• 药剂与工艺 •

1,8-桉叶油素自微乳给药系统的制备及质量评价和细胞摄取研究

李婉蓉[1]，王　菲[1]，陈建波[1]，杨佳佳[1]，杨增秋[1]，杨贵前[1]，宋朔尧[1]，肖　婷[1]，周　雪[1]，吴林菁[1]，张　敏[1,2]，沈祥春[1*]，陶　玲[1*]

1. 贵州省特色天然药物高效利用工程中心，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，贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室，贵州医科大学药学院，贵州 贵阳　550025
2. 贵州医科大学基础医学院，贵州 贵阳　550025

摘　要：目的　优化 1,8-桉叶油素（1,8-cineole，1,8-Cin）自微乳给药系统（1,8-cineole self-microemulsion drug delivery system，1,8-Cin-SMEDDS）处方，对其进行表征并进行细胞摄取考察。**方法**　通过绘制伪三元相图，确定 1,8-Cin-SMEDDS 有效自乳化区域，进行初步处方筛选。以粒径和载药量为指标，采用星点设计-效应面法对 1,8-Cin-SMEDDS 处方进行优化并验证。荧光显微镜观察高糖损伤的人脐静脉内皮细胞（HUVEC）对 1,8-Cin-SMEDDS 的摄取情况。**结果**　1,8-Cin-SMEDDS 的最佳处方是大豆油（7.5%）与 1,8-Cin（22.5%）为混合油相，HS15（56%）为乳化剂，乙醇（14%）为助乳化剂，滴加纯水至 8 mL 得半透明略带蓝色乳光液体。透射电镜观察其外观呈球形液滴，激光粒度 Zeta 电位测定仪测得平均粒径为（131.68±1.44）nm，Zeta 电位为（−10.03±1.63）mV；HPLC 法测得包封率为（99.890±0.012）%，载药量为（224.750±0.028）mg/g。HUVEC 细胞摄取实验结果表明，细胞对 1,8-Cin-SMEDDS 的摄取高于游离 1,8-Cin。**结论**　1,8-Cin-SMEDDS 制备方法简便，重复性好，所得 1,8-Cin-SMEDDS 外观良好，包封率高，理化性质稳定，且能促进细胞摄取。

关键词：1,8-桉叶油素；自微乳；伪三元相图；星点设计-效应面法；细胞摄取；人脐静脉内皮细胞

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2020)09 - 2418 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.017

Preparation, quality evaluation and cell uptake of 1,8-cineole self-microemulsion drug delivery system

LI Wan-rong[1], WANG Fei[1], CHEN Jian-bo[1], YANG Jia-jia[1], YANG Zeng-qiu[1], YANG Gui-qian[1], SONG Suo-yao[1], XIAO Ting[1], ZHOU Xue[1], WU Ling-jing[1], ZHANG Min[1,2], SHEN Xiang-chun[1], TAO Ling[1]

1. Guizhou Provincial Center for Efficient Utilization of Natural Drugs, Key Laboratory of Pharmacology and Drug Evaluation of Natural Drugs in Colleges and Universities of Guizhou Province, Key Laboratory of Excellent Utilization of Natural Drug Resources of Guizhou Medical University, School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China
2. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective　To optimize the formulation of 1,8-cineole self-microemulsifying drug delivery system (1,8-Cin-SMEDDS), characterize it and investigate its cell uptake. **Methods**　By drawing pseudo-ternary phase diagram, the effective self-emulsifying region of 1,8-Cin-SMEDDS was determined, and the preliminary prescription was screened. Taking the particle size and drug loading as the index, the central composite design-response surface method was used to optimize and verify the prescription. Fluorescence microscope was used to observe the uptake of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) injured by high glucose. **Results**　The

收稿日期：2019-11-21

基金项目：贵州省科技计划项目（黔科合支撑 [2017] 2891）；贵州医科大学药学国际科技合作基地（黔科合平台人才 [2017] 5802）；贵州省高层次创新型人才百层次人才项目（贵州科技厅黔科合人才 [2015] 4029 号）；贵州省科技创新人才团队项目（黔科合人才团队 [2015] 4025 号）；贵州省教育厅拔尖人才计划项目（黔教合 KY2016 [073]）

作者简介：李婉蓉，在读硕士，从事中药民族药新药研发和药物新剂型及新技术研究。Tel: 15761602593　E-mail: 1292312348@ qq.com

***通信作者**　沈祥春，博士，教授，从事心血管药物药理、功能天然产物化学及生物学研究。Tel: (0851)88416149　E-mail: shenxiangchun@126.com

陶　玲，硕士，教授，从事中药民族药和药物新剂型及新技术研究。Tel: (0851)8416160　E-mail: 649511230@ qq.com

results showed that the best prescription of 1,8-Cin-SMEDDS was a mixture of soybean oil (7.5%) and 1,8-Cin (22.5%), HS15 (56%) as emulsifier, ethanol (14%) as co-emulsifier, and dripping pure water to 8 mL to obtain a translucent slightly bluish emulsion. The appearance of spherical droplets was observed by transmission electron microscope, and the average particle size and Zeta potential measured by laser particle size Zeta tester was (131.68 ± 1.44) nm and (−10.03 ± 1.63) mV, respectively; The entrapment efficiency estimated by HPLC was (99.890 ± 0.012)%, and the drug loading was (224.750 ± 0.028) mg/g. The results of HUVEC cell uptake assay showed that the uptake of 1,8-Cin-SMEDDS by cells was higher than that of free 1,8-Cin. **Conclusion** The preparation method of 1,8-Cin-SMEDDS is simple and reproducible. The obtained method has good appearance, high entrapment efficiency, stable physical, and chemical properties, which can also promote cell uptake.

