

RGD 环肽修饰的姜黄素/黄芩苷靶向共递送纳米脂质体的制备工艺优化及表征

吴斯宇¹, 曾盈蓉¹, 唐 聘¹, 桂 卉^{1*}, 胡立志^{2*}

1. 湖南中医药大学药学院 湖南省中药现代化研究重点实验室, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

摘要: 目的 优化 RGD 环肽修饰的姜黄素(curcumin, Cur)/黄芩苷(baicalin, Bai)共递送靶向纳米脂质体(RGD-Cur/Bai-Lip)的制备工艺并进行表征评价。方法 采用乙醇注入法制备 RGD-Cur/Bai-Lip, 首先通过 Plackett-Burman 筛选实验确定超声时间、胆脂比、水合温度作为制备 RGD-Cur/Bai-Lip 的关键因素, 然后采用 Box-Behnken 响应面法进行工艺优化, 以姜黄素包封率、黄芩苷包封率、总载药量为考察指标, 采用 AHP-复相关系数法-拉开档次法进行多指标组合赋权以确定各指标权重系数并计算综合得分, 从而确定 RGD-Cur/Bai-Lip 的最优处方及关键工艺参数。最后对其形态、粒径电位、稳定性、体外释放度及溶血性等进行表征评价。结果 优选得到的最佳工艺为胆脂比 1:12, 水合温度 60 ℃, 探头超声时间为 10 min。RGD-Cur/Bai-Lip 外观澄清透明, 呈亮黄色, 对光可视淡蓝色乳光, 透射电子显微镜下观察形态圆整、分散均匀。平均粒径为 (101.10 ± 0.62) nm, 多分散系数(PDI)为 $0.191 0 \pm 0.014 3$, Zeta 电位为 (1.59 ± 0.07) mV, 姜黄素包封率为 $(94.28 \pm 4.51)\%$, 黄芩苷包封率为 $(76.93 \pm 1.35)\%$, 总载药量为 $(2.27 \pm 0.09)\%$ 。7 d 内稳定性良好, 无溶血性, 并具有一定的缓释作用。结论 优化处方后制备的 RGD-Cur/Bai-Lip 包封率高, 粒径分布均匀, 7 d 内较稳定, 无溶血性, 并具有一定的缓释作用, 为 RGD-Cur/Bai-Lip 的后续抗肝纤维化体内外研究提供了制剂基础。

关键词: 脂质体; 姜黄素; 黄芩苷; RGD 环肽; Plackett-Burman 设计; Box-Behnken 响应面法; AHP-复相关系数法-拉开档次法

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)22-6834-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.008

Preparation process optimization and characterization of RGD cyclopeptide modified curcumin/baicalin co-delivery targeted liposomes

WU Si-yu¹, ZENG Ying-rong¹, TANG Pin¹, GUI Hui¹, HU Li-zhi²

1. Hunan Key Laboratory of Modernization Research of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China

Abstract: Objective To optimize the preparation and characterization of curcumin/baicalin co-delivery targeting nanoliposomes (RGD-Cur/Bai-Lip) modified by RGD cyclopeptide. **Methods** RGD-Cur/Bai-Lip was prepared by ethanol injection. Ultrasonic time, bile-fat ratio and hydration temperature were determined by Plackett-Burman screening experiment as the key factors for the preparation of RGD-Cur/Bai-Lip. Then the process was optimized by Box-Behnken response surface method, with curcumin entrapment efficiency, baicalin entrapment efficiency and total drug loading as indexes. The AHP-multiple correlation coefficient method-open grade method was used to determine the weight coefficient of each index and calculate the comprehensive score, so as to determine the optimal prescription and key process parameters of RGD-Cur/Bai-Lip. Finally, its morphology, particle size potential, stability, *in vitro* release and hemolysis were characterized and evaluated. **Results** The optimum conditions were as follows: the ratio of bile to lipid was 1:12, the hydration temperature was 60 ℃, and the ultrasonic time of the probe was 10 min. The appearance of

收稿日期: 2021-06-08

基金项目: 湖南中医药大学中药学一流学科开放基金项目(2020ZYX09)

作者简介: 吴斯宇, 女, 土家族, 硕士研究生, 中药学专业。Tel: 15508979610 E-mail: 2464423265@qq.com

*通信作者: 桂 卉, 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: 13707488252 E-mail: 1302985572@qq.com

胡立志, 男, 硕士, 主管中药师。Tel: 15116424878

RGD-Cur/Bai-Lip was clear and transparent, bright yellow, light blue opalescent light. Under transmission electron microscope, RGD-Cur/Bai-Lip dispersed evenly with round shape. The average particle size was (101.10 ± 0.62) nm, the dispersion coefficient (PDI) was 0.1910 ± 0.0143 , the Zeta potential was (1.59 ± 0.07) mV, the entrapment efficiency of curcumin was $(94.28 \pm 4.51)\%$, the entrapment efficiency of baicalin was $(76.93 \pm 1.35)\%$, and the total drug loading was $(2.27 \pm 0.09)\%$. It had good stability and no hemolysis within 7 d, and had a certain sustained release effect. **Conclusion** This method can effectively and reliably optimize the preparation process of RGD-Cur/Bai-Lip. After optimizing the prescription, the prepared RGD-Cur/Bai-Lip has high entrapment efficiency, uniform particle size distribution and good stability without hemolysis, which provides a preparation basis for the follow-up study of anti-hepatic fibrosis of RGD-Cur/Bai-Lip *in vivo* and *in vitro*.

