

王忠娟, 李紫茵, 张秀娟, 等. 基于红松籽油辅酶 Q_{10} 纳米乳的制备、表征和药代动力学研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 225–234. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020080

WANG Zhongjuan, LI Zihan, ZHANG Xiujuan, et al. Formulation, Characterization and Pharmacokinetic Studies of *Pinus koraiensis* Nuts Oil Based Coenzyme Q_{10} Loaded Nanoemulsion[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 225–234. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020080

· 工艺技术 ·

基于红松籽油辅酶 Q_{10} 纳米乳的制备、表征和药代动力学研究

王忠娟^{1,2}, 李紫茵^{1,2}, 张秀娟^{1,2}, 刘治廷^{1,2}, 陈小强^{1,2,3,4,5,6}, 张莹^{1,2,3,4,5,*}

(1. 森林植物生态学教育部重点实验室, 东北林业大学, 黑龙江哈尔滨 150040;

2. 东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江哈尔滨 150040;

3. 东北林业大学林业生物制剂教育部工程中心, 黑龙江哈尔滨 150040;

4. 黑龙江省林源活性物质生态利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040;

5. 东北林业大学生物资源生态利用国家地方联合工程实验室, 黑龙江哈尔滨 150040;

6. 西藏农牧学院资源与环境学院, 西藏林芝 860000)

摘要: 本文以红松籽油为油相, 大豆卵磷脂为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 优化了辅酶 Q_{10} 纳米乳 (Coenzyme Q_{10} nanoemulsion, Co Q_{10} -NE) 制备工艺。研究了不同因素对 Co Q_{10} -NE 平均粒径和分散系数的影响, 通过激光粒度仪, 透射电镜, 傅立叶红外光谱, 稳定性, 体外释放行为及大鼠体内药代动力学等进行表征。结果表明, 当 Co Q_{10} 与混合表面活性剂的质量比为 3:40, Co Q_{10} 与红松籽油质量比为 1:4, 均质压力为 800 bar, 循环次数为 6 次时, 得到平均粒径为 150.30 ± 1.43 nm、分散系数为 0.234 ± 0.012 的 Co Q_{10} -NE。透射电镜形貌微观结构表明, 在 $1 \mu\text{m}$ 和 500 nm 尺寸下, Co Q_{10} -NE 呈圆形, 无粘连, 成型性好; 傅立叶红外光谱实验表明, Co Q_{10} 被完全包裹在纳米乳液中; 稳定性实验结果表明, 平均粒径和分散系数整体无显著性差异 ($P > 0.05$), Co Q_{10} -NE 稳定性良好; 体外释放实验结果表明, 在 120 min 时, Co Q_{10} -NE 累积溶释量是 Co Q_{10} 混悬液的 4.7 倍, 体外释放量显著提高。大鼠体内药代动力学实验结果表明, Co Q_{10} -NE 的最大血药浓度 C_{max} 是 Co Q_{10} 混悬液的 2.80 倍, Co Q_{10} -NE 在大鼠体内的药物浓度显著提高, Co Q_{10} -NE 的药时曲线下面积 $AUC_{0-\infty}$ 是 Co Q_{10} 混悬液的 3.25 倍, 表明 Co Q_{10} -NE 生物利用度明显提高, 吸收更好。本研究获 Co Q_{10} -NE 为探索 Co Q_{10} 新剂型的研发以及作为一种潜在的功能性成分应用到食品领域提供了理论基础。

关键词: 辅酶 Q_{10} , 红松籽油, 纳米乳, 表征, 药代动力学

中图分类号: R944.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)21-0225-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020080

本文网刊:



Formulation, Characterization and Pharmacokinetic Studies of *Pinus koraiensis* Nuts Oil Based Coenzyme Q_{10} Loaded Nanoemulsion

WANG Zhongjuan^{1,2}, LI Zihan^{1,2}, ZHANG Xiujuan^{1,2}, LIU Zhiting^{1,2}, CHEN Xiaoqiang^{1,2,3,4,5,6},
ZHANG Ying^{1,2,3,4,5,*}

(1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

3. Engineering Research Center of Forest Bio-preparation, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

收稿日期: 2022-02-14

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2020C036; LH2019C006); 西藏农牧学院林学学科创新团队建设项目 (藏财预指 2020-001); “111”计划 (B20088)。

作者简介: 王忠娟 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物活性筛选, E-mail: 1453916933@qq.com。

* 通信作者: 张莹 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: yingzhang@nefu.edu.cn。

4.Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Ecological Utilization of Forestry-based
Active Substances, Harbin 150040, China;

5.National Engineering Laboratory of BioResource EcoUtilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

6.College of Resources and Environment, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China)

Abstract: Coenzyme Q₁₀ nanoemulsion (CoQ₁₀-NE) was improved and made utilizing *Pinus koraiensis* nuts oil as the oil phase, soybean lecithin as the surfactant, and ethanol as the cosurfactant in this study. The effects of different factors on the mean particle size and polydispersity index (PDI) of CoQ₁₀-NE were studied, and the quality was evaluated by DLS, TEM, FT-IR, stability, *in vitro* release behavior and *in vivo* pharmacokinetic experiments in rats. The results showed that when the mass ratio of CoQ₁₀ to mixed surfactant was 3:40, the mass ratio of CoQ₁₀ to *Pinus koraiensis* nuts oil was 1:4, the homogenizing pressure was 800 bar, and the number of cycles was 6 times, the CoQ₁₀-NE of mean particle size of 150.30±1.43 nm and PDI of 0.234±0.012 was obtained. The morphology and microstructure showed that the CoQ₁₀-NE was round and non-adhesive at the size of 500 nm and 1 μm. FT-IR results showed that CoQ₁₀ was completely encapsulated in nanoemulsion. The stability experiment showed that there was no significant difference in the mean particle size and PDI ($P>0.05$). CoQ₁₀-NE had good stability. *In vitro* release experiments showed that the cumulative dissolution rate of CoQ₁₀-NE was 4.7-fold that of the CoQ₁₀ suspension at 120 min. The dissolution rate was significantly improved. According to the results of pharmacokinetic investigations in rats, the maximum plasma concentration C_{max} of CoQ₁₀-NE was 2.80-fold that of CoQ₁₀ suspension, the drug concentration of CoQ₁₀-NE in rats was greatly enhanced. The area AUC_{0-∞} was 3.25-fold that of the CoQ₁₀ suspension, demonstrating that CoQ₁₀-NE bioavailability and absorption were greatly increased. The CoQ₁₀-NE developed in this study provides a theoretical foundation for investigating the creation of new CoQ₁₀ formulations and their potential application as a functional ingredient in food.

