

# 香茅醇亚微乳的处方工艺优化研究<sup>Δ</sup>

杨佳佳<sup>1\*</sup>, 李婉蓉<sup>1</sup>, 彭剑青<sup>1</sup>, 肖婷<sup>1</sup>, 吴林菁<sup>1</sup>, 周雪<sup>1</sup>, 杨增秋<sup>1</sup>, 姜丰<sup>1</sup>, 丁杨<sup>2</sup>, 沈祥春<sup>1#a</sup>, 陶玲<sup>1#b</sup> (1. 贵州医科大学药学院/贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心/贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室/贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室/天然药物资源优效利用重点实验室, 贵阳 550025; 2. 中国药科大学药剂学教研室/天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 南京 210009)

中图分类号 R944.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)14-1704-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.14.08

**摘要** 目的:优化香茅醇亚微乳的制备工艺。方法:采用高效液相色谱法测定香茅醇亚微乳中的香茅醇含量;采用高速剪切分散-高压均质法制备香茅醇亚微乳,以离心稳定常数( $k_c$ )、粒径为指标,对其处方及工艺进行优化并进行验证;测定所得制剂的载药量的包封率。结果:香茅醇检测质量浓度的线性范围为4~64  $\mu\text{g/mL}$  ( $R^2=0.9999$ );精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于3%;加样回收率为97.64%~101.97% ( $RSD=2.28\%$ ,  $n=3$ )、97.71%~99.50% ( $RSD=1.29\%$ ,  $n=3$ )、96.87%~101.48% ( $RSD=2.86\%$ ,  $n=3$ )。最优处方为大豆油+中链甘油三酯(1:1, g/g)总质量3.75 g, 1.2%大豆磷脂0.6 g, 胆固醇0.06 g, 香茅醇1.25 g, 0.6%油酸钠0.3 g, 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯0.75 g, 泊洛沙姆188 0.75 g, 加水至50 mL。最优工艺为于4  $^{\circ}\text{C}$ 下以13 000 r/min高速剪切5 min制得初乳后,经稀盐酸调pH至7,再以600 Bar高压均质5 min。按最优处方及工艺制备的3批香茅醇亚微乳的平均粒径为( $91.05 \pm 0.26$ ) nm, 多分散系数为( $0.20 \pm 0.01$ ), Zeta电位为( $-30.86 \pm 0.39$ ) mV,  $k_c$ 值为9.23, 香茅醇的平均含量为( $100.21 \pm 0.01$ )%;载药量为( $2.4817 \pm 0.0007$ ) mg/mL, 包封率为( $99.27 \pm 0.03$ )%。结论:优化所得处方及工艺稳定、可行。

**关键词** 香茅醇;亚微乳;高速剪切分散-高压均质法;处方;工艺;优化;高效液相色谱法;含量

## Study on Optimization of Formulation and Technology of Citronellol Submicroemulsion

YANG Jiajia<sup>1</sup>, LI Wanrong<sup>1</sup>, PENG Jianqing<sup>1</sup>, XIAO Ting<sup>1</sup>, WU Linjing<sup>1</sup>, ZHOU Xue<sup>1</sup>, YANG Zengqiu<sup>1</sup>, JIANG Feng<sup>1</sup>, DING Yang<sup>2</sup>, SHEN Xiangchun<sup>1</sup>, TAO Ling<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University/Engineering Center for the Highly Efficient Utilization of Natural Medicine Resources in Guizhou Province/Key Lab for Pharmacology and Pharmacogenesis Evaluation of Natural Medicine in Guizhou Universities/Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Laboratory/Key Laboratory for Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, Guiyang 550025, China; 2. Pharmaceutics Teaching and Research Section, China Pharmaceutical University/State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of citronellol submicroemulsion. METHODS: The content of citronellol in Citronellol submicroemulsion was determined by HPLC. Citronellol submicroemulsion by high-speed shearing dispersion-high pressure homogenization method, with centrifugation stability constant ( $k_c$ ) and particle size were used as evaluation indexes. Its formulation and preparation technology were optimized and validated. Drug-loading amount and encapsulation rate of the preparation were detected. RESULTS: The linear range of citronellol were 4-64  $\mu\text{g/mL}$  ( $R^2=0.9999$ ). RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all lower than 3%. The recoveries were 97.64%-101.97% ( $RSD=2.28\%$ ,  $n=3$ ), 97.71%-99.50% ( $RSD=1.29\%$ ,  $n=3$ ), 96.87%-101.48% ( $RSD=2.86\%$ ,  $n=3$ ). The optimal formulation included that total weight of soybean oil and medium chain triglycerides (1:1, g/g) was 3.75 g, 1.2% soybean phospholipid was 0.6 g, cholesterol was 0.06 g, citronellol was 1.25 g, 0.6% sodium oleate was 0.3 g, 15-hydroxystearic acid polyethylene glycol ester

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1812403);贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2017]5802);贵州省高层次创新型人才培养项目(No.黔科合人才[2015]4029);贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2017]30-25号)

\* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与新技术。E-mail: 1434412440@qq.com

#a 通信作者:教授,博士。研究方向:心血管药理、功能天然产物化学生物学。电话:0851-88416149。E-mail: shenxiangchun@126.com

