肉豆蔻酸异丙酯自乳化递送系统的构建及其蛋白晕形成能力

李琪琪，张光琼，李玲燕，贺智勇，陈　英，王玉娥，吴兴杰，沈祥春*，陶　玲*

贵州医科大学　药学院，贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心，贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室，贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室，天然药物资源优效利用重点实验室，贵州 贵阳　561113

摘　要：目的　以肉豆蔻酸异丙酯（IPM）为油相构建自乳化递送系统（IPM@SEDDS），优选 IPM@SEDDS 最佳处方并评价其蛋白晕（PC）结合能力。**方法**　结合伪三元相图法和星点设计-响应面法筛选 IPM@SEDDS 的最佳处方，评价其外观、粒径、ζ电位和稳定性；通过 CCK-8、溶血实验考察其安全浓度范围及生物相容性；利用粒径结合考马斯亮蓝染色评估 IPM@SEDDS 在血清中的 PC 形成能力。**结果**　IPM@SEDDS 最佳乳化剂和助乳化剂分别为聚山梨酯-80 和无水乙醇，混合乳化剂质量比为 2∶1，油相与混合乳化剂质量比为 3∶7，涡旋状态下逐滴加入纯水至 10 mL，得半透明状带有淡蓝色乳光的 IPM@SEDDS。IPM@SEDDS 粒径为（209.77±6.34）nm，ζ电位为（−16.20±1.36）mV，且其具有良好的细胞安全范围和血液相容性。体外 PC 孵育实验结果表明，IPM@SEDDS 与胎牛血清（FBS）、小鼠血清（MS）、小鼠炎症血清（iMS）之间形成了 PC，且 PC 的形成能力与孵育时间、血清浓度以及血清种类有关。**结论**　IPM@SEDDS 具有较好的药剂学性能，安全性高且生物相容性好，可以为 IPM 更为广泛的应用提供实验参考。

关键词：自乳化递送系统；肉豆蔻酸异丙酯；药剂学性能；蛋白晕；伪三元相图法；星点设计-响应面法

中图分类号：R283.6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674 - 6376(2025)06 - 1517 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.013

Construction of isopropyl myristate self-emulsifying delivery system and its protein corona formation ability

LI Qiqi, ZHANG Guangqiong, LI Lingyan, HE Zhiyong, CHEN Ying, WANG Yu'e, WU Xingjie, SHEN Xiangchun, TAO Ling

School of Pharmacy, Guizhou Medical University; Efficient Utilization Engineering Center for Characteristic Natural Medicinal Resources in Guizhou Province; Key Laboratory of Pharmacology and Evaluation of Traditional Chinese Medicine in Higher Education Institutions in Guizhou Province; Joint Key Laboratory of Guizhou Medical University and Guiyang City; The State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants & School of Pharmaceutical Sciences; Gui'an New District, Guizhou 561113, China

Abstract：Objective　To construct a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) based on isopropyl myristate (IPM), optimize the formulation of IPM@SEDDS, and evaluate its protein corona (PC) binding ability. **Methods**　The optimal formulation of IPM@SEDDS was screened by pseudo-ternary phase diagram and central composite design-response surface methodology. The appearance, particle size, ζ potential and stability of IPM@SEDDS were evaluated. The safe concentration range and biocompatibility of IPM@SEDDS were investigated by CCK-8 and hemolysis experiments. The formation ability of IPM@SEDDS PC was evaluated by particle size combined with coomassie brilliant blue staining. **Results**　The optimal emulsifier and co-emulsifier for IPM@SEDDS were Tween-80 and anhydrous ethanol, the mass ratio of mixed emulsifier is 2∶1, the mass ratio of oil phase to mixed emulsifier is 3∶7, IPM@SEDDS was obtained by adding pure water dropwise to 10 mL under vortexing, presenting a semi-transparent state with a light

收稿日期：2025-01-23

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82260827）；贵州省科技计划项目黔科合基础-ZK[2022]380；贵州省科技创新基地，黔科合中引地[2023]003；贵州省高层次创新型人才百层次人才/黔科合平台人才-GCC[2023]048；贵州医科大学国家自然科学基金培育项目（20NSP050）；贵州医科大学高层次人才科研启动基金项目校博合 J 字（2023）026 号。

作者简介：李琪琪（2000—），女，硕士研究生，主要从事药物递送系统研究。E-mail: 2466257145@qq.com

***共同通信作者**：陶　玲（1975—），女，硕士，教授，主要从事药物递送系统研究。E-mail: 649511230@qq.com

沈祥春（1973—），男，博士，教授，从事心脑血管药物药理、天然功能物质化学生物学领域的研究。E-mail: shenxiangchun@126.com

blue milky luster. The particle size of IPM@SEDDS was (209.77 ± 6.34) nm, the ζ potential was (−16.20 ± 1.36) mV, moreover, it has good cell safety range and blood compatibility. The results of *in vitro* PC incubation experiments show that IPM@SEDDS forms PC with fetal bovine serum (FBS), mouse serum (MS), and mouse inflammatory serum (iMS), and the formation ability of PC is related to the incubation time, serum concentration, and serum type. **Conclusion** IPM@SEDDS has excellent pharmaceutical properties, high safety and good biocompatibility, which can provide experimental references for the more extensive application of IPM.

Key words: Self-emulsifying delivery system; isopropyl myristate; pharmaceutics performance; protein corona; pseudo-ternary phase diagram; central composite design-response surface methodology

自乳化递送系统（SEDDS）是由油相、乳化剂与助乳化剂自发形成的热力学稳定油水混合系统，在温和搅拌条件下，可于水或体液中自发分散形成的水包油型乳剂[1]。该载药体系可增加难溶性药物溶解度，使乳滴在体内快速扩散并均匀分布，增加药物的膜渗透性。同时，其独特的淋巴转运机制可避免首关效应，不仅有效改善药物的生物利用度[2]，还能有效缓解药物对组织的刺激性，降低临床不良反应[3]。相较于传统胶束或助溶剂系统，SEDDS 在提高药物溶解度和稳定性方面展现出显著优势[4]。作为不含水分的浓缩溶液，SEDDS 具有稳定的物理化学性质，且制备工艺简单，已广泛应用于难溶性药物增溶研究。1994 年，德国上市的环孢素 A 软胶囊，通过运用 SEDDS 技术极大地增加了药物与肠上皮细胞的接触面积，促进了药物吸收，标志着该技术进入产业化应用阶段[5]。此外，Gandhi 等[6]依托 SEDDS 制备的顺铂递送系统增强了药物在三阴性乳腺癌细胞中的摄取，为难治性肿瘤治疗提供了新思路；Kang 等[7]通过优化药物递送效率制备的紫杉醇 SEDDS，实现了抗肿瘤疗效的显著性提升。这些成果充分证实，SEDDS 作为创新药物载体，在提升药物治疗效能方面具有广阔的应用前景与发展潜力。

