

# 雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备工艺优化及其表征<sup>Δ</sup>

屈子卉\*,张 备,陈洋洋,阎雪莹<sup>#</sup>(黑龙江中医药大学药学院,哈尔滨 150040)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)11-1470-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.07

**摘要** 目的:优化雷公藤红素(Cel)纳米结构脂质载体(Cel-NLC)的制备工艺,并对其进行表征。方法:采用熔融乳化超声法制备Cel-NLC。在单因素试验基础上,以Cel包封率为指标,采用星点设计-响应面法优化液态脂质比例(占总质量的比例)、复合乳化剂用量及主药用量,并进行验证试验。利用纳米粒度及Zeta电位分析仪测定最优处方下制备的Cel-NLC的粒径及Zeta电位,在透射电镜下观察其形态。结果:最优处方的液态脂质比例为39%,复合乳化剂用量为196 mg,主药用量为8 mg。所制3批Cel-NLC的平均包封率为87.22%、平均粒径为(41.2±1.1) nm、平均Zeta电位为(-18.4±0.2) mV(n=3),电镜下观察其外观呈类球形。结论:优化的处方工艺方法简便、稳定可行,适用于Cel-NLC的制备。

**关键词** 星点设计-响应面法;雷公藤红素;纳米结构脂质载体;熔融乳化超声法;包封率;表征

**Optimization of Preparation Technology of Celastrol Nanostructured Lipid Carrier and Its Characterization**  
QU Zihui, ZHANG Bei, CHEN Yangyang, YAN Xueying (School of Pharmacy, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of Celastrol nanostructured lipid carriers (Cel-NLC), and to characterize it. METHODS: Cel-NLC was prepared by melt-emulsification ultrasonic method. Based on single factor test, using encapsulation rate of Cel as index, the ratio of liquid lipid (the ratio of total mass), the amount of compound emulsifier and the dose of main drug were optimized by central composite design-response surface methodology. Validation test was conducted. Zeta potential and particle size of Cel-NLC that prepared by optimal prescription were determined by using granularity and Zeta potential analyzer. The morphology of liposome was observed by TEM. RESULTS: The optimal prescription included that the ratio of liquid lipid was 39%; the amount of compound emulsifier was 196 mg; the dose of main drug was 8 mg. The average encapsulation efficiency of 3 batches of Cel-NLC was 87.22%; average particle size was (41.2 ± 1.1) nm, and average Zeta potential was (-18.4 ± 0.2) mV (n=3). It was spherical under electron microscopy. CONCLUSIONS: The optimized technology is simple, stable and feasible, and it is suitable for the preparation of Cel-NLC.

**KEYWORDS** Central composite design-response surface methodology; Celastrol; Nanostructured lipid carriers; Melt-emulsification ultrasonic method; Encapsulation rate; Characterization

雷公藤红素(Celstrol,简称Cel)是自雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)根部提取出的一个天然活性成分<sup>[1]</sup>,具有广泛的药理活性,如能抑制肿瘤生长、促进肿瘤细胞凋亡<sup>[2]</sup>,以及对免疫功能和神经退行性疾病等具有较好的改善作用<sup>[3]</sup>。但是Cel毒副作用大,加上由于Cel具有水不溶性特点而导致其生物利用度低、体内消除快,制约了其临床应用<sup>[4]</sup>。在纳米给药系统中,纳米结构脂质载体(Nanostructured lipid carriers, NLC)不仅具有固体脂质纳米粒的优点,并且解决了固体脂质纳米粒粒径大、易凝胶化以及由于固体脂质纳米粒的晶体结构而导致的包封率低等问题<sup>[5-6]</sup>。NLC可作为水不溶性抗癌药物的载体,当药物通过静脉或肌内注射进入机体

后,由于NLC具有被动靶向性,在肿瘤部位的分布将大大增加<sup>[7-8]</sup>。因此,将全身毒性大的药物(如Cel)包载入NLC中,可提高其抗肿瘤作用并降低其全身毒性,这种思路和方法已被广泛应用于肿瘤治疗研究中。星点设计-响应面法是一种综合了数学和统计学的试验设计方法,因其试验次数少、试验精度高等特点,近年来被广泛应用于新型给药系统的处方筛选中<sup>[9]</sup>。故本研究以Cel为模型药,通过星点设计-响应面法优化Cel-NLC的制备工艺,为Cel的靶向抗肿瘤研究提供试验依据,同时为进一步研究和开发应用于临床的新型纳米递药载体提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); W202B 数控恒温水浴锅(上海申胜生物有限公司); UV 9100 紫外分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司);

<sup>Δ</sup> 基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No.ZD2016019)

\* 硕士研究生。研究方向:缓控释制剂、中药体内代谢、中药新药研发。电话:0451-87266988。E-mail:2802038237@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授,博士。研究方向:缓控释制剂、中药体内代谢、中药新药研发。电话:0451-87266988。E-mail:15159267@qq.com

Nano-ZS90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(英国马尔文仪器有限公司);JEM-2100 透射电子显微镜(日本电子株式会社);Unique-R20 多功能超纯水机(厦门锐思捷水纯化技术有限公司);Scientz-II D 超声波细胞破碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);KQ5200DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HZS-HA 恒温水浴振荡器(东联电子技术开发有限公司);BT25S 分析天平(德国赛多利斯公司);HJ-6A 数显恒温磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司)。

