黏度、包封率和载药量, 进行稳定性考察, 探究其体外释药行为。构建 RAW264.7 细胞炎症模型, 验证 Sin-NE 对一氧化氮 (nitric oxide, NO)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的影响。 **结果** Sin-NE 的最优处方为薏苡仁油用量 3%, 联合表面活性剂用量 0.5%, 白及多糖与甘草酸质量比 1 : 9, 超声处理时间 10 min, 超声功率 325 W。该处方所制备的 Sin-NE 平均粒径为 (145.30 \pm 2.35) nm, ζ 电位为 (-39.51 \pm 0.43) mV, PDI 为 0.095 \pm 0.022, pH 值为 3.990 \pm 0.033。其包封率达到 88.78%, 载药量为 26.14 mg/g。此外, Sin-NE 在离心、储存、稀释及加热条件下均表现出良好的稳定性, 并具备缓释特性, 在体外能显著抑制炎症细胞中 NO 的释放, 有效降低炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的水平。 **结论** Sin-NE 显著提高了青藤碱的生物利用度和抗炎活性, 为新型中药纳米乳制剂的开发提供了实验依据。

关键词: 白及多糖; 青藤碱; 甘草酸; 纳米乳; 抗炎活性; 超声乳化法; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)01-0095-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.01.011

Preparation and *in vitro* anti-inflammatory evaluation of sinomenine nanoemulsion co-stabilized by *Bletilla striata* polysaccharide and glycyrrhizic acid

DAN Wulong^{1,2}, YANG Jing¹, CHEN Zhiyong^{1,2}, CHEN Teng^{1,2}, FENG Tingting^{1,2}, ZHU Yue^{1,2}, ZHOU Ying^{1,2}, WANG Zuhua^{1,2}

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine Creation, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To prepare sinomenine nanoemulsion (Sin-NE) co-stabilized by *Bletilla striata* polysaccharide and glycyrrhizic acid, systematically characterize its properties, investigate its stability and drug release behavior, and further evaluate its anti-inflammatory effects through *in vitro* experiments. **Methods** The Sin-NE was prepared using the ultrasonic emulsification method. Its morphology, particle size, polydispersity index (PDI), and ζ potential were observed and determined. Optimal formulation parameters were screened via single-factor and orthogonal experiments, followed by formulation validation. pH value, turbidity, viscosity, encapsulation efficiency, and drug loading capacity were measured. Stability was investigated under centrifugation, storage, dilution, and heating conditions was evaluated, and *in vitro* drug release behavior was investigated. A RAW264.7 cell inflammation model was established to validate the effects of the Sin-NE on nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results** The optimized formulation comprised 3% *Coicis Semen* oil, 0.5% combined emulsifiers, a 1 : 9 mass ratio of *Bletilla striata* polysaccharide to glycyrrhizic acid, 10 min of ultrasonic treatment, and 325 W ultrasonic power. The resulting Sin-NE exhibited an average particle size of (145.30 \pm 2.35) nm, ζ potential of (-39.51 \pm 0.43) mV, PDI of 0.095 \pm 0.022, and pH value of 3.990 \pm 0.033. Encapsulation efficiency and drug loading capacity reached 88.78% and 26.14 mg/g, respectively. The nanoemulsion

收稿日期: 2025-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82360852); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK[2023]重点 046); 贵州省现代中药创制全省重点实验室 (黔科合平台[2025]019); 贵州中医药大学纳米药物技术研究中心 (贵中医 ZX 合字[2024]070)

作者简介: 但武龙, 男, 硕士研究生, 研究方向为纳米创新药物制剂开发。E-mail: 112906291286@163.com

*通信作者: 汪祖华, 男, 博士生导师, 研究方向为纳米创新药物制剂开发。E-mail: wangrui551601@163.com

demonstrated excellent stability under centrifugation, storage, dilution, and heating conditions and displayed sustained-release characteristics. *In vitro*, it significantly inhibited NO release and effectively reduced IL-6 and TNF- α levels in inflamed cells. **Conclusion** The Sin-NE significantly enhances sinomenine's bioavailability and anti-inflammatory activity, providing experimental evidence for developing novel traditional Chinese medicine nanoemulsion formulations.

Key words: *Bletilla striata* polysaccharide; sinomenine; glycyrrhizic acid; nanoemulsion; anti-inflammatory activity; ultrasonic emulsification method; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

青藤碱 (sinomenine, Sin) 是青风藤 *Sinomenii Caulis* 中具有抗炎、镇痛及骨保护作用的主要生物碱成分, 在类风湿性关节炎的治疗中表现出明确疗效^[1-3]。其抗炎机制与抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路, 下调肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等关键炎症因子密切相关^[4-6]。同时具有促进骨细胞分化与成熟, 抑制骨破坏进程的作用^[7-8]。目前, 青藤碱已开发为多种剂型用于临床^[9-10], 但其水溶性差、生物利用度低、半衰期较短的问题限制了其进一步应用^[11-12]。因此, 开发一种安全、高效、稳定的新型递药系统成为当前研究的迫切需求。

纳米乳是一种由水相、油相、表面活性剂及助表面活性剂以适当比例构成的热力学稳定体系, 其乳滴粒径通常介于 1~100 nm^[13]。能显著提高难溶性药物的溶解性和生物利用度, 并具备缓释与靶向潜力。在纳米乳的制备过程中, 表面活性剂的选择尤为关键。传统合成表面活性剂 (如聚山梨酯、司盘) 存在潜在的生物安全性问题^[14-15]。因此, 源于天然活性成分的表面活性剂因其良好的安全性和生物相容性而备受关注。

甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA) 为中药甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 提取的三萜皂苷类成分, 具有明确的两亲性结构, 可在水溶液中自组装形成胶束^[16], 并表现出抗炎、抗氧化及免疫调节等药理活性^[17-18]。白及多糖 (*Bletilla striata* polysaccharide, BSP) 是中药白及 *Bletillae Rhizoma* 的主要功能性成分, 具有抗炎、抗氧化、免疫调节、促凝血及抗菌等多种生物活性^[19-21], 其优良的胶凝特性、生物相容性、可降解性, 被广泛用于胶束、微针等药物递送系统^[22]。将甘草酸与 BSP 联合作为天然表面活性剂, 不仅可利用其两亲结构与胶体特性发挥乳化功能, 还能够与所负载的药物 (如青藤碱) 在抗炎等药理活性上产生协同增效效应, 从而在纳米乳体系中同时作为结构单元和功能活性单元, 增强制剂的综合性能。

薏苡仁油作为薏苡仁的主要活性成分, 具有“利水渗湿、除痹”的传统功效, 用于治疗“湿痹拘挛”, 现代研究证实具有抗炎及防治骨质疏松的活性^[23]。同时, 薏苡仁油黏度适中, 理化性质稳定, 有利于形成稳定均一的乳滴。而且薏苡仁油具有良好的相容性, 是构建纳米乳的优良载体。基于此, 本研究选用薏苡仁油为油相, 甘草酸和 BSP 作为天然表面活性剂, 构建负载青藤碱的纳米乳递药系统 (sinomenine nanoemulsion, Sin-NE)。该体系旨在提高青藤碱的溶解度、稳定性及生物利用度, 增强缓释效果, 并实现缓释递药与多组分协同治疗, 为青藤碱的剂型优化及天然表面活性剂的开发提供新思路。

1 材料与仪器

1.1 材料

BSP, 批号 BCSW230910-1, 质量分数 $\geq 99\%$, 陕西百川生物科技有限公司; 甘草提取物 (甘草质量分数 $\geq 98\%$), 西安小草植物科技有限责任公司; 薏苡仁油, 批号 20240920, 正植汇 (广州) 生物科技有限公司; 无水乙醇, 天津市风船化学试剂科技有限公司; 青藤碱对照品, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 K2212407, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 噻唑蓝四唑溴盐, 批号 5550516005, 北京索莱宝科技有限公司; 二甲基亚砜, 质量分数 99.0%, 批号 710N0312, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; RAW264.7 细胞来源于美国模式培养物集存库 ATCC (American type culture collection) 细胞库; 胎牛血清, 批号 21020701, 浙江天杭生物科技股份有限公司; DMEM 培养基 (批号 2022102601)、PBS (批号 2022030302), 浙江森瑞生物科技有限公司; 0.25%胰蛋白酶, 批号 20201221, 北京索莱宝科技有限公司; 99%纯度无水乙醇, 批号 10009218, 国药集团化学试剂有限公司; TNF- α 试剂盒 (批号 121112005104810103)、IL-6 试剂盒 (批号 121112005202680103), 上海江莱生物科技有限公司; 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒, 批号 A060241120, 上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.2 仪器