药用辅料是药物制剂的重要组成部分，是保证药物制剂安全性、有效性、稳定性和均一性的物质基础[8]，适宜辅料的选择是配制高效安全 SEDDS 的关键前提。油相是 SEDDS 的重要组成部分，其不仅可以通过促进药物经肠道淋巴系统运输显著提升胃肠道吸收效率[9]，对亲脂性药物也有较好的溶解性[10]。SEDDS 中常用的油相可分为具有不同饱和度或水解程度的改良中链甘油三酯和长链甘油三酯。与天然未修饰食用油相比，这些改良的油类不仅具有更高的载药能力，且与合适的表面活性剂协同使用时具有更优的乳化特性[11]。肉豆蔻酸异丙酯（IPM）又名十四酸异丙酯，是由椰子油加工得到的一种长链羧酸酯类化合物，具有安全性高，黏度低，互溶性佳等优点，在医药、化妆品等众多领域得到广泛应用[12]。在医药领域，IPM 的低毒性和良好的溶解性，使其既能作为药物的载体和溶剂提升药效、稳定成分，又能延长药物保质期[13]。尽管 IPM 作为油相在 SEDDS 中已有研究，但目前多数集中于经皮等局部给药 SEDDS 中。例如，Prajapati 等[14]以 IPM 为油相所制备的载酮康唑 SEDDS 展现出较好的抗真菌活性；Zhang 等[15]以 IPM 为油相制备的共载姜黄素和双歧杆菌水包油型 SEDDS 不仅可以增加姜黄素的溶解度，还在胰岛 β 细胞功能修复方面表现出优异的疗效。

当纳米载体进入体内后，会立即与生物流体中蛋白质等生物分子接触，这些生物分子会竞争性地结合到纳米载体的表面并形成蛋白晕（PC）[16]。纳米材料-PC 复合物是纳米载体在体内与细胞、组织及器官作用的主要形式，PC 的形成会显著影响纳米药物的细胞摄取、特异性识别、药物释放和免疫反应等递送过程[17]。在细胞摄取层面，PC 能够改变纳米药物与非吞噬细胞的相互作用模式，进而改变其细胞摄取和内吞途径[18]。例如，Aliyandi 等[19]研究发现，用富含组氨酸的糖蛋白（HRG）预涂二氧化硅纳米颗粒后，其在内皮细胞中的摄取量会显著降低。在特异性识别方面，大量蛋白吸附会掩盖纳米药物表面的靶向结构，致使生物环境中细胞靶向配体或功能基团的识别能力下降[20]，最终影响纳米药物的靶向递送效果。

药物释放过程受 PC 影响展现出双面性：一方面 PC 的形成会增加纳米药物的流体动力学半径和扩散层厚度，导致释放速率降低和释放时间延长；另一方面，PC 又能通过催化纳米载体的分解、增强与细胞膜的静电作用等过程促进纳米药物在体内的释放[21]。免疫反应方面，PC 作为纳米药物与免疫系统相互作用的生物界面，能够调节先天免疫细胞活性，激活补体系统，并引发适应性免疫反应[22-23]。

由此可见，PC 的形成会影响纳米载体的原有理化性质和生物学效应[24]。值得注意的是，血浆中蛋白质的类型在不同的患者和疾病中有所不同，即使使用相同的纳米药物，在不同的病理条件下形成的 PC 都是独一无二的，即形成“个性化 PC”（PPC）[25]。因此，深入探究纳米载体表面 PC 的特征及其影响机制是调控纳米载体体内命运的首要步骤。

基于课题组前期研究基础[26]，本研究以 IPM 为油相进行 IPM@SEDDS 的处方优化、药剂学性能评价、安全性考察，并探究其与 PC 的结合能力，以期为 IPM 在临床药物递送中的广泛应用提供参考，为其在药物递送领域的拓展应用提供实验数据。

1　仪器与材料

1.1　主要仪器

ME104 型分析电子天平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；UPW-UP-10 型纯水仪（成都天莘宁科技有限公司）；XH-C 型旋涡混合器（江苏金坛市白塔新宝仪器厂）；NanoBrook 90 Plus PALS 型纳米激光粒度分布仪（美国布鲁克海文有限公司）；ELX 800 型酶标仪（美国 BioTek 公司）；ChemiDoc XRS 凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）。

1.2　主要试剂

IPM（质量分数 98%，批号 54844856P0）阿拉丁生化科技有限公司；聚山梨酯-80（T80 批号 1215E013）北京索莱宝试剂有限公司；泊洛沙姆 188（F68，批号 WBAK539B）德国巴斯夫公司；聚乙二醇 -15- 羟基硬脂酸酯（HS15，批号 54844856P0）上海协泰化工有限公司；聚乙二醇 400（PEG 400，批号 20200725）西陇科学股份有限公司；甘油（批号 20191213）浙江遂昌惠康药业有限公司；无水乙醇（批号 20200918，分析纯）国药集团化学试剂有限公司；胎牛血清（批号 R20115）北京全式金生物技术股份有限公司；琼脂糖凝胶 CL-4B（批号 QC4L2009）北京瑞达恒辉科技发展有限公司；考马斯亮蓝快速染色液（批号 P0017）上海碧云天生物技术有限公司；SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（货号 P1200）、二喹啉甲酸（BCA）蛋白浓度测定试剂盒（货号 PC0020），北京 Solarbio 科技有限公司。

1.3　细胞及动物

人脐静脉内皮细胞株 HUVECs（美国 ATCC）。SPF 级昆明小鼠，雄性，体质量（20±2）g；SPF 级 SD 大鼠，雄性，体质量（200±20）g；均购自贵州医科大学动物中心，实验动物生产许可证号 SCXK（湘）2019-0014，所有动物实验经贵州医科大学伦理委员会批准（210082）。

2　方法与结果

2.1　伪三元相图绘制

固定体系质量为 1 g，分别称取乳化剂与助乳化剂，质量比（K_m）为 2∶1 混匀形成混合乳化剂。再称取适量的油相与混合乳化剂分别以 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 的质量比混合，涡旋状态下逐滴加入超纯水，观察乳化现象并记录临界点的加水量，计算各组分在临界点的质量百分数。以油相、水相、K_m 为 3 个顶点，采用 Orgin 9.0 软件绘制伪三元相图，以乳化区域面积（阴影区域）大小为考察指标，进行 IPM@SEDDS 最优处方考察，所有处方重复 3 次。

2.2　乳化剂的考察

固定体系质量为 1 g，助乳化剂为无水乙醇，K_m 值为 2∶1，选取 T80、F68、HS15 进行乳化剂种类考察。按照 IPM 与混合乳化剂的比例为 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 称量后置于 10 mL 的 EP 管中，涡旋混匀，逐滴加入超纯水，观察乳化现象，记录各相质量，以乳化区域面积为考察指标，绘制伪三元相图。乳化剂筛选结果表明，IPM@SEDDS 乳化面积大小依次为 T80、F68、HS15。且在 T80 作为乳化剂时，IPM@SEDDS 在室温下放置 12 h 比例为 5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 出现分层现象；F68 作为乳化剂时，所有比例均出现分层现象；HS15 作为乳化剂时，比例为 6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 出现分层现象，因此综合选择 T80 作为 IPM@SEDDS 的乳化剂，结果见图 1。

2.3　助乳化剂考察

固定体系质量为 1 g，乳化剂为 T80，K_m 值为 2∶1，选取 PEG 400、甘油、无水乙醇进行助乳化剂种类考察。IPM 与混合乳化剂分别按质量比 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 涡旋混匀，逐滴加入超纯水，仔细观察乳化现象，记录各相质量，以乳化区域面积为考察指标，绘制伪三元相图。助乳化剂筛选结果表明，IPM@SEDDS 乳化面积大小依次为无水乙醇、PEG 400、甘油。且当使用 PEG 400 和甘油作为助乳化剂时，室温放置 12 h，所有比例的 IPM@SEDDS 均出现分层现象，因此选择无水乙醇作为 IPM@SEDDS 的助乳化剂，结果见图 2。

