

二氢杨梅素自微乳配方的优化及表征

常大伟,曹佳怡,姚 芊,任 娜,王虎玄,孙玉姣,沈 文

(陕西科技大学 食品科学与工程学院,西安 710021)

摘要:旨在提高二氢杨梅素(DMY)的生物利用度,制备了二氢杨梅素自微乳(DMY-SMES),通过DMY在辅料(油相、乳化剂和助乳化剂)中的溶解度及各辅料的相容性确定油相、乳化剂和助乳化剂,通过伪三元相图确定三者 in 自微乳中的比例,在此基础上,以粒径、多分散指数(PDI)和载药量为指标,通过单纯形网格法优化DMY-SMES的配方,并对最佳配方制备的DMY-SMES进行表征。结果表明:以中链甘油三酯(MCT)、吐温80和聚乙二醇400分别为油相、乳化剂和助乳化剂,DMY-SMES的最佳配方为10% MCT、60%吐温80、30%聚乙二醇400,在此条件下DMY-SMES的液滴平均粒径为14.46 nm, PDI为0.138,载药量为29.84 mg/g,包封率可达85.26%;最佳配方所得DMY-SMES为浅黄色澄清液体,乳滴呈类球形、粒径小、表面光滑,无团聚现象,为O/W型,自微乳及其稀释液的稳定性均较优;DMY-SMES的浊点为70℃;DMY-SMES在水、pH 1.2 HCl、pH 6.8磷酸盐缓冲液(PBS)中及在30 d的储藏期内(4℃),其液滴粒径和分布均无明显变化;DMY-SMES在水、pH 1.2 HCl、pH 6.8 PBS中的释放量明显高于游离DMY;在一定质量浓度下,DMY-SMES的DPPH和ABTS自由基清除能力强于游离DMY。综上,自微乳可提高DMY的溶解度,使其具有良好的生物相容性和稳定性,在食品工业和医药领域具有广阔的发展前景。

关键词:二氢杨梅素;自微乳;单纯形网格法;体外释放

中图分类号:TS202.3;O69

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2025)05-0075-10

Formulation optimization and characterization of self-microemulsifying system for dihydromyricetin

CHANG Dawei, CAO Jiayi, YAO Qian, REN Na, WANG Huxuan,
SUN Yujiao, SHEN Wen

(College of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: In order to improve the bioavailability of dihydromyricetin (DMY), dihydromyricetin self-microemulsifying system (DMY-SMES) was prepared. The solubility of DMY in excipients (oil phase, emulsifier, and co-emulsifier) and the compatibility of each excipient were investigated to determine the oil phase, emulsifier, and co-emulsifier. The proportions of these components in the self-microemulsifying system were determined based on the pseudo-ternary phase diagram. Then, the formulation of DMY-SMES was optimized by the simplex lattice method using particle size, polydispersity index (PDI) and drug loading as indicators. The DMY-SMES prepared with the optimal formulation was characterized. The results showed that with medium-chain triglycerides (MCT), Tween-

80, and polyethylene glycol 400 as oil phase, emulsifier and co-emulsifier, respectively, the optimal formulation of DMY-SMES was 10% MCT, 60% Tween-80, and 30% polyethylene glycol 400. Under these conditions, the average particle size of DMY-SMES was 14.46 nm, the PDI was 0.138, and the drug loading was 29.84 mg/g, with an encapsulation efficiency of

收稿日期:2024-01-26;修回日期:2024-11-28

基金项目:国家自然科学基金项目(32272446);陕西省科技厅重点研发计划项目(2022NY-223);陕西省西安市科技局农业技术研发计划项目(21NYF0058);陕西省重点研发计划项目(2023-YBSF-379)

作者简介:常大伟(1978),男,副教授,博士,研究方向为功能因子的微胶囊、果蔬加工以及功能性配料与添加剂(E-mail)cdw1860@126.com。

85.26%。The DMY – SMES obtained from the optimal formulation was a light yellow, clear liquid with spherical – like droplets, small particle size, smooth surface, and no aggregation, forming an O/W type. Both the self – microemulsifying system and its diluted solutions exhibited excellent stability. The cloud point of DMY – SMES was 70 °C. The particle size and distribution of DMY – SMES in water, pH 1.2 HCl, and pH 6.8 phosphate buffer solution (PBS) showed no significant changes during the 30 d storage period (4 °C). The release amount of DMY – SMES in water, pH 1.2 HCl, and pH 6.8 PBS was significantly higher than that of free DMY. At a certain mass concentration, the DPPH and ABTS free radical scavenging abilities of DMY – SMES were stronger than those of free DMY. In conclusion, the self – microemulsion system can improve the solubility of DMY, giving DMY good biocompatibility and stability, and it has broad prospects for development in the food industry and pharmaceutical field.

Key words: dihydromyricetin; self – microemulsion; simplex lattice method; *in vitro* release

二氢杨梅素(Dihydromyricetin, DMY)是藤茶的主要活性成分^[1],具有抗氧化、抗菌、降血糖和解酒等活性^[2-3],还可用于治疗酒精使用障碍、慢性咽炎和高血压等疾病^[4]。因此,DMY适用于食品添加剂、保健药品的研发,在食品工业和医药领域具有广阔的发展前景。然而,DMY水溶性低、体内吸收差、生物利用度低,严重阻碍了其临床应用^[5]。另外,DMY含有6个酚羟基,分子稳定性较差,在加工和储存过程中易受金属离子、氧气以及光线等因素影响发生氧化,且pH和温度的升高也会加速其氧化进程,导致其活性损失^[6]。因此,改善DMY的溶解性和稳定性以提高其生物利用度对扩展其应用范围至关重要。

基于脂质的递送系统是提高难溶性化合物生物利用度的有效方法之一,尤其对受制于肝脏首过效应的化合物具有良好的效果^[7]。自微乳(Self – microemulsifying system, SMES)是一种由油相、乳化剂、助乳化剂和药物组成的各向同性混合物^[8],其在水相中通过轻微搅拌可形成液滴粒径小于100 nm的水包油(O/W)型微乳液^[9-10]。该体系通过微小的乳滴扩大界面面积,降低表面张力,形成易于通过胃壁和肠壁的水化层^[11],促进药物的释放和吸收。SMES具有载药量高、稳定性好、分散快、制备方便等优点,并能够刺激胃肠道内脂蛋白和乳糜微粒的产生,刺激淋巴运输,增强药物旁路运输,避免肝门静脉的首过效应,从而间接提高药物的生物利用度^[12]。近年来,SMES在提高川芎油、姜黄素^[13]、白藜芦醇^[14]、辛伐他汀^[15]等不稳定和水不溶性药物的口服生物利用度方面得到了广泛的研究,但目前尚未有应用在DMY上的相关报道。

