

星点设计-效应面法优化天山雪莲提取物复合磷脂脂质体制备工艺

姜雯¹, 曾诚^{2,3}, 于宁², 谭梅娥², 邢建国^{2*}

1. 新疆医科大学第六附属医院 药剂科, 新疆 乌鲁木齐 830002

2. 新疆药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

3. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

摘要: 目的 采用星点设计-效应面法优化天山雪莲提取物 (*Saussureae Involucratae Herba extract*, SIHE)-复合磷脂脂质体 (composite phospholipid liposome, CPL) 的制备工艺, 并考察其体外释药规律。方法 采用硫酸铵梯度法制备 SIHE-CPL, 通过单因素试验考察磷酸盐缓冲液 pH 值、药脂比 (质量比) 和磷脂与胆固醇质量比对平均粒径和分散指数 (PDI) 的影响。基于单因素, 应用星点设计考察磷脂用量、胆固醇用量 2 个因素对平均粒径、PDI、Zeta 电位和包封率的影响, 对结果进行多元线性和二项式方程拟合, 用效应面法预测最佳处方, 并考察其体外释放特征 (动态透析法), 用傅里叶红外光谱 (FTIR) 和 X 射线衍射光谱 (XRD) 研究 SIHE-CPL 的光谱特征及分子表征。结果 二项式非线性拟合方程优于多元线性回归方程, 理论预测值与实测值偏差较小, 预测性良好。在最佳制备工艺条件下, SIHE-CPL 的平均粒径为 (102.7 ± 5.1) nm, PDI 为 0.154 ± 0.017 , Zeta 电位为 (-28.4 ± 2.2) mV, 绿原酸的包封率为 $(87.68 \pm 2.57)\%$, 芦丁的包封率为 $(84.18 \pm 2.97)\%$, SIHE 和 SIHE-CPL 的体外释放规律均符合一级动力学方程, FTIR 和 XRD 验证了 SIHE-CPL 的形成。结论 SIHE-CPL 具有较低的平均粒径、PDI 和较高的 Zeta 电位、包封率, 星点设计-效应面法可以准确快速地优化 SIHE-CPL 的制备工艺。

关键词: 天山雪莲提取物; 复合磷脂脂质体; 星点设计-效应面法; 体外释放; 红外光谱法; X 射线衍射

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)01-0057-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.009

Optimization on preparation of *Saussureae Involucratae Herba extract*-composite phospholipid liposome by central composite design-response surface method

JIANG Wen¹, ZENG Cheng^{2,3}, YU Ning², TAN Mei-e², XING Jian-guo²

1. Department of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract: Objective To optimize the preparation of *Saussureae Involucratae Herba extract* (SIHE)-composite phospholipid liposome (CPL) by the central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) and to investigate the *in vitro* release of drugs. **Methods** The method of ammonium sulfate transmembrane gradients was adopted to prepare SIHE-CPL. The single factor experiments were used for the key experimental factors and their test ranges. Based on the single factor experiments, with the size of SIHE-CPL, polymery disperse index (PDI), encapsulation efficiency (EE), and Zeta potential as dependent variables, central composite design was adopted to optimize the preparation technology by taking the content of phospholipid and the content of cholesterol as independent variables, test results were fitted by multiple linear and binomial nonlinear equations, and optimum formulation was selected by RSM, then the *in vitro* release behavior of the drug was studied by method of dynamic dialysis. Infrared (IR) spectroscopy and X-ray diffraction (XRD) pattern were used to analyze the spectroscopic properties of SIHE-CPL. **Results** The second-order polynomial equation was superior to the linear one, the observed values agreed well with model predicted values. The optimal process conditions were as follows: Size of SIHE-CPL was (102.7 ± 5.1) nm, PDI was 0.154 ± 0.017 , EE of chologenic acid and rutin was $(87.68 \pm 2.57)\%$ and $(84.18 \pm 2.97)\%$, Zeta potential was (-28.4 ± 2.2) mV, SIHE-CPL and solution of SIHE were both accorded with the first order model, and IR analysis and XRD proved the formation of SIHE-CPL. **Conclusion** The size and PDI of SIHE-CPL are

收稿日期: 2015-09-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260681)

作者简介: 姜雯, 女, 硕士研究生。Tel: 15026018390 E-mail: 523524359@qq.com

*通信作者 邢建国, 男, 研究员, 硕士生导师。Tel: (0991)2300682 E-mail: xjguodd@163.com

low, the EE and Zeta potential of SIHE-CPL are high. CCD-RSM could be successfully used to optimize the prescription of SIHE-CPL.

Key words: *Saussureae Involucratae Herba* extract; composite phospholipid liposome; central composite design-response surface methodology; *in vitro* release; infrared spectroscopic analysis; X-ray diffraction

天山雪莲 *Saussureae Involucratae Herba* 为菊科 (Compositae) 植物雪莲 *Saussurea involucrate* (Kar. et Kir) Sch. -Bip. 的干燥地上部分, 始见于藏药文献《月王药珍》, 清代《本草纲目拾遗》中也有记载^[1], 维吾尔名为“塔格来丽斯”, 系维吾尔医习用药材^[2], 在我国仅分布于新疆天山、昆仑山^[3]。天山雪莲具有温肾助阳、祛风胜湿、通经活血等功效, 同时, 本课题组前期研究已证实天山雪莲提取物 (*Saussureae Involucratae Herba* extract, SIHE) 中主要活性成分为绿原酸和芦丁^[4-5]。但由于 SIHE 脂溶性不高、口服吸收差、生物利用度低, 从而影响药物的临床疗效^[6]。

