doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.23.009

柚皮苷微乳制备工艺研究*

徐坤勇[1],郭建忠[1],颜 娟[2],韵国萍[1]
(1.河北省张家口市第一医院药剂科,河北 张家口 075061; 2.河北北方学院附属第一医院药剂科,河北 张家口 075061)

摘要:目的 建立柚皮苷微乳的处方与制备工艺。**方法** 以溶解度为指标筛选柚皮苷微乳油相,通过表面活性剂与助表面活性剂配伍试验与伪三元相图法筛选柚皮苷微乳处方;以微乳外观、透光率为指标,对微乳的乳化温度和稀释倍数进行筛选;对制备的柚皮苷微乳进行外观、形态和粒径表征观察;通过高温试验和常温留样试验对柚皮苷微乳进行初步稳定性考察。**结果** 柚皮苷微乳最佳处方组成比例为柚皮苷2%,油酸乙酯4%,聚氧乙烯35蓖麻油12%,无水乙醇4%,水78%;柚皮苷微乳的最佳乳化温度为40 ℃,稀释倍数为20倍;柚皮苷微乳的外观性状为黄棕色透明,呈圆球形,pH为5.37,粒径在10～100 nm;柚皮苷微乳于60 ℃放置5 d外观明显浑浊,于25 ℃放置6个月质量稳定。**结论** 该方法制备的柚皮苷微乳符合要求,可为柚皮苷制剂的后期研究提供参考。

关键词:柚皮苷;微乳;伪三元相图;制备工艺;表征;稳定性
中图分类号:R932;R283.6;TQ460.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)23－0036－05

Preparation Technology of Naringin Microemulsion

XU Kunyong[1], *GUO Jianzhong*[1], *YAN Juan*[2], *YUN Guoping*[1]
(*1. Department of Pharmacy, The First Hospital of Zhangjiakou City, Zhangjiakou, Hebei, China 075061; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China 075061*)

Abstract: Objective To establish the formulation and preparation technology of naringin microemulsion. **Methods** The naringin microemulsion oil phase was screened with the solubility as the index, the naringin microemulsion formula was screened by the surfactant and co－surfactant compatibility test and the pseudo－ternary phase diagram method. The microemulsion appearance and light transmittance were used as indicators to screen the emulsification temperature and dilution factor of the microemulsion and to characterize the appearance, morphology and particle size of the prepared naringin microemulsion. The stability of naringin microemulsion was preliminarily investigated by high－temperature test and normal temperature retention test. **Results** The optimal prescription composition ratio of naringin microemulsion was naringin(2%), ethyl oleate(4%), polyoxyethylene 35 castor oil(12%), absolute ethanol(4%), and water(78%), the optimal emulsification temperature of naringin microemulsion was 40 ℃, and the dilution factor was 20 times. Naringin microemulsion was yellowish－brown and transparent, with a spherical shape, its pH was 5.37 and its particle size was 10－100 nm. The naringin microemulsion has become cloudy after being stored at 60 ℃ for 5 d, but its quality was stable after being stored at 25 ℃ for 6 months. **Conclusion** Naringin microemulsion prepared by this method can meet the requirements, which can provide a reference for the later research of naringin preparations.

Key words: naringin; microemulsion; pseudo－ternary phase diagram; preparation technology; characterization; stability

柚皮苷又称柚苷、柑橘苷,来源于芸香科柑橘属植物柚、葡萄柚未成熟或近成熟的干燥果皮,是一种天然的黄酮类化合物[1]。柚皮苷具有多种生物学活性,包括抗过敏反应[2],抗氧化,调血脂,抑制杂环胺类物质等致突变性,抗癌,预防与治疗胃溃疡,对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠埃希杆菌及某些真菌有抑制作用,抗炎,对某些毒物有拮抗作用,解痉,镇痛,改善微循环和软骨组织细胞功能,降低毛细血管通透性和骨关节病变率等[3]。微乳剂可缓慢释放药物,提高药物生物利用度,达到协同增效和减毒的目的[4]。本研究中拟利用柚皮苷的生物学活性,制备柚皮苷微乳,并对其外观、形态、粒径表征和稳定性进行观察,为柚皮苷制剂的进一步开发奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