#b 通信作者:教授,硕士生导师,博士研究生。研究方向:药物新剂型和新技术、中药民族药新药开发。电话:0851-88416160。E-mail: 649511230@qq.com

was 0.75 g, poloxamer 188 was 0.75 g, water added to 50 mL. After prepared by optimal technology at 4  $^{\circ}\text{C}$  which contained shearing speed of 13 000 r/min, lasting for 5 min, primary emulsion was adjusted to pH 7 with dilute hydrochloric acid, and homogenized with 600 Bar high pressure for 5 min. The parameters of Citronellol submicroemulsion according to optimal formulation and technology contained mean particle size of ( $91.05 \pm 0.26$ ) nm, PDI of ( $0.20 \pm 0.01$ ), Zeta-potential of ( $-30.86 \pm 0.39$ ) mV, average content of citronellol ( $100.21 \pm 0.01$ )%, the drug-loading amount was

(2.481 7 ± 0.000 7) mg/mL, the encapsulation rate was (99.27 ± 0.03)% . CONCLUSIONS: The optimal formulation and technology is stable and feasible.

**KEYWORDS** Citronellol; Submicroemulsion; High-speed shearing dispersion-high pressure homogenization method; Formulation; Technology; Optimization; HPLC; Content

香茅醇是一种于香茅属植物香茅 [*Cymbopogon citratus* (dC.) Stapf] 精油中发现的单萜烯类化合物<sup>[1]</sup>。目前,香茅醇已被作为添加剂广泛应用于烟草、日化及食品领域<sup>[2-3]</sup>。有研究发现,该化合物具有抗菌、抗炎、镇痛、抗氧化和抗肿瘤等药理作用<sup>[4-5]</sup>。本课题组前期研究发现,香茅醇对人喉癌上皮细胞 Hep-2 具有显著的增殖抑制作用。但因香茅醇挥发性较强,对光线、氧气、温度等条件较敏感,且难溶于水,故其临床应用受到限制<sup>[6]</sup>。

亚微米乳剂(以下简称“亚微乳”)作为一种新型的药物递送系统,其乳滴粒径介于乳剂和微乳之间<sup>[7-8]</sup>,药物可与油相混溶或停留在油相界面层内,除可减少药物不良反应、提高生物膜透过率和生物利用度、增强药物靶向性外,还具有增加难溶性药物溶解度和稳定性、促进药物持续释放等优点<sup>[9-11]</sup>,是目前药剂学领域研究的热点之一<sup>[12]</sup>。高速剪切分散-高压均质法是指借助介质研磨或高压均质等机械力来减小药物分子粒径的方法,与传统方法(如胶体磨乳化法、超声波乳化法、剪切搅拌乳化法等)相比,该方法可大幅减少乳化剂用量、降低药物毒副作用,所得微粒的粒度分布范围更窄、靶向分布更具特异性,且易于工业化生产,是微(纳)米级混悬液最受欢迎的制备方法<sup>[13-14]</sup>。为此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中香茅醇的含量,采用高速剪切分散-高压均质法制备香茅醇亚微乳,并对其处方及工艺进行优化,旨在为该化合物新剂型的开发和合理应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

U3000 型 HPLC 仪,配备四元泵、紫外检测器、进样器、柱温箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);85-2B 型恒温加热磁力搅拌器(金坛市科析仪器有限公司);NANOJ H10 型高速剪切乳化机、4802 型高压均质机均由 ATS 工业系统有限公司提供;UV 2700 型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司);KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);NANO-ZA 型 Zeta 电位及粒径测定仪(英国 Malvern 公司);ME104/02 型千分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];BS-223S 型百分之一分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

香茅醇对照品[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:J1713062,纯度:≥95%];大豆磷脂(PC,上海太伟药业有限公司,批号:201806032);15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯(15-HS,批号:0339458800)、泊洛沙姆 188(F-68,批

号:WPAK539B)均购自德国 BASF 公司;胆固醇(CH,国药集团化学试剂有限公司,批号:69008214);中链甘油三酯(MCT,批号:20190802)、甘油(批号:20180116)均购自浙江遂昌惠康药业有限公司;大豆油(LCT,浙江田雨山药用油有限公司,批号:20190802);油酸(西陇科学股份有限公司,批号:170329);油酸钠(天津市光复精细化工研究所,批号:20191022);乙腈、甲醇均为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 香茅醇亚微乳的制备

根据本课题组前期预试验初步确定香茅醇亚微乳处方。取 LCT、PC 和油酸各适量,置于烧杯中,于 55 ℃ 水浴中超声(功率:240 W,频率:40 kHz)使溶解,冷却至 25 ℃ 左右,加入香茅醇对照品,混匀,即得油相。另取 15-HS、F-68 各 0.75 g,置于烧杯中,加水至 50 mL,于 55 ℃ 加热溶解,以 1 000 r/min 搅拌 5 min,得水相,冷却至 25 ℃ 左右。于 4 ℃ 水溶条件下将油相缓慢注入至水相中,采用高速剪切乳化机以 10 000 r/min 高速剪切 5 min,得香茅醇亚微乳初乳。经稀盐酸调节 pH 至 7,采用高压均质机以 300 Bar 高压均质 5 min,得香茅醇亚微乳。另同法制备不含香茅醇对照品的空白亚微乳。

