

复方蜂胶纳米乳的制备及其品质评价*

张 旭, 欧阳五庆*, 陈建民, 胡 帅

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 制备复方蜂胶纳米乳并进行品质评价。利用伪三元相图法优选处方, 以 RH-40、无水乙醇、乙酸乙酯、蜂胶和黄芪多糖为原料制备复方蜂胶纳米乳, 并考察其结构类型、形态粒径、黏度、稳定性。结果表明: 复方蜂胶纳米乳透射电镜下呈球形, 平均粒径为 12.70 nm, 粒径分布均匀, 黏度 2 s(每垂直流出 0.4 mL 所需时间)。影响因素试验显示其品质稳定。复方蜂胶纳米乳制备工艺简单、稳定性好、黏度低, 有望成为疫苗佐剂的新型制剂。

关键词: 蜂胶; 黄芪多糖; 纳米乳; 伪三元相图; 品质评价

中图分类号: R944.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2010)05-0024-04

Preparation and Quality Evaluation of
Compound Propolis Nanoemulsion

ZHANG Xu, OUYANG Wuqing*, CHEN Jianmin and HU Shuai

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The Compound Propolis Nanoemulsion(CPN) was prepared and its quality was evaluated. Optimized formula of CPN was produced with the method of the pseudoternary phase diagrams. RH-40, absolute alcohol, ethyl acetate, propolis, astragalus polysaccharides and distilled water were selected to prepare CPN. Its structural type, appearance, particle size, viscosity, and physical stability were tested respectively. CPN presented as spherical drops with uniform size distribution and mean diameter of 12.70 nm in the observation of the transmission electron microscope (TEM) and Nicomp388/Zeta PALS. The viscosity of CPN was 2 s • 0.4 mL⁻¹ and good physical stability was proved by influencing factors experiment. The Compound Propolis nanoemulsion is a promising vaccine adjuvant for its simple preparation procedure, good stability, and low viscosity.

Key words: Propolis; Astragalus polysaccharides; Nanoemulsion; Pseudoternary phase diagrams; Quality evaluation

目前市售的常规佐剂灭活疫苗普遍存在免疫原性差、稳定性差、黏度高等缺点, 严重影响了畜禽疫病的预防。因此, 研制高效、安全稳定的新型佐剂具有重要的现实意义。近年来, 纳米技术在疫苗佐剂中的应用越来越受到重视。佐剂材料经过纳米化, 能够携带远大于常规免疫佐剂量的免疫活性物质, 易于被抗原提呈细胞摄取, 有效地增

强了免疫效应, 降低刺激性; 同时纳米佐剂可以改良常规佐剂的缺点, 提高疫苗的稳定性和安全性, 降低疫苗的黏度^[1-3]。

经大量试验证明, 蜂胶和黄芪多糖是两种效果显著的免疫增强剂^[4-5]。本研究借助纳米技术制备复方蜂胶纳米乳佐剂并对其进行品质评价, 旨在改善常规疫苗佐剂存在的问题, 增强疫苗的

* 收稿日期: 2009-08-12 修回日期: 2009-12-20

基金项目: 陕西省科技攻关项目(2008k02-01)。

作者简介: 张 旭, 女, 在读硕士, 主要从事纳米疫苗佐剂的研究。E-mail: selfroom@126.com

* 通讯作者: 欧阳五庆, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米药理学、细胞生物学研究。E-mail: oywq506@sina.com

免疫原性,提供一种疫苗佐剂的新剂型。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

提纯蜂胶(河南长葛长生园蜂业有限公司);黄芪多糖(四川罗乐动物药业有限公司);蓖麻油聚氧乙烯醚(EL-40,天津市浩元精细化工有限公司);聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40,德国 BASF 公司);Tween 80(天津市登峰化学试剂厂);肉豆蔻酸异丙酯(IPM,浙江物美化学品有限公司);液体石蜡(天津天大化学试剂厂);无水乙醇、1,2-丙二醇、1,3-丁二醇(均为分析纯,西安化学试剂厂);苏丹红Ⅲ(上海试剂三厂);亚甲基蓝(天津市福晨化学试剂厂)。

EB-280 型电子天平(日本 shimadzu 公司);JME-1230 透射电镜(日本 JEOL 公司);Zetasizer Nano ZS 型激光粒度分析仪(英国 Malvern Instrument 公司);TGL-16B 型高速离心机(湖南星科科学仪器有限公司)。

1.2 处方筛选

1.2.1 油相和表面活性剂的筛选 通过考察蜂胶在乙酸乙酯、液体石蜡、IPM 中的溶解性,筛选出适合本体系的油相。预试验发现,加入表面活性剂后,纳米乳的载药量有所提高。给筛选的油相中分别加入无水乙醇、1,2-丙二醇、1,3-丁二醇 3 种表面活性剂,考察三者对纳米乳形成的影响。