复合磷脂脂质体 (composite phospholipid liposome, CPL) 是一种由 2 种不同磷脂相间排列和胆固醇组成的类似生物膜结构的拥有不同相区域的磷脂双分子层的球型药物载体^[7], 其特点是在制备过程中采用 2 种不同相变温度的磷脂为膜材 (一种高于常温, 一种低于常温)^[8], 由于复合磷脂脂质体中形成了不同的相区域, 所制得的脂质体能够改善脂溶性药物的溶解度, 从而提高其口服生物利用度^[9]。与传统脂质体相比, 具有更好的稳定性和生物利用度, 并且克服了传统脂质体的载药量偏低和包合率低等问题^[10]。

近年来, 星点设计 (central composite design, CCD)-效应面优化法 (response surface methodology, RSM) 在优化实验中被广泛应用^[11-12], 与常用的正交设计、均匀设计相比, 其实验的准确度高、适用于非线性模型拟合, 预测值更接近真实值^[13-15]。因此, 本实验在单因素试验基础上, 结合 CCD-RSM 设计非线性数学模型优选天山雪莲提取物复合磷脂脂质体 (SIHE-CPL) 的制备工艺, 为其制剂学研究和开发应用提供实验依据; 通过动态透析法观察体外释放特征, 采用傅里叶红外光谱 (FTIR) 和 X 射线衍射光谱 (XRD) 研究 SIHE-CPL 的光谱特征及分子表征, 初步探讨 SIHE-CPL 的体外释药规律。

1 仪器与材料

SPD-10Avp 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 控温加热磁力搅拌器, 德国 IKA 公司; BS110S 型 Sartorius 电子天平, 德国 Sartorius 公司; KQ-100DE

型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; AB135-S 梅特勒-托利多电子天平, 瑞士梅特勒仪器公司; JY92-IIN 超声细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Nano S90 激光粒度仪, 英国马尔文公司。SIHE, 批号 130512, 含绿原酸 3.159%、芦丁 7.908%, 新疆维吾尔自治区药物研究所提供; 大豆磷脂, 德国 lipid 公司, 批号 139017, 质量分数 >95%; 氢化大豆磷脂, 日本精细化工株式会社, 批号 RKL-MD231, 质量分数 >98%; 胆固醇, 分析纯, 中国慧兴生化试剂有限公司, 批号 13126, 质量分数 >95%; 对照品绿原酸 (批号 110753-200413, 质量分数 >99%)、芦丁 (批号 100080-200707, 质量分数 >98%), 中国食品药品检定研究院; 甲醇和乙腈, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; 水为去离子水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 绿原酸、芦丁定量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取绿原酸与芦丁对照品适量, 精密称定, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 制成含绿原酸 52.5 μg/mL、芦丁 50 μg/mL 的混合储备液, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 备用。

2.1.2 SIHE 供试品溶液的制备 精密称取 SIHE 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 备用。

2.1.3 SIHE-CPL 供试品溶液的制备 精密吸取 SIHE-CPL 溶液 1 mL, 加入 1 mL 破膜剂 (无水乙醇-异丙醇 1:4), 超声 5 min, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 即得 SIHE-CPL 供试品溶液。

2.1.4 阴性对照样品溶液的制备 精密吸取空白 CPL 溶液 1 mL, 加入 1 mL 破膜剂 (无水乙醇-异丙醇 1:4), 超声 5 min, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 即得阴性对照样品溶液。

2.1.5 色谱条件 Kromasil C₁₈ 柱谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~13 min, 10%~12%乙腈; 13~40 min, 12%~15%乙腈; 检测波长 353 nm, 柱温 35 °C, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 mL。绿原酸与芦丁混合对照品溶液、SIHE 供试品溶液、SIHE-CPL 供试品溶液、阴性对照样品溶液的色谱图见图 1。

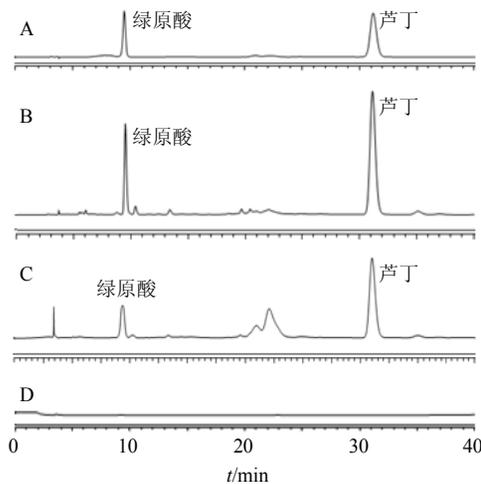


图 1 混合对照品 (A)、SIHE 样品 (B)、SIHE-CPL 样品 (C) 和阴性对照样品 (D) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), SIHE sample (B), SIHE-CPL sample (C), and negative controls (D)

