

马钱子碱纳米结构脂质载体处方与制备工艺的优化

管庆霞, 张伟兵, 张喜武, 刘振强, 于欣, 李伟男, 华晓丹, 王锐, 冯宇飞, 吕邵娃*
黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 优化马钱子碱纳米结构脂质载体(B-NLC)处方与制备工艺。方法 溶剂乳化超声法制备 B-NLC, 以单因素考察法结合星点设计-效应面法(CCD-RSM)优化处方与制备工艺。结果 所制备的 B-NLC 为淡蓝色乳光的透明液体。最优条件为药物用量为 1.28 mg, 泊洛沙姆 188 质量浓度为 1.08%, 固态脂质与液态脂质的比例为 1.45 : 1, 平均粒径为 (136.89 ± 4.23) nm, 多分散指数(PDI)为 0.289 ± 0.005 , Zeta 电位为 (-34.46 ± 0.31) mV, 包封率为 $(68.98 \pm 2.06)\%$, 载药量为 $(1.90 \pm 0.06)\%$ 。结论 溶剂乳化超声法制备的 B-NLC 包封率高, 粒径小, 分布均匀, 该方法操作简单方便, 可以用于 B-NLC 制备与处方的优化, 为马钱子碱的进一步体内研究奠定了基础。

关键词: 马钱子碱; 纳米结构脂质载体; 溶剂乳化超声法; 单因素考察法; 星点设计-效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)11-2557-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.011

Optimization of prescription and preparation technology of brucine nanostructured lipid carriers

GUAN Qing-xia, ZHANG Wei-bing, ZHANG Xi-wu, LIU Zhen-qiang, YU Xin, LI Wei-nan, HUA Xiao-dan, WANG Rui, FENG Yu-fei, LV Shao-wa

College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To optimize the prescription and preparation technology of brucine nanostructured lipid carriers (B-NLC). **Methods** The method of "the solvent emulsification ultrasound" was used to prepare B-NLC. The prescription and preparation was optimized using a single factor method combined with central composite design-response surface methodology (CCD-RSM). **Results** The resultant B-NLC was transparent liquid with light blue opalescence. The optimal conditions were that the dosage of drugs was 1.28 mg, the mass concentration of poloxamer 188 was 1.08%, and the ratio of solid lipid to liquid lipid was 1.45 : 1. The obtained NLC showed the average particle size of (136.89 ± 4.23) nm with a polydispersity index of 0.289 ± 0.005 and a zeta potential of (-34.46 ± 0.31) mV. The entrapment efficiency was calculated to be $(68.98 \pm 2.06)\%$, and the drug loading content was $(1.90 \pm 0.06)\%$. **Conclusion** B-NLC prepared by solvent emulsification ultrasound had a high entrapment efficiency and a narrow particle size distribution. The method was easy and simple and can be used to optimize the prescription and preparation of B-NLC, which provides a foundation for the further *in vivo* research of brucine.

Key words: brucine; nanostructured lipid carriers; solvent emulsification ultrasonic method; single factor method; central composite design-response surface method

马钱子碱是中药马钱子的主要有效成分之一, 目前国内外学者研究证明其除了具有明显的镇痛^[1]、抗炎、免疫调节、中枢神经系统兴奋等作用, 还可以治疗多种肿瘤, 如肺癌、肝癌、乳腺癌、骨肿瘤、白血病等^[2-5]。但是马钱子碱具有毒性, 且半衰期短,

生物利用度低, 在一定程度上限制了其在临床上的应用。如何将马钱子碱开发成安全、有效的给药系统以避免其毒性, 提高生物利用度, 使其更好地服务于临床是目前急需解决的难点^[6-8]。

纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carriers,

收稿日期: 2017-12-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金面上项目(H2016076); 黑龙江中医药中青年科技攻关项目(ZQG-039); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(I2531624); 哈尔滨市应用技术与开发项目(青年后备人才A类)(2017RAQXJ090)

作者简介: 管庆霞(1974—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药纳米递药系统及中药新药开发。Tel: (0451)87266893 E-mail: 546105832@qq.com

*通信作者 吕邵娃(1971—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及新药开发。Tel: (0451)87266916 E-mail: 1031892056@qq.com

