

# 木香羟内酯与去氢木香内酯共包封聚乙二醇化长循环脂质体的制备及表征

王文俊<sup>1</sup>, 严晓敏<sup>1</sup>, 陈自强<sup>1</sup>, 李奇娟<sup>1</sup>, 谢余<sup>1</sup>, 胡慧玲<sup>1\*</sup>, 王战<sup>2</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 西南特色中药资源国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 成都大学医学院, 代谢组学协同创新实验室, 羌医药标准研究推广基地暨协同创新中心, 四川 成都 610106

**摘要:** 目的 优化川木香主要药效成分木香羟内酯(Cos)与去氢木香内酯(DL)共包封的聚乙二醇(PEG)化长循环脂质体的制备工艺, 并对其进行表征。方法 采用薄膜水化法制备 Cos 与 DL 共包封的 PEG 化长循环脂质体, 以包封率为指标, 通过单因素考察结合 Box-Behnken 响应面法对方剂进行优化, 并对脂质体的形态、粒径及表面电位、包封率、稳定性和体外释放度进行测定。结果 最佳制备工艺为药脂比 0.14:1、胆固醇与磷脂比 0.05:1、mPEG-2000-DSPE 添加量 6%、水化时间 30 min、探头超声时间 4 min。所得脂质体外观圆整、分散均匀, 平均粒径为  $(104.80 \pm 2.48)$  nm, 多分散指数(PDI)为  $0.245 \pm 0.031$ , Zeta 电位  $(-9.70 \pm 0.23)$  mV, Cos 包封率  $(91.9 \pm 2.6)\%$ , DL 的包封率  $(94.41 \pm 1.23)\%$ 。结论 工艺和处方优化后制得外观形态良好、配伍药物包封率均较高的 PEG 化脂质体。

**关键词:** 木香羟内酯; 去氢木香内酯; PEG; 长循环脂质体; 薄膜水化法; 包封率; 单因素实验; Box-Behnken 响应面法; 稳定性; 体外释放度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4068-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.010

## Preparation and characterization of PEGylated long-circulating liposomes encapsulating costunolide and dehydrocostus lactone

WANG Wen-jun<sup>1</sup>, YAN Xiao-min<sup>1</sup>, CHEN Zi-qiang<sup>1</sup>, LI Qi-juan<sup>1</sup>, XIE Yu<sup>1</sup>, HU Hui-ling<sup>1</sup>, WANG Zhan-guo<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Characteristic Chinese Medicine Resources in Southwest China, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Collaborative Innovation Laboratory of Metabonomics, Standard Research and Extension Base & Collaborative Innovation Center of Qiang Medicine, School of Medicine, Chengdu University, Chengdu 610106, China

**Abstract:** **Objective** To prepare pegylated long-circulating liposomes co-encapsulated by costunolide (Cos) and dehydrocostus lactone (DL), optimize the formulation and process, and evaluate the quality. **Methods** The pegylated long-circulating liposomes co-encapsulated by Cos and DL were prepared by film hydration method. Single factor test and Box-Behnken response surface methodology were used to optimize the preparation process with encapsulation efficiency of Cos and DL as the index. The particle size, surface potential, encapsulation efficiency and *in vitro* release of the liposomes were evaluated. **Results** The optimal preparation conditions were as follows: drug-to-lipid ratio was 0.14, ratio of cholesterol to phospholipid was 0.05, mPEG-2000-DSPE addition amount was 6%, hydration time was 30 min, and probe ultrasonic time was 4 min. The obtained liposome was round and uniform in distribution, with an average particle size of  $(104.8 \pm 2.48)$  nm, a polydispersity index (PDI) of  $(0.245 \pm 0.031)$ , and a Zeta potential of  $(-9.7 \pm 0.23)$  mV, the encapsulation efficiency of Cos and DL were  $(91.9 \pm 2.6)\%$  and  $(94.41 \pm 1.23)\%$ , respectively. **Conclusion** The PEGylated long-circulating liposome prepared by the process and prescription optimization has good appearance and high encapsulation efficiency, which can meet the application requirements.

**Key words:** costunolide; dehydrocostus lactone; PEG; long-circulating liposomes; thin film hydration method; encapsulation efficiency; single-factor experiment; Box-Behnken response surface method; stability; *in vitro* release

收稿日期: 2019-08-12

基金项目: 成都中医药大学杏林学者项目(QNXZ2018010); 成都中医药大学校基金项目(XYPY1505)

作者简介: 王文俊(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂和新剂型。Tel: 15308212692 E-mail: wwjmedicine@126.com

\*通信作者 胡慧玲, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: huhuiling@cdutcm.edu.cn

王战, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: wangzhanguo@cdutcm.edu.cn

川产道地药材川木香具有行气止痛之效,主治脘腹胀痛、肠鸣腹泻等症<sup>[1]</sup>,其主要活性成分木香炔内酯(costunolide, Cos)和去氢木香内酯(dehydrocostus lactone, DL)是2种药理活性广泛的天然倍半萜内酯。现代药理学对其抗炎、抗癌机制进行了大量研究,不仅拓宽了其在传统用药中用于治疗胃肠道疾病的认识<sup>[2-5]</sup>,还进一步开发了在其他疾病中应用潜力,如抗乳腺癌<sup>[6]</sup>等。然而这2种川木香内酯水溶性极差、胃肠稳定性不佳、入血量甚微且生物利用度低<sup>[3,7-8]</sup>,大大影响了其在制剂中的应用。