Key words: coenzyme Q₁₀; *Pinus koraiensis* nuts oil; nanoemulsion; characterization; pharmacokinetics

辅酶 Q₁₀(Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀)是天然醌类化合物,别名泛醌,是细胞自身合成的具有清除作用的唯一内源性亲脂抗氧化剂^[1]。CoQ₁₀具有清除人体自由基^[2],降低血脂^[3],提高免疫力等^[4]作用,同时在预防和辅助治疗心血管疾病^[5]、糖尿病^[6]、肿瘤^[7]等方面也具有良好的效果。CoQ₁₀在幼年时期合成量相对较低,随着年龄的增长,含量逐渐增加并达到最大值,但在20岁以后,其含量随着自身合成速率降低而减少^[8]。因此,外源性补充CoQ₁₀对维持人体正常的新陈代谢具有积极意义。但从CoQ₁₀结构可知,它具有较长疏水性侧链基团,如图1所示。因此,CoQ₁₀存在水溶性差,化学性质不稳定、生物利用度低等问题,从而使其应用受限^[9]。红松籽油来源于松科松属植物红松(*Pinus koraiensis* Sivb.ct Zucc)的种子红松籽,在我国东北地区分布较广、资源丰富,具有良好的开发利用价值。红松籽油风味独特,富含对人体有益的不饱和脂肪酸,其中皮诺敛酸是红松籽油特有的多不饱和脂肪酸,具有一定的抗氧化能力^[10]。同时,红松籽油具有减肥降脂^[11]、免疫抗炎^[12]、抗肿瘤转移等^[13]多种生理功效。然而,由于其自身结构的高度不饱和,使其容易被氧化,从而应用受限。

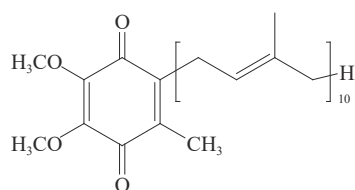


图1 CoQ₁₀ 化学结构

Fig.1 Chemical structure of CoQ₁₀

纳米乳液一般指液滴粒径范围在50~200 nm的乳液,是油相(或水相)分散于水相(或油相)中形成的多相分散体系,可以分为O/W型和W/O型,是动力学稳定体系,制备过程中需要输入能量^[14]。近年来,纳米乳液常被用来递送亲脂性化合物,而负载CoQ₁₀的纳米乳液具有很多优势:可以穿越细胞膜,具有靶向和缓释双重效果,负载率高,还能增强CoQ₁₀的理化稳定性。采用纳米乳负载CoQ₁₀,一方面可以使其处于一个更加稳定的体系当中,生物活性成分更加稳定,另一方面纳米乳粒径小,负载活性物的能力高,使活性物更容易被机体吸收利用,从而有效提高其生物利用度^[15]。然而,近年来,在制备CoQ₁₀纳米乳液过程中,对油相的选择上大多采用合成类油脂,如中碳链甘油三酯或中长碳链甘油三酯,这些油脂仅有增大CoQ₁₀溶解度的作用且获取途径可能存在安全性问题,因此,选用新型的、健康的、安全的天然植物油为油相成为研究的新思路。

目前采用天然植物油红松籽油为油相制备纳米乳的研究较少。本文采用高压均质技术制备基于红松籽油的CoQ₁₀纳米乳(Coenzyme Q₁₀ nanoemulsion, CoQ₁₀-NE)。这既能解决红松籽油不饱和脂肪酸因高度不饱和而易被氧化的问题,同时也会解决CoQ₁₀水溶性差,生物利用度低等问题,二者的生理功效又可以发挥协同作用。本文通过单因素实验和正交优化实验,确定了制备CoQ₁₀-NE的最佳工艺,对CoQ₁₀-NE通过透射电镜(Transmission electron microscope, TEM)、傅立叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、包封率、稳定性、体外释放行为及药代动力学进行表征和研究。为基于

红松籽油 CoQ₁₀-NE 的应用提供数据和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

动物:SPF 级 SD 大鼠,体重为(300~325 g),雄性,辽宁长生生物科技有限公司,合格证编号:SCXK(辽)2020-0001。所有涉及动物的实验均按照中国哈尔滨医科大学动物护理指南进行,并经中国黑龙江省实验动物管理委员会批准。CoQ₁₀(纯度>98%),CoQ₉(纯度>98%) 西安圣青生物科技有限公司;大豆卵磷脂(20200106) 北京奥博星生物技术有限责任公司;红松籽 哈尔滨东北特产有限公司;红松籽油(纯度为 97.3%,得率>60%,Y30 R0.6,碘值为 141.65±0.02 g/100 g,过氧化值为 2.62±0.04 mmol/kg,皂化值为 185.73±0.45 mg KOH/g,酸值为 0.34±0.10 mg KOH/g) 实验室自制;其它化学药品均为分析纯或色谱纯。

FSH-2 高速匀浆机 江苏金坛市环宇科学仪器厂;AH100D 高压均质机 上海阳溢生物科技有限公司;FA114A 0880 电子分析天平 上海奔普仪器科技有限公司;ZetaPALS 激光粒度仪 美国 Brookhaven 公司;JEM-2100 透射显微镜 日本电子株式会社;IRAffinity-1 傅里叶变换红外光谱仪 日本岛津公司;1260 型高效液相色谱仪 美国安捷伦公司;MICRO 220R 高速低温离心机 德国 Hettich 科学仪器公司;TCQF-3800 氮气吹干仪 北京通德创业科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CoQ₁₀ 标准曲线的建立 精密称取 20 mg 纯度为 99.0% 的 CoQ₁₀,用无水乙醇溶解定容于 100 mL 的容量瓶中,配置浓度为 0.2 mg/mL 的 CoQ₁₀ 乙醇溶液,并将其作为母液。从母液中分别移取 3.125、6.250、9.375、12.50、15.625 mL 体积至 25 mL 容量瓶中,无水乙醇定容并混合均匀,得到浓度梯度分别为 0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 mg/mL 的标准溶液。通过液相色谱 HPLC 测定 CoQ₁₀ 的浓度和峰面积之间的关系。HPLC 进样操作条件为:色谱柱为 Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm;美国 Waters 公司)柱;流动相甲醇:乙醇(V/V, 10:90);流速 1 mL/min;检测波长 275 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL。以 CoQ₁₀ 浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。线性拟合方程为:Y=25961X-85.55, R²=0.9995,线性范围为 0.025~0.125 mg/mL。

1.2.2 CoQ₁₀ 纳米乳的制备 以 30 mg CoQ₁₀ 于红松籽油中加热至完全溶解为油相,以 0.35 g 表面活性剂大豆卵磷脂和 0.05 g 助表面活性剂无水乙醇于蒸馏水中加热至完全溶解为水相,水相和油相混合后于高速匀浆机以 8000 r/min 匀浆 3 min,得到初乳液,将得到的初乳液以均质压力 800 bar,循环次数为 6 次,进行高压均质,得到 CoQ₁₀ 纳米乳^[16]。将 30 mg CoQ₁₀ 溶解于生理盐水中,得到 CoQ₁₀ 混悬液。

以 0.12 g 红松籽油为油相,以 0.35 g 表面活性剂大豆卵磷脂和 0.05 g 助表面活性剂无水乙醇于蒸馏水中加热至完全溶解为水相,水相和油相混合后于高速匀浆机以 8000 r/min 匀浆 3 min,得到初乳液,将得到的初乳液以均质压力 800 bar,循环次数为 6 次,进行高压均质,得到空白纳米乳。

1.2.3 单因素实验 固定 CoQ₁₀ 与混合表面活性剂质量比为 3:30,CoQ₁₀ 和红松籽油的质量比为 1:4,均质压力为 800 bar,循环次数为 6 次。在上述工艺条件下,以平均粒径和 PDI 为考察指标,分别探讨 CoQ₁₀ 与混合表面活性剂质量比 3:10、3:20、3:30、3:40、3:50;CoQ₁₀ 与红松籽油质量比 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7;均质压力 400、600、800、1000、1200 bar;循环次数 3、6、9、12、15 次,每次实验重复三次。

1.2.4 正交优化试验设计 在单因素实验的基础上,选择 CoQ₁₀ 与混合物表面活性剂(大豆卵磷脂和无水乙醇)的质量比、CoQ₁₀ 与红松籽油的质量比、均质压力和循环次数 4 因素 3 水平的正交试验设计对 CoQ₁₀ 纳米乳的粒径参数工艺进行优化,如表 1 所示。