本研究通过制备DMY自微乳(DMY – SMES)来提高DMY的溶解度,以粒径、多分散指数(PDI)及载

药量为指标,采用单纯形网格法优化DMY – SMES的配方,并对最佳配方制备的DMY – SMES进行表征,以期DMY在功能食品领域的应用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

DMY(纯度 $\geq 98\%$),西安天丰生物科技股份有限公司;中链甘油三酯(MCT),广州汇龙生物科技股份有限公司;橄榄油,青岛嘉里粮油有限公司;玉米油,中粮粮油工业有限公司;油酸乙酯,江苏圣仑化工科技有限公司;聚乙二醇200(PEG – 200)、聚乙二醇400(PEG – 400)、吐温20(Tween – 20),天津市科密欧化学试剂有限公司;吐温80(Tween – 80)、司盘80(Span – 80)、无水乙醇、甘油,天津市天力化学试剂有限公司;1,1 – 二苯基 – 2 – 苦基肼(DPPH)、2,2' – 联氮 – 双 – (3 – 乙基苯并噻唑啉 – 6 – 磺酸)二铵盐(ABTS),上海源叶生物科技股份有限公司。

1.1.2 仪器与设备

LE104E电子天平,上海梅特勒 – 托利多仪器有限公司;B – 260恒温水浴锅,上海亚荣生化仪器厂;ES35 B – Pro加热磁力搅拌器,莱伯泰科有限公司;HRT20MM高速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;ZS90纳米粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;UV – 1240紫外 – 可见分光光度计,日本Shimadzu公司;KQ – 300B超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;XW – 80A涡旋混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DMY在油相、乳化剂及助乳化剂中溶解度的测定

分别移取油相(橄榄油、玉米油、油酸乙酯、

MCT)、乳化剂(Tween-80、Tween-20、Span-80)及助乳化剂(PEG-200、PEG-400、甘油)各 1 mL 于西林瓶,各加入过量 DMY(产生沉淀现象),涡旋 5 min,超声 2 h 助溶,37 °C 水浴静置 24 h,10 000 r/min 离心 20 min,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,滤液用无水乙醇稀释至一定倍数,采用紫外-可见分光光度计测定稀释液在 293 nm 处的吸光度,代入 DMY 标准曲线方程($y = 0.05358x - 0.01154$,式中: y 为 DMY 含量; x 为吸光度)计算 DMY 在各辅料中的溶解度。

1.2.2 自微乳中各辅料的相容性测定

通过相容性试验进行油相、乳化剂及助乳化剂的筛选。将油相与乳化剂分别按质量比 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5 涡旋混匀,加入总质量 100 倍的 37 °C 超纯水,300 r/min 恒速磁力搅拌,观察乳化情况并参照表 1 对自微乳进行分级,确定最佳油相与乳化剂。再以确定的最佳油相与乳化剂分别与 PEG-200、PEG-400、甘油按质量比 2:4:4 混合,加入总质量 100 倍的 37 °C 超纯水,300 r/min 恒速磁力搅拌,观察乳化情况,按照表 1 对其进行分级,以筛选最佳助乳化剂。

表 1 自微乳的标准评级

Table 1 Standard rating of SMES

等级	乳化时间/min	外观及分散状态
A	<1	澄清或者略泛蓝光
B	<1	略浑浊,呈蓝白色
C	1~2	不透明,呈蓝白色
D	>2	色泽灰暗,呈灰白色,稍带油状
E	>2	难以乳化,有油滴浮于液面

1.2.3 伪三元相图的绘制

将最佳乳化剂与助乳化剂按质量比 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 混合,再与最佳油相按质量比 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5 混合,旋涡混匀制得空白自微乳。取适量空白自微乳按照质量比 1:100 加入 37 °C 超纯水,300 r/min 恒速磁力搅拌,按照表 1 对自微乳进行分级,利用 Origin 绘制油相-乳化剂-助乳化剂的伪三元相图,记录能形成 A 级与 B 级自微乳的各相比例形成阴影区,确定各相的比例范围。

1.2.4 DMY-SMES 的制备

将油相、乳化剂与助乳化按照一定比例混合,于 37 °C 下用磁力搅拌器以 300 r/min 混匀,制得空白自微乳,加入过量 DMY,超声 2 h 助溶,随后 37 °C 水浴静置 24 h,10 000 r/min 离心 20 min,上清液即为

DMY-SMES。

1.2.5 粒径、PDI 和载药量的测定

在 25 °C 下,用纳米粒度仪测定 DMY-SMES 的平均粒径和 PDI。每个样品至少测定 3 次。

取一定量 DMY-SMES 过 0.22 μm 微孔滤膜,用无水乙醇将滤液稀释至一定倍数,测定稀释液在 293 nm 处的吸光度,代入 1.2.1 的 DMY 标准曲线方程中计算 DMY-SMES 中 DMY 的含量,即为载药量。

1.2.6 包封率的测定

参照文献[16]采用超滤离心法测定包封率。

1.2.7 DMY-SMES 表征

1.2.7.1 形态观测

外观形态:观察最佳配方制备的 DMY-SMES 以及将其用超纯水稀释 100 倍后所得乳液在低温(4 °C)和室温(25 °C)下储藏 30 d 的外观形态。

微观形态:将 DMY-SMES 用超纯水稀释至一定倍数,取 1 滴(约 20 μL)于铜网上,用 2% 磷钨酸进行染色,待其晾干形成薄膜后,在透射电子显微镜下观察 DMY-SMES 的微观形态。

1.2.7.2 微乳类型鉴别

采用 Wang 等^[17]的方法并稍作修改鉴别微乳类型。将 2 份 DMY-SMES 分别用超纯水稀释 100 倍后,采用磁力搅拌器搅拌均匀,分别加入油性染料苏丹红粉末(红色)和水溶性染料亚甲基蓝粉末(蓝色),观察苏丹红及亚甲基蓝在溶液中的扩散速度,若蓝色扩散的快,说明形成的微乳为 O/W 型,反之则为油包水(W/O)型。