脂质体是将药物包封于类脂质双分子层内而形成的微型泡囊体制剂<sup>[9]</sup>,包封药物后可改善药物水溶性和稳定性,增强渗透性和被动靶向性,从而增加药物的疗效、减少药物的治疗剂量并降低药物毒性<sup>[10-16]</sup>。然而脂质体进入循环系统后,因血中的蛋白质、酶等的作用,易发生破裂,包封的药物快速渗漏,同时脂质体易被网状内皮组织系统(RES)识别吸收<sup>[17]</sup>,被包裹的药物迅速释放,或未到达靶向目标,从而降低了应用价值。因此研究者常通过恰当修饰赋予脂质体更多功能性。脂质体经亲水性基团,如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)或其类脂衍生物等修饰后得到的长循环脂质体,其可阻碍单核吞噬细胞系统(mononuclear phagocyte system, MPS),并减少与血浆中调理成分的结合,从而增加其在血液中的稳定性,延长药物在血液循环中的滞留时间<sup>[18]</sup>。本实验研究了共包封2种川木香内酯配伍的PEG化脂质体(PEG-Cos/DL-Lips),采用单因素实验、Box-Behnken响应面法优化,得到最优制备工艺,并对脂质体特性和体外释放度进行表征。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

DD5台式大容量低速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;UV756CRT紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;YMNL-IIYJ超声波细胞破碎仪,南京以马内利仪器设备有限公司;JEM-2100Plus透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社(JEOL);马尔文Zetasizer Nano ZS90纳米粒度电位仪,杭州纽蓝科技有限公司;超凡型小容量恒温培养摇床,上海世平实验设备有限公司。

### 1.2 试剂

Cos(批号M-022-180427)、DL(批号Q-016-

180427),质量分数均 $\geq 98\%$ ,成都瑞芬思生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS),0.01 mol/L, pH 7.2~7.4,北京雷根生物技术有限公司;三氯甲烷、无水乙醇,分析纯,四川绿森林化工有限公司;胆固醇、大豆卵磷脂、十二烷基硫酸钠、聚山梨酯80(Tween 80, T80),成都市科隆化学品有限公司;二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(mPEG 2000-DSPE),迈瑞达技术公司;磷钨酸,上海源叶生物科技有限公司;葡聚糖凝胶G-50,台州市路桥四甲生化塑料厂出品;甲醇,色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Triton-x100,上海西唐生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 PEG-Cos/DL-Lips的制备

采用薄膜水化法制备PEG-Cos/DL-Lips。按处方量精密称取Cos、DL、胆固醇、大豆卵磷脂、mPEG 2000-DSPE,加入氯仿10 mL,振荡摇匀使其充分溶解,用恒温减压旋转蒸发仪将氯仿挥发完全使其成膜,再加入PBS 5 mL,用旋转蒸发仪旋转30 min,使形成的薄膜水化完全,探头超声后即得PEG-Cos/DL-Lips。

Cos/DL-Lips采用同法制备,制备时不添加mPEG 2000-DSPE。

### 2.2 Cos和DL含量测定方法建立

**2.2.1 色谱条件** 依据《中国药典》2015年版川木香含量测定项下Cos和DL的检测条件设定。色谱柱为Uranus C<sub>18</sub>柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相为甲醇-水(65:35);体积流量1.0 mL/min;柱温30  $^{\circ}$ C;进样量10  $\mu$ L;检测波长225 nm。

**2.2.2 对照品溶液制备** 取Cos、DL对照品适量,精密称定,共同置于5 mL量瓶中,加甲醇稀释至Cos质量浓度梯度为323.0、162.0、65.0、32.3、16.2、6.5  $\mu$ g/mL,DL质量浓度梯度为110.0、55.0、22.0、11.0、5.5、2.2  $\mu$ g/mL的Cos、DL对照品溶液,过0.45  $\mu$ m微孔滤膜,即得对照品溶液。

**2.2.3 线性关系考察** 精密吸取“2.2.2”项下系列质量浓度对照品溶液10  $\mu$ L,按照“2.2.1”项下色谱条件,测得峰面积(A)值,以A值(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程Cos  $Y=16\,747X+6\,292.5$ ,  $r^2=1.000\,0$ ;DL  $Y=12\,870X+13\,443$ ,  $r^2=0.999\,9$ ,结果表明Cos在6.5~323.0  $\mu$ g/mL,DL在2.2~110.0  $\mu$ g/mL线性关系良好。

**2.2.4 系统适应性考察** 将载药脂质体加甲醇破

膜, 制为载药脂质体供试品溶液, 精密吸取对照品溶液、载药脂质体供试品溶液 10  $\mu$ L, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 色谱图见图 1。结果表明载药脂质体系统适用性良好, 对测定结果无干扰。

