

## 星点设计-效应面法优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒处方

严春临<sup>1</sup>, 张季<sup>2</sup>, 刘敏<sup>2</sup>, 徐梦<sup>2</sup>, 侯勇<sup>2</sup>, 薛贵平<sup>2</sup>

1. 河北北方学院基础医学院, 河北 张家口 075000

2. 河北北方学院药理学系, 河北 张家口 075000

**摘要:** 目的 优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒(Rut-SLN)的处方。方法 以薄膜-超声法制备Rut-SLN, 以包封率、平均粒径、Zeta电位为评价指标, 采用星点设计考察单硬脂酸甘油酯/主药质量比(A)、卵磷脂/单硬脂酸甘油酯质量比(B)、泊洛沙姆188质量(C)3因素对包封率、平均粒径、Zeta电位的影响, 以效应面法选取最佳处方条件进行预测分析。结果 根据优化处方制得Rut-SLN的包封率、平均粒径、Zeta电位分别为84.27%、122.6 nm、-20.7 mV。结论 优选的Rut-SLN处方稳定可行, 包封率高, 稳定性好, 可用于生产。

**关键词:** 吴茱萸次碱; 固体脂质纳米粒; 星点设计; 效应面法; 包封率; Zeta电位; 平均粒径; 薄膜-超声法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1307-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.010

## Optimization of rutaecarpine solid lipid nanoparticles by central composite design and response surface methodology

YAN Chun-lin<sup>1</sup>, ZHANG Ji<sup>2</sup>, LIU Min<sup>2</sup>, XU Meng<sup>2</sup>, HOU Yong<sup>2</sup>, XUE Gui-ping<sup>2</sup>

1. Basic Medical College, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

**Abstract: Objective** To optimize the prescription of rutaecarpine solid lipid nanoparticles (Rut-SLN). **Methods** Using the film-ultrasound method to lining-up the Rut-SLN, with the entrapment efficiency (EE), Zeta potential, and the average particle size as the evaluation indexes, using central composite design to inspect the effects of glycerol monostearate/drug quality ratio (A), soybean lecithin for injection/glycerol monostearate mass ratio (B), Poloxamer 188 (C) on three factors of the EE, Zeta potential, and average particle size. Prediction and analysis for selecting the best prescription condition were carried out by using the response surface method. **Results** According to the optimized prescription, the EE, Zeta potential, and the average particle size of Rut-SLN was respectively 84.27%, 122.6 nm, and -20.7 mV. **Conclusion** The optimal prescription of Rut-SLN has better stability, feasibility, and high EE, which is suitable for the production.

**Key words:** rutaecarpine; solid lipid nanoparticles; central composite design; response surface methodology; entrapment efficiency; Zeta potential; average particle size; film-ultrasound method

吴茱萸次碱(rutaecarpine, Rut)是吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的有效成分之一, 具有抗高血压、抗心律不齐、兴奋子宫等作用<sup>[1-2]</sup>。但Rut难溶于水, 口服生物利用度低, 注射对血管有刺激性, 限制了其在临床的应用<sup>[3]</sup>。固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是以天然或合成的生理相容性好、室温下为固态的脂质为基质, 将药物包裹于类脂核中制成粒径为50~1 000 nm的固

体脂质粒子, 其具有良好的生理相容性、广泛的药物适应性等特点, 可提高药物口服生物利用度, 将SLN制成注射剂, 可提高注射给药的靶向性和定位释药能力<sup>[4-5]</sup>。

星点设计(central composite design, CCD)和效应面优化法(response surface method, RSM)采用非线性数学模型对实验结果进行拟合, 具有实验次数相对较少, 精密度高、优选条件预测性好与实

收稿日期: 2014-12-10

基金项目: 河北省卫生厅医学科学研究重点课题指导项目(20130040); 河北省中医药管理局中药类科研项目(2014203); 张家口市局科技计划指导项目(20100195D)

作者简介: 严春临(1981—), 男, 硕士, 讲师, 主要从事中药药剂学与药物动力学研究。Tel: 18931316002 E-mail: yanchunlinycl@163.com

际大生产相吻合等特点<sup>[6]</sup>。因此本实验旨在通过 CCD-RSM 优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒 (rutaecarpine solid lipid nanoparticles, Rut-SLN) 的处方, 考察其体外释放性能及稳定性, 为进一步将 Rut-SLN 制成口服制剂或注射制剂提供实验依据。