### 2.2 香茅醇的含量测定

采用 HPLC 法测定香茅醇亚微乳中香茅醇的含量。

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Ultimate<sup>®</sup> LP-C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(70:30, V/V);检测波长:205 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取香茅醇对照品 5.0 mg,置于 25 mL 量瓶中,加乙腈溶解并定容,得质量浓度为 200 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1”项下香茅醇亚微乳 0.2 mL,置于 10 mL 量瓶中,加乙腈破乳并定容至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液 1.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,加乙腈定容,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.4 空白亚微乳对照溶液 精密吸取“2.1”项下空白亚微乳 0.2 mL,按“2.2.3”项下方法制备空白亚微乳对照溶液。

2.2.5 专属性考察 分别吸取上述对照品溶液、供试品溶液、空白亚微乳对照溶液及空白对照溶液(乙腈)各 20 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,供试品溶液与对照品溶液在相同保留时间处有同一色谱峰;空白亚微乳对照溶液、空白对照溶液均不干

扰测定;理论板数以香茅醇计均不低于6 000,分离度均大于3,详见图1。

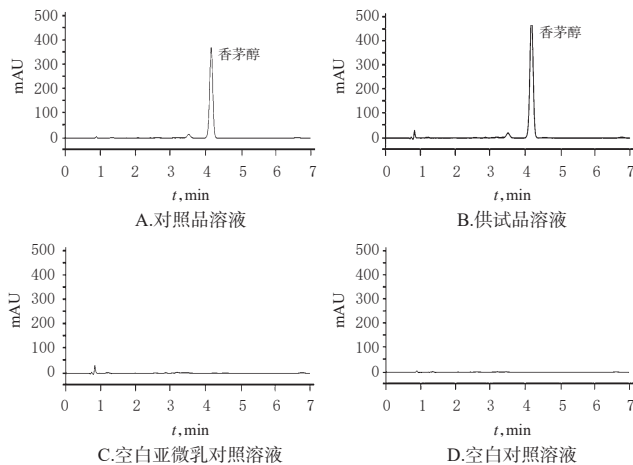


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.6 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液0.2、0.6、1.0、1.6、3.2 mL,分别置于10 mL量瓶中,加乙腈定容至刻度,制成质量浓度分别为4、12、20、32、64  $\mu\text{g/mL}$ 的线性溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以香茅醇的质量浓度( $X, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.576\ 2X+0.128\ 5$  ( $R^2=0.999\ 9$ ),表明香茅醇检测质量浓度的线性范围为4~64  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.7 精密度试验 精密吸取“2.2.6”项下20  $\mu\text{g/mL}$ 的线性溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,香茅醇峰面积的RSD为2.23% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 精密吸取“2.1”项下香茅醇亚微乳适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中香茅醇的含量。结果,香茅醇含量的RSD为2.19% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 精密吸取“2.2.3”项下供试品溶液适量,分别于室温放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,香茅醇峰面积的RSD为1.08% ( $n=8$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取“2.1”项下空白亚微乳适量,置于10 mL量瓶中,加入一定量的对照品溶液(取“2.2.2”项下对照品溶液,加乙腈稀释至质量浓度分别为12、20、32  $\mu\text{g/mL}$ ),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,上述3种质量浓度样品的加样回收率分别为97.64%~101.97% ( $RSD=2.28\%$ ,  $n=3$ )、97.71%~99.50% ( $RSD=1.29\%$ ,  $n=3$ )、96.87%~101.48% ( $RSD=2.86\%$ ,  $n=3$ )。

### 2.3 离心稳定常数的测定

乳剂在一定转速下离心后产生的影响相当于自然静置较长时间后产生的影响<sup>[12]</sup>。当乳剂中乳滴的表面张力过大而不稳定时,离心易导致乳剂分层,其吸光度值可能发生变化,因此本研究采用离心-分光光度法测定乳剂离心前后吸光度值变化百分率即离心稳定常数( $k_c$ ), $k_c$ 值越小表示乳剂体系越稳定<sup>[15]</sup>。取“2.1”项下香茅醇亚微乳(或初乳)3 mL,以3 500 r/min离心15 min,取下层液50  $\mu\text{L}$ ,加水稀释至10 mL,以水为空白,采用紫外-可见分光光度计于500 nm波长处测定吸光度值( $A$ )<sup>[15]</sup>;另取“2.1”项下香茅醇亚微乳(或初乳)50  $\mu\text{L}$ ,同法稀释后测定吸光度值( $A_0$ );并计算 $k_c:k_c=(A_0-A)/A_0\times 100\%$ <sup>[12]</sup>。

### 2.4 处方的优化

采用单因素试验,以初乳粒径(经Zeta电位及粒径测定仪检测)和 $k_c$ 值(按“2.3”项下方法检测)为指标。

2.4.1 油相 参考相关文献,固定油相总量为10%<sup>[16]</sup>,加香茅醇2.5 g、PC 0.6 g、油酸0.2 g、15-HS 0.75 g、FS-68 0.75 g,再加水至50 mL,考察不同油相对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,LCT、MCT与香茅醇均有较好的相容性,且粒径及 $k_c$ 值较适中,详见表1。但有研究认为,单独使用LCT或MCT的毒性较大<sup>[17-18]</sup>,因此本研究以LCT+MCT作为混合油相进行后续试验。