表 1 正交试验因素与水平设计
Table 1 Orthogonal experiment factor and level

水平	CoQ ₁₀ 与混合表面活性剂质量比A	CoQ ₁₀ 与红松籽油的质量比B	均质压力 C(bar)	循环次数 D(次)
1	3:20	1:3	600	3
2	3:30	1:4	800	6
3	3:40	1:5	1000	9

1.2.5 粒径和多分散系数的测定 本实验采用动态激光散射(Dynamic light scattering, DLS),使用的仪器为 ZetaPALS 激光粒度仪,测试温度为 25 °C,测试角度为 90°,平衡条件为 90 s,测定结果以平均粒径和多分散系数(Polydispersity Index, PDI)为指标。将纳米乳的稀释液进行测定,待测样品用去离子水稀释 200 倍,稀释成透明状态,每次实验重复三次。

1.2.6 包封率的测定 将 1 mL CoQ₁₀ 纳米乳稀释 10 倍,取稀释液 1 mL,涡旋 2 min,超声破乳 10 min,5000 r/min 离心 10 min,得到 CoQ₁₀ 破乳液。上清液 0.22 μm 滤膜过滤后,取 20 μL 进行分析,根据所得峰面积计算出总的 CoQ₁₀ 量(W_总)。

将 1 mL CoQ₁₀ 纳米乳稀释 10 倍,取稀释液 1 mL,置于超滤管内室,4 °C 条件下 5000 r/min 离心 20 min,将外室的滤液用乙醇定容至 1 mL,0.22 μm 滤膜过滤后,取 20 μL 进行分析,根据所得峰面积计算出 CoQ₁₀ 量(W_{游离})^[17]。

根据公式(1),计算得到包封率(Encapsulation efficiency, EE):

$$EE(\%) = \left(1 - \frac{W_{\text{游离}}}{W_{\text{总}}}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.7 透射电镜 (Transmission electron microscope,

TEM)的测定 根据最优配方得到的 CoQ₁₀ 纳米乳, 稀释 50 倍, 滴加到铜网表面, 用滤纸吸取多余的液体, 用磷酸盐负染 2 min, 滤纸吸取多余液体, 自然晾干, 用透射电镜观察 CoQ₁₀ 纳米乳的微观形貌^[18]。

1.2.8 傅立叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)测定 采用 IRAffinity-1 傅立叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)进行红外光谱分析。采用 KBr 压片法对 CoQ₁₀ 原药、冷冻干燥后的空白纳米乳和 CoQ₁₀-NE 在 25 MPa 压力条件下进行压片, 设置分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描范围为 500~4000 cm⁻¹^[19]。

1.2.9 稳定性实验 本实验主要通过以下四个实验验证其稳定性^[16]。

加速离心实验: 分别取 15 mL 纳米乳液于离心管中, 于转速 8000 r/min 分别离心 5、10、15、20 min, 观察样品是否分层, 以平均粒径和 PDI 作为指标进行测定。

常温静止稳定试验: 将 15 mL 纳米乳液储存室温下, 分别于 30、60、90 和 120 d 取出样品, 以平均粒径和 PDI 作为指标进行测定。

低温静置稳定实验: 分别将 5 份 15 mL 的纳米乳放入 4 ℃ 冰箱中分别冷处理 20、40、60、80 和 100 min, 以平均粒径和 PDI 作为指标进行测定。

冻融升温稳定实验: 分别将 6 份 15 mL 的纳米乳放入不同温度-20、-10、0、10、20 和 30 ℃ 的条件下放置 3 h, 以平均粒径和 PDI 作为指标进行测定。

1.2.10 体外释放实验 采用透析袋法对药物的体外释放行为进行考察, 以 300 mL 0.5% 十二烷基硫酸钠溶液(pH=6.8)为溶出介质, 在温度 37 ℃ 条件下于烧杯中搅拌振荡, 转速为 50 r/min。分别精密量取适量的 CoQ₁₀ 混悬液和 CoQ₁₀-NE(相当于 CoQ₁₀ 10 mg)置于事先处理过的透析袋(MWCO: 3500 g/mol)中, 并捆扎好两侧, 置于溶出介质中, 分别于 10、20、30、60、90、120、180、240 min 吸取溶出介质 5 mL, 同时向烧杯中补加相同体积的空白介质, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 吸取滤液 20 μL, 按 1.2.1 色谱条件进样, 计算 CoQ₁₀ 的累积释放量^[20]。

1.2.11 大鼠体内药代动力学研究

1.2.11.1 动物分组及血样采集 SD 雄性大鼠 12 只, 体重 300~325 g, 实验前将大鼠置于单独的金属笼中, 室温 25±1 ℃, 相对湿度 50%±5%, 明暗循环 12 h, 大鼠随意喂食食物和水。

给药前禁食 12 h 后, 将大鼠随机分成两组, 每组六只。两组大鼠分别灌胃 60 mg/kg CoQ₁₀ 混悬液(分散于 0.9% 生理盐水中)和 CoQ₁₀-NE。给药后于 0.08、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0 和 24.0 h 通过眼眶穿刺取血收集全血样本, 将血液置于含有肝素钠的抗凝管中, 立即在 4 ℃ 下以 12000 r/min 离心 10 min, 血浆样品在-20 ℃ 下储存直至分析。

1.2.11.2 血浆中 CoQ₁₀ 含量的测定 大鼠血浆分析:

在 1.0 mL 离心管中混合 80 μL 大鼠血浆、300 μL 甲醇和 20 μL 内标 CoQ₉(20 μg/mL)。将混合物涡旋 3 min, 以 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并在真空 termovap 样品浓缩器下干燥, 将残留物溶解在 100 μL 流动相中。将 20 μL 试样注入 HPLC 系统进行分析, CoQ₁₀ 与 CoQ₉ 的峰面积比值用于 CoQ₁₀ 的定量。按照上述“1.2.1”完成色谱进样操作。

1.2.11.3 大鼠血浆分析标准曲线的建立及方法学验证 CoQ₁₀ 标准储备液的配制: 精密称取 CoQ₁₀ 标准品 5 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 用色谱级乙醇定容, 得浓度 100 μg/mL CoQ₁₀ 储备液, 置 4 ℃ 冰箱中保存, 临用时稀释至所需浓度。

内标储备液的配制: 精密称取 CoQ₉ 标准品 1 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 用色谱级乙醇定容, 得到浓度 20 μg/mL CoQ₉ 储备液, 置 4 ℃ 冰箱中保存, 临用时稀释至所需浓度。

首先配制不同浓度的血浆生物样品, 精密移取大鼠空白血浆 80 μL, 分别加入系列浓度 CoQ₁₀ 对照品溶液 20 μL, 得一系列浓度梯度, 20、10、5、0.6250、0.3125 和 0.0391 μg/mL 的血浆生物样品, 然后血浆生物样品处理方法按“1.2.11.2”进行处理, 色谱进样条件按“1.2.1”进行分析, 记录每个血浆样品浓度记为 C。

回收率实验: 配制 5 份 CoQ₁₀ 浓度为低(0.0391 μg/mL)、中(0.6250 μg/mL)以及高(10 μg/mL)的血浆生物样品。按“1.2.11.2”进行处理, 按“1.2.1”进样分析, 记录 CoQ₁₀ 和 CoQ₉ 内标的峰面积比值。

精密度实验: 在 SD 大鼠空白血浆 80 μL 中加入 20 μL 的 CoQ₁₀ 对照品溶液, 涡旋混匀, 得到低(0.0391 μg/mL)、中(0.6250 μg/mL)、高(10 μg/mL)浓度的血浆生物样品, 按“1.2.11.2”进行处理, -20 ℃ 冷藏。每个浓度 6 份, 连续三天每天同时按“1.2.1”色谱条件分析, 记录 CoQ₁₀ 和 CoQ₉ 内标峰面积的比值。