F98 型荧光分光光度计, 上海棱光技术有限公司; JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; AE/240 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; TG16 型高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 上海秋佐科学仪器有限公司; KQ-300DM 型静音超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; SHZ-82A 型数显水浴恒温振荡器, 上海上登实验设备有限公司; 1530 型全波长酶标仪、3111 型二氧化碳培养箱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; ZSU3100 型激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 Sin-NE 的制备

采用超声乳化法^[24], 精密称取处方量的甘草酸和 BSP, 加入去离子水, 超声、加热溶解作为水相。将处方量的薏苡仁油置于玻璃瓶中, 加入精密称取的青藤碱, 超声, 使其均匀分散在薏苡仁油中, 作为油相。将水相倒入油相, 用磁力搅拌器搅拌均匀, 随后用细胞粉碎机超声 10 min, 即得 Sin-NE。

2.2 青藤碱含量测定方法的建立

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取青藤碱对照品适量, 放入 10 mL 棕色量瓶中, 加乙醇, 超声, 定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密量取 Sin-NE 适量, 加入乙醇超声破乳, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 置于 10 mL 量瓶中, 加乙醇定容, 即得供试品溶液。

2.2.3 青藤碱最大吸收波长的确定 精密称取青藤碱 5 mg, 加入无水乙醇超声溶解, 再用无水乙醇定容至 10 mL, 用紫外分光光度计在 200~800 nm 进行全波长扫描, 确定青藤碱的最大吸收波长为 295 nm。

2.2.4 线性关系考察 将对照品溶液分别稀释为 1.0、1.25、2.5、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$, 用紫外分光光度计在 295 nm 下测定吸光度 (A) 值。以 A 值为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得到青藤碱线性回归方程 $Y=0.0047X-0.001$, $R^2=0.9993$, 线性范围为 1~100 $\mu\text{g/mL}$, 结果表明青藤碱在线性范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 取 1 份质量浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的青藤碱对照品溶液, 采用紫外-可见分光光度计在

295 nm 波长下连续测定 6 次, 测定 A 值, 计算其 RSD, 考察其精密度。结果显示 RSD 为 0.30%, 小于 2.0%, 表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 精密称取一定量的 Sin-NE, 按“2.2.2”项下方法配制青藤碱质量浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24、48 h 分别测定其在 295 nm 的 A 值, 计算其 RSD。经计算得其 RSD 为 1.53%, 结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取 6 份平行制备的供试品溶液, 分别在 295 nm 波长下测定 A 值, 计算其质量浓度的 RSD 为 0.52%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密量取 3 份已知青藤碱质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 Sin-NE 溶液 2.0 mL 分别置于 5 mL 量瓶中, 分别精密加入低、中、高质量浓度青藤碱对照品溶液(质量浓度分别为 10、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 各 2.0 mL, 以乙醇稀释至刻度, 摇匀, 每个质量浓度重复 3 次。在 295 nm 波长下测定 A 值, 并计算加样回收率。青藤碱的平均加样回收率为 98.01%, RSD 为 1.64%, 结果表明该实验加样回收率良好。

2.3 单因素实验筛选 Sin-NE 处方

2.3.1 油相用量的筛选 薏苡仁油作为油相, 用不同用量的薏苡仁油(体积分数为 1%、2%、3%、4%、5%) 制备 Sin-NE, 以外观、粒径和分散指数(polydispersity index, PDI) 作为评价标准, 筛选出合适的处方, 制备方法同“2.1”项, 具体结果见表 1 和图 1。油相用量过低时, 粒径偏大, 不能形成稳定的纳米乳; 油相用量过高, 乳液表面有油滴漂浮, 油相未能完全乳化, 且随着油相用量增加, 粒径有增大的趋势。综合粒径、PDI 和外观, 最终选择油相用量为 3%。

2.3.2 联合表面活性剂用量的筛选 固定薏苡仁油用量为 3%, 将甘草酸和 BSP 按照 1:1 的比例(质量比) 进行混合得到联合表面活性剂, 再称取不同

表 1 薏苡仁油用量筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Screening of *Coicis Semen* oil dosage ($\bar{x} \pm s, n=3$)

油相用量/%	粒径/nm	PDI
1	217.80 \pm 1.23	0.236 \pm 0.022
2	205.80 \pm 5.09	0.212 \pm 0.037
3	191.90 \pm 1.88	0.186 \pm 0.021
4	192.90 \pm 1.96	0.179 \pm 0.019
5	196.40 \pm 1.75	0.181 \pm 0.013

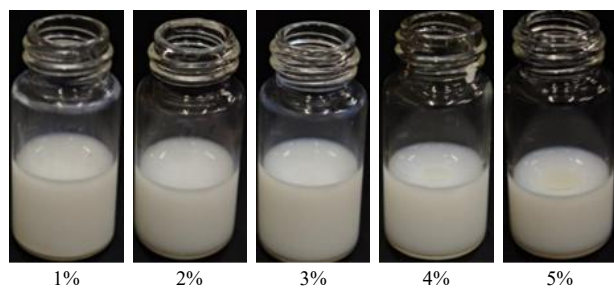


图1 不同油相比例制备的纳米乳外观

Fig. 1 Appearance of nanoemulsions prepared with different oil-phase ratios

用量的联合表面活性剂（质量分数为0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%）溶于处方量去离子水中，按照“2.1”项下方法制备纳米乳，观察外观，并测定粒径和PDI，结果见表2和图2。当表面活性剂用量过低（如0.1%~0.3%）时，油相未能被充分乳化，导致粒径较大（≥206.90 nm）；随用量增加至0.4%~0.5%，乳化趋于完全，粒径显著降低至182.80~186.70 nm，且PDI维持在较低水平（约0.141），表明乳液均匀稳定；继续增

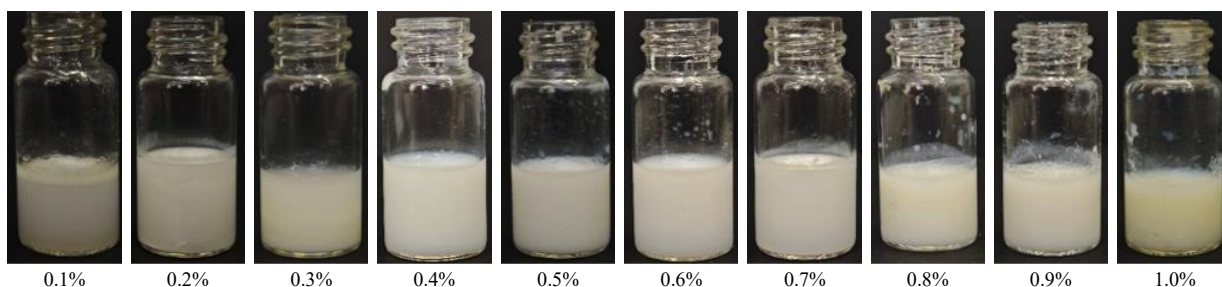


图2 不同表面活性剂用量制备的纳米乳外观

Fig. 2 Appearance of nanoemulsions prepared with different surfactant dosages

2.3.3 2种表面活性剂比例的确定 在固定薏苡仁油比例为3%、联合表面活性剂总用量为0.5%的基础上，系统考察了BSP与甘草酸不同质量比（1：9、2：8、3：7、4：6、5：5、6：4、7：3、8：2、9：1）对纳米乳外观、粒径及PDI的影响，结果见表3和图3。随着BSP在联合乳化剂中比例的增加，纳米乳的粒径呈逐渐增大趋势，由BSP与甘草酸质量比为1：9时的187.80 nm逐步上升至9：1时的248.00 nm。与此同时，PDI在BSP与甘草酸质量比为1：9时最低（0.121），表明该条件下乳液分布最为均匀；随着配比偏离该值，PDI和粒径普遍升高，且纳米乳出现分层，提示体系均一性和稳定性下降。综合粒径、PDI和外观，确定BSP与甘草酸的最佳质量配比为1：9。

进一步比较单一表面活性剂（BSP或甘草酸）

表2 联合表面活性剂用量筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Screening of combined surfactant dosage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

联合表面活性剂用量/%	粒径/nm	PDI
0.1	210.70 ± 3.61	0.140 ± 0.027
0.2	207.10 ± 1.77	0.169 ± 0.010
0.3	206.90 ± 1.34	0.144 ± 0.014
0.4	186.70 ± 0.92	0.141 ± 0.036
0.5	182.80 ± 1.33	0.141 ± 0.013
0.6	189.00 ± 2.81	0.109 ± 0.021
0.7	206.00 ± 5.23	0.136 ± 0.008
0.8	220.60 ± 2.48	0.136 ± 0.025
0.9	221.10 ± 1.79	0.132 ± 0.027
1.0	210.90 ± 3.31	0.169 ± 0.025

加用量至0.6%~1.0%，粒径再度上升（189.00~221.10 nm），提示表面活性剂过量反而不利于形成均匀纳米乳。综上，从粒径最小、分布均匀及乳化效果最佳的角度出发，确定联合表面活性剂的最佳用量为0.5%。

