

姚秋萍, 严敏, 何可群, 等. 鱼腥草多糖纳米乳的制备及质量评价[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(22): 190–193.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.22.045

鱼腥草多糖纳米乳的制备及质量评价

姚秋萍, 严敏, 何可群, 周培富, 姜春兰

[贵州民族大学化学工程学院(民族医药学院), 贵州 550025]

摘要:制备鱼腥草多糖纳米乳并进行质量评价。通过伪三元相图法优化鱼腥草多糖纳米乳剂的配方,测定其形态、粒径分布、pH 值、黏度、稳定性及有效成分含量。结果表明,鱼腥草多糖纳米乳剂的配方为 Tween80/Span80、无水乙醇、液体石蜡、1% 鱼腥草多糖溶液配方的质量比为 9:3:3:10:2.8,制备的鱼腥草多糖纳米乳剂为 W/O 型,透射电镜下呈圆球形,平均粒径为 143.5 nm,外观为棕黄色透明液体,pH 值为 6.81,黏度为 9.08 s,理化性质稳定。鱼腥草多糖纳米乳剂制备工艺简单,具有较大的开发应用价值。

关键词:鱼腥草;多糖;纳米乳剂;制备;理化性质;三元相图

中图分类号: R944.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)22-0190-04

纳米乳(nanoemulsion,简称 NE)由水相、表面活性剂、油相按比例制成的粒径在 10~200 nm,透明或半透明乳化运输体系^[1]。纳米乳作为一种极具前途的新型药物载体,具有极高的稳定性、提高难溶性药物的溶解度、促进大分子水溶性药物在体内的吸收、提高药物的生物利用度等优点^[2-3]。鱼腥草多糖是鱼腥草的主要有效成分之一,药理研究表明,鱼腥草多糖具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化和抑菌等作用^[4-6]。目前对多糖纳米乳剂的研究已有相关文献报道,大豆多糖与大豆酸溶蛋白在高压微射流作用下可制备成纳米乳液^[7]。藏蒲公英多糖纳米乳能通过调节体内的激素水平,从而提高蛋鸡生产性能,能促进小鼠器官的生长发育提高机体免疫力^[8-10]。以鲑鱼软骨多糖生产的眼用纳米乳制剂为例,其质量稳定,符合眼用制剂的标准^[11]。黄芪多糖与紫锥菊提取物纳米乳佐剂能显著增强机体抗体的产生能力,同时可以增强 Th1 和 Th2 的免疫应答反应^[12]。本研究通过筛选合适的油、表面活性剂和助表面活性剂,制备了 W/O 型鱼腥草多糖纳米乳剂,并对其理化性质进行研究,以期利用纳米技术开发中药多糖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

鱼腥草多糖为实验室自制(水提醇沉法提取鱼腥草多糖,Sevag 法除蛋白,鱼腥草多糖含量为 24.45%),Tween80、Tween60、Span80、Span60、肉豆蔻酸异丙酯、液体石蜡、无水乙醇、丙三醇、正丁醇、乙酸乙酯、苏丹红Ⅲ、亚甲基蓝等均为分析纯。玉米油、大豆油(江西益普生药业有限公司,药用级)。

1.2 主要仪器

分析天平(JA5003 型,舜宇恒平仪器)、磁力加热搅拌器(78-1 型,常州澳华仪器有限公司)、高速离心机(TDL-

8M,卢湘仪)、双光束紫外可见分光光度计(TU-1901,北京普析通用有限责任公司)、Tecnai G² F20 S-Twin 场发射高分辨率透射电子显微镜(FEI 公司)、Mastersizer 2000 激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司)。

1.3 鱼腥草多糖纳米乳配方的筛选

按一定比例将筛选出的表面活性剂、助表面活性剂、油相和水相进行混合,制备鱼腥草多糖纳米乳。

1.4 鱼腥草多糖纳米乳中鱼腥草多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸对鱼腥草多糖纳米乳中的多糖含量进行测定^[13]。

