

牛至油纳米乳的制备及其稳定性研究

张文娟, 吴旭锦, 尹宝英, 熊忙利, 朱小甫

(咸阳职业技术学院仪祉农林学院, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 通过绘制伪三元相图筛选牛至油纳米乳处方, 采用透射电子显微镜(TEM)、激光粒度测定仪分别考察其形态和粒径, 利用染色法鉴别纳米乳的类型, 通过光照试验、高速离心试验、加速试验以及长期试验考察牛至油纳米乳的稳定性。结果表明, 牛至油纳米乳的最佳制备工艺是以牛至油和液体石蜡(质量比2:1)为油相, 蒸馏水为水相, 混合表面活性剂中吐温-80和无水乙醇的质量比为3:1, 混合表面活性剂与油相的质量比为4:1。牛至油纳米乳为水包油型。在透射电镜下呈圆球形, 无粘连, 其平均粒径为16.4nm, 多分散系数(PDI)为0.062。在光照试验、高速离心试验、加速试验和长期试验中, 牛至油纳米乳均保持澄清透明。该制剂制备工艺简单, 有优良的稳定性。

关键词: 牛至油; 纳米乳; 稳定性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2015)02-038-03

新型植物性抗生素——牛至油, 是一种从自然界植物“牛至”中提取的挥发油, 是一种新型动物保健药物。其主要成分有香芹酚、麝香草酚、百里酚、石里靛、双戊烯、伽罗木醇以及香荆芥酚等。牛至油是我国农业部(农牧发[2001120号]批准的可长期在饲料中添加使用的一种药物饲料添加剂。牛至油中的香芹酚等酚类化合物有较强的抗菌活性, 能迅速穿透病原微生物的细胞膜, 改变其结构, 破坏其正常代谢机能; 并能有效地阻止线粒体内的呼吸氧化过程, 使病原微生物丧失能量而死亡, 具有较强的抑制和杀灭多种病原微生物的功能, 并且不会产生耐药性。牛至油常温下呈淡黄色的澄清油状液体, 有特殊芳香气味, 不溶于水但溶于乙醚、乙醇等有机溶剂。牛至油的传统剂型为10%牛至油预混剂, 由于临床上牛至油用药量很小, 所以预混剂存在拌料不均、生物利用率低等缺点。纳米乳是一种新型药物载体, 由油、水、表面活性剂和助表面活性剂以适当比例混合形成的一种透明或半透明、低黏度的动力学和热力学稳定体系, 粒径介于1~100 nm之间。纳米乳不仅具有制备简单、热力学稳定、缓释、靶向等优点, 还具有增大难溶性药物溶解度、提高药物生物利用度、提高易水解药物稳定

性等特点。本研究将新型植物抗生素牛至油制成纳米乳, 并对其稳定性进行考察, 为临床提供一种稳定、高效、缓释的新型药物制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

牛至油, 济南凯茵生物科技有限公司; 聚氧乙烯蓖麻油-40(EL-40)、聚氧乙烯(40)氢化蓖麻油(RH-40), 天津市浩元精细化工有限公司; 肉豆蔻酸异丙酯(IPM), 陕西省医药公司; 吐温-80(Tween-80), 天津市恒星化学试剂制造有限公司; 无水乙醇, 西安三浦化学试剂有限公司; 苏丹III, 上海试剂三厂; 亚甲基蓝, 天津市福晨化学试剂厂。

1.2 主要仪器

JEM-1230型透射电子显微镜, 日本JEOL公司; TGL 16B型台式高速离心机, 湖南星科科学仪器有限公司; Nicomp 388/Zeta PALS激光粒度测定仪 Zetasizer Nano ZS型, 英国 Malvern instrument公司; DS224S电子天平, 德国Sartorius公司。

1.3 牛至油纳米乳的制备

1.3.1 油的选择 选择液体石蜡和肉豆蔻酸异丙酯两

收稿日期: 2015-02-18

基金项目: 陕西省农业科技攻关项目(项目编号: 2013k02-17)

作者简介: 张文娟(1980—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 纳米药理学。

种物质, 分别与牛至油进行复配, 通过溶解度试验, 筛选最佳油相。

1.3.2 助表面活性剂的选择 助表面活性剂的加入能够调节表面活性剂的亲水亲油平衡(HLB)值、降低油水问界面张力、增加界面膜的流动性, 助表面活性剂又可作为药物的助溶剂, 从而提高载药量。试验选择无水乙醇为助表面活性剂。