NLC) 系统是为了克服传统固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLN) 的不足对其进行修饰而开发的一种新型载体系统^[9]。NLC 具有以下优点^[10-11]: 液态脂质的加入不会改变纳米粒固体内核的性质, 不仅可以使难溶性药物的溶解度增加, 提高药物的包封率和载药量, 还可以延缓药物的泄露; NLC 的载体原料可以在体内生物降解, 对机体的毒副作用较小, 且 NLC 具有缓控释和靶向性。

星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 是集数学与统计学于一体的多因素 5 水平优化方法, 是一种新型的实验设计方法, 国内外近年来常用 CCD-RSM 进行实验设计, 因其能够较好地保证实验的精度, 分析各个因素之间的相互作用, 具有实验次数少, 精度高, 预测值更接近真实值等特点^[12-15]。因此, 本实验采用单因素考察结合 CCD-RSM 对马钱子碱纳米结构脂质载体 (brucine nanostructured lipid carriers, B-NLC) 的处方和工艺进行优化, 为马钱子碱的进一步体内研究奠定了基础。

1 仪器与材料

Waters e2695-2698 高效液相色谱仪系统, 美国 Waters 公司; AB265-S 分析电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Autotune 高强度超声波细胞破碎仪, 美国 SONICS 公司; DF-101Z 恒温磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; SB-5200D 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

马钱子碱对照品, 批号 110706-200505, 质量分数 98%, 中国食品药品检定研究院; 单硬脂酸甘油酯, 分析纯, 天津市化学试剂三厂; 油酸, 分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司; 高纯氢化大豆磷脂, 美国 Cargill 公司; 泊洛沙姆 188 (F68), 德国 BASF 公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50, 分离范围 1 000~3 000, 上海浩然生物技术有限公司; 甲醇, 色谱纯, 北京 DIKMA 公司; 无水乙醇, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司; 硬脂酸, Aladdin Chemistry Co., Ltd.

2 方法与结果

2.1 B-NLC 的制备

本实验曾采用薄膜超声分散法、熔融超声分散法、溶剂乳化超声法^[16]3 种方法以相同质量的单硬脂酸甘油酯、油酸、无水乙醇、马钱子碱为油相, 相同体积的 F68 水溶液为水相制备 B-NLC, 所制备的 B-NLC 的包封率、粒径、多分散指数 (PDI)、Zeta 电位结果见表 1。由表 1 可知溶剂乳化超声法制备的 B-NLC 比薄膜超声分散法、熔融超声分散法制备的 B-NLC 包封率高、粒径小、且分散较好; 另外, 溶剂乳化超声法制备的 B-NLC 外观为淡蓝色乳光液体, 而薄膜超声分散法外观为乳白色液体, 熔融超声分散法制得的 B-NLC 出现分层现象。故本实验采用溶剂乳化超声法制备 B-NLC, 即精密称取处方量的单硬脂酸甘油酯、油酸、卵磷脂, 在 60 °C 水浴条件下溶于量取的 2 mL 无水乙醇中, 搅拌使其完全溶解, 将适量的药物加入其中构成有机相, 在磁力搅拌 60 °C 水浴情况下将有机相加入到量取的 20 mL 0.5% F68 (称取 0.5 g F68 溶于 100 mL 蒸馏水中) 水溶液中, 滴加完毕后细胞破碎仪超声 3 min, 室温磁力搅拌 45 min, 挥去无水乙醇, 即得 B-NLC 混悬液。

2.2 B-NLC 处方工艺的优化

按照文献方法^[17]测定 B-NLC 的载药量和包封率。取 B-NLC 样品, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 放入样品池中, 用 Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪测定 B-NLC 的粒径、PDI、Zeta 电位, 平行 3 次。以载药量、包封率、粒径、PDI、Zeta 电位为评价指标进行单因素考察。

考察单硬脂酸甘油酯、硬脂酸以及 2 种物质合用作为固态脂质载体材料, 结果见表 2。单独使用单硬脂酸甘油酯时包封率较大, 载药量较高, 单独使用硬脂酸时, 粒径较小, 但包封率和载药量较低, 两者合用时。粒径与单独使用单硬脂酸甘油酯时相差不大, 但是 PDI 明显增高, 表明粒径分布不均匀, 而且包封率、载药量也有所降低, 故本实验选择单用单硬脂酸甘油酯为载体材料。