## 1.2 药品与试剂

Cel 对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:34157-83-0,纯度: $>98\%$ );肉豆蔻酸异丙酯(上海源叶生物科技有限公司,批号:110-27-0,纯度: $98\%$ );维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)、双硬脂酸甘油酯、嵌段式聚醚 F-68(上海源叶生物科技有限公司,批号:9002-96-4、1323-83-7、9003-11-6);SephadexG-50 葡聚糖凝胶(瑞典法玛西亚公司,批号:17-0033-01);油酸、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、卵磷脂(天津市科密欧化学试剂公司);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 Cel-NLC 及空白 NLC 的制备

2.1.1 Cel-NLC 的制备 结合预试验结果和相关文献报道<sup>[10]</sup>确定制备方法,即称取处方量的固体脂质材料、液态脂质材料和 Cel 对照品,置于 20 mL 烧杯中,70 °C 恒温水浴使其充分熔融作为油相;另取处方量的嵌段式聚醚 F-68 和复合乳化剂于 50 mL 烧杯中,加适量水,70 °C 恒温水浴搅拌,加热到油相相同温度,作为水相。待水相完全溶解后,将水相加入到同温度的油相中,用恒温磁力搅拌器在 70 °C 条件下搅拌(1 500 r/min)60 min,使其充分乳化。趁热将制得的初乳转移至细胞破碎机中,在 600 W 下探头超声 10 min,冷却后用微孔滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )滤过,即得 Cel-NLC,4 °C 保存。

2.1.2 空白 NLC 的制备 按“2.1.1”项下方法,油相中不加 Cel 制得空白 NLC。

### 2.2 Cel 的含量测定

2.2.1 溶液的制备 (1)Cel 对照品溶液:取 Cel 对照品适量,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,混匀,得到质量浓度为 520  $\mu\text{g/mL}$  的 Cel 对照品溶液。(2)Cel-NLC 供试品溶液:精密量取“2.1.1”项下的 Cel-NLC 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,用 85% 甲醇稀释并定容至刻度,振摇混匀,然后用微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ )滤过,即得。(3)阴性对照溶液:精密量取“2.1.2”项下的空白 NLC 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,用 85% 甲醇稀释并定容至刻度,振摇混匀,用微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ )滤过,即得。

2.2.2 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Dikma Di-

amonsil(钻石一代) $\text{C}_{18}$ (250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~12 min,85% A;12~20 min,85% $\rightarrow$ 90% A;20~30 min,90% A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;检测波长:426 nm;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。取“2.2.1”项下 3 种溶液,按此色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,在该色谱条件下,理论板数按 Cel 峰计不低于 7 000,待测成分与相邻峰间分离度大于 1.5,且阴性对照对测定无干扰,色谱图见图 1。

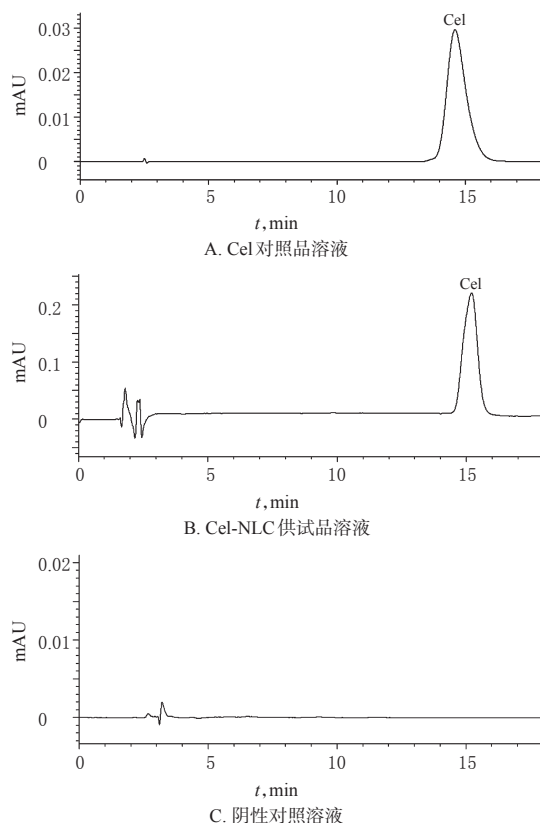


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取“2.2.1”项下 Cel 对照品溶液适量,用甲醇稀释为 Cel 质量浓度分别为 520、390、260、130、26、6.5、0.65  $\mu\text{g/mL}$  的 Cel 标准溶液,按“2.2.2”项下色谱条件进样分析,以峰面积( $A$ )为纵坐标、Cel 质量浓度( $c$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标建立标准曲线。结果, Cel 的线性回归方程为: $A=15\ 051c-2\ 666(R^2=0.999\ 6)$ ,表明 Cel 在进样质量浓度为 0.65~520  $\mu\text{g/mL}$  范围内与其峰面积的线性关系良好。