1.3.3 表面活性剂的筛选 本研究对EL-40、RH-40、Tween-80三种表面活性剂进行筛选。室温下, 将上述3种表面活性剂与已确定的油相分别按质量比9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9的比例混匀, 边搅拌边逐滴加入蒸馏水, 当体系由粘稠变稀时纳米乳形成, 记录此时的加水量, 分别以表面活性剂、油相、水相作为相图的3个顶点, 利用Origin Pro 7. 5软件绘制三元相图, 根据形成乳区的大小确定最佳的表面活性剂。

1.3.4 表面活性剂与助表面活性剂质量比(Km)的选择 将确定的表面活性剂和助表面活性剂按Km值分别为4:1、3:1、2:1混匀, 然后与确定的油相按比例混匀后, 边搅拌边逐滴加入蒸馏水, 直至形成澄清透明的乳液, 记录体系由粘稠突然变稀时的临界点水量, 确定最佳的Km值。

1.4 牛至油纳米乳结构类型的鉴别

采用染色法鉴别纳米乳的类型。通过在纳米乳中滴加亚甲基蓝和苏丹III, 观察2种染色剂在纳米乳中扩散速度的快慢, 判断其结构类型。

1.5 牛至油纳米乳形态观察和粒径分布

将牛至油纳米乳稀释10倍后分成2份, 1份滴加在覆盖碳膜的铜网上, 用质量分数为2%的磷酸铀负染30s, 自然挥干, 在透射电镜下观察纳米乳的形态; 另1份用激光粒度分析仪测定其平均粒径(Z. Average)和多分散系数(PDI)。

1.6 牛至油纳米乳的稳定性考察

1.6.1 外观 肉眼观察纳米乳的外观是否澄清透明, 有无浑浊、分层、絮状等变化。

1.6.2 高速离心试验 将牛至油纳米乳置于离心管中, 10000r/min离心20min, 观察其外观有无变化。

1.6.3 光照试验 将3批牛至油纳米乳密封于玻璃瓶内, 置于(4500±500)lx条件下, 分别于0、5、10d观察其性状有无变化, 并测定乳滴粒径大小。

1.6.4 加速试验 将3批牛至油纳米乳密封于玻璃瓶

内, 置于(30±2)℃、相对湿度(65±5)%条件下6个月, 分别于1、2、3、6个月取样, 观察其性状有无变化, 并测定乳滴粒径大小。

1.6.5 长期试验 将3批牛至油纳米乳密封于玻璃瓶内, 置于(25±2)℃、相对湿度(60±10)%条件下12个月, 分别于0、3、6、9和12个月取样, 观察其性状有无变化, 并测定乳滴粒径大小。

2 结果与分析

2.1 牛至油纳米乳配方的确定及制备

2.1.1 油的确定 液体石蜡对牛至油有较强的溶解能力, 为提高载药量, 选择液体石蜡做为油相部分。

2.1.2 表面活性剂的确定 表面活性剂是纳米乳形成的关键物质, 其能形成界面吸附膜, 降低界面张力, 从而促使纳米缓释剂的形成。由图1可知, 当以Tween-80为表面活性剂时, 形成的纳米乳区域(黑色部位为纳米乳区)最大, 体系也更加稳定, 因此确定Tween-80为表面活性剂。



图1 表面活性剂对纳米乳形成区域的影响

Fig.1 Effects of surfactant on the nanoemulsion formation

2.1.3 Km的确定 Km能够影响纳米乳的形成及其稳定性, 因此需要对其进行选择。当Km为3:1时所形成的纳米乳区域最大, 说明在此条件下所形成的纳米乳更加稳定, 因此将Km确定为3:1。

2.1.4 牛至油纳米乳配方的确定 质量比: 吐温-80:无水乙醇:牛至油:液体石蜡:水=3:1:7.5:2.5:8。

2.1.5 牛至油纳米乳的制备 室温下, 依上述配方量将牛至油溶于液体石蜡中, 然后加入无水乙醇, 再加入吐温-80搅拌均匀, 最后边搅拌边滴加配方量的蒸馏水, 即可制备出牛至油纳米乳。