表 1 不同制备方法对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of different preparation methods on B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备方法	包封率/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV	PDI
薄膜超声分散法	48.12 ± 1.25	242.02 ± 5.23	-26.48 ± 4.45	0.254 ± 0.003
熔融超声分散法	45.89 ± 2.03	203.20 ± 2.43	-19.89 ± 3.57	0.284 ± 0.008
溶剂乳化超声法	55.35 ± 1.21	151.02 ± 3.43	-26.08 ± 1.61	0.201 ± 0.013

表 2 不同固态脂质对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of different solid lipids on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

固态脂质种类	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
单硬脂酸甘油酯	157.21 ± 1.28	0.205 ± 0.031	-30.10 ± 3.50	50.12 ± 2.34	0.99 ± 0.02
硬脂酸	123.34 ± 2.07	0.310 ± 0.001	-23.08 ± 2.09	34.04 ± 4.12	0.68 ± 0.03
单硬脂酸甘油酯-硬脂酸 (1 : 1)	154.09 ± 3.67	0.587 ± 0.013	-20.01 ± 2.12	40.21 ± 2.34	0.79 ± 0.04

考察注射用大豆油、油酸、以及二者合用作为液态脂质载体材料,结果见表 3。单独使用注射用大豆油时,粒径较大,PDI 较大,粒径分布不均匀,Zeta 电位较小;单独使用油酸时,粒径较小,包封率、载药量较高,而将两者合用时,包封率不如单独使用油酸时高,故本实验选择单用油酸作为液态脂质。

考察 F68、卵磷脂、以及二者合用作为表面活性剂,结果见表 4。F68 与卵磷脂合用提高了包封率与载药量,而且稳定性较好,故选择 F68 与卵磷脂合用。

考察 F68 质量分数分别为 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 5 个水平,结果见表 5。F68 的质量分数对 B-NLC 粒径大小的影响较大,其平均粒径随着 F68 质量分数的增加呈现先减小后增加的趋势,其

包封率、载药量在 F68 质量分数为 1.0% 时较高,选择此条件在 0.8%~1.2% 做进一步优化。

考察有机相与水相的比例分别为 1 : 1、1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 10 5 个水平,结果见表 6。有机相的比例过大,易造成有机溶剂残留,会在放置过程中破坏 NLC 结构,造成药物泄露和体系稳定性下降。有机相比例过小,会使包封率、载药量下降。最终选择有机相与水相的比例为 1 : 8。

考察固态脂质与液态脂质比例分别为 1 : 1、1 : 2、1 : 3、3 : 1、2 : 1 5 个水平,结果见表 7。固态脂质与液态脂质的比例对 B-NLC 包封率与载药量影响较大。故选择此条件在 0.5~1.5 进一步优化研究。

考察药物与脂质比例分别为 1 : 10、1 : 30、1 : 50、1 : 80、1 : 120 5 个水平,结果见表 8。固定药

表 3 不同液态脂质对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of different liquid lipids on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

液态脂质种类	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
油酸	161.34 ± 2.15	0.245 ± 0.034	-26.21 ± 3.13	49.12 ± 2.31	0.97 ± 0.03
注射用大豆油	222.12 ± 3.21	0.567 ± 0.013	-12.31 ± 2.22	39.98 ± 2.03	0.79 ± 0.02
油酸-注射用大豆油 (1 : 1)	202.13 ± 3.41	0.324 ± 0.018	-20.43 ± 1.23	40.12 ± 4.01	0.90 ± 0.04

表 4 不同表面活性剂对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of different surfactants on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表面活性剂种类	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
F68	121.21 ± 2.191	0.241 ± 0.011	-24.21 ± 1.23	34.65 ± 1.22	0.69 ± 0.02
卵磷脂	223.23 ± 2.23	0.341 ± 0.047	-25.56 ± 1.45	40.22 ± 3.12	0.80 ± 0.01
F68-卵磷脂 (1 : 3)	156.19 ± 1.81	0.310 ± 0.031	-27.89 ± 1.23	46.13 ± 2.17	0.91 ± 0.02

表 5 F68 质量浓度对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of different F68 mass concentrations on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