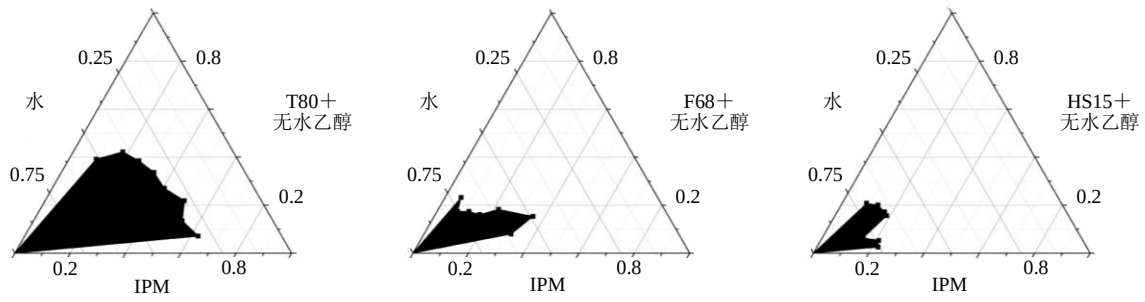


图 1　不同乳化剂考察的伪三元相图

Fig. 1　Pseudo-ternary phase diagram of different emulsifiers investigation

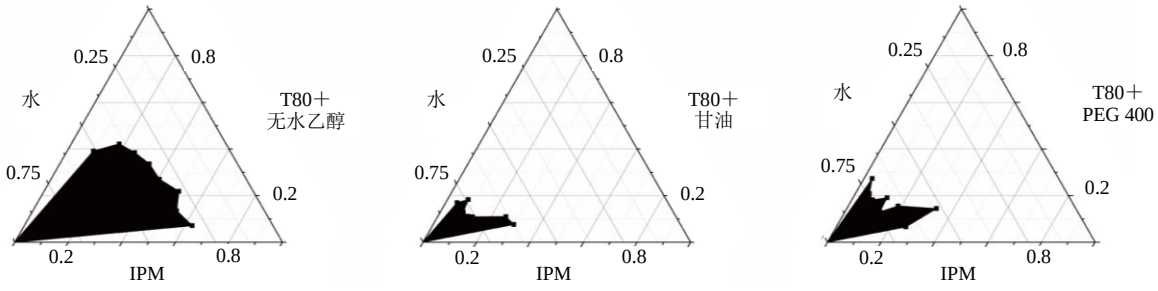


图 2　不同助乳化剂考察的伪三元相图

Fig. 2　Pseudo-ternary phase diagram of co-emulsifier investigation

2.4　K_m 值的考察

根据上述实验结果，固定体系质量为 1 g，乳化剂为 T80，助乳化剂为无水乙醇。考察最佳 K_m 值。分别设置 K_m 为 1∶3、1∶2、1∶1、2∶1、3∶1，将油相与混合乳化剂分别以 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 的质量比涡旋混匀，绘制伪三元相图。K_m 值考察结果表明，IPM@SEDDS 在不同 K_m 值时乳化面积大小依次为 2∶1、1∶1、1∶3、1∶2、3∶1，因此选择 2∶1 进行后续实验，结果见图 3。

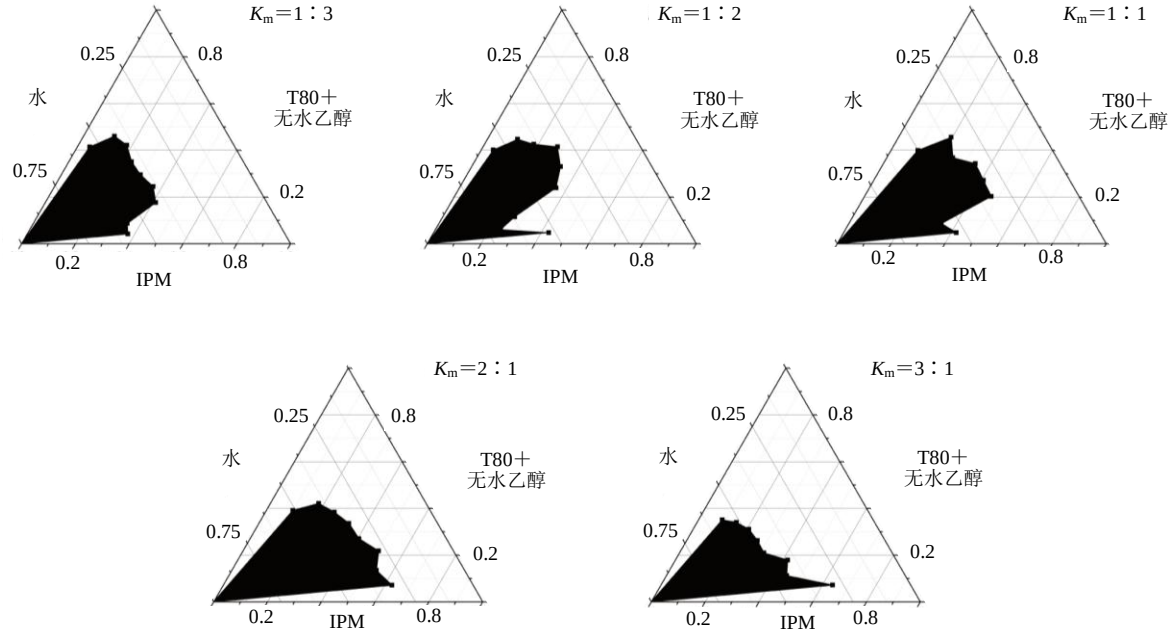


图 3　K_m 值考察的伪三元相图

Fig. 3　Pseudo-ternary phase diagram of K_m value investigation

2.5　油相与混合乳化剂比例的选择

在 K_m 值比例考察的实验结果中发现，所制备的溶液在室温静置 12 h 后，油相与混合乳化剂质量比为 5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 的溶液均出现分层，故设置油相质量分数的范围为 20%～40%，进行后续实验，结果见图 4。

图 4　不同油相与混合乳化剂比例的考察

Fig. 4　Investigation of different oil phases and K_m value

2.6　星点设计-响应面法优化处方

以伪三元相图筛选结果为基础，选择对 SEDDS 形成显著影响的油相质量分数（X_1）和 K_m（X_2）为自变量，中位径（D_{50}）为考察指标（Y），使用 Design Expert 8.0.6 软件进行星点设计，确定最佳处方。实验设计与结果见表 1。

用 Design expert 8.0.6 软件对测得数据进行二项式模型拟合及显著性检验，其响应方程为 $Y=202.03+47.23X_1-65.05X_2+8.06X_1X_2+3.39X_1^2+32.40X_2^2$，相关系数（$R^2$）为 0.9691，模型显著性水平 $P<0.001$，表明模型显著可靠。然后根据响应方程绘制三维响应面图，分析自变量对考察指标的影响。实验结果显示，D_{50} 随着油相质量分数的增加而增大，随 K_m 的增加而减小，结果见图 5。限定 D_{50} 在 200 nm 左右，根据 Design expert 8.0.6 软件得到理论最佳处方为油相质量分数 29.96%，K_m 值为 2.02。为简化处方，将处方修定为油相质量分数 30%，混合乳化剂 K_m 值为 2∶1。