1.2.7.3 浊点测定

采用 Liao 等^[18]的方法并稍作修改测定 DMY-SMES 浊点。取适量 DMY-SMES,按质量比 1:100 缓慢加入 37 °C 超纯水中,缓慢搅拌,以 2 °C/min 速度梯度升温,观察体系出现浑浊时的温度,即为浊点。

1.2.7.4 稳定性分析

采用 Chen 等^[19]的方法并稍作修改分析 DMY-SMES 的储藏稳定性。将 DMY-SMES 保存在封闭的小瓶中,于 4 °C 下储藏 30 d,测定其在 0、5、10、20、30 d 的平均粒径分布,观察外观性状。

采用 Wang 等^[20]的方法并稍作修改研究 DMY-SMES 在不同介质中的稳定性。将 DMY-SMES 分别溶于超纯水、pH 1.2 的 HCl 和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,在 37 °C 水浴下搅拌 1 h,搅拌速率 100 r/min,测定乳液的平均粒径分布。

1.2.7.5 体外释放分析

采用 Zheng 等^[21]的方法并稍作修改,测定 DMY 和 DMY-SMES 在不同介质中的溶出度。将 3 份 1 mL DMY-SMES 和与其 DMY 质量相同的 DMY 粉末分别装入透析袋,将透析袋分别放入 500 mL 超纯水、pH 1.2 HCl 和 pH 6.8 PBS 的 3 种溶出介质中,在 37 °C 下以 100 r/min 搅拌 12 h,在 0.5、1、2、4、6、8、12 h 取样 5 mL,并补充等体积的溶出介质,样品溶液过 0.22 μm 微孔滤膜后测定其在 293 nm 处的吸光度,代入 1.2.1 中的 DMY 标准曲线方程中计算得到样品溶液中的 DMY 含量,平行测定 3 次,按照式(1)计算 DMY 溶出度(Y),并以时间为横坐标,累积溶出度为纵坐标绘制释放曲线。

$$Y = M_1/M_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中: M_1 为释放的 DMY 的量; M_2 为加入透析袋的 DMY 的量。

1.2.7.6 抗氧化活性测定

DPPH 自由基清除率的测定:参照 Sarabandi 等^[22]的方法,并稍作修改。准确称取 8 mg DPPH,用适量无水乙醇溶解,在 30 °C 下避光超声处理 5 min,完全溶解后定容至 100 mL,制成 0.08 mg/mL 的 DPPH 溶液,现配现用。取 2 mL 0.08 mg/mL 的 DPPH 溶液和 2 mL 无水乙醇,充分混匀,室温下避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度(A_1);取 2 mL 无水乙醇和 2 mL DMY 质量浓度分别为 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0、24.0 μg/mL 的 DMY-SMES 或 DMY 无水乙醇溶液,充分混匀,室温下避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度(A_2);取 2 mL 0.08 mg/mL 的 DPPH 溶液和 2 mL 待测样品溶液,充分混匀,室温下避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度(A_3)。以无水乙醇为对照。按照式(2)计算 DPPH 自由基清除率(X_1)。

$$X_1 = [1 - (A_3 - A_2)/A_1] \times 100\% \quad (2)$$

ABTS 自由基清除率的测定:参照 Tang 等^[23]的方法,并稍作修改。首先将 7 mmol/L 的 ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾($K_2S_2O_8$)溶液按照体积比 1:1 混匀,室温避光反应 16 h,直到溶液变成暗蓝色,作为 ABTS 储备液。再用无水乙醇稀释 ABTS 储备液,使其在 734 nm 下的吸光度在(0.70 ± 0.02),作为 ABTS 工作液。分别吸取 1 mL DMY 质量浓度为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 μg/mL 的 DMY-SMES 或 DMY 无水乙醇溶液于试管中,再加入 4 mL ABTS 工作液,避光反应 6 min,测定 734 nm 处吸光度(A_s);用 4 mL 无水乙

醇代替 ABTS 工作液作为空白,避光反应 6 min,测定 734 nm 处吸光度(A_b);用 1 mL 无水乙醇代替样品作为对照,避光反应 6 min,测定 734 nm 处吸光度(A_c)。无水乙醇为参比。按照式(3)计算 ABTS 自由基清除率(X_2)。

$$X_2 = [1 - (A_s - A_b)/A_c] \times 100\% \quad (3)$$

1.2.8 数据分析

结果以“平均值 ± 标准差”表示,采用 Design Expert 8.0.6 软件进行回归分析。使用 Origin 2021 和 GraphPad Prism 8 软件绘图。使用 SPSS 17.0 软件处理和分析数据,采用 Duncan 检验($p < 0.05$)进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 DMY 在不同辅料中的溶解度

DMY 在不同辅料中的溶解度如表 2 所示。

表 2 DMY 在不同辅料中的溶解度

Table 2 Solubility of DMY in various excipients

辅料	溶解度/(mg/mL)
油相	
橄榄油	0.42 ± 0.09
玉米油	1.08 ± 0.16
油酸乙酯	0.59 ± 0.11
MCT	0.91 ± 0.04
乳化剂	
Tween-80	33.86 ± 2.06
Tween-20	47.93 ± 2.58
Span-80	10.01 ± 0.63
助乳化剂	
PEG-200	195.32 ± 6.12
PEG-400	191.31 ± 8.32
甘油	8.59 ± 0.79

由表 2 可知:与其他油相相比,DMY 在玉米油和 MCT 中的溶解度明显较高;乳化剂中,吐温类乳化剂的 DMY 溶解度较高;助乳化剂中,PEG-400 与 PEG-200 的 DMY 溶解度较高,且二者相近,而甘油的 DMY 溶解效果相对较差。综上,后续试验选择玉米油和 MCT 为油相,考察油相、乳化剂和助乳化剂的相容性。

2.2 自微乳中辅料的确定

油相与乳化剂间的相容性对乳化能力有重要影响,相容性差的油相和乳化剂制得的自微乳会出现粒径过大或分层现象^[24]。不同油相与乳化剂配伍所得自微乳的分级结果见表 3。

表 3 不同油相与乳化剂配伍自微乳的分级

Table 3 Classification of SMES based on different oil phase and emulsifier combination

