

# 艾纳香纳米乳的制备及质量评价

沈丽<sup>1</sup>, 宋信莉<sup>1,2,3\*</sup>, 付莉<sup>1</sup>, 万开龙<sup>1</sup>, 杨小双<sup>1</sup>, 石佳楠<sup>1</sup>, 杨胜磊<sup>1</sup>, 钱舒琪<sup>1</sup>, 陈丽<sup>1</sup>

<sup>1</sup>贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

<sup>2</sup>贵州中医药大学药用高分子材料研究中心, 贵州 贵阳

<sup>3</sup>贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年7月26日; 录用日期: 2023年8月28日; 发布日期: 2023年9月6日

## 摘要

目的: 优化艾纳香纳米乳的制备工艺, 并对其质量评价。方法: 以粒径和PDI为指标, 进行单因素考察和正交试验优化处方并制备艾纳香纳米乳, 考察其外观形态, 结构类型, pH值, 粒径, 多分散系数以及稳定性。结果: 艾纳香纳米乳的优化处方为: 吐温-80 4.00 g与正丁醇1.00 g, 艾纳香油为油相0.21 g, 艾纳香水提物溶液5.21 mL。该处方制备出的艾纳香纳米乳为浅棕色澄清透明液体, 结构为O/W型, pH值为6.69左右, 平均粒径为11.37 nm, 在微观状态下呈圆球形且分布均匀。离心后未出现破乳、分层等现象, 具有较好的稀释稳定性, 并且其在4℃环境中放置28天是相对稳定的。气相色谱法测得艾纳香纳米乳中左旋龙脑的含量为0.8487 mg/g。结论: 所制备的艾纳香纳米乳外观透明, 质量良好, 稳定性好。

## 关键词

艾纳香纳米乳, 制备工艺, 质量评价, 类风湿性关节炎

# Preparation and Quality Evaluation of *Blumea balsamifera* Nanoemulsion

Li Shen<sup>1</sup>, Xinli Song<sup>1,2,3\*</sup>, Li Fu<sup>1</sup>, Kailong Wan<sup>1</sup>, Xiaoshuang Yang<sup>1</sup>, Jianan Shi<sup>1</sup>, Shenglei Yang<sup>1</sup>, Shuqi Qian<sup>1</sup>, Li Chen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

<sup>2</sup>Guizhou University of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Polymer Materials Research Center, Guiyang Guizhou

<sup>3</sup>Guizhou Traditional Chinese Medicine Processing and Preparation Engineering Technology Research Center, Guiyang Guizhou

Received: Jul. 26<sup>th</sup>, 2023; accepted: Aug. 28<sup>th</sup>, 2023; published: Sep. 6<sup>th</sup>, 2023

\*通讯作者。

文章引用: 沈丽, 宋信莉, 付莉, 万开龙, 杨小双, 石佳楠, 杨胜磊, 钱舒琪, 陈丽. 艾纳香纳米乳的制备及质量评价[J]. 中医学, 2023, 12(9): 2511-2526. DOI: 10.12677/tcm.2023.129376

## Abstract

**Objective:** To optimize the preparation process of *Blumea balsamifera* nanoemulsion and evaluate its quality. **Methods:** Single factor investigation and orthogonal test were used to optimize the prescription and prepare *Blumea balsamifera* nanoemulsion with particle size and PDI as indexes. The appearance, structure type, pH value, particle size, polydispersity coefficient and stability were investigated. **Results:** The optimized formulation of *Blumea balsamifera* nanoemulsion was as follows: Tween-80 4.00 g and n-butanol 1.00 g, *Blumea balsamifera* oil as oil phase 0.21 g, *Blumea balsamifera* water extract solution 5.21 mL. The *Blumea balsamifera* nanoemulsion prepared by this prescription is a light brown clear transparent liquid, the structure is O/W type, the pH value is about 6.69, the average particle size is 11.37 nm, and it is spherical and evenly distributed in the microscopic state. After centrifugation, there was no demulsification and stratification, and it had good dilution stability, and it was relatively stable at 4°C for 28 days. The content of L-borneol in *Blumea balsamifera* nanoemulsion was 0.8487 mg/g by gas chromatography. **Conclusion:** The prepared *Blumea balsamifera* nanoemulsion has transparent appearance, good quality and good stability.

## Keywords

*Blumea balsamifera* Nanoemulsion, Preparation Process, Quality Evaluation, Rheumatoid Arthritis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种由身体免疫系统攻击自身关节导致的疾病,其主要特征为关节炎症状的侵袭性[1]。滑膜炎是其主要的病理变化,它可以扩散到关节软骨、韧带、肌腱和软骨下骨,导致关节软骨、骨和关节囊的破坏,最终会导致关节畸形和功能丧失[2] [3]。据调查,RA在全球的发病率为0.5%~1%,在我国的发病率为0.32%~0.36%,严重危害人类的健康[4]。现代医学主要通过药物治疗缓解和控制,RA病程缠绵难愈一般需长期用药,目前临床上治疗RA的药物有:传统抗风湿药、生物制剂及各种生物仿制药。大多数口服药物均会出现不同程度的毒副作用,如目前首选治疗RA的甲氨蝶呤,其能有效缓解RA症状,修复骨破坏,对于活动期RA、良性自限性RA和进展侵蚀性RA均能有效改善。但长期应用会引发胃肠道反应,及其他皮肤疾病,如皮肤发红、瘙痒或皮疹,甚至会引起伪膜性或出血性肠炎等症状[5] [6]。外用制剂具有众多优势,能够避免口服药物受到胃肠道分泌物和胃酸等不利因素的干扰;降低血药浓度的峰谷变化以减轻药物的不良反应;减少了给药的次数,并且病人能够独立服药,服药依从性好;用药期间若出现不良反应能随时中断使用[7]。常用的外用制剂类型主要有乳膏剂、软膏剂、贴膏剂和凝胶剂。但传统中药外用剂型存在着工艺单一、药物吸收差、不易通过皮肤角质层等问题,例如传统膏药生产时药物会与高温油发生化学反应导致药效减低等问题,尤其是某些芳香通窍的药物在温度较高时更容易挥发、破坏有效成分从而导致药效下降[8] [9]。