1.2.2 表面活性剂的筛选 固定 K_m 为 2:1,选择纳米乳常用的 3 种非离子表面活性剂:RH-40、EL-40、Tween 80,根据筛选出的油相、表面活性剂,绘制伪三元相图,筛选出最佳表面活性剂。

1.2.3 K_m 值的筛选 将表面活性剂与助表面活性剂按 3:1、2:1、1:1(以上均为质量比)的比例混匀,作为混合表面活性剂,根据“1.2.1”、“1.2.2”的筛选结果,绘制伪三元相图,筛选出最佳 K_m 。

1.2.4 伪三元相图的绘制^[6] 将确定的表面活性剂和油相分别按质量比 9:1、8.5:1.5、8:2、7.5:2.5、7:3、6:4、5:5、4:6 混匀,准确称取后置烧杯中。25℃恒温下,搅拌同时逐滴加入蒸馏水,当体系澄清透明、黏度突然降低时,记录恰好形成 O/W 型纳米乳时的临界点水量,并计算体系中各成分的质量百分比。利用 Origin Pro 7.5 软件,按油、水、混合表面活性剂在临界点的质

量分数绘制的曲线,确定纳米乳的乳区。

1.2.5 复方蜂胶纳米乳处方确定及其制备 根据配方初步筛选结果,采用转相乳化法制备复方蜂胶纳米乳。具体制备方法:室温条件下,先将蜂胶完全溶于助表面活性剂,并加入表面活性剂和油相混匀,逐滴加入黄芪多糖水溶液,其间不断搅拌,直至形成均匀透明的体系,即复方蜂胶纳米乳。

1.3 复方蜂胶纳米乳品质评价

1.3.1 复方蜂胶纳米乳结构类型的鉴别 纳米乳的鉴别采用离心法^[7],将制备的纳米乳 4 000 r/min 离心 20 min,如体系维持透明均一即判断为纳米乳。纳米乳类型的鉴别采用染色法^[8],利用红色油性染料苏丹红Ⅲ和蓝色水溶性染料亚甲基蓝在纳米乳中扩散快慢来判断,如果蓝色的扩散速度大于红色,则纳米乳为 O/W 型,反之为 W/O 型。

1.3.2 复方蜂胶纳米乳微观形态观察及其粒径分布 取复方蜂胶纳米乳 10 mL,蒸馏水稀释 5 倍,透射电镜下观察纳米乳的微观形态;激光粒度分析仪测定其平均粒径、多分散系数(Polydispersity index, PDI)和强度粒径分布。

1.3.3 复方蜂胶纳米乳黏度测定^[9] 取出 1 mL 玻璃吸管(下口内径为 1.2 mm,上口内径为 2.7 mm),在室温下分别吸取不同批次的纳米乳基质 1 mL,垂直流出 0.4 mL,以所需时间(s)表示黏度。

1.3.4 复方蜂胶纳米乳稳定性考察 将复方蜂胶纳米乳分别于高湿(92.5%)、高温(40℃)、常温及光照(4 500±500)lx 环境下进行影响因素试验,于始日、5 和 10 d 取样,考察其外观^[10];取纳米乳置离心管中,以 10 000 r/min 的速度离心 20 min,观察是否有沉淀、浑浊、分层等现象发生。

2 结果与分析

2.1 处方的筛选

2.1.1 油相和表面活性剂的筛选 筛选结果表明乙酸乙酯可以增大蜂胶的溶解度,适合做本体系的油相。乙醇与 1,2-丙二醇、1,3-丁二醇相比更易形成纳米乳,同时可以溶解蜂胶,提高蜂胶的载药量,故适宜做该体系的助表面活性剂。

2.1.2 表面活性剂的筛选 由图 1 可知,图中曲线和水相顶点围成的阴影部分即为纳米乳乳区。微乳区大小顺序为:RH-40>EL-40>Tween-80。3 种表面活性剂所形成的纳米乳体系都可以