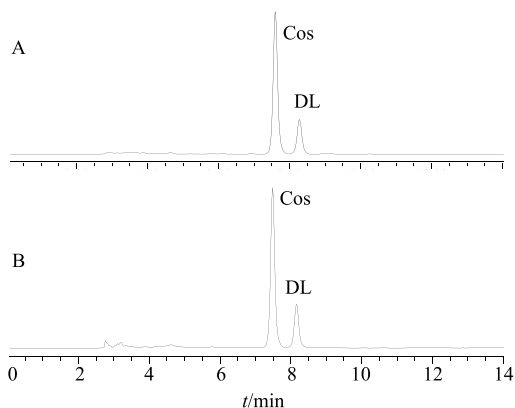


图 1 Cos 和 DL 对照品溶液 (A) 与载药脂质体 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of Cos and DL reference substance solution (A), and drug-loaded liposomes (B)

**2.2.5 精密度考察** 取适量对照品溶液稀释至 Cos 与 DL 为高 (70.0、23.3  $\mu$ g/mL)、中 (50.0、16.6  $\mu$ g/mL)、低 (30.0、10.0  $\mu$ g/mL) 3 个质量浓度后, 精密吸取 10  $\mu$ L, 分别连续进样 3 次, 结果高、中、低 3 个质量浓度下 Cos 峰面积的 RSD 分别 0.84%、0.73%、0.77%, DL 峰面积的 RSD 分别为 0.54%、1.54%、1.98%, 精密度较好。

**2.2.6 稳定性试验** 取载药脂质体, 加入 5 倍量脂甲醇破膜, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜, 取续滤液分别于 0、1、2、4、8、12 h 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 结果 Cos 峰面积的 RSD 为 0.78%, DL 峰面积的 RSD 为 1.22%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性较好。

**2.2.7 重复性试验** 取载药脂质体 6 份, 加入 10 倍量脂甲醇破膜, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜, 取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件测定, 结果 Cos 质量浓度的 RSD 为 0.41%, DL 质量浓度的 RSD 为 1.03%, 重复性较好。

**2.2.8 加样回收率试验** 取适量对照品溶液稀释至 Cos 与 DL 为高 (70.0、23.3  $\mu$ g/mL)、中 (50.0、16.6  $\mu$ g/mL)、低 (30.0、10.0  $\mu$ g/mL) 3 个质量浓度后, 各取 1 mL, 每份分别加入空白脂质体溶液 200  $\mu$ L, 涡旋混匀, 加入 5 倍量甲醇破坏, 涡旋混匀, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜, 取续滤液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行定量测定, 结果在高、中、低 3 个质量浓

度下, Cos 的加样回收率平均值分别为 96.92%、96.07%、96.00%, RSD 分别为 1.21%、0.56%、1.31%, DL 的加样回收率平均值分别为 96.82%、96.59%、97.06%, RSD 分别为 0.77%、0.77%、0.44%, 表明脂质体膜材对 Cos 和 DL 含量测定无明显影响。

## 2.3 微柱离心法测定包封率

**2.3.1 葡聚糖凝胶柱的制备** 将葡聚糖凝胶用蒸馏水充分溶胀后, 注入到 2 mL 的注射剂里 (注射剂底部填有 2 层滤纸以防葡聚糖凝胶泄漏), 将装有葡聚糖凝胶的注射器装入塑料试管中, 组成微柱离心组件。将制好的离心组件转移至离心机中, 于 3 000 r/min 离心 3 min, 使凝胶柱失水紧缩, 备用。

**2.3.2 包封率测定** 取 200  $\mu$ L PEG-Cos/DL-Lips 溶液加至微柱的顶端, 于 3 000 r/min 离心 3 min, 加入 200  $\mu$ L 纯水洗脱 3 次, 收集合并洗脱液, 加入 100  $\mu$ L 5% Triton-x100 进行破乳; 另取 200  $\mu$ L 未过柱样品, 加入 100  $\mu$ L 5% Triton-x 100 进行破乳, HPLC 进样检测, 计算包封率。

$$\text{包封率} = 1 - C_{\text{游离}} / C_{\text{总}}$$

$C_{\text{游离}}$  为游离 Cos/DL 含量,  $C_{\text{总}}$  为脂质体溶液总 Cos/DL 含量

## 2.4 PEG-Cos/DL-Lips 处方的单因素实验优化

对薄膜水化法制备 PEG-Cos/DL-Lips 的处方进行单因素实验, 考察药脂比、胆固醇磷脂比、mPEG 2000-DSPE 加入量、水化时间、探头超声时间共 5 个因素对脂质体包封率的影响。将制得样品加入流动相甲醇破坏脂质体结构释放药物, HPLC 进样分析, 计算包封率, 结果见表 1。根据结果分析, 在药脂比为 0.3:1、胆固醇磷脂比为 0.15:1、mPEG 2000-DSPE 加入量为 2%、水化时间为 30 min、探头超声时间为 2 min 时, 所得的包封率最好。结果表明, 随着含药量的增加, 包封率提升; 胆固醇磷脂比为 0.25:1 时, 包封率达到最高值, 但随着胆固醇加入量的增多, 包封率降低, 推测虽然胆固醇加入可增加膜刚性和稳定性, 但超过一定范围后会与脂溶性药物竞争, 导致包封率下降; mPEG 2000-DSPE 加入量在 2%、4%、6% 时, 包封率缓慢升高, 但加入量为 8% 时, 包封率明显下降; 水化时间和探头超声时间增加对包封率影响较小。