Key words:1,8-cineole; self-microemulsion; pseudo ternary phase diagram; central composite design-response surface method; cell uptake; human umbilical vein endothelial cells

心血管疾病发病率一直位于重大疾病的前列，并呈上升态势和年轻化趋势。血管内皮细胞结构和功能受损，是高血压、动脉粥样硬化、冠心病等多种心血管疾病的主要起始病理状态，也是贯穿疾病全程的共同病理基础。随着安全性更高的载体材料的发现，靶向血管内皮损伤部位递送系统研究逐渐成为热点[1-2]。自微乳药物递送系统（self-microemulsion drug delivery system，SMEDDS）由油相、乳化剂和助乳化剂的三元混合物组成，在水相中温和搅拌的情况下能够自发形成 O/W 型乳剂，其粒径范围为 100～500 nm，是疏水性药物的良好载体，且具有制备工艺简便等优点，是难溶性药物的理想载体[3-8]。Pouton[9]和 Amri 等[10]进行了白藜芦醇自乳化系统研制，并考察了血管内皮细胞摄取，结果表明，SMEDDS 显著改善了血管内皮细胞对白藜芦醇的摄取，对 H_2O_2 损伤的血管内皮细胞保护作用显著。

1,8-桉叶油素（1,8-cineole，1,8-Cin）是存在于桉树属、蔷薇属和丹参属等芳香植物中的一种单萜类化合物[1]，研究表明其具有多种生物和药理学活性，包括改善胰腺炎[11]、抗增殖及抗胆固醇生成[12]、改善非酒精性脂肪性肝炎[13]、抗菌、杀虫、抗炎等[14]。实验室前期研究结果表明，1,8-Cin 可通过潜在的抗炎活性机制如诱导 IkBa 来控制 NF-κB p65 的核易位，降低 NF-κB 活性从而改善内皮细胞的功能障碍；1,8-Cin 对脂多糖（LPS）所致小鼠血管内皮损伤具有显著的保护作用，在控制血管炎症的发生发展方面具有显著疗效，具有潜在的抗心血管疾病作用[15]。然而，1,8-Cin 为油状挥发性液体，水溶性差，稳定性差，传统制剂制备技术严重限制了其临床应用。

本研究利用伪三元相图[4,16]筛选油相、乳化剂和助乳化剂种类及其配比，采用星点设计-效应面法[17-18]，进行 1,8-桉叶油素自微乳给药系统（1,8-Cin-SMEDDS）处方优化，并对其进行质量评价及细胞摄取评价[19]，以期为挥发性抗心血管疾病活性成分药物传递系统奠定实验基础。

1 材料

DAD/1260 高效液相色谱仪，美国安捷伦公司；BT-9300H 型激光粒度分布仪，丹东百特仪器有限公司；ME104/02 型分析电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；XH-C 型旋涡混合器，金坛市白塔新宝仪器厂；BS-223S 型分析天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；Nanobrook 90Plus PALS 电位及纳米粒度分析仪，美国布鲁克海文仪器公司；3020-426 多功能全波长酶标仪，Thermo 公司；NovoCyte 流式细胞仪，艾森生物杭州有限公司。

15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯（Kolliphor® HS15），德国巴斯夫公司；无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司；1,2-丙二醇购自天津市瑞金特化学品有限公司；磷钨酸购自天津市大茂化学试剂厂；1,8-Cin 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司，质量分数≥99%，批号 H150747；大豆油（LCT）购自龙游县湖镇工业园区；聚山梨酯-80 购自国药集团化学试剂有限公司；乙腈、甲醇，色谱纯，美国天地公司。人脐静脉内皮细胞（HUVEC）、ECM 培养基、青霉素/链霉素、胎牛血清、胰蛋白酶（0.25%）、胰酶中和液均购自美国 Sciencell 公司；香豆素 6（C6）购自梯希爱化成工业发展有限公司；3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物（MTT）和 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐（DAPI）购自索莱宝生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 1,8-Cin-SMEDDS 的制备方法

固定混合物（油相、乳化剂、助乳化剂）总质量为 1 g，称取一定量的油相、乳化剂及助乳化剂于 EP 管中，涡旋混合均匀，置于预先恒温至 25 ℃的

水浴中，在涡旋状态下逐滴加入纯水 8 mL，即得半透明略带蓝色乳光的 1,8-Cin-SMEDDS。

不含 1,8-Cin 的空白 SMEDDS 制备方法同上，仅不加入 1,8-Cin。

2.2 1,8-Cin HPLC 含量测定方法学建立

2.2.1 储备液的配制 精密称取 1,8-Cin 对照品 50 mg，置于 50 mL 量瓶中，乙腈超声 5 min 使溶解，定容，得质量浓度为 1 000 μg/mL 的储备液。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密吸取 1,8-Cin 储备液 2 mL，置于 10 mL 量瓶中，乙腈定容，混匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，得质量浓度为 200 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密吸取 1,8-Cin-SMEDDS 0.04 mL 置于 10 mL 的量瓶中，适量乙腈超声 5 min 使溶解并定容，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，得 1,8-Cin-SMEDDS 供试品溶液。同法制备 SMEDDS 空白对照溶液。

2.2.4 最大吸收波长的确定 精密吸取对照品溶液适量，乙腈为空白对照，全波长扫描，确定 1,8-Cin 最大吸收波长为 203 nm。

2.2.5 色谱条件 色谱柱为 Ultimate®LP-C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）；体积流量 1.0 mL/min；进样量 10 μL；柱温 30 ℃；检测波长 203 nm；流动相为乙腈-水（56∶44）。

2.2.6 专属性考察 分别取空白溶剂乙腈、1,8-Cin 对照品溶液、SMEDDS 空白对照溶液、1,8-Cin-SMEDDS 供试品溶液各 10 μL，按照“2.2.5”项下色谱条件，进样测定，记录图谱，色谱图见图 1。