2.1.6 线性关系考察 精密吸取混合对照品储备液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 mL 加甲醇稀释至 10 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过，HPLC 法进样测定。以质量浓度 (C) 为横坐标，峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归，得绿原酸回归方程 $A=26\ 288\ C+722.56$ ， $r=0.999\ 4$ ；芦丁回归方程 $A=23\ 243\ C+6\ 104.6$ ， $r=0.999\ 7$ 。结果表明，绿原酸在 1.31~52.5 μg/mL、芦丁在 1.25~50 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.7 精密度试验 分别取低、中、高质量浓度的绿原酸和芦丁对照品溶液 (1.31、26.9、52.5 μg/mL 和 1.25、25.6、50.0 μg/mL)，用 HPLC 法在 353 nm 下连续测定 6 次峰面积，计算日内精密度，分别在 5 d 内每天用 HPLC 测定峰面积，计算日间精密度。绿原酸和芦丁低、中、高 3 个质量浓度的日内精密度分别为 1.22%、1.41%、0.76%；日间精密度分别为 1.47%、0.85%、1.52%。上述结果表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液，按“2.1.5”项下色谱条件在 0、1、2、4、6、12 h 进样测定峰面积，共测定 6 次，分别测定绿原酸及芦丁峰面积值，结果绿原酸峰面积值 RSD 为 1.42%，芦丁峰面积值 RSD 为 1.78%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 制备一供试品溶液 6 份，按“2.1.5”项下色谱条件测定，分别测定绿原酸及芦丁峰面积值，结果绿原酸质量分数的 RSD 为 0.81%，芦丁质量分数的 RSD 为 0.66%，表明重复性良好。

2.1.10 回收率试验 精密吸取 SIHE-CPL 1 mL，分别加入 1 mL 高、中、低质量浓度的绿原酸 (31.4、15.6、7.1 μg/mL) 和芦丁 (30.7、15.3、6.6 μg/mL) 对照品溶液，混匀，再加入 2 mL 破膜剂 (无水乙醇-异丙醇为 1:4)，超声 2 min，经 0.22 μm 滤膜滤过，用 HPLC 测定峰面积并计算加标回收率。结果高、中、低质量浓度的绿原酸的回收率分别为 100.31%、99.15%、98.29%，RSD 分别为 0.62%、0.97%、1.28% ($n=3$)；高、中、低质量浓度的芦丁的回收率分别为 99.35%、100.49%、100.35%，RSD 分别为 0.92%、0.72%、0.63% ($n=3$)。

2.2 SIHE-CPL 的制备工艺

按一定质量比将氢化大豆磷脂、大豆磷脂和胆固醇，溶于 2 mL 无水乙醇，适当超声使其溶解，注入到磁力搅拌 (60 °C) 的 5 mL、0.2 mol/L 硫酸铵溶液中，50 °C 减压回收乙醇 5 min，取出，调整体积至 25 mL，冰浴探头超声 (400 W，150 次) 匀化后，低速离心 (1 000 r/min，5 min) 除去钛粉，用 10 倍量体积磷酸盐缓冲液 (PBS，pH 7.4) 透析，每次 2 h，共 4 次，除去外水相硫酸铵，制得空白 CPL。取 SIHE 磷酸盐缓冲液与空白 CPL 混匀，60 °C 恒温水浴磁力搅拌 45 min，冰浴中放置 10 min，即得 SIHE-CPL。

2.3 SIHE-CPL 包封率的测定

精密吸取 SIHE-CPL 2 mL，上样经处理的 SephadexG-50 柱 (内径 1 cm，长度 27 cm)，用 pH 7.4 PBS 洗脱，体积流量为 1 mL/min，收集含药 CPL；取同一批 SIHE 无水乙醇溶液用 PBS 溶液 (pH 7.4) 按 1:3 比例稀释；分别以 HPLC 进样 10 μL，测定峰面积，并代入线性方程计算 CPL 中药物的量和游离药物的量。

包封率 = $\frac{\text{CPL 中药物的量}}{\text{CPL 中药物的量} + \text{游离药物的量}}$

2.4 单因素试验考察

2.4.1 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的 pH 值 按照“2.2”项下 SIHE-CPL 的制备方法，设定所用 PBS 的 pH 值分别为 6.8、7.4、8.0，固定其他因素 (药脂比为 1:20 和磷脂与胆固醇比例为 12:1)，考察不同 pH 值对平均粒径和多分散指数 (PDI) 的影响，得出平均粒径分别为 (226.6±7.2)、(174.4±3.5)、(190.7±6.5) nm，PDI 分别为 0.245±0.043、0.202±0.016、0.266±0.025，根据结果，选择 PBS 的 pH 值为 7.4。

2.4.2 药脂比例 按照“2.2”项下 SIHE-CPL 的制

备方法, 固定其他因素 (PBS 的 pH 值 7.4 和磷脂与胆固醇比例 12 : 1), 设定 SIHE 与磷脂用量比例分别为 1 : 10、1 : 20、1 : 40, 考察不同比例对粒径和 PDI 的影响, 分别得出平均粒径分别为 (280.6 ± 6.7)、(168.6 ± 4.9)、(248.4 ± 3.2) nm, PDI 分别为 0.277 ± 0.015、0.194 ± 0.014、0.298 ± 0.021, 根据结果, 选择药脂比例为 1 : 20。

2.4.3 磷脂与胆固醇比例 按照“2.2”项下 SIHE-CPL 的制备方法, 固定其他因素 (PBS 的 pH 值为 7.4 和药脂比为 1 : 20), 设定磷脂与胆固醇的用量比例分别为 6 : 1、12 : 1、24 : 1, 考察不同比例对粒径和 PDI 的影响, 得出平均粒径分别为 (242.6 ± 8.8)、(179.2 ± 3.7)、(356.1 ± 12.3) nm, PDI 为 0.263 ± 0.023、0.216 ± 0.008、0.378 ± 0.031,