F68 质量分数/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
0.1	175.30 ± 1.33	0.229 ± 0.019	-27.56 ± 2.17	41.22 ± 1.11	0.82 ± 0.02
0.5	134.12 ± 1.19	0.224 ± 0.005	-28.56 ± 1.93	52.11 ± 1.02	1.02 ± 0.03
1.0	133.31 ± 1.18	0.219 ± 0.049	-27.78 ± 1.76	52.18 ± 1.06	1.01 ± 0.03
1.5	135.22 ± 1.26	0.218 ± 0.038	-28.31 ± 1.93	52.05 ± 1.33	0.99 ± 0.02
2.0	178.23 ± 1.21	0.348 ± 0.023	-26.38 ± 2.13	50.91 ± 1.26	0.97 ± 0.03

表 6 不同有机相与水相比例对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Effects of different proportion of organic solvent-water on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

有机相/水相	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1 : 1	419.84 ± 4.13	0.518 ± 0.034	-28.45 ± 1.23	28.98 ± 3.16	0.54 ± 0.03
1 : 2	361.19 ± 4.71	0.456 ± 0.028	-27.81 ± 2.30	28.57 ± 3.12	0.54 ± 0.02
1 : 4	209.35 ± 2.14	0.392 ± 0.028	-26.78 ± 1.82	42.24 ± 2.13	0.80 ± 0.01
1 : 8	146.32 ± 1.26	0.184 ± 0.034	-28.31 ± 2.14	50.21 ± 2.15	0.95 ± 0.02
1 : 10	140.29 ± 2.13	0.124 ± 0.051	-22.91 ± 2.19	40.05 ± 2.12	0.76 ± 0.02

表 7 固态脂质与液态脂质比例对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Effects of ratio of solid lipid to liquid lipid on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

固态/液态脂质	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1 : 1	134.51 ± 1.23	0.231 ± 0.004	-28.76 ± 0.32	45.18 ± 0.42	0.83 ± 0.02
1 : 2	199.76 ± 3.12	0.432 ± 0.063	-27.69 ± 0.67	34.68 ± 0.58	0.44 ± 0.01
1 : 3	256.64 ± 4.12	0.321 ± 0.032	-26.37 ± 0.58	30.76 ± 0.73	0.30 ± 0.02
3 : 1	167.28 ± 2.31	0.264 ± 0.031	-24.49 ± 0.91	40.56 ± 0.68	1.08 ± 0.02
2 : 1	170.38 ± 2.19	0.258 ± 0.044	-25.76 ± 0.83	39.85 ± 0.49	0.97 ± 0.01

物质量,随着脂质用量的增加,粒径呈现逐步增加趋势,PDI 逐渐变大,粒径分布变得不均匀,Zeta 电位逐渐增大,溶液变得不稳定,包封率呈现先增加后减少最后趋于平稳的趋势,载药量逐渐降低,综合考虑,最终选择药物与脂质的比例为 1 : 30。

考察 0.4、0.8、1.6、2.0、2.4 mg 5 个药物用量,结果见表 9,药物用量对 B-NLC 的包封率及粒径影响较大,选择此条件在 0.4~1.2 g 继续优化。

由单因素考察结果可知,药物用量、固态脂质

与液态脂质的比例,F68 质量分数对 B-NLC 影响较大,故采用 CCD-RSM 做进一步优化。

2.3 CCD-RSM 优化 B-NLC 处方

2.3.1 实验设计 在对于影响 B-NLC 各种指标的单因素考察基础之上,发现药物用量(A)、固态脂质与液态脂质的比例(B)、F68 质量分数(C)对方考察指标影响较大,故选择此 3 因素进行实验设计,本设计共设 5 水平(包括中心点、析因设计点、极值点), $r=1.682$,各变量范围实际值标准化

表 8 药物与脂质比例对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Effects of different proportion of drug and lipid on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物/脂质	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1 : 10	146.37 ± 2.11	0.119 ± 0.003	-26.84 ± 0.87	29.07 ± 1.34	2.03 ± 0.05
1 : 30	156.34 ± 3.18	0.214 ± 0.009	-34.46 ± 0.22	49.78 ± 1.23	1.44 ± 0.04
1 : 50	256.71 ± 4.24	0.374 ± 0.023	-27.45 ± 0.32	48.96 ± 1.26	0.90 ± 0.03
1 : 80	289.76 ± 3.26	0.445 ± 0.016	-18.54 ± 1.16	47.84 ± 1.42	0.57 ± 0.03
1 : 120	345.26 ± 3.65	0.438 ± 0.013	-17.98 ± 2.13	47.59 ± 1.78	0.38 ± 0.02