2.7　最佳处方的验证

按最佳处方平行制备 3 份 IPM@SEDDS 进行验证实验，计算偏差。实验结果显示 3 批 IPM@SEDDS 的 D_{50} 为（195.61±3.83）nm，实测值与预测值（200）的相对误差为 2.03，表明所构建数学模型的预测性良好。

相对误差＝（预测值－实测值）/预测值

2.8　外观、D_{50} 和ζ电位

制备所得最佳处方的 IPM@SEDDS，肉眼观察，结果表明，IPM@SEDDS 呈半透明状，带有淡蓝色乳光，流动性良好。用超纯水稀释 IPM@SEDDS，

表 1　星点设计-响应面法实验因素水平及结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 1　The factors and measurement results of central composite design ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

序号	X_1%	X_2	D_{50}/nm	序号	X_1%	X_2	D_{50}/nm
1	37.07 (1)	2.71∶1(1)	247.47±6.48	8	22.93 (−1)	2.71∶1 (1)	129.22±1.20
2	30.00 (0)	2.00∶1 (0)	195.81±2.13	9	30.00 (0)	1.00∶1 (−1.414)	374.79±15.96
3	30.00 (0)	2.00∶1 (0)	190.77±8.12	10	40.00 (1.414)	2.00∶1 (0)	266.66±9.57
4	30.00 (0)	2.00∶1 (0)	215.33±7.69	11	20.00 (−1.414)	2.00∶1 (0)	144.92±3.90
5	30.00 (0)	3.00∶1 (1.414)	153.83±1.96	12	37.07 (1)	1.29∶1 (−1)	335.32±10.62
6	22.93 (−1)	1.29∶1 (−1)	249.30±5.60	13	30.00 (0)	2.00∶1 (0)	202.36±2.91
7	30.00 (0)	2.00∶1 (0)	205.88±2.75				

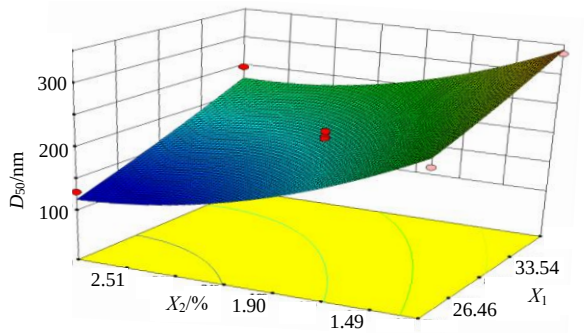


图 5　D_{50} 的三维响应面图

Fig. 5　Three-dimensional response surface of D_{50}

布鲁克海文纳米粒径仪测定其粒径及ζ电位。结果表明，IPM@SEDDS 平均粒径为（209.77±6.34）nm，PDI 为 0.208±0.021，ζ电位为（−16.20±1.36）mV，所制得的 IPM@SEDDS 粒径分布较为均匀，结果见图 6。

2.9　稳定性考察

应用布鲁克海文纳米粒径仪考察 IPM@SEDDS 在用 pH 值为 7.4 的 PBS 溶液稀释 100、200、300、400、500、600、700、800 倍，和在室温放置 0、2、4、8、12、24 h 后对 D_{50} 及 PDI

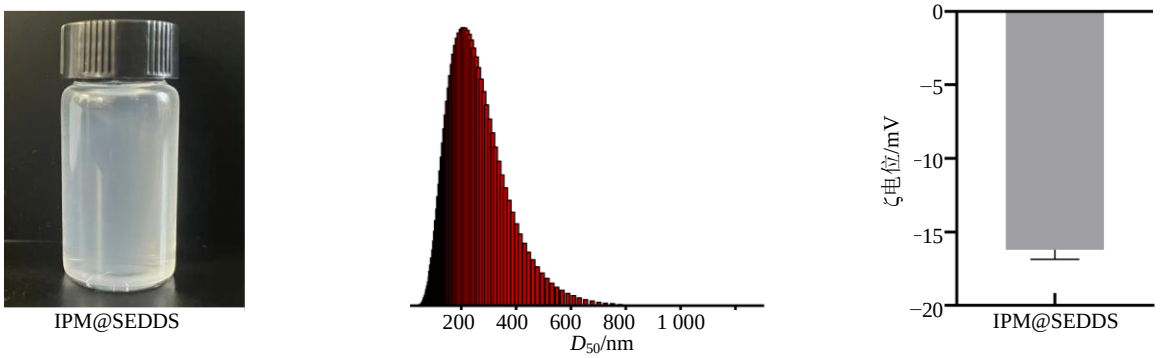


图 6　IPM@SEDDS 的外观、粒径和ζ电位（$\bar{x}$ ±s，n=3)

Fig. 6　Appearance, particle size and ζ potential of IPM@SEDDS ($\bar{x}$ ±s，n = 3)

的影响。结果见图 7，在不同的稀释倍数及室温下放置 24 h 内，IPM@SEDDS 的 D_{50} 及 PDI 均未发生明显变化，表明所制备的 IPM@SEDDS 具有良好的稳定性。

2.10　细胞毒性试验

将处于对数生长期的 HUVECs 细胞以每孔 6×10^3 个的密度接种至 96 孔板中，培养 24 h，弃去旧培养基，实验组分别加入质量浓度为 1.00×10^{-4}、1.00×10^{-3}、0.01、0.10、1.00、20.00 mmol·L^{-1} 的 IPM@SEDDS 溶液，对照组为 RPMI - 1640 基础培养基处理的细胞，空白组为 RPMI - 1640 基础培养基，共同孵育 24 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂

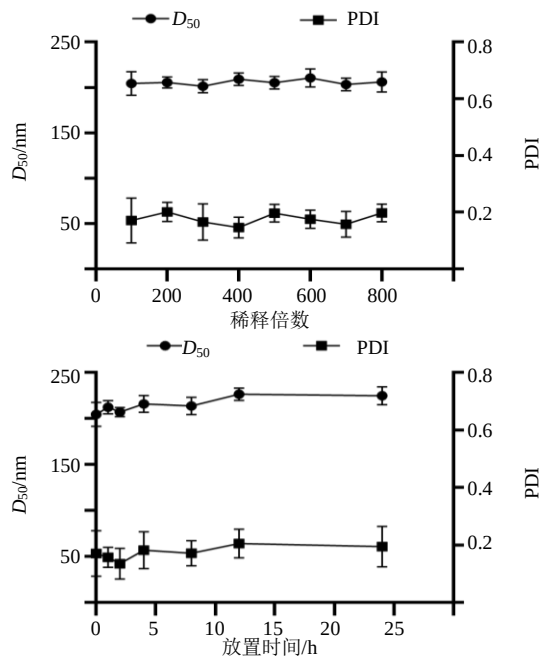


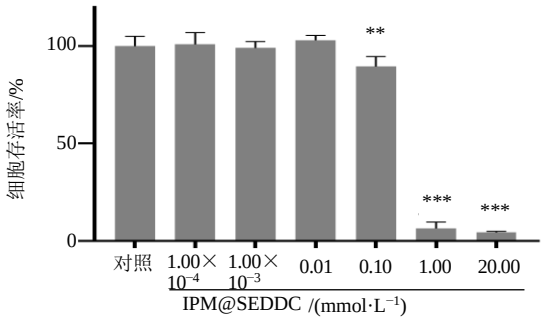
图 7　IPM@SEDDS 稳定性研究结果（$\bar{x}$ ±s，n=3)

Fig. 7　Stability study results of IPM@SEDDS ($\bar{x}$ ±s，n = 3)

混匀，37 ℃培养箱孵育 2 h，采用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度（A）值，计算细胞存活率。

存活率＝（$A_{实验}$－$A_{空白}$）/（$A_{对照}$－$A_{空白}$）

实验结果如图 8 所示，与对照组相比，0.10、1.00、20.00 mmol·L^{-1} 的 IPM@SEDDS 作用 HUVECs 细胞 24 h 后，HUVECs 细胞的存活率显著降低（P＜0.01、0.001）。



与对照组比较：$^{**}P$＜0.01　$^{***}P$＜0.001。

$^{**}P$ < 0.01　$^{***}P$ < 0.001 *vs* control group.