2.2.7 线性关系的考察 精密吸取 1,8-Cin 储备液 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，乙腈定容，摇匀，配制成质量浓度分别为 50、100、150、200、300、400 μg/mL 的 1,8-Cin 对照品溶液。按照“2.2.5”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以 1,8-Cin 峰面积（Y）对其质量浓度（C）进行线性回归，得回归方程为 Y=1.012 2 X+0.819 6，r^2=0.999 5，结果表明 1,8-Cin 在 50～400 μg/mL 线性关系良好。

2.2.8 精密度考察 精密吸取 200 μg/mL 的对照品溶液，按照“2.2.5”项下色谱条件进样测定，连续测定 6 次，记录峰面积。计算得 1,8-Cin 峰面积 RSD 为 0.99%，表明仪器精密度良好。

2.2.9 重复性考察 按“2.2.3”项方法制备供试品溶液 6 份，精密吸取各供试品溶液，按“2.2.5”项下色谱条件测定，记录峰面积，计算得 RSD 值为 0.91%，表明该方法重复性良好。

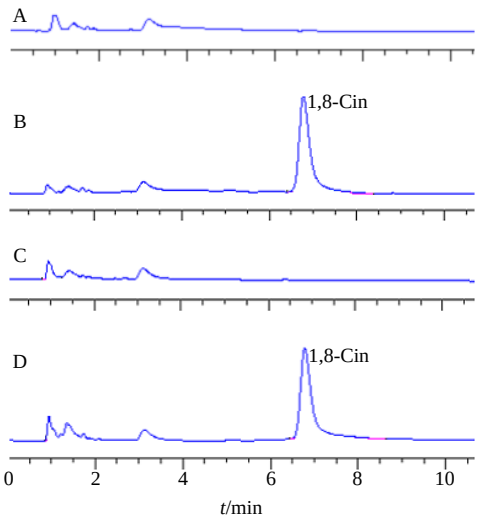


图 1 乙腈 (A)、1,8-Cin 对照品溶液 (B)、SMEDDS 空白对照 (C)、1,8-Cin-SMEDDS (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of acetonitrile (A), 1,8-Cin reference solution (B), blank self-microemulsion (C) and 1,8-Cin-SMEDDS (D)

2.2.10 稳定性考察 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h，精密吸取“2.2.3”项下供试品溶液适量，按“2.2.5”项下色谱条件测定，记录峰面积，计算峰面积的 RSD 为 1.15%，表明 1,8-Cin-SMEDDS 供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.11 加样回收率考察 取一定量“2.2.3”项下的 1,8-Cin-SMEDDS 供试品溶液，按“2.2.5”项下色谱条件测得供试品峰面积，计算供试品含量（A）。分别取对照品储备液 1、2、4 mL 于 10 mL 量瓶中，定容至刻度，按“2.2.5”项下色谱条件测得对照品峰面积，计算对照品含量（B）。在“2.2.3”项下的供试品中加入对照品储备液 1、2、4 mL，各配制 3 份，按“2.2.5”项下色谱条件测定峰面积，计算含量（C）。按以下公式计算回收率：回收率＝(C－A)/B。结果表明，低、中、高 3 种质量浓度的平均加样回收率分别为 98.75%、101.54%、102.32%，RSD 分别为 1.65%、0.97%、0.52%。回收率符合要求。

2.3 1,8-Cin-SMEDDS 处方筛选

2.3.1 伪三元相图绘制 本研究采用乳化剂与助乳化剂以一定的质量比（K_m）混匀形成混合乳化剂。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（固定体系质量为 1 g），涡旋状态下逐滴加入纯水，记录溶液由浑浊到澄清时临界点的加水量，计算各组分在临界点的质量分数。以油相、水

相、K_m 为 3 个顶点，用 Orgin 7.5 软件绘制伪三元相图，以乳化区域面积（图中 M 区域）大小为考察指标。

2.3.2 混合油相配比的考察 根据预试验，固定乳化剂为 HS15，助乳化剂为甘油，K_m＝1∶1，设置 1,8-Cin 与 LCT 混合油相比例分别为 1∶0、1∶1、1∶2、2∶1、3∶1、4∶1，以乳化区域面积为考察指标，按“2.3.1”项方法进行伪三元相图的绘制。结果表明，1,8-Cin 与 LCT 为 3∶1 时乳化面积最大。结果见图 2。

2.3.3 乳化剂的种类筛选 固定 1,8-Cin 与 LCT 为 3∶1，助乳化剂为甘油，K_m＝1∶1，分别设置 HS15 和聚山梨酯-80 为乳化剂，以乳化区域面积为考察指标，按“2.3.1”项方法进行伪三元相图的绘制。结果表明，HS15 作为乳化剂时，自乳化面积较大，故选择 HS15 作为乳化剂。结果见图 3。