1.3 数据处理

使用正交设计助手 II V3.1 软件进行正交实验设计及实验数据处理, 使用 DAS 2.0 软件进行药代动力学参数分析。每组实验数据设置 3 个平行, 实验数据以平均值±标准误差来表示, 采用 Origin 2019b 进行数据和图像处理并生成图片。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

如图 2a 所示, 随着 CoQ₁₀ 与混合表面活性剂质量比的变化, 平均粒径呈先减小后增加的趋势, 质量比为 3:30 时平均粒径为最小值 298.1 nm, 多分散系数为 0.153。这可能是因为表面活性剂可以较好的降低油/水界面张力, 形成界面膜而促使纳米乳的形成。而在纳米乳液形成过程中加入适量的助表面活性剂, 可以降低界面膜弯曲应力, 使界面膜获得足够弹性, 从而促进纳米乳的形成, 使纳米乳液粒径更小, 更加稳定^[21]。Kaci 等^[22]研究发现, 添加表面活性剂

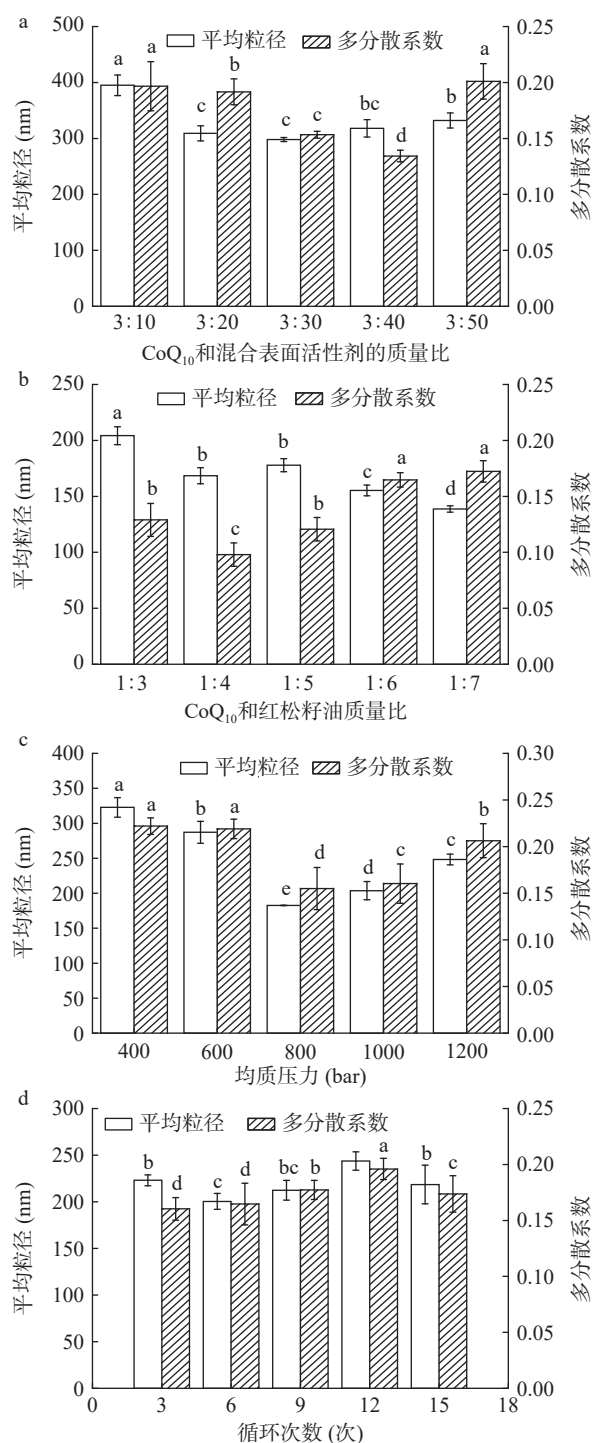


图2 单因素实验结果

Fig.2 Results of single factor experiments

注: 字母不同代表差异性显著($P < 0.05$)。

会得到粒径更小的纳米乳液, 乳化率大大提高, 与本文研究结果相似。因此, 确定 CoQ₁₀ 和混合表面活性剂的质量比为 3:30。

由图 2b 所示, 随着 CoQ₁₀ 和红松籽油的质量比的增加, 平均粒径整体呈逐渐减小的趋势, 在质量比为 1:7 时, 平均粒径为 138.8 nm。而多分散系数呈先减小后增大的变化趋势, 在质量比为 1:4 时 PDI 为 0.098。这可能是因为, 随着油相比率的增加, 药物在油相中的溶解性提高, 油相在水相中的分散更

好, 有利于纳米乳的形成, 平均粒径逐渐减小。但是当油相比率过高, 粘度增加, 反而不利于纳米乳的形成, 影响纳米乳的均一性。Kommuru 等^[23] 研究不同组成和比例的油脂对纳米乳的影响, 当油脂的质量分数为 40% 时, 纳米乳平均粒径和分散性最小, 纳米乳的稳定性和生物利用度最高。因此, 综合平均粒径和 PDI 的整体变化, 最终确定 CoQ₁₀ 和红松籽油的质量比为 1:4。

由图 2c 所示, 随着均质压力的增加, 均质压力对平均粒径和多分散系数有显著影响。平均粒径随着均质压力的增大呈先减小后增加的趋势, 在均质压力为 800 bar 时, 平均粒径为 182.5 nm, 多分散系数为 0.155, 当均质压力上升到 1000 bar 和 1200 bar 时, 平均粒径增大到 203.7 nm 和 248.2 nm, 这是可能因为随着均质压力的增大, 体系温度升高, 纳米乳液颗粒发生聚集, 粒径随后又增大, PDI 也增大^[24]。因此选择均质压力为 800 bar 为最佳值。

由图 2d 所示, 随着循环次数的增加, 平均粒径呈先减小后增加而后又减小的趋势, 循环次数为 6 次时, 平均粒径和多分散系数分别为 200.4 nm, PDI 为 0.165。循环次数为 9、12、15 次时, 平均粒径分别增加到 212.4、243.8、218.5 nm。过多的循环次数导致体系温度升高, 纳米乳颗粒开始发生聚集, 平均粒径变大, PDI 也有一定变大趋势, 出现粒径不均一的现象^[25]。因此选择循环次数为 6 次为最佳值。

2.2 正交优化试验结果

表 1 为 A、B、C、D 四因素三水平试验的正交设计编号, 正交软件设计了 9 组试验, 试验正交结果如下表 2 所示。在正交试验的过程中发现, 9 组正交试验的 PDI 值均表明纳米乳具有良好的均一性, 为了下一步统计学上 S 值、K 值及极差 R 计算方便, 因此, 本正交试验只以平均粒径为考察指标。从表 2 可以得出, CoQ₁₀ 纳米乳的粒径范围在 151.4 nm 到 228.8 nm。对正交软件得到的试验数据进行分析, 通过极差 R 确定因素的主次顺序为 B>D>A>C, 即四个因素影响的主次顺序分别为 CoQ₁₀ 与红松籽油的质量比, 循环次数, CoQ₁₀ 与混合表面活性剂的质量比, 均质压力。由实验结果可知, 最佳组合为 A₃B₂C₂D₂, 分别为 CoQ₁₀ 和混合表面活性剂的质量比 3:40, CoQ₁₀ 和红松籽油的质量比为 1:4, 均质压力为 800 bar, 循环次数为 6 次。