表3 BSP与甘草酸不同质量比考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation of different mass ratios of BSP to glycyrrhizic acid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

BSP与甘草酸质量比	粒径/nm	PDI
1：9	187.80 ± 2.08	0.121 ± 0.019
2：8	208.90 ± 6.02	0.212 ± 0.039
3：7	224.00 ± 4.80	0.266 ± 0.020
4：6	214.70 ± 3.19	0.190 ± 0.022
5：5	208.30 ± 1.41	0.201 ± 0.011
6：4	260.60 ± 6.47	0.164 ± 0.010
7：3	270.40 ± 4.33	0.233 ± 0.014
8：2	256.80 ± 10.34	0.279 ± 0.028
9：1	248.00 ± 4.41	0.135 ± 0.010

与联合表面活性剂（BSP与甘草酸质量比1：9）的乳化效果及稳定性。结果如表4和图4，单一表面活性剂所制备的纳米乳初始粒径较大，且在室温放

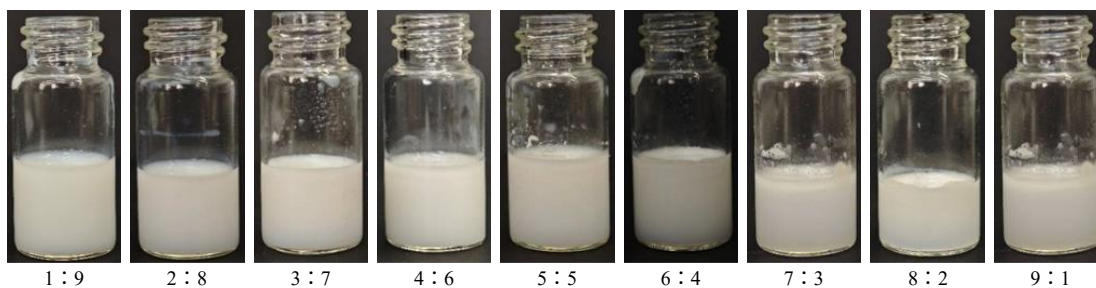


图3 BSP与甘草酸不同质量比制备的纳米乳外观

Fig. 3 Appearance of nanoemulsions prepared with varying ratios of BSP to glycyrrhizic acid

表4 单一表面活性剂筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Screening of individual surfactants ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	储存时间/d	粒径/nm	PDI
BSP-甘草酸 (1:9)	0	191.50±1.66	0.154±0.021
	3	189.60±2.32	0.151±0.037
	7	192.50±0.99	0.168±0.009
单一BSP	0	237.70±2.59	0.197±0.013
	3	289.90±5.17	0.135±0.039
	7	303.50±7.92	0.211±0.009
单一甘草酸	0	230.10±2.95	0.165±0.009
	3	240.30±3.16	0.198±0.022
	7	254.40±2.47	0.222±0.003

置7 d后粒径进一步增大并伴随着分层现象,表明其稳定性较差;而采用BSP与甘草酸质量比1:9联合表面活性剂制备的纳米乳不仅粒径适中,并且在储存期间表现出良好的稳定性,外观均一,未见分层现象。综上,基于粒径、PDI、外观及稳定性等多项指标的综合评价,最终确定BSP与甘草酸的最佳质量配比为1:9。

2.3.4 超声时间的筛选 固定薏苡仁油的用量为3%,联合表面活性剂的用量为0.5%,BSP与甘草酸质量比为1:9,用不同的超声时间(2、4、6、8、10 min)按照“2.1”项下方法制备纳米乳,考察

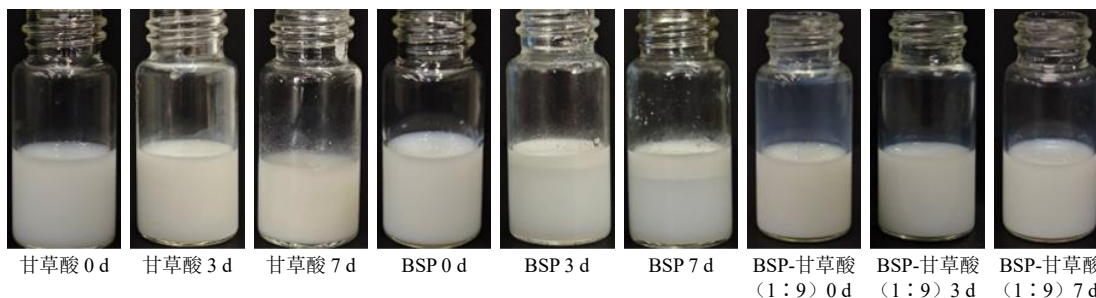


图4 单一表面活性剂与联合表面活性剂分别制备的纳米乳7 d储存期内的外观

Fig. 4 Appearance of nanoemulsions prepared with individual surfactants and combined surfactants during 7 d storage period

外观、粒径和PDI。如表5和图5所示,随着超声时间延长,纳米乳的粒径与PDI均呈现逐渐下降趋势。超声时间从2 min增至10 min,粒径由262.80 nm显著降低至144.80 nm, PDI也由0.114降至0.075,表明体系均匀性与稳定性随超声时间增加而

表5 超声时间筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Screening of ultrasonication time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	粒径/nm	PDI
2	262.80±10.67	0.114±0.013
4	232.90±2.37	0.183±0.018
6	215.60±2.63	0.154±0.017
8	189.80±4.08	0.132±0.013
10	144.80±2.21	0.075±0.012

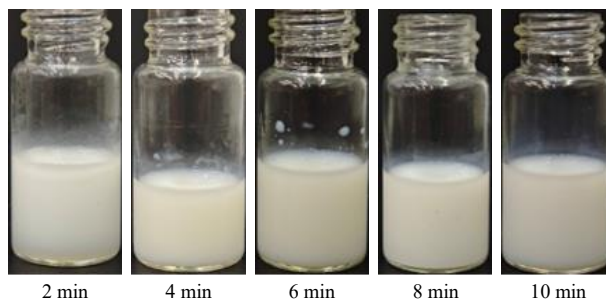


图5 不同超声时间制备的纳米乳外观

Fig. 5 Appearance of nanoemulsions prepared at different ultrasonication times

提升。较短的超声时间(如2 min)因能量输入不足,导致乳化不完全,出现分层现象,粒径较大且分布

不均;当超声时间延长至 10 min 时,体系获得充分分散,粒径最小、分布最窄,乳液外观均匀。因此,综合粒径、PDI 及稳定性表现,最终选择 10 min 作为最佳超声时间。

2.3.5 超声功率的筛选 固定薏苡仁油的用量为 3%,联合表面活性剂的用量为 0.5%,BSP 与甘草酸质量比为 1:9,超声时间为 10 min,分别选择 130、195、260、325、360 W 的功率制备纳米乳。结果见表 6 和图 6,随着超声功率从 130 W 升高至 325 W,纳米乳粒径由 219.40 nm 逐渐下降至 181.90 nm,PDI 也由 0.164 降低至 0.122,表明适当提高功率有助于提升乳滴均一性与体系稳定性。然而,当功率进一步增至 360 W 时,粒径与 PDI 均出现回升(分别为 193.90 nm 与 0.164)。因此,基于粒径与分布均匀性的综合考量,最终确定最佳超声功率为 325 W。

表 6 超声功率筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Screening of ultrasonication power ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	粒径/nm	PDI
130	219.40±5.02	0.164±0.010
195	207.90±2.05	0.138±0.011
260	200.10±1.70	0.142±0.023
325	181.90±1.66	0.122±0.014
360	193.90±2.66	0.164±0.034

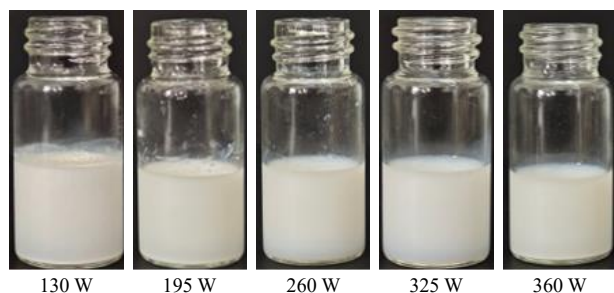


图 6 不同超声功率制备的纳米乳外观

Fig. 6 Appearance of nanoemulsions prepared at different ultrasonic powers

2.3.6 投药量的筛选 在优化上述工艺参数的基础上,于油相中加入不同质量的青藤碱(2.50、3.25、5.00、6.25、7.50 mg),制备载药纳米乳并评价粒径、PDI、外观。结果见表 7 和图 7,随着青藤碱投药量由 2.50 mg 增至 6.25 mg,纳米乳粒径由 207.30 nm 逐渐减小至 143.70 nm,PDI 亦呈现优化趋势,外观均一稳定;然而,当投药量进一步升至 7.50 mg 时,粒径增大至 180.00 nm,PDI 显著上升至 0.447,提示药物过载可能导致体系稳定性下降。综上,基于