纳米乳(Nanoemulsion, NE)是粒径为 10~100 nm 乳滴散布于另一液体中而形成胶体分散体系,乳滴多为球形,透明或半透明。其促渗作用可改善角质层脂质双层流动性、影响皮肤毛囊透皮吸收、提高药物溶解性等,同时缓释效果好。因此,将药物制备成纳米乳能够很好的解决上述问题[10]。

艾纳香又称大风叶、大毛药、冰片艾等,是菊科(Asteraceae)艾纳香属植物艾纳香[*Blumea balsamifera* (L.) DC.]的新鲜或干燥地上部分,是苗族、布依族、黎族、傣族等少数民族的重要药材,具有消除风湿、驱除害虫的功效,可用来治疗类风湿性关节炎、疮疖痈肿、皮肤瘙痒和跌打损伤[11]。艾纳香含有大量挥发油、黄酮类成分,而主要发挥抗炎、镇痛作用的是挥发油中的左旋龙脑、(-)-芳樟醇、反式石竹烯等[12]。研究发现,挥发油及其成分在透皮吸收过程中能够打破脂质细胞的结构,使其由有序变为无序,增加细胞流动性,从而弱化皮肤对药物的屏障作用,能促进药物吸收[13]。

综上所述,基于纳米乳能解决传统外用制剂存在的问题,艾纳香挥发油促进药物吸收,本实验将两者结合,以艾纳香挥发油作为油相,艾纳香水提物作为水相,采用水转相法将其制备成纳米乳,并对其质量评价。以期丰富艾纳香中药制剂的种类,为其进一步开发提供思路及实验依据。

## 2. 仪器与试药

### 2.1. 仪器

万分之一电子天平(ME204E, 瑞士梅特公司);超声波清洗机(JOYN-10A, 上海乔跃电子有限公司);磁力加热搅拌器(D1-1A, 常州澳华仪器有限公司);粒径分析仪(DelsaMax PRO, 苏州冠卓自动化科技有限公司);离心机(H1650, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);pH计(PHS-3C, 上海仪电科学仪器股份有限公司);粒径分析仪(DelsaMax PRO, 苏州冠卓自动化科技有限公司);气相色谱仪(Trace1300, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司);色谱柱(USP579947H, 安捷伦科技有限公司)。

### 2.2. 药物与试剂

龙脑对照品(110881-201709, 成都普思生物科技股份有限公司);水杨酸甲酯(PS000861, 成都普思生物科技股份有限公司);环己烷(20211201, 重庆江川化工有限公司);艾纳香油(20221114, 江西海麟香料有限公司);吐温-80(214H011, 北京索莱宝科技有限公司);蓖麻油聚氧乙烯醚(C804845, 上海麦克林生化科技有限公司);氢化蓖麻油(E873767, 上海麦克林生化科技有限公司);正丁醇(20211101, 重庆江川化工有限公司);无水乙醇(20210120, 常熟市鸿盛精细化工有限公司);聚乙二醇-400(802A011, 北京索莱宝科技有限公司);艾纳香油(20221114, 江西海麟香料有限公司);pH标准缓冲液(20221204, 四川普西奥标物科技有限公司);亚甲基蓝(Q/12HB 3651-2010, 天津科密欧化学试剂有限公司);油红 O(808M051, 北京索莱宝科技有限公司)。

## 3. 实验方法

### 3.1. 艾纳香纳米乳的制备工艺

本实验对艾纳香纳米乳制备工艺进行优化,以粒径和多分散系数(PDI)为指标,优化处方,进行如下处方筛选和单因素考察。

#### 3.1.1. 表面活性剂和助表面活性剂的选择

在本实验中,选择了乳化效果偏好的吐温-80(Tween-80)、蓖麻油聚氧乙烯醚(EL-40)和氢化蓖麻油(PEG-60)作为表面活性剂,选择了副作用和毒性都偏小的聚乙二醇-400(PEG-400)、无水乙醇和正丁醇作为助表面活性剂。

参考袁珍珍、尹寿玉等[14]在杜香油纳米乳体外透皮吸收及药效学研究中杜香油纳米乳的制备方法,其表面活性剂与助表面活性剂的质量比为 3:1,混匀后得到 9 种表面活性剂-助表面活性剂组合,由三种表面活性剂分别与三种助表面活性剂组成。再以艾纳香挥发油为油相,将表面活性剂-助表面活性剂组合和挥发油按 8:2 的比例混合,搅拌均匀后,边震荡边加入水相进行滴定,以观察是否形成了澄清透明的纳米乳液。

### 3.1.2. 单因素考察

#### ① 乳化剂及助乳化剂比例的考察

从安全性和乳化效果的角度考虑,选择吐温-80 和正丁醇为考察对象,为了考察乳化剂及助乳化剂比例在纳米乳液体系中包埋油脂的效果,改变乳化剂及助乳化剂比例进行了一系列试验。分别制备乳化剂及助乳化剂比例为 6:1、5:1、4:1、3:1、2:1 的纳米乳,通过粒径、多分散系数作为指标考察制剂性质变化。

#### ② 艾纳香油投入量的考察

分别制备不同艾纳香油投入量(2%, 4%, 6%, 8%, 10%)的纳米乳,考察不同艾纳香油投入量对于纳米乳的影响,测出粒径及多分散系数。

#### ③ 艾纳香水提取物投入量的考察

分别制备不同艾纳香水提取物投入量(45%, 50%, 55%, 60%, 65%)的纳米乳,考察不同艾纳香水提取物投入量对于纳米乳的影响,测出粒径及多分散系数。

#### ④ 搅拌温度的考察

固定基本处方中物料的用量,分别在搅拌温度为 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃下制备纳米乳,考察搅拌温度对于纳米乳的影响,测出粒径及多分散系数。