根据结果, 选择磷脂与胆固醇比例为 12 : 1。

2.5 处方优化

2.5.1 星点设计 根据单因素试验与方差分析结果 PBS 的 pH 值和药脂比例对平均粒径、PDI 和包封率影响不显著 ($P > 0.05$), 而磷脂与胆固醇的用量变化对平均粒径、PDI 和包封率影响较为显著 ($P < 0.05$), 选择对 SIHE-CPL 理化性质影响较显著的 2 个因素: 磷脂用量 (即大豆磷脂和氢化大豆磷脂的总和为 X_1) 和胆固醇用量 (X_2) 作为处方考察因素, 分别以平均粒径 (Y_1 , 最小化)、PDI (Y_2 , 最小化)、绿原酸包封率 (Y_3 , 最大化)、芦丁包封率 (Y_4 , 最大化) 和 Zeta 电位 (Y_5 , 最小化) 为考察指标进行星点设计-效应面优化, 实验设计与结果见表 1。

2.5.2 模型拟合 以 5 项评价指标为因变量, 采用

表 1 星点设计-效应面优化试验结果

Table 1 Results of central composite design and response surface methodology

试验号	X_1 /mg	X_2 /mg	Y_1 /nm	Y_2	Y_3 /%	Y_4 /%	Y_5 /mV
1	243.02 (-1)	26.11 (-1)	216.7	0.288	75.39	70.62	-13.6
2	836.98 (1)	26.11 (-1)	264.2	0.303	71.61	76.34	-17.2
3	243.02 (-1)	103.89 (1)	178.6	0.267	79.25	75.33	-15.3
4	836.98 (1)	103.89 (1)	206.7	0.326	74.62	71.26	-16.8
5	120.00 (-1.414)	65.00 (0)	197.5	0.322	73.68	71.47	-9.2
6	960.00 (1.414)	65.00 (0)	246.7	0.335	72.52	69.35	-8.7
7	540.00 (0)	10.00 (-1.414)	174.3	0.178	82.35	82.64	-18.6
8	540.00 (0)	120.00 (1.414)	185.2	0.182	84.52	81.52	-20.6
9	540.00 (0)	65.00 (0)	101.2	0.153	89.59	85.71	-29.5
10	540.00 (0)	65.00 (0)	102.5	0.147	88.15	84.98	-28.6
11	540.00 (0)	65.00 (0)	102.1	0.151	90.46	85.46	-28.9
12	540.00 (0)	65.00 (0)	101.3	0.155	90.27	85.86	-28.2
13	540.00 (0)	65.00 (0)	103.4	0.149	88.82	86.22	-29.7

Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行多元线性回归和二项式拟合, 以相关系数 (r) 和置信度 (P) 评定模型的优度。由于多元线性回归各拟合方程的相关系数较低, 自变量与因变量之间线性相关性较差, 而二元多项式回归拟合方程 r 和 P 较好。二元多项式方程分别为 $Y_1 = 401.025 - 0.691\ 92\ X_1 - 3.688\ 27\ X_2 - 4.199\ 13\ X_1X_2 + 7.225\ 2\ X_1^2 + 0.028\ 13\ X_2^2$ ($r^2 = 0.951\ 7$, $P = 0.000\ 2$); $Y_2 = 0.555\ 57 - 1.227\ 87\ X_1 - 2.488\ 02\ X_2 + 9.523\ 81\ X_1X_2 + 1.113\ 62\ X_1^2 + 1.537\ 19\ X_2^2$ ($r^2 = 0.947\ 9$, $P = 0.000\ 2$); $Y_3 = 48.588\ 2 + 0.107\ 43\ X_1 + 0.373\ 13\ X_2 - 1.839\ 83\ X_1X_2 - 1.022\ 85\ X_1^2 - 2.548\ 1\ X_2^2$ ($r^2 = 0.957\ 5$, $P = 0.000\ 1$);

$Y_4 = 44.439\ 8 + 0.115\ 26\ X_1 + 0.319\ 84\ X_2 - 2.103\ 9\ X_1X_2 - 9.453\ 23\ X_1^2 - 1.628\ 26\ X_2^2$ ($r^2 = 0.963\ 0$, $P < 0.000\ 1$); $Y_5 = 18.723\ 1 - 0.123\ 73\ X_1 - 0.414\ 92\ X_2 + 4.545\ 45\ X_1X_2 + 1.101\ 19\ X_1^2 + 2.900\ 83\ X_2^2$ ($r^2 = 0.987\ 0$, $P < 0.000\ 1$)。

上述各方程经 F 检验显示二次多项式拟合的模型均具有显著性, 失拟性检验 ($P > 0.05$) 不显著, 表明二次多项式拟合的回归模型拟合情况良好, 代表性强, 理论预测值与实际值偏差较小, 模型拟合优度好。

2.5.3 效应面优化与预测 采用 Design-expert 8.0.6 软件, 固定 2 个自变量之一为中心值, 代入方

程,以拟合目标函数为数学模型,绘制三维效应图,使其能形象地反映各因素对不同考察指标的影响,见图 2。结果表明在一定范围内,因素 X_1 、 X_2 与 SIHE-CPL 的平均粒径、PDI、包合率和 Zeta 电位呈正态相关。综合以上结果,确定最终 SIHE-CPL 制备工艺的较优工艺范围为 X_1 535~550 mg, X_2

55~70 mg。

2.5.4 验证试验 按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,取均值与二项式方程预测值相比较,结果见表 2,所有实际值与预测值的偏差 [偏差=(预测值-实验值)/预测值] < 3%,说明二项式模型拟合效果良好,可信度高。