表 7 投药量筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Screening of drug loading amount ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

青藤碱/mg	粒径/nm	PDI
2.50	207.30±12.22	0.075±0.040
3.75	205.30±0.05	0.097±0.008
5.00	155.80±2.81	0.162±0.043
6.25	143.70±3.00	0.105±0.010
7.50	180.00±7.44	0.447±0.080

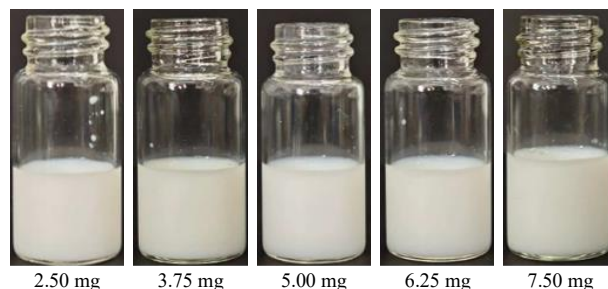


图 7 不同青藤碱用量制备的纳米乳外观

Fig. 7 Appearance of nanoemulsions prepared with different sinomenine dosages

粒径最小、分布均匀及外观稳定的综合考量,最终确定青藤碱的最佳投药量为 6.25 mg。

2.3.7 正交试验优化 Sin-NE 处方 根据单因素考察结果,油相比比例、联合表面活性剂总用量、BSP 和甘草酸的质量比 3 个因素的变化对粒径和 PDI 有显著影响。故确定油相用量(A, 2%、3%、4%)、联合表面活性剂总用量(B, 0.4%、0.5%、0.6%)、BSP 与甘草酸的质量比(C, 3:7、1:9、2:8)为考察因素,采用 SPSS 26.0 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。对粒径和 PDI 进行归一化处理,赋权后得到的综合评分(comprehensive score, CS)作为评价指标。结果如表 8 所示,极差(R)绝对值大小顺序为 A>B>C,即各影响因素的主次顺序为油相用量>联合表面活性剂用量>BSP 与甘草酸质量比。A、B、C 各水平的最小值均为 K_2 ,则最优组合方案为 $A_2B_2C_2$ 。从正交试验方差分析结果(表 9)来看,上述各因素对于粒径和 PDI 均有显著性影响($P < 0.05$)。最终确定最佳工艺为油相用量 3%,联合乳化剂总用量 0.5%,BSP 与甘草酸质量比 1:9。

粒径归一化处理=(当前组粒-最小粒径)/(最大粒径-最小粒径)

PDI 归一化处理=(当前组 PDI-最小 PDI)/(最大 PDI-最小 PDI)

CS=0.7×归一化粒径+0.3×归一化 PDI

2.3.8 最优处方验证 根据单因素考察和正交试验

表 8 正交试验因素与水平、实验设计与综合评分结果

Table 8 Orthogonal experiment factors and levels, experimental design and comprehensive evaluation results

编号	A/%	B/%	C	D(误差)	粒径/nm	PDI	CS
1	2(1)	0.4(1)	3:7(1)	(1)	219.60	0.2051	0.9469
2	2(1)	0.5(2)	2:8(3)	(2)	191.40	0.1462	0.5520
3	2(1)	0.6(3)	1:9(2)	(3)	202.80	0.1887	0.7566
4	3(2)	0.4(1)	2:8(3)	(3)	187.00	0.1448	0.5091
5	3(2)	0.5(2)	1:9(2)	(1)	141.70	0.1023	0.0000
6	3(2)	0.6(3)	3:7(1)	(2)	185.30	0.1306	0.4598
7	4(3)	0.4(1)	1:9(2)	(2)	206.40	0.1778	0.7627
8	4(3)	0.5(2)	3:7(1)	(3)	190.60	0.1662	0.5929
9	4(3)	0.6(3)	2:8(3)	(1)	209.20	0.2272	0.9065
K ₁	2.2555	2.2187	1.9996	1.8534			
K ₂	0.9689	1.1449	1.5193	1.7745			
K ₃	2.2621	2.1229	1.9676	1.8586			
R	1.2932	1.0738	0.4803	0.0841			

表 9 正交试验方差分析结果

Table 9 Analysis of variance results of orthogonal experiment

误差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
A	0.3697	2	0.1849	249.7362	0.004
B	0.2354	2	0.1177	159.0018	0.006
C	0.0481	2	0.0240	32.4715	0.030
D(误差)	0.0015	2	0.0007		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.05}(2, 2)=99.00$

结果, Sin-NE 的最优处方为油相用量 3%、联合乳化剂总用量 0.5%、BSP 与甘草酸质量比 1:9、超声时间 10 min、超声功率 325 W、青藤碱投药量 6.25 mg。根据最优处方制备 3 批纳米乳, 测其粒径和 PDI, 结果见表 10, 按照最优处方制备的 3 批纳米乳粒径相近, 说明处方的筛选较为理想。

2.4 理化性质考察

2.4.1 Sin-NE 的类型鉴别 (染色法^[25]) 利用染色

法对纳米乳类型进行鉴别, 分别取等量的 Sin-NE 放入玻璃瓶中, 再分别加入水溶性染料亚甲基蓝和油溶性染料苏丹红, 观察这 2 种染料在纳米乳中的扩散情况。结果如图 8 所示, 亚甲基蓝在 Sin-NE 中的扩散速度快于苏丹红, 表明 Sin-NE 为 O/W 型纳米乳。

表 10 验证试验 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Verification test ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	粒径/nm	PDI
1	141.20±1.31	0.141±0.030
2	148.80±4.41	0.126±0.014
3	150.30±4.59	0.146±0.020



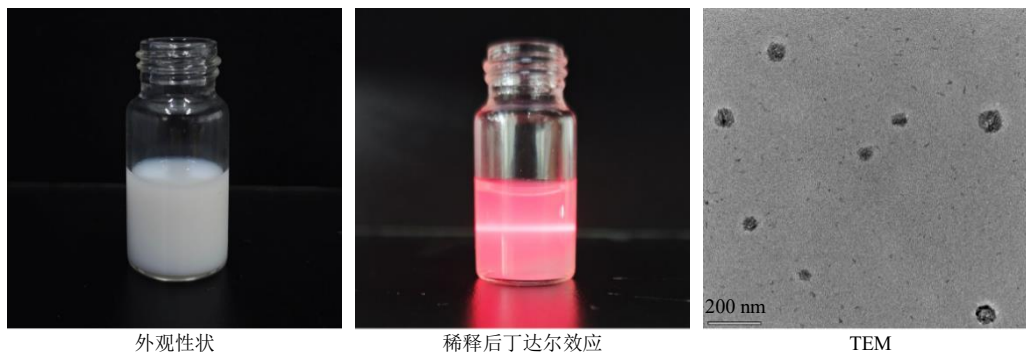
苏丹红 亚甲基蓝

图 8 Sin-NE 的染色鉴别

Fig. 8 Identification of Sin-NE staining

2.4.2 Sin-NE 的宏观微观形态 Sin-NE 外观为均匀的乳白色液体, 稀释后用红外线照射具有丁达尔现象 (图 9)。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, 用滤纸吸去多余的液体, 然后加入 3% 磷钨酸溶液 (pH 7.0) 复染 90 s, 再用滤纸吸去多余的液体。自然蒸发后, 用 TEM 在 200 nm 的尺寸下观察 Sin-NE 的微观形貌, 结果如图 9 所示, Sin-NE 呈大小均匀、形状饱满的圆球形。

2.4.3 粒径、PDI 和 ζ 电位 按处方制备 3 批 Sin-



外观性状

稀释后丁达尔效应

TEM

图 9 Sin-NE 的宏观和微观形态

Fig. 9 Macroscopic and microscopic morphology of Sin-NE

NE, 稀释 40 倍, 在室温下使用粒径仪测量纳米乳的平均粒径、PDI 以及 ζ 电位, 结果见图 10。测得 Sin-NE 的平均粒径为 (145.30 ± 2.35) nm, 平均 ζ 电位为 (-39.51 ± 0.43) mV, PDI 为 0.095 ± 0.022 。