表1 油相的选择

Tab 1 Selection of oil phase

油相	中位粒径, $\mu\text{m}$	粒径范围, $\mu\text{m}$	$k_c$
LCT	0.33	0.16~0.85	0.54
MCT	4.12	1.88~10.96	0.77

2.4.2 LCT与MCT比例 参考相关文献,固定油相总量为10%<sup>[16]</sup>,LCT+MCT总质量为2.5 g,加香茅醇2.5 g、PC 0.6 g、油酸0.2 g、15-HS 0.75 g、FS-68 0.75 g,再加水至50 mL,考察不同质量比LCT与MCT对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,当LCT:MCT为1:1(g/g)时,初乳的粒径和 $k_c$ 值均较小,故选择LCT:MCT为1:1(g/g),详见表2。

表2 LCT与MCT比例的选择

Tab 2 Selection of ratio of LCT to MCT

LCT:MCT, g/g	中位粒径, $\mu\text{m}$	粒径范围, $\mu\text{m}$	$k_c$
1:3	3.53	1.21~12.59	0.65
1:1	0.69	0.18~2.62	0.62
3:1	2.22	0.43~7.82	0.78

2.4.3 LCT+MCT与香茅醇比例 参考相关文献,固定油相总用量为10%<sup>[16]</sup>,LCT和MCT(1:1, g/g)总质量为3.75 g,加PC 0.6 g、油酸0.2 g、15-HS 0.75 g、FS-68 0.75 g,再加水至50 mL,考察不同质量比LCT+MCT与香茅醇对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,虽然当LCT+MCT:香茅醇为1:3(g/g)时,初乳的 $k_c$ 值最小,但因其对应的粒径范围较大且有乳滴挂壁、表面浮油现象,故最终选择了LCT+MCT:香茅醇为3:1(g/g),详见表3。

表3 LCT+MCT与香茅醇比例的选择

Tab 3 Selection of ratio of LCT to MCT

(LCT+MCT):香茅醇,g/g	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_c$
1:3	5.77	2.80~14.53	0.48
1:1	3.76	1.63~8.65	0.72
3:1	0.33	0.16~0.83	0.60

2.4.4 助乳化剂 参考相关文献,固定油相总量为10%<sup>[6]</sup>,LCT+MCT和香茅醇(3:1,g/g)总质量为3.75 g,加PC 0.6 g、油酸0.2 g、15-HS 0.75 g、F-68 0.75 g,再加水至50 mL,考察不同助乳化剂[F-68、15-HS、两者组合(1:1,g/g)]对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,以F-68为助乳化剂时,初乳的滤过速度极慢,且在烧杯内壁存有大量油滴;以15-HS为助乳化剂,初乳的 $k_c$ 值虽然最小,但粒径差异较大,故选择F-68+15-HS作为助乳化剂,详见表4。

表4 助乳化剂的选择

Tab 4 Selection of co-emulsifiers

助乳化剂	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_c$
F-68	0.76	0.19~2.19	0.56
15-HS	35.09	0.68~85.96	0.40
F-68+15-HS	1.24	0.26~6.52	0.44

2.4.5 15-HS与F-68比例 参考相关文献,固定油相总量为10%<sup>[6]</sup>,LCT+MCT和香茅醇(3:1,g/g)总质量为3.75 g,加PC 0.6 g、油酸0.2 g,再加水至50 mL,考察不同质量比15-HS与F-68对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,15-HS:F-68为1:1(g/g)时,初乳的 $k_c$ 值最小,且粒径适中,故选择15-HS:F-68为1:1(g/g),详见表5。

表5 15-HS与F-68比例的选择

Tab 5 Selection of ratio of 15-HS to F-68

HS 15:F-68,g/g	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_c$
2:1	0.34	0.16~0.95	0.78
1:1	0.35	0.16~1.11	0.69
1:2	0.47	0.17~1.87	0.83

2.4.6 PC质量分数 参考相关文献,固定油相总量为10%<sup>[6]</sup>,LCT+MCT和香茅醇(3:1,g/g)总质量为3.75 g,加PC 0.6 g、油酸0.2 g、15-HS 0.75 g、F-68 0.75 g,再加水至50 mL,考察不同质量分数PC对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,当PC质量分数为1.2%时,初乳的 $k_c$ 值最小,且粒径适中,故选择PC质量分数为1.2%,详见表6。

表6 PC质量分数的选择

Tab 6 Selection of mass percent of PC

质量分数,%	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_c$
0.8	0.36	0.16~1.01	0.83
1.2	0.34	0.16~0.89	0.78
1.5	0.33	0.16~0.87	0.84

2.4.7 稳定剂种类 参考相关文献,固定油相总量为10%,稳定剂用量为0.4%<sup>[6]</sup>,LCT+MCT和香茅醇(3:1,g/g)总质量为3.75 g,加1.2% PC 0.6 g、15-HS 0.75 g、F-68 0.75 g,再加水至50 mL,考察不同稳定剂对香茅醇

亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,以油酸钠为稳定剂时,初乳的 $k_c$ 值最小,且粒径适中故选择油酸钠为稳定剂,详见表7。

表7 稳定剂的选择

Tab 7 Selection of stabilizers

稳定剂	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_c$
油酸	0.35	0.16~0.99	0.84
油酸钠	0.39	0.17~1.21	0.65

2.4.8 油酸钠质量分数 参考相关文献,固定油相总量为10%,稳定剂用量为0.4%<sup>[6]</sup>,LCT+MCT:和香茅醇(3:1,g/g)总质量为3.75 g,加1.2% PC 0.6 g、15-HS 0.75 g、F-68 0.75 g、油酸钠0.3 g,加水至50 mL,考察不同油酸钠质量分数对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,当油酸钠质量分数为0.6%时,初乳的 $k_c$ 值最小,且粒径适中,故选择油酸钠质量分数为0.6%,详见表8。

表8 油酸钠质量分数的选择

Tab 8 Selection of mass percent of sodium oleate

质量分数,%	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_c$
0.3	0.51	0.17~1.17	0.61
0.4	0.62	0.18~2.19	0.68
0.5	0.64	0.18~2.01	0.71
0.6	0.67	0.18~2.06	0.55
0.7	1.38	0.40~3.58	0.75

2.4.9 PC与CH比例 有研究认为,适量的胆固醇对生物膜稳定性具有双相调节作用<sup>[9]</sup>。参考相关文献,固定油相总量为10%,稳定剂用量为0.4%<sup>[6]</sup>,LCT+MCT和香茅醇(3:1,g/g),总质量为3.75 g,加1.2% PC 0.6 g、15-HS 0.75 g、F-68 0.75 g、0.6%油酸钠0.3 g,再加水至50 mL,考察不同质量比PC与CH对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,当PC与CH为10:1(g/g)时,初乳的 $k_c$ 值最小,且粒径适中,故选择PC:CH为10:1(g/g),详见表9。

表9 PC与CH比例的选择

Tab 9 Selection of ratio of PC to CH

PC:CH,g/g	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_c$
5:1	0.80	0.20~2.34	0.75
10:1	0.69	0.18~2.11	0.67
20:1	0.59	0.18~1.92	0.74

## 2.5 高速剪切机的工艺优化

2.5.1 乳化温度 按“2.4”项下处方,固定剪切转速为10 000 r/min、剪切时间为5 min。将油相加热溶解后,冷却至25℃左右,加入香茅醇;于水相中加入上述溶液,分别于4、25℃条件下进行高速剪切,考察乳化温度对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 值的影响。结果,当乳化温度为4℃时,亚微乳的 $k_c$ 值最小,且粒径适中,故选择乳化温度为4℃,详见表10。

2.5.2 剪切转速 按“2.4”项下处方,固定剪切时间为5 min、乳化温度为4℃,按“2.5.1”项下方法考察不同剪切转速对香茅醇亚微乳初乳粒径及 $k_c$ 的影响。结果,剪切转速10 000、13 000 r/min时的 $k_c$ 值相差不大,但13 000 r/min时的粒径范围更小,故选择剪切转速为13 000

r/min, 详见表 11。

表 10 乳化温度的选择

Tab 10 Selection of emulsification temperature

温度, °C	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_e$
4	0.53	0.17~1.67	0.72
25	0.49	0.17~1.76	0.82

表 11 剪切转速的选择

Tab 11 Selection of high-speed shearing speed

转速, r/min	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_e$
10 000	0.65	0.18~2.07	0.68
13 000	0.39	0.16~1.30	0.69

2.5.3 剪切时间 固定乳化温度为 4 °C、剪切转速为 13 000 r/min, 按“2.5.1”项下方法考察不同剪切时间对香茅醇亚微乳初乳粒径及  $k_e$  值的影响。结果, 随着剪切时间的延长, 粒径呈减小的趋势, 粒径范围变化显著, 但随着时间继续延长, 粒径范围的变化趋势减小; 当剪切时间为 7 min 时,  $k_e$  值增加明显, 这可能会导致亚微乳体系不稳定, 故综合考虑, 最终选择剪切时间为 5 min, 详见表 12。

表 12 剪切时间的选择

Tab 12 Selection of shearing time

剪切时间, min	中位粒径, μm	粒径范围, μm	$k_e$
3	0.62	0.18~1.88	0.70
5	0.38	0.16~1.22	0.71
7	0.38	0.16~1.09	0.79
10	0.37	0.16~1.12	0.77

## 2.6 高压均质机的工艺优化

2.6.1 均质压力 按“2.4”项下处方以及“2.5”项下高速剪切机工艺, 固定均质时间为 7 min, 考察不同均质压力对香茅醇亚微乳粒径及  $k_e$  值的影响。结果, 当均质压力为 600 Bar 时, 亚微乳的粒径和  $k_e$  值均最小, 故选择均质压力为 600 Bar, 详见表 13。