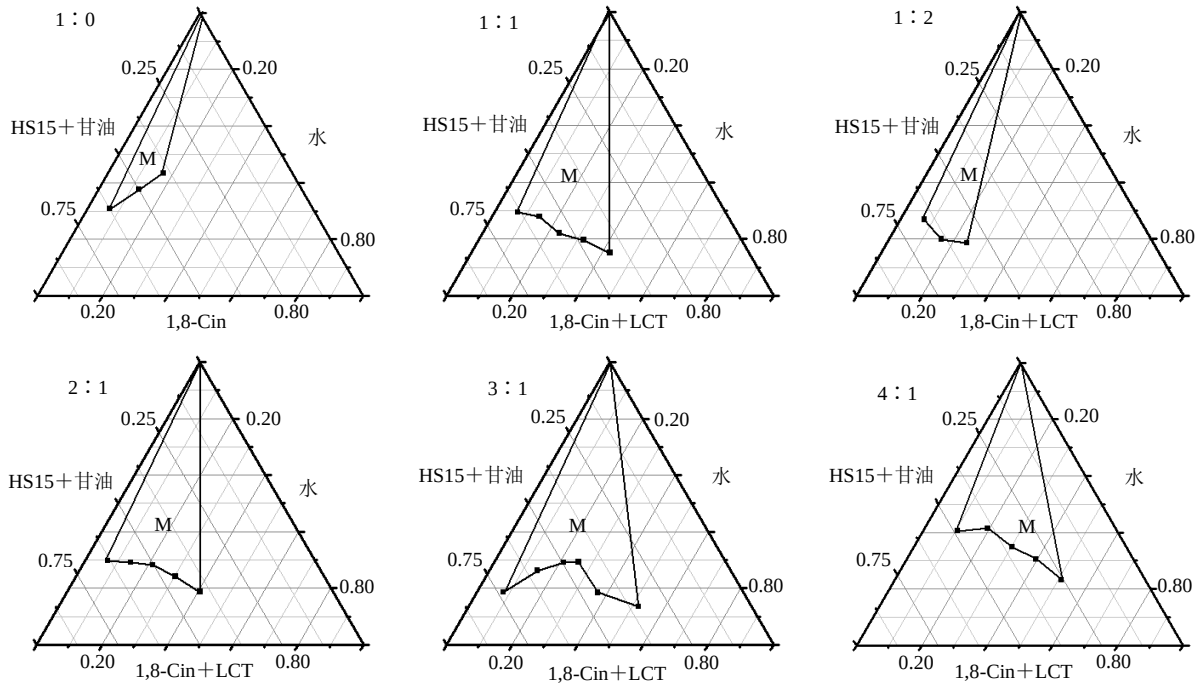


图 2 1,8-Cin 与 LCT 不同比例的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo ternary phase diagrams with different ratios of 1,8-Cin to LCT

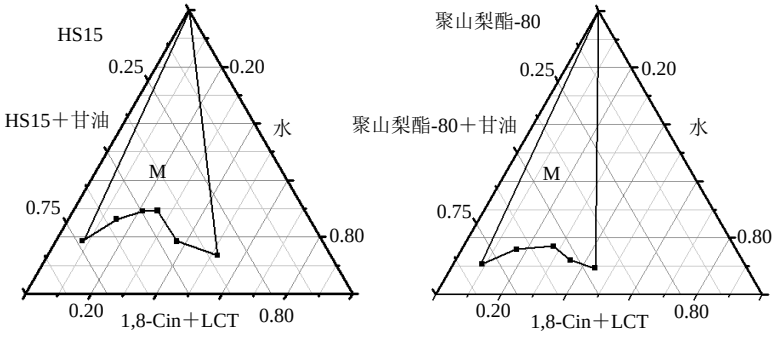


图 3 不同乳化剂的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagrams of different emulsifiers

2.3.4 助乳化剂的筛选 固定 8-Cin 与 LCT 为 3∶1，乳化剂为 HS 15，K_m＝1∶1，分别设置助乳化剂为甘油、乙醇、丙二醇，按“2.3.1”项方法进行伪三元相图的绘制。结果表明，乙醇为助乳化剂时，乳化面积较大，故选择乙醇作为助乳化剂。结果见图 4。

2.3.5 乳化剂和助乳化剂比例（K_m）的确定 根据以上实验结果，分别称取适量油相、乳化剂、助乳化剂，分别按 K_m 为 1∶1、2∶1、3∶1、4∶1 的质量比配制系列混合物，分别通过“2.3.1”项的方法绘制伪三元相图。结果表明，当 K_m 为 4∶1 时乳化面积最大，选择 K_m 为 4∶1。结果见图 5。