2.2 牛至油纳米乳的结构类型

试验结果发现亚甲基蓝在纳米乳中扩散的速度明显快于苏丹III, 表明所制备的纳米乳为水包油(O/W)型。

2.3 牛至油纳米乳的形态及粒径分布

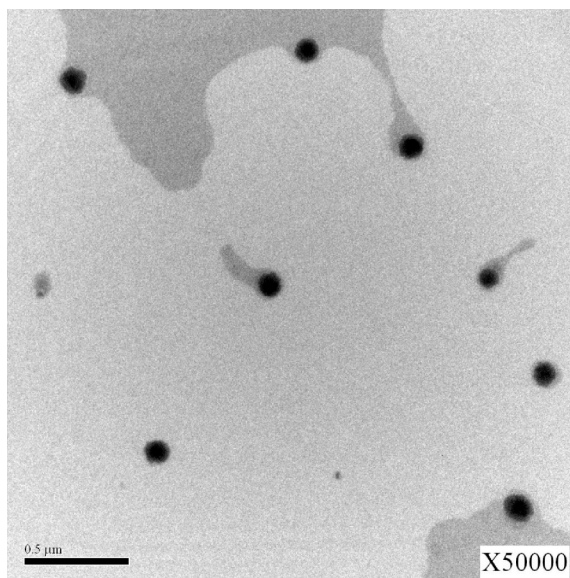


图2 牛至油纳米乳的透射电镜照片

Fig.2 Transmission electron micrograph of origano oil nanoemulsion

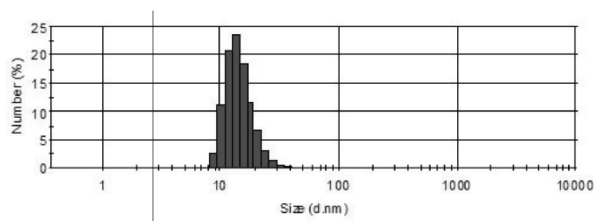


图3 牛至油纳米乳的粒径分布图

Fig.3 Droplet size distribution of origano oil nanoemulsion

透射电镜下,牛至油纳米乳乳滴呈圆球形,分散性良好(见图2)。Z-Average为16.4nm, PDI为0.062,其粒径分布范围较窄,均在10~50nm之间(见图3)。

2.4 牛至油纳米乳的稳定性

2.4.1 外观 牛至油纳米乳为淡黄色澄清透明的液体,无浑浊、絮凝、分层等现象。

2.4.2 高速离心试验 将牛至油纳米乳于10000 r/min离心20min后,仍为淡黄色澄清透明的液体,外观未发生任何变化,表明其稳定性良好。

2.4.3 光照试验结果 光照条件下,牛至油纳米乳外观澄清透明,未见分层、絮凝和破乳等现象,平均粒径随时间变化规律见表1,结果表明该制剂对光照稳定。

2.4.4 加速试验结果 加速试验条件下,牛至油纳米乳的外观一直保持澄清透明,未见分层、絮凝、色变和破乳等现象,平均粒径随时间变化规律见表1,结果表明该制剂在高温和高湿环境下贮存稳定。

2.4.5 长期试验结果 经过长期试验,牛至油纳米乳外观一直保持澄清透明,未见分层、絮凝、色变和破乳等现象,平均粒径随时间变化规律见表1,结果表明该制剂在长期贮存条件下性质稳定。

表1 牛至油纳米乳的稳定性试验结果

Tab. The stability test results of the origano oil nanoemulsion

批 次	平均粒径(nm)										
	光照试验(4500±500)lx			加速试验(30±2)℃				长期试验(25±2)℃			
	0d	5d	10d	1月	2月	3月	6月	3月	6月	9月	12月
20130606	16.4	16.5	16.8	18.5	19.3	21.8	25.7	21.5	22.6	25.5	26.9
20130607	16.9	16.9	17.0	19.0	19.6	22.3	26.4	23.7	24.5	26.7	28.4
20130608	16.6	16.7	16.8	18.8	19.9	22.5	26.9	22.8	23.9	24.8	27.2

3 讨论

研究发现纳米乳各组分的选择对纳米乳的形成至关重要。本研究通过滴定法绘制伪三元相图,对制备牛至油纳米乳的配方进行优化筛选,以确定其最佳配方,并对其稳定性进行考察。通过相图可知,当表面活性剂为吐温-80时所形成的纳米乳区域最大,表示纳米乳体系更加稳定,因此确定乳化能力强且安全性较高的吐温-80作为本配方的表面活性剂。通过考察3种油脂对药物的溶解度发现液