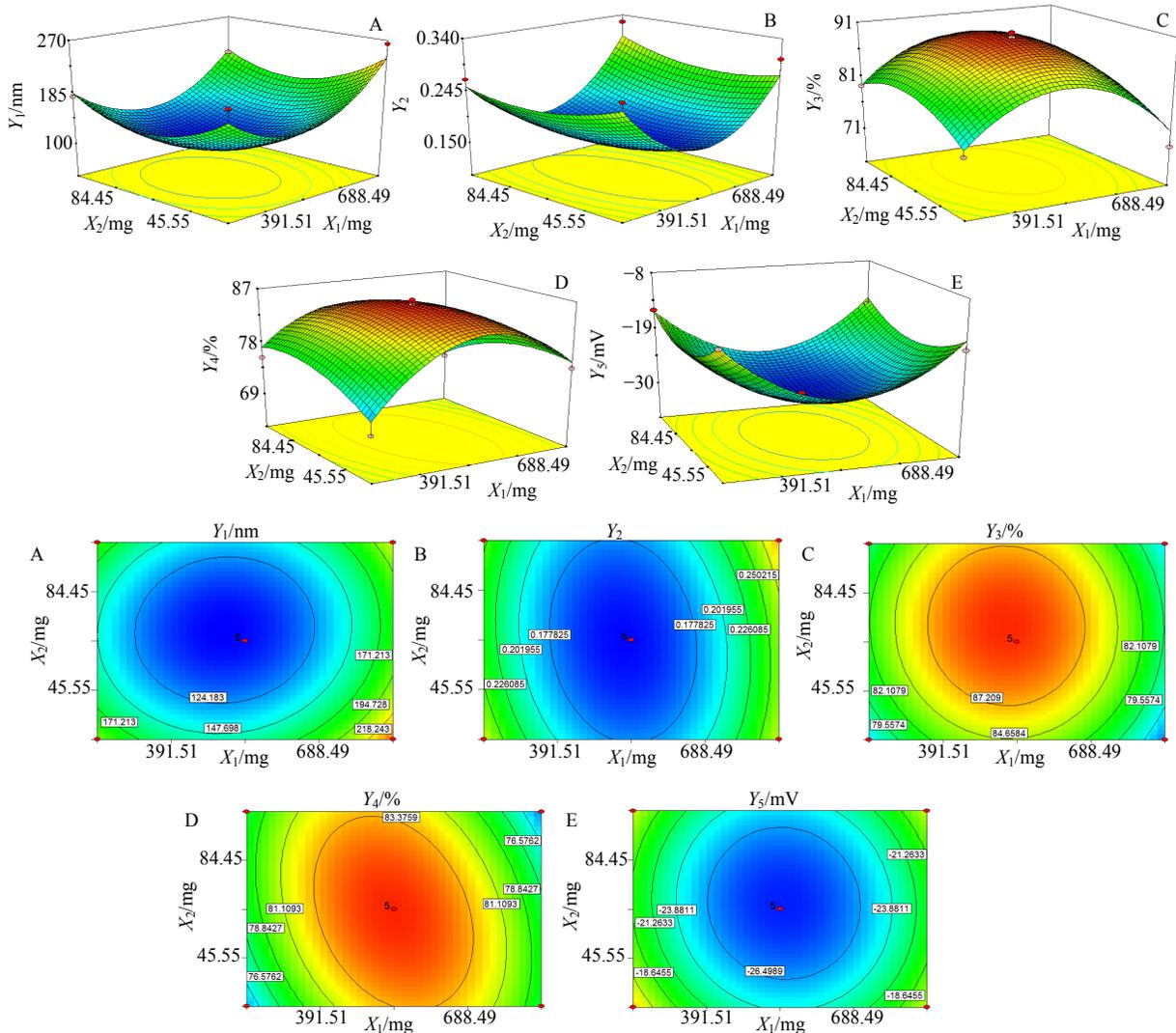


图 2 制备工艺中各因素对不同考察指标影响的响应曲面及等高线

Fig. 2 Response surface model (RSM) and contour of effect of each factors on various inspection index in preparation

表 2 预测值与实验值比较 (n = 3)

Table 2 Comparison on predicted values and actual values (n = 3)

指标	预测值	实验值	偏差/%
粒径/nm	103.6	102.5	1.06
PDI	0.159	0.156	1.89
绿原酸包封率/%	89.57	87.68	2.11
芦丁包封率/%	85.85	84.18	1.95
Zeta 电位/mV	-29.2	-28.4	2.74

2.6 体外释放度考察

按照《中国药典》2010 年版规定的第三法(小杯法)测定释放度。采用动态透析法,精密移取 SIHE 溶液和 SIHE-CPL 混悬液各 5 mL,分别置于已活化的透析袋中,两端扎牢,将透析袋置于装有 50 mL 溶出介质的具塞锥形瓶中,37 °C 恒温水浴振荡,分别于 0、0.083、0.167、0.333、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 各取 1 mL 置于 EP 管中,并及时补充等温同体积空白介质,经 0.22 μm 微孔

滤膜滤过，参照“2.1”项方法测定所取溶液中绿原酸和芦丁的总量（总量=绿原酸的量+芦丁的量），根据公式计算各时间点相对累积释放率，并绘制累积释放曲线，见图 3。由图 3 可知，SIHE-CPL 3 h 累积释放近 90%，4 h 即达到 95%以上，释放速度及释放量均明显高于 SIHE。