2.3 验证试验及包封率的测定

通过单因素和正交优化试验, 得到的最佳参数为: CoQ₁₀ 与混合表面活性剂的质量比 3:40, CoQ₁₀ 与红松籽油的质量比为 1:4, 均质压力为 800 bar, 循环次数为 6 次。为了验证最佳条件下制备的平均粒径, 在最优条件下进行 3 次重复实验, 得到平均粒径为 150.30±1.43 nm, 多分散系数为 0.234±0.012 的 CoQ₁₀-NE, 达到预期。

包封率的测定: 纳米乳液包封率高低与活性物

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiments

试验号	CoQ ₁₀ 与混合表面活性剂质量比A	CoQ ₁₀ 与红松籽油的质量比B	均质压力C(bar)	循环次数D(次)	粒径(nm)
1	3:20	1:3	600	3	228.8
2	3:20	1:4	800	6	151.4
3	3:20	1:5	1000	9	165.7
4	3:30	1:3	800	9	178.3
5	3:30	1:4	1000	3	166.8
6	3:30	1:5	600	6	155.4
7	3:40	1:3	1000	6	178.7
8	3:40	1:4	600	9	154.3
9	3:40	1:5	800	3	166.1
S ₁	545.90	585.80	538.50	561.70	
S ₂	500.50	472.50	495.80	485.50	
S ₃	499.10	487.20	511.20	498.30	
K ₁	181.97	195.27	179.50	187.23	
K ₂	166.83	157.50	165.27	161.83	
K ₃	166.37	162.40	170.40	166.10	
R	15.60	37.77	14.23	25.40	
主次顺序B>D>A>C					
最优水平	A ₃	B ₂	C ₂	D ₂	
优化组合	3:40	1:4	800	6	

质的物理化学性质、制备方法等因素有关。本实验采用超滤离心法检测包封率。CoQ₁₀-NE 的包封率为 87.48%±0.59%, 表明大部分 CoQ₁₀ 已被成功包裹到纳米结构载体中。这与研究酚类化合物纳米乳的包封率所得到的结果相似^[26]。

2.4 TEM 的测定

图 3 是 1 μm 和 500 nm 尺寸下的 TEM 微观形貌, 如图所示, CoQ₁₀-NE 呈圆形, 大小均匀, 无粘连, 成型性好。CoQ₁₀-NE 的形态与 Fathordoobady 等^[26]研究的纳米乳液观察到的形态相似。此外, TEM 形貌观察的图像与 Wu 等^[27]研究使用丙泊酚的纳米乳液非常相似。

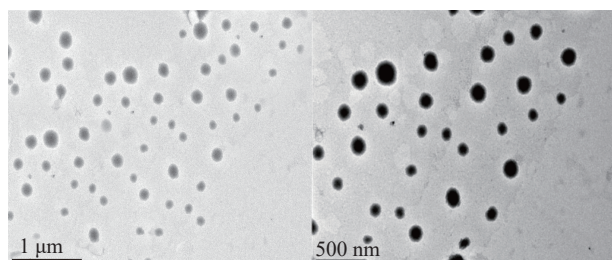


图 3 CoQ₁₀ 纳米乳形貌图
Fig.3 TEM morphology of CoQ₁₀ nanoemulsion

2.5 FT-IR 测定

采用 FT-IR 探讨 CoQ₁₀ 纳米乳液中分子间相互作用的形式。如图 4 所示, 从上到下分别为 CoQ₁₀-NE、空白纳米乳和原料药 CoQ₁₀ 的红外图谱。CoQ₁₀ 在 2960 cm⁻¹ 是乙烯基的振动峰, 2850 cm⁻¹ 是烷基伸缩振动峰, 1260 cm⁻¹ 是醚基团的伸缩振动峰。从 CoQ₁₀-NE 中还可以找到相应的特征峰, 但发生了偏移, 说

明 CoQ₁₀ 只是分散在载体中, 并没有在载体化后发生化学性质变化。CoQ₁₀-NE 中并没有出现和 CoQ₁₀ 在同样波段之间的特征峰, 且与空白纳米乳液的红外谱图基本一致, 这说明 CoQ₁₀ 被完全包埋在纳米乳液体系当中。这与椰子油中含有姜黄素的纳米乳剂的研究结果相似^[28]。

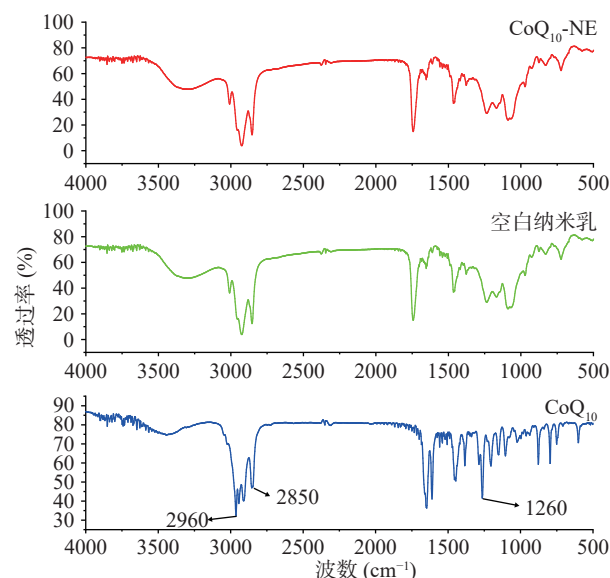


图 4 CoQ₁₀ 原药、CoQ₁₀-NE 和空白纳米乳的红外光谱图
Fig.4 Fourier infrared spectrum of CoQ₁₀, CoQ₁₀-NE and blank nanoemulsion

注: 根据不同官能团的红外吸收峰特征, 由波段确定官能团名称。如: 2930~2980 cm⁻¹ 为乙烯基的振动峰; 2700~3000 cm⁻¹ 为烷基伸缩振动峰; 1000~1300 cm⁻¹ 为醚基团的特征吸收波段。

2.6 稳定性实验

如图 5a 所示, 与初始纳米乳液相比, 平均粒径随着离心时间的变化没有发生显著变化($P>0.05$), 因此体系是稳定的, 离心后也没有发生明显的分层现象, 表明纳米乳液具有良好的稳定性。

如图 5b 所示, 在室温下, 随着考察天数的延长, 纳米乳液的平均粒径虽有略微的上浮, 由 150.4 nm 到 161.9 nm, 但整体没有发生显著变化($P>0.05$), 表明纳米乳随着静置时间的变化保持良好的稳定性。

为了考察在较低的温度下, 纳米乳液仍具有良好的稳定性, 将纳米乳液放置在低温 4 ℃ 下保存, 对其平均粒径和 PDI 进行测定。如图 5c 所示, 与初始纳米乳液相比, 随着考察天数的变化, 平均粒径和 PDI 没有发生显著变化($P>0.05$), 说明纳米乳液稳定性良好。

考察不同温度下纳米乳的稳定性对当储存温度超过正常室温储存的突发状况有很大的意义。如图 5d 所示, 温度从 -20 ℃ 到 30 ℃ 变化, 平均粒径没有显著变化($P>0.05$)。尤其在纳米乳冷冻后, 在室温下放置恢复到原来的状态后, 平均粒径和 PDI 均没有发生显著变化($P>0.05$)。因此, 在不同的温度下, 纳米乳液具有良好的稳定性。观察到的结果与先前的研究发现一致, 即纳米乳液可稳定长达数月^[29]。