油相	乳化剂	不同油相与乳化剂比例自微乳分级				
		1:9	2:8	3:7	4:6	5:5
	Tween-80	B	C	D	D	E
玉米油	Tween-20	A	B	D	D	E
	Span-80	E	E	E	E	E
MCT	Tween-80	A	A	C	D	D
	Tween-20	A	E	E	E	E
	Span-80	E	E	E	E	E

由表 3 可知,整体来看,与玉米油相比,MCT 与乳化剂的相容性更好,因此选择 MCT 作为油相进行后续试验。3 种乳化剂中 Span-80 与玉米油、MCT 配伍均出现絮状物,且久置后仍无法消失;而 Tween-80 配伍 MCT 的相容性良好,这可能是由于 Tween-80 的 C18 脂肪酸链中不饱和双键的存在。Wang 等^[25]也报道了表面活性剂的脂肪酸链中存在双键有助于通过在液滴周围形成松散的界面膜从而形成纳米/微乳液。因此,选择 Tween-80 作为乳化剂进行后续试验。

助乳化剂可以减少乳化剂的用量,减少对胃肠黏膜的刺激性,增加药物在油或油水界面的溶解度,增加微乳载药量^[26]。不同助乳化剂与 MCT、Tween-80 配伍形成乳液 3 次平行试验的分级结果见表 4。

表 4 不同助乳化剂与 MCT、Tween-80 配伍自微乳的分级

Table 4 Classification of SMES based on different co-emulsifiers mixed with MCT and Tween-80 self-microemulsions

助乳化剂	自微乳分级		
	试验 1	试验 2	试验 3
PEG-200	C	B	C
PEG-400	A	A	B
甘油	E	D	E

由表 4 可知:PEG-400 为助乳化剂时,自微乳体系乳化完全所需时间最短,为 21 s,遇水乳化后总体澄清,乳液无油滴与絮状物出现;而 PEG-200 作为助乳化剂时,乳液呈浑浊灰白状;甘油作为助乳化剂时乳液会出现分层现象。因此,选择 PEG-400 为助乳化剂进行后续试验。

2.3 伪三元相图

自微乳被稀释后会从 W/O 到双连续相,再到被表面活性剂膜覆盖的油滴分散在水中(O/W)的结构转变^[27]。根据 2.2 试验结果,选择 MCT、

Tween-80、PEG-400 为辅料,按 1.2.3 方法绘制伪三元相图,结果如图 1 所示,图中阴影部分是形成 A 级与 B 级自微乳的区域。

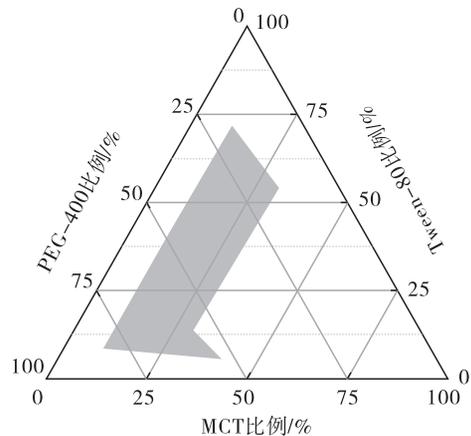


图 1 空白自微乳伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram of blank SMES

由图 1 可知,当 MCT、Tween-80 及 PEG-400 的比例分别为 10%~40%、10%~65%、15%~80% 时,能够在 20 s 内形成 A 级与 B 级自微乳,久置后未出现浑浊。当油相比例超过 40% 时,观察到自微乳形成能力差,呈深灰色和微油性外观,久置后仍有大量油滴存在。

2.4 单纯形网格法优化 DMY-SMES 配方

单纯形网格优化设计适用于组分总量一定、体系质量受变量比例而非绝对含量影响的配方优化。在自微乳中,油相、乳化剂和助乳化剂的比例对体系的理化性质有显著影响,且三组分含量的变化相互影响、相互制约。参考 2.3 其伪三元相图结果,并考虑到自微乳中乳化剂一般用量范围及单纯形网格法比例约束,以 MCT 比例(A)、Tween-80 比例(B)、PEG-400 比例(C)为自变量,以 DMY-SMES 平均粒径(Y_1)、PDI(Y_2)及载药量(Y_3)为响应变量,采用单纯形网格法对 DMY-SMES 配方进行设计及优化,单纯形网格法试验设计及结果见表 5。

回归模型的方差分析见表 6。

通过 Design Expert 软件对表 5 结果进行多元回归模型拟合得回归方程: $Y_1 = 182.57A + 15.03B + 56.94C + 257.17AB + 220.57AC - 80.37BC - 337.22ABC$ ($R^2 = 0.9975$, $R_{Adj}^2 = 0.9953$); $Y_2 = 0.24A + 0.14B + 0.2C + 0.23AB + 0.084AC - 0.15BC$ ($R^2 = 0.9708$, $R_{Adj}^2 = 0.9525$); $Y_3 = 26.78A + 29.02B + 27.34C - 42.39AB - 19.5AC - 15.01BC$ ($R^2 = 0.9925$, $R_{Adj}^2 = 0.9879$)。

表5 单纯形网格法试验设计及结果

Table 5 Experimental design and results of simplex lattice method

试验号	A MCT 比例/%	B Tween - 80 比例/%	C PEG - 400 比例/%	Y_1 /nm	Y_2	Y_3 / (mg/g)
1	30	35	35	171.80	0.242	19.77
2	10	60	30	15.76	0.151	28.47
3	40	30	30	181.13	0.229	26.42
4	10	45	45	16.76	0.129	24.55
5	10	60	30	14.89	0.134	29.59
6	25	45	30	162.23	0.244	17.46
7	15	50	35	65.42	0.186	21.27
8	10	30	60	59.50	0.188	27.91
9	40	30	30	185.43	0.245	27.16
10	25	45	30	165.96	0.244	17.27
11	20	40	40	123.35	0.219	19.32
12	25	30	45	176.59	0.236	22.31
13	15	35	50	84.25	0.188	22.32
14	10	30	60	54.66	0.207	26.79