表 13 均质压力的选择

Tab 13 Selection of homogeneous pressure

均质压力, Bar	中位粒径, nm	粒径范围, nm	$k_e$
400	104.23	10.58~374.29	26.09
600	87.76	7.19~189.70	19.62
800	90.22	15.01~178.86	21.88

2.6.2 均质时间 按“2.4”项下处方以及“2.5”项下高速剪切机工艺, 固定均质压力为 600 Bar, 考察不同均质时间对香茅醇亚微乳粒径及  $k_e$  值的影响。结果, 均质时间为 5 min 时,  $k_e$  值最小, 且粒径适中, 故选均质时间为 5 min, 详见表 14。

表 14 均质时间的选择

Tab 14 Selection of homogenization time

均质时间, min	中位粒径, nm	粒径范围, nm	$k_e$
3	101.35	16.32~577.31	26.77
5	94.05	15.15~535.73	8.63
7	89.16	15.80~508.35	21.83

## 2.7 最优处方工艺的确定及验证试验

最优处方如下: LCT+MCT(1:1, g/g)总质量为 3.75 g, 1.2% PC 为 0.6 g, CH 为 0.06 g, 香茅醇为 1.25 g, 0.6%

油酸钠为 0.3 g, 15-HS 为 0.75 g, F-68 为 0.75 g, 加水至 50 mL。最优工艺如下: 于 4 °C 下以 13 000 r/min 高速剪切 5 min 制得初乳后, 经稀盐酸调 pH 至 7, 再以 600 Bar 高压均质 5 min。按上述最优处方及工艺制备 3 批香茅醇亚微乳, 观察外观后, 采用 Zeta 电位及粒度仪测定其粒径、多分散系数、Zeta 电位, 并按“2.3”项下方法检测  $k_e$  值; 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按外标法计算样品中香茅醇的含量。所得香茅醇亚微乳外观见图 2, 粒径分布及 Zeta 电位图见图 3, 验证试验结果见表 15。



图 2 香茅醇亚微乳外观

Fig 2 Appearance of Citronellol submicroemulsion

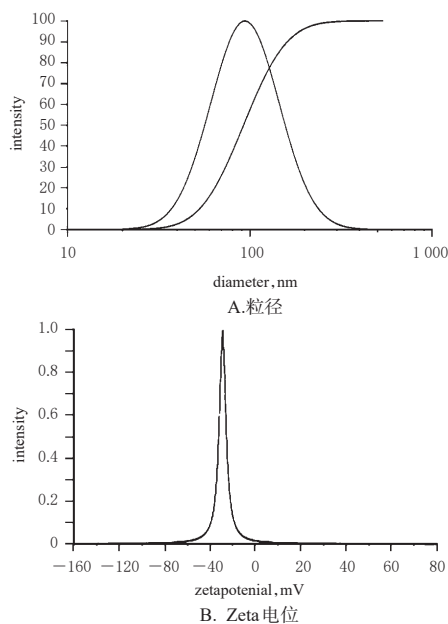


图 3 香茅醇亚微乳粒径分布及 Zeta 电位图

Fig 3 Particle size distribution and Zeta potential of Citronellol submicroemulsion

表 15 验证试验结果

Tab 15 Results of varification test

试验号	平均粒径, nm	多分散系数	Zeta 电位, mV	$k_e$	香茅醇含量, %
1	90.80	0.21	-31.00	9.40	100.20
2	91.31	0.20	-31.17	8.90	100.21
3	91.05	0.20	-30.42	9.40	100.22
平均值( $\bar{x} \pm s/\bar{x}$ )	91.05 ± 0.26	0.20 ± 0.01	-30.86 ± 0.39	9.23	100.21 ± 0.01

## 2.8 载药量及包封率的测定

2.8.1 载药量 取按“2.7”项下最优处方及工艺制备的

香茅醇亚微乳适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算亚微乳中香茅醇的含量,换算为总质量( $W_{总}$ )后,计算载药量:载药量( $\%$ )= $(W_{总}/\text{香茅醇亚微乳的质量})\times 100\%$ <sup>[20]</sup>。每样品重复测定3次。结果,香茅醇亚微乳的载药量为 $(2.4817\pm 0.0007)\text{mg/mL}$ 。

2.8.2 包封率 取按“2.7”项下最优处方及工艺制备的香茅醇亚微乳3 mL,置于50 kDa超滤管中,以3 500 r/min离心30 min,取续滤液0.2 mL,置于1.0 mL量瓶中,加乙腈定容至刻度,经0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算游离香茅醇的含量,并换算为未包封入亚微乳、游离在水相中的香茅醇质量( $W_{游}$ ),计算包封率:包封率( $\%$ )= $(W_{总}-W_{游})/W_{总}\times 100\%$ <sup>[20]</sup>。结果,香茅醇亚微乳的包封率为 $(99.27\pm 0.03)\%$ 。