相对累积释放率=某个时间点取样测定的总量/24 h 的最终释放量

2.7 释放度数据拟合

分别对 SIHE 溶液和 SIHE-CPL 累积释放率与时间按照零级、一级、Higuchi 和 Weibull 方程进行拟合，根据《中国药典》2010 年版规定，拟合时以 r 最大而均方误差 (Mse) 最小为最好拟合结果，结

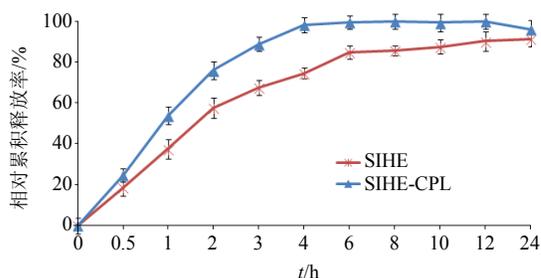


图 3 SIHE 和 SIHE-CPL 的体外累积释放曲线 (n=3)
Fig. 3 *In vitro* release curves of SIHE and SIHE-CPL (n=3)

果见表 3。结果表明，SIHE 和 SIHE-CPL 释放均符合一级方程。

2.8 SIHE-CPL 的表征及形成机制推测

2.8.1 红外分光光度法 本研究通过溴化钾压片的方式，对 SIHE、物理混合物、空白 CPL 及 SIHE-CPL 的红外表征进行扫描分析，观察各组分在扫描波长范围内的吸收值的变化。

扫描波长选择：在波长 400~4 000 nm 下 SIHE、物理混合物，空白 CPL 和 SIHE-CPL 的红外分光光度法扫描光谱扫描图见图 4。从图 4 可知，物理混合物保留了 SIHE 中 1 800~1 500 cm^{-1} 处的峰 (C=O)、芳香族化合物苯环振动骨架 ν (C=C)、 ν (NO₂) 的特征峰；SIHE-CPL 保留了空白 CPL 1 700~500 cm^{-1} 的 5 个峰，同时，SIHE-CPL 对比与空白 CPL，减弱了其在 2 273.95 cm^{-1} 处的峰。图 4-C 显示了空白 CPL 红外光谱图的特征频率，其中 3 079.71 cm^{-1} 是空白 CPL 中胆固醇的-OH 与压片时水蒸气缔合的特征吸收峰，2 921.34 cm^{-1} 是 C-H 伸缩振动吸收峰，2 851.73 cm^{-1} 是 CH₂ 对称伸缩吸收峰，1 733.05 cm^{-1} 是大豆卵磷脂中 C=O 伸缩吸收峰，1 456.82 cm^{-1} 是 CH₂ 剪切振动（为六方晶系），1 117.72 cm^{-1} 是大豆卵磷脂中 CO-C-O 反对称伸缩

表 3 释放曲线拟合结果

Table 3 Results of release curve fitting

拟合模型	SIHE 溶液	SIHE-CPL
零级方程	$Q=0.3166t+0.0574, r^2=0.9249, \text{Mse}=0.00814$	$Q=0.9908t-0.0167, r^2=0.9376, \text{Mse}=0.00836$
一级方程	$\ln(1-Q)=0.9214t+0.1123, r^2=0.9521, \text{Mse}=0.00662$	$\ln(1-Q)=2.0394t+0.1169, r^2=0.9638, \text{Mse}=0.00574$
Higuchi 方程	$Q=0.5861t_{1/2}+0.1225, r^2=0.9342, \text{Mse}=0.00763$	$Q=0.9411t_{1/2}-0.1838, r^2=0.8836, \text{Mse}=0.01215$
Weibull 方程	$\ln\ln[1/(1-Q)]=1.1706\ln t-0.433, r^2=0.9482, \text{Mse}=0.00719$	$\ln\ln[1/(1-Q)]=1.4386\ln t+0.6316, r^2=0.9471, \text{Mse}=0.00743$

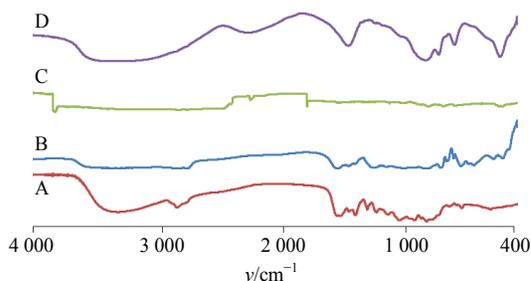


图 4 SIHE (A)、物理混合物 (B)、空白 CPL (C) 及 SIHE-CPL (D) 的 IR 图
Fig. 4 IR spectra of SIHE (A), mixture of SIHE (B), blank CPL (C), and SIHE-CPL (D)

吸收，1 063.61 cm^{-1} 是大豆卵磷脂中 PO₂⁻¹ 对称伸缩吸收峰，949 cm^{-1} 是 RCH=CH₂ 特征吸收峰。而胆固醇的主要特征吸收峰为 1 394.82、861.34、536.25 和 513.13 cm^{-1} 。

2.8.2 XRD 分析 XRD 分析检测条件：石墨单色器单色化 CuK α 辐射；管电压 40 kV；管电流 40 mA，扫描角度 5°~80°，步长：0.02°，步速：0.2°/步。分别将 SIHE、物理混合物、空白 CPL 和 SIHE-CPL 进行 XRD 分析，结果见图 5。从图 5 可知，图 5-A 是 SIHE 的 XRD 图谱，在 5°~30°有较强衍射峰包，其中，在 11.12°位置的衍射最强，周围有多处零散