2.2.4 精密度的试验 制备低、中、高(4.06、10.15、20.30  $\mu\text{g/mL}$ )3 个质量浓度的 Cel 对照品溶液各 3 份,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,同日内每份样品连续进样 3 次,计算日内精密度;连续进样测定 3 d,计算日间精密度。结果,日内精密度的 RSD 分别为 1.08%、0.75%、0.53% ( $n=3$ ),日间精密度的 RSD 分别为 1.03%、1.24%、1.43% ( $n=3$ ),表明日内、日间精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取“2.2.1”项下 Cel-NLC 供试品溶液,放置 0、3、6、9、12、24 h 后,分别按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,Cel 峰面积的 RSD=1.37% (n=6),表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 取制备的同一批 Cel-NLC 样品适量,共 6 份,按“2.2.1(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,Cel 峰面积的 RSD=0.88% (n=6),表明该方法的重复性良好。

2.2.7 回收率试验 精密量取空白 NLC 溶液 0.5 mL,共 9 份,分别加入质量浓度为 10、30、50  $\mu\text{g/mL}$  的 Cel 对照品溶液,每个质量浓度平行制备 3 份,然后按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果,10、30、50  $\mu\text{g/mL}$  3 个质量浓度 Cel 的平均回收率分别为 99.02%、99.89%、98.52%,RSD 均小于 2.0% (n=3),表明该方法准确度良好。回收率测定结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 Results of recovery tests

加入量, $\mu\text{g/mL}$	测得量, $\mu\text{g/mL}$	回收率, %	平均回收率(n=3), %	RSD(n=3), %
10	9.97	99.70	99.02	0.91
10	9.83	98.30		
10	9.92	99.20		
30	29.85	99.50	98.89	1.04
30	29.36	97.87		
30	29.86	97.95		
50	49.24	98.48	98.52	1.32
50	49.45	98.90		
50	49.87	99.74		

## 2.3 微型凝胶柱离心法测定 Cel-NLC 的包封率

2.3.1 微型凝胶柱的制备 将 SephadexG-50 葡聚糖凝胶用水浸泡 24 h,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中封口,备用。取 2.5 mL 的注射器,去掉针头和活塞,底部填入双层圆形滤纸,然后加入充分溶胀的 SephadexG-50 葡聚糖凝胶,注射器外套一 5 mL 离心管,置于离心机中,以 2 000 r/min 离心 2 min(下同),使其失水皱缩<sup>[11-12]</sup>(在注射器中呈斜面圆柱状),待用,此时 SephadexG-50 葡聚糖凝胶高约 2.3 cm。

2.3.2 微型凝胶柱对空白 NLC 过柱回收率的影响 分别精密吸取 0.1、0.2、0.3 mL 的空白 NLC,缓慢注入微型凝胶柱的顶端,离心,收集滤液。继续向微型凝胶柱中加入相同量磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4);以 2 000 r/min 离心 2 min,收集洗脱滤液,重复以上操作 4 次,合并 4 次洗脱滤液,然后置于 5 mL 量瓶中,加 PBS(pH 7.4)至刻度。另取相同量的空白 NLC 置于 5 mL 量瓶中,加 PBS(pH 7.4)至刻度。用紫外分光光度计分别在 490 nm 波长处测定溶液吸光度,计算空白 NLC 的过柱回收率[过柱回收率(%)=(过柱后溶液吸光度/未过柱溶液吸光度) $\times 100\%$ ]。0.1、0.2、0.3 mL 空白 NLC 过柱后溶液的吸光度分别设为  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ ,未过柱溶液吸光度均设为  $A_0$ ,每

批样品重复测定 3 次。结果显示,0.1、0.2、0.3 mL 空白 NLC 的平均过柱回收率分别为(100.26  $\pm$  0.59)%、(99.91  $\pm$  0.81)%、(99.39  $\pm$  0.20)% (n=3),均符合要求,表明微型凝胶柱本身对空白 NLC 几乎不吸收,不会影响 Cel-NLC 包封率的检测。微型凝胶柱对空白 NLC 的过柱回收率测定结果见表 2。

表 2 微型凝胶柱对空白 NLC 的过柱回收率测定结果 (n=3)

Tab 2 The column recovery rate of black NLC on microgel column (n=3)

体积, mL	$A_1/A_0$	$A_2/A_0$	$A_3/A_0$	平均过柱回收率, %	RSD, %
0.1	0.369 4/0.372 8	0.365 9/0.364 5	0.371 8/0.368 9	100.26 $\pm$ 0.59	0.59
0.2	0.372 1/0.375 9	0.373 4/0.371 5	0.371 4/0.370 6	99.91 $\pm$ 0.81	0.81
0.3	0.375 2/0.378 1	0.374 2/0.376 8	0.376 1/0.377 6	99.39 $\pm$ 0.20	0.20