#### ⑤ 搅拌速度的考察

固定基本处方中物料的用量,分别在搅拌速度为 240 r/min、360 r/min、480 r/min、600 r/min、720 r/min 下制备纳米乳,考察搅拌速度对于纳米乳的影响,测出粒径及多分散系数。

### 3.1.3. 正交试验优化艾纳香纳米乳处方

根据单因素试验结果,设计正交试验优化最佳处方。由于乳化剂及助乳化剂比例、艾纳香油投入量及艾纳香水提取物投入量是影响纳米乳粒径最大的三因素,故选此三种用量做正交优化实验设计。根据预实验结果对上述三因素各取三水平,按 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交设计试验表安排试验,以粒径为评价指标,以粒径均匀且粒径较小为好,优选用量,正交试验因素水平见表 1。

Table 1. Factor level table

表 1. 因素水平表

水平	A 乳化剂及助乳化剂比例	B 艾纳香油投入量	C 艾纳香水提取物投入量
1	5:1	2%	45%
2	4:1	4%	50%
3	3:1	6%	55%

### 3.1.4. 艾纳香纳米乳最佳处方工艺验证试验

根据正交试验筛选优化的最优处方工艺,平行制备三批艾纳香纳米乳,测定其粒径、PDI,评价该处方及工艺的重复性和稳定性。

## 3.2. 艾纳香纳米乳的质量评价

### 3.2.1. 外观观察

将艾纳香纳米乳置于实验台上,用肉眼观察纳米乳的外观形态,是否有絮凝、破乳、分层现象。

### 3.2.2. 结构类型鉴别

本实验采用了染色法来鉴别纳米乳的结构类型。取两份纳米乳,同时分别滴加蓝色水性染料亚甲基蓝和红色油性染料油红 O 各一滴,通过两者不同的分散速度判断纳米乳的类型,其中油红 O 分散较快时为 W/O 型,亚甲基蓝分散较快时则为 O/W 型。

### 3.2.3. pH 值测定

取适量艾纳香纳米乳,用 pH 计测试其 pH 值。

### 3.2.4. 粒径分布和多分散系数(PDI)测定

取适量艾纳香纳米乳,用水稀释 10 倍,用粒度分析仪测定其平均粒径、多分散系数(PDI)。

### 3.2.5. 微观形态观察

在透射电子显微镜下观察艾纳香纳米乳液的微观形态。

### 3.2.6. 稳定性评价

#### ① 离心稳定性

取适量艾纳香纳米乳于适宜的离心管内,4000 r/min 的转速条件下,离心 30 分钟,观察纳米乳在离心后是否出现分层、破乳等现象,重复三次实验。

#### ② 稀释稳定性

取等量的艾纳香纳米乳用水稀释至不同的倍数(10、50、100、200、400 倍)观察其外观,测定平均粒径、多分散系数(PDI),评价其稀释稳定性。

#### ③ 放置稳定性

取同一批次的艾纳香纳米乳样品,考察其在不同温度下稳定性的研究。具体如下:将艾纳香纳米乳分别放置在 4℃ 及室温条件下,于 0、7、14、21、28 天取出,观察其外观,测定平均粒径、多分散系数(PDI),评价其放置稳定性。

## 3.3. 艾纳香纳米乳中左旋龙脑的含量测定

### 3.3.1. 色谱条件

色谱柱:以聚乙二醇(PEG-20M)为固定相的毛细管柱(柱长为 30 m,内径为 0.25 mm,膜厚度为 0.5  $\mu\text{m}$ );进样口温度为 170℃;FID 检测器温度为 220℃;柱温为 100℃;进样量 1  $\mu\text{L}$ ;分流进样,分流比为 10:1;定量方法为内标法。理论塔板数按龙脑峰计算应不低于 6000。

### 3.3.2. 溶液的制备

#### ① 内标溶液的制备

精密称取水杨酸甲酯 25 mg,至 100 mL 量瓶中,加环己烷溶解并定容至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含水杨酸甲酯为 0.25 mg 的溶液,作为内标溶液。

#### ② 对照品溶液的制备

精密称取左旋龙脑对照品 1.5 mg,用内标溶液(水杨酸甲酯 0.25 mg/mL)溶解,并定容至 10 mL 量瓶中,即得左旋龙脑对照品贮备液。

### ③ 供试品溶液的制备

精密称取艾纳香样品 2.00 g 置于锥形瓶中, 精密加入内标溶液(水杨酸甲酯 0.25 mg/mL) 25mL, 称质量并密封口塞, 超声提取 30 min, 放冷, 用内标溶液补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

#### 3.3.3. 专属性实验

取缺艾纳香纳米乳按“2.3.2”项下方法制得缺艾纳香阴性对照溶液。取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液, 按选定色谱条件进行分析。

#### 3.3.4. 线性关系

精密称取龙脑对照品适量, 加环己烷制成每 1 mL 含龙脑 1.0104 mg 的对照品溶液。精密量取上述对照品溶液 0.2、0.4、1、2、4 mL 分别置 5 mL 量瓶中, 精密加入上述水杨酸甲酯内标溶液(0.25 mg/mL) 各 1 mL, 再用环己烷稀释至刻度, 摇匀, 分别进样, 测定龙脑峰面积。

#### 3.3.5. 精密度试验

精密吸取龙脑对照品溶液 1  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 记录龙脑和水杨酸甲酯的峰面积考察仪器精密度。

#### 3.3.6. 稳定性试验

取一份艾纳香纳米乳按照“2.3.2”供试品溶液的制备方法制备, 分别于 0、2、4、6、8、10 h, 进样 1  $\mu\text{L}$ , 以龙脑和水杨酸甲酯峰面积考察艾纳香纳米乳的稳定性。

#### 3.3.7. 重复性试验

平行称取 6 份同一批次的艾纳香纳米乳样品, 每份 2 g, 照“2.3.2”供试液制备方法制备供试液, 精密吸取供试液 1  $\mu\text{L}$  进样, 记录龙脑和水杨酸甲酯峰面积并计算其含量及 RSD。