## 2.5 PEG-Cos/DL-Lips 处方的 Box-Behnken 响应面法试验优化

**2.5.1 Box-Behnken 响应面法试验** 在单因素实验基础上, 以药物与磷脂比例 (药脂比, A)、胆固醇与磷脂比例 (胆脂比, B)、mPEG 2000-DSPE 添加

表 1 单因素实验设计与结果

Table 1 Design and results of univariate experiment

| 试验号 | 药脂比     | 胆固醇磷脂比   | mPEG 2000-DSPE 加入量/% | 水化时间/min | 超声时间/min | Cos 包封率/% | DL 包封率/% |
|-----|---------|----------|----------------------|----------|----------|-----------|----------|
| 1   | 0.1 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 65.24     | 49.76    |
| 2   | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 76.16     | 65.88    |
| 3   | 0.3 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 79.24     | 68.63    |
| 4   | 0.4 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 74.47     | 63.36    |
| 5   | 0.2 : 1 | 0.05 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 74.63     | 64.23    |
| 6   | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 76.16     | 65.88    |
| 7   | 0.2 : 1 | 0.25 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 70.62     | 63.17    |
| 8   | 0.2 : 1 | 0.35 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 36.76     | 21.28    |
| 9   | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 75.86     | 66.74    |
| 10  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 4                    | 30       | 2        | 76.16     | 65.88    |
| 11  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 6                    | 30       | 2        | 78.41     | 63.99    |
| 12  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 8                    | 30       | 2        | 69.93     | 62.11    |
| 13  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 15       | 2        | 75.38     | 66.30    |
| 14  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 76.16     | 65.88    |
| 15  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 45       | 2        | 76.02     | 64.96    |
| 16  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 60       | 2        | 73.91     | 65.61    |
| 17  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 1        | 75.08     | 67.94    |
| 18  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 2        | 76.16     | 65.88    |
| 19  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 3        | 74.77     | 67.48    |
| 20  | 0.2 : 1 | 0.15 : 1 | 2                    | 30       | 4        | 75.92     | 65.74    |

量 (C) 为自变量, Cos 包封率 ( $Y_1$ ) 和 DL 包封率 ( $Y_2$ ) 为因变量, 采用 Design-Expert V8.0.6.1 软件进行响应面试验设计, 选用 Box-Behnken 模型, 进行 3 因素 3 水平共 17 个实验点 (5 个中心点), 2 次回归正交组合试验。基于 Box-Behnken 响应面设计试验方案进行试验, Box-Behnken 试验设计方案及结果见表 2。

**2.5.2 模型建立与回归分析** 对试验结果进行响应面分析, 经过 2 次回归拟合后, 得出响应值与影响因素 A、B、C 之间的回归方程为  $Y_1=0.454\ 08+2.389\ 83\ A+0.934\ 24\ B-0.028\ 923\ C+0.382\ 95\ AB-0.104\ 60\ AC-0.084\ 498\ BC-4.213\ 31\ A^2-6.552\ 12\ B^2+0.013\ 551\ C^2$  ( $r^2=0.859\ 6>0.8$ ),  $Y_2=0.468\ 92+0.877\ 90\ A+0.681\ 42\ B+0.068\ 245\ C+1.184\ 83\ AB-0.215\ 63\ AC+0.003\ 607\ 5\ BC-1.050\ 42\ A^2-7.413\ 07\ B^2+0.003\ 085\ 64\ C^2$  ( $r^2=0.959\ 1>0.8$ )。

方程的回归分析见表 3、4。Cos 和 DL 的 2 次回归模型  $F$  值分别为 4.76 ( $P<0.05$ )、18.24 ( $P<0.000\ 5$ ), 表明所建立的模型具有显著性; 失拟项数

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken experiment

| 编号 | A    | B    | C/%  | $Y_1$ /% | $Y_2$ /% |
|----|------|------|------|----------|----------|
| 1  | 0.25 | 0.05 | 6.00 | 0.938 1  | 0.878 9  |
| 2  | 0.10 | 0.15 | 2.00 | 0.540 2  | 0.587 3  |
| 3  | 0.25 | 0.15 | 4.00 | 0.790 6  | 0.744 8  |
| 4  | 0.25 | 0.15 | 4.00 | 0.684 9  | 0.677 5  |
| 5  | 0.25 | 0.05 | 2.00 | 0.849 6  | 0.740 3  |
| 6  | 0.40 | 0.15 | 6.00 | 0.797 9  | 0.713 6  |
| 7  | 0.40 | 0.05 | 4.00 | 0.648 8  | 0.658 7  |
| 8  | 0.25 | 0.15 | 4.00 | 0.767 3  | 0.744 2  |
| 9  | 0.25 | 0.25 | 2.00 | 0.555 2  | 0.448 9  |
| 10 | 0.40 | 0.15 | 2.00 | 0.590 1  | 0.618 5  |
| 11 | 0.25 | 0.15 | 4.00 | 0.707 9  | 0.739 2  |
| 12 | 0.25 | 0.25 | 6.00 | 0.576 1  | 0.590 4  |
| 13 | 0.10 | 0.15 | 6.00 | 0.873 6  | 0.941 1  |
| 14 | 0.10 | 0.25 | 4.00 | 0.501 2  | 0.557 1  |
| 15 | 0.40 | 0.25 | 4.00 | 0.479 0  | 0.491 5  |
| 16 | 0.25 | 0.15 | 4.00 | 0.754 7  | 0.711 4  |
| 17 | 0.10 | 0.05 | 4.00 | 0.694 0  | 0.795 4  |