## 1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; UV9100DPC 紫外分光光度计, 北京莱博泰科仪器有限公司; BSA2235 电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; 85-2A 测速数显恒温磁力搅拌器, 常州朗越仪器制造有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; WH-90A 微型旋涡混合器, 上海振荣科学仪器有限公司; KQ-400KBV 高功率数控超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 日立 H-7650 透射电镜, 日本日立公司; Zetasizer 激光粒度测定仪, 英国 Malvern 公司; ZRS-8G 智能溶出试验仪, 天津市盛鑫通达科技有限公司。

Rut 对照品, 中国食品药品检定研究院, 质量分数 99.34%, 批号 130421-301025; Rut 原料, 南京泽朗医药科技有限公司, 质量分数 99.2%, 批号 20130921; 卵磷脂 (注射用)、单硬脂酸甘油酯 (药用), 上海太伟药业有限公司; 泊洛沙姆 188, 上海生物化学试剂公司, 药用; 聚山梨酯 80, 国药集团化学试剂有限公司; 氯仿、丙酮为分析纯; 甲醇为色谱纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 Rut-SLN 制备条件的初选

**2.1.1 辅料的选择** 参考文献方法<sup>[7-8]</sup>, 在预试验中分别采用硬脂酸、单硬脂酸甘油酯作为脂质载体, 试验发现以硬脂酸做脂质载体时成膜性不好而且制成的 SLN 稳定性差, 短时间内即成絮状, 以单硬脂酸甘油酯为脂质载体时成膜性、稳定性均较好, 因此选择单硬脂酸甘油酯为脂质载体。

**2.1.2 水合温度与水合时间的选择** 预试验中分别采用 pH 7.4 的磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液、生理盐水、纯化水为水合试剂。以 PBS 缓冲溶液为水合溶剂时, Rut-SLN 混悬液分层, 不均匀; 以生理盐水及纯化水为水合溶剂时水合效果好, 形成的 Rut-SLN 混悬液分散均匀且质量稳定, 因纯化水廉价易得, 本实验中选择纯化水为水合试剂; 实验中分别选择 30、40、50、60、70 °C 作为水合温度, 当水合温度

低于 40 °C 时形成的 SLN 不均一, 当水合温度为 50~70 °C 时制备的 Rut-SLN 稳定、均一, 考虑到温度过高可能会影响药物的稳定性, 因此选择 50 °C 作为水合温度, 实验中分别以 0.5、1.0、1.5 h 作为旋转蒸发水合时间, 当旋转蒸发水合时间低于 1 h, 难以将药物脂质膜水合完全, 时间过长会费时费力, 因此选择旋转蒸发水合时间为 1 h; 为了保证制备的 SLN 水合完全, 提高其稳定性, 参考文献方法<sup>[5]</sup>采用室温水合 3 h 后同时配合超声 5 min (超声频率 25 kHz, 超声功率 700 W), 形成的稳定的 Rut-SLN 混悬液。

### 2.2 Rut-SLN 制备方法

采用薄膜-超声法, 按处方量精密称取适量单硬脂酸甘油酯、卵磷脂溶于 10 mL 氯仿, 加入 1 mL 聚山梨酯-80, 超声混合均匀置于 500 mL 茄形瓶中, 精密称取 Rut 适量 (约 50 mg) 溶于 10 mL 丙酮, 加入茄形瓶中, 超声至混匀, 减压旋转蒸发去除有机溶剂, 在瓶壁上形成一层脂质薄膜, 抽真空 15 min, 然后加入 25 mL 泊洛沙姆 188 水溶液, 室温水合 1 h, 超声 5 min 至形成 Rut-SLN 混悬液, 置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

### 2.3 定量测定方法的建立

**2.3.1 检测波长的选择** 取适量 Rut 对照品用甲醇溶解, 在波长 200~700 nm 内进行光谱扫描, 按处方量称取适量辅料制备空白 SLN 并用甲醇溶解后采用同样方法进行光谱扫描, 选择最佳检测波长。通过紫外可见分光光度计扫描, Rut 在 348 nm 处有明显吸收, 空白 SLN 在 348 nm 基本无吸收, 不干扰 Rut 定量测定, 因此选择 348 nm 作为检测波长。

**2.3.2 色谱条件** 色谱柱为 Elite C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水 (95:5) 为流动相, 柱温 30 °C, 检测波长 348 nm, 体积流量 0.8 mL/min, 进样量 20 μL, 分别测定 Rut 对照品溶液、Rut-SLN 及空白脂质体 (按照 Rut-SLN 处方及制备工艺进行制备, 但不含 Rut) 中 Rut 的量, Rut 的保留时间为 4.98 min, 结果见图 1。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 精密量取 Rut-SLN 3.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 12 000 r/min 低温离心 20 min, 上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 续滤液即为供试品溶液。