1.5 鱼腥草多糖纳米乳类型的鉴定

采用染色法判断鱼腥草多糖纳米乳类型^[14]。

1.6 鱼腥草多糖纳米乳稳定性试验

取鱼腥草多糖纳米乳适量,分别于温度为 4、25、37、40、60℃条件下保存,分别于 5、10 d 后取样考察,观察其外观、pH 值和鱼腥草多糖含量。

2 结果与分析

2.1 鱼腥草纳米乳配方的筛选

2.1.1 表面活性剂的选择 试验选用 Tween 80[亲水亲油平衡值(hydrophile lipophilic balance,简称 HLB,HLB=14.9)]、Tween 60(HLB=15)、Span80(HLB=4.3)、Span60(HLB=4.7)作为表面活性剂,根据混合表面活性剂 HLB 值,对以上表面活性剂进行复配和热稳定性观察,由表 1 可知,最佳表面活性剂复配组合为 Tween80 和 Span80。

在室温下,分别将混合表面活性剂 Tween80 和 Span80 按质量比为 2:1.3:1.4:1 进行混合,以液体石蜡为油相,加水搅拌至形成透明的纳米乳剂,观察纳米乳的澄清度和黏度变化。采用 Origin 7.0 软件,分别以混合表面活性剂、油相、水相作为相图的 3 个顶点绘制伪三元相图(图 1)。当 Tween80 和 Span80 质量比为 3:1 时,Tween80/Span80、液体石蜡、水形成的纳米乳区的面积最大。

2.1.2 助表面活性剂的选择 试验选用无水乙醇、正丁醇和丙三醇作为助表面活性剂。将混合表面活性剂与助表面活性

收稿日期:2018-01-22

基金项目:贵州省科技合作计划(编号:黔科合字[2015]7210)。

作者简介:姚秋萍(1978—),女,陕西渭南人,博士,副教授,从事天然产物综合利用研究。E-mail:wonderyqp@aliyun.com。

表 1 表面活性剂复配结果

混合表面活性剂	质量比	外观		
		4 ℃	室温	60 ℃
Tween80/Span60	1 : 1, 2 : 1	乳白色膏状固体	乳白色膏状固体	澄清透明液体
Tween80/Span80	1 : 1, 2 : 1	澄清透明液体	澄清透明液体	澄清透明液体
Tween60/Span80	1 : 1, 2 : 1	破乳分层液体	白沫分层液体	澄清透明液体
Tween60/Span60	1 : 1, 2 : 1	乳白色膏状固体	乳白色浑浊液体	澄清透明液体