表 3 Cos 的响应面 2 次模型的方差分析

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model of Cos

| 来源             | 平方和       | 自由度 | 均方        | F 值    | P 值     | 显著性 |
|----------------|-----------|-----|-----------|--------|---------|-----|
| 模型             | 0.260 000 | 9   | 0.029 000 | 4.760  | 0.025 9 | 显著  |
| A              | 0.001 089 | 1   | 0.001 089 | 0.180  | 0.682 5 |     |
| B              | 0.130 000 | 1   | 0.130 000 | 21.690 | 0.002 3 |     |
| C              | 0.053 000 | 1   | 0.053 000 | 8.840  | 0.020 7 |     |
| AB             | 0.000 132 | 1   | 0.000 132 | 0.022  | 0.886 1 |     |
| AC             | 0.003 939 | 1   | 0.003 939 | 0.660  | 0.443 9 |     |
| BC             | 0.001 142 | 1   | 0.001 142 | 0.190  | 0.675 3 |     |
| A <sup>2</sup> | 0.038 000 | 1   | 0.038 000 | 6.320  | 0.040 1 |     |
| B <sup>2</sup> | 0.018 000 | 1   | 0.018 000 | 3.020  | 0.125 8 |     |
| C <sup>2</sup> | 0.012 000 | 1   | 0.012 000 | 2.070  | 0.193 7 |     |
| 残差             | 0.042 000 | 7   | 0.005 984 |        |         |     |
| 失拟项            | 0.034 000 | 3   | 0.011 000 | 6.030  | 0.057 6 | 不显著 |
| 净误差            | 0.007 582 | 4   | 0.001 896 |        |         |     |
| 总离差            | 0.300 000 | 16  |           |        |         |     |

值分别为 6.03 和 2.90,  $P$  值均大于 0.05, 说明失拟项对于误差不显著, 回归方程拟合度较好。此外, 由模型可以看出, B、C 和 A<sup>2</sup> 项显著, 表明胆脂比和 PEG 添加量对 Cos 的包封率具有显著影响, 而 A、B、C、AC、B<sup>2</sup> 项显著, 表明药脂比、胆脂比、mPEG 2000-DSPE 添加量、药脂比与 mPEG 2000-DSPE 添加量的交互作用对 DL 的包封率具有显著影响。

响应曲面图直观地反映了胆脂比、药脂比、mPEG 2000-DSPE 添加量的交互作用对响应值的影响, 见图 2。Cos 和 DL 趋势相似, 在胆脂比不变的

表 4 DL 的响应面 2 次模型的方差分析

Table 4 ANOVA for response surface quadratic model of DL

| 来源             | 平方和           | 自由度 | 均方            | F 值    | P 值      | 显著性 |
|----------------|---------------|-----|---------------|--------|----------|-----|
| 模型             | 0.250 000 000 | 9   | 0.028 000 000 | 18.240 | 0.000 5  | 显著  |
| A              | 0.020 000 000 | 1   | 0.020 000 000 | 12.910 | 0.008 8  |     |
| B              | 0.120 000 000 | 1   | 0.120 000 000 | 78.950 | <0.000 1 |     |
| C              | 0.066 000 000 | 1   | 0.066 000 000 | 43.200 | 0.000 3  |     |
| AB             | 0.001 263 000 | 1   | 0.001 263 000 | 0.820  | 0.394 8  |     |
| AC             | 0.017 000 000 | 1   | 0.017 000 000 | 10.890 | 0.013 1  |     |
| BC             | 0.000 002 082 | 1   | 0.000 002 082 | 0.001  | 0.971 7  |     |
| A <sup>2</sup> | 0.002 352 000 | 1   | 0.002 352 000 | 1.530  | 0.256 0  |     |
| B <sup>2</sup> | 0.023 000 000 | 1   | 0.023 000 000 | 15.050 | 0.006 1  |     |
| C <sup>2</sup> | 0.000 991 100 | 1   | 0.000 991 100 | 0.640  | 0.448 4  |     |
| 残差             | 0.011 000 000 | 7   | 0.001 538 000 |        |          |     |
| 失拟项            | 0.007 374 000 | 3   | 0.002 458 000 | 2.900  | 0.165 0  | 不显著 |
| 净误差            | 0.003 389 000 | 4   | 0.000 847 200 |        |          |     |
| 总离差            | 0.260 000 000 | 16  |               |        |          |     |