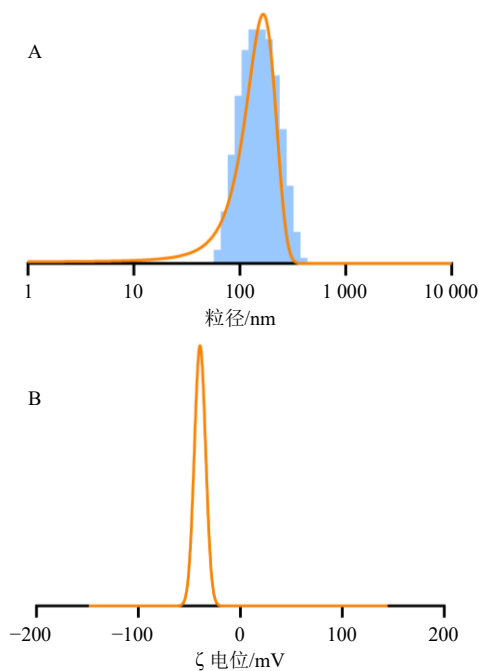


图 10 Sin-NE 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位分布 (B)
Fig. 10 Particle size distribution (A) and ζ potential distribution (B) of Sin-NE

2.4.4 pH 值的测定 按最优处方制备 Sin-NE, 室温下使用 pH 计测量其 pH 值, 平行 3 次, 取平均值, 结果为 3.990 ± 0.033 ($n=3$)。由于使用甘草酸作表面活性剂, 纳米乳 pH 值偏低, 符合皮肤给药制剂弱酸性的要求^[26]。

2.4.5 黏度的测定 黏度是透皮药物载体的重要参数, 它会影响稳定性和涂抹性, 较低的黏度有利于药物渗透到皮肤^[27]。按最优处方制备 Sin-NE, 室温下使用 NDJ-8S 旋转粘度计 (转子 0, 转速 6.0 r/min) 测量 Sin-NE 的黏度, 平行测量 3 次。Sin-NE 的平均黏度为 (66.32 ± 4.02) mPa·s ($n=3$)。

2.4.6 浊度的测量 参考文献的方法^[28]将制备的 Sin-NE 用去离子水稀释 50 倍, 用酶标仪在 650 nm 波长处测定 A 值, 重复测定 3 次, 根据公式计算其浊度为 (16.16 ± 2.29) cm⁻¹ ($n=3$)。

$$T = 2.303AD/L$$

T 为浊度, A 为波长 650 nm 处 A 值, D 为 NE 稀释比, L 为样品路径深度

2.5 稳定性考察

2.5.1 稀释稳定性 将新制备的 Sin-NE 分别稀释

50、100、200、1 000 倍, 考察纳米乳稀释后的粒径、PDI、 ζ 电位、外观性状。结果如表 11 和图 11 所示, 将纳米乳稀释以上倍数后, 可见 Sin-NE 无分层, 无沉淀析出, 呈稳定均一的透明状, 泛微蓝色乳光。粒径、PDI、 ζ 电位在稀释数倍后均无明显变化, 稳定性良好。

表 11 稀释稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Investigation of dilution stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

稀释倍数	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	162.20 ± 4.97	0.366 ± 0.032	-43.18 ± 0.52
50	166.80 ± 0.62	0.382 ± 0.030	-42.28 ± 0.43
100	159.50 ± 2.03	0.359 ± 0.013	-41.46 ± 0.84
200	164.70 ± 2.81	0.416 ± 0.041	-41.57 ± 0.38
1 000	166.20 ± 3.22	0.410 ± 0.015	-40.26 ± 0.46

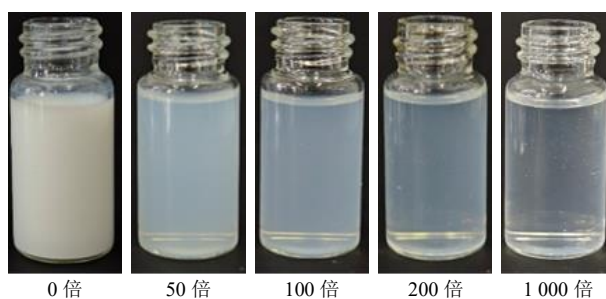


图 11 不同稀释倍数下的 Sin-NE 外观

Fig. 11 Appearance of Sin-NE at different dilution multiples

2.5.2 储存稳定性 按最优处方制备 3 批纳米乳, 常温下放置 30 d, 分别在第 0、7、14、21、28、30 天取样测定粒径、PDI 和 ζ 电位, 并观察其外观变化。结果如表 12 和图 12 所示, 纳米乳在放置 30 d 后, 粒径、PDI、 ζ 电位稳定, 乳液均匀, 无分层、破乳现象。

2.5.3 离心稳定性 取适量新配制的 Sin-NE, 分别于不同转速下 (1 000、2 000、3 000、4 000、5 000、6 000、7 000、8 000、9 000、10 000 r/min) 离心 10 min, 测量离心后纳米乳的粒径、 ζ 电位、PDI, 并

表 12 储存稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 12 Investigation of storage stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

储存时间/d	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	189.50 ± 2.13	0.188 ± 0.020	-37.60 ± 0.22
7	192.70 ± 2.53	0.158 ± 0.018	-37.45 ± 0.39
14	205.80 ± 4.54	0.213 ± 0.005	-36.38 ± 0.38
21	204.00 ± 2.35	0.140 ± 0.015	-36.07 ± 0.12
28	207.40 ± 4.53	0.205 ± 0.011	-37.03 ± 0.63
30	215.40 ± 4.54	0.201 ± 0.038	-34.07 ± 0.06

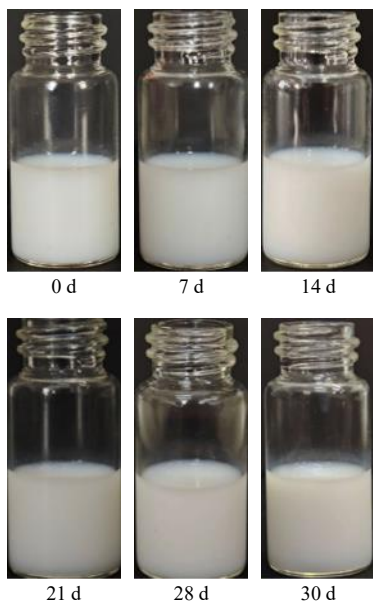


图 12 Sin-NE 30 d 储存期内的外观

Fig. 12 Appearance of Sin-NE during 30 d storage period

观察其外观。结果如表 13 和图 13 所示，纳米乳经不同转速离心后，粒径、 ζ 电位和 PDI 无明显变化，外观呈均匀的乳白色，无分层、破乳的现象。

表 13 离心稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 13 Investigation of centrifugal stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

离心转速/ ($r \cdot \text{min}^{-1}$)	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1 000	225.10 \pm 2.05	0.223 \pm 0.004	-36.89 \pm 0.64
2 000	224.20 \pm 3.50	0.212 \pm 0.008	-36.69 \pm 0.77
3 000	213.10 \pm 3.44	0.214 \pm 0.013	-38.08 \pm 0.41
4 000	217.50 \pm 0.66	0.174 \pm 0.012	-38.11 \pm 0.19
5 000	217.00 \pm 3.83	0.132 \pm 0.008	-37.06 \pm 0.65
6 000	220.30 \pm 3.24	0.220 \pm 0.012	-38.09 \pm 0.12
7 000	222.20 \pm 2.48	0.150 \pm 0.007	-38.07 \pm 0.32
8 000	217.80 \pm 0.56	0.137 \pm 0.025	-37.06 \pm 0.43
9 000	217.80 \pm 3.98	0.159 \pm 0.013	-36.85 \pm 0.18
10 000	224.90 \pm 3.85	0.179 \pm 0.005	-36.47 \pm 0.24

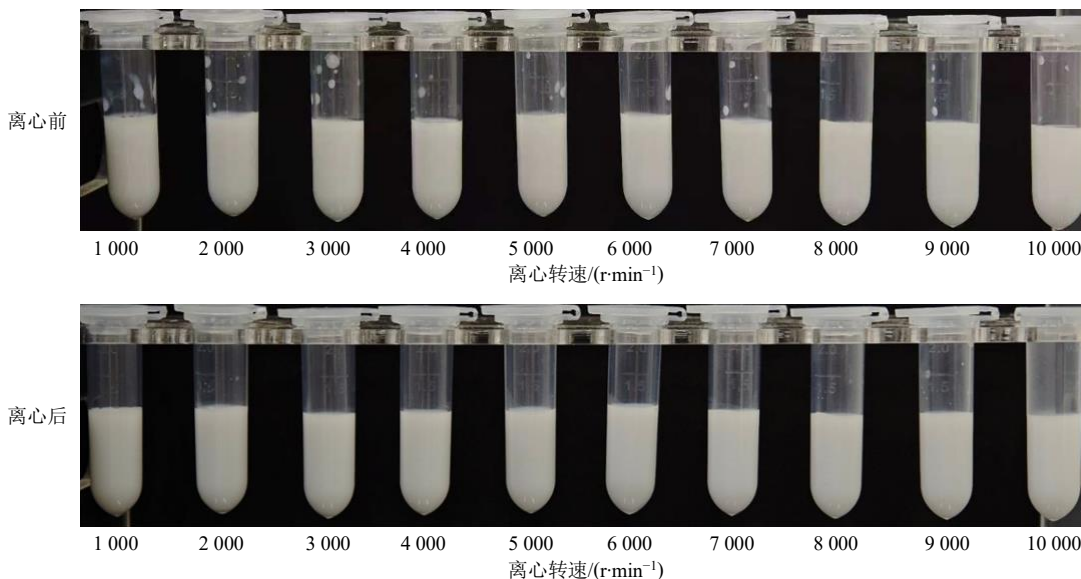


图 13 不同转速离心前后 Sin-NE 的外观

Fig. 13 Appearance of Sin-NE before and after centrifugation at different rotation speeds