#### 3.3.8. 加样回收试验

取同一批样品约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入龙脑对照品溶液(浓度 0.15 mg/mL) 2mL 与水杨酸甲酯内标溶液(浓度 0.25 mg/mL) 8mL, 混匀, 再按“2.3.2”供试品溶液制备方法制备, 记录龙脑和水杨酸甲酯峰面积并计算其加样回收率及 RSD。

#### 3.3.9. 含量测定

取样品三份, 每份约 2 g, 按“2.3.2”供试品溶液制备方法制备和“2.3.1”项下色谱条件测定, 计算三份样品中龙脑含量。

## 4. 结果

### 4.1. 艾纳香纳米乳的制备

#### 4.1.1. 表面活性剂和助表面活性剂的选择结果

Table 2. Formation of *Blumea balsam* oil nanoemulsion

表 2. 艾纳香油纳米乳形成情况

表面活性剂/助表面活性剂组合	外观性状
Tween-80/正丁醇	浅棕色溶液, 澄清透明
Tween-80/PEG-400	乳棕色溶液, 浑浊
Tween-80/无水乙醇	浅棕色溶液, 澄清透明性略差

Continued

PEG-60/正丁醇	浅棕色溶液，澄清透明性略差
PEG-60/PEG-400	乳棕色溶液，浑浊
PEG-60/无水乙醇	乳棕色溶液，澄清透明性差
EL-40/正丁醇	浅棕色溶液，澄清透明性略差
EL-40/PEG-400	乳棕色溶液，浑浊
EL-40/无水乙醇	乳棕色溶液，澄清透明性差

观察表 2 可见在三种表面活性剂 Tween-80、PEG-60、EL-40 中，Tween-80 形成的纳米乳性状优于 PEG-60 和 EL-40。而在三种助表面活性剂正丁醇、PEG-400、无水乙醇中，Tween-80 与正丁醇组合形成的纳米乳优于 PEG-400 和无水乙醇。因此选择 Tween-80 与正丁醇作为纳米乳的表面活性剂与助表面活性剂。

#### 4.1.2. 单因素考察结果

##### ① 乳化剂及助乳化剂比例的考察结果

乳化剂及助乳化剂比例对艾纳香纳米乳的影响见表 3，结果表明随着体系中表面活性剂及助表面活性剂比例的增加，纳米乳的粒径越小，当表面活性剂及助表面活性剂比例为 4:1 时，粒径较小且 PDI 最小，表明此时乳液最稳定。

**Table 3.** The investigation results of the proportion of surfactants and cosurfactants

**表 3.** 表面活性剂及助表面活性剂比例的考察结果

乳化剂：助乳化剂	6:1	5:1	4:1	3:1	2:1
粒径/nm	12.72	13.32	13.70	14.56	17.66
PDI	0.23	0.19	0.18	0.20	0.26

##### ② 艾纳香油投入量的考察结果

由表 4 可看出随着体系中艾纳香油投入量的增加，纳米乳的粒径越大。当精油投入量为 4% 时，粒径较小且 PDI 最小，表明此时乳剂最稳定。

**Table 4.** Investigation results of the amount of *Blumea balsam* input

**表 4.** 艾纳香投入量的考察结果

艾纳香油投入量	2%	4%	6%	8%	10%
粒径/nm	11.64	12.16	13.92	118.44	静置分层
PDI	0.25	0.19	0.22	-	-

##### ③ 艾纳香水提物投入量的考察结果

投入量结果如表 5 显示，当艾纳香水提物投入量为 50% 时，粒径最小且 PDI 最小。表明此时乳剂最稳定。

##### ④ 搅拌温度的考察结果

搅拌温度结果如表 6 显示，当搅拌温度为 25℃ 时，纳米乳的粒径和 PDI 最小，表明在该搅拌温度下形成的纳米乳最稳定。

**Table 5.** Investigation results of the amount of *Blumea balsam* input**表 5.** 艾纳香投入量的考察结果

艾纳香水提物投入量	45%	50%	55%	60%	65%
粒径/nm	14.00	11.60	12.10	12.18	12.44
PDI	0.23	0.15	0.20	0.20	0.21

**Table 6.** Investigation results of stirring temperature**表 6.** 搅拌温度的考察结果

搅拌温度	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
粒径/nm	12.70	11.80	13.06	13.30	13.52
PDI	0.23	0.21	0.23	0.25	0.28

### ⑤ 搅拌速度的考察结果

搅拌速度结果如表 7 显示, 当搅拌速度为 480 r/min 时, 纳米乳的粒径和 PDI 最小, 表明在该搅拌速度下形成的纳米乳最稳定。

**Table 7.** County level planning schedule**表 7.** 县域等级规划一览表

搅拌速度	240 r/min	360 r/min	480 r/min	600 r/min	720 r/min
粒径/nm	12.82	12.14	11.88	12.56	12.82
PDI	0.23	0.22	0.20	0.23	0.23

### 4.1.3. 艾纳香纳米乳处方优化结果

根据单因素考察结果设置 3 因素 3 水平正交表进行正交试验, 以粒径和 PDI 为评价指标, PDI 值越小表明纳米乳分散越均匀稳定。对正交试验结果进行直观分析(表 8)可知, 3 个因素中对于艾纳香纳米乳影响程度的大小顺序为艾纳香油投入量 > 艾纳香水提物投入量 > 表面活性剂及助表面活性剂比例。艾纳香油投入量对艾纳香纳米乳粒径具有显著性影响( $P < 0.05$ ), 结果见表 9。根据分析结果可知, 筛选出的艾纳香纳米乳最佳处方为艾纳香油 0.21 g, 艾纳香水提物 5.21 g, 吐温 80 4.00 g, 正丁醇 1.00 g。

**Table 8.** Orthogonal test results**表 8.** 正交试验结果

序号	因素				粒径/nm	PDI
	A 艾纳香油投入量	B 表面活性剂及 助表面活性剂比例	C 艾纳香水提物 投入量	D 空白		
1	1	1	1	1	11.67	0.21
2	1	2	2	2	11.02	0.19
3	1	3	3	3	11.70	0.23
4	2	1	2	3	11.66	0.19
5	2	2	3	1	12.44	0.22
6	2	3	1	2	11.91	0.22