**2.3.4 线性关系的考察** 精密称取 Rut 对照品 5.0 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得 50 μg/mL 的 Rut 储备液。分别精密吸取 Rut

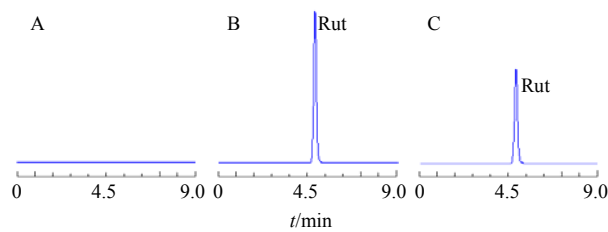


图 1 空白 SLN (A)、Rut 对照品 (B)、Rut-SLN 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank SLN (A), Rut reference substance (B) and Rut-SLN sample (C)

储备液 1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0、10.5 mL 至 25 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，配制成质量浓度为 3.0、6.0、9.0、12.0、15.0、18.0、21.0  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液，0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过，进样 20  $\mu\text{L}$ ，以“2.3.2”项下色谱条件进行定量测定，记录峰面积，以峰面积对 Rut 质量浓度做线性回归，得回归方程为  $Y=4\ 783+108\ 684 X$ ， $r^2=0.999\ 9$ ，表明 Rut 在 3.0~21.0  $\mu\text{g/mL}$  线性关系良好。

**2.3.5 精密度试验** 精密吸取 50  $\mu\text{g/mL}$  Rut 储备液 6.0、7.5、9.0 mL 至 25 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，制得 12.0、15.0、18.0  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液，以“2.3.2”项下色谱条件进行定量测定，重复进样 5 次，每次 20  $\mu\text{L}$ ，分别测定峰面积，计算峰面积的 RSD 值分别为 0.58%、0.86%、0.37%。

**2.3.6 重复性试验** 精密吸取同一 Rut-SLN 供试品溶液 1 mL，共 5 份，按“2.3.3”项下样品溶液制备方法制备样品，按照“2.3.2”项下色谱条件测定峰面积，计算峰面积的 RSD 值为 0.81%。

**2.3.7 稳定性试验** 取同一 Rut-SLN 供试品溶液 3 mL，按“2.3.2”项下色谱条件，室温放置，于 0、2、4、6、12、24 h 分别进样 20  $\mu\text{L}$ ，测定峰面积，按照回归方程计算 Rut 量并计算其 RSD 为 0.59%，表明 Rut-SLN 样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.8 回收率试验** 准确量取已测定的 Rut-SLN 1.0 mL 9 份，均分 3 组，置 10 mL 量瓶中，每组分别加入 15  $\mu\text{g/mL}$  Rut 储备液 0.80、1.00、1.20 mL，各 3 份。甲醇定容，混匀，离心，取上清液，0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过，按照“2.3.2”项下色谱条件测定峰面积，计算高、中、低 3 组质量浓度的平均回收率分别为 100.21%、99.76%、99.89%，RSD 分别为 1.21%、0.69%、0.76% ( $n=3$ )。

**2.3.9 Rut-SLN 包封率的测定**

(1) Rut-SLN 中总 Rut 的测定方法：精密量取

Rut-SLN 0.5 mL，用甲醇稀释至 3.0 mL，于 12 000 r/min 低温 (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 离心 20 min，取上清液 1.0 mL 过 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜，按照“2.3.2”项下色谱条件，测定 Rut 峰面积，计算 Rut-SLN 中总 Rut 的量 ( $C_{\text{总}}$ ) [7]。

(2) Rut-SLN 中已包封 Rut 的测定方法：精密量取制备好的 Rut-SLN 1.0 mL，于 15 000 r/min 低温 (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 离心 1 h，弃去上清液，沉淀中准确加入 1.0 mL 甲醇，旋涡混合后超声 5 min 至完全溶解，混匀，用 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过，按照“2.3.2”项下色谱条件，测定 Rut 峰面积，计算 Rut-SLN 中已包封 Rut 的量 ( $C_{\text{册}}$ )。采用公式计算包封率 (包封率 =  $C_{\text{册}}/C_{\text{总}}$ )。