JB－2型恒温磁力搅拌器(上海智光仪器仪表有限公司);KQ－250DE型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz);PHS－3C型pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);Zetasizer Nano ZS90型激光粒度及Zeta电位测定仪(英国Malvern公司);SKY－2102C型恒温摇床(常州金坛精达仪器制造有限公司);LG16－B型高速离心机(北京雷博尔离心机有限公司);752型紫外可见分光光度计(上海恒平科学仪器有限公司);HH－2型数显恒温水浴锅(江苏金坛荣华仪器制造有限公司);Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);JEM－2100型透射电子显微镜(日本电子株式会社);AE/240型电子分析天平(梅特勒－托利多仪器<上海>有限公司,精度为万分之一)。

1.2 试药

柚皮苷对照品(重庆对照品科技有限公司,批号为110722－201312,纯度≥98%);柚皮苷(实验室自制,纯度≥90%);丙二醇辛酸酯(法国Gattefosse公司,批号为

*基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目[2019536]。
第一作者:徐坤勇,男,大学本科,主管中药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)776387993@qq.com。

58748－27）；油酸乙酯（批号为 Z16D8Y50961），肉豆蔻酸异丙酯（IPM，批号为 Y20J8S40186），均购自上海源叶生物科技有限公司；聚山梨酯 80（Tween80，天津市光复精细化工研究所，批号为 20171101）；聚氧乙烯 35 蓖麻油（EL－35，批号为 D1216A），聚氧乙烯氢化蓖麻油（RH－40，批号为 S0824A），均购自德国 BASF 公司；聚乙二醇 400（PEG400，批号为 20121201），无水乙醇（批号为 20171103），均购自西陇化工股份有限公司；1，2－丙二醇（南京威尔化工有限公司，批号为 20170901）；甘油（天津市恒兴化学试剂有限公司，批号为 20160522）；甲醇、乙酸为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 油相选择

色谱条件与系统适用性试验[5－7]：色谱柱为 Hypersil C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 36% 乙酸－甲醇－水（4∶49∶51，*V*/*V*/*V*）；流速为 1.0 mL/min；检测波长为 283 nm；柱温为室温；进样量为 10 μL。理论板数按柚皮苷峰计应不低于 3 000。

油相中柚皮苷平衡溶解度：将过量的柚皮苷分别加入含有不同油相（IPM，油酸乙酯、丙二醇辛酸酯）的离心管中，漩涡振荡 5 min，混合均匀，超声处理 30 min，置 40 ℃恒温摇床中水平振摇 48 h 以达平衡，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，用适量甲醇稀释，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，依法进样测定。结果显示，柚皮苷在油酸乙酯中的平衡溶解度最高（4.76 g/L），故选择油酸乙酯为油相。

2.2 表面活性剂与助表面活性剂配伍试验

分别以 Tween80，EL－35，RH－40 为表面活性剂，以 1，2－丙二醇、PEG400、甘油与无水乙醇为助表面活性剂，固定总质量为 1.0 g，将油酸乙酯、表面活性剂与助表面活性剂按质量比 1∶3∶1 混合，40 ℃恒温水浴搅拌均匀，得油相混合物，逐滴滴入 4 mL 水，形成微乳。取微乳，4 000 r/min 离心 15 min，静置 1 h，观察分层现象。按公式物理稳定性参数（K_E）=（A_0－A）/A_0 测定微乳的 K_E。式中，A_0 和 A 分别为原微乳和原微乳离心后下层液经同倍稀释后在同一波长下的吸光度。在相同条件下，K_E 越小，微乳越稳定。以 283 nm 为检测波长，采用紫外分光光度法考察表面活性剂与助表面活性剂的配伍情况，结果见表 1。Tween80 和 1，2－丙二醇、甘油制备的微乳经离心后均已分层，当 Tween80，EL－35，RH－40 分别为表面活性剂，PEG400、无水乙醇为助表面活性剂时均能形成澄清透明的微乳，K_E 较小，且 4000r/min 离心 15 min 后无分层，常温避光静置 24 h 后乳化稳定。通过配伍试验初步选择 Tween80，EL－35 与 RH－40 为表面活性剂，选择 PEG400、无水乙醇为助表面活性剂。