Key words: liposome; curcumin; baicalin; RGD cyclopeptide; Plackett-Burman design; Box-Behnken response surface method; AHP-complex correlation coefficient-open level weight method

近年来,肝纤维化的发病率逐年增高,引起了全社会的广泛关注和重视。肝纤维化是由于肝脏在病毒、自身免疫性疾病、药物等诸多因素的作用下,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)被激活,大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝脏中过度堆积形成瘢痕组织而形成^[1-2]。已有研究表明^[3-4],姜黄素(curcumin, Cur)与黄芩苷(baicalin, Bai)可以通过不同途径和通路抑制肝纤维化,发挥协同作用,增强临床疗效。其中姜黄素通过抑制 HSC 中的 Hedgehog (Hh) 信号传导调节细胞代谢和衰老,促进 HSC 凋亡而逆转肝纤维化进程;黄芩苷通过抑制肝细胞膜的脂质过氧化,降低 α -SMA 的表达,抑制肝细胞氧化应激和 HSC 的活化,从而抑制肝纤维化。

姜黄素与黄芩苷虽具确切治疗肝纤维化的疗效,但制成普通制剂时存在口服吸收差、稳定性不高和低靶向性等缺点,限制了药效的充分发挥。脂质体(liposomes, Lip)系指将药物包封于类脂质双分子层内而形成的超微球形载体制剂,具有改善药物溶解性,提高药物稳定性、增强体内靶向性等优点^[5]。此外,已有研究表明^[6-7]HSC 的激活和增生是肝纤维化发生的中心环节,各种致纤维化因素共同通过这一决定性途径启动肝纤维化的过程。RGD 环肽^[8]具有与 HSC 表面整合素结合的能力,是整合素与 ECM 结合识别最常见的位点,能够特异性地与 HSC 表面的整合素结合,抑制细胞与细胞、细胞与间质之间的黏附,阻止细胞的增殖、分化,从而逆转肝纤维化进程。因此本实验构建主动靶向于 HSC 的 RGD 环肽修饰的姜黄素/黄芩苷共递送靶向纳米脂质体(RGD-Cur/Bai-Lip)载药系统,采用 AHP-复相关系数法-拉开档次法多指标综合评分以确定权重系数,通过 Plackett-Burman 筛选实验设计结合 Box-Behnken 响应面实验以确定 RGD-Cur/Bai-Lip

的最优工艺参数,并进一步进行表征评价,为 RGD-Cur/Bai-Lip 的后续抗肝纤维化体内外研究奠定制剂基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器设备

Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪, Agilent ChemStation 色谱工作站, 美国安捷伦公司; Precisa XB 220A 型分析天平, 瑞士 Precisa 重量分析股份公司; 01A418 型超声细胞粉碎机、SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机、Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; ZNCL-G 型智能磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SPX-250B 型恒温培养箱, 上海博泰实验设备有限公司; H3-20KR 型台式高速冷冻离心机, 湖南可成仪器设备有限公司。

1.2 材料与试剂

姜黄素原料药(批号 R30A11S112330, BR, 98%)、黄芩苷原料药(批号 G07S11L123706, BR, 90%)、姜黄素对照品(批号 R08S8S43416, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$)、黄芩苷对照品(批号 P16S8F44143, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$)、大豆卵磷脂(批号 T7011F127302)均购于上海源叶生物有限公司; DSPE-PEG2K-cRGD(批号 RMO211108), 西安瑞禧生物有限公司; 胆固醇(批号 20181128), 国药集团化学试剂有限公司; D36 mm 透析袋(截留相对分子质量 8000~14000), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 无菌脱纤维兔血(批号 210624), 广州鸿泉生物科技有限公司; 乙腈、甲醇、磷酸、冰醋酸均为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 RGD-Cur/Bai-Lip 制备方法

采用乙醇注入法制备 RGD-Cur/Bai-Lip。黄芩

昔、RGD 环肽溶于 pH 6.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中作为水相, 大豆卵磷脂、胆固醇、姜黄素溶于无水乙醇中作为油相, 将油相匀速滴入水相中, 并置于恒温 60 °C 水浴中水化 1 h, 减压旋蒸除去乙醇, 用 PBS 定容至 20 mL, 探头超声 10 min, 分别过 0.80、0.45、0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2 含量测定方法