被水稀释至顶点而保持澄明状态,但 RH-40 载蜂胶量最大。因此,选用 RH-40 为表面活性剂。

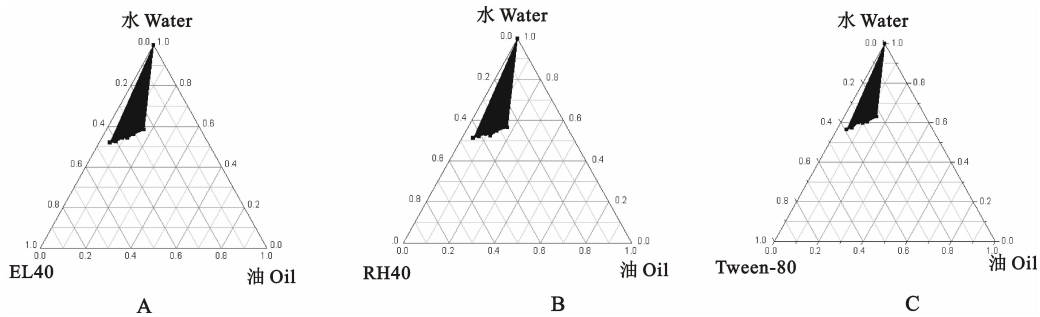


图 1 表面活性剂对纳米乳形成的影响

Fig. 1 Effect of surfactants on nanoemulsion region

2.1.3 K_m 的筛选 由图 2 可知,微乳区大小顺序为: $K_m(2:1) > K_m(1:1) > K_m(3:1)$ 。因此,确定 K_m 值为 2:1。

2.1.4 处方的确定及其制备 根据以上筛选结果,确定复方蜂胶纳米乳的处方:表面活性剂(RH-40)32%、助表面活性剂(无水乙醇)16%、油(乙酸乙酯)5.5%、蜂胶 6%、黄芪多糖 14%、去离子水至 100%(均为质量分数)。根据“1.2.5”的制备方法,该处方制备的复合蜂胶纳米乳外观呈棕黄色,透明均一,流动性良好,蜂胶和黄芪多糖的载药量可达到最高。

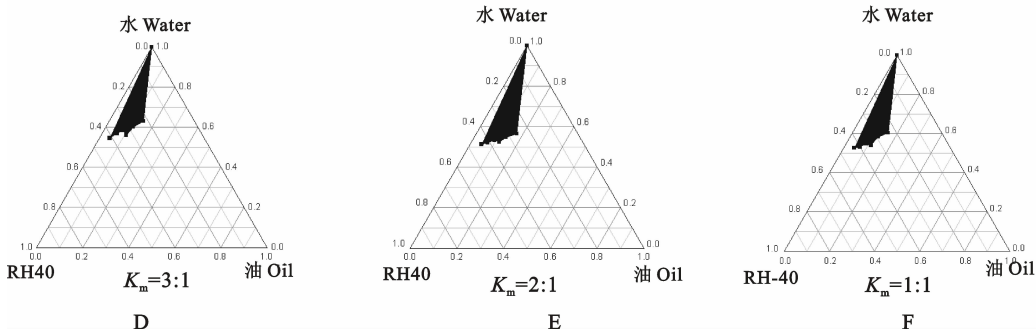


图 2 K_m 值对纳米乳形成的影响

Fig. 2 Effect of different K_m on nanoemulsion region

2.2 复方蜂胶纳米乳品质评价

2.2.1 复方蜂胶纳米乳结构类型的鉴别 结果显示,按“1.2.5”制备的复合蜂胶纳米乳,离心后仍保持澄清透明的外观,未见分层、絮凝等现象,判定该乳液为纳米乳。染色结果显示,亚甲基蓝在纳米乳中的扩散速度大于苏丹红,证明该体系为 O/W 型。

2.2.2 复方蜂胶纳米乳微观形态观察及其粒径分布 透射电镜结果显示,纳米乳的液滴呈球形,液滴大小均匀,分散性良好(图 3)。粒度分析结果表明,复合蜂胶纳米乳平均粒径为 12.70 nm;液滴大小均匀,PDI 为 0.188;粒径分布范围窄,基本呈正态分布,强度粒径分布见图 4。

2.2.3 复方蜂胶纳米乳黏度测定 0.4 mL 复方蜂胶纳米乳流出时间为 2 s,在佐剂黏度允许的范围之内(<8 s)。

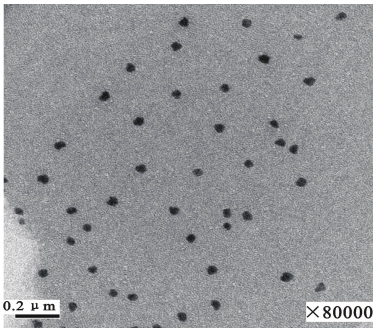


图 3 复合蜂胶纳米乳的透射电镜观察结果

Fig. 3 Transmission electron micrograph of P-APS-NE

2.2.4 复方蜂胶纳米乳稳定性考察 影响因素试验结果显示,在不同时间取样观察,复方蜂胶纳米乳外观仍保持澄清透明,该体系受温度、光照、湿度影响较小。高速离心试验后纳米乳仍保持澄清透明,未见絮状沉淀,油水分层等现象,稳定性