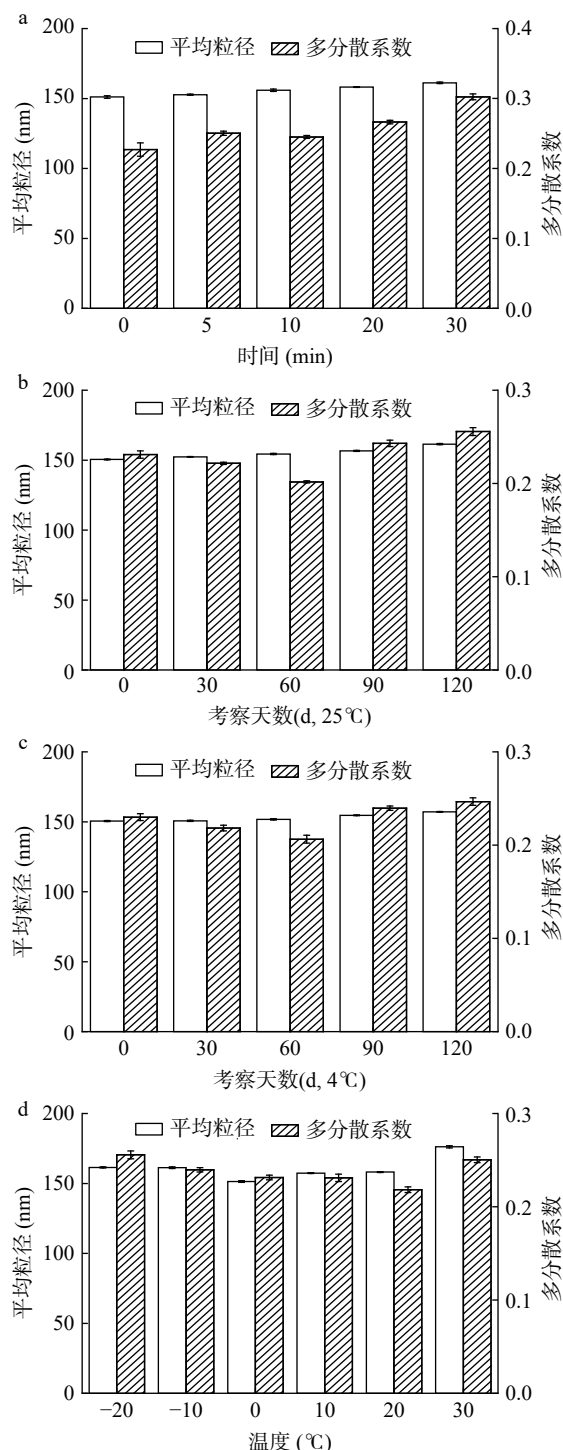


图 5 稳定性实验结果

Fig.5 Results of stability experiments

注: a: 加速离心实验; b: 常温储存实验; c: 低温储存实验; d: 冻融升温实验。

纳米乳的稳定性取决于脂类、乳化剂和水体系的性质和浓度。乳化剂在液滴周围形成一层膜,降低界面能,为纳米乳的聚集提供机械屏障,从而提高纳米乳的稳定性^[30]。Chutia 等^[31]在研究高压均质得到的淀粉纳米颗粒用于开发类胡萝卜素富集粉纳米乳中,发现富含类胡萝卜素的纳米乳剂对热和冻融处理稳定。同时,开发的纳米乳液在储存期间显示出良好的物理稳定性,与本文的研究结果相似。

2.7 体外释放实验

通过 HPLC 检测 CoQ₁₀ 混悬液和 CoQ₁₀-NE 的体外累积释放量。如图 6 所示,CoQ₁₀-NE 累积释放量高于混悬液,30 min 内 CoQ₁₀ 混悬液的累积释放量分别为 4.17%、5.32%、8.30%,CoQ₁₀-NE 的累积释放量分别为 46.61%、51.15%、52.17%。两者在 30 min 内都呈上升趋势,CoQ₁₀-NE 上升更为明显。60 min 时,CoQ₁₀-NE 的累积释放量达到 63.41%,而混悬液的只有 11.83%,随后两者累积释放量均缓慢上升,120 min 后基本保持不变。在 300 min 时,CoQ₁₀ 混悬液的累积释放量为 18.01%,CoQ₁₀-NE 为 84.66%,是混悬液的 4.7 倍。这可能是药物的释放量与溶解度和比表面积有关,纳米乳的比表面积较大以及表面活性剂的存在均提高了药物的释放量^[32]。这与陈家铃等^[33]研究发现的高压均质制备水杨酸纳米乳的体外释放量显著提高的结果相似。

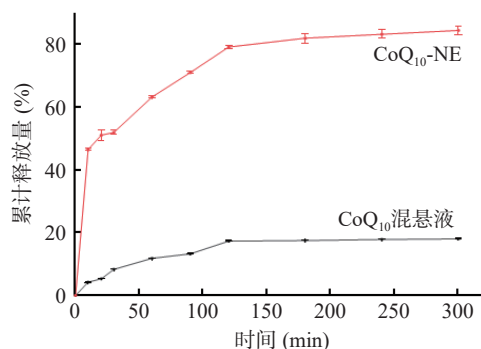


图 6 体外释放实验结果

Fig.6 Results of *in vitro* release experiments

2.8 大鼠药代动力学研究

2.8.1 体内分析方法的建立结果 血浆中 CoQ₁₀ 的浓度测定采用内标法。选择内标法是为了抵消上样体积、流动相以及检测器的影响。操作过程中样品和内标物混合一起注入色谱柱,因此,只要混合溶液中被测组分与内标的量的比值是恒定的,上样体积的变化不影响定量的结果。本文选择和 CoQ₁₀ 保留时间接近但不重叠的 CoQ₉ 为内标,它与 CoQ₁₀ 是同系物,且具有一致的色谱行为和相应特征。在色谱分析条件下,CoQ₉ 内标物与样品各组分充分分离。方法专属性实验结果图 7 表明,内标峰 CoQ₉ 和 CoQ₁₀ 峰型良好,两者的保留时间分别为 9.86 和 12.37 min,且血浆中内源物质不干扰实验的测定。

标准曲线以待测物浓度 C 为横坐标,待测物和内标物的峰面积比值 R_1 为纵坐标,得到直线回归方程为 $R_1 = 0.7307C - 0.041$, $R^2 = 0.9996$,表明 CoQ₁₀ 在 0.0391~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。精密实验表明,低、中、高浓度的日间精密分别为 5.15%、2.35%、1.33%,日内精密分别为 7.80%、2.65%、1.80%。回收实验结果表明,低、中、高浓度的回收率分别为 99.23%、101.73%、100.67%。以上结果均表明,该方法灵敏度好、准确度高,符合方法学要求。

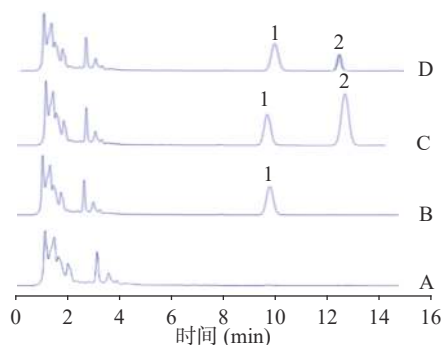


图7 方法专属性考察

Fig.7 Result of chromatographic method specificity investigation

注: A: 空白血浆; B: 内标+空白血浆; C: 内标+空白血浆+CoQ₁₀; D: 内标+血浆样品; 1: CoQ₉; 2: CoQ₁₀。

2.8.2 药时曲线的绘制 如图8所示,在每个时间点,CoQ₁₀-NE组的血药浓度均高于CoQ₁₀混悬液组。CoQ₁₀-NE和CoQ₁₀混悬液组的血浆浓度分别在0~2.0 h和0~4.0 h之间趋于增加,属于吸收分布过程。CoQ₁₀混悬液的达到最大血药浓度的时间T_{max}是CoQ₁₀-NE的2倍,可知CoQ₁₀-NE在体内更快达到峰浓度。CoQ₁₀混悬液组的浓度从4.0~24.0 h趋于下降,而CoQ₁₀-NE组的浓度从2.0~24.0 h趋于下降,属于代谢排泄过程。CoQ₁₀混悬液组4.0 h时血样中CoQ₁₀浓度为0.850±0.024 μg/mL,CoQ₁₀-NE组2.0 h时为2.450±0.040 μg/mL。CoQ₁₀-NE组的最大血药浓度C_{max}是CoQ₁₀混悬液的2.80倍,说明CoQ₁₀-NE在体内的血药浓度更高。