### 3 讨论

LCT具有升高肺动脉压、抑制胃肠功能等毒副作用,其作为油相在亚微乳中的应用由此受到限制<sup>[16-17]</sup>。有研究认为,MCT因相对分子量较小,有较好的水溶性及较低的酸度系数,故其无需依赖肉毒碱即可进入线粒体而被快速氧化,且在血液循环中清除速度较快,不易在肝脏中蓄积,这对肉毒碱缺乏的危重患者和新生儿无疑是有益的<sup>[16]</sup>。但也有研究认为,单用MCT可引起代谢性酸中毒和神经系统副作用<sup>[17]</sup>,因此不宜单独作为油相。文献报道,以LCT与MCT混合作为油相可减少毒性并降低游离药物的浓度,且对网状内皮系统无影响,因此临床推荐LCT与MCT作为混合乳剂使用,以降低单用LCT或MCT引起的相应风险<sup>[18]</sup>。

有研究认为,油相黏度、油水界面张力均与温度有关<sup>[17]</sup>。由于香茅醇易挥发,因此高压均质过程中的温度控制对其亚微乳的稳定性具有十分重要的意义。当温度过低时,油相黏度较大,形成的乳滴粒度大且粒径分布广;升高温度虽然可降低油相黏度,有利于亚微乳的形成,但温度过高可造成乳滴动能增加,从而加速乳滴间的相互碰撞,发生聚集而产生大油滴,导致油水分层、乳剂破裂,最终影响亚微乳的稳定性<sup>[19,21]</sup>。

在处方及工艺优化过程中,随着均质压力的增加和均质时间的延长,所得亚微乳粒径和 $k_1$ 值逐渐降低,但当均质压力和均质时间达到一定值时,粒径减小不明显,但 $k_1$ 值变化较大,其原因可能为压力增大时会产生较多的热量,导致乳滴聚集,从而影响稳定性<sup>[22-23]</sup>。

综上所述,优化所得处方及工艺稳定、可行。

### 参考文献

[1] SANTOS PL, MATOS JPSCF, PICOT L, et al. Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities: a systematic review[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2018.11.030.  
[2] 姜丰,王益,严俊丽,等.香茅醇微乳凝胶的制备及体外抗菌试验[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(20):8-13.

[3] 项佳媚,郑希龙,魏建和,等.香茅草及香茅草茶的研究进展[J].世界科学技术:中医现代化,2017,19(5):874-879.  
[4] 廉晓红,李德山,窦玉琴,等.香茅草提取物的免疫调节作用与肿瘤抑制作用[J].沈阳药科大学学报,2005,22(4):295-297,300.  
[5] YU WN, LAI YJ, MA JW, et al. Citronellol induces necroptosis of human lung cancer cells VII TNF- $\alpha$  pathway and reactive oxygen species accumulation[J]. *In Vivo*, 2019, 33(4):1193-1201.  
[6] 陶紫,赵振刚.香茅草精油微乳液的构建及其抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2018,34(10):162-170.  
[7] 岳鹏飞,袁海龙,杨明,等.葛根素亚微乳的制备及表征[J].药学学报,2007,42(6):649-655.  
[8] 赵丽珊,吴素香.亚微乳作为静脉给药载体的研究进展[J].医药导报,2008,27(5):74-75.  
[9] GAO K, SUN J, LIU K, et al. Preparation and characterization of a submicron lipid emulsion of docetaxel: submicron lipid emulsion of docetaxel[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008, 34(11):1227-1237.  
[10] WANG JJ, SUNG KC, HU YP, et al. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs[J]. *J Control Release*, 2006, 115(2):140-149.  
[11] 和素娜,王东凯,李林穗,等.多烯紫杉醇磷脂复合物亚微乳的制备与工艺优化[J/CD].中国药理学杂志:网络版,2010,8(1):9-16.  
[12] LI WQ, LIN X, YANG ZHH, et al. A bufadienolide-loaded submicron emulsion for oral administration: stability, antitumor efficacy and toxicity[J]. *Int J Pharm*, 2015, 479(1):52-62.  
[13] 张多婷.中心复合设计-效应面法优化泊沙康唑口服混悬液制备工艺[J].沈阳药科大学学报,2019,36(8):655-661,698.  
[14] 宋婷.松萝酸脂微球载药系统的设计、制备及动物体内药代动力学研究[D].重庆:重庆理工大学,2018.  
[15] 李桂玲,林瑞红.新型麻醉药异丙酚静注乳剂的制备及其物理性质的测定[J].沈阳药科大学学报,1999,16(2):92-94.  
[16] 刘颖.氟比洛芬酯微球注射液的研究[D].沈阳:中国医科大学,2013.  
[17] 王艳娇,王涛,李芳,等.地西洋亚微乳注射液处方及制备工艺的研究[J].中国新药杂志,2007,16(2):142-146.  
[18] LI Y, HE H, WANG Q, et al. Preparation, stability and pharmacokinetics evaluation of lipid microspheres loading a promising antitumor candidate: timataxel[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016. DOI: 10.1016/j.ajps.2016.07.004.  
[19] 祝丹平. ZRANB1和SEN1调控LDLR蛋白稳定性的功能与机制研究[D].武汉:武汉大学,2017.  
[20] 刘碧林,石明芯,朱照静,等.星点设计-效应面法优化姜黄素正负离子纳米结构脂质载体处方[J].中草药,2016,47(19):3401-3406.  
[21] 翟宇,黄青.黄体酮亚微乳注射剂的处方和制备工艺研究