良好。

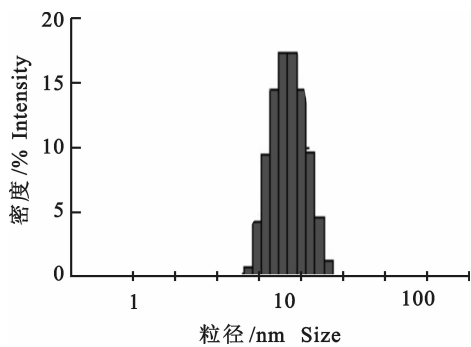


图 4 复合蜂胶纳米乳的强度粒径分布

Fig. 4 Size distribution by intensity of P-APS-NE

3 讨论

纳米乳是乳滴直径大小在纳米尺度的一种特殊乳剂。它是由油、水、表面活性剂及助表面活性剂,按适当比例混合形成的一种热力学稳定、各向同性、透明均一的分散体系^[11]。其中表面活性剂和油相的选择影响着纳米乳体系的形成、稳定性和载药量。据文献报道,纳米乳作为一种极具潜力的新型药物载体其本身即是一种免疫佐剂,能增强流感病毒疫苗的免疫力^[12];同时纳米乳具有其他药物载体不可比拟的优点:物理稳定性好;可提高难溶性药物的溶解度;促进大分子水溶性药物在体内的吸收,从而提高药物的生物利用度;易于制备、过滤和保存;黏度低,注射时不会引起疼痛^[13-14]。

本研究借助伪三元相图筛选出 RH-40 为表面活性剂,无水乙醇为助表面活性剂,乙酸乙酯为油相, K_m 值为 2:1,在该配方下形成的复合蜂胶纳米乳透明均一,体系稳定,载药量最高。这可能是由于在此质量比范围内,表面活性剂和助表面活性剂能更好地增加界面膜的流动性和形成较低的超低界面张力,故形成粒径较小、界面膜稳定的纳米乳体系。

蜂胶是一种含有多种活性成分的天然活性物质,其中酶类、醇类、脂类和酸类物质具有广泛的免疫效应。黄芪多糖是中草药黄芪中最重要的天然有效活性成分,具有促进机体免疫功能,增加白细胞和淋巴细胞数,提高淋巴细胞转化率和巨噬细胞活性,诱生干扰素等作用。根据纳米乳中不同微域的存在,将蜂胶溶于油相,黄芪多糖溶于水相,使纳米乳成为两种免疫增强剂的载体,使两种免疫增强剂起到协同增效作用,从而提高佐剂的

免疫效力。制备的复方蜂胶纳米乳为水包油型结构,可以和去离子水按任意比例稀释,黏度极低,便于注射(注射剂乳苗黏度 2~6 s 为佳)。制备的复合蜂胶纳米乳以 10 000 r/min 离心 20 min 体系依然保持稳定,符合佐剂品质标准(常规油佐剂的品质要求是 3 000 r/min 离心 15 min 不分层)。该复合纳米乳的免疫效果仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 梁存军,黎晓敏,吕凤林,等.无机纳米佐剂的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2007,20(7):543-546.
- [2] Myc A, Kukowska-Latallo J F, Bielinska A U, *et al.* Development of immune response that protects mice from viral pneumonitis after a single intranasal immunization with influenza A virus and nanoemulsion[J]. *Vaccine*, 2003, 21(25-26):3801-3814.
- [3] 张阳德. 纳米药理学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:134-138.
- [4] 于智慧,刘 涛,沈志强,等.蜂胶与蜂胶疫苗[J].现代畜牧兽医,2006(2):46-47.
- [5] 贺生中,王 涛,周建强,等.黄芪多糖的免疫作用及其兽医临床应用[J].动物科学与动物医学,2004,21(7):39-41.
- [6] 秦金森,李引乾,薛 琴,等.多潘立酮微乳的制备及质量评价[J].西北农业学报,2009,18(3):33-37.
- [7] Schechter R S, Bourrel M. Microemulsions and Related Systems[M]. New York:Marcel Dekker, 1998:1-200.
- [8] Ho HO, Hsiao C C, Sheu M T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(2):138-143.
- [9] 邢 钊,张 健,范 琳.兽医生物制品实用技术[M].北京:中国农业出版社,2000:165-166.
- [10] 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].中草药,2007,38(10):1476-1480.
- [11] Bourrel M, Schechter R S. Microemulsion and Related Systems: Formulation, Solvency and Physical Properties. Chapter 1, Surfactant Science Series [M]. New York: Plenum Press, 1988:15-25.
- [12] Myc A, Kukowska-Latallo J F, Bielinska A U, *et al.* Development of immune response that protects mice from viral pneumonitis after a single intranasal immunization with influenza A virus and nanoemulsion[J]. *Vaccine*, 2003, 21(25-26):3801-3814.
- [13] Lee J M, Park K M, Lim S J, *et al.* Microemulsion formulation of clonixic acid: solubility enhancement and pain reduction[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54(1):43-49.
- [14] Lawrence M J, Rees G D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 45(1):89-121.