2.3.3 洗脱曲线的绘制 取 Cel 对照品溶液和 Cel-NLC 供试品溶液各 0.1 mL,混合后置于微型凝胶柱顶端,离心,收集滤液,继续向微型凝胶柱中加入 0.2 mL PBS (pH 7.4) 0.2 mL,离心,连续洗脱 20 次,每份洗脱液加甲醇 0.5 mL 破乳,按“2.2.2”项下色谱条件测定其中 Cel 含量,绘制洗脱曲线。结果显示,Cel-NLC 和游离 Cel 可完全分开,洗脱 0~4 次的洗脱液为 Cel-NLC,洗脱 4~11 次的洗脱液为蒸馏水,洗脱 11~16 次的洗脱液为游离 Cel,故本研究中只需收集洗脱 0~4 次的洗脱液进行破乳处理,用于测定 Cel-NLC 中 Cel 的含量。Cel 对照品溶液和 Cel-NLC 供试品溶液的洗脱曲线见图 2。

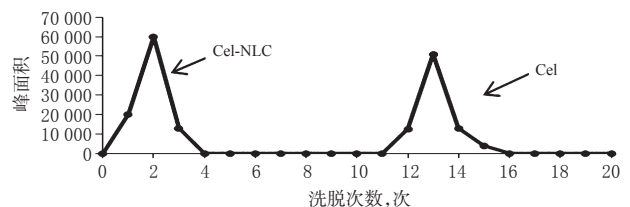


图 2 Cel 对照品溶液和 Cel-NLC 供试品溶液的洗脱曲线  
Fig 2 Elution curve of Cel control solution and Cel-NLC test solution

2.3.4 Cel-NLC 包封率的测定 取 Cel-NLC 0.2 mL,按“2.3.3”项下方法连续洗脱 4 次,收集 4 次的洗脱液,置于 5 mL 量瓶中,加甲醇破乳并定容至刻度,然后按“2.2.2”项下色谱条件分别进样测定 Cel-NLC 包封的 Cel 含量 ( $c_{\text{NLC}}$ )。另取 Cel-NLC 0.2 mL,置于 5 mL 量瓶中,加甲醇破乳并定容至刻度,然后再按“2.2.2”项下色谱条件进样测定总 Cel 含量 ( $c_{\text{总}}$ ),并按下式计算其包封率:包封率(%)= $c_{\text{NLC}}/c_{\text{总}} \times 100\%$ 。重复操作 3 次。结果,测定 3 次的包封率分别为 86.54%、85.59%、88.37%,平均包封率为 86.83%,RSD=1.63% (n=3)。

## 2.4 单因素试验

根据相关文献报道<sup>[13-14]</sup>,固态脂质类型、液态脂质类型、液态脂质比例、脂质材料用量、主药用量、复合乳化

剂类型、复合乳化剂比例、复合乳化剂用量、乳化时间、超声时间等都会对NLC的包封率产生影响。因此,在本研究中将NLC包封率为指标,对上述10个因素进行单因素考察。

2.4.1 固态脂质 固定脂质材料总量为100 mg[液态脂质为肉豆蔻酸异丙酯,液态脂质比例(占总质量的比例,下同)为50%],主药用量为10 mg,复合乳化剂用量为200 mg(嵌段式聚醚F-68与TPGS的质量比为1:1),乳化时间为40 min,超声时间为10 min(功率:600 W,频率:20 kHz),按“2.1.1”项下方法制备Cel-NLC。考察固态脂质分别为单硬脂酸甘油酯、硬脂酸和双硬脂酸甘油酯时对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC的包封率分别为66.24%、49.54%、78.12%,故选择双硬脂酸甘油酯作为固态脂质材料。

2.4.2 液态脂质 固定脂质材料总量为100 mg(固态脂质为双硬脂酸甘油酯,液态脂质比例为50%),其余条件同“2.4.1”项下,按“2.1.1”项下方法制备Cel-NLC。考察不同液态脂质(油酸、肉豆蔻酸异丙酯)对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC的包封率分别为59.46%、78.19%,故选择肉豆蔻酸异丙酯作为液态脂质材料。

2.4.3 液态脂质比例 固定液态脂质为肉豆蔻酸异丙酯、固态脂质为双硬脂酸甘油酯,脂质材料总量为100 mg,其余条件同“2.4.1”项下,按“2.1.1”项下方法制备Cel-NLC。考察液态脂质比例分别为25%、30%、40%、50%、60%时对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC包封率分别为38.94%、66.04%、81.84%、72.12%、43.21%,可见液态脂质比例为40%时Cel-NLC包封率达到80%以上,故选择液态脂质比例40%为中值进行进一步筛选。

2.4.4 脂质材料用量 固定液态脂质为肉豆蔻酸异丙酯、固态脂质为双硬脂酸甘油酯,液态脂质比例为40%,其余条件同“2.4.1”项下,按“2.1.1”项下方法制备Cel-NLC。考察脂质材料用量分别为60、100、140 mg时对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC包封率分别为70.64%、85.38%、78.04%,故确定脂质材料用量为100 mg。