表6 回归模型的方差分析

Table 6 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方差	F	p
平均粒径(Y_1)					
模型	59 496.92	6	9 916.15	461.36	<0.000 1
线性混合	50 799.21	2	25 399.61	1 181.74	<0.000 1
AB	5 551.54	1	5 551.54	258.29	<0.000 1
AC	2 527.20	1	2 527.20	117.58	<0.000 1
BC	335.59	1	335.59	15.61	0.005 5
ABC	123.07	1	123.07	5.73	0.048 0
残差	150.45	7	21.49		
失拟项	122.16	3	40.72	5.76	0.062 0
纯误差	28.29	4	7.07		
总变异	59 647.37	13			
PDI(Y_2)					
模型	0.02	5	4.34E-03	53.11	<0.000 1
线性混合	0.02	2	7.61E-03	93.15	<0.000 1
AB	4.81E-03	1	4.81E-03	58.83	<0.000 1
AC	4.53E-04	1	4.53E-04	5.54	0.046 4
BC	1.37E-03	1	1.37E-03	16.75	0.003 5
残差	6.54E-04	8	8.18E-05		
失拟项	2.01E-04	4	5.03E-05	0.44	0.774 6
纯误差	4.53E-04	4	1.13E-04		
总变异	0.02	13			
载药量(Y_3)					
模型	227.65	5	45.53	212.90	<0.000 1
线性混合	16.92	2	8.46	39.55	<0.000 1
AB	166.63	1	166.63	779.13	<0.000 1
AC	24.54	1	24.54	114.76	<0.000 1
BC	14.55	1	14.55	68.03	<0.000 1
残差	1.71	8	0.21		
失拟项	0.16	4	0.04	0.11	0.974 0
纯误差	1.55	4	0.39		
总变异	229.36	13			

由表6可知,3个模型 p 值均小于0.000 1,非常显著,而失拟项的 p 值均大于0.05,不显著,同时 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 3个指标回归方程的决定系数(R^2)分别为0.997 5、0.970 8、0.992 5,调整决定系数(R_{adj}^2)分别为0.995 3、0.952 5、0.987 9,均大于0.95,表明该模型拟合较好,可用于DMY-SMES配方的优化。

2.5 DMY-SMES最佳配方预测与模型验证

自微乳粒径越小、粒径分布越窄,越有利于药物溶出及吸收;而载药量越高,实际服用剂量越小,越有利于应用。综合考虑3个指标情况,限定平均粒径最小,PDI最小,载药量最大,确定最佳配方组成为MCT比例10%、Tween-80比例60%、PEG-400比例30%。根据预测的最优配方进行验证试验,结果如表7所示。

表7 最佳配方预测与验证结果($n=3$)Table 7 Prediction and verification results of optimal formula ($n=3$)

评价指标	实测值				预测 值	相对误 差/%
	试验1	试验2	试验3	平均值		
平均粒径/nm	14.59	14.39	14.40	14.46	15.03	3.94
PDI	0.105	0.161	0.147	0.138	0.143	3.62
载药量/(mg/g)	29.96	29.22	30.34	29.84	29.02	2.75

由表7可知,平均粒径、PDI和载药量的预测值与实测值的相对误差均较小,分别为3.94%、3.62%和2.75%,说明所构建数学模型预测性良好,DMY-SMES的配方优化成功。在优化配方下,制备的DMY-SMES的平均粒径为14.46 nm,PDI为0.138,载药量为29.84 mg/g,包封率可达(85.26 ± 1.33)%,表明大部分药物都能在自微乳中溶解,并能很好地包封在体系中。

2.6 DMY-SMES表征

2.6.1 形态

最佳配方所得DMY-SMES以及稀释100倍的DMY-SMES在4℃和25℃下储藏30 d的外观形态和DMY-SMES的透射电子显微镜(TEM)图分别见图2、图3。

由图2可知:DMY-SMES为浅黄色澄清液体,均一性较好,且4℃储藏30 d后其色泽更透亮;DMY-SMES经超纯水稀释后,可在水中均匀分散、乳化形成澄清透明的乳液,具有良好的稀释稳定性。

由图3可知,DMY-SMES微乳滴呈类球形,具有较小的粒径,表面光滑,无团聚现象。



注: A. 4℃ 储藏的 DMY-SMES; B. 25℃ 储藏的 DMY-SMES; C. 4℃ 储藏的稀释 100 倍的 DMY-SMES; D. 25℃ 储藏的稀释 100 倍的 DMY-SMES

Note: A. DMY-SMES stored at 4℃; B. DMY-SMES stored at 25℃; C. 100 times diluted DMY-SMES stored at 4℃; D. 100 times diluted DMY-SMES stored at 25℃

图 2 DMY-SMES 的外观形态

Fig. 2 Appearance of DMY-SMES

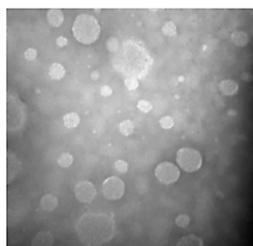
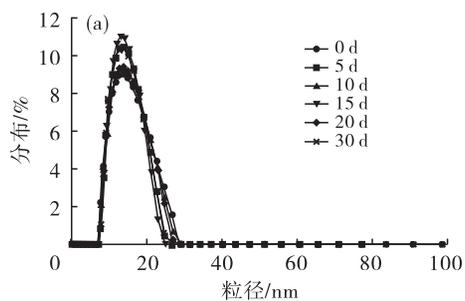


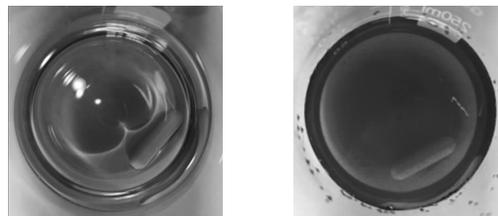
图 3 DMY-SMES 的 TEM 图(100 000 ×)

Fig. 3 TEM of DMY-SMES(100 000 ×)



2.6.2 微乳类型

DMY-SMES 类型鉴别结果如图 4 所示。



a) 亚甲基蓝染色
b) 苏丹红染色
a) Methylene blue staining
b) Sudan red staining

图 4 DMY-SMES 类型鉴别结果

Fig. 4 DMY-SMES type identification results

由图 4 可知,水溶性染料亚甲基蓝在乳液中扩散迅速,而油溶性染料苏丹红仅沉积而不扩散,表明 DMY-SMES 为 O/W 型。

2.6.3 浊点

梯度升温过程中发现:当 DMY-SMES 温度低于 60℃ 时,DMY-SMES 外观无明显变化,从澄清到微微泛蓝光;当温度达到 70℃ 时,体系出现蓝白色浑浊。因此,DMY-SMES 的浊点为 70℃。