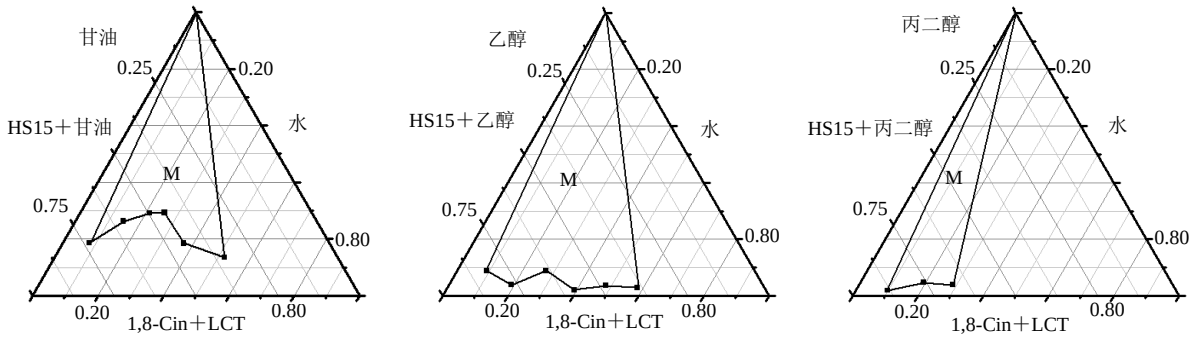


图 4　不同助乳化剂的伪三元相图

Fig. 4　Pseudo-ternary phase diagrams of different co-emulsifiers

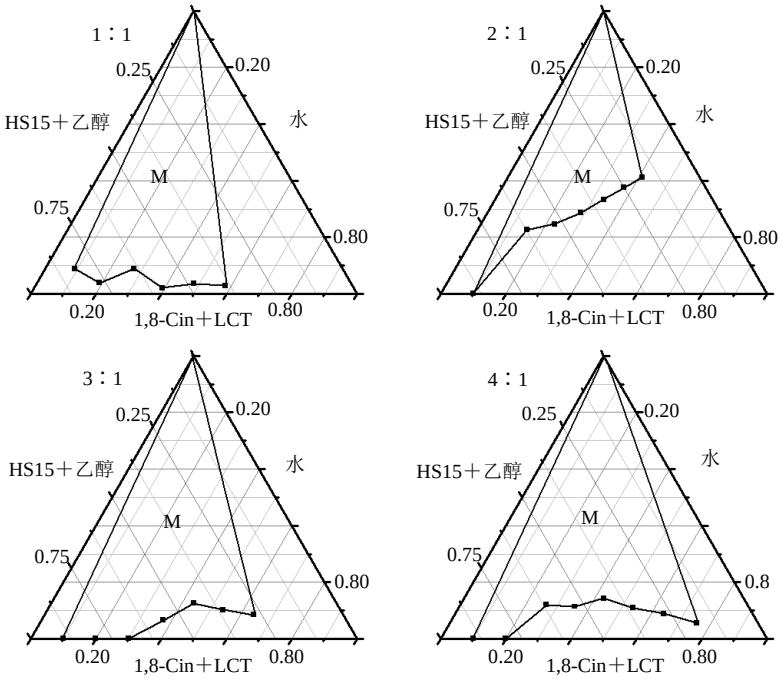


图 5　不同 K_m 值的伪三元相图

Fig. 5　Pseudo-ternary phase diagrams with different K_m values

2.3.6　星点设计-响应面法确定最佳处方　为了更好地评价 1,8-Cin-SMEDDS 的处方，以粒径和载药量为评价指标，在伪三元相图筛选出的结果基础上，选择对 1,8-Cin-SMEDDS 性质影响较显著的油相质量分数（X_1）和 K_m（X_2）作为考察因素。油相质量分数越低越有利于自微乳体系的形成和稳定，故将油相质量分数的范围确定为 10%～50%。采用伪三元相图对 K_m 值进行考察，结果表明 K_m 为 4∶1 时，得到最大的乳化面积。K_m 为 5 时，混合油相和混合乳化剂比例为 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5，没有浑浊变澄清的点，出现较大面积凝胶区域，推测在 4∶1～5∶1 可能存在最佳 K_m 值，故 K_m 的范围为 1∶1～5∶1。以平均粒径（Y_1）及载药量（Y_2）为评价指标，采取星点设计-效应面优化法，对处方进行优化。使用 Design Expert 8.0.6 软件对各成分进行多元线性回归和二项式的拟合，并遵循拟合方程绘制表达各指标与各成分之间关系的三维效应面，根据曲线图进行响应面优化。因素与水平及结果见表 1。

以 Y_1 和 Y_2 为因变量，X_1 和 X_2 为自变量，使用 Design Expert 8.0.6 软件，分别对各因素的各水平进行多元线性回归和 2 项式方程拟合，得到拟合方程 $Y_1 = 133.34 + 63.42\ X_1 - 69.77\ X_2 - 57.99\ X_1X_2 - 43.82\ X_1^2 + 45.75\ X_2$，$r^2 = 0.893\ 4$，$P = 0.002\ 7$；$Y_2 = 212.81 + 26.51\ X_1 + 53.43\ X_2$，$r^2 = 0.429\ 1$，$P = 0.060\ 7$；由上述方程可知，粒径符合多元线性方程，非线性拟合效果良好，相关系数均较高，结果具有统计学意义。

表 1 星点设计实验因素水平与结果

Table 1 Experimental factor level and result of central composite design

序号	X_1/%	X_2	平均粒径/nm	载药量/(mg·g^{-1})
1	15.86 (−1)	3.29 (−1)	30.06	116.67
2	15.86 (−1)	4.71 (+1)	27.63	117.17
3	44.14 (+1)	3.29 (−1)	353.30	330.51
4	44.14 (+1)	4.71 (+1)	118.93	330.49
5	10 (−1.414)	4 (0)	15.77	74.51
6	50 (+1.414)	4 (0)	81.38	224.15
7	30 (0)	3 (−1.414)	341.54	224.50
8	30 (0)	5 (+1.414)	114.30	224.72
9	30 (0)	4 (0)	130.01	224.76
10	30 (0)	4 (0)	131.51	224.72
11	30 (0)	4 (0)	137.94	224.79
12	30 (0)	4 (0)	133.40	224.75
13	30 (0)	4 (0)	133.83	224.73

2.3.7 效应面分析 当油相的质量分数一定时，粒径随着 K_m 值的增大出现一个先减小后增大的变化过程；载药量不受 K_m 变化的影响。当 K_m 值一定时，随着油相质量分数增加，粒径先增大后减小，载药量先增大后减小，油相质量分数和 K_m 对粒径的影响较大，载药量仅受油相占比的影响。综合粒径和载药量 2 个指标，通过 Design Expert 8.0.6 软件的预测分析功能，根据拟合方程及其三维效应面图综合分析，以粒径和载药量大小为综合考察指标，得到理论最佳处方为油相 30%，K_m＝4∶1。LCT 7.5%、1,8-Cin 22.5%、HS15 56%、乙醇 14%。三维效应面结果见图 6。

2.3.8 处方验证 按照最优处方，精密称取 LCT0.075 g，1,8-Cin 0.225 g，HS15 0.56 g，乙醇 0.14 g。涡旋混匀，在涡旋状态下逐滴加入 8 mL 纯水，得半透明略带蓝色乳光的 1,8-Cin-SMEDDS。预测值与实测值偏差结果表明，最优处方平均粒径和载药量的真实值与预测值之间没有显著差异，且指标的相对误差[相对误差＝(预测值－实测值)/预测值]均较小。表明本实验所应用的星点设计-效应面法所拟合的方程预测效果良好。见表 2。

2.4 1,8-Cin 自微乳的质量评价

2.4.1 1,8-Cin-SMEDDS 形态 将最优处方制备的 1,8-Cin-SMEDDS 用水稀释 100 倍后，滴加适量在覆盖碳膜的铜网上，用 2%磷钨酸溶液（pH 7.4）负染 10 min，自然挥干，于透射电镜观察其形态。结果显示，1,8-Cin-SMEDDS 经水稀释后形成较为均一的球形乳滴。结果见图 7。