Continued

7	3	1	3	2	13.06	0.23
8	3	2	1	3	12.68	0.23
9	3	3	2	1	13.06	0.23
K <sub>1</sub>	34.39	36.39	36.26			
K <sub>2</sub>	36.01	36.14	35.74			
K <sub>3</sub>	38.80	36.67	37.20			
k <sub>1</sub>	11.46	12.13	12.09			
k <sub>2</sub>	12.00	12.05	11.91			
k <sub>3</sub>	12.93	12.22	12.40			
R 极差	1.47	0.17	0.49			
最优组合	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>					

Table 9. Analysis of variance table

表 9. 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	3.317	2	1.659	70.784	P < 0.05
B	0.046	2	0.023	1.000	
C	0.365	2	0.183	7.789	
误差	0.297	2	0.148		

#### 4.1.4. 最佳制备工艺验证结果

称取适量的干燥的艾纳香叶，粉碎，过筛，提取溶剂为水，料液比为 1:30，超声提取 30 分钟，即得艾纳香水提物，备用。称取吐温-80 4.00 g，正丁醇 1.00 g，艾纳香油 0.21 g，置于烧杯中，在 25℃ 下磁力搅拌器以 480 r/min 的转速搅拌 10 min，另称取 5.21 mL 艾纳香水提物溶液，缓慢加入正在搅拌的烧杯中，使油水两相混合均匀，即得艾纳香纳米乳。

按照最佳处方，平行制备三份艾纳香纳米乳，测出粒径，结果见表 10。

Table 10. Optimal prescription particle size results table

表 10. 最佳处方粒径结果表

试验号	粒径/nm	平均粒径/nm
1	11.36	11.37
2	11.52	
3	11.24	

## 4.2. 艾纳香纳米乳的质量评价结果

### 4.2.1. 外观

艾纳香纳米乳为浅棕色溶液，澄清度较好，肉眼未观察到不溶性物质。

### 4.2.2. 结构类型

如图 1 所示，艾纳香纳米乳在水性染料亚甲基蓝中的扩散速度更快，因此该纳米乳为水包油(O/W)型。



**Figure 1.** Staining method to determine the structure of nanoemulsion  
**图 1.** 染色法判断纳米乳结构

#### 4.2.3. pH 值

结果如表 11 显示, 该实验制备的艾纳香纳米乳的 pH 值为 6.69, 性质相对安全、温和。

**Table 11.** pH value results table

**表 11.** pH 值结果表

试验号	pH 值	平均 pH 值
1	6.68	6.69
2	6.70	
3	6.69	

#### 4.2.4. 纳米乳粒径与多分散系数(PDI)

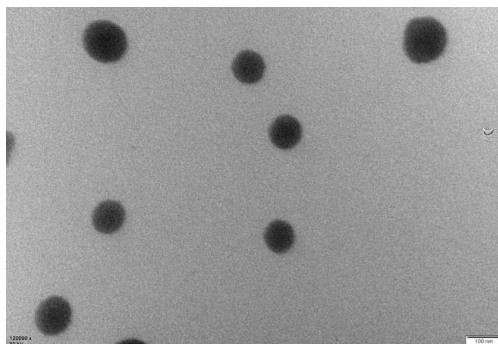
本实验采用贝克曼粒径仪测定纳米乳的粒径、多分散系数(PDI), 结果如表 12 所示, 纳米乳的平均粒径为 11.37 nm, 多分散系数为 0.23, 质量良好。

**Table 12.** Results of particle size and polydispersity coefficient

**表 12.** 粒径与多分散系数结果

试验号	粒径/nm	平均粒径/nm	PDI
1	11.36	11.37	0.23
2	11.52		
3	11.24		

#### 4.2.5. 微观形态



**Figure 2.** Transmission electron microscopy of *Blumea balsamifera* nanoemulsion  
**图 2.** 艾纳香纳米乳的透射电镜图

由图 2 可知, 艾纳香纳米乳在 100 nm 以内, 微观状态下呈圆球形, 大小均一, 分布均匀, 状态良好。

#### 4.2.6. 稳定性评价

##### ① 离心稳定性

艾纳香纳米乳在 4000 r/min 的转速下离心 30 分钟后, 纳米乳体系未出现破乳、絮凝、分层等现象, 颜色维持不变。

##### ② 稀释稳定性

结果表明, 艾纳香纳米乳的外观依旧保持稳定, 且呈浅棕色, 未出现分层、絮凝和沉淀等现象; 如表 13 与图 3 所示, 粒径保持在 100 nm 以内, PDI 在 0.3 以内, 都在允许范围内, 因此具有较好的稀释稳定性。

Table 13. Dilution stability of *Blumea balsamifera* nanoemulsion

表 13. 艾纳香纳米乳的稀释稳定性

稀释倍数	粒径/nm	PDI
10	11.35	0.23
50	12.60	0.20
100	13.12	0.23
200	13.30	0.23
400	13.50	0.24