表 1 表面活性剂与助表面活性剂的配伍试验结果

表面活性剂(g)			助表面活性剂(g)				K_E
Tween80	EL－35	RH－40	1,2－丙二醇	PEG400	甘油	无水乙醇	
0.3	－	－	0.1	－	－	－	－
－	0.3		0.1	－	－	－	23.8
－	－	0.3	0.1	－	－	－	33.5
0.3	－	－	－	0.1	－	－	7.6
－	0.3	－	－	0.1	－	－	8.9
－	－	0.3	－	0.1	－	－	9.5
0.3	－	－	－	－	0.1	－	－
－	0.3	－	－	－	0.1	－	21.4
－	－	0.3	－	－	0.1	－	31.7
0.3	－	－	－	－	－	0.1	10.7
－	0.3	－	－	－	－	0.1	13.6
－	－	0.3	－	－	－	0.1	12.2

2.3 微乳制备及伪三元相图绘制

按一定比例将表面活性剂与助表面活性剂混匀，作为混合表面活性剂，再将油相加入混合表面活性剂中，混匀，40 ℃恒温磁力搅拌器搅拌（转速为 100 r/min），混匀，同时向混合体系中缓慢滴加水，观察体系由清至浊或由浊至清的现象。以流动性好、外观均一透明及有丁达尔效应为微乳形成的判断标准。以混合表面活性剂为 1 个顶点，以水相和油相为另外 2 个顶点，根据形成微乳临界点时各组分所占比例确定在相图中的位置，采用 Origin8.5 软件绘制伪三元相图，确定微乳区的面积[8]。

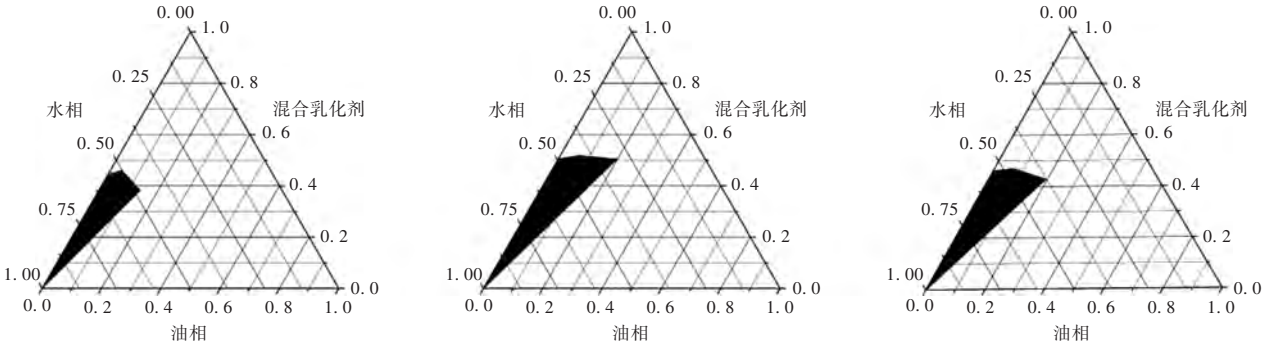
2.4 微乳处方筛选

空白微乳制备：固定油相为油酸乙酯不变，分别选用 Tween80，EL－35，RH－40 为表面活性剂，选用 PEG400、无水乙醇为助表面活性剂，表面活性剂与助表面活性剂质量比（*Km*）分别为 1，2，3，按 2.3 项下方法制备空白微乳，观察并记录在临界点时各组分所占比例。