图 8　IPM@SEDDS 对 HUVECs 细胞存活率的影响($\bar{x}$ ± s，n=3)

Fig. 8　Effect of IPM@SEDDS on viability of HUVECs cells ($\bar{x}$ ±s，n = 3)

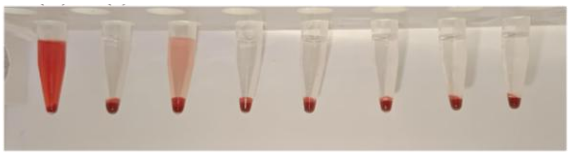
2.11　溶血实验考察

大鼠主动脉腹侧穿刺取血，以 3 000 r·min^{-1} 离心 15 min，取红细胞，按 4∶100 的比例加入 0.9%氯化钠溶液，使红细胞悬液的最终质量浓度为 4%。使用蒸馏水作为阳性对照，0.9%氯化钠溶液作为阴性对照，取 500 μL 红细胞悬液分别与等体积的蒸馏水、0.9%氯化钠溶液及不同质量浓度的 IPM@SEDDS（2.00、0.20、0.02、2.00×10^{-3}、2.00×10^{-4}、2.00×10^{-5} mmol·L^{-1}）混合，并在 37 ℃下孵育 3 h。4 ℃、3 000 r·min^{-1} 离心 10 min，使用酶标仪在波长 450 nm 处检测各组上清液的 A 值，平行 3 份，并计算其溶

血率（*HR*）。

$HR=（A_{样品}-A_{阴性}）/（A_{阳性}-A_{阴性}）$

结果见图 9，阴性对照 0.9%氯化钠溶液组未发生溶血，阳性对照蒸馏水组显示出完全溶血，表明其对红细胞膜具有溶解能力；当 IPM@SEDDS 质量浓度小于 1 mmol·L^{-1} 时，均未引起溶血现象，显示 IPM@SEDDS 在评估的质量浓度范围内保持了红细胞的完整性，溶血率结果如表 2 所示，当 IPM@SEDDS 质量浓度小于 1 mmol·L^{-1} 时，溶血率均＜5%，表明 IPM@SEDDS 具有较好的生物相容性。



从左到右依次为阳性对照组，阴性对照组，IPM@SEDDS 质量浓度 1.00、0.10、0.01、1.00×10^{-3}、1.00×10^{-4}、1.00×10^{-5} mmol·L^{-1}。

From left to right were positive group; negative group; IPM@SEDDS concentration 1.00、0.10、0.01、1.00×10^{-3}、1.00×10^{-4}、1.00×10^{-5} mmol·L^{-1}.

图 9　IPM@SEDDS 的溶血性评价（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 9　Hemolytic evaluation of IPM@SEDDS ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

表 2　溶血率结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 2　Results of hemolytic rate ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

组别	质量浓度/(mmol·L^{-1})	*HR*/%
阳性对照	—	100.00±1.94
阴性对照	—	0.00±0.06
IPM@SEDD	1.00	13.89±0.15
	0.10	0.77±0.24
	0.01	0.42±0.20
	1.00×10^{-3}	0.35±0.10
	1.00×10^{-4}	0.16±0.10
	1.00×10^{-5}	0.19±0.15

2.12　IPM@SEDDS PC 形成考察

2.12.1　小鼠血清的制备　12 只小鼠适应性饲养 7 d，随机分为 2 组，对照组 6 只 ip 0.9%氯化钠溶液，模型组 6 只 ip 脂多糖（LPS）溶液（10 mg·kg^{-1}）建立小鼠炎症损伤模型。注射 12 h 后，眼球取血，室温静置 0.5 h，于 4 ℃，3 000 r·min^{-1} 离心 15 min，收集上清液得对照血清（MS）和炎症血清（iMS），备用。

2.12.2　含 PC 的 IPM@SEDDS 的制备　将制备得到的 IPM@SEDDS 分别与胎牛血清（FBS）、MS 和 iMS 按体积比 1∶1 混合，于 37 ℃，150 r·min^{-1} 的摇床中孵育 1 h 后，将样品加载到琼脂糖凝胶 CL-4B 柱（20.0 cm×1.0 cm）上，采用尺寸排阻色谱（SEC）的方法除去游离的蛋白，以 PBS 溶液为洗脱液，每 500 μL 为一个组分进行收集，共收集 30 个洗脱组分，共获得 15 mL 洗脱液。使用紫外-可见分光光度计测量各组分在 280 nm 处的 *A* 值，以收集的组分为横坐标，*A* 值为纵坐标分别绘制样品的洗脱曲线（图 10），并将含有 PC 的组分汇集，分别得到 PC 包被的 IPM@SEDDS-FBS、IPM@SEDDS-MS、IPM@SEDDS-iMS，其中 IPM@SEDDS 在 11 组分开始洗脱，FBS 在第 17 个组分开始洗脱，MS 在 20 个组分开始洗脱，iMS 在 17 个组分开始洗脱。

2.12.3　透射电镜（TEM）观察　取 5 μL 的 IPM@SEDDS、IPM@SEDDS-FBS、IPM@SEDDS-MS、IPM@SEDDS-iMS 溶液垂直滴于 300 目铜网上染色 5 min，用 2%的磷钨酸复染 5 min，吸干多于的液体后置于室温晾干，在加速电压 120 kV，放大倍数 25 万倍下观察其外观形态。结果显示（图 11），IPM@SEDDS-FBS、IPM@SEDDS-MS、IPM@SEDDS-iMS 仍呈类球型，但与 IPM@SEDDS 相比，表面被 PC 包被边缘较为模糊。