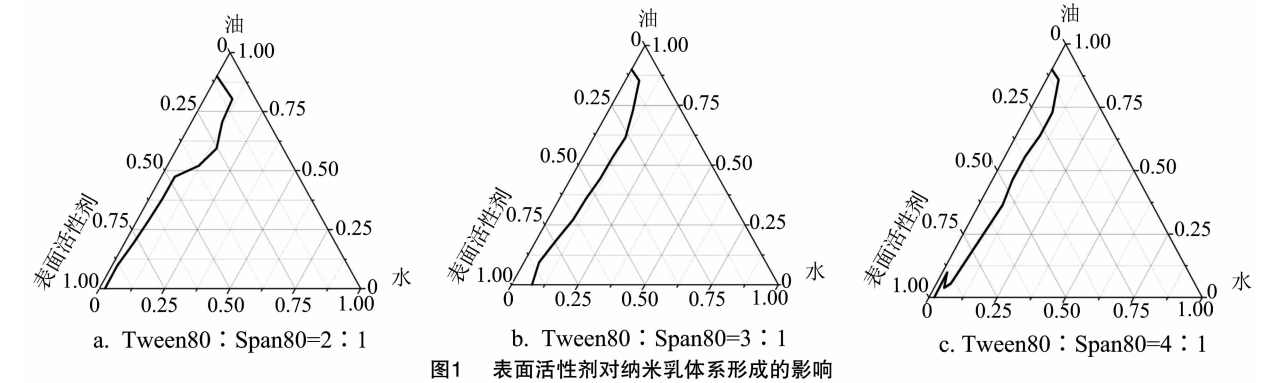


图1 表面活性剂对纳米乳体系形成的影响

剂按 $K_m = 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1$ 混合,再分别与液体石蜡混匀后进行筛选。由表 2 可知,无水乙醇($K_m = 3 : 1, 4 : 1$)和丙三醇($K_m = 4 : 1$)能形成澄清透明的纳米乳剂。由图 2 可知,当 $K_m = 4 : 1$ 时,无水乙醇作为助表面活性剂形成的纳米乳区面积最大,并且纳米乳易形成,不会出现凝胶等形态。因此,确定 $K_m = 4 : 1$ 。

表 2 助表面活性剂的筛选结果

助表面活性剂	K_m	外观		
		4 ℃	室温	60 ℃
无水乙醇	1 : 1, 2 : 1	浑浊,油水分离	浑浊,油水分离	浑浊,破乳分层
无水乙醇	3 : 1, 4 : 1	半透明	澄清透明液体	澄清透明液体
正丁醇	1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1	乳白色浑浊,有浮沫	乳白色浑浊	乳白色浑浊
丙三醇	1 : 1, 2 : 1, 3 : 1	浑浊	浑浊	浑浊
丙三醇	4 : 1	透明	透明	透明

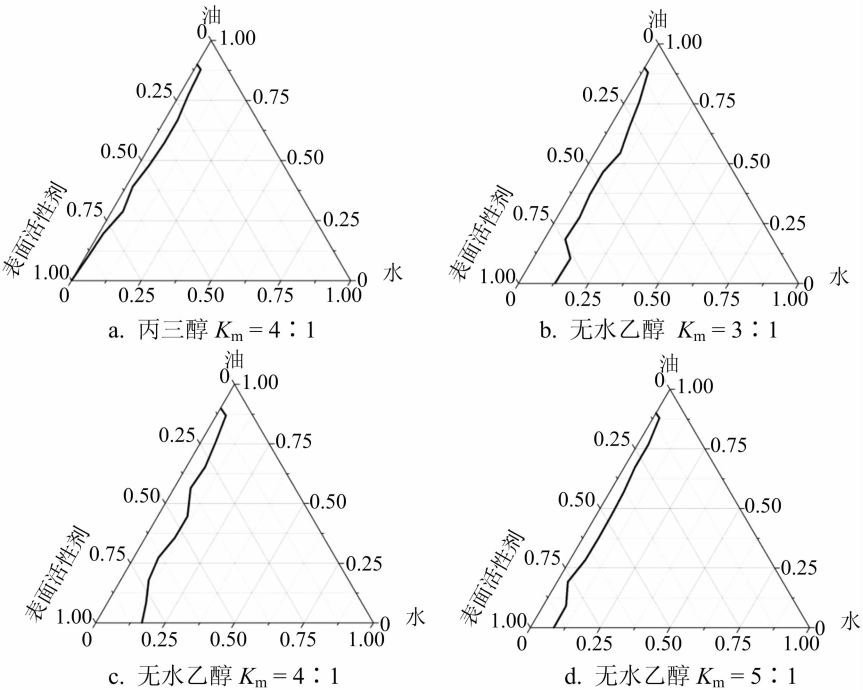


图2 不同 K_m 值对纳米乳体系形成的影响

2.1.3 油相的选择 试验选择玉米油、大豆油、液体石蜡和肉豆蔻酸异丙酯作为待选油相。由表 3 可知,玉米油和大豆油都不能形成纳米乳,肉豆蔻酸异丙酯在温度为 60 ℃ 时纳米

乳变浑浊,而液体石蜡作为油相是最稳定的。因此,选择液体石蜡为最佳油相。

表 3 油相的筛选结果

待选油相	质量比 (S/O)	外观		
		4 ℃	室温	60 ℃
玉米油	1:9.2:8.3:7	浑浊	油水分层半透明	油水分层半透明
大豆油	1:9.2:8.3:7	浑浊破乳分层	浑浊破乳分层	浑浊破乳分层
液体石蜡	1:9.2:8.3:7	透明	透明	透明
肉豆蔻酸异丙酯	1:9.2:8.3:7	透明	透明	浑浊