(3) 加样回收率试验：分别精密量取 9 份空白脂质体 1.0 mL，分为 3 组，分别加入 15  $\mu\text{g/mL}$  Rut 储备液 0.80、1.00、1.20 mL，混匀后于 15 000 r/min 低温离心 1 h，取上清液 1.0 mL 过 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜，按照“2.3.2”项下色谱条件，测定 Rut 峰面积，并带入回归方程计算游离 Rut 的质量浓度即为测得量，以测得量/加入量计算加样回收率。结果可见游离 Rut 在空白 SLN 中的平均回收率为 99.60%，平均 RSD 为 0.48%，表明低温超速离心 1 h 可较好的将游离药物与 SLN 完全分离，因此本实验所采用的低温超速离心法测定 Rut-SLN 包封率快速、可靠。

**2.4 Rut-SLN 的处方优化**

**2.4.1 因素水平的确定** 在预试验基础上，参考文献报道 [8]，选择对 Rut-SLN 性质影响较显著的 3 个因素作为考察对象，即单硬脂酸甘油酯/主药质量比 (A)、卵磷脂/单硬脂酸甘油酯质量比 (B)、泊洛沙姆 188 质量 (C)，因素水平表见表 1。分别以包封率、平均粒径和 Zeta 电位作为评价指标，采用 Design-Expert 8.0 软件进行试验设计，实验设计见表 1。

**2.4.2 模型拟合与效应面优化** 采用 Design-Expert 8.0 软件对数据进行处理及效应面处方优化，分别以包封率 ( $Y_1$ )、平均粒径 ( $Y_2$ ) 和 Zeta 电位 ( $Y_3$ ) 为因变量，以单硬脂酸甘油酯/主药质量比 (A)、卵磷脂/单硬脂酸甘油酯质量比 (B)、泊洛沙姆 188 质量 (C) 为自变量进行模型拟合，结果表明各因变量与自变量以二项式方程拟合时相关系数 ( $R$ ) 最大， $Y_1$ 、 $Y_2$  和  $Y_3$  二项式拟合方程分别为  $Y_1=78.31-4.41 A+2.28 B+5.92 C+1.39 AB+9.89 AC+5.41 BC-13.09 A^2-1.15 B^2-4.60 C^2$ ， $R^2=0.914\ 2$ ； $Y_2=$

表 1 试验设计与结果 (n = 3)

Table 1 Design and results of central composite test (n = 3)

编号	A	B	C/mg	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /nm	Y <sub>3</sub> /mV	编号	A	B	C/mg	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /nm	Y <sub>3</sub> /mV
1	2.67 (-1)	1.85 (-1)	56.9 (-1)	65.32	189.5	-37.6	11	4 (0)	1 (-1.732)	80 (0)	75.25	108.5	-54.1
2	5.33 (1)	1.85 (-1)	56.9 (-1)	40.41	192.6	-48.5	12	4 (0)	5 (1.732)	80 (0)	71.33	109.5	-20.2
3	2.67 (-1)	4.15 (1)	56.9 (-1)	68.31	201.6	-20.2	13	4 (0)	3 (0)	40 (-1.732)	58.25	221.0	-25.1
4	5.33 (1)	4.15 (1)	56.9 (-1)	35.13	135.7	-37.9	14	4 (0)	3 (0)	120 (1.732)	67.63	95.3	-18.5
5	2.67 (-1)	1.85 (-1)	103.1 (1)	58.31	99.6	-48.1	15	4 (0)	3 (0)	80 (0)	75.96	210.2	-28.5
6	5.33 (1)	1.85 (-1)	103.1 (1)	59.14	88.6	-46.4	16	4 (0)	3 (0)	80 (0)	80.22	230.1	-27.1
7	2.67 (-1)	4.15 (1)	103.1 (1)	69.11	96.1	-21.3	17	4 (0)	3 (0)	80 (0)	86.14	211.3	-30.1
8	5.33 (1)	4.15 (1)	103.1 (1)	89.31	98.3	-22.1	18	4 (0)	3 (0)	80 (0)	75.51	192.3	-28.7
9	1 (-1.732)	3 (0)	80 (0)	44.63	152.5	-41.6	19	4 (0)	3 (0)	80 (0)	76.77	241.3	-27.5
10	7 (1.732)	3 (0)	80 (0)	30.36	100.7	-58.2	20	4 (0)	3 (0)	80 (0)	75.24	192.1	-38.9