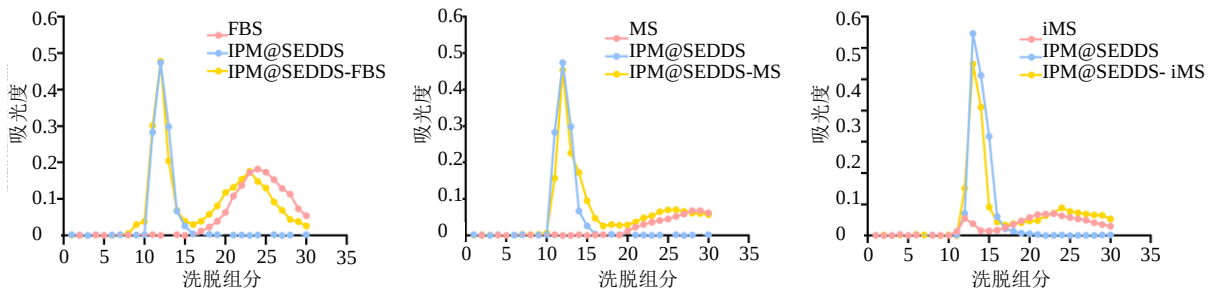


图 10　IPM@SEDDS-FBS、IPM@SEDDS-MS、IPM@SEDDS-iMS 的洗脱曲线

Fig. 10　Elution curves of IPM@SEDDS-FBS、IPM@SEDDS-MS、IPM@SEDDS-iMS

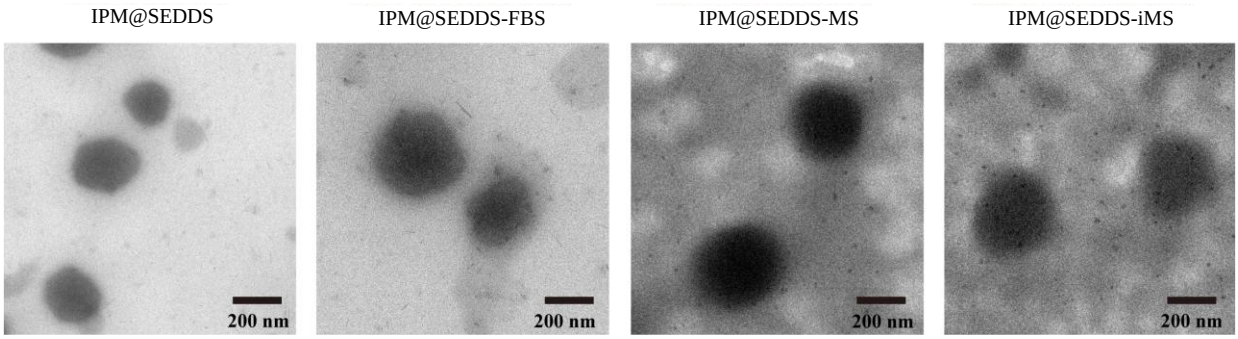


图 11 IPM@SEDDS、IPM@SEDDS-FBS、IPM@SEDDS-MS、IPM@SEDDS-iMS 的 TEM 图

Fig. 11 TEM images of IPM@SEDDS, IPM@SEDDS-FBS, IPM@SEDDS-MS and IPM@SEDDS-iMS

2.12.4 考马斯亮兰染色 按 BCA 蛋白含量测定试剂盒说明书操作，使用酶标仪在波长 570 nm 处测定牛血清白蛋白（BSA）标准品的蛋白系列标准溶液，以 BSA 标准品的系列浓度为横坐标，A 值为纵坐标绘制标准曲线，拟合回归方程为 $Y=0.978\ X+0.120\ 6$，线性范围 0～0.5 mg·mL^{-1}，相关系数 $R^2=0.999\ 5$。根据样本 IPM@SEDDS-FBS、IPM@SEDDS-MS、IPM@SEDDS-iMS 的 A 值，计算各组分蛋白质量浓度，结果如图 12 所示。

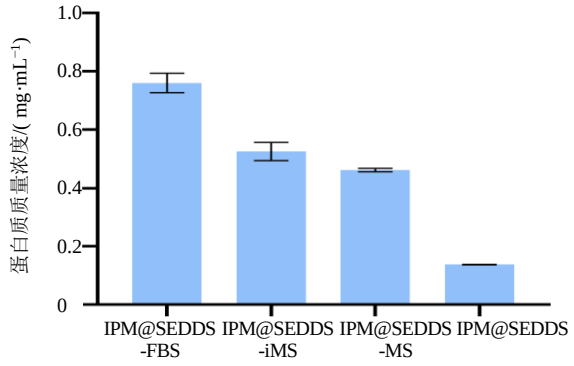


图 12 IPM@SEDDS-PC 的蛋白浓度（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 12 Protein concentration plots of IPM@SEDDS-PC ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

应用 10%的 SDS-PAGE 凝胶对所收集含 3 种不同血清 PC 的 IPM@SEDDS 及对应的血清蛋白进行电泳分离，120 V 电泳 90 min 后，将凝胶置于 0.1%考马斯蓝亮蓝 R-250 的溶液中避光染色 2 h，而后使用超纯水脱色 3～4 h，至凝胶呈透明无色，使用曝光仪采集图像。实验结果显示（图 13），IPM@SEDDS 组中无蛋白条带，FBS 中富含胎牛白蛋白、转铁蛋白等蛋白质，所以在 IPM@SEDDS-FBS 组中 7.50×10^4 处有较强的蛋白条带出现。MS 中含白蛋白、补体蛋白、lgG 等小鼠正常血浆蛋白，IPM@SEDDS-MS 组可能吸附了较多的补体蛋白，因此在约 1.80×10^5 处出现明显条带。LPS 诱导的炎症可能会使小鼠血清中急性期相关蛋白增多，白蛋白减少，考马斯亮蓝染色结果与预测相符，与 MS 组相比，iMS 组中白蛋白分子量附近的蛋白条带明显减少，IPM@SEDDS-iMS 组同样可能吸附了较多的补体蛋白，在约 1.35×10^5 处出现明显条带。考马斯亮蓝染色结果表明 IPM@SEDDS 与 3 种血清在共孵育条件下相互作用形成了 PC，且 PC 的组成与血清种类有关。

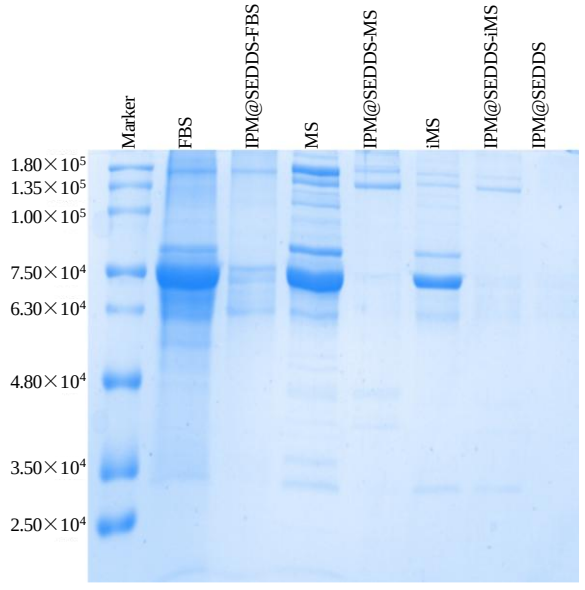


图 13 IPM@SEDDS-PC 的 SDS-PAGE 图

Fig. 13 SDS-PAGE plots of IPM@SEDDS-PC

2.12.5 时间和血清浓度对 IPM@SEDDS 吸附蛋白的影响 将 IPM@SEDDS 分别与 FBS、MS 和 iMS 按体积比 1∶1 混匀后放置于 37 ℃，150 r·min^{-1} 的摇床上孵育 15、30、60、90、120 min；将 IPM@SEDDS

分别与 FBS、MS 和 iMS 以体积比 5∶1，3∶1，1∶1，1∶3，1∶5 混匀后在摇床上孵育 60 min。以动态光散射（DLS）测量粒径为考察指标，分别考察不同孵育时间和不同血清浓度条件对 IPM@SEDDS 吸附蛋白的影响。结果见图 14。