体石蜡对牛至油的溶解能力最好,为提高载药量,确定油脂为液体石蜡。以吐温-80表面活性剂,无水乙醇为助表面活性剂,液体石蜡和牛至油为油相,蒸馏水为水相,利用伪三元相图优选配方,结果表明,当Km值为3:1, m(混合表面活性剂):m(油相)=4:1时,所形成的纳米乳澄清透明,稳定性良好,在透射电镜下乳滴呈圆球形,分布均匀,无粘连,粒径分布范围狭窄,说明本研究确定的配方所制备出的纳米乳符合其性质要求。亚甲基蓝属于水溶性的染色剂,苏丹Ⅲ属于油溶性的染色剂,本试

验纳米乳类型鉴别结果显示, 亚甲基蓝在纳米乳中的扩散速度快于苏丹Ⅲ, 因此确定牛至油纳米乳为水包油型。本研究通过多种方式考察了牛至油纳米乳的稳定性, 结果发现, 在光照试验、高速离心试验、加速试验以及长期试验中, 牛至油纳米缓释剂均保持澄清透明, 未见分层及沉淀等现象, 粒径随着贮存时间的延长, 稍有变大的趋势, 但是变化不明显, 粒径大小仍然处于纳米乳粒径范围之内, 说明本制剂具有优良的贮存稳定性。总之, 本研究制备的牛至油纳米乳为澄清透明的淡黄色液体, 乳滴呈圆球形, 分布均匀, 平均粒径为16.4nm, 其制备工艺简单, 重复性良好, 性质稳定并质量可控, 便于工业化生产。

参考文献

- [1]张阳德.纳米药理学[M].北京:化学工业出版社,2006:163-164.
- [2]Moreno MA, Ballesteros MP, Fitos P. Lecithin-based oil-in water microemulsions for parenteral use: Pseudoternary phase diagrams, characterization and Toxicity studies[J]. J Pharm Sci, 2003, 92(7): 1428.
- [3]Pons R, Carrera I, Caelles J, et al. Formation and Properties of mini-emulsions formed by microemulsions dilution[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2003, 106 (12):129.
- [4]刘梅雪, 欧阳五庆, 宋冰, 等. 百里香酚纳米乳的制备及其稳定性[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2011, 29(6): 28-34.
- [5]史同瑞, 许腊梅, 于万才, 等. 2005. 微乳基质成乳条件与稳定性研究. 动物医学进展, 27(6):97~99.
- [6]何兰花. 新型植物抗生素——牛至油[J]. 畜牧与兽医, 2004, 36(5):22-23.
- [7]孙红武, 欧阳五庆. 盐酸小檗碱纳米乳的制备及其理化性质研究[J]. 草药, 2007, 38(10):1476-1480.
- [8]石波, 梁平, 李秀波, 等. 天然饲用抗菌剂牛至油微囊的制备[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(7):14-16.
- [9]胡晓飞, 林东康, 王利娜, 等. 牛至油对肉鸡生产性能和免疫功能的作用[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(9):15-16.

[责任编辑、校对: 阮班录]

Preparation and Stability Evaluation of Origanum Oil Nanoemulsion

ZHANG Wen-jue, WU Xu-jin, YIN Bao-ying, XIONG Mang-li, ZHU Xiao-fu

(Xianyang Vocational Technical College, xian yang 712000, China)

Abstract: The optimal formulation of origanum oil nanoemulsion was screened by studying the pseudoternary phase diagrams. The drop shape and average droplet size of origanum oil nanoemulsion were measured by transmission electron microscope (TEM) and the laser granularity analysis instrument, respectively. Its type was determined through staining method. And centrifugalization test, acceleration test and long-term stability was inspected by light test, high speed test. The results showed that the best prescription of origanum oil nanoemulsion was as follows: origanum oil and Liquid paraffin (mass ratio 2:1) as mixed oil phase, distilled water as water phase, Tween-80 and ethanol (Km 3:1) as mixed surfactants, in which the mass ratio of mixed surfactants and mixed oil phase was 4:1. The origanum oil nanoemulsion was of oil-in-water. The TEM showed that drops of origanum oil nanoemulsion were spheroidal and without adhesion to each other. The average droplet size was 16.4 nm with PDI at 0.062. The origanum oil nanoemulsion was still clarity after light test, high speed centrifugalization test, acceleration test and long-term test. The tests showed a fine stability of the origanum oil nanoemulsion.

Key words: origanum oil; nanoemulsion; stability