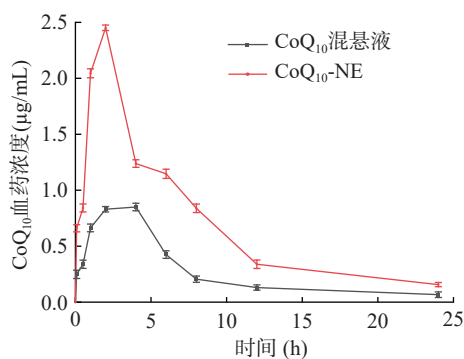


图8 CoQ₁₀-NE和CoQ₁₀混悬液在体内吸收曲线的比较
Fig.8 Comparison of *in vivo* absorption profiles of CoQ₁₀-NE and CoQ₁₀ suspension

2.8.3 药代动力学参数分析 本实验通过DAS 2.0软件对大鼠药代动力学数据进行房室模型拟合,所得的药代动力学参数如表3所示。依照拟合度R²及赤池信息量准则(Akaike's Information Criterion, AIC)进行模型判断,拟合度越接近1、AIC越小,模型拟合越好。由软件分析可知,混悬组和纳米乳组的大鼠药代动力学均属于二室模型,权重系数分别为1和1/cc。药时曲线下面积(AUC)是判断药物吸收程度的重要指标之一。CoQ₁₀-NE的药时曲线下面积AUC_{0-∞}是CoQ₁₀混悬液组的3.25倍,CoQ₁₀-NE

表3 灌胃给药CoQ₁₀-NE和CoQ₁₀混悬液后CoQ₁₀的药代动力学参数(n=6)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of CoQ₁₀ after intragastric administration of CoQ₁₀-NE and CoQ₁₀ suspension (n=6)

房室参数	CoQ ₁₀ 混悬液	CoQ ₁₀ -NE
C _{max} (mg/h)	0.850±0.024	2.450±0.040***
T _{max} (h)	4.000±0.065	2.000±0.038***
AUC _{0-t} (mg/L·h)	5.591±0.602	17.059±0.471***
AUC _{0-∞} (mg/L·h)	5.602±0.981	18.179±0.702***
t _{1/2α} (h)	1.197±0.363	2.284±0.006***
t _{1/2β} (h)	1.435±5.129	69.315±0.417***
V ₁ /F(L/kg)	2.220±4.398	17.796±0.530***
CL/F(L/h/kg)	10.710±1.603	3.522±0.148***
MRT(0-t)(h)	6.393±1.298	6.465±0.229***
MRT(0-∞)(h)	7.627±4.400	8.716±0.655***
t _{1/2Ka} (h)	0.588±0.033	1.426±0.004***
Ka(1/h)	1.179±0.173	0.486±0.063***

注: ***P<0.001表示具有显著性差异;最大血药浓度C_{max};达到最大血药浓度的时间T_{max};药物浓度-时间曲线下面积MRT_{0-∞};0~24 h药物浓度-时间曲线下面积AUC_{0-t};分布半衰期t_{1/2α};消除半衰期t_{1/2β};中央室分布容积V₁/F;从中央室向外药物的清除率CL/F;0~24 h药物在体内的平均滞留时间MRT(0-t);药物在体内的平均滞留时间MRT(0-∞);吸收半衰期t_{1/2Ka};吸收速度常数Ka。

组药时曲线下面积AUC更大,这表明CoQ₁₀-NE生物利用度明显提高,吸收更好。对于二室模型来说,V₁和V₂分别表示中央室和外周室分布容积,CL表示从中央室向外药物的清除率,F为生物利用度。从药物在体内的平均滞留时间MRT_{0-∞}和清除率CL/F可以看出,CoQ₁₀-NE的MRT_{0-∞}是CoQ₁₀的1.14倍,CoQ₁₀混悬组的CL/F是CoQ₁₀-NE的3.04倍。说明CoQ₁₀-NE比CoQ₁₀在体内滞留时间更长,清除速率更慢。综上所述,这些不同可能是由于药物被纳米乳负载后,纳米乳粒径变小,比表面积变大,且被负载的药物结构良好,给药后,药物释放量提高,药物与胃肠壁接触面积变大,在体内作用时间变长,更容易被机体吸收,生物利用度显著提高^[34]。统计结果显示,以上参数均具有统计学差异。Belhaj等^[35]制备的一种由鲑鱼油、鲑鱼卵磷脂、CoQ₁₀组成的纳米乳液,和大豆油和CoQ₁₀组成的油性混合物相比较,纳米乳液的生物利用度提高了2倍,这与本文得出相似的结论。

3 结论

本文以CoQ₁₀为原料药,采用高压均质技术制备基于红松籽油CoQ₁₀的纳米乳,在单因素实验的基础上,通过正交优化确定CoQ₁₀-NE的最佳工艺。对最佳工艺条件下制备得到的CoQ₁₀-NE分别进行TEM、包封率实验、FT-IR、稳定性实验、体外释放行为等表征。同时,对CoQ₁₀-NE在大鼠体内的药代动力学特征进行研究。结果表明:在CoQ₁₀与混合表面活性剂的质量比3:40,CoQ₁₀与红松籽油的质量比为1:4,均质压力为800 bar,循环次数为6次的最佳工艺条件下,得到平均粒径为150.30±1.43 nm,