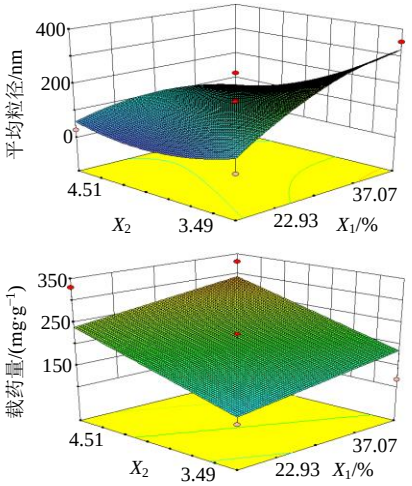


图 6 粒径和载药量三维效应面图

Fig. 6 Three-dimensional response surface of particle size and drug loading

表 2 Design Expert 8.0.6 预测粒径和载药量实测值与预测值 (n = 3)

Table 2 particle size and drug loading measured and predicted by Design Expert 8.0.6 (n = 3)

指标	实测值	预测值	相对误差/%
粒径/nm	133.83	133.34	−0.37
	131.51		1.37
	130.01		2.56
载药量/(mg·g^{-1})	224.72	212.81	−5.59
	224.79		−5.63
	224.75		−5.61

2.4.2 1,8-Cin-SMEDDS 平均粒径及 Zeta 电位表征 采用动态光散射法（LDS）测量 SEDDS 的平均粒径，相位分析光散射（PALS）测定 Zeta 电位。结果表明 1,8-Cin-SMEDDS 平均粒径为（131.68±1.44）nm，Zeta 电位为（−10.03±1.63）mV（n＝3）。结果见图 8。

2.4.3 载药量及包封率测定 精密称取 3 份 1,8-Cin-SMEDDS 各 0.1 g（W_0），置于 10 mL 量瓶中，

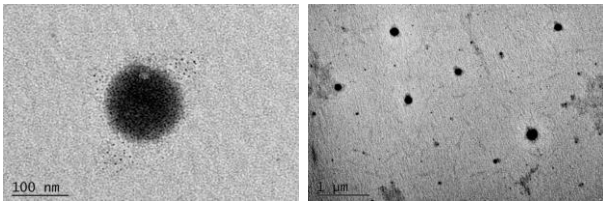


图 7 1,8-Cin-SMEDDS 透射电镜图

Fig. 7 TEM image of 1,8-Cin-SMEDDS

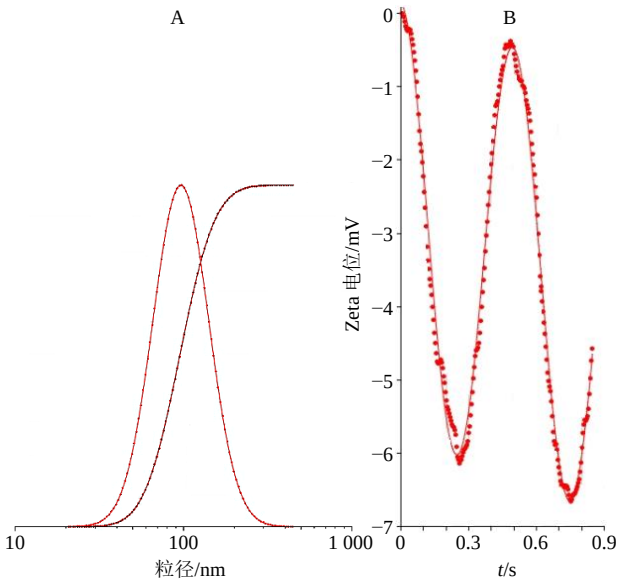


图 8　1,8-Cin-SMEDDS 的粒径分布图 (A) 和 Zeta 电位图 (B)

Fig. 8　Particle size distribution map (A) and Zeta potential diagram (B) of 1,8-Cin-SMEDDS

加乙腈适量，超声 5 min 使溶解，定容，摇匀，按“2.2.5”项下方法测定药物含量（W_1）。根据以下公式计算载药量：载药量＝W_1/W_0。结果表明，1,8-Cin-SMEDDS 0.1 g 的载药量分别为 224.72、224.79、224.75 mg/g，均数为 224.75 mg/g，RSD 为 0.013%。

精密称取 3 份 1,8-Cin-SMEDDS 1 g，滴加 8 mL 纯净水，得 1,8-Cin-SMEDDS，取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中，加乙腈适量，超声 5 min 使溶解，定容，按照“2.2.5”项下色谱条件进样测定，计算药物含量 $W_{总}$，量取 1,8-Cin-SMEDDS 3 mL，置于 15 mL 超滤管（截留相对分子质量 10 000）中 3 000 r/min 离心 20 min，取离心管中自微乳液 1 mL，取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中，加乙腈适量，超声助溶 5 min，定容，按照“2.2.5”项下色谱条件进样测定，计算药物含量（$W_{包}$）。根据以下公式计算包封率：包封率＝$W_{包}/W_{总}$。1,8-Cin-SMEDDS 的包封率分别为 99.89%、99.91%、99.88%，均数为 99.89%，RSD 为 0.012%。结果表明，1,8-Cin-SMEDDS 的载药量和包封率均较高。

2.5　1,8-Cin-SMEDDS 稳定性考察

2.5.1　稀释对 1,8-Cin-SMEDDS 稳定性的影响　将 1 g 的 1,8-Cin-SMEDDS，分别用 4、8、12 mL 纯水稀释后，于 4 ℃条件下放置 2、8、12、24 h，观察沉淀和分层现象，结果见表 3。并将 1,8-Cin-SMEDDS 置于 5 mL EP 管中，4 000 r/min 离心 30 min，观察离心后变化。结果表明，在 4 ℃条件下放置，随着稀释体积的增加，1,8-Cin 自乳化后 2、8、12、24 h 内均未见有沉淀产生和分层现象，且离心后 30 min 内仍未发生分层。