2.6.4 稳定性

在 30 d 储藏期 and 不同介质中 DMY-SMES 的粒径分布如图 5 所示。

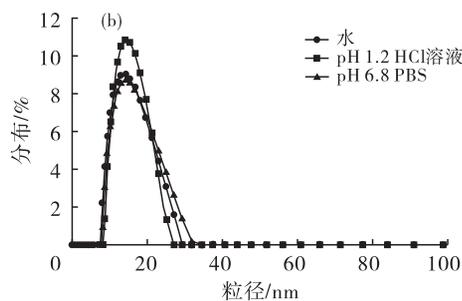


图 5 DMY-SMES 的稳定性

Fig. 5 Stability of DMY-SMES

基于脂质的载体系统在储藏期间易发生聚集、融合等现象^[28],从而影响其稳定性和功效。由图 5a 可知,在 4℃ 下储藏 30 d 后,DMY-SMES 仍然澄清透明,没有出现分层或药物析出现象,液滴粒径和分布没有观察到明显变化,表明在一般储藏期内 DMY-SMES 可以稳定地包埋 DMY,并具有良好的分散性。由图 5b 可知,DMY-SMES 不管是在水、pH 1.2 HCl 或是 pH 6.8 PBS 体系中,液滴粒径和分布均无明显变化,表明 DMY-SMES 可以在水、pH 1.2 HCl 及 pH 6.8 PBS 中保持乳滴完整。

2.6.5 体外释放

自微乳在介质中释放时,存在以不同形式溶出的药物,包括游离药物分子、纳米乳滴包埋药物和胶

束溶液负载药物^[29]。游离 DMY 和 DMY-SMES 在水、pH 1.2 HCl 和 pH 6.8 PBS 中的释放曲线如图 6 所示。

由图 6 可知,DMY-SMES 在不同介质中的释放曲线均高于游离 DMY,这与 DMY-SMES 的较小液滴粒径有关^[30]。较小的粒径可以为自微乳的释放提供更大的表面积,从而促进药物穿过胃肠黏膜移动^[31]。在 3 种介质中,DMY-SMES 可持续释放,在 8 h 左右达到最高累积溶出度,而游离 DMY 的释放曲线相对平缓,在 4 h 后几乎不再溶出。释放过程中,各组微乳液均保持澄清透明,未出现浑浊现象。与游离 DMY 相比,DMY-SMES 使 DMY 更高效地释放到介质中,虽然其在 3 种介质中均未实现

100% 溶出,但在 12 h 时 DMY-SMES 在 3 种介质中的累积溶出度在 71.34%~88.62% 之间,远高于游离 DMY 的(34.89%~45.77%),DMY-SMES 的

释放明显增强。关于速释制剂,75% 的累积释放率即可视为理想释放^[32]。因此,DMY-SMES 可以改善 DMY 的水溶性,提高 DMY 的累积释放率。

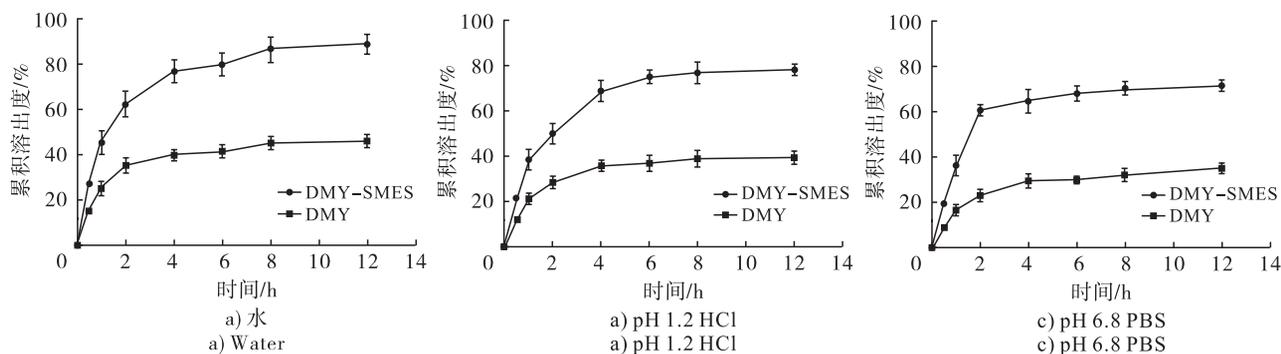


图 6 DMY-SMES 和游离 DMY 的释放曲线

Fig. 6 Release curves of DMY-SMES and free DMY

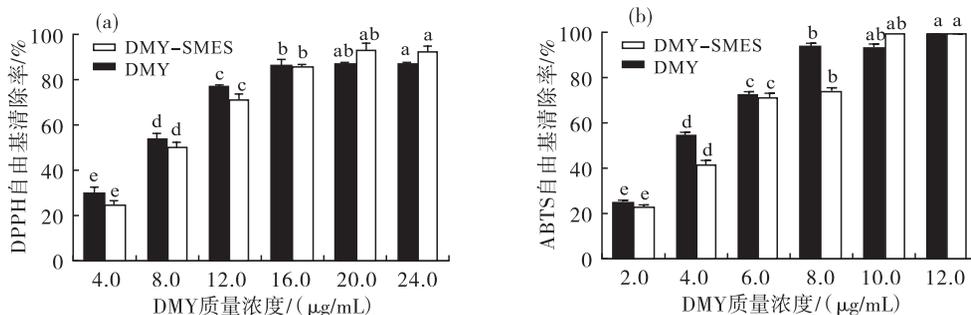
2.6.6 抗氧化活性

DMY-SMES 与游离 DMY 对 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力如图 7 所示。

由图 7a 可知,游离 DMY 在低质量浓度时相比 DMY-SMES 具有更高的 DPPH 自由基清除率,这可能是因为 DMY-SMES 自微乳将 DMY 包埋在乳滴中,缓释了其活性。当 DMY 质量浓度为 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,DMY-SMES 的 DPPH 自由基清除率(93.25%)超过了游离 DMY 的(86.96%),当 DMY 质量浓度继续增加时,DMY-SMES 与游离 DMY 对 DPPH 自由基的清除能力基本不再增加。总的来说,游离 DMY 本身具有较强的抗氧化能力^[33],而自微乳几乎不影响其抗氧化活性,且当达到一定质量