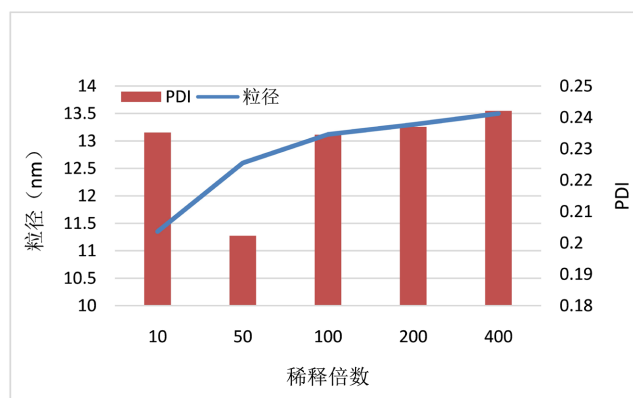


Figure 3. Dilution stability of *Blumea balsamifera* nanoemulsion

图 3. 艾纳香纳米乳的稀释稳定性

##### ③ 放置稳定性

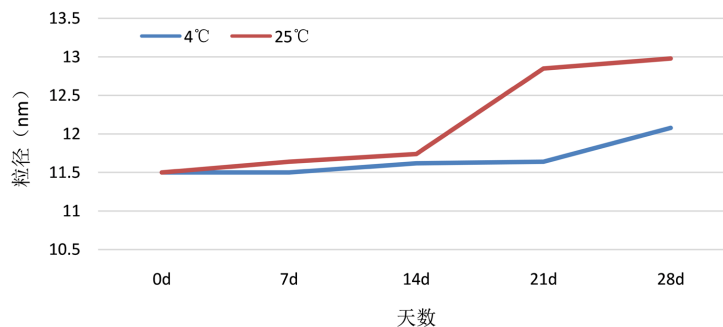
Table 14. Effects of different storage temperatures on the appearance of *Blumea balsamifera* nanoemulsion

表 14. 不同的放置温度对艾纳香纳米乳外观的影响

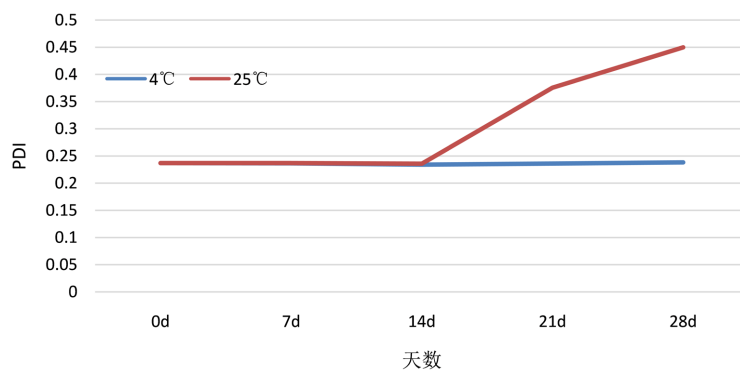
外观	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
4°C	澄清透明的浅棕色溶液				
25°C	澄清透明的浅棕色溶液			稍微浑浊	

由表 14、图 4 和图 5 可知, 在 4°C 下, 艾纳香纳米乳 28 天内都呈现浅棕色透明液体, 未发生变化, 而其平均粒径略有增加趋势, 但 PDI 变化不明显; 但在 25°C 下的纳米乳在第 28 天观察发现其变得稍微

浑浊, 并且从第 14 天后其平均粒径和 PDI 都有较大的变化, 说明温度是能够对艾纳香纳米乳的放置稳定性产生一定影响的, 艾纳香纳米乳在 4℃ 环境中放置 28 天是相对稳定的。因此, 维持纳米乳系统的放置稳定性应该冷藏贮存。



**Figure 4.** Changes in particle size of *Blumea balsamifera* nanoemulsion at different storage temperatures  
**图 4.** 不同放置温度下艾纳香纳米乳的粒径变化

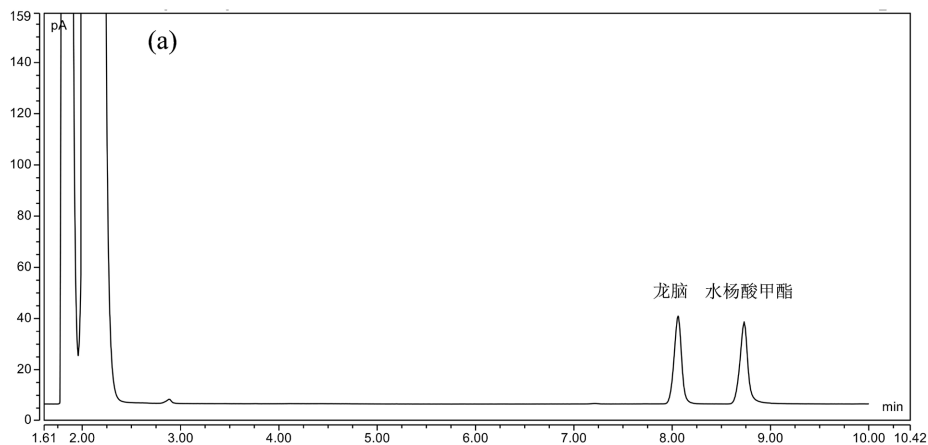


**Figure 5.** PDI changes of *Blumea balsamifera* nanoemulsion at different storage temperatures  
**图 5.** 不同放置温度下艾纳香纳米乳的 PDI 变化