2.5.4 热稳定性 按最优处方制备 3 批纳米乳，放置在 60 °C 环境中，分别于 0、3、5、7、10 d 取样测定粒径、PDI、 ζ 电位，观察其外观变化，结果如表 14 和图 14 所示，纳米乳在 60 °C 放置 10 d 内，粒径、PDI、 ζ 电位稳定，未出现大幅度变化，乳液均匀，无分层、破乳现象。

2.6 载药量及包封率

参考文献方法^[29]，取 1 mL Sin-NE 于离心管中，加入 4 mL 无水乙醇超声破乳，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，过微孔滤膜后，按照“2.2”项下条

表 14 热稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 14 Investigation of thermal stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

60 °C 放置时间/d	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	190.70 \pm 1.35	0.176 \pm 0.026	-41.01 \pm 0.71
3	194.10 \pm 3.93	0.155 \pm 0.029	-41.85 \pm 1.66
5	200.40 \pm 0.87	0.160 \pm 0.025	-41.32 \pm 1.61
7	203.90 \pm 1.60	0.136 \pm 0.036	-41.13 \pm 0.28
10	206.80 \pm 1.27	0.175 \pm 0.017	-40.50 \pm 0.32

件进行分析，测得青藤碱总量 ($W_{总}$)。另取 1 mL Sin-NE 于离心管中，加入 4 mL 无水乙醇，12 000 r/min

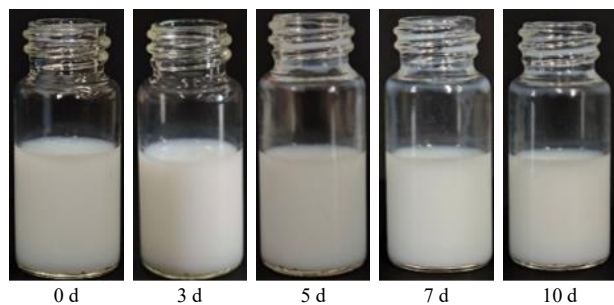


图 14 Sin-NE 在 60 °C 放置 10 d 内的外观

Fig. 14 Appearance of Sin-NE during 10 d at 60 °C

离心 10 min, 取上清液, 过微孔滤膜后按照“2.2”项下条件进行分析, 测得青藤碱游离药物量 ($W_{\text{游离}}$), 按照公式计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / (W_{\text{总}} + W_{\text{NE}})$$

2.7 体外释放研究

配制 pH 7.4 的 PBS 溶液作为释放介质, 添加 0.3% 的聚山梨酯 80 增加药物溶解度。分别将 1 mL Sin-NE 和 1 mL 青藤碱溶液 (溶剂为无水乙醇) 放入透析袋中 (截留相对分子质量 10 000), 绑紧透析袋两端, 放入离心管, 加入 10 mL 释放介质, 确保透析袋完全浸没在释放介质中。将离心管放入恒温摇床内, 37 °C, 100 r/min, 分别于 0、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72 h 吸取 1 mL 释

放液, 并补加同等体积的等温释放介质。取出样品经微孔滤膜滤过后, 按照“2.2”项下条件计算青藤碱的质量浓度, 并根据公式计算累积释放率 (Q_n), 绘制累积释放曲线, 结果如图 15 所示。

$$Q_n = (V_0 C_t + \sum_{i=1}^{t-1} V C_i) / W$$

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

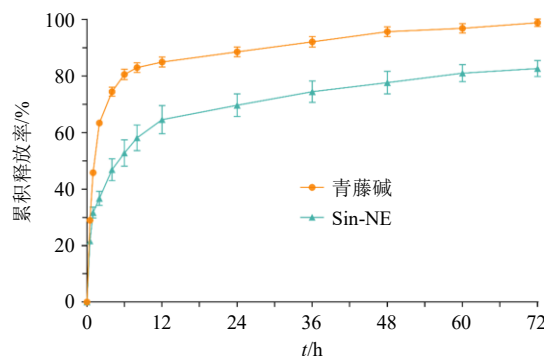


图 15 Sin-NE 和青藤碱的累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 15 Cumulative release curves for Sin-NE and sinomenine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

再分别用零级动力学、一级动力学、Weibull、Higuchi、Ritger Peppas 方程对其体外释药行为进行线性拟合, 结果见表 15。

据体外释放实验结果显示, Sin-NE 与青藤碱的

表 15 Sin-NE 和青藤碱体外释放曲线的拟合结果

Table 15 Fitting results of *in vitro* release curves of Sin-NE and sinomenine

模型	拟合方程	
	青藤碱	Sin-NE
零级动力学	$Q_n = 42.02 + 1.01 t, R^2 = 0.544$	$Q_n = 28.54 + 1.16 t, R^2 = 0.793$
一级动力学	$Q_n = 89.56 (1 - e^{-0.72 t}), R^2 = 0.974$	$Q_n = 72.45 (1 - e^{-0.53 t}), R^2 = 0.886$
Higuchi	$Q_n = 9.52 t^{1/2} + 3.49, R^2 = 0.718$	$Q_n = 8.29 t^{1/2} + 2.42, R^2 = 0.921$
Ritger-peppas	$Q_n = 43.51 t^{0.22}, R^2 = 0.847$	$Q_n = 29.18 t^{0.25}, R^2 = 0.973$
Weibull	$Q_n = 100 [1 - e^{-0.470 (t - 0.347)^{0.411}}], R^2 = 0.996$	$Q_n = 100 [1 - e^{-0.073 (t - 0.281)^{0.341}}], R^2 = 0.998$

释放行为具有明显差异, 青藤碱在初始阶段释放迅猛, 在 24 h 内即达到释放平台期, 累积释放率接近 90%, 表现出典型的突释和快速释放特征。相比之下, Sin-NE 的释放曲线则极为平缓, 在整个 72 h 周期内持续、缓慢地释放药物, 最终累积释放率在 80% 左右, 显著低于青藤碱, 表现出更为平缓、持续的释放趋势, 突显其缓释特性, 表明纳米乳体系对药物释放具有良好的调控能力。

为进一步阐明其释放机制, 对释放数据进行了多种数学模型拟合 (表 15), 在零级动力学模型中,

Sin-NE 的拟合度相对较高, 表明其释放行为在部分时间段内接近恒速, 具备一定的控释特征。一级动力学对青藤碱拟合最佳, 说明其释放速率与药物剩余量直接相关, 是简单的扩散过程。Higuchi 方程对 Sin-NE 拟合良好, 提示其释放可能是由药物从纳米乳基质中的扩散过程所主导。对于青藤碱, 一级动力学和 Weibull 模型的高拟合度表明其释放是一个与浓度梯度相关的简单扩散过程, 无其他复杂屏障控制。

综上, Sin-NE 较青藤碱具有更明显的缓释效果

和更优的模型拟合性能,表明该纳米乳系统可实现青藤碱的持续、可控释放,为提高其生物利用度和延长体内作用时间提供了理论基础。

2.8 Sin-NE 的抗炎活性研究

2.8.1 细胞培养条件 RAW264.7 细胞培养环境为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度,培养基为含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液。

2.8.2 细胞活性筛选 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种到 96 孔板中,接种密度为 1 × 10⁴ 个/孔,培养至细胞贴壁后,分为空白组、对照组、Sin-NE 组、NE 组、青藤碱组、甘草酸组、BSP 组、BSP-甘草酸 (BSP 与甘草酸质量比 1 : 9) 组。弃培养基, Sin-NE 组加入不同质量浓度 (0、5、10、15、20、25、30、35、40 μg/mL) 的 Sin-NE (以青藤碱的含量计),青藤碱组的给药质量浓度为 20、40、60、80、100、120、140、160 μg/mL; NE 组、甘草酸组、BSP 组、BSP-甘草酸组的给药质量浓度为 191、382、573、765、956、1 147、1 338、1 530 μg/mL; 对照组每孔加入 DMEM 培养液 100 μL; 空