随着 IPM@SEDDS 与 FBS、MS 和 iMS 3 种血清孵育时间的增加，可以观察到 2 h 内，IPM@SEDDS-FBS 随时间的延长而增加，IPM@SEDDS-MS 和 IPM@SEDDS-iMS 在 1 h 内随时间的延长而增加，但 1 h 后粒径开始略有减小。从考马斯亮蓝染色结果中观察到 FBS 中主要含有胎牛白蛋白，与 IPM@SEDDS 共孵育后可以快速的吸附在其表面，随着时间的延长，越来越多的蛋白吸附在其表面，因此粒径随时间的延长而增加。MS 和 iMS 的考马斯亮蓝染色中除了在约 7.50×10^4 左右观察到明显的条带外，在 2.50×10^4～4.80×10^4、1.00×10^5～1.80×10^5 也有不同程度蛋白条带的表

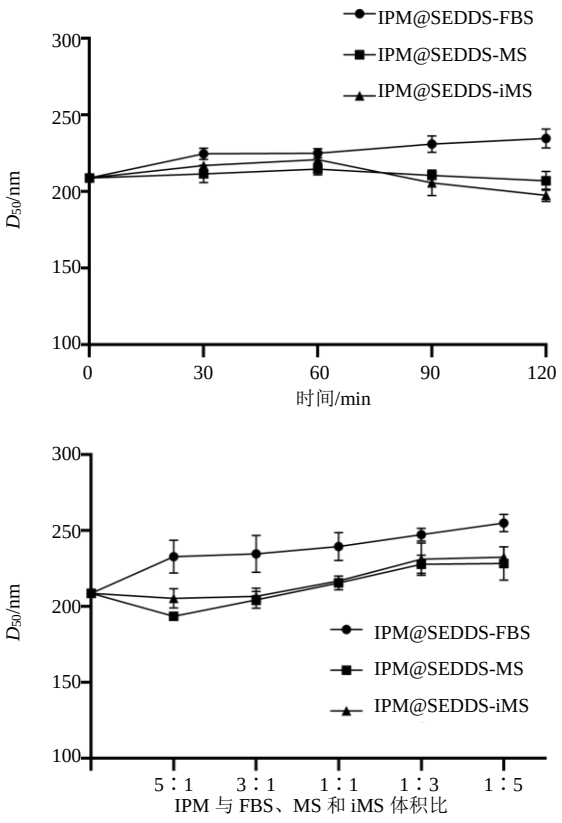


图 14　IPM@SEDDS 与 FBS、MS 和 iMS 孵育不同时间和不同浓度的粒径变化（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 14　Particle size changes of IPM@SEDDS were incubated with FBS, MS and iMS at different time and concentrations （$\bar{x}\pm s$，n = 3）

达，当 IPM@SEDDS 进入 MS 和 iMS 的环境后，可能会快速吸附白蛋白等高丰度的蛋白质，从而使粒径增加，随着相互作用时间的延长，低丰度高亲和力的蛋白逐步取代初期吸附的高丰度蛋白，形成更为稳定的 PC 层，因此出现粒径减小的现象。随着血清浓度的增加，IPM@SEDDS 与 3 种血清相互作用所形成的 PC 厚度增加，在 IPM@SEDDS 与 MS、iMS 体积比大于 1∶3 时所形成的 PC 厚度无明显变化，表明当血清达到该浓度时，与 IPM@SEDDS 的 PC 已达到稳定。此外，该实验中，与 FBS 相比，两种不同生理环境 MS 所形成的 PC 的变化趋势更为相似，也表明 PC 的形成与血清的种类有关。

3　讨论

乳液的理化性质在很大程度上受油相、乳化剂、助乳化剂的种类及比例影响。因此，在处方设计时，需考虑辅料与药物，辅料与辅料之间的配伍性，确保乳液中成分无毒、无刺激性且不影响药效。本研究选用的 T80 是一种常用的非离子型表面活性剂，生物相容性好、低毒性、且能有效的稳定蛋白质，具有良好的乳化和增溶作用[27]。无水乙醇已收入 FDA 非活性成分数据库中，可用于静脉注射剂，透皮吸收制剂和皮肤用制剂等领域[28]。

研究表明，乳剂 D_{50} 在 200 nm 时，乳滴具有被动靶向血管内皮损伤部位的性能[29]。在本实验中，以 IPM 为油相，T80 为乳化剂，无水乙醇为助乳化剂所制备的 SEDDS，选择稳定性好，D_{50} 在 200 nm 左右的 IPM@SEDDS 处方进行下一步研究。为保证 IPM@SEDDS 可用于静脉注射，对不同浓度 IPM@SEDDS 进行了溶血考察，结果表明 IPM@SEDDS 具有较好的生物相容性，符合静脉注射的要求。

目前，在 PC 的研究中常依据 PC 密度、尺寸和磁性等差异，采用离心法、尺寸排阻色谱法、磁分离法等方法实现分离纯化[30-31]。磁分离法借助磁性纳米颗粒的磁响应特性，能够在外加磁场中快速分离 PC 复合物，尽管该方法效率高，但需对纳米载体进行磁性修饰，这可能改变其表面化学性质，因此不适于本研究[32]。此外，研究表明离心法虽然用于纳米颗粒-PC 分离，但对于尺寸较小或密度低的纳米材料（如脂质体）并不适用，主要原因在于此类材料沉降困难，且高离心力易导致强烈的团聚，进而影响 PC 组成[33]。因此，本研究选择通过 SEC

技术对 PC 进行分离纯化。实验结果表明，SEDDS-PC 复合物和游离血清可在不同的组分被洗脱收集，达到 PC 分离纯化的目的。

血清成分复杂，其中含量最为丰富的蛋白质为白蛋白（35～55 g·L^{-1}）和球蛋白（20～40 g·L^{-1}），相对分子质量分别为 6.65×10^4 和 9.30×10^4～1.50×10^5，这与考马斯亮蓝染色结果一致，图谱中在 7.00×10^4 和 1.35×10^5 附近呈现出明显条带。已有研究表明，阴离子 SEDDS 的蛋白质结合显著低于相应的中性和阳离子 SEDDS。这是由于蛋白质在低于等电点的 pH 值下带正电，在高于等电点的 pH 值条件下带负电，所以在 pH 7.4 的 PBS 中带负电的 SEDDS 蛋白结合较低[34-35]。本研究制备的 IPM@SEDDS 呈负电性，因此其在 pH 7.4 的 PBS 中与 3 种血清相互作用形成的 PC 厚度较小，粒径变化不明显。此外，考马斯亮蓝染色、时间和浓度对 PC 影响的实验结果均表明，相同种类血清作用下，条带特征和粒径变化更为相似，但因病理条件差异仍存在一定区别，表明 IPM@SEDDS 与 FBS、MS、iMS 之间的相互作用形成了 PPC。

本研究评估了 IPM@SEDDS 的最佳处方，结果显示其具有较好的药剂学性能，粒径适宜、安全性较好，适用于 iv 给药系统，形成 PC 后 IPM@SEDDS 在 3 种不同种类血清中的最大粒径变化约为 40 nm，表明血清对粒径影响较小。后续研究可以通过增加剪切力等实验条件模拟动态生理环境，并结合蛋白质组学等技术深入考察不同环境中 IPM@SEDDS 的蛋白吸附特性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Singh S, Bajpai M, Mishra P. Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS): An emerging dosage form to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2020, 37(4): 305-329.

[2] Friedl J D, Walther M, Vestweber P K, et al. SEDDS-loaded mucoadhesive fiber patches for advanced oromucosal delivery of poorly soluble drugs [J]. J Control Release, 2022, 348: 692-705.