情况下, Cos 和 DL 的包封率的值随着药脂比的增大而呈现出先升高后降低趋势, 随 mPEG 2000-DSPE 添加量的增大而呈缓慢上升的趋势; 在药脂比不变的情况下, Cos 和 DL 的包封率的值随着胆脂比的增大而呈现出下降趋势, 随 mPEG 2000-DSPE 添加量的增大而呈缓慢上升的趋势; 在 mPEG 2000-DSPE 添加量不变的条件下, Cos 和 DL 的包封率的值随药脂比的增大而呈先升后降的趋势, 随胆脂比的增大而呈上升的趋势。

### 2.5.3 最佳处方工艺确定及其验证 在 Design-

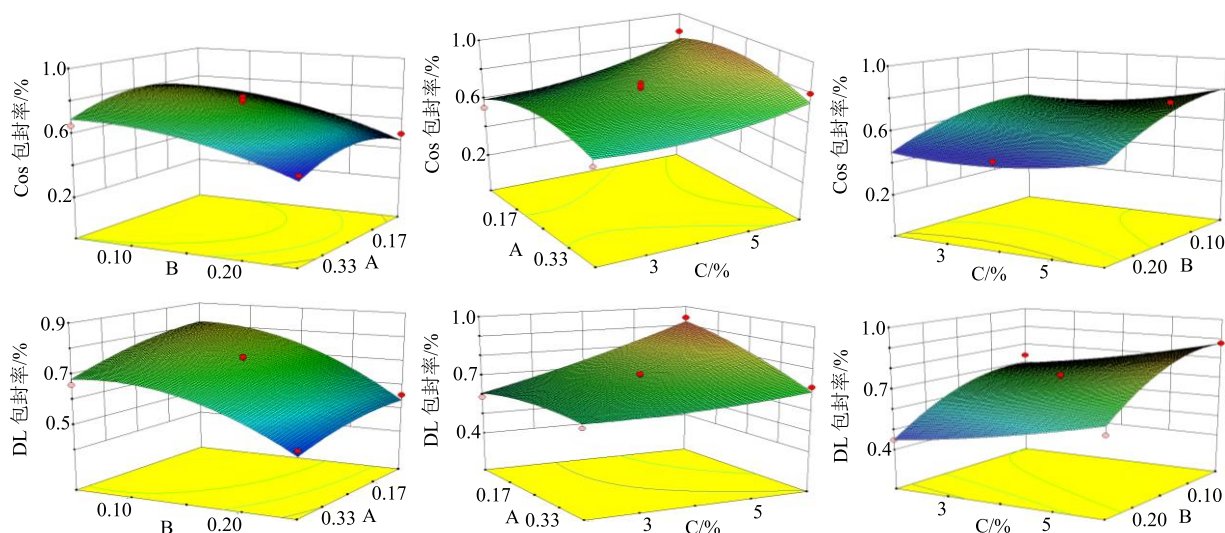


图 2 各影响因素的响应面 3D 图

Fig. 2 Response surface 3D map of various factors

Expert. V8.0.6.1 软件 Responses 项设置 2 个响应值 ( $Y_1$ 、 $Y_2$ )，输入包封率测定结果并进行分析，由软件对 Cos 和 DL 的拟合方程进行联合求解，分析处理得到最佳处方工艺为药脂比 0.14:1、胆脂比 0.05:1、mPEG 2000-DSPE 添加量 6%、水化时间 30 min、探头超声时间 4 min，Cos、DL 预测包封率分别为 94.11%和 96.15%，按此工艺下进行验证试验 ( $n=3$ )，结果 Cos 包封率为  $(91.9 \pm 2.6)\%$ ，偏差值 2.34%，DL 包封率为  $(94.41 \pm 1.23)\%$ ，偏差值为 1.81%，与预测值偏差均小于  $\pm 5\%$ ，表明该法预测与验证结果基本一致。

## 2.6 PEG-Cos/DL-Lips 的表征

**2.6.1 TEM 观察 PEG-Cos/DL-Lips 表面微观形态** 将制备得的木香内酯脂质体纯化水稀释后置于铜网上，滤纸吸去多余溶液，5%磷钨酸溶液负染自然晾干，TEM 下观察其形态，见图 3。结果表明脂质体在 TEM 下呈典型单室，磷脂双分子膜结构连续、规整，形状为囊状，形状圆整，反映出所制备的脂质体质量良好。

**2.6.2 粒径及表面电位考察** 将制备所得的木香内酯脂质体用纯化水稀释到适当浓度，放入石英皿中，用 Zeta 粒径电位仪测定粒径及表面电位，检测平均粒径及多分散指数 (PDI)。测得脂质体的平均粒径为  $(104.80 \pm 2.48)$ ，PDI 为  $0.245 \pm 0.031$ ，Zeta 电位为  $(-9.70 \pm 0.23)$  mV，表明制得脂质体粒径较小，均一性良好，见图 4。