# 昆明山海棠提取物对新西兰兔的胚胎-胎仔发育毒性研究<sup>△</sup>

施汀兰\*,张莉,黄鹤,梅小利,涂如霞,吴思澜,兰波,李恒华<sup>#</sup>(重庆市中药研究院/重庆市药物安全评价中心,重庆 400065)

中图分类号 R285.5;R994.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)14-1710-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.14.09

**摘要** 目的:研究昆明山海棠提取物对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响。方法:取交配成功的新西兰雌兔,按体质量随机区组法分为溶剂对照组、阳性对照组(环磷酰胺,20 mg/kg)和昆明山海棠提取物高、中、低剂量组(15.0、7.50、3.75 g/kg,以生药量计),每组均至少18只。溶剂对照组和昆明山海棠提取物各剂量组雌兔在妊娠第6~18天灌胃水或相应昆明山海棠提取物药液,5 mL/kg,每天1次;阳性对照组雌兔在妊娠第10~13天于颈部皮下注射环磷酰胺,1 mL/kg,每天1次。依据《药物生殖毒性研究技术指导原则》相关要求,在实验期间观察并记录雌兔的一般情况、体质量和摄食量,并于妊娠第28天时对其实施安乐死,解剖后观察并记录其主要脏器、带胎子宫、胎盘子宫、胎盘、卵巢以及着床腺、吸收胎、死胎、活胎、黄体等相关指标,并对胎仔进行体质量、外观形态、内脏和骨骼发育等相关指标的检查。结果:与溶剂对照组比较,昆明山海棠提取物各剂量组孕兔的体质量、体质量增长、摄食量、主要脏器,孕兔妊娠、生殖功能以及胚胎形成和胎仔的生长发育、外观形态、内脏和骨骼发育等相关指标均未见明显异常改变( $P>0.05$ );阳性对照组上述指标均有显著变化( $P<0.05$ ),表现出明显的孕兔母体毒性以及胚胎和胎仔发育毒性。结论:昆明山海棠提取物在剂量为3.75~15.00 g/kg(以生药量计)时对新西兰兔无明显母体毒性、胚胎或胎仔发育毒性。

**关键词** 昆明山海棠;提取物;新西兰兔;胚胎;胎仔;生殖毒性

## Study on Toxic Effect of the Extract from *Tripterygium hypoglaucum* on Embryo-fetal Development of New Zealand Rabbits

SHI Tinglan, ZHANG Li, HUANG He, MEI Xiaoli, TU Ruxia, WU Silan, LAN Bo, LI Henghua (Chongqing Academy of Chinese Material Medica/Chongqing Center for Safety Evaluation of Drugs, Chongqing 400065, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the toxic effect of the extract from *Tripterygium hypoglaucum* on pregnant animal and embryo-fetal development. METHODS: Successfully mated New Zealand female rabbits were randomly divided into solvent control group, positive control group (cyclophosphamide, 20 mg/kg) and *T. hypoglaucum* extract high-dose, medium-dose and low-dose groups (15.0, 7.50, 3.75 g/kg, by the amount of crude drug) according to their body weight, with 18 rabbits in each group at least. The female rabbits in solvent control group and *T. hypoglaucum* extract groups were given water or the corresponding *T. hypoglaucum* extract solution from 6th to 18th day of pregnancy, 5 mL/kg, once a day. Positive control group was given cyclophosphamide subcutaneously into the neck from 10th to 13th day of pregnancy, 1 mL/kg, once a day. According to the related requirements of *Technical Guidelines for the Study of Drug Reproductive Toxicity*, the general situation, body weight, body weight increase and food intake of female rabbits were observed and recorded during the experiment, and euthanasia was carried out on 28th day of pregnancy; the relative indexes of main organs, fetal uterus, placenta uterus, placenta, ovary, implantation gland, absorption fetus, stillbirth, live fetus and corpus luteum were observed and recorded after anatomy; the relative indexes of body weight, appearance, visceral and skeletal alterations of the fetus were detected. RESULTS: Compared with solvent control group, the body weight, body weight increase, food intake, main organs, pregnancy of pregnant rabbits, as well as reproductive function, embryo formation, fetal growth and development, appearance, visceral and skeletal development indexes in *T.*

及其性质考察[J].宁夏医科大学学报,2014,36(8):872-

△ 基金项目:国家科技重大专项(No.2017ZX09101002-002-004);重庆市基本科研业务费项目(No.cstc2019jxjl-jbky10005, No.cstc2019-jxjl-jbky120004)

\* 助理研究员,硕士。研究方向:中药药理与毒理。电话:023-89029135。E-mail:289643518@qq.com

# 通信作者:工程师,硕士。研究方向:中药药理与毒理。电话:023-89029135。E-mail:lh8010\_2002@163.com

875.

[22] 王思玲,李玉娟,张景海,等.电泳光散射法测定异丙酚微乳剂的动电电位[J].沈阳药科大学学报,2002,19(5):313-315,331.

[23] 马涛.全合一混合液(all in one admixture)的稳定性[J].中国药房,2000,11(2):40-42.

(收稿日期:2020-02-06 修回日期:2020-06-14)

(编辑:陈宏)