注:S/O 为混合表面活性剂与油相的质量比。

2.1.4 水相的选择 试验以不同浓度的鱼腥草多糖作为水相进行筛选。由表 4 可知,温度为 60 ℃ 时,形成的纳米乳浑浊。由图 3 可知,鱼腥草多糖浓度在 1%~4% 时,纳米乳区的面积没有明显变化;浓度为 5% 和 8% 时纳米乳区的面积明显减小。当鱼腥草多糖浓度为 1% 时,纳米乳区面积最大,并且当 S/O 为 3:2 时加入的水量最多,载药量也最大。

鱼腥草多糖纳米乳中各组分的质量比 Tween80:Span80:无水乙醇:液体石蜡:1% 鱼腥草多糖=9:3:3:10:2.8。

表 4 水相的筛选结果

鱼腥草多糖溶液 浓度(%)	质量比 (S/O)	外观			
		4 ℃	室温	40 ℃	60 ℃
1	1:9~9:1	透明	透明	透明	浑浊
2	1:9~9:1	透明	透明	透明	浑浊
3	1:9~9:1	透明	透明	透明	浑浊
4	1:9~9:1	透明	透明	半透明	浑浊
5	1:9~9:1	透明	透明	半透明	浑浊
8	1:9~9:1	透明	透明	半透明	浑浊