表面活性剂选择：分别以 Tween80，EL－35，RH－40 为表面活性剂，以无水乙醇为助表面活性剂，*Km* 取 3，制备混合表面活性剂，按 2.3 项下方法绘制微乳的伪三元相图，确定微乳区，结果见图 2。可见，当 EL－35 为表面活性剂时微乳区面积最大，故选择 EL－35 为表面活性剂。

助表面活性剂选择：固定表面活性剂为 EL－35，其 *Km* 为 3，分别以 PEG400、无水乙醇为助表面活性剂，按 2.3 项下方法绘制微乳的伪三元相图，确定微乳区，结果见图 3。可见，当无水乙醇为助表面活性剂时微乳区面积最大，故选择无水乙醇为助表面活性剂。

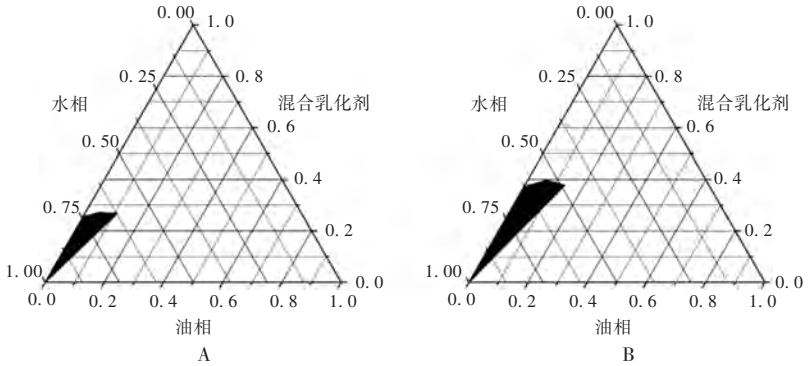
Km 值选择：以表面活性剂为 EL－35，以无水乙醇为助表面活性剂，以 *Km* 分别为 1，2，3 制备混合表面活性剂。按 2.3 项下方法绘制微乳的伪三元相图，确定微乳区，结果见图 3。可见，当 *Km*＝3 时微乳区面积最大，故选择 *Km* 为 3∶1。同时，油酸乙酯与混合表面活性剂



