

W/O型黄芩苷纳米乳的制备及质量评价

郑转弟¹, 周 安^{1,2}, 吴鸿飞¹

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学科研实验中心, 安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 制备 W/O 型黄芩苷纳米乳并对其质量进行评价。方法 通过优化处方工艺制得 W/O 型黄芩苷纳米乳, 并对其外观、粒径、载药量及稳定性进行考察, 采用高效液相色谱法测定纳米乳中黄芩苷的含量, 检测波长为 280 nm。结果 W/O 型黄芩苷纳米乳为均一透明的液体, 平均粒径为 (63.40 ± 1.10) nm, 载药量为 9.5 mg/mL。黄芩苷在 12.40~310.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.9997$ 。高、中、低质量浓度的黄芩苷供试品溶液平均加样回收率分别为 99.88%、99.01%、100.31%, RSD 均小于 0.87%。黄芩苷纳米乳在常温和低温条件下贮存 30 d, 含量无明显变化。结论 制备的 W/O 型黄芩苷纳米乳质量稳定可靠, 建立的高效液相色谱法操作简便、快捷、重复性好, 可用于测定纳米乳中黄芩苷的含量。

[关键词]黄芩苷; W/O 型黄芩苷纳米乳; 质量评价; 高效液相色谱法; 稳定性

[中图分类号]R927.2 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.03.023

黄芩苷是从唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis Georgi*) 的干燥根中提取分离出来的一种黄酮类化合物^[1-2], 具有抑制乙型肝炎病毒复制、清除乙型肝炎病毒复制模板环状 DNA、抑制肝纤维化等药理作用^[3-4], 临床上主要用于治疗慢性乙型肝炎。研究表明, 乙型肝炎病毒易藏匿于淋巴系统^[5-6], 而黄芩苷常规剂型难经淋巴转运, 不能有效地富集于淋巴系统, 导致慢性乙型肝炎的治疗受到一定的阻碍。纳米乳是一种新型淋巴靶向递药系统^[7], 本课题组前期成功制备出 W/O 型黄芩苷纳米乳, 相对于黄芩苷混悬剂, 所制备得到的 W/O 型黄芩苷纳米乳可经淋巴转运, 极大提高了黄芩苷的生物利用度。为进一步评价 W/O 型黄芩苷纳米乳的质量体系, 本研究建立了 W/O 型黄芩苷纳米乳的高效液相色谱分析方法, 对 W/O 型黄芩苷纳米乳中黄芩苷进行含量测定, 为该制剂质量控制提供一定的参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (包含 G1311X 四元梯度泵、G1329 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315C 紫外检测器); 美国安捷伦公司; Welch Topsil HPLC C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 上海月旭材料科技公司; CP225D 型十万分之一电子天平; 德国 Sartorius 公司; KQ-5200B 型数控超声波清洗器; 江苏省昆山市超声仪器有限公司; DF-101B 型磁力搅拌器; 河南省巩义市予华

仪器责任公司; Malvern Zeta sizer Nano ZS-90 纳米粒径电位分析仪; 英国马尔文仪器有限公司; SYZ-C 型石英自动亚沸高纯水蒸馏器; 南京桑力电子设备厂。

1.2 试药 W/O 型黄芩苷纳米乳及空白纳米乳 (批号分别为 20171010、20171101、20171102、20171103、20171104、20171105、20171106、20171107、20171108、20171109); 自制; 黄芩苷对照品 (批号 110715-201318, 含量 $\geq 98\%$); 中国食品药品检定研究院; 黄芩苷原料药 (批号 141201, 含量为 85.94%); 四川省玉鑫药业公司; 大豆磷脂: 安徽省合肥沃森生物科技公司; 1,2-丙二醇、肉豆蔻酸异丙酯、磷酸、甲醇 (色谱纯): 国药集团化学试剂公司; 苏丹红、亚甲蓝: 天津市光复精细化工公司; 蒸馏水: 自制; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 W/O 型黄芩苷纳米乳的制备及载药量考察 精密称取大豆磷脂 10.5 g、1,2-丙二醇 10.5 g、肉豆蔻酸异丙酯 9 g 混合置于锥形瓶中, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下磁力搅拌至全溶, 精密称定黄芩苷原料药 313.5 mg 溶于上述体系中, 直至黄芩苷原料药全部溶解在混合溶液中, 室温下往体系缓慢滴加 3 g 双蒸水直至体系变为透明均匀的液体, 即得 W/O 型黄芩苷纳米乳, 载药量为 9.5 mg/mL。