**2.6.3 包封率和载药量测定** 按照“2.3.2”项下进

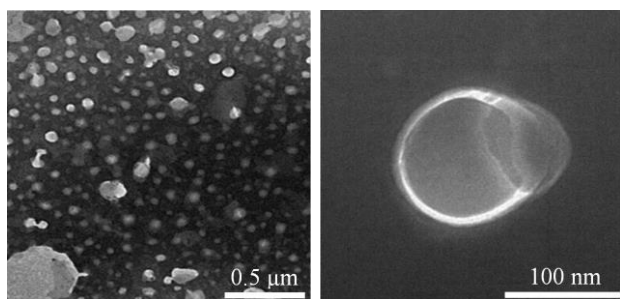


图 3 PEG-Cos/DL-Lips 的 TEM 图

Fig. 3 TEM of PEG-Cos/DL-Lips

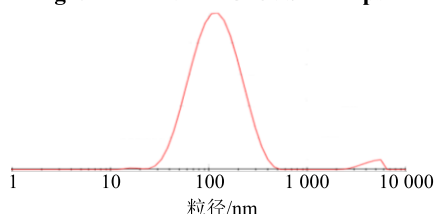


图 4 PEG-Cos/DL-Lips 粒径分布图

Fig. 4 Particle size distribution of PEG-Cos/DL-Lips

行操作，HPLC 进样检测包封 Cos 与 DL 的总药物质量浓度与游离药物质量浓度，计算脂质体的包封率和载药量 ( $n=3$ )。

$$\text{载药量} = 1 - W_{\text{药}}/W_{\text{总}}$$

$W_{\text{药}}$  为包封药物质量， $W_{\text{总}}$  为投料总质量

通过微柱离心法测得 Cos 包封率为  $(91.9 \pm 2.6)\%$ ，DL 的包封率  $(94.41 \pm 1.23)\%$ ，Cos 载药量  $(2.66 \pm 0.21)\%$ ，DL 载药量  $(3.02 \pm 0.15)\%$ ，Cos 与 DL 包封率与载药量情况均良好。

## 2.7 体外释放度考察

分别向透析袋 (截留相对分子质量 5 000) 中加入 5.0 mL PEG-Cos/DL-Lips、Cos/DL-Lips 溶液、Cos、DL 混合液，用封口夹将两端夹紧后，放入 25.0 mL 透析介质 (1% SDS 和 1% T80 的混合水溶液) 中，于 0、0.5、1、2、4、6、8、12、16、24 h 时，取 1 mL 透析液 (后补充 1 mL 透析介质，维持透析液体积不变)，进行 HPLC 检测透析液中药物含量。以透析时间为横坐标，以透析液中 Cos、DL 的累积峰面积为纵坐标，绘制体外释放曲线 ( $n=1$ )。结果 (图 5) 显示，游离药物在前 4 h 基本释放完全；Cos/DL-Lips 在前 8 h 释药速率快，释药量达到 74.55%、61.40%，8 h 后释药速率变缓。PEG-Cos/DL-Lips 在前 6 h 释药速率快，释药量达到 65.53%、50.51%，6 h 后释药速率变缓。结果表明常规和 PEG 化脂质体均具有缓释作用，6~8 h 时，Cos/DL-Lips 释药速度较快，同时 PEG-Cos/DL-Lips 可平缓释放，24 h 总释放度低于 Cos/DL-Lips，体外情况下 PEG 化脂质体比常规脂质体具有较强的缓释作用，这可能是由于 PEG 修饰增加了脂质膜结构的稳定性。

## 3 讨论

将来自于中药川木香的主要活性成分配伍治疗是一种具有前景的方法，精而有效的同时可减少未

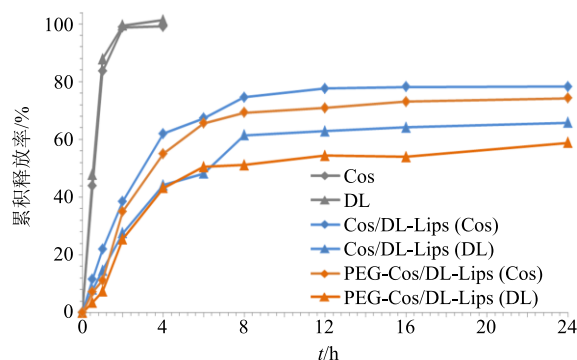


图 5 PEG-Cos/DL-Lips 体外释放曲线

Fig. 5 Releasing curve of PEG-Cos/DL-Lips *in vitro*



知成分带来的非治疗作用的风险。除了提高水溶性和可持续释放行为外,纳米载体还可轻松改变药物分布,有利于提高生物利用度和降低毒性<sup>[19]</sup>。纳米粒子的这些优点部分是由于它们具有 10~200 nm 的较小粒径,具有增强的渗透性和保留(EPR)效应<sup>[20-21]</sup>。脂质体的长循环表面修饰物一般选用神经节苷脂 GM1、非离子表面活性剂、聚乙二醇及其类脂衍生物等,其中 PEG 及其类脂衍生物因来源普遍且无免疫毒性等,是现在常用的一种脂质体表面修饰物<sup>[22]</sup>,由于 PEG 分子中大量的亲水基团与水结合而构成空间位阻,降低了长循环脂质体被 RES 的识别和吞噬的概率,延长药物在血液中循环的时间,使药物能长时间作用于组织或细胞,从而增加药物的生物利用度,提高治疗效果。本研究采用 mPEG-2000-DSPE 对 Cos、DL 共包封脂质体进行表面修饰,以改善 2 种内酯的亲水性和缓释性能,提高生物利用度。