的尖峰, 根据此现象可以推测 SIHE 以无定性非晶体结构为主。图 5-B 和 C 中衍射角在 $0^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 有多处结晶峰, 但同时, 也存在无定型区域对应的峰包, 由此推测空白 CPL 和物理混合物均为半晶型粉末。在图 5-D 中, 可以看出 SIHE-CPL 的 XRD 谱图基线平稳、衍射峰窄且强度高, 说明结晶度高、规整性好。

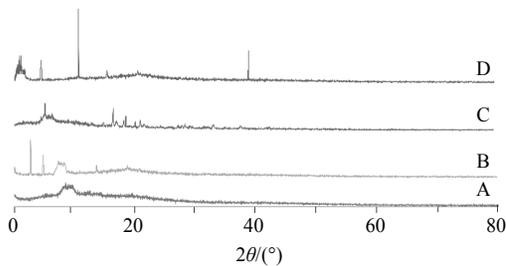


图 5 SIHE (A)、物理混合物 (B)、空白 CPL (C) 和 SIHE-CPL (D) 的 XRD 图

Fig. 5 XRD spectra of SIHE (A), mixture of SIHE (B), blank CPL (C), and SIHE-CPL (D)

2.8.3 Scherrer 公式计算晶粒尺寸 根据 X 射线衍射理论, 运用 Debye-Scherrer 公式计算 SIHE-CPL 的晶粒尺寸。

$$D_{hkl} = k\lambda / \beta \cdot \cos\theta$$

D_{hkl} 为沿垂直于晶面方向的晶粒直径, k 为 Scherrer 常数 ($k=0.89$), λ 为入射 X 射线波长 (CuK α 波长为 154.06 pm), θ 为布拉格衍射角 ($^{\circ}$), β 为衍射峰的半高峰宽 (FWHM)

采用 XRD 分析软件 MDI Jade5.0 和 XRD 粒径计算器 (v1.0), 对 SIHE-CPL 的 XRD 图谱中的衍射峰计算后得到 SIHE-CPL 的 D_{hkl} 平均值为 (142.71 ± 6.88) nm。通过计算 SIHE-CPL 的 D_{hkl} 值与激光粒度仪基本一致。

3 讨论

前期研究表明^[16], SIHE (主要成分为绿原酸和芦丁) 主要以被动扩散为主, 通过溶入膜的类脂中透过脂质层。而 CPL 具有两亲性, 利于药物的溶解, 同时 CPL 中有 SPC 和 HSPC, 对肠道中的脂质层具有亲和性, 有助于药物在胃肠道中的渗透与吸收。

单因素试验结果表明, 硫酸铵梯度法制备 SIHE-CPL 的机制在于脂质体膜内外存在 pH 梯度 (浓度差)。药物在外水相 pH 值中性条件 (pH 7.4) 下以分子形式存在, 并以浓度差为动力, 通过磷脂双分子层进入内水相, 由于内水相和药物均为酸性, 根据相似相容原理, 使得药物不能再回到外水相, 从而减少药物泄漏, 使得制剂的粒径和分散度减小。

SIHE 脂溶性差, 可溶解于水和 PBS 中, 本实验通过考察不同的药脂比, 确定最佳比例系数。其中, 磷脂用量过低时, 澄清度好, 但药物因缺少足够的磷脂包裹, 易从体系中析出结晶, 使得成型制剂稳定性差, 从而增大粒径和 PDI, 但当磷脂用量过大时, CPL 的粒径和 PDI 较大, 偶见磷脂块, 浊度较大, 易发生脂质体相互间的絮凝和融合, 稳定性差。此外, 胆固醇在脂质体的制备中起着膜流动性调节剂的作用, 可使相变温度以下处于固态的磷脂转变为液晶态, 防止类脂链结晶化, 可抑制磷脂分子碳氢链的某些运动能力, 降低其流动性, 还能增加脂质双分子层膜的坚固性, 防止药物渗漏。加入适量的胆固醇, 可使膜的刚性增强, 曲率增大, 在相同质量的膜质中, 所形成的脂质双分子层膜的总表面积减小, 从而使得粒径和 PDI 减小。但是胆固醇的量不宜过低, 据报道胆固醇的量过低会使 CPL 在制备和储存过程中发生严重渗漏, 形成结晶。当胆固醇的用量过大时, CPL 容易出现絮凝或沉淀现象。

本研究采用星点设计效应面法优化了 SIHE-CPL 的处方。结果表明, 采用二项式方程拟合上述 5 种考察指标, 均具有良好的 r , 且预测效果较好。由于 SIHE 脂溶性差, 在制备过程中采用磷酸盐缓冲液作为溶解剂, 可增加其溶解性, 且采用减压的方法将乙醇除尽, 使 SIHE 均匀分散在 CPL 中。此外, 本实验采用动态透析法, 主要根据透析膜相对分子质量大小的不同对不同分子截留的原理, 从而使小分子药物透过, 达到分离的方法, 此方法相比于溶出度测定法, 操作简单, 测定准确, 重复性好。并为 SIHE-CPL 的体内的分布、药效及毒性研究提供试验依据。