2.4.5 主药用量 固定脂质材料总量为100 mg(液态脂质为肉豆蔻酸异丙酯、固态脂质为双硬脂酸甘油酯,液态脂质比例为40%),除主药用量外的其余条件同“2.4.1”项下,按“2.1.1”项下方法制备Cel-NLC。考察主药用量分别为6、8、10、12 mg时对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC包封率分别为85.38%、85.49%、83.53%、79.94%。结果显示,当主药用量为6、8 mg时包封率均在85%以上,而主药用量为10 mg时包封率下降,并且制得的Cel-NLC在放置1 d即出现沉淀,说明稳定性变差,包载量已过饱和,故最终选择主药用量为8

mg为中值进行进一步筛选。

2.4.6 复合乳化剂类型 固定脂质总量为100 g(液态脂质为肉豆蔻酸异丙酯、固态脂质为双硬脂酸甘油酯,液态脂质比例为40%),主药用量为8 mg,复合乳化剂用量200 mg(固定其中一种乳化剂为嵌段式聚醚F-68,两种乳化剂的质量比为1:1),乳化时间为40 min,超声时间为10 min(功率:600 W,频率:20 kHz),按“2.1.1”项下方法制备Cel-NLC。分别考察卵磷脂和TPGS分别与嵌段式聚醚F-68组成的复合乳化剂对Cel-NLC包封率的影响。结果Cel-NLC包封率分别为61.50%、83.19%,故选择TPGS与嵌段式聚醚F-68共同作为复合乳化剂。

2.4.7 复合乳化剂比例 固定其他条件不变,考察嵌段式聚醚F-68与TPGS的质量比分别为1:1、3:7、7:3、4:6时对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC包封率分别为83.53%、81.84%、73.58%、82.64%,故选择将嵌段式聚醚F-68与TPGS按1:1的质量比混合后作为复合乳化剂。

2.4.8 复合乳化剂用量 固定其他条件不变,考察复合乳化剂用量分别为100、200、280 mg时对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC包封率分别为75.07%、82.73%、81.69%,可见复合乳化剂用量为200、280 mg时包封率均较高,但复合乳化剂用量为280 mg时制得的Cel-NLC在放置1 d出现了沉淀,故选择复合乳化剂用量200 mg为中值进行进一步优化。

2.4.9 乳化时间 固定其他条件不变,考察乳化时间分别为40、60、80、100 min时对Cel-NLC包封率的影响,结果Cel-NLC包封率分别为75.07%、82.09%、77.48%、81.69%,将乳化时间控制在60 min时包封率最高,故选择乳化时间为60 min制备Cel-NLC。

2.4.10 超声时间 固定其他条件不变,考察超声时间分别为6、8、10、12 min(功率:600 W,功率:20 kHz)对Cel-NLC包封率的影响。结果Cel-NLC包封率分别为69.79%、76.12%、81.81%、65.93%。可见,超声时间过短时包封率较小,且其粒径较大;而超声时间过长,包封率也会降低,Cel-NLC颜色变深且易产生沉淀,故选择超声时间为10 min制备Cel-NLC。

## 2.5 星点设计-响应面法优化Cel-NLC的制备工艺

2.5.1 星点试验设计 通过单因素试验考察结果发现,液态脂质比例、复合乳化剂用量、主药用量对包封率的影响较大。故本研究进一步以液态脂质比例( $X_1$ )、复合乳化剂用量( $X_2$ )、主药用量( $X_3$ )作为考察因素,以包封率( $Y$ )为考察指标(响应值),通过星点设计-响应面法优化Cel-NLC的制备工艺。因素与水平见表3,星点设计表及响应值结果见表4。

2.5.2 方程拟合 运用Design-Expert V 8.0.6软件对试验结果进行分析,软件内模型拟合功能显示,采用二次

表3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素		
	$X_1$ (液态脂质比例), %	$X_2$ (复合乳化剂用量), mg	$X_3$ (主药用量), mg
-1.732	30	160	6
-1	34	176	6.8
0	40	200	8
1	46	224	9.2
1.732	50	240	10

表4 星点设计表及响应值结果

Tab 4 Central composite design and response value result

编号	因素			$Y, \%$
	$X_1, \%$	$X_2, \text{mg}$	$X_3, \text{mg}$	
1	1	1	1	65.22
2	-1	1	1	60.48
3	1	-1	1	62.18
4	-1	-1	1	71.11
5	1	1	-1	68.92
6	-1	1	-1	70.46
7	1	-1	-1	65.00
8	-1	-1	-1	67.38
9	0	1.732	0	59.45
10	0	-1.732	0	70.15
11	-1.732	0	0	76.52
12	1.732	0	0	72.03
13	0	0	-1.732	80.38
14	0	0	1.732	71.18
15	0	0	0	83.49
16	0	0	0	85.18
17	0	0	0	84.29
18	0	0	0	84.92
19	0	0	0	86.47
20	0	0	0	83.86

多项式方程拟合效果较好,拟合方程为  $Y = -803.660 + 7.006X_1 + 5.158X_2 + 61.773X_3 + 0.0126X_1X_2 - 0.005X_1X_3 - 0.063X_2X_3 - 0.121X_1^2 - 0.013X_2^2 - 3.138X_3^2$  ( $R^2 = 0.8982$ ,  $P < 0.0001$ )。计算出模型  $Y$  失拟项的平方和为 5.75,  $P = 0.13 > 0.05$ , 表明本模型没有失拟现象, 可用于 Cel-NLC 处方的分析及预测。方差分析结果见表 5。