212.88-11.52 A-2.63 B-39.61 C-6.97 AB+6.75 AC+6.38 BC-27.52 A<sup>2</sup>-33.39 B<sup>2</sup>-17.01 C<sup>2</sup>, R<sup>2</sup>=0.941 6; Y<sub>3</sub>=-30.13-4.03 A+9.84 B+1.27 C-1.16 AB+3.69 AC+2.89 BC-6.39 A<sup>2</sup>-2.14 B<sup>2</sup>+2.97 C<sup>2</sup>, R<sup>2</sup>=0.959 7。

对各指标进行方差分析, 结果见表 2~4, 结果表明, Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub> 和 Y<sub>3</sub> 通过二项式拟合的模型均具有显著性差异 (P<0.01), 根据 P 值可知 A 和 C 对 Y<sub>1</sub> 的影响更加显著, 而 A 和 B 对 Y<sub>2</sub> 和 Y<sub>3</sub> 更加显著,

因此在响应面分析时, 分别选择对 Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>、Y<sub>3</sub> 影响较显著的 2 个因素为因变量, 另一个因素的中心点值作为固定值, 采用 Design-Expert 8.0 软件绘制三维效应面图, 见图 2。Y<sub>1</sub> 是影响 SLN 质量的主要因素之一, 因此本实验以 Y<sub>1</sub> 为主要影响指标, 以 Y<sub>2</sub> 和 Y<sub>3</sub> 尽量小为依据选择最佳处方条件为 A=0.39、B=1、C=0.86, 即以 Rut 10 mg、单硬脂酸甘油酯 45 mg、卵磷脂 187 mg、泊洛沙姆 188 为 100 mg 的处方制备 Rut-SLN。

表 2 包封率回归模型方差分析

Table 2 Analysis of variance for regression model on EE

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	4 717.00	9	11.84	0.000 3	A <sup>2</sup>	2 696.87	1	60.93	<0.000 1
A	272.59	1	6.16	0.032 5	B <sup>2</sup>	20.97	1	0.47	0.506 9
B	72.64	1	1.64	0.229 1	C <sup>2</sup>	333.82	1	7.54	0.020 6
C	491.44	1	11.10	0.007 6	残差	442.63	10		
AB	15.40	1	0.35	0.568 4	失拟项	352.52	5	3.91	0.080 3
AC	782.50	1	17.68	0.001 8	纯误差	90.12	5		
BC	233.93	1	5.28	0.044 3	总和	5 159.63	19		

表 3 平均粒径回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression model on average particle size

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	52 978.82	9	5 886.54	<0.000 1	A <sup>2</sup>	11 930.88	1	11 930.88	
A	1 858.87	1	1 858.87	0.038 8	B <sup>2</sup>	17 559.22	1	17 559.22	0.000 1
B	97.09	1	97.09	0.598 7	C <sup>2</sup>	4 555.15	1	4 555.15	<0.000 1
C	21 963.65	1	21 963.65	<0.000 1	残差	3 287.81	10	328.78	0.004 0
AB	389.20	1	389.20	0.302 1	失拟项	1 318.56	5	263.71	
AC	364.50	1	364.50	0.317 2	纯误差	1 969.25	5	393.85	0.664 7
BC	325.13	1	325.13	0.343 5	总和	56 266.63	19		

表4 Zeta 电位回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for regression model on Zeta potential

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	2 715.07	9	301.67	<0.000 1	A <sup>2</sup>	644.00	1	56.50	<0.000 1
A	227.63	1	227.63	0.001 2	B <sup>2</sup>	72.43	1	6.35	0.030 3
B	1 356.67	1	1 356.67	<0.000 1	C <sup>2</sup>	139.14	1	12.21	0.005 8
C	22.46	1	22.46	0.190 7	残差	113.98	10		
AB	10.81	1	10.81	0.353 1	失拟项	16.26	5	0.17	0.964 4
AC	108.78	1	108.78	0.011 5	纯误差	97.71	5		
BC	66.70	1	66.70	0.036 1	总和	2 829.04	19		