[3] 仲粒, 李小芳, 廖艳梅, 等. 甘草黄酮自微乳化释药系统的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3044-3051.
Zhong L, Li X F, Liao Y M, et al. Preparation and quality evaluation of licorice flavonoids self-microemulsifying drug delivery system [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(13): 3044-3051.

[4] Mishra V, Nayak P, Yadav N, et al. Orally administered self-emulsifying drug delivery system in disease management: Advancement and patents [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2021, 18(3): 315-332.

[5] Survase S A, Kagliwal L D, Annapure U S, et al. Cyclosporin A: A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications [J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(4): 418-435.

[6] Gandhi N, Modi S, Soni S, et al. Modular self-emulsifying drug delivery platform to enhance cellular uptake activity in triple-negative breast cancer [J]. Eur J Pharm Sci, 2025, 206: 106993.

[7] Eid R K, Arafa M F, El Maghraby G M. Water in Nigella oil microemulsion for enhanced oral bioavailability of linagliptin [J]. Drug Deliv Transl Res, 2025, 15(2): 596-608.

[8] 缪妍, 胡丽琴, 张珂, 等. 药用辅料在中药制剂中的应用研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(6): 734-741.
Miao Y, Hu L Q, Zhang K, et al. Advances in research on the application of pharmaceutical excipients in traditional Chinese medicine preparations [J]. J China Pharm Univ, 2024, 55(6): 734-741.

[9] 杨志欣, 张蕾, 王鑫, 等. 自乳化药物递送系统研究概述 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 563-569.
Yang Z X, Zhang L, Wang X, et al. General introduction of research on self-emulsifying drug delivery systems [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(3): 563-569.

[10] Sandmeier M, Hoeng J, Skov Jensen S, et al. Oral formulations for highly lipophilic drugs: Impact of surface decoration on the efficacy of self-emulsifying drug delivery systems [J]. J Colloid Interface Sci, 2025, 677(Pt A): 1108-1119.

[11] Uttreja P, Karnik I, Adel Ali Youssef A, et al. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): Transition from liquid to solid-a comprehensive review of

formulation, characterization, applications, and future trends [J]. Pharmaceutics, 2025, 17(1): 63.

[12] Shen Q, Wang M, Tang X H, et al. Preparation of a Hippophae rhamnoides Linn oil nanoemulsion and the visualization of its transdermal permeation [J]. J Chin Pharm Sci, 2019, 28(8): 579-594.

[13] Baghdadi R A, Abdalla A N, Abourehab M A S, et al. Evaluation of the effects of a dasatinib-containing, self-emulsifying, drug delivery system on HT29 and SW420 human colorectal carcinoma cells, and MCF7 human breast adenocarcinoma cells [J]. J Taibah Univ Med Sci, 2024, 19(4): 806-815.

[14] Prajapati B G, Paliwal H, Shah P A. In vitro characterization of self-emulsifying drug delivery system-based lipsticks loaded with ketoconazole [J]. Future J Pharm Sci, 2023, 9(1): 35.

[15] Zhang H J, Wang R T, Xu Z Q, et al. Oral multidrug co-delivery system targeting differential sites for diabetes mellitus treatment [J]. Adv Funct Mater, 2024, 34(11): 2309809.

[16] Li H M, Yin D, Liao J Y, et al. Regulation of protein Corona on liposomes using albumin-binding peptide for targeted tumor therapy [J]. J Control Release, 2023, 355: 593-603.

[17] Park S J. Protein-nanoparticle interaction: Corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 5783-5802.

[18] Bélteky P, Rónavári A, Zakupszky D, et al. Are smaller nanoparticles always better? understanding the biological effect of size-dependent silver nanoparticle aggregation under biorelevant conditions [J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 3021-3040.

[19] Aliyandi A, Reker-Smit C, Bron R, et al. Correlating Corona composition and cell uptake to identify proteins affecting nanoparticle entry into endothelial cells [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2021, 7(12): 5573-5584.

[20] Wang Y Z, Zhang H L, Xiao W, et al. Unmasking CSF protein Corona: Effect on targeting capacity of nanoparticles [J]. J Control Release, 2021, 333: 352-361.

[21] Tekie F S M, Hajiramezanali M, Geramifar P, et al. Controlling evolution of protein Corona: A prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9664.

[22] Barbalinardo M, Caicci F, Cavallini M, et al. Protein Corona mediated uptake and cytotoxicity of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblast [J]. Small, 2018, 14(34): e1801219.

[23] Ding T H, Guan J, Wang M K, et al. Natural IgM dominates *in vivo* performance of liposomes [J]. J Control Release, 2020, 319: 371-381.

[24] Xiao Q Q, Zoulikha M, Qiu M, et al. The effects of protein Corona on *in vivo* fate of nanocarriers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 186: 114356.

[25] Tang H, Zhang Y, Yang T, et al. Cholesterol modulates the physiological response to nanoparticles by changing the composition of protein Corona [J]. Nat Nanotechnol, 2023, 18(9): 1067-1077.

[26] 刘欢欢, 吴采栋, 李琪琪, 等. 2 种自乳化递送系统的制备及其对斑马鱼炎症损伤部位“引药”作用 [J]. 中草药, 2023, 54(16): 5204-5213.
Liu H H, Wu C D, Li Q Q, et al. Preparation of two self-emulsifying delivery systems and its medicinal usher effect on zebrafish with inflammatory injury [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(16): 5204-5213.

[27] Kudłacik-Kramarczyk S, Drabczyk A, Przybyłowicz A, et al. Linseed oil-based oleogel vehicles for hydrophobic drug delivery-physicochemical and applicative properties [J]. Pharmaceutics, 2024, 16(5): 600.

[28] Okonogi S, Phumat P, Khongkhunthian S, et al. Development of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing 4-allylpyrocatechol for treatment of oral infections caused by Candida albicans [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(2): 167.

[29] Shoji Y, Mizushima Y, Yanagawa A, et al. Electron microscopic studies on tissue distribution of lipid microspheres used as drug delivery carriers [J]. Drugs Exp Clin Res, 1985, 11(9): 601-609.

[30] García-Álvarez R, Vallet-Regí M. Hard and soft protein Corona of nanomaterials: Analysis and relevance [J]. Nanomaterials (Basel), 2021, 11(4): 888.

[31] Kristensen K, Münter R, Kempen P J, et al. Isolation methods commonly used to study the liposomal protein

Corona suffer from contamination issues [J]. Acta Biomater, 2021, 130: 460-472.

[32] Ashkarran A A, Dararatana N, Crespy D, et al. Mapping the heterogeneity of protein Corona by *ex vivo* magnetic levitation [J]. Nanoscale, 2020, 12(4): 2374-2383.

[33] Yang K N, Mesquita B, Horvatovich P, et al. Tuning liposome composition to modulate Corona formation in human serum and cellular uptake [J]. Acta Biomater, 2020, 106: 314-327.

[34] Le-Vinh B, Le N N, Phan T N Q, et al. Effects of excipients on the interactions of self-emulsifying drug delivery systems with human blood plasma and plasma membranes [J]. Drug Deliv Transl Res, 2024, 14(11): 3200-3211.

[35] Arezki Y, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, et al. Surface charge influences protein Corona, cell uptake and biological effects of carbon dots [J]. Nanoscale, 2022, 14(39): 14695-14710.

[责任编辑 孙英杰]

≈≈≈