表 9 药物用量对 B-NLC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 9 Effects of dosage of drugs on preparation of B-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物用量/mg	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
0.4	156.87 ± 1.21	0.189 ± 0.048	-28.67 ± 0.98	35.45 ± 1.24	0.39 ± 0.01
0.8	155.67 ± 1.22	0.191 ± 0.051	-28.94 ± 0.66	50.21 ± 1.11	1.10 ± 0.02
1.6	197.55 ± 1.76	0.218 ± 0.074	-27.98 ± 0.92	25.22 ± 2.13	1.17 ± 0.02
2.0	198.66 ± 2.13	0.234 ± 0.089	-29.91 ± 0.69	21.19 ± 1.16	1.16 ± 0.01
2.4	209.22 ± 1.81	0.241 ± 0.078	-30.31 ± 0.49	18.16 ± 1.18	1.19 ± 0.02

值见表 10。以包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 为响应参数, 按照实验设计的试验点进行实验。记录实验数据填入相应表格内, 结果见表 10。

2.3.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert V8.0.6 软件, 以 Y_1 、 Y_2 分别对 A、B、C 对实验数据进行多元线性和 2 次多项式回归方程拟合。由于多元线性的置信度、拟合度均偏低, 因此采用 2 次多项式回归方程拟合。多元线性拟合方程: $Y_1 = 59.71 + 0.57 A + 6.15 B + 0.29 C$ ($R^2 = 0.368 7$, $P = 0.055 7$), $Y_2 = 1.51 + 0.23 A + 0.16 B + 3.29 \times 10^{-3} C$ ($R^2 = 0.556 3$, $P = 0.003 9$)。二次多项式拟合方程: $Y_1 = 67.74 + 0.57 A - 6.15 B + 0.29 C + 3.27 AB + 2.63 AC - 1.85 A^2 - 5.77 B^2 - 4.13 C^2$ ($R^2 = 0.946 1$, $P < 0.000 1$), $Y_2 = 1.77 + 0.23 A + 0.16 B + 3.29 \times 10^{-3} C + 0.098 AB - 0.15 A^2 - 0.14 B^2 - 0.098 C^2$ ($R^2 = 0.910 8$, $P < 0.000 1$)。

从拟合方程的 R^2 与 P 值可知, 二次多项式拟合较好, 可用此模型对 B-NLC 的处方进行分析和预测。 Y_1 与 Y_2 的响应面模型方差分析结果见表 11、12。由表 11、12 可知, Y_1 、 Y_2 模型项 $P < 0.000 1$, 说明回归方程的关系是极显著的。对于 Y_1 模型方程 B、AB、AC、 A^2 、 B^2 、 C^2 都是显著项, 是 Y_1 的显著影响因素, 交互影响因素 3D 效果图与等高线图见图 1。对于 Y_2 模型方程 A、B、AB、 A^2 、 B^2 、 C^2 都是显著项, 是 Y_2 的显著影响因素, 交互影响因素 3D 效果图与等高线图见图 1。

2.3.3 响应面优化 结合试验要求, 公共区域中效应面响应值较高部分为最佳区域, 并选择最佳处方范围, 确定最佳参数范围为 $0.92 \leq A \leq 1.33$, $1.08 \leq B \leq 1.53$, $0.89 \leq C \leq 1.13$ 。由 Design-Expert V8.0.6 软件设计优化因素范围。最终确定包封率、载药量最高的处方条件是 $A = 1.28 \text{ mg}$, $B = 1.45$, $C = 1.08\%$ 。