2.2 W/O 型黄芩苷纳米乳质量评价

2.2.1 外观性状 制备的 W/O 型黄芩苷纳米乳外观上均为橙黄色均一透明液体, 流动性良好。

2.2.2 类型鉴别 采用染色法来判断纳米乳类型, 取黄芩苷纳米乳 (批号 20171010) 5.0 mL 于两只试管中, 分别加入适量的水溶性染料亚甲基蓝和油溶

作者简介: 郑转弟 (1993-), 女, 硕士研究生

通信作者: 吴鸿飞 (1982-), 女, 博士, 教授, wuhongfei2009@

性染料苏丹红于试管中,比较两种染料的扩散速度。结果苏丹红的扩散速度明显快于亚甲基蓝的扩散速度,表明制备的纳米乳为W/O型纳米乳。

2.2.3 粒径分布 取W/O型黄芩苷纳米乳(批号20171010)1.0 mL,用外相肉豆蔻酸异丙酯稀释至10 mL。取稀释后的纳米乳适量,用Malvern Zeta sizer Nano ZS-90纳米粒径电位分析仪测定纳米乳体系的粒径,结果见图1。本实验制备的W/O型黄芩苷纳米乳的平均粒径为 (63.40 ± 1.10) nm ($n=3$),PDI为 (0.166 ± 0.006) ($n=3$),表明制备的W/O型黄芩苷纳米乳大小均一,且分布均匀。

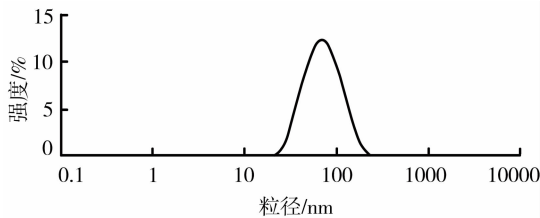


图1 W/O型黄芩苷纳米乳粒径分布图

2.3 W/O型黄芩苷纳米乳的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Welch Topsil HPLC

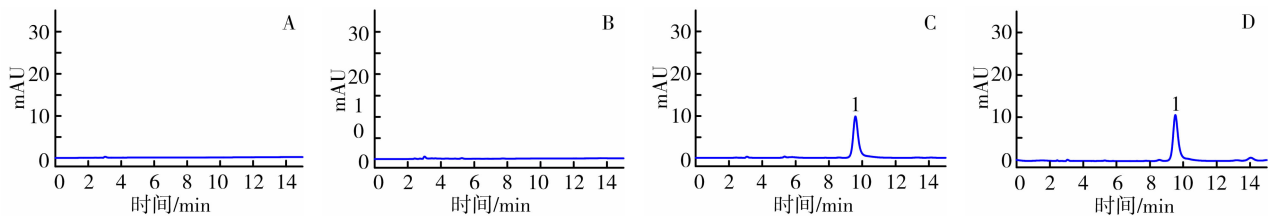


图2 甲醇(A)、空白纳米乳(B)、黄芩苷对照品(C)、W/O型黄芩苷纳米乳(D)的高效液相色谱图(1.黄芩苷)

(2)线性关系 取对照品储备液0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL分别置于10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为12.40、31.00、62.00、124.00、186.00、248.00、310.00 $\mu\text{g/mL}$ 的系列溶液。按“2.3.1”项下方法进行测定,平行测定3次,求得峰面积的平均值,以黄芩苷浓度(x)与峰面积(y)作图,绘制标准曲线,并计算得回归方程 $y=38.125x-32.384$ ($r=0.9997$)。结果表明,黄芩苷在12.40~310.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积的线性关系良好。

(3)精密度试验 取标准曲线中浓度为62.00 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,按“2.3.1”项的色谱条件连续进样6次,记录色谱峰面积,计算RSD为0.89%,表明仪器精密度良好。

(4)重复性试验 精密量取W/O型黄芩苷纳米乳1.0 mL(批号20171102),共6份,按“2.3.3”

C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水(55:45);柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;流速1.0 mL/min;检测波长为280 nm;进样量:10 μL 。理论塔板数按黄芩苷计算,应不小于3000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品6.2 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得620.00 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光储存。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取纳米乳1.0 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,超声20 min破乳。精密量取1.0 mL破乳液,置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,即得纳米乳待测样品,避光保存。