多分散系数为 0.234 ± 0.012 的 CoQ₁₀-NE。在 $1 \mu\text{m}$ 和 500 nm 条件下, CoQ₁₀-NE 大小均匀, 成型性良好; FT-IR 实验表明 CoQ₁₀ 被完全包裹在纳米乳液中且 CoQ₁₀ 没有在载体化后发生化学性质的改变; CoQ₁₀-NE 的包封率为 $87.48\% \pm 0.59\%$, 表明大部分 CoQ₁₀ 已被成功包裹到纳米结构载体中; 此外, 在加速离心和储存实验中, CoQ₁₀-NE 的平均粒径和 PDI 变化不显著 ($P > 0.05$), CoQ₁₀-NE 维持了良好的稳定性; 同时, CoQ₁₀-NE 的体外累积释放量高达 84.66% , 约是 CoQ₁₀ 混悬液的 4.7 倍, 累计释放量显著提高。大鼠药代动力学参数表明: 由最高血药浓度 C_{max} 和达到最高血药浓度所需时间 T_{max} 可知, CoQ₁₀-NE 组的 C_{max} 比 CoQ₁₀ 混悬组提高了 1.80 倍, T_{max} 缩短了 1 倍, 这表明纳米乳组比混悬组更快达到最大血药浓度。两组分别经灌胃给药后, CoQ₁₀-NE 组的体内平均滞留时间 MRT 和药时曲线下面积 AUC 相对于 CoQ₁₀ 混悬组均显著提高 ($P < 0.05$), 结果表明, CoQ₁₀-NE 较混悬液更易被吸收, 且在体内的作用时间更长, 生物利用度显著提高。本研究为探索 CoQ₁₀ 新剂型的研发及提高其生物利用度奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] RAIZNER A E. Coenzyme Q₁₀[J]. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 2019, 15(3): 185–191.
- [2] YANG C X, LIU S, MIAO J K, et al. CoQ₁₀ improves meiotic maturation of pig oocytes through enhancing mitochondrial function and suppressing oxidative stress[J]. *Theriogenology*, 2021, 159: 77–86.
- [3] ELSHAZLY S M, ALSEMEH A E, AHMAD E A A, et al. CoQ₁₀ exerts hepatoprotective effect in fructose-induced fatty liver model in rats[J]. *Pharmacological Reports*, 2020, 72(4): 922–934.
- [4] AGAMY D, NAGUIB Y M. CoQ₁₀ ameliorates monosodium glutamate-induced alteration in detrusor activity and responsiveness in rats via anti-inflammatory, anti-oxidant and channel inhibiting mechanisms[J]. *BMC Urology*, 2019, 19(1): 103.
- [5] ZOZINA V, COVANTEV S, GOROSHKO O, et al. Coenzyme Q₁₀ in cardiovascular and metabolic diseases: Current state of the problem[J]. *Current Cardiology Reviews*, 2018, 14(3): 164–174.
- [6] AASETH J, ALEXANDER J, ALEHAGEN U. Coenzyme Q₁₀ supplementation-in ageing and disease[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2021, 197: 111521.
- [7] TAFAZOLI A. Coenzyme Q₁₀ in breast cancer care[J]. *Future Oncology*, 2017, 13(11): 1035–1041.
- [8] AF MARÍA, EVA T, GLORIA B C. Clinical syndromes associated with coenzyme Q₁₀ deficiency[J]. *Essays in Biochemistry*, 2018, 62(3): 377–398.
- [9] PRAVST I, AGUILERA J, RODRIGUEZ A, et al. Comparative bioavailability of different coenzyme Q₁₀ formulations in healthy elderly individuals[J]. *Nutrients*, 2020, 12(3): 784.
- [10] CHEN X, ZHANG Y, WANG Z, et al. *In vivo* antioxidant activity of *Pinus koraiensis* nut oil obtained by optimised supercritical carbon dioxide extraction[J]. *Natural Product Research*, 2011, 25(19): 1807–1816.
- [11] SHPATOV A V, POPOV S A, SALNIKOVA O I, et al. Composition and bioactivity of lipophilic metabolites from needles and twigs of Korean and Siberian Pines (*Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. and *Pinus sibirica* Du Tour)[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2017, 14(2): e1600203.
- [12] TAKALA R, RAMJI D P, ANDREWS R, et al. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of pinolenic acid in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2022, 61(3): 992–1004.
- [13] ZHANG Y, XIN C, QIU J, et al. Essential oil from *Pinus koraiensis* pinecones inhibits gastric cancer cells via the HIPPO/YAP signaling pathway[J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3851.
- [14] SINGH Y, MEHER J G, RAVAL K, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 252: 28–49.
- [15] PANDEY P, GULATI N, MAKHIJA M, et al. Nanoemulsion: A novel drug delivery approach for enhancement of bioavailability[J]. *Recent Patents on Nanotechnology*, 2020, 14(4): 276–293.
- [16] 张平. 复合抗衰老纳米乳液的制备及其应用评估[D]. 南京: 东南大学, 2017. [ZHANG Ping. Preparation and application evaluation of compound antiaging nano emulsion[D]. Nanjing: South-east University, 2017.]
- [17] FAN H, LIU G, HUANG Y, et al. Development of a nanostructured lipid carrier formulation for increasing photo-stability and water solubility of phenylethyl resorcinol[J]. *Applied Surface Science*, 2014, 288: 193–200.
- [18] BHALEKAR M R, POKHARKAR V, MADGULKAR A, et al. Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2009, 10(1): 289–296.
- [19] ZHONG Y, WANG J, WANG Y, et al. Preparation and evaluation of liposome-encapsulated codrug LMX[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 438(1-2): 240–248.
- [20] 周佳, 孙燕燕, 温美强, 等. 布洛芬口服纳米乳的制备及处方优化研究[J]. *沈阳药科大学学报*, 2020, 37(10): 865–871. [ZHOU Jia, SUN Yanyan, WEN Meiqiang, et al. Preparation and optimization of ibuprofen loaded oral nanoemulsion[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2020, 37(10): 865–871.]
- [21] KHATTAB A, HASSANIN L, ZAKI N. Self-nanoemulsifying drug delivery system of coenzyme Q₁₀ with improved dissolution, bioavailability, and protective efficiency on liver fibrosis[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2017, 18(5): 1657–1672.
- [22] KACI M, ARAB-TEHRANY E, DOSTERT G, et al. Efficiency of emulsifier-free emulsions and emulsions containing rapeseed lecithin as delivery systems for vectorization and release of coenzyme Q₁₀: Physico-chemical properties and *in vitro* evaluation[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 147: 142–150.
- [23] KOMMURU T R, GURLEY B, KHAN M A, et al. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q₁₀: Formulation development and bioavailability assessment[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 212(2): 233–246.
- [24] HALLOUARD F, DOLLO G, BRANDHONNEUR N, et al.

Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanoemulsions for extemporaneous applications[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 478(1): 193–201.

[25] 杨璇. 辅酶 Q₁₀ 纳米制剂制备、表征及其生物效应研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018. [YANG Xuan. Preparation, characterization and biological effects of coenzyme Q₁₀ nanoemulsion[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2018.]

[26] GARAVAND F, JALAI-JIVAN M, ASSADPOUR E, et al. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review[J]. *Food Chemistry*, 2021, 364(4): 130376.

[27] WU Y, PETROCHENKO P, MYUNG J H, et al. Distinguish coexistence of nanoemulsion and liposome in propofol by cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM)[J]. *Microscopy & Microanalysis*, 2017, 23(S1): 852–853.

[28] YULIATI L. Curcumin-loaded nanoemulsion for better cellular permeation[J]. *Scientia Pharmaceutica*, 2020, 88(4): 44.

[29] TUBESHA Z, ABUBAKAR Z, ISMAIL M. Characterization and stability evaluation of thymoquinone nanoemulsions prepared by high-pressure homogenization[J]. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 2013: 1–6.

[30] SABJAN K B, MUNAWAR S M, RAJENDIRAN D, et al. Nanoemulsion as oral drug delivery-A review[J]. *Current Drug Research Reviews*, 2020, 12(1): 4–15.

[31] CHUTIA H, MAHANTA C L. Properties of starch nanoparticle obtained by ultrasonication and high pressure homogenization for developing carotenoids-enriched powder and pickering nanoemulsion[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2021, 74: 102822.

[32] KHAN A W, KOTTA S, ANSARI S H, et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of the poorly water-soluble grapefruit flavonoid naringenin: Design, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *Drug Delivery*, 2015, 22(4): 552–561.

[33] 陈家铃, 吴航航, 何益飞, 等. 水杨酸纳米乳的制备、体外释放行为及抑菌活性研究[J]. *精细与专用化学品*, 2022, 30(3): 16–21. [CHEN Jialing, WU Hanghang, HE Yifei, et al. Preparation, *in vitro* release behavior and antibacterial activity of salicylic acid nanoemulsion[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2022, 30(3): 16–21.]

[34] CHHABRA G, CHUTTANI K, MISHRA A K, et al. Design and development of nanoemulsion drug delivery system of amlodipine besilate for improvement of oral bioavailability[J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2011, 37: 907–916.

[35] BELHAJ N, DUPUIS F, ARAB-TEHRANY E, et al. Formulation, characterization and pharmacokinetic studies of coenzyme Q₁₀ PUFA's nanoemulsions[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 47(2): 305–312.