表 10 实验设计和结果

Table 10 Design and results of experiment

试验号	A/mg	B	C/%	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	A/mg	B	C/%	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	1.2 (1)	0.5 (-1)	0.8 (-1)	44.02	1.25	11	1.47 (1.682)	1.0 (0)	1.0 (0)	67.56	1.95
2	1.2 (1)	1.5 (1)	1.2 (1)	65.80	1.84	12	0.8 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	68.00	1.78
3	0.4 (-1)	1.5 (1)	1.2 (1)	54.09	1.17	13	0.8 (0)	0.16 (-1.682)	1.0 (0)	41.10	1.08
4	1.2 (1)	1.5 (1)	0.8 (-1)	60.90	1.72	14	0.4 (-1)	0.5 (-1)	1.2 (1)	50.78	1.10
5	0.4 (-1)	1.5 (1)	0.8 (-1)	62.00	1.37	15	0.8 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	67.90	1.78
6	1.2 (1)	0.5 (-1)	1.2 (1)	47.10	1.32	16	0.8 (0)	1.0 (0)	0.66 (-1.682)	54.66	1.45
7	0.13 (-1.682)	1.0 (0)	1.0 (0)	60.00	0.78	17	0.8 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	68.97	1.81
8	0.8 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	67.80	1.78	18	0.4 (-1)	0.5 (-1)	0.8 (-1)	55.90	1.24
9	0.8 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	65.21	1.71	19	0.8 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	68.10	1.78
10	0.8 (0)	1.84 (1.682)	1.0 (0)	64.31	1.69	20	0.8 (0)	1.0 (0)	1.34 (1.682)	60.00	1.56

表 11 Y_1 方差分析

Table 11 ANOVA results for B-NLC as Y_1

因素	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	1 340.86	8	24.15	<0.000 1	极显著
A	4.41	1	0.64	0.442 0	
B	516.96	1	74.49	<0.000 1	极显著
C	1.13	1	0.16	0.694 1	
AB	85.61	1	12.33	0.004 9	极显著
AC	55.18	1	7.95	0.016 7	显著
A^2	49.48	1	7.13	0.021 8	显著
B^2	479.56	1	69.10	<0.000 1	极显著
C^2	246.22	1	35.48	<0.000 1	极显著
残差	76.34	11			

表 12 Y_2 方差分析

Table 12 ANOVA results for B-NLC as Y_2

因素	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	1.80	7	17.50	<0.000 1	极显著
A	0.75	1	50.61	<0.000 1	极显著
B	0.36	1	24.19	0.000 4	极显著
C	1.483×10^{-4}	1	0.01	0.921 7	
AB	0.076	1	5.16	0.042 3	显著
A^2	0.32	1	21.79	0.000 5	极显著
B^2	0.28	1	19.28	0.000 9	极显著
C^2	0.14	1	9.39	0.009 8	极显著
残差	0.18	12			

2.3.4 优化后的处方验证 依据最优条件制备 B-NLC 3 批样品。并将测定的平均结果与拟合方程的预测值进行比较, 计算其相对偏差 $[RD, RD = (\text{预测值} - \text{实测值}) / \text{预测值}]$, 评价建立模型方程的可靠性。电位、粒径、外观形态如图 2, 为带淡蓝色乳光的透明液体。测定结果见表 13、14。由表 14 可知, 实测值与预测值之间的偏差率较小, RD 小于