在 IR 图谱中, SIHE-CPL 显示出 SIHE 官能团基团的特征吸收峰 (如 2 928、967.45 cm^{-1}) 与物理混合物的 IR 图谱比较差异较大。从物理混合物图谱中可以显示出 SIHE 的一些官能团区 (4 000~1 400 cm^{-1}) 基团的特征吸收峰和指纹区 (1 300~400 cm^{-1}) 的吸收峰。但 SIHE-CPL 的红外图谱中只有 865.6 和 527.51 cm^{-1} (均为胆固醇特征峰) 有较强吸收外, 由于 SIHE 被磷脂双分子层包裹的原因, 其余区域的特征吸收峰均消失。根据 XRD 图谱表示, SIHE 被 CPL 包裹后受到 SIHE、SPC、HSPC 及胆固醇物质分子之间的相互作用或影响, 可能形成亚微晶或微晶结构。同时, 对比 SIHE 和 SIHE-CPL 的衍射图谱, 在 SIHE-CPL 衍射图谱中可以看到

SIHE 中的晶型衍射峰几乎完全消失, 这表明在 SIHE-CPL 成型过程中, 由不同磷脂的脂质分子自组装形成以双分子层为单位的多层膜, 而 SIHE 被磷脂所包裹, CPL 的宽峰将 SIHE 的晶型衍射峰掩盖, 使 SIHE 以一种无定形形式存在于 CPL 中。

本课题组前期进行了天山雪莲提取物磷脂复合物的研究, 与目前 CPL 的研究相比, 二者的生成机制截然不同, 其内部结构和特点存在较大差异。磷脂复合物主要通过药物与磷脂的极性端之间相互作用而与磷脂结合在一起。而 CPL 是将药物包裹在由不同磷脂材料形成的囊泡内, 药物主要分散在囊泡内的溶液中和磷脂的多层膜之间。从结构上比较, 使得 CPL 比磷脂复合物具有更高的载药量和稳定性。此外, 药物与磷脂形成复合物后使物理化学性质和药效发生改变, 形态多呈不规则排列, 由于此特点, 往往使得实际结果比理想预期结果偏差较大。故本课题组根据药物自身特点, 以提高药物口服生物利用度和稳定性为目标, 制备 SIHE-CPL。

CPL 是一种类似生物膜结构的磷脂双分子层的球型药物载体, 并且采用不同相变温度, 这就使得在 CPL 的双分子层中形成了 2 种不同的相区域, 即胶晶相和液晶相, 这 2 种相将双分子层分隔成多个不连续的区域, 抑制了难溶性药物的互相聚集, 从而提高了药物在脂质体中的稳定性, 并同时存在相分离, 这便导致了脂质体膜表面产生区块结构, 从而增加了膜通透性, 使得 SIHE 可能更容易通过 CPL 膜进入内水相, 提高了药物的载药量^[8]。在当今中药药剂学领域, 采用复合磷脂脂质体技术的特点, 解决中药中成分多而复杂且用量大等问题, 尤其对单一中药有效部位和提取物脂质体的制备具有更加深远的意义。因此, 本课题将 SIHE 制成 CPL 拟开发新型纳米给药制剂, 并且, 希望将此技术得到更好的改进, 更加广泛地应用于医药领域。

参考文献

- [1] 赵学敏·清. 本草纲目拾遗 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957.
- [2] 王晓玲, 李启发, 丁立生. 天山雪莲的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1795-1797.
- [3] Ma H P, Fan P C, Jing L L, *et al.* Anti-hypoxic activity at simulated high altitude was isolated in petroleum ether extract of *Saussurea involucrata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1510-1515.
- [4] 肖 皖, 李 宁, 波拉提·马卡比力, 等. 雪莲化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 344-348.
- [5] Yao L Y, Zhao Q S, Xiao J, *et al.* Composition and antioxidant activity of the polysaccharides from cultivated *Saussurea involucrata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3): 849-853.
- [6] 邢建国, 谢 敏, 王新春, 等. 天山雪莲提取物平衡溶解度和表现油水分配系数的测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(1): 26-28.
- [7] 曾 诚, 黄 伟, 何承辉, 等. 复合磷脂脂质体的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(1): 91-95.
- [8] 陈 军, 张 婷, 蔡宝昌, 等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的药剂学性质研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 35-39.
- [9] 王立杰. 马钱子总生物碱及其脂质体的药物代谢动力学与毒性研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [10] Kan P, Wang A J, Chen W K, *et al.* Liposome for incorporating large amounts of hydrophobic substances: US, 7485320 [P]. 2009-02-03.
- [11] Xu H, Paxton J, Lim J, *et al.* Development of a gradient high performance liquid chromatography assay for simultaneous analysis of hydrophilic gemcitabine and lipophilic curcumin using a central composite design and its application in liposome development [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 98(9): 371-378.
- [12] 吕 维, 吴 恋, 罗红丽, 等. 星点设计-效应面法优化川芎提取工艺 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 53-57.
- [13] 张雪峰, 杨 轲, 欧 燕, 等. 星点设计-效应面法优化天山雪莲提取物磷脂复合物制备工艺 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2326-2332.
- [14] Varshosaz J, Ghaffari S, Khoshayand M R, *et al.* Development and optimization of solid lipid nanoparticles of amikacin by central composite design [J]. *J Liposome Res*, 2010, 20(2): 97-104.
- [15] Hao J, Wang F, Wang X, *et al.* Development and optimization of baicalin-loaded solid lipid nanoparticles prepared by coacervation method using central composite design [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(2): 497-505.
- [16] 袁 勇, 邢建国, 刘桂花, 等. 天山雪莲提取物主要成分的大鼠在体肠吸收动力学 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(17): 1407-1410.