表5 方差分析结果

Tab 5 Results of variance analysis

误差来源	自由度	离均差平方和	F	P
模型	9	152.37	11.63	0.0003
$X_1$	1	18.03	1.38	0.2680
$X_2$	1	26.31	2.01	0.1869
$X_3$	1	33.87	2.58	0.1390
$X_1X_2$	1	26.32	2.01	0.1868
$X_1X_3$	1	29.13	2.35	0.1795
$X_2X_3$	1	26.61	2.03	0.1846
$X_1^2$	1	298.65	22.79	0.0008
$X_2^2$	1	887.40	67.72	<0.0001
$X_3^2$	1	321.71	24.55	0.0006

由表 5 可知, 此模型的  $F = 11.63$  ( $P < 0.001$ ), 表明此模型具有显著性。并且, 二次项  $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  对试验结果

有极显著的影响 ( $P < 0.001$ ), 表明所得回归方程能很好地预测 Cel-NLC 包封率随考察因素的变化, 佐证了本研究中选取的 3 个因素均为该模型的显著性影响因素。

2.5.3 响应面分析 以 Design-Expert V 8.0.6 软件分别绘制 3 个因素两两交互对 Cel-NLC 包封率的响应面曲线图和等高线图, 通过响应面曲线的变化情况和等高线的稀疏程度可直观反映出各因素对 Cel-NLC 包封率的影响, 结果见图 3。

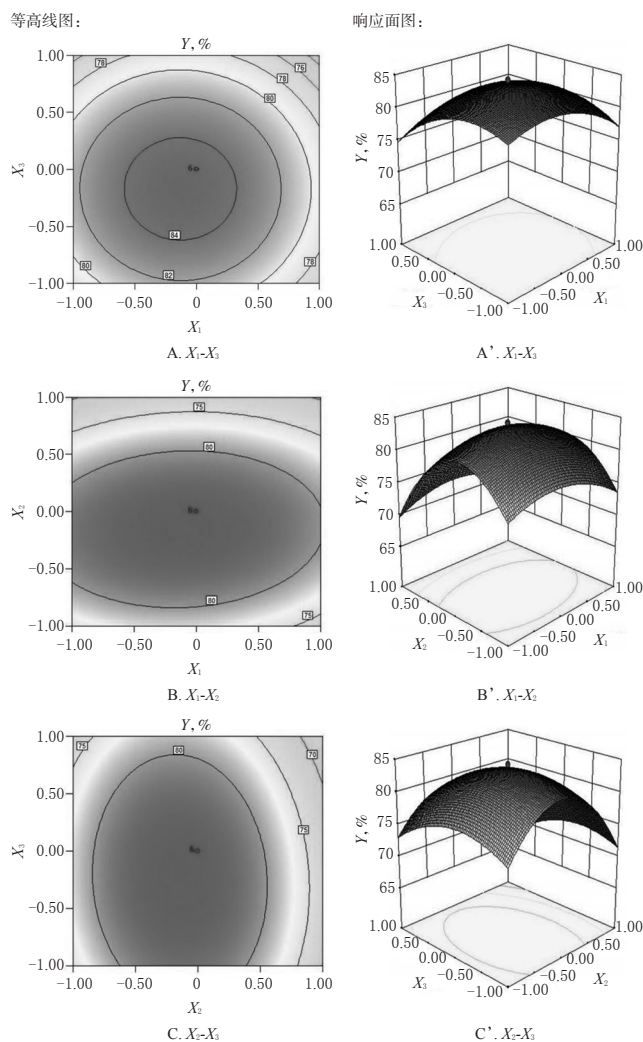


图3 各因素两两交互对 Cel-NLC 包封率影响的等高线图和响应面图

Fig 3 Contour map and response surface map for the effects of variables interaction on encapsulation rate of Cel-NLC

由图 3 可知, 包封率 ( $Y$ ) 与液态脂质比例 ( $X_1$ )、复合乳化剂用量 ( $X_2$ ) 以及主药用量 ( $X_3$ ) 的关系密切。随着  $X_1$  升高、 $X_2$  增加以及  $X_3$  的增加, 包封率先升高后降低, 且趋势明显。因此在合适的液态脂质比例、复合乳化剂用量、主药用量下, 包封率会有极大值, 且应位于响应曲面的顶部。

2.5.4 响应面优化与预测 在满足 Cel-NLC 包封率最

大化条件下,利用 Design-Expert V 8.0.6 软件优化处方,得到最优处方为液态脂质比例 38.89%、复合乳化剂用量 195.58 mg、主药用量 7.86 mg。考虑到实际操作,将 Cel-NLC 最优处方调整为液态脂质比例为 39%、复合乳化剂用量为 196 mg、主药用量为 8 mg。

2.5.5 验证试验 按最优化后的处方工艺条件,平行制备 3 批 Cel-NLC,按“2.3”项下方法测定包封率。结果,3 批 Cel-NLC 的包封率分别为 87.23%、87.53%、86.89%,平均包封率为 87.22%,RSD=0.37% ( $n=3$ )。与预测值 85.13% 的相对误差为 2.46%,低于 5%,说明优选的工艺准确、可靠。