A B C

A. Tweeen80 B. EL－35 C. RH－40

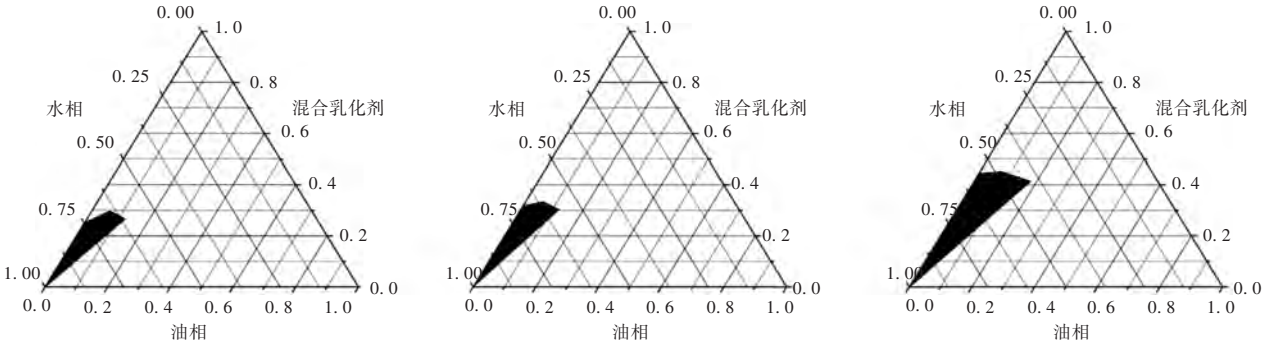
图 1 不同表面活性剂绘制的伪三元相图



A B

A. PEG400 B. 无水乙醇

图 2 不同助表面活性剂绘制的伪三元相图



A B C

A. $Km=1$ B. $Km=2$ C. $Km=3$

图 3 不同 Km 绘制的伪三元相图

质量比为 1∶4 时能形成稳定的微乳，故确定油酸乙酯与混合表面活性剂质量比为 1∶4。

2.5 微乳制备

乳化温度选择：分别称取油酸乙酯 0.2 g、EL－35 0.6 g 与无水乙醇 0.2 g，按 2.3 项下方法分别于 40，50，60 ℃恒温磁力搅拌（转速为 100 r/min）下逐滴滴入 4 mL 水，制备空白微乳。以微乳外观性状、透光率为考察指标，观察乳化温度对乳化效果的影响，结果见表 2。随着乳化温度的升高，微乳透光率逐渐降低。40 ℃乳化时所得微乳澄清透明，常温静置 24 h 仍保持稳定，无分层现象。故选择乳化温度为 40 ℃。

表 2 乳化温度对乳化效果的影响（$n=3$）

乳化温度（℃）	外观性状	透光率（$\overline{X}\pm s$，%）
40	澄清透明	90.82±2.72
50	浑浊	63.41±1.92
60	浑浊	56.13±1.68

稀释倍数（$W_{水}$：$W_{油}$）确定：分别称取油酸乙酯 0.2 g、EL－35 0.6 g 与无水乙醇 0.2 g，按 2.3 项下方法分别滴入 1，4，8，16 mL 水，制备空白微乳。以微乳外观性状与透光率为考察指标，观察不同稀释倍数对乳化效果的影响，结果见表 3。随着稀释倍数的增大，微乳的透光率逐渐升高。当水≥4 mL（即稀释倍数≥20 倍）时，

均能形成澄清透明的微乳，透光率均 > 90%，常温静置 24 h 仍保持稳定。故选择水与油的质量比为 20∶1。

表 3 稀释倍数对乳化效果的影响（$n=3$）

水(mL)	稀释倍数($W_{水}$∶$W_{油}$)	外观性状	透光率($\bar{X}\pm s$,%)
1	5	浑浊	34.81±1.04
4	20	澄清透明	90.12±2.70
8	40	澄清透明	91.23±2.72
16	80	澄清透明	91.71±2.76

2.6 空白微乳处方确定

由筛选结果可知，油酸乙酯为微乳油相，EL－35 为表面活性剂，无水乙醇为助表面活性剂，*Km* 为 3。确定空白微乳处方组成比例为油酸乙酯 4%，EL－35 12%，无水乙醇 4%，水 80%。

2.7 柚皮苷微乳处方确定

称取适量柚皮苷，加入油酸乙酯中，按 2.3 项下方法制备含柚皮苷 0.5%，1%，2% 的微乳，于 4 000 r/min 离心 15 min，于离心前后分别测定微乳中柚皮苷的含量。结果离心前后柚皮苷含量无明显变化，所制备的柚皮苷微乳稳定性良好。为了保持更高的载药量，故选择含 2% 柚皮苷的微乳为目标处方，进而确定柚皮苷微乳处方组成比例为柚皮苷 2%，油酸乙酯 4%，EL－35 12%，无水乙醇 4%，水 78%。

2.8 柚皮苷微乳表征

性状：黄棕色透明、流动性好的低黏度液体。

形态观察：取柚皮苷微乳适量，用水稀释 20 倍，滴在铜网上，静置 10 min，用滤纸吸走多余的水，用 2% 磷钨酸（pH7.4）溶液负染 10 min，自然挥干，置透射电子显微镜下观察，结果见图 4。该微乳颗粒呈圆球形，分布相对均匀，基本无粘连现象。