2.2.1 色谱条件

(1) 姜黄素: Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 2% 冰乙酸-乙腈溶液 (45 : 55); 进样量为 10 μL ; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长为 430 nm。

(2) 黄芩苷: Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.4% 磷酸溶液 (47 : 53); 进样量 10 μL ; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 280 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备

(1) 姜黄素对照品溶液: 精密称取姜黄素对照品 2.12 mg, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 以色谱甲醇溶解并定容至刻度线, 得到质量浓度为 0.212 mg/mL 的姜黄素对照品母液, 4 °C 冰箱避光密封储存, 待用。

(2) 黄芩苷对照品溶液: 精密称取黄芩苷对照品 1.17 mg, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加色谱甲醇适量使全部溶解并定容至刻度线, 摇匀, 得质量浓度为 0.117 mg/mL 的对照品母液, 4 °C 冰箱避光密封储存, 待用。

2.2.3 供试品溶液的制备 量取 RGD-Cur/Bai-Lip 溶液 2 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入适量甲醇与乙腈 1 : 1 的混合溶剂破乳, 混合溶剂定容至 10 mL, 超声 1 h, 静置 24 h, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 4 °C 冰箱避光密封储存, 待用。

2.2.4 空白脂质体供试品溶液的制备 精密量取空白脂质体溶液 2 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 按“2.2.3”项下相同方法处理空白脂质体样品。

2.2.5 专属性试验 分别取“2.2.2”~“2.2.4”项下姜黄素对照品溶液、黄芩苷对照品溶液、RGD-Cur/Bai-Lip 供试品溶液、空白脂质体供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件各进样 10 μL , 结果见图 1、2, 空白脂质体供试品溶液色谱图未出现对照品对应峰, 表明阴性无干扰。

2.2.6 线性关系考察

(1) 姜黄素: 精密吸取上述“2.2.2”项下姜黄

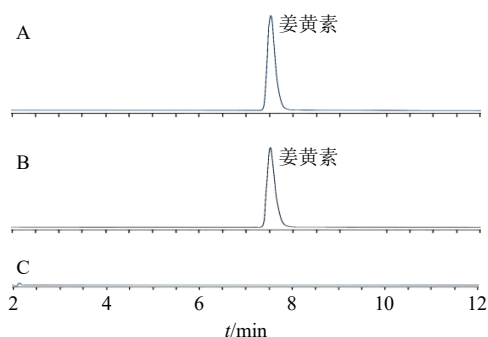


图 1 姜黄素对照品 (A)、RGD-Cur/Bai-Lip 样品 (B) 及空白脂质体 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of curcumin reference substance (A), RGD-Cur/Bai-Lip sample (B) and blank liposomes (C)

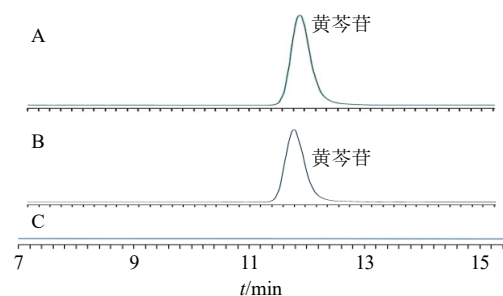


图 2 黄芩苷对照品 (A)、RGD-Cur/Bai-Lip 样品 (B) 及空白脂质体 (C) HPLC 图

Fig. 2 HPLC of baicalin reference substance (A), RGD-Cur/Bai-Lip sample (B) and blank liposomes (C)

素对照品母液 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.75 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 得到质量浓度分别为 0.010、0.015、0.020、0.025、0.030、0.035 mg/mL 系列对照品溶液。分别精密吸取各对照品溶液 10 μL , 按“2.2.1”项下姜黄素色谱条件进样测定, 以进样质量浓度为横坐标 (X), 相应的峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y=485.66 X+446.31$, $R^2=0.999 1$, 结果表明姜黄素在 0.010~0.035 mg/mL 呈良好线性关系。

(2) 黄芩苷: 精密吸取上述“2.2.2”项下黄芩苷对照品母液 0.01、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 得到质量浓度分别为 0.001、0.050、0.100、0.150、0.200、0.250 mg/mL 系列对照品溶液。分别精密吸取各对照品溶液 10 μL , 按“2.2.1”项下黄芩苷色谱条件进样测定, 以进样质量浓度为横坐标 (X), 相应的峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y=37 410 X-54.361$, $R^2=0.999 7$, 结果表明姜黄素在 0.001~0.250 mg/mL 呈良好线性关系。

2.2.7 精密度考察 精密吸取按“2.2.2”项下方法

制备的姜黄素对照品溶液和黄芩苷对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下分别连续进样 6 次，每次进样 10 μL ，其中姜黄素峰面积的 RSD 为 1.02%，黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.12%，表明仪器精密性良好。

2.2.8 重复性试验 制备 6 份 RGD-Cur/Bai-Lip 供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分别进样，结果姜黄素质量分数的 RSD 为 0.32%，黄芩苷质