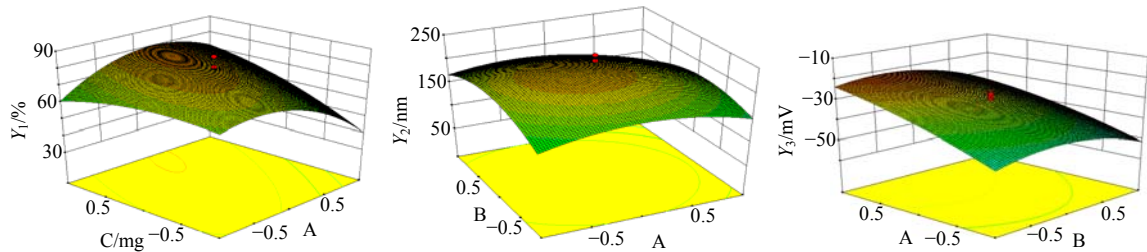


图2 三维效应面图

Fig. 2 3D response surface

2.5 最优处方工艺验证

按照选定的处方工艺重复制备 3 批 Rut-SLN 并测定其包封率、平均粒径和 Zeta 电位，并将预测值与实测值进行比较，计算偏差 [偏差=(实测值-预测值)/预测值]，结果见表 5。结果表明包封率和平均粒径的实测值与预测值偏差较小，均在 5.0% 以内，而 Zeta 电位的偏差较大为 11.89%，实测值为

-20.7 mV，符合 SLN 稳定性要求，因此本实验所拟合的多元二项方程能够较好地反映各因变量与自变量间的关系，具有一定的可行性。

2.6 Rut-SLN 物理性质考察

称取适量 Rut-SLN，用纯化水稀释至适当浓度，滴至载玻片上，以 2% 磷钨酸负染后转移至专用铜网上，自然挥干，透射电镜观察粒径大小和形态并

表5 工艺验证结果 (n = 3)

Table 5 Result of process validation (n = 3)

编号	包封率/%			平均粒径/nm			Zeta 电位/mV		
	预测值	实测值	偏差/%	预测值	实测值	偏差/%	预测值	实测值	偏差/%
1	85.86	82.39	4.04	127.2	130.3	-2.44	-18.5	-18.8	-1.62
2	85.86	86.01	-0.17	127.2	121.0	4.87	-18.5	-22.3	-20.51
3	85.86	84.41	1.68	127.2	116.5	8.41	-18.5	-21.0	-11.90
均值	85.86	84.27	1.85	127.2	122.6	3.61	-18.5	-20.7	-11.89

拍片，所得结果见图 3。结果可见 Rut-SLN 呈椭球形或圆球形，粒子均匀分散，未见粘连聚集现象。取 Rut-SLN 混悬液适量，采用 Nano-ZS90 粒径分析仪分别测定平均粒径及 Zeta 电位，结果见图 4。Rut-SLN 的粒径范围分布在 90~190 nm，平均粒径为 122.6 nm，多分散指数(polydispersity, PDI)为 0.247，其 Zeta 电位分布在 -35~-15 mV，属于纳米给药系统的稳定体系。

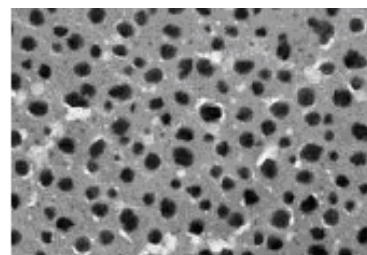


图3 Rut-SLN 电镜扫描图

Fig. 3 SEM scanogram of Rut-SLN



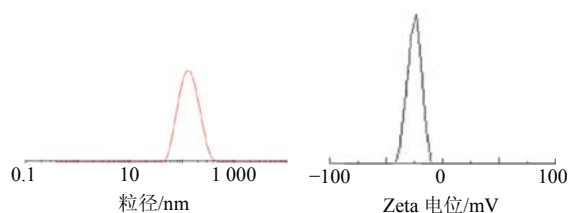


图 4 Rut-SLN 平均粒径和 Zeta 电位分布图

Fig. 4 Distribution of average particle size and Zeta potential of Rut-SLN

2.7 Rut-SLN 体外释放度和稳定性考察

2.7.1 溶出度考察 取约 10 cm 的透析袋，置于蒸馏水中，煮沸 20 min，浸泡 24 h，再用蒸馏水润洗，精密量取制得的 Rut-SLN 适量（相当于含 Rut 1.5 mg）放于透析袋中，用手术线将口封紧，再将其置于 RC806 溶出试验仪上，另取 Rut 适量，与处方剂量的各辅料进行物理混合，混合均匀后精密量取适量（相当于含 Rut 1.5 mg）放于透析袋中，采用溶出度测定法的第 3 法进行溶出度测定，设定转速为 100 r/min，温度 37 °C，溶出介质为 0.5% 的十二烷基硫酸钠 100 mL，定时取溶出液 1.0 mL，同时补充 1.0 mL 溶出介质，将不同时间取得的溶出液采用“2.3.2”项下色谱条件进行 HPLC 法测定 Rut 的量，并计算各时间点 Rut 的累计溶出量，结果见图 5 和表 6。结果表明，Rut 6 h 时累积溶出量达到 71.52%，12 h 时累积溶出为 84.33%，而 Rut-SLN 释药较慢，