表 3　不同稀释体积对 1,8-Cin-SMEDDS 稳定性 (4 ℃放置) 的影响

Table 3　Effect of dilution volume on stability of 1,8-Cin-SMEDDS

稀释体积/mL	放置时间/h	外观	离心稳定性
4	2	半透明均一乳剂体系，略带淡蓝色乳光	未见分层
	8		
	12		
	24		
8	2	半透明均一乳剂体系，略带淡蓝色乳光	未见分层
	8		
	12		
	24		
12	2	半透明均一乳剂体系，略带淡蓝色乳光	未见分层
	8		
	12		
	24		

2.5.2　不同分散介质对 1,8-Cin-SMEDDS 稳定性的影响　将 1 g 1,8-Cin-SMEDDS 分别用 8 mL 注射用水、生理盐水、5%葡萄糖溶液稀释后，分别于 4℃下放置 2、8、12、24 h，并观察其 4 000 r/min 离心 30 min 后的外观变化，结果见表 4。结果表明，在 4 ℃条件下，不同分散介质对 1,8-Cin 自乳化后 2、8、12、24 h 内均未见有沉淀产生和分层现象，且离心后 30 min 内仍未发生分层。说明在相应情况下，不同分散介质对 1,8-Cin 自乳化后的稳定性无影响。

2.6　细胞摄取实验

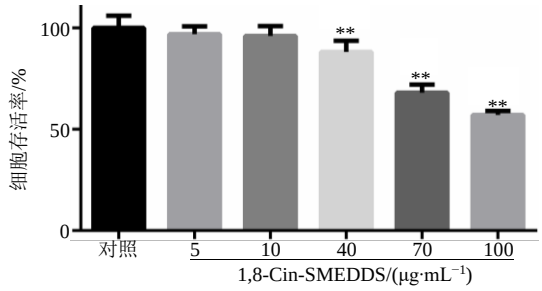
2.6.1　1,8-Cin-SMEDDS 的细胞毒性　当 HUVEC 密度达到 70%～80%，给予不同质量浓度 1,8-Cin-SMEDDS（含 1,8-Cin 5～100 μg/mL）孵育 24 h，采用 MTT 法评价细胞存活率。结果表明，在 5～10 μg/mL 时，1,8-Cin-SMEDDS 对细胞生长没有显著的抑制作用（存活率＞90%）。结果见图 9。本实验室前期研究结果表明，1,8-Cin 在 0.879～8 761.4 μg/mL 对 HUVEC 没有细胞毒性作用[15]。

2.6.2　细胞摄取考察　取正常培养的 HUVEC，经消化、计数，调整细胞密度至 1×10^5 个/mL，每孔 2 mL 接种入 6 孔板中，细胞维持在 37℃、5% CO_2 和 95%

表 4 不同分散介质对 1,8-Cin-SMEDDS 稳定性 (4 ℃放置) 的影响

Table 4 Effect of different dispersing media on stability of 1,8-Cin-SMEDDS

稀释体积/mL	放置时间/h	外观	离心稳定性
注射用水	2	半透明均一乳剂体系，略带淡蓝色乳光	未见分层
	8		
	12		
	24		
生理盐水	2	半透明均一乳剂体系，略带淡蓝色乳光	未见分层
	8		
	12		
	24		
5%葡萄糖	2	半透明均一乳剂体系，略带淡蓝色乳光	未见分层
	8		
	12		
	24		



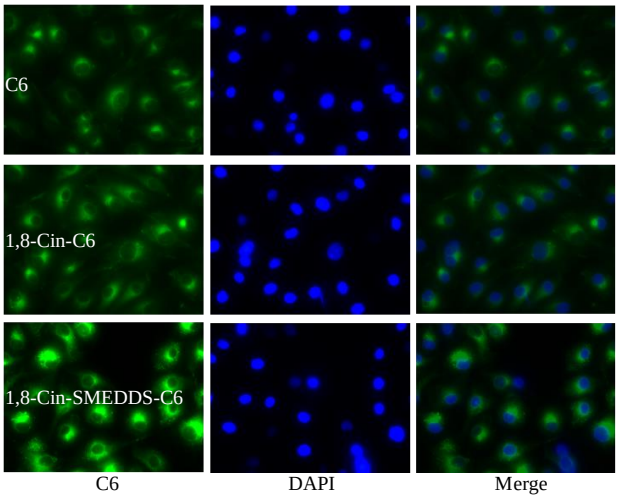
与对照组比较： $^{**}P<0.01$

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

图 9 1,8-Cin-SMEDDS 对 HUVEC 的毒性作用

Fig. 9 Toxic effect of 1,8-Cin-SMEDDS on HUVEC

相对湿度的培养箱中 24 h 贴壁后，移除培养基，加入含有高浓度葡萄糖（35 μmol/L）的培养基建立高糖损伤的内皮细胞损伤模型。分别加入含 C6 （80 ng）的培养基、1,8-Cin-C6、1,8-Cin-SMEDDS-C6 培养 4 h，移除培养基，预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次后，4%多聚甲醛固定细胞，加入 DAPI 染色液染色细胞核。用 PBS 洗涤后，荧光倒置显微镜下观察细胞摄取情况。荧光倒置显微镜下观察，C6 所体现的绿色位于细胞系的核周区域，表明其分布在细胞质中。实验结果表明，与 1,8-Cin-SMEDDS 相比，游离 C6 预处理组和含 C6 的 1,8-Cin 组，荧光强度均比含有 C6 的 1,8-Cin-SMEDDS 荧光强度低。表明 1,8-Cin-SMEDDS 能有效地内化到 HUVEC 细胞中，并在细胞质中积累。结果见图 10。