白组不接种细胞,每孔加入 DMEM 培养液 100 μL。培养 24 h 后,每孔加入 20 μL 质量浓度为 0.5 mg/mL 的 噻 唑 蓝 (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)。4 h 后停止培养,弃 MTT,每孔加入二甲基亚砷并低速振荡 5 min,在 490 nm 波长处测量 A 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_s - A_b) / (A_c - A_b)$$

A_s 为药物组的吸光度, A_b 为空白组的吸光度, A_c 为对照组的吸光度

结果见表 16, Sin-NE 在 20 μg/mL 质量浓度范围内,对细胞无明显毒性,细胞存活率均在 80% 以上; NE 在 765 μg/mL 质量浓度范围内对细胞无明显毒性。青藤碱在 120 μg/mL 以下质量浓度几乎无毒性,说明 Sin-NE 的细胞毒性是由于其中的空白纳米乳浓度过高导致。结果见表 17, BSP 在 1 530 μg/mL 范围内无细胞毒性,表现出良好的生物相容性。甘草酸、BSP-甘草酸在 956 μg/mL 对细胞的存活率有明显影响,且甘草酸、BSP-甘草酸、NE 毒性范围重合,说明三者毒性由甘草酸主导。

表 16 Sin-NE、NE、青藤碱对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 16 Effects of Sin-NE, NE, and sinomenine on viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Sin-NE/(μg·mL ⁻¹)	存活率/%	NE/(μg·mL ⁻¹)	存活率/%	青藤碱/(μg·mL ⁻¹)	存活率/%
5	90.60 ± 5.89	191	102.59 ± 3.37	20	99.86 ± 1.39
10	96.26 ± 2.13	382	98.20 ± 6.16	40	101.18 ± 1.53
15	89.60 ± 4.59	573	104.60 ± 4.15	60	104.42 ± 8.10
20	86.29 ± 1.21	765	89.70 ± 1.81	80	108.81 ± 3.42
25	64.27 ± 7.62	956	77.29 ± 1.34	100	102.05 ± 3.31
30	51.95 ± 3.36	1 147	62.39 ± 1.12	120	90.29 ± 1.85
35	46.93 ± 2.91	1 338	46.75 ± 2.14	140	67.89 ± 2.32
40	39.07 ± 0.51	1 530	46.97 ± 2.30	160	47.08 ± 2.77

表 17 BSP-甘草酸、甘草酸、BSP 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 17 Effects of BSP-glycyrrhizic acid, glycyrrhizic acid, and BSP on viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

BSP-甘草酸/(μg·mL ⁻¹)	存活率/%	甘草酸/(μg·mL ⁻¹)	存活率/%	BSP/(μg·mL ⁻¹)	存活率/%
191	99.30 ± 0.94	191	92.91 ± 4.41	191	90.02 ± 10.73
382	98.13 ± 2.71	382	90.38 ± 1.30	382	100.94 ± 9.24
573	92.75 ± 6.71	573	90.06 ± 1.38	573	103.81 ± 5.93
765	100.52 ± 5.38	765	90.14 ± 5.08	765	90.23 ± 4.34
956	56.33 ± 1.61	956	59.45 ± 2.11	956	91.05 ± 5.25
1 147	42.28 ± 0.43	1 147	38.28 ± 1.53	1 147	86.67 ± 1.32
1 338	30.68 ± 2.15	1 338	26.93 ± 0.46	1 338	89.33 ± 8.38
1 530	29.29 ± 1.42	1 530	28.63 ± 0.15	1 530	99.30 ± 5.16

2.8.3 NO 的抑制作用 根据细胞毒性的筛选结果, Sin-NE 组、青藤碱组均选择安全质量浓度 20 μg/mL 作为给药质量浓度, NE 组选择 765 μg/mL,

与 Sin-NE 组中纳米乳载体 (不含青藤碱) 的浓度保持一致。取对数生长期 RAW264.7 细胞, 接种到 96 孔板中, 接种密度为 1 × 10⁴ 个/孔, 待细胞贴壁后,

分为对照组、模型组、青藤碱组、Sin-NE 组、NE 组。对照组加入 DMEM, 其他 4 组加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 溶液构建细胞炎症模型。24 h 后弃去上清, 对照组和模型组加入 DMEM; Sin-NE 组、青藤碱组分别加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Sin-NE、青藤碱; NE 组加入 765 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NE。24 h 后停止培养, 分别吸取 50 μL 细胞上清液置于另一块 96 孔板中, 按 NO 试剂盒说明书进行操作并记录实验结果。结果如表 18 所示, 模型组细胞经 LPS 刺激后 NO 释放量显著升高, 给药组均使 RAW264.7 细胞 NO 释放量降低, 说明具有良好的抗炎效果, 其中 Sin-NE 组抗炎效果最为突出, 优于 NE 组和青藤碱组。

表 18 Sin-NE、NE、青藤碱对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液中 NO、IL-6、TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 18 Effects of Sin-NE, NE, and sinomenine on LPS-induced NO, IL-6, and TNF- α levels in RAW264.7 cell supernatants ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	1.85 \pm 0.57***	21.33 \pm 1.45***	1.40 \pm 1.27***
模型	36.36 \pm 0.67	58.84 \pm 4.21	2 170.00 \pm 98.62
NE	24.89 \pm 0.91***	50.83 \pm 1.36	1 344.90 \pm 274.35**
青藤碱	12.48 \pm 0.47***	36.76 \pm 3.60***	1 252.91 \pm 193.60**
Sin-NE	9.65 \pm 0.29***	28.61 \pm 1.00***	362.46 \pm 46.54***

与模型组比较: *** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

2.8.4 ELISA 测定细胞上清炎症因子水平 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 接种于 96 孔板中, 接种密度为 1×10^4 个/孔, 待细胞贴壁后, 分为对照组、模型组、青藤碱组、Sin-NE 组、NE 组。对照组加入 DMEM, 其余 4 组加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液构建细胞炎症模型。24 h 后弃去上清, 对照组和模型组加入 DMEM; Sin-NE 组、青藤碱组分别加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Sin-NE、青藤碱; NE 组加入 765 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NE。24 h 后停止培养, 收集细胞上清, 用 ELISA 试剂盒检测 IL-6、TNF- α 的含量。结果如表 18 所示, 与对照组相比, 模型组细胞上清中 IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 除 NE 组 IL-6 外, 其余各组细胞上清中 IL-6、TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 说明该纳米乳对细胞炎症模型中炎症因子的表达具有明确的抑制作用, 其中 Sin-NE 组效果最为明显, 优于青藤碱组和 NE 组, 说明将青藤碱载入纳米乳能提高其抗炎活性。

3 讨论

青藤碱作为天然活性成分, 其临床应用长期受限于低水溶性与肝脏首过效应显著导致的低生物利用度^[30]。纳米乳是一种热力学和动力学稳定体系, 能够高效包载药物, 提高药物的利用度, 但其制备高度依赖合成表面活性剂。本研究创新性地提出了一种基于 BSP 和甘草酸的共稳定策略, 成功制备了以薏苡仁油为油相的 Sin-NE 纳米乳。该纳米乳具有良好的离心、储存、稀释、加热稳定性和缓释特性, 粒径为 150 nm 左右。与传统的合成表面活性剂 (如聚山梨酯、司盘等) 相比, 本研究所制备的纳米乳以天然活性成分 BSP 和甘草酸为表面活性剂, 具有“药辅合一, 协同增效”潜力。这种由“天然多糖-天然皂苷”共稳定的双重天然来源纳米乳载体体系, 在青藤碱载体设计研究中目前尚未见报道。

从组分协同机制来看, BSP 作为天然高分子聚合物, 其分子链上的羟基、羧基可通过氢键与青藤碱分子相互作用, 既能提高药物在油相中的溶解度, 又能在纳米乳界面形成致密的空间位阻层, 抑制粒子聚集^[31]。此外, 甘草酸作为天然皂苷类表面活性剂, 不仅具备优异的乳化能力 (临界胶束浓度低至 0.02 mmol/L), 可降低油-水界面张力以稳定粒径, 可辅助提升生物利用度^[32]。二者协同作用下, 体系实现了 150 nm 左右的均一粒径 ($\text{PDI} < 0.2$) 与良好的物理稳定性 (25 $^{\circ}\text{C}$ 储存 30 d 粒径无显著变化), 稳定性显著优于单一 BSP 稳定的纳米乳 (储存 7 d 后出现分层) 或单一甘草酸稳定的纳米乳 (储存 7 d 后粒径增大, 有分层现象), 证实了共稳定策略的科学性与优越性。

药物的缓慢释放是药物能在体内长效发挥作用的关键, 能够有效维持平稳的治疗性血药浓度, 避免因传统剂型快速释放所引起的“峰谷现象”, 从而显著降低毒副作用风险、延长药物作用时间^[33]。结果显示, Sin-NE 的药物释放行为在零级动力学模型中拟合度相对较高, 且部分时间段内接近恒速, 此外, Higuchi 方程对 Sin-NE 拟合良好, 提示其释放可能由药物从纳米乳基质中的扩散过程所主导, 可实现青藤碱的持续、可控释放。对于青藤碱, 一级动力学和 Weibull 模型的高拟合度表明其释放是一个与浓度梯度相关的简单扩散过程, 无其他复杂屏障控制。