## 2.6 Cel-NLC 的表征

2.6.1 Cel-NLC 的外观 取按最优处方工艺制备的 Cel-NLC,用肉眼进行外观观察。结果,Cel-NLC 为黄色半透明的澄清液体,肉眼观察外观均匀,未见不溶性颗粒,Cel-NLC 的外观见图 4。



图 4 Cel-NLC 的外观  
Fig 4 Appearance of Cel-NLC

2.6.2 Cel-NLC 的粒径及 Zeta 电位 取按最优处方工艺制备的 Cel-NLC 1 滴,加水 1 mL 稀释后,置于纳米粒度及 Zeta 电位分析仪中测定其粒度分布及 Zeta 电位。结果,测得粒径为  $(41.2 \pm 1.1)$  nm、多分散指数(PDI)为  $0.14 \pm 0.28$ ,Zeta 电位为  $(-18.4 \pm 0.2)$  mV ( $n=3$ ),Cel-NLC 的粒径和 Zeta 电位分布图见图 5。

2.6.3 Cel-NLC 的微观形态观察 采用透射电子显微镜观察 Cel-NLC 的微观形态。结果,样品中粒子呈类球形,粒径大小与“2.6.2”项下检测结果基本吻合,Cel-NLC 的透射电镜图见图 6。

2.6.4 稳定性考察 取 3 批 Cel-NLC 样品,分别于室温 ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 和  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏下保存,分别于 0、7、15、30 d 取样,肉眼观察外观变化,考察其稳定性。结果,Cel-NLC 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下放置 30 d,外观均匀,不分层,无沉淀;在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下放置 15 d 时,肉眼可见出现絮凝,但振摇后可恢复;在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下放置 30 d 时,已出现不可逆沉淀。以上

结果表明,Cel-NLC 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏下保存 30 d 内比较稳定。

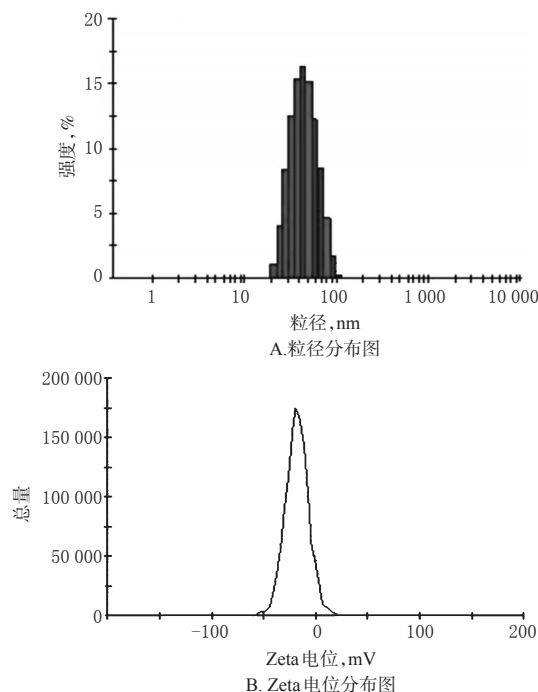


图 5 Cel-NLC 的粒径和 Zeta 电位分布图

Fig 5 Particle size and Zeta-potential distribution of Cel-NLC

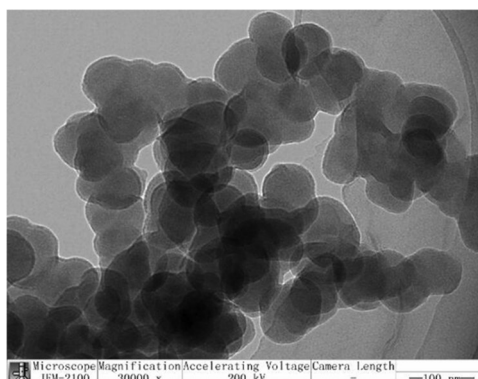


图 6 Cel-NLC 的透射电镜图  
Fig 6 Picture of Cel-NLC by TEM

## 3 讨论

在前期研究中,笔者曾分别采用熔融乳化超声法、薄膜超声分散法和溶剂扩散法以相同质量双硬脂酸甘油酯、肉豆蔻酸异丙酯、Cel 为油相,相同体积嵌段式聚醚 F-68 和 TPMS 为水相制备 Cel-NLC。试验结果表明,采用溶剂扩散法制得的 Cel-NLC 体系不稳定, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 1 d 即产生絮凝;采用薄膜超声分散法制得的 Cel-NLC 粒径较大,在 190 nm 左右,静置易浑浊;而采用熔融乳化超声法制得的 Cel-NLC 粒径在 40 nm 左右,且纳米体系稳定,故最终选择熔融乳化超声法制备 Cel-NLC。

包封率是 NLC 重要的评价指标<sup>[15]</sup>。对于不同性质的 NLC,适合的包封率测定方法各有不同。微柱离心法

测定 NLC 包封率所需时间短、葡聚糖凝胶用量少,且对 NLC 的稀释倍数小,可有效地将 NLC 与游离药物分离<sup>[16]</sup>。在本研究中,笔者采用 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶微柱离心和 HPLC 法联合应用测定 Cel-NLC 包封率,取得了较好的结果。在试验过程中,笔者发现离心处理时转速对微型凝胶柱的形成具有重要作用,转速过小凝胶失水量少,无法脱离注射器成柱,但转速过高会导致微型凝胶柱断裂,经过反复试验后最终确定以 2 000 r/min 离心 2 min,此时既可使微型凝胶柱失水收缩,又不会引起凝胶的断裂,从而达到理想的分离效果。