薄膜水化法和乙醇注入法是常用的脂质体制备方法,前期试验发现乙醇注入法制备 PEG-Cos/DL-Lips 时,可明显看见将药物注入乙醇中时有不溶物存在,相比之下,薄膜水化法所制得的长循环脂质体溶解度良好,Cos、DL 分散性均一稳定。PEG-Cos/DL-Lips 的制备过程受卵磷脂种类、药脂比、磷脂比、磷脂浓度 mPEG-2000-DSPE 加入量、水化时间、超声波细胞破碎时间等因素的影响,结果表明药脂比、胆脂比和 mPEG2000-DSPE 添加量对包封率影响较大,结合单因素实验与 Box-Behnken 设计试验对制备处方进行优化的 2 部分研究均发现 Cos 与 DL 包封率随自变量的变化,呈现出了相似的变化趋势。对 Cos 和 DL 来说,它们同为倍半萜内酯,且具有相似的结构,这可能导致了它们在脂质体制剂中相似的包封情况。此外,推测由于 2 者对脂质和水相介质的亲和力有差异,Cos 油水分配系数( $\log P=4.05$ )较 DL ( $\log P=3.40$ ) 更高,Cos 对脂质具有更好的亲和力,故 Cos 体外释放度低于 DL。体外释放曲线表明,PEG 化木香内酯脂质体具有良好的体外缓释性能,但由于 2 种木香内酯均为疏水性极强的亲脂性药物,于释放介质中 24 h 时缓慢释放大部分药物后难以释放完全,还需结合更长时间的释放度考察以及进一步的体内药动学研究共同阐明 PEG-Cos/DL-Lips 的释药行为。

#### 参考文献

[1] 中国药典[S].一部.2015.

- [2] 毛景欣,王国伟,易 垠,等.川木香化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(22): 4797-4803.
- [3] 高 飞,傅超美,胡慧玲,等.川木香煨制前后药效成分在大鼠胃、小肠、结肠中吸收差异研究[J].中草药,2013,44(20): 2872-2877.
- [4] Dong S, Ma L Y, Liu Y T, *et al.* Pharmacokinetics of costunolide and dehydrocostuslactone after oral administration of *Radix Aucklandiae* extract in normal and gastric ulcer rats [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(11): 1055-1063.
- [5] Kim D Y, Choi B Y. Costunolide—A bioactive sesquiterpene lactone with diverse therapeutic potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2926-2946.
- [6] Peng Z X, Wang Y, Fan J H, *et al.* Costunolide and dehydrocostuslactone combination treatment inhibit breast cancer by inducing cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc/p53 and AKT/14-3-3 pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 41254-41269.
- [7] Zhang J, Hu X, Gao W, *et al.* Pharmacokinetic study on costunolide and dehydrocostuslactone after oral administration of traditional medicine *Aucklandia lappa* Decne. by LC/MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 15(1): 191-197.
- [8] 强永在,屈晓梅,王 阳.川木香倍半萜组分固体分散体的制备及体外溶出度考察[J].中国医药导报,2019,16(1): 28-32.
- [9] 张景勃,张志荣,陈开杰.长循环脂质体的研究进展[J].药学进展,2003,27(3): 139-142.
- [10] 朱李飞,刘晓妍,陈红君,等.白藜芦醇二棕榈酰卵磷脂脂质粉雾剂的制备及其抗菌作用研究[J].中草药,2018,49(24): 5803-5811.
- [11] 郭 仪,刘玉波,陈 兵.脂质体多柔比星治疗恶性肿瘤临床疗效及安全性的系统评价[J].药物评价研究,2017,40(9): 1338-1347.
- [12] 韩 旭,丁冠宇,董 青,等.基于脂质体的纳米基因载体的研究进展[J].应用化学,2018,35(7): 735-744.
- [13] 姜 倩,岳 冬,顾忠伟.脂质体传递系统的研究进展及临床应用概况[J].中国材料进展,2017,36(11): 813-826.
- [14] 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.
- [15] Guo Y, Shen L X, Lu Y F, *et al.* Preparation of rutin-liposome drug delivery systems and evaluation on their *in vitro* antioxidant activity [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 371-375.
- [16] 吴 溪,李文静,杨志强,等.正交试验优化硫酸长春

- 新碱脂质体的制备工艺 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(6): 653-657.
- [17] 张 奇, 邓英杰. 长循环脂质体的研究进展 [J]. 药学进展, 1999, 23(5): 270-272.
- [18] Deodhar S, Dash A K. Long circulating liposomes: Challenges and opportunities [J]. *Ther Deliv*, 2018, 9(12): 857-872.
- [19] He Y, Liu H F, Xie Z Y, *et al.* PVP and surfactant combined carrier as an effective absorption enhancer of poorly soluble astilbin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40(2): 237-243.
- [20] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 136-151.
- [21] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo* [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(1): 71-79.
- [22] 胡晓静, 苏 峰, 何广卫. 靶向递药系统长循环脂质体的研究进展 [J]. 安徽医药, 2015, 19(10): 1837-1840.