6 h 时累积溶出 Rut 64.32%，12 h 时累积溶出 Rut 达 93.41%，因此 Rut-SLN 具有一定的缓释效应。从表 6 拟合模型来看， $R^2$  越接近 1，表明拟合效果越好，结果表明 Rut 在 0.5% 十二烷基硫酸钠溶液中 12 h 内的释放符合 Weibull 方程， $R^2=0.837 2$ ，Rut-SLN 在 0.5% 十二烷基硫酸钠中 12 h 内的累积释放符合 Ritger-Peppas 模型， $R^2=0.982 1$ ，其中  $n=0.578 7$ ， $0.45 < n < 0.89$ ，为非 Fick 扩散机制<sup>[9]</sup>，药物释放机制为混合型，即药物释放为药物的扩散和骨架溶蚀双重机制，这与 SLN 的制备工艺有关，通过薄膜分散法制备的 SLN 部分药物附着在脂质载体的表面，药物以扩散的方式释放；部分药物包裹在脂质载体的内部，药物以骨架溶蚀的方式释放。

2.7.2 渗漏率的测定 考虑到本实验将进一步对

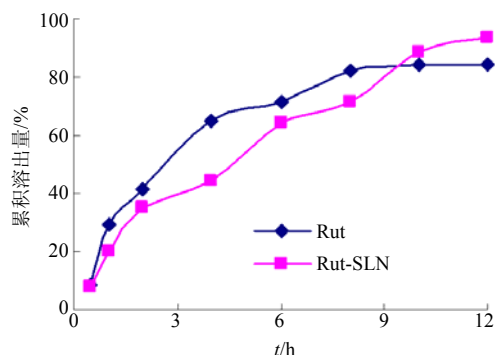


图 5 Rut-SLN 累积溶出曲线

Fig. 5 Cumulative dissolution curve of Rut-SLN

表 6 Rut-SLN 释放拟合模型

Table 6 Fitting model of Rut-SLN release

释放模型	Rut		Rut-SLN	
	拟合方程	$R^2$	拟合方程	$R^2$
零级模型	$Q=6.061 7 t+25.355$	0.824 0	$Q=7.186 6 t+13.982$	0.963 0
一级模型	$\ln(1-Q)=-0.060 6 t+0.746 5$	0.824 0	$\ln(1-Q)=-0.071 9 t+0.860 2$	0.963 0
Higuchi 方程	$Q=0.51 t^{1/2}+33.402$	0.784 4	$Q=-0.200 1 t^{1/2}-1.043 4$	0.580 1
Ritger-Peppas 模型	$Q=0.423 7 t^{0.382 7}$	0.797 1	$Q=0.116 5 t^{0.578 7}$	0.982 1
Weibull 方程	$\ln[1/(1-Q)]=0.287 4 \ln t+0.699 6$	0.837 2	$\ln[1/(1-Q)]=0.230 5 \ln t+0.110 2$	0.788 5

Q 表示 t 时间的累积溶出量，t 表示溶出时间

Q indicates cumulative dissolution rate of t time which is dissolution time

Rut-SLN 进行冷冻干燥，在混悬状态放置的时间不会很长，因此本实验选择 7 d 进行渗漏率的测定，采用“2.3.9”项下方法分别在 Rut-SLN 制备好第 0 天和第 7 天测定 Rut-SLN 中已包封 Rut 的量，分别计为  $C_{Rut0}$  和  $C_{Rut7}$ ，并计算 Rut-SLN 放置 7 d 后的渗漏率，渗漏率 =  $(C_{Rut0} - C_{Rut7}) / C_{Rut0}$ 。结果表明放置 7 d 后 Rut-SLN 渗漏率为 0.42%，说明 Rut-SLN

在室温放置 7 d 性质稳定。

2.7.3 Rut-SLN 复溶性的考察 将制备好的 Rut-SLN 混悬液放于西林小瓶中，并于 -80 °C 的条件下冷冻 0.5 h，于冷冻干燥机中干燥 18 h 直至完全冻干，然后分别用 PBS、蒸馏水、生理盐水溶解冷冻干燥后的样品，制得与原来体积相同的溶液，再采用“2.3.9”项下方法测定 Rut-SLN 复溶后的包封率，