5%, 说明优化后的处方验证试验的预测值和实测值基本相吻合, 星点设计-效应面法的预测效果良好, 可以描述效应面和影响因素之间的关系。

3 讨论

本课题组前期研究结果^[17]表明 HPLC 法测定包封率、载药量符合分析要求。本实验在单因素考察基础之上, 发现药物用量、固态脂质与液态脂质的

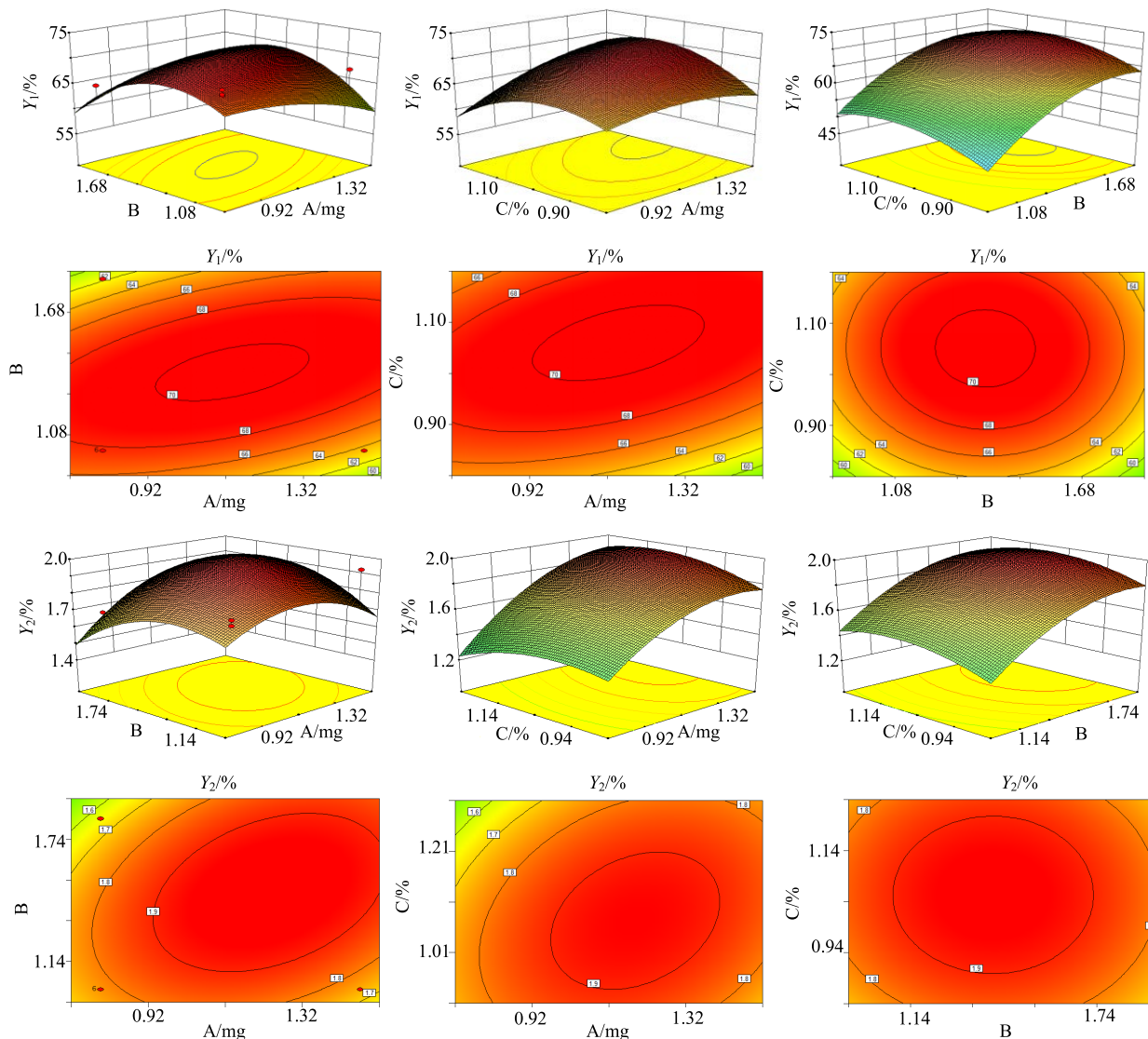


图 1 Y_1 和 Y_2 响应面图

Fig. 1 Response surface figures of Y_1 and Y_2

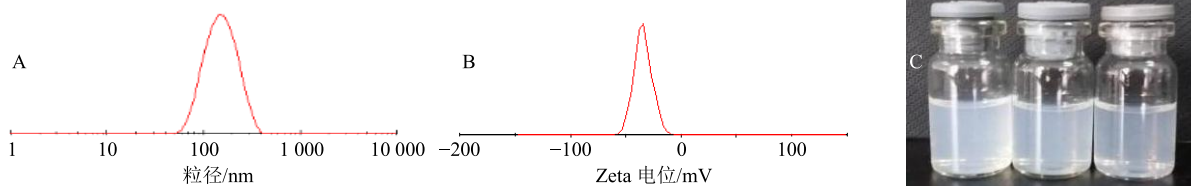


图 2 B-NLC 的粒径 (A)、Zeta 电位 (B) 和外观 (C)

Fig. 2 Particle size, Zeta potential, and appearance of B-NLC

表 13 验证结果 ($n = 3$)
Table 13 Verification results ($n = 3$)

批次	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1	140.86	0.289	-34.76	70.98	1.85
2	137.37	0.294	-34.48	69.09	1.88
3	132.44	0.284	-34.14	66.87	1.97
平均值	136.89±4.23	0.289±0.005	-34.46±0.31	68.98±2.06	1.90±0.06