将单硬脂酸甘油酯中微量的双硬脂酸甘油酯提到 80% 以上可称为双硬脂酸甘油酯,其脂质特性更优于单硬脂酸甘油酯,在本研究中也证实了这一点。本研究以双硬脂酸甘油酯作为固态脂质材料比单硬脂酸甘油酯包封率高 11.9%,故选择双硬脂酸甘油酯作为固态脂质材料。采用固态和液态混合脂质材料作为载体,能增加 NLC 的晶格混乱度,解决了 SLN 脂质粒径变大、凝胶化趋势,以及由于 NLC 的晶体结构而导致的包封率低等问题<sup>[17-18]</sup>。在预试验中笔者发现,用固态脂质和液态脂质作为载体制得的 Cel-NLC 在稳定性、载药量和 PDI 指数方面均优于单独使用固态脂质材料,且粒径在 100 nm 以内,这提示制备的 Cel-NLC 具有被动靶向性。乳化剂可以改变 NLC 中脂质的结晶行为,避免脂质裸露于颗粒的表面,降低颗粒间发生聚集的可能性,然而乳化剂用量过多也会影响 NLC 的稳定性并会增加毒性<sup>[19]</sup>。嵌段式聚醚 F-68 是 NLC 常用的乳化剂,但在本研究制备 Cel-NLC 时,不断增加嵌段式聚醚 F-68 用量,Cel-NLC 的稳定性均较低,而发现用 TPGS 和嵌段式聚醚 F-68 形成复合乳化剂后,Cel-NLC 包封率和稳定性都明显提高,于是在本研究中采用复合乳化剂作为 NLC 的水相。

综上所述,本研究优化了 Cel-NLC 的制备处方工艺,制得的 Cel-NLC 粒径较小且分布均匀、包封率高,为 Cel 的后续开发及研究拓宽了思路并提供了试验依据。

## 参考文献

- [1] 袁菱,童德银.雷公藤红素及其制剂的抗肿瘤研究进展[J].中国医院药学杂志,2016,36(14):1224-1229.
- [2] MI C, SHI H, MA J, et al. Celastrol induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits their invasion via downregulation of MMP-9[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(6): 2527-2532.
- [3] 钟丽芳,吴春敏.8种雷公藤单体免疫抑制活性的筛选[J].康复学报,2014,24(5):28-31.
- [4] 王慧.雷公藤红素的长期毒性研究[J].中国民族民间医药,2017,26(6):39-45.
- [5] JANAGAM DR, WU L, LOWE TL. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017. DOI: 10.1016/j.addr.2017.04.001.
- [6] XU W, LEE MK. Development and evaluation of lipid nanoparticles for paclitaxel delivery: a comparison between solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers [J]. *J Pharm Investig*, 2015, 45(7): 675-680.
- [7] 阮婧华,肖吉娇,朱迪,等.口服槲皮素纳米结构脂质载体的制备及体外评价[J].华西药理学杂志,2010,25(4):403-405.
- [8] RODRIGUES DA SILVA GH, RIBEIRO LNM, MITSU-TAKE H, et al. Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine [J]. *Int J Pharm*, 2017, 529(1/2): 253-263.
- [9] 刘艳杰,项荣武.星点设计效应面法在药理学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学,2007,24(6):455-457.
- [10] MANJUNATH K, REDDY JS, VENKATESWARLU V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2005, 27(2): 127-144.
- [11] 秦晶,陈大为,乔明曦,等.微柱离心法测定阿魏酸脂质体的包封率[J].中国药理学杂志,2007,42(14):1116-1117.
- [12] 郭一沙.辣椒碱纳米结构脂质载体的制备及其特性考察[D].石家庄:河北医科大学,2013.
- [13] 张文娟,陈一桢,唐兰如,等.二氢杨梅素长循环纳米脂质体的制备及大鼠体内药动学研究[J].中草药,2018,49(4):806-813.
- [14] 苏艳莹,雷小小,桂卉,等.星点设计-效应面法优化山茱萸总环烯醚萜苷脂质体的制备工艺[J].中国药房,2018,29(19):2612-2616.
- [15] HONARY S, EBRAHIMI P, HADIANAMREI R. Optimization of particle size and encapsulation efficiency of vancomycin nanoparticles by response surface methodology [J]. *Pharm Dev Technol*, 2014, 19(8): 987-998.
- [16] CHU Y, LI D, LUO YF, et al. Preparation and in vitro evaluation of glycyrrhetic acid-modified curcumin-loaded nanostructured lipid carriers[J]. *Molecules*, 2014, 19(2): 2445-2457.
- [17] MEHNERT W, MÄDER K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(2/3): 165-196.
- [18] DAS S, CHAUDHURY A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery[J]. *Aaps Pharmscitech*, 2011, 12(1): 62-76.
- [19] 何建丹,赵海燕,朱迪冰,等.白藜芦醇纳米结构脂质载体的制备[J].绿色科技,2018(18):195-198.

(收稿日期:2019-01-18 修回日期:2019-03-28)

(编辑:林 静)