浓度时,DMY-SMES 的抗氧化活性甚至要优于游离 DMY。此外,可以发现,自微乳可以延缓所包封 DMY 的释放,从而产生持续的活性释放,增强 DMY 的吸收和利用^[34]。

由图 7b 可知,DMY-SMES 与游离 DMY 对 ABTS 自由基的清除率均随着 DMY 质量浓度的增加而增大。在 DMY 质量浓度为 2.0~8.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,游离 DMY 相对 DMY-SMES 对 ABTS 自由基表现出更好的清除能力,当 DMY 质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,DMY-SMES 的 ABTS 自由基清除率达到 99.62%,高于游离 DMY,当 DMY 质量浓度继续增加时,DMY-SMES 与游离 DMY 的 ABTS 自由基清除率差异不大,且几乎将 ABTS 自由基全部清除。



注:不同字母表示组内具有显著差异($p < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant differences within groups ($p < 0.05$)

图 7 DMY-SMES 和游离 DMY 体外抗氧化活性

Fig. 7 Antioxidant activity of DMY-SMES and free DMY *in vitro*

3 结论

本研究制备了 DMY-SMES,通过单纯形网格法优化 DMY-SMES 的配方,并对最佳配方所得 DMY-SMES 进行了表征。结果表明:DMY-SMES 最佳配方为 10% MCT、60% Tween-80 和 30% PEG-400,在最佳配方下制备的 DMY-SMES 的平

均粒径为 14.46 nm, PDI 为 0.138,载药量为 29.84 mg/g,包封率可达 85.26%。DMY-SMES 外观呈浅黄色澄清液体,微乳滴呈类球形,表面光滑,无团聚现象,为 O/W 型。稳定性研究显示,不同溶出介质对 DMY-SMES 粒径没有显著影响,DMY-SMES 在 4、25 $^{\circ}\text{C}$ 下储藏 30 d 仍具有良好的稳定性。体外

释放结果表明,DMY-SMES 在不同介质中可以有效释放,并提高 DMY 的溶解度。DMY-SMES 可以在一定质量浓度范围提高 DMY 的抗氧化活性。综上,本文研制的 DMY-SMES 是一种具有应用前景的包埋体系,可以通过稳定、有效和安全的途径改善 DMY 的水溶性,为功能食品及保健食品的开发提供思路。

参考文献:

- [1] LIU D, MAO Y, DING L, et al. Dihydromyricetin: A review on identification and quantification methods, biological activities, chemical stability, metabolism and approaches to enhance its bioavailability[J]. Trends Food Sci Technol, 2019, 91: 586-597.
- [2] 杨薇, 张驰. 二氢杨梅素在食品工业中的应用研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(12): 55-57.
- [3] 王丹彤. 二氢杨梅素微纳米载体的制备与评价[D]. 南京: 东南大学, 2019.
- [4] SHEN Y, LINDEMEYER A K, GONZALEZ C, et al. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication[J]. J Neurosci, 2012, 32(1): 390-401.
- [5] LI H, LI Q, LIU Z, et al. The versatile effects of dihydromyricetin in health [J/OL]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 1053617[2024-01-26]. <https://doi.org/10.1155/2017/1053617>.
- [6] 林淑英, 高建华, 郭清泉, 等. 二氢杨梅素的稳定性及其影响因素[J]. 食品与生物技术学报, 2004, 23(2): 17-20.
- [7] YANG F, FU C, LV L, et al. Self-microemulsifying delivery system of WPI-Dai nanocomplex mixed with nonionic surfactant and its superiority in delivering daidzein[J/OL]. Food Hydrocolloid, 2020, 108: 105952[2024-01-26]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105952>.
- [8] YI T, ZHANG J. Effects of hydrophilic carriers on structural transitions and *in vitro* properties of solid self-microemulsifying drug delivery systems [J/OL]. Pharmaceutics, 2019, 11(6): 267[2024-01-26]. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060267>.
- [9] MAHMOUD D B, SHUKR M H, BENDAS E R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems of cilostazol for oral and parenteral administration [J]. Int J Pharm, 2014, 476(1/2): 60-69.
- [10] SERMKAEW N, KETJINDA W, BOONME P, et al. Liquid and solid self-microemulsifying drug delivery systems for improving the oral bioavailability of andrographolide from a crude extract of *Andrographis paniculata* [J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 50(3/4): 459-466.
- [11] KHAN A W, KOTTA S, ANSARI S H, et al. Potentials and challenges in self-nanoemulsifying drug delivery systems[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2012, 9(10): 1305-1317.
- [12] CAO X, ZHU Q, WANG Q L, et al. Improvement of oral bioavailability and anti-tumor effect of zingerone self-microemulsion drug delivery system [J]. J Pharm Sci, 2021, 110(7): 2718-2727.
- [13] CUI J, YU B, ZHAO Y, et al. Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems [J]. Int J Pharm, 2009, 371(1/2): 148-155.
- [14] VASCONCELOS T, ARAÚJO F, LOPES C, et al. Multicomponent self nano emulsifying delivery systems of resveratrol with enhanced pharmacokinetics profile [J/OL]. Eur J Pharm Sci, 2019, 137: 105011[2024-01-26]. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105011>.
- [15] SHARMA P, SINGH S K, PANDEY N K, et al. Impact of solid carriers and spray drying on pre/post-compression properties, dissolution rate and bioavailability of solid self-nanoemulsifying drug delivery system loaded with simvastatin [J]. Powder Technol, 2018, 338: 836-846.
- [16] ZHU J, WANG Q, LI H, et al. Galangin-loaded, liver targeting liposomes: Optimization and hepatoprotective efficacy [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2018, 46: 339-347.
- [17] WANG L, YAN W, TIAN Y, et al. Self-microemulsifying drug delivery system of phillygenin: Formulation development, characterization and pharmacokinetic evaluation [J/OL]. Pharmaceutics, 2020, 12(2): 130[2024-01-26]. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020130>.
- [18] LIAO H, GAO Y, LIAN C, et al. Oral absorption and lymphatic transport of baicalein following drug-phospholipid complex incorporation in self-microemulsifying drug delivery systems [J]. Int J Nanomed, 2019, 14: 7291-7306.
- [19] CHEN Y, ZHANG H, YANG J, et al. Improved antioxidant capacity of optimization of a self-microemulsifying drug delivery system for resveratrol [J]. Molecules, 2015, 20(12): 21167-21177.
- [20] WANG Y, CHEN L, ADU-FRIMPONG M, et al. Preparation, *in vivo* and *in vitro* evaluation, and pharmacodynamic study of DMY-loaded self-microemulsifying drug delivery system [J/OL]. Eur J Lipid Sci Tech, 2021, 123(6): 369[2024-01-26]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000369>.
- [21] ZHENG D, LV C, SUN X, et al. Preparation of a