### 4.3. 艾纳香纳米乳中左旋龙脑的含量

#### 4.3.1. 专属性实验

专属性结果如图 6 所示, 实验结果表明缺艾纳香阴性对照的色谱图中无干扰峰, 表明该方法专属性好。



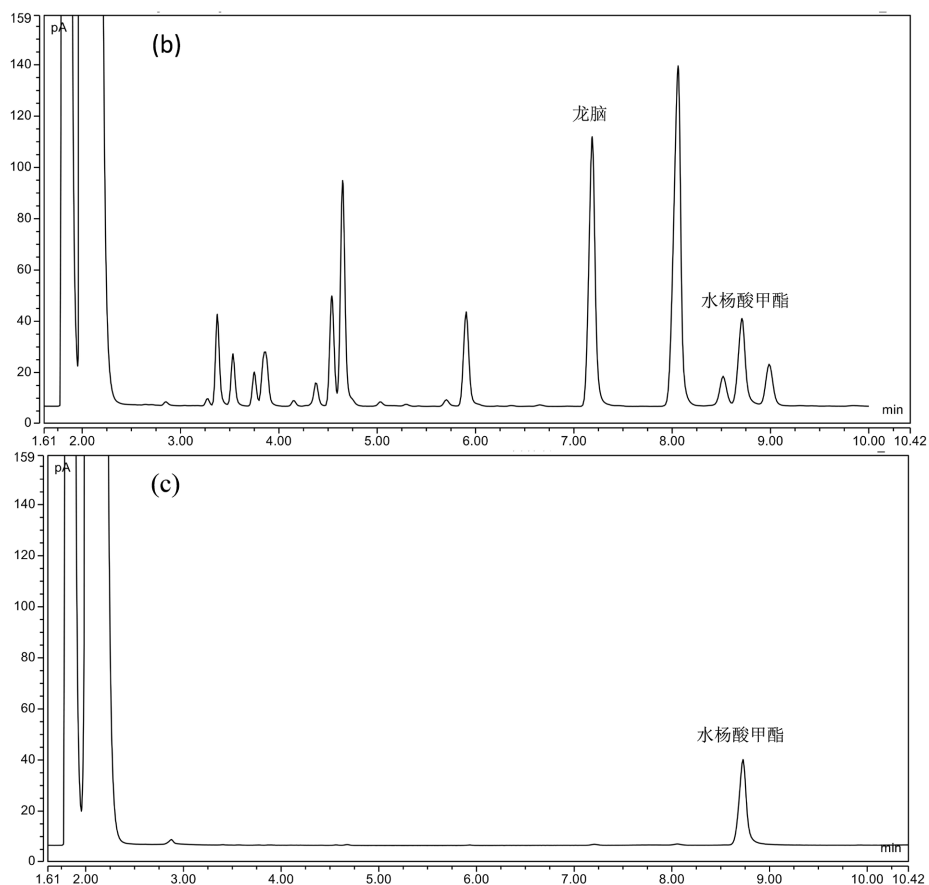


Figure 6. GC chromatograms of reference substance (a), sample (b) and methyl salicylate negative control (c)  
 图6. 对照品(a)、样品(b)、水杨酸甲酯阴性对照(c)的 GC 色谱图

#### 4.3.2. 线性关系

以龙脑对照品溶液浓度为横坐标, 以对照品与内标的峰面积比值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程:  $y = 29.12x + 0.3743$ ,  $R^2 = 0.9996$ 。结果表明龙脑在 0.040416~0.80832 mg/mL 之间呈良好的线性关系(图 7)。

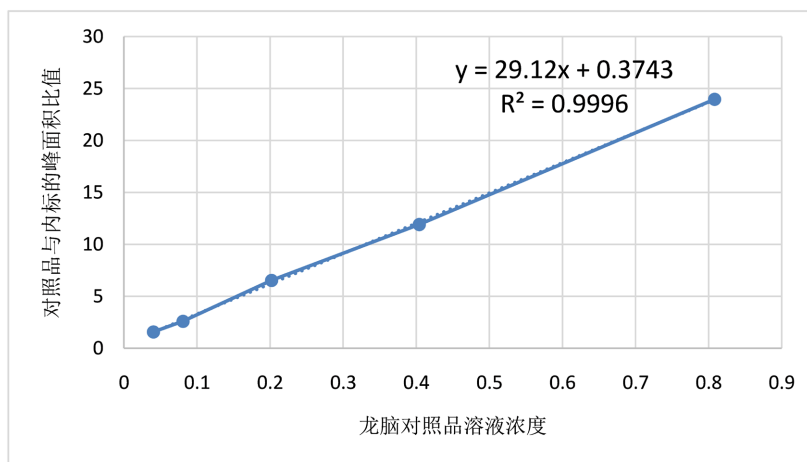


Figure 7. Standard curve  
 图7. 标准曲线

#### 4.3.3. 精密度试验

精密度实验结果见表 15，其 RSD 为 1.25%，说明仪器有着良好的精密度。

Table 15. Precision test results

表 15. 精密度试验结果

序号	龙脑峰面积	水杨酸甲酯峰面积	RSD
1	2.2916	3.1324	1.25%
2	2.9192	3.2140	
3	2.9994	3.2575	
4	3.0648	3.3244	
5	3.0115	3.2743	
6	2.9989	3.2044	

#### 4.3.4. 稳定性试验

稳定性试验结果见表 16，其 RSD 为 2.09%，表明艾纳香纳米乳在 10 h 内稳定。

Table 16. Stability test results

表 16. 稳定性试验结果

进样时间/h	龙脑峰面积	水杨酸甲酯峰面积	RSD
0	9.9566	3.3440	2.09%
2	9.9518	3.2952	
4	9.9099	3.2537	
6	9.7477	3.2322	
8	9.6255	3.0836	
10	9.3863	3.0187	

#### 4.3.5. 重复性试验

重复性试验结果见表 17，其 RSD 为 1.06%，表明本方法有着良好的重复性。

Table 17. Repeatability test results

表 17. 重复性试验结果

序号	龙脑峰面积	水杨酸甲酯峰面积	RSD
1	8.2752	3.5060	1.06%
2	8.4739	3.6470	
3	8.3340	3.5162	
4	8.5247	3.6149	
5	8.5535	3.5946	
6	8.4144	3.6020	

#### 4.3.6. 加样回收试验

加样回收试验结果见表 18，平均加样回收率为 96.14%，RSD 为 0.70%，结果符合要求。

Table 18. Results of sample recovery test

表 18. 加样回收试验结果

序号	取样量/g	样品中量/mg	龙脑加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.206	0.1751	0.3240	0.4938	96.96	96.14	0.70
2	0.210	0.1785	0.3240	0.4939	95.15		
3	0.204	0.1734	0.3302	0.4965	95.88		
4	0.216	0.1836	0.3302	0.5060	95.77		
5	0.238	0.2023	0.3222	0.5170	96.32		
6	0.244	0.2074	0.3222	0.5228	96.74		

#### 4.3.7. 含量测定

样品含量测定结果见表 19。

Table 19. Content determination results

表 19. 含量测定结果

序号	龙脑峰面积	水杨酸甲酯峰面积	龙脑含量(mg/g)	平均含量(mg/g)
1	8.2752	3.5060	0.8525	0.8487
2	8.5247	3.6149	0.8516	
3	8.4144	3.6020	0.8421	