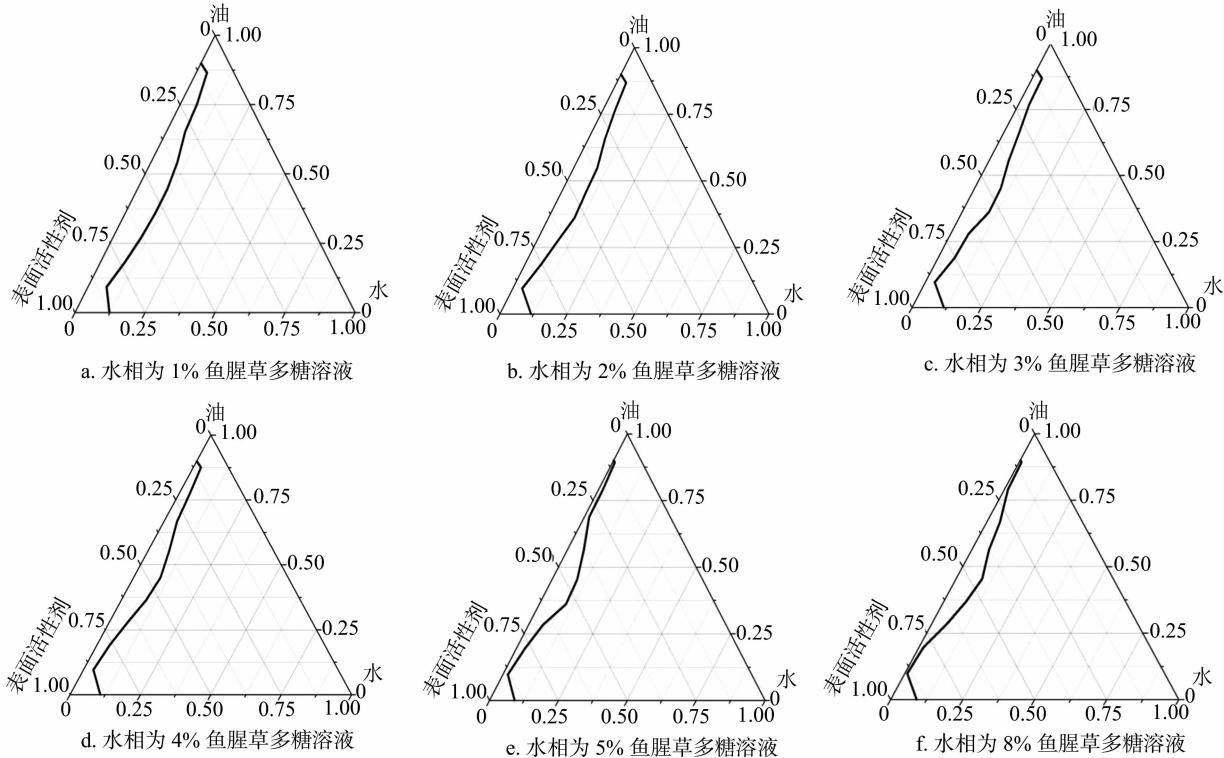


图 3 鱼腥草多糖浓度对纳米乳体系形成的影响

2.2 鱼腥草多糖纳米乳的理化性质

2.2.1 纳米乳多糖含量 采用苯酚-硫酸法测定鱼腥草多糖纳米乳中鱼腥草多糖含量,以葡萄糖浓度(mg/mL)为横坐标、吸光度值为纵坐标制作标准曲线,回归方程为 $y = 11.626x + 0.0347$, $r^2 = 0.9964$,经测定本试验的纳米乳多糖含量为 8.55 mg/mL。

2.2.2 外观和 pH 值 鱼腥草多糖纳米乳剂外观为棕黄色透明液体,流动性良好,pH 值为 6.81。

2.2.3 黏度 取出口内径为 1.2 mm 的玻璃吸管吸取鱼腥

草多糖纳米乳剂 1 mL,在室温下记录流出所需要的时间(即为其黏度,s)。测得本试验的纳米乳黏度为 9.08 s。

2.2.4 形态及粒径 鱼腥草多糖纳米乳在透射电镜下呈圆球形(图 4),平均粒径为 143.5 nm。

2.3.5 鱼腥草多糖纳米乳的类型 根据水溶性染料亚甲基蓝(蓝色)易在水相中扩散,油溶性染料苏丹Ⅲ号(红色)易在油相中扩散的特点,结果表明,苏丹Ⅲ号的扩散速度比亚甲基蓝快,即鱼腥草多糖纳米乳属于 W/O 型。

2.3.6 鱼腥草多糖纳米乳的稳定性考察 将鱼腥草多糖纳

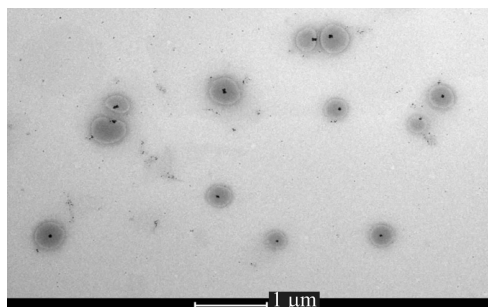


图4 鱼腥草多糖纳米乳透射电镜照片

表5 鱼腥草多糖纳米乳的稳定性

放置条件 (℃)	pH 值			多糖含量(%)			外观		
	0 d	15 d	30 d	0 d	15 d	30 d	0 d	15 d	30 d
4	6.81	6.81	6.81	9.6	9.6	9.6	棕黄色透明	棕黄色透明	棕黄色透明
25	6.81	6.81	6.81	9.6	9.6	9.6	棕黄色透明	棕黄色透明	棕黄色透明
37	6.81	6.81	6.81	9.6	9.6	9.6	棕黄色透明	棕黄色透明	棕黄色透明
40	6.81	6.76	6.73	9.6	9.6	9.6	棕黄色透明	棕黄色透明	棕黄色透明
60	6.81	6.68	6.65	9.6	9.6	9.6	变浑浊	变浑浊	变浑浊