- supersaturatable self – microemulsion as drug delivery system for ellagic acid and evaluation of its antioxidant activities[J/OL]. *J Drug Deliv Sci Tech*, 2019, 53: 101209[2024 – 01 – 26]. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101209>.
- [22] SARABANDI K, JAFARI S M. Effect of chitosan coating on the properties of nanoliposomes loaded with flaxseed – peptide fractions: Stability during spray – drying[J/OL]. *Food Chem*, 2020, 310: 125951 [2024 – 01 – 26]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125951>.
- [23] TANG H, XIANG S, LI X, et al. Preparation and *in vitro* performance evaluation of resveratrol for oral self – microemulsion [J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14 (4): e0214544[2024 – 01 – 26]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214544>.
- [24] VERMA R, KAUSHIK D. Design and optimization of candesartan loaded self – nanoemulsifying drug delivery system for improving its dissolution rate and pharmacodynamic potential [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27 (1): 756 – 771.
- [25] WANG L, DONG J, CHEN J, et al. Design and optimization of a new self – nanoemulsifying drug delivery system[J]. *J Colloid Interf Sci*, 2009, 330(2): 443 – 448.
- [26] LIN L, ASGHAR S, HUANG L, et al. Preparation and evaluation of oral self – microemulsifying drug delivery system of chlorophyll [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2021, 47(6): 857 – 866.
- [27] SPERNATH A, ASERIN A, GARTI N. Fully dilutable microemulsions embedded with phospholipids and stabilized by short – chain organic acids and polyols[J]. *J Colloid Interf Sci*, 2006, 299(2): 900 – 909.
- [28] LIN L, GU Y, SUN Y, et al. Characterization of chrysanthemum essential oil triple – layer liposomes and its application against *Campylobacter jejuni* on chicken [J]. *LWT – Food Sci Technol*, 2019, 107: 16 – 24.
- [29] AVACHAT A M, PARPANI S S. Formulation and development of bicontinuous nanostructured liquid crystalline particles of efavirenz [J]. *Colloids Surf B Biointerf*, 2015, 126: 87 – 97.
- [30] OMARI – SIAW E, ZHU Y, WANG H, et al. Hypolipidemic potential of perillaldehyde – loaded self – nanoemulsifying delivery system in high – fat diet induced hyperlipidemic mice: Formulation, *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 85: 112 – 122.
- [31] BACHHAV Y G, PATRAVALE V B. SMEDDS of glyburide: Formulation, *in vitro* evaluation, and stability studies[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2009, 10(2): 482 – 487.
- [32] The United States Pharmacopoeia: USP30 – NF25 [S]. Washington DC:USP Commission, 2007.
- [33] 罗非君, 丁锦屏. 藤茶及二氢杨梅素的生物学功能研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(2): 8 – 21.
- [34] DHUMAL D M, AKAMANCHI K G. Self – microemulsifying drug delivery system for camptothecin using new bicephalous heterolipid with tertiary – amine as branching element [J]. *Int J Pharm*, 2018, 541 (1/2): 48 – 55.
-
- (上接第 68 页)
- [6] HSU M C, TUNG C Y, CHEN H E. *Omega* – 3 polyunsaturated fatty acid supplementation in prevention and treatment of maternal depression: Putative mechanism and recommendation[J]. *J Affect Disord*, 2018, 238: 47 – 61.
- [7] 周玉兰, 冀俊林, 池兴旺. 鱼油通过调节炎症反应及氧化应激改善糖尿病大鼠认知障碍[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(18): 4587 – 4589.
- [8] 刘飞, 何干, 白鍊. 鱼油脂肪乳对直肠癌患者术后免疫功能的影响[J]. *中国药业*, 2021, 30(8): 39 – 42.
- [9] 王红梅. 鱼油制剂对人体降脂作用的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [10] 黄聘和, 田嘉军, 蒋勇. 鱼油软胶囊经口灌胃对 KM 小鼠免疫功能的影响[J]. *预防医学情报杂志*, 2022, 38 (5): 718 – 721.
- [11] XIONG Z, LU W, ZHU L, et al. *Dl* – 3 – *n* – butylphthalide treatment enhances hemodynamics and ameliorates memory deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion[J/OL]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 238[2024 – 02 – 18]. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00238>.
- [12] 马永钧, 杨博. 世界海洋鱼油资源利用现状与发展趋势[J]. *中国油脂*, 2010, 35(11): 1 – 3.
- [13] 夏树华, 姜元荣, 张余权, 等. 鱼油在食品领域中的应用技术综述[J]. *食品科学*, 2012, 33(11): 299 – 302.
- [14] 田明, 王玉伟, 李瑞锋, 等. 辅酶 Q10 等 5 种原料的保健食品纳入备案制目录管理的情况分析及启示[J]. *食品科学*, 2022, 43(15): 320 – 326.
- [15] 刘汝萃, 范书琴, 张建全, 等. 鱼油软胶囊辅助改善记忆功能研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(2): 60 – 64.
- [16] 曾强, 张静姝, 刘忠慧, 等. 深海鱼油改善小鼠记忆功能的实验研究[J]. *卫生研究*, 2012, 41(3): 441 – 444.
- [17] 李晶. 鱼油制剂改善小鼠记忆作用的实验研究[J]. *食品科学*, 2004(10): 301 – 304.
- [18] 昌友权, 郑鸿雁, 王秀华, 等. 鱼油制剂改善小鼠记忆作用的研究[J]. *中国食品学报*, 2005(1): 50 – 54.
- [19] 刘淑青, 顾丰华. 东莨菪碱长期给药致小鼠学习记忆障碍模型及机制研究[J]. *医学食疗与健康*, 2021, 19(2): 1 – 6.
- [20] 钟礼云, 林健, 林蔚. 鱼油软胶囊辅助改善记忆功能研究[J]. *海峡药学*, 2019, 31(5): 21 – 23.