2.3.4 方法学考察

(1)专属性考察 分别取空白溶剂(甲醇)、黄芩苷对照品(以甲醇稀释所得的溶液)、空白纳米乳(批号20171101,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液)、W/O型黄芩苷纳米乳(批号20171102,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液),按“2.3.1”项下方法进行测定,记录色谱图,结果见图2。黄芩苷保留时间为9.59 min,辅料与试剂不干扰药物测定,表明方法专属性良好。

项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下的色谱条件测定,记录色谱峰面积,按“2.3.4”项下“(2)”之标准曲线计算黄芩苷含量,计算RSD为1.54%,表明方法重复性良好。

(5)稳定性考察 取同一供试品溶液分别于室温放置0、2、4、6、8、12、24 h后,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰面积,按“2.3.4”项下“(2)”之标准曲线计算黄芩苷含量,计算RSD为1.21%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

(6)加样回收率试验 精密量取已知含量的W/O型黄芩苷纳米乳1.0 mL(批号20171102),共9份,置于100 mL容量瓶中,分别精密加入9.5 mg/mL黄芩苷对照品溶液0.8、1.0、1.2 mL,各3份,加入一定容积的甲醇,超声20 min破乳,最后稀释至刻度,制得低、中、高质量浓度的黄芩苷供试品溶液,按“2.3.1”项下的色谱条件测定,记录色谱峰

面积,按“2.3.4”项下“(2)”之标准曲线计算黄芩苷含量,结果见表1。低、中、高3个浓度的平均加样

回收率分别为98.70%、99.01%、100.31%,RSD分别为0.40%、0.66%、0.87%,表明该方法准确度良好。

表1 加样回收率试验

编号	样品含量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加入量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加样回 收率/%	平均加样 回收率/%	RSD/ %
1	95.30	76.00	170.33	98.72		
2	95.30	76.00	170.60	99.08	98.70	0.40
3	95.30	76.00	170.00	98.29		
4	95.30	95.00	188.93	98.56		
5	95.30	95.00	190.07	99.76	99.01	0.66
6	95.30	95.00	189.07	98.71		
7	95.30	114.00	210.73	101.25		
8	95.30	114.00	208.77	99.54	100.31	0.87
9	95.30	114.00	209.47	100.15		

2.3.5 样品含量测定 精密量取6批W/O型黄芩苷纳米乳各1.0 mL,每批3份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,以“2.3.1”项下色谱条件测定,记录色谱峰面积,按“2.3.4”项下“(2)”之标准曲线计算黄芩苷含量,结果见表2。

表2 黄芩苷含量测定结果($n=3$)

批号	黄芩苷/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD/%
20171104	94.87	0.95
20171105	95.09	1.13
20171106	95.72	1.08
20171107	95.36	0.98
20171108	94.89	0.79
20171109	95.96	1.02

2.4 初步稳定性考察 精密量取2.0 mL W/O型黄芩苷纳米乳封于安瓿瓶中(批号20171103),共8份,每组4份,分别进行常温实验(25℃放置30 d)和低温实验(4℃放置30 d),分别于0、10、20、30 d时观察纳米乳的外观形状,并测定黄芩苷含量。结果见表3。在常温25℃、低温4℃条件下放置30 d,纳米乳外观澄清透明、无分层现象,且含量与0 d测定结果相比较无明显变化,表明制备的W/O型黄芩苷纳米乳在此时间内性质稳定。

表3 稳定性试验结果

试验条件	贮存时间/ d	外观	含量/ (mg/mL)
低温	0	橙黄透明	9.51
	10	橙黄透明	9.53
	20	橙黄透明	9.47
	30	橙黄透明	9.42
常温	0	橙黄透明	9.54
	10	橙黄透明	9.43
	20	橙黄透明	9.39
	30	橙黄透明	9.31

3 讨论

纳米乳是一种热力学稳定体系^[8],其破乳影响药物的释放,选择适宜的破乳方法对准确检测出黄芩苷含量具有重要意义。纳米乳的破乳方法主要有化学破乳法和物理破乳法^[9]。预实验中,考察了超声破乳和甲醇、乙腈的破乳效果,结果发现,超声无法破乳,乙腈破乳后出现浑浊,故选用甲醇作为破乳剂。同时,本实验考察甲醇联合超声法对所制备的W/O型黄芩苷纳米乳的破乳效果,结果发现甲醇联合超声条件下破乳效果最好(溶液澄明)。