并比较复溶前后包封率变化,同时测定复溶后 Rut-SLN 的平均粒径及 Zeta 电位,结果表明以 PBS、蒸馏水、生理盐水为溶剂溶解的 Rut-SLN 复溶前后包封率偏差分别为 0.67%、0.65%和 0.67%,偏差均小于 1.0%,表明冷冻干燥对 Rut-SLN 包封率并无显著影响,以 PBS、蒸馏水、生理盐水为溶剂溶解的 Rut-SLN 复溶后平均粒径分别为 123.6、122.4、123.8 nm, Zeta 电位分别-21.4、-20.6、-21.8 mV,与冷冻前无显著变化,考虑到临床应用的方便实用性,建议在临床使用中以生理盐水作为 Rut-SLN 冻干粉剂溶剂。

### 3 讨论

星点设计-效应面优化法是一种多元非线性拟合进行实验设计的方法,通过非线性数学模型绘制效应面并优选实验条件,能够较好地保证试验精度,分析各因素之间的相互作用,具有精度高、预测性较好、选择范围大、试验次数少等特点,避免了从实验室研究到工业生产过渡过程中生产工艺的单一性和不一致性<sup>[6]</sup>。本实验采用通过星点设计 3 因素 5 水平制备 Rut-SLN,通过星点设计大大的减少了实验次数,所得实际制备方案与预测方案吻合性好、偏差小,因此本法所确定的制备 Rut-SLN 的最佳配比具有一定的可行性。利用本实验优化所得的处方制备的 Rut-SLN 粒径小、包封率高、稳定性和溶出度均较好,实验中将制备的 Rut-SLN 混悬液进行简单的冷冻干燥,其复溶性良好,可进一步讲其制备为口服制剂或注射剂供临床使用,在今后的实验中将进一步探索 Rut-SLN 冷冻干燥工艺和辅料的添加,为 Rut-SLN 确定了可行的制剂种类。

包封率常用的测定方法有凝胶柱色谱法、透析法、膜分离技术(膜滤、超滤)、低温超速离心、低温低速反复离心等方法;凝胶色谱法测定结果比较准确但操作过程繁琐,透析法则费时费力,膜分离技术操作快捷方便、结果准确,但所用的超滤离心管等属于高额耗材,不合适一般生产使用<sup>[9]</sup>;本实验采用低温高速离心法将游离药物与 SLN 分离并进行包封率的测定,分别通过测定 SLN 中已包封的

Rut 和 SLN 中总的 Rut 的量计算 Rut 的包封率,具有操作简便、快速,实验结果准确等优点,可以在工业大生产过程中广泛推广,因此具有一定的科学性和实用性。

实验中以不同比例的甲醇-水作为流动相,发现当水的比例大于 50%时保留时间过长,本实验选定甲醇-水为 95:5 的比例作为流动相, Rut 出峰快,仅 4.98 min,且甲醇廉价易得,因此该法适合广泛推广。

溶出度实验中分别选择 0.1%、0.3%、0.5%的十二烷基硫酸钠作为释放介质,其中以 0.5%的十二烷基硫酸钠溶出性能最好,本实验即选择 0.5%的十二烷基硫酸钠溶液作为溶出介质,在今后的工作中将进一步进行体内外释放度相关性的实验研究,为 Rut-SLN 的体内外释放提高更多的实验参考。

### 参考文献

- [1] 邱模昌,彭维杰. 吴茱萸次碱药理作用研究进展 [J]. 科技信息, 2012, 5(1): 115-117.
- [2] 薛宝娟,李志慧,张玉杰,等. 吴茱萸次碱对 5 种黄连生物碱大鼠体外肝代谢的抑制作用 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1293-1296.
- [3] 吴海,丁劲松,蒋学华. 吴茱萸次碱在犬体内的药动力学规律 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22(4): 408-410.
- [4] 琚辉,郝存江,尹飞. 固体脂质纳米粒制备方法的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1580-1582.
- [5] 陈玲,周建平. 固体脂质纳米粒研究新进展 [J]. 药学进展, 2003, 27(6): 354-358.
- [6] 郝吉福,房信胜,王建筑,等. 应用 Box-Behnken 实验设计优化水飞蓟素固体脂质纳米粒处方研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2221-2225.
- [7] 张卿,张良珂,袁佩,等. 和厚朴酚固体脂质纳米粒的制备及性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 1875-1879.
- [8] 杨涛,盛欢欢,程雪梅,等. 星点设计-效应面法优化穿心莲内酯固体脂质纳米粒处方 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(9): 752-755.
- [9] 陆彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.