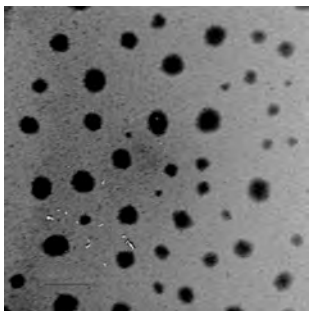
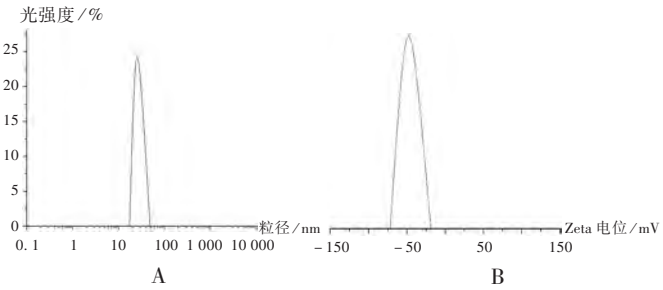


图 4 柚皮苷微乳透射电镜图（×80 000）

粒径分布与 Zeta 电位测定：取适量柚皮苷微乳，加水稀释，超声分散，采用激光粒度测定仪于 25 ℃测定柚皮苷微乳粒径分布，结果见图 5；Zeta 电位分析仪测定电位分布，结果见图 6。柚皮苷微乳的平均粒径为（32.78±0.30）nm，均在 10～100 nm 之间；Zeta 电位平均值为（－47.86±4.71）mV。

pH 测定：称取柚皮苷微乳 0.5 g，加水稀释 100 倍，于 25 ℃测定 pH，结果为 5.37。



A. 粒径分布 B. Zeta 电位分布

图 5 柚皮苷微乳的粒径和 Zeta 电位分布

2.9 初步稳定性考察

高温试验：取适量柚皮苷微乳，密封保存于带塞西林瓶中，60 ℃恒温水浴锅中分别放置 5 d 和 10 d，考察柚皮苷微乳的稳定性，结果见表 4。放置 5 d，微乳已变浑浊，透光率明显下降，表明柚皮苷微乳在高温时质量不稳定。

表 4 60 ℃稳定性试验结果（$n=3$）

时间	外观性状	透光率($\bar{X}\pm s$,%)
第 0 天	黄棕色透明，未见分层	91.51±2.74
第 5 天	黄棕色浑浊、不透明	40.72±1.21
第 10 天	黄棕色浑浊、不透明	30.21±0.92

常温留样考察：取适量柚皮苷微乳，密封保存于带塞西林瓶中，在温度 25 ℃、相对湿度 75% 条件下分别放置 1，2，3，6 个月，定期考察，结果见表 5。第 6 个月柚皮苷微乳仍保持澄明，未见分层，透光率及含量与第 0 个月比较均无明显变化。

表 5 常温留样考察结果（$n=5$）

时间	外观性状	透光率($\bar{X}\pm s$,%)	含量($\bar{X}\pm s$,mg/g)
第 0 个月	黄棕色透明，未见分层	91.31±2.74	17.76±0.51
第 1 个月	黄棕色透明，未见分层	90.83±2.68	17.49±0.83
第 2 个月	黄棕色透明，未见分层	90.51±2.66	17.34±0.62
第 3 个月	黄棕色透明，未见分层	90.63±2.69	17.81±0.44
第 6 个月	黄棕色透明，未见分层	90.34±2.65	17.21±1.01

3 讨论

柚皮苷单体具有良好的成药性[9]。目前，有代表性的柚皮苷制剂为片剂[10]，但存在首过效应，生物利用度不高[11]。微乳为良好的药物载体，可提高药物的生物利用度[12]。因此，本研究中制备柚皮苷微乳考察其表征形态及稳定性，为柚皮苷制剂的进一步开发提供参考。

油相是微乳的重要组成部分，本研究中通过平衡溶解度筛选油相。伪三元相图是研究微乳体系的基本工具，微乳区域面积与微乳稳定性关系密切[13]。EL－35 含聚氧乙烯基团，为非离子型表面活性剂，可降低界面膜的表面张力，有较好的乳化性能，不易受酸碱的影响，毒性小，溶血性低[14]，且形成的微乳区面积较大，故选择 EL－35 为表面活性剂。助表面活性剂可调节表面活性剂亲水亲油平衡值，同表面活性剂降低界面张力有协同作用，增加微乳的流动性，增强界面间的柔性，且因短链