文献报道黄芩苷含量测定时流动相的体系主要为甲醇-0.2%磷酸水^[10-11],考虑到磷酸对色谱柱的损害,本实验比较了甲醇-0.2%磷酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液的色谱行为,结果发现两者流动相条件下峰形无差异。因此,选择甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相条件,减小对色谱柱的损伤。

本实验对W/O型黄芩苷纳米乳中黄芩苷进行含量测定,以甲醇-0.1%磷酸水为流动相,色谱峰分离效果好,峰形尖锐,操作简便,结果准确可靠,重现性好,可用于W/O型黄芩苷纳米乳的质量控制和稳定性考察。

参考文献:

- [1] WU H, LIU Z, PENG J, et al. Design and evaluation of baicalin-containing in situ pH-triggered gelling system for sustained ophthalmic drug delivery[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 410(1): 31-40.
- [2] GAO X, GUO M, ZHANG Z, et al. Baicalin promotes the bacteriostatic activity of lysozyme on *S. aureus* in mammary glands and neutrophilic granulocytes in mice [J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 19894-19901.
- [3] 李新成, 王宏伟, 申保生, 等. 黄芩苷联合干扰素 α 治疗慢性乙型肝炎疗效及对细胞免疫的影响[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(2): 3-5.

- [4] HUANG H, ZHOU W, ZHU H, et al. Baicalin benefits the anti-HBV therapy via inhibiting HBV viral RNAs [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 323:36-43.
- [5] ZIGNEGO A L, PILUSO A, GIANNINI C. HBV and HCV chronic infection: autoimmune manifestations and lymphoproliferation[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2008, 8(2):107-111.
- [6] UMEDA M, MARUSAWA H, SENO H, et al. Hepatitis B virus infection in lymphatic tissues in inactive hepatitis B carriers[J]. *Journal of Hepatology*, 2005, 42(6): 806-812.
- [7] CHU M, XIAO X, MA J, et al. In vivo real-time near-infrared fluorescent mapping of sentinel lymph nodes using methylene blue encapsulated in a microemulsion nanosystem[J]. *Current Nanoscience*, 2010, 6(4): 388-396.
- [8] KAWAKAMI K, YOSHIKAWA T, MOROTO Y, et al. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs: I. Prescription design[J]. *Journal of Controlled Release*, 2002, 81(1-2):65-74.
- [9] 李萌, 王杏林, 葛志强, 等. HPLC法测定依托泊苷亚微乳中的药物含量[J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(17): 1390-1392.
- [10] 史亚军, 吴品江, 许润春, 等. 黄芩苷磷脂复合物基本性质研究[J]. *中草药*, 2012, 43(1):78-82.
- [11] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社, 2015:301.

(收稿日期:2018-10-25;编辑:曹健)

Preparation and Quality Assessment of W/O Baicalin Nanoemulsion

ZHENG Zhuan-di¹, ZHOU An^{1,2}, WU Hong-fei¹

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Experimental Research Center, School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract] Objective To prepare water-in-oil (W/O) baicalin nanoemulsion and assess its quality.

Methods W/O baicalin nanoemulsion was prepared by the optimized formulation process. The appearance, particle size, drug loading, and stability of W/O baicalin nanoemulsion were investigated. High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed at a detection wavelength of 280 nm to determine the content of baicalin in nanoemulsion. **Results** W/O baicalin nanoemulsion was uniform transparent liquid, with an average particle size of (63.40 ± 1.097) nm and a drug loading of 9.5 mg/mL. The concentration of baicalin showed a good linear relationship with peak area within 12.40-310.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9997$). The average recovery rates of high-, middle-, and low-concentration baicalin sample solutions were 99.88%, 99.01%, and 100.31%, respectively, with relative standard deviations of $<0.87\%$. No significant change in the content of baicalin was observed after baicalin nanoemulsion was stored at normal or low temperature for 30 days. **Conclusion** The prepared W/O baicalin nanoemulsion has stable and reliable quality. The established HPLC method is simple, efficient, and repeatable, and can be used to determine baicalin in nanoemulsion.

[Key words] Baicalin; W/O baicalin nanoemulsion; Quality assessment; High-performance liquid chromatography; Stability