蓝色为 DAPI 细胞核染色；绿色为 C6 细胞质染色

blue for nuclear staining fluorescence; green for C6 cytoplasm fluorescence

图 10 荧光显微镜对 1,8-Cin-SMEDDS 在 HUVEC 作用 4 h 的细胞摄取分析

Fig. 10 Qualitative analysis of cell uptake of 1,8-Cin-SMEDDS exposed to HUVEC for 4 h

3 讨论

安全性高、允许用于血管内注射的 Kolliphor® HS15 是由德国巴斯夫公司开发并上市的新型非离子型增溶剂和乳化剂，已被德国药典、英国药典、美国药典和欧洲药典收录。国外已上市含有 HS15 的产品包括注射液、口服给药和皮下给药等剂型，其中注射液 Panitol 中 HS15 的含量高达 50%[20]。实验室前期多个细胞实验考察结果表明其具有良好的安全性（相关数据尚未发表），因此，选择将其作为乳化剂制备注射用 1,8-Cin-SMEDDS。

由于 1,8-Cin 挥发性较强，现有的溶出度考察方法属于开放式系统，难以规避物质挥发造成的损失，因此，本研究目前未进行溶出度相关考察。

自微乳中油相、乳化剂和助乳化剂的含有量对微乳粒径和载药量等理化性质有显著影响[21]。常用的均匀设计和正交设计方法，实验精度不够，建立的数学模型预测性较差，采用星点设计更佳合理地确定油相百分比及混合乳化剂的配比，获得较准确的结果。

文献报道，直径 100～600 nm 的纳米粒子反而能更好地达到靶向血管内皮损伤部位的效应，考虑到自微乳平均粒径过大，最大粒径范围超过注射范围，因为选择了平均粒径为（131.68±1.44）nm 的处方为最佳处方[22-23]。

参考文献

[1] 王 春, 秦少博, 李 萍, 等. 炎症与血管内皮损伤研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2015, 36(1): 89-92.

[2] 杨久亮. 动脉粥样硬化发病机制的研究进展 [J]. 人民军医报, 2003, 46(8): 484-486.

[3] Kladniew B R, Polo M, Villegas S M, *et al*. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines [J]. *Chem-Biol Interact*, 2014, 214: 57-58.

[4] 张小飞, 果秋婷, 邹俊波, 等. 黄芪甲苷自乳化释药系统的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3037-3043.

[5] 轩肖玉, 王亚静, 张伟玲, 等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 166-170.

[6] 傅春升, 李洪松, 张学顺. 苦参碱固体自微乳制剂的制备及其评价 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 511-514.

[7] 李 墨, 赵秀丽, 陈大为, 等. 注射用葫芦素 B 自微乳化药物传递系统的处方优化 [J]. 沈阳药科大学学报. 2008, 25(1): 15-19.

[8] 赖章婷, 丁海波, 蒋且英, 等. 水飞蓟宾过饱和自微乳给药系统的制备及体外质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4091-4099.

[9] Pouton C W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems [J]. *Adv Drug Del Rev*, 1997, 25: 47-58.

[10] Amri A, Clanche S L, Thérond P, *et al*. Resveratrol self-emulsifying system increases the uptake by endothelial cells and improves protection against oxidative stress-mediated death [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(3): 418-426.

[11] Lima P R, Melo de T S, Carvalho K M M B, *et al*. 1,8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-κB activity in mice [J]. *Life Sci*, 2013, 92: 1195-1197.

[12] Kladniew B R, Polo M, Villegas S M, *et al*. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines [J]. *Chem-Biol Interact*, 2014, 214: 57-58

[13] Lanzetti1 M, Kennedy-Feitosa E, Okuto R T, *et al*. Effects of 1,8-cineole in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse [J]. *Free Rad Biol Med*, 2015, 10(250): 350-351.

[14] Santos F A, Silva R M, Campos A R, *et al*. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42: 579-580.

[15] Linghu K, Lin D, Yang H, *et al*. Ameliorating effects of 1,8-cineole on LPS-induced human umbilical vein endothelial cell injury by suppressing NF-κB signaling *in vitro* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 789: 195-201.

[16] 钟琳瑛, 田湾湾, 刘彩凤, 等. 川芎嗪微乳的制备及不同粒径微乳体外释放对比研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5231-5238.

[17] 吴朝花, 严俊丽, 王 益, 等. 艳山姜挥发油自乳化释药系统的优化及评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 48(19): 3970-3976.

[18] 赵惠茹, 张 鹏, 刘少静, 等. 伪三元相图法研究芦丁自微乳化释药系统的制备工艺 [J]. 中国药师, 2016, 19(7): 1255-1259.

[19] 彭 佩, 林爱华, 陈军, 等. NGR 修饰的香豆素-6 隐形脂质体的制备及其体外细胞摄取性质 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(6): 427-432.

[20] 张 蕾, 訾 鹏, 高 洁, 等. 非离子型表面活性剂 HS15 在药剂中的研究进展 [J]. 药学进展, 2015, 39(5): 370-375.

[21] 杨佳佳, 韦世权, 张 科, 等. 香茅醇自乳化递送系统的制备及其体外抗肿瘤活性评价 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1196-1204.

[22] Chino Y, Minagawa T, Kohno Y, *et al*. Uptake by vascular smooth muscle cells plays an important role in targeting of lipid microspheres incorporating prostaglandin E1 into a thickened intima [J]. *Life Sci*, 2001, 68(8): 933-942.

[23] 何 军, 张 兵, 陈艳华, 等. 脂质乳剂释药机制及其靶向性的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2008. 39(1): 56-60.