## 5. 结论

艾纳香是贵州苗药之一，有悠久的历史，中药艾片及民族药艾纳香油也源于艾纳香。艾纳香含有多种化学成分，包括挥发油、黄酮类、倍半萜类、苯丙素等，具有抗菌、抗炎、镇痛、抗癌，抗氧化等多种药理活性，目前已被加工成多种产品，其加工品具有不同疗效[15]。挥发油是艾纳香主要成分之一，是其独特的芳香气味来源，也使具有治疗烫伤的作用，在化妆品界被广泛使用，创造了不少的社会经济效益[16]。此外，研究表明艾纳香挥发油具有较好的抗炎止痛的功效，能有效抑制细胞炎症因子如白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 6 和炎症介质前列腺素 E<sub>2</sub>、白三烯 B<sub>4</sub>、一氧化氮的释放和表达[17][18]。因此，充分发挥艾纳香挥发油抗炎的作用对于促进其开发利用有一定意义。

纳米乳作为一种新剂型，经皮给药可以延缓药物释放、提高药物透皮速率，提高生物利用度，作为按摩介质十分合适。使用具有抗炎镇痛的民族药艾纳香的纳米乳作为介质治疗类风湿性关节炎，其毒副作用低，疗效好，具有广阔的市场前景，值得深入研究。

因此，本实验从艾纳香的抗炎活性成分出发，将其制备为纳米乳，作为介质，从而治疗类风湿性关节炎。本实验设计了诸多单因素考察和三因素三水平正交试验以优化处方，确定艾纳香纳米乳最佳处方为：吐温-80 4.00 g，正丁醇 1.00 g，艾纳香油 0.21 g，艾纳香水提溶液 5.21 mL。所制备的艾纳香纳米乳为浅棕色澄清透明液体，结构为 O/W 型，pH 值为 6.69 左右，平均粒径为 11.37 nm，分散指数为 0.23，在微观状态下呈圆球形且分布均匀。离心后未出现破乳、分层等现象，具有较好的稀释稳定性，并且其

在 4℃环境中放置 28 天是相对稳定的, 因此结果表明该艾纳香纳米乳质量良好。利用气相色谱法测定艾纳香纳米乳中左旋龙脑的含量, 在 0.040416~0.80832 mg/mL 之间呈良好的线性关系, 精密度, 稳定性, 重复性, 加样回收率等符合相关要求, 最后测得艾纳香纳米乳中左旋龙脑的含量为 0.8487 mg/g。

本实验以艾纳香油为油相, 艾纳香水提溶液为水相制备的艾纳香纳米乳外观透明, 质量良好, 稳定性好。但只对其中左旋龙脑进行含量测定, 后续研究可从其他抗炎成分出发进行研究, 同时也可从体外透皮, 体内药效等方面进行研究, 有利于促进其开发。

## 基金项目

1. 国家自然科学基金, 项目编号: 82260770; 2. 贵州省特色功能食品与中药制剂开发攻关大平台黔教合, 项目编号: KY 字[2020]006; 3. 贵州中医药大学药用高分子材料研究中心, 项目编号: 贵中医党办发[2019]70; 4. 贵州中医药大学博士启动基金, 项目编号: 贵中医博士启动[2021]14; 5. 贵州省国内一流学科建设项目, 项目编号: GNYL[2017]008; 6. 贵州省药物新剂型新工艺科技创新人才团队项目, 项目编号: 黔科合平台人才[2017]5655。

## 参考文献

- [1] Urman, A., Taklalsingh, N., Sorrento, C., *et al.* (2018) Inflammation beyond the Joints: Rheumatoid Arthritis and Cardiovascular Disease. *SciFed Journal of Cardiology*, **2**, Article ID: 1000019.
- [2] Small, A. and Wechalekar, M.D. (2020) Synovial Biopsies in Inflammatory Arthritis: Precision Medicine in Rheumatoid Arthritis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **20**, 315-325. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1707671>
- [3] Emese, B., Monika, B., Ursula, F., *et al.* (2019) Angiogenesis in Inflammatory Arthritis. *The Israel Medical Association Journal*, **5**, 345-352.
- [4] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4): 265-270.
- [5] 胡晓敏, 宗英, 余珊珊, 等. 类风湿关节炎治疗药物的研发进展及趋势[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(1): 36-43.
- [6] Giles, J.L., Polak, O.J. and Landon, J. (2020) Disease Modifying Drugs for Rheumatological Diseases: A Brief History of Everything. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, **120**, 313-348. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.11.007>
- [7] 李彩霞, 王雪纯, 余喻先, 等. 中药新型外用制剂的研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 372-377.
- [8] 苗明三, 刘浩哲, 彭孟凡, 等. 中药外用的现状、存在问题及未来发展思考[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(11): 961-969.
- [9] 贺葵邦, 李晓芳, 白菊, 等. 2020 年版《中国药典》一部中药外用制剂分析[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2645-2650.
- [10] 廖艳梅, 李小芳, 刘罗娜, 等. 纳米乳液在中药制剂领域的研究进展[J]. 中药与临床, 2019, 10(Z1): 50-56.
- [11] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第五十八卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 19.
- [12] 范东生, 李玲, 王可可, 胡玉洁, 黄健, 周婵媛, 阮婧华, 张文龙. 艾纳香化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(10): 1274-1280.
- [13] 张建林, 陶玲, 管咏梅, 等. 中药挥发油的促透皮吸收作用及在外用制剂研究中的问题分析[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5263-5269.
- [14] 袁珍珍, 尹寿玉, 金勇. 杜香油纳米乳的制备及其质量评价[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(3): 620-622.
- [15] 范东生, 李玲, 王可可, 等. 艾纳香化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(10): 1274-1280.
- [16] 范佐旺, 王丹, 庞玉新, 等. 艾纳香油对大鼠深 II 度烫伤的治疗研究[J]. 中医药信息, 2014, 31(6): 93-96.
- [17] 罗世兰, 廖利, 宾雪英, 等. 民族药艾纳香的药理活性研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(3): 191, 194.
- [18] 王万林, 高月, 廖加美, 等. 艾纳香油对 NF- $\kappa$ B 及 Nrf2/HO-1 信号通路的作用研究[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(4): 976-986.