表 14 验证结果 ($n = 3$)
Table 14 Verification results ($n = 3$)

指标	预测值/%	实测值/%	RD/%
包封率	70.82	68.98±2.06	2.60
载药量	1.99	1.90±0.06	4.52

比例、F68 质量浓度对方考察指标影响较大，故选择此 3 因素进行 CCD-RSM 实验设计来进一步优化。从拟合方程可知，2 次多项式拟合较好，优化后的最优条件为药物用量为 1.28 mg，固态与液态脂质的比为 1.45，F68 质量浓度为 1.08%。依据最优工艺与处方条件制备的 B-NLC 3 批样品各项评价指标变化差异小，说明重现性良好。

目前，如何改变马钱子碱在体内的自然分布，使其在非作用部位的毒性降低，作用部位的疗效增强，从而开发成高效、安全的药物已成为临床研究的热点^[1,18]。本实验成功制备了 B-NLC，并对其进行了优化，为之后对马钱子碱的进一步研究提供了参考。马钱子碱具有多种药理作用，却因其具有毒性，半衰期短，生物利用度低等缺点而限制了其临床应用，本实验为马钱子的进一步奠定了剂型基础。

参考文献

[1] 唐 敏, 伍冠一, 朱 婵, 等. 马钱子碱镇痛研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1791-1795.
[2] 李仙仙, 魏 武. 马钱子碱抗肿瘤及减毒增效的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(20): 486-487.
[3] 李永吉, 张欣媛, 管庆霞, 等. 浅议马钱子研究进展 [J]. 中医药学报, 2011, 39(4): 104-106.
[4] 曹 欢, 管庆霞, 张 亮, 等. 马钱子新型制剂研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(4): 622-624.
[5] 王海丽, 魏 武, 纪爱芳, 等. 马钱子碱对人白血病细胞株 K562 细胞的诱导凋亡作用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(3): 630-633.
[6] 秦建民, 杨 林, 撒忠秋, 等. 马钱子碱免疫纳米微粒的研制及药代动力学特点 [J]. 中国组织工程研究,

2012, 16(29): 5331-5335.
[7] 赵引利, 何燕宁, 杨宇杰, 等. 马钱子及其制剂药动力学研究进展 [J]. 中草药, 2015, 36(11): 1710-1774.
[8] 吴小娟, 马凤森, 郑高利. 马钱子吲哚类生物碱毒性研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 231-235.
[9] 郑 娟, 沈成英, 庞建云, 等. 丹参酮 II_A 纳米结构脂质载体的体外评价及其对 HaCaT 细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4340-4344.
[10] 高振东. 新型纳米结构脂质载体给药系统的研究进展 [J]. 中国药业, 2013, 22(4): 93-94.
[11] 刘碧林, 石明芯, 朱照静, 等. 星点设计-效应面法优化姜黄素正负离子纳米结构脂质载体处方 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3401-3406.
[12] Vaka S R K, Shivakumar H N, Repka M A, et al. Formulation and evaluation of carnosic acid nanoparticulate system for upregulation of neurotrophins in the brain upon intranasal administration [J]. *J Drug Target*, 2013, 21(1): 44-53.
[13] Jia L J, Shen J Y, Zhang D R, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of oridonin-loaded long circulating nanostructured lipid carriers [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3): 523-529.
[14] Eskandari S, Varshosaz J, Minaiyan M, et al. Brain delivery of valproic acid via intranasal administration of nanostructured lipid carriers: *In vivo* pharmacodynamic studies using rat electroshock model [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6: 363-371.
[15] 姜 雯, 曾 诚, 于 宁, 等. 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 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 57-64.
[16] 冯炜玮, 陈志伟. 固体脂质体纳米粒制备方法的研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(3): 218-221.
[17] 管庆霞, 华晓丹, 张喜武, 等. HPLC 法测定马钱子碱纳米结构脂质载体的主药含量及包封率 [J]. 中国药房, 2015, 26(21): 2983-2986.
[18] 何晓玮, 范晓萍, 钟 涛, 等. 马钱子碱新型给药系统治疗类风湿性关节炎的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(12): 2908-2911.