与 NE、青藤碱组相比, Sin-NE 在体外能显著

抑制炎症细胞中 NO 的释放,有效降低 IL-6 和 TNF- α 炎症因子的水平,这可归因于纳米乳中 BSP、甘草酸、青藤碱和薏苡仁油协同作用的结果。其中,青藤碱可抑制 NF- κ B 通路。其作用机制在于抑制 I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 的活化,从而阻止 I κ B α 的降解,使得 NF- κ B p65 亚基被锚定在胞质中无法入核启动炎症基因的转录^[34]。甘草酸同样被证实能有效抑制 NF- κ B 通路。其机制可能与干扰 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 信号转导及随后 IKK 的激活有关。此外,甘草酸还能诱导细胞产生抗氧化蛋白,如血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1),而 HO-1 的激活已被证明可以负反馈抑制 NF- κ B 的活性^[35]。研究表明,BSP 可通过调控巨噬细胞极化,即抑制促炎的 M1 型而促进抗炎的 M2 型,来发挥抗炎作用。M2 型巨噬细胞的特征之一是 NF- κ B 活性降低^[36]。薏苡仁油中的活性成分(如三酰甘油、酯类)也被报道具有抗炎活性,其部分机制也与抑制 NF- κ B p65 的核转位相关^[37]。Sin-NE 显著提高了青藤碱的生物利用度,为新型青藤碱纳米制剂的开发提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐易琳,黄莉,周莉莉,等.青藤碱药理作用及临床应用的研究进展[J].华西药理学杂志,2024,39(2):209-215.
- [2] 罗艳群,沈小兰,蔡三金,等.青藤碱化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(3):898-911.
- [3] 周莹莹,刘宇灵,林龙飞,等.青藤碱及其新剂型治疗类风湿性关节炎的研究进展[J].中草药,2021,52(24):7709-7717.
- [4] Song L Q, Liu D, Zhao Y, et al. Sinomenine inhibits breast cancer cell invasion and migration by suppressing NF- κ B activation mediated by IL-4/miR-324-5p/CUEDC2 axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(3): 705-710.
- [5] Zeng M Y, Tong Q Y. Anti-inflammation effects of sinomenine on macrophages through suppressing activated TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(1): 130-137.
- [6] 王金凤,王枫,刘杰,等.青藤碱通过 JAK/STAT 通路调控巨噬细胞极化改善胶原诱导性关节炎大鼠炎症和骨破坏的作用研究[J].中药药理与临床,2025,41(5):27-33.
- [7] Zhang B, Zhang H J, Luo H, et al. Sinomenine can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by regulating the Akt/Runx2 signaling pathway in MC3T3-E1 cells [J]. *Pharmazie*, 2019, 74(12): 747-750.
- [8] 邹颺,李浩,尚江荫子,等.青藤碱对前成骨细胞增殖、分化的影响及可能的作用机制[J].江西医药,2018,53(2):119-121.
- [9] 张晓强,李孟芳,李萍.正清风痛宁缓释片联合苓液汤治疗干燥综合征 41 例临床观察[J].新中医,2014,46(2):117-119.
- [10] 冯皓盈,王东凯,代英辉.青藤碱治疗类风湿关节炎新剂型研究进展[J].中国药剂学杂志:网络版,2025,23(2):109-119.
- [11] 张游,唐旖雯,彭玉婷,等.青藤碱治疗类风湿关节炎的作用机制研究进展[J].广西中医药大学学报,2025,28(3):59-63.
- [12] 张继芬,董芳明,刘川,等.药物纳米晶自稳定 Pickering 乳液给药系统研究的关键问题[J].药学报,2024,59(6):1582-1592.
- [13] 阮慧妮,丁文雅,杨旭,等.中药皂苷类成分纳米制剂的研究进展[J].中国医院药学杂志,2025,45(7):827-833.
- [14] 马永强,牛绩超,尤婷婷,等. Pickering 乳液的稳定性研究及其在食品领域的应用进展[J].食品工业科技,2023,44(23):376-386.
- [15] Chachra D, Coote J G, Parton R, et al. Haemolytic and cytotoxic activities of the Tween 80-extracted putative haemolysin of *Pasteurella multocida* B:2 [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 150(3/4): 331-337.
- [16] 陈悦,官智超,樊文洁,等.以甘草酸为稳定剂的白藜芦醇纳米混悬剂的制备及评价[J].广东药科大学学报,2025,41(4):16-22.
- [17] 周晶晶,周洁,窦霞,等.不同炮制方法对甘草化学成分及药理作用的影响研究[J].中华中医药学刊,2024,42(5):244-249.
- [18] Wu Y F, Guo Y L, Huang T R, et al. Licorice flavonoid alleviates gastric ulcers by producing changes in gut microbiota and promoting mucus cell regeneration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115868.
- [19] 沈晓静,秦宇,华宗,等.白及多糖的提取纯化、结构鉴定及生物活性研究进展[J].中华中医药学刊,2024,42(5):225-232.
- [20] Wang Y R, Han S W, Li R F, et al. Structural characterization and immunological activity of polysaccharides from the tuber of *Bletilla striata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 122: 628-635.
- [21] 冯永波,高景,周忠海,等.白及多糖对巨噬细胞 M1 型极化的调节作用及机制研究[J].药物评价研究,2024,47(11):2525-2532.

- [22] Chen Z Y, Cheng L Z, He Y C, *et al.* Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of *Bletilla striata* polysaccharide: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 2076-2085.
- [23] 刘家燕. 解毒散结方对肝热血瘀型肝癌 TACE 术后疗效的影响及其基于数据挖掘的组方规律研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2025.
- [24] Tan S F, Masoumi H R F, Karjiban R A, *et al.* Ultrasonic emulsification of parenteral valproic acid-loaded nanoemulsion with response surface methodology and evaluation of its stability [J]. *Ultrason Sonochem*, 2016, 29: 299-308.
- [25] Devendiran D K, Amirtham V A. A review on preparation, characterization, properties and applications of nanofluids [J]. *Renew Sustain Energy Rev*, 2016, 60: 21-40.
- [26] Blaak J, Staib P. The relation of pH and skin cleansing [J]. *Curr Probl Dermatol*, 2018, 54: 132-142.
- [27] Zhu Y, Chen T, Feng T T, *et al.* Fabrication and biological activities of all-in-one composite nanoemulsion based on *Blumea balsamifera* oil-tea tree oil [J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5889.
- [28] Hou P P, Pu F L, Zou H Y, *et al.* Whey protein stabilized nanoemulsion: A potential delivery system for ginsenoside Rg₃ whey protein stabilized nanoemulsion: Potential Rg₃ delivery system [J]. *Food Biosci*, 2019, 31: 100427.
- [29] 李伟宏, 张涛, 高娟, 等. 白藜芦醇 pH 敏感介孔二氧化硅纳米粒的制备、表征和体外抗肿瘤活性 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(8): 1934-1942.
- [30] 赵海燕, 陆金玲, 鲁妍, 等. 光甘草定烟酰胺纳米乳的制剂评价与透皮吸收 [J]. *中南民族大学学报: 自然科学版*, 2024, 43(4): 468-473.
- [31] 郑海新. 大黄酚-Pluronic F127/甘草酸混合胶束的制备、药动学及体外抗肿瘤初步研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2025.
- [32] Guo Y L, Zhang X P, Wang X H, *et al.* Nanoemulsions stable against Ostwald ripening [J]. *Langmuir*, 2024, 40(2): 1364-1372.
- [33] 魏征. 小檗碱复合磷脂醇质体水凝胶的制备及其治疗小鼠乳腺炎的效果评估 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2025.
- [34] Liu W W, Zhang Y J, Zhu W N, *et al.* Sinomenine inhibits the progression of rheumatoid arthritis by regulating the secretion of inflammatory cytokines and monocyte/macrophage subsets [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2228.
- [35] Wang Y J, Wang L L, Luo R L, *et al.* Glycyrrhizic acid against *Mycoplasma gallisepticum*-induced inflammation and apoptosis through suppressing the MAPK pathway in chickens [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(6): 1996-2009.
- [36] Yue L, Wang W, Wang Y, *et al.* *Bletilla striata* polysaccharide inhibits angiotensin II-induced ROS and inflammation via NOX4 and TLR2 pathways [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 89: 376-388.
- [37] Zhang C F, Zhang W F, Shi R Y, *et al.* *Coix lachryma-jobi* extract ameliorates inflammation and oxidative stress in a complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis model [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 792-798.

[责任编辑 郑礼胜]