指标。当表面活性剂的 HLB 值范围在 8~18 时,易形成 O/W 型微乳;HLB 值范围在 4~7 时,易形成 W/O 型微乳^[9]。HLB 值过低或过高都须要进行复配,且当表面活性剂与油相乳化所需的 HLB 值相吻合时,纳米乳才易形成。试验对表面活性剂进行复配和热稳定性观察,筛选 Tween80 和 Span80 为表面活性剂,且当 Tween80 和 Span80 质量比为 3:1 时所得伪三元相图纳米乳区的面积最大。试验选择无水乙醇为助表面活性剂,因为醇类能增大药物溶解度,提高载药量,通过自身的剪切作用减小纳米乳的粒径^[3],且当 $K_m = 4:1$ 时能形成澄清透明的乳化剂,纳米乳区域最大。但醇类具有挥发性,放置时必须密封保存,否则会导致药物析出,影响纳米乳制剂的质量。相比于玉米油、大豆油和肉豆蔻酸异丙酯,试验选择液体石蜡作为油相最稳定。鱼腥草多糖纳米乳在 40℃ 以下能保持良好的稳定性,但温度高于 60℃ 体系会出现浑浊,这可能与表面活性剂的浊点有关^[9]。

以 Tween80 和 Span80 为表面活性剂,无水乙醇为助表面活性剂,液体石蜡为油相制备的鱼腥草多糖纳米乳外观透明、黏度小,鱼腥草多糖含量为 8.55 mg/mL,透射电镜下纳米乳呈球形,平均粒径为 143.5 nm。本试验制备鱼腥草多糖纳米乳的工艺可行、方法可靠、重复性好,纳米乳粒径小,性质稳定,为开发鱼腥草多糖新剂型奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 吴旭锦. 紫苏子油纳米乳的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [2] 杨鹏飞,陈卫东. 纳米乳提高难溶性药物生物利用度的研究进展[J]. 中国药学杂志,2013,48(15):1238-1244.
- [3] 夏鹏飞,马肖,吴国泰,等. 龙胆苦苷纳米乳的制备工艺及质量

米乳离心 10 min(10 000 r/min)后,外观仍能保持澄清透明、均一,并且没有出现药物析出的现象。由表 5 可知,鱼腥草纳米乳的稳定性较好。在 4、25、37、40℃ 存放 30 d 后,未见有药物析出、絮凝等现象,pH 值、多糖含量、外观的变化不明显。本试验制备的鱼腥草多糖纳米乳剂在 40℃ 下保存较为稳定。

3 结论与讨论

纳米乳配方组分的筛选一般是先选定某种表面活性剂相或混合表面活性剂相,然后根据其 HLB 值确定油相种类。表面活性剂亲水亲油平衡值的选择是微乳配方设计的一个初步

安全性评价[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(11):1824-1830.

- [4] 刘光建,王璐,王菲菲,等. 鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌和脑组织抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):207-210.
- [5] 王健,史玉,张永泽,等. 鱼腥草不同部位提取物的抗菌抗病毒作用比较[J]. 河北工程大学学报(自然科学版),2010,27(2):104-106.
- [6] 张娟娟,卢燕,陈道峰. 鱼腥草抗补体活性多糖的制备工艺研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2071-2075.
- [7] 齐军茹,翁静宜,康燕辉,等. 大豆酸溶蛋白/大豆多糖纳米乳液的制备及表征[J]. 现代食品科技,2015,31(6):6136-6141.
- [8] 郝艳霜,卫书鹏,魏军. 蒲公英多糖纳米乳对蛋鸡生产性能的影响[J]. 养禽与禽病防治,2012(5):6-9.
- [9] 郝艳霜,魏军,陈福星. 藏蒲公英多糖纳米乳剂的制备及性质研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(6):236-239.
- [10] 马红梅,别玉宙,魏军,等. 藏蒲公英多糖纳米乳剂对小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ 的影响[J]. 粮食与饲料加工,2013(6):51-53.
- [11] 曹见敏,张蕾,郭斌. 鲑鱼软骨多糖眼用纳米乳的质量评价[J]. 山东大学学报(医学版),2010,48(5):157-160.
- [12] 李树鹏,郝艳霜,欧阳五庆. 黄芪多糖与紫锥菊提取物纳米乳的制备及免疫佐剂效应研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(10):10-16.
- [13] 刘军海,黄宝旭,蒋德超. 响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J]. 食品科学,2009,30(2):114-118.
- [14] 芮亚培,欧阳五庆,邱刚,等. 红霉素纳米乳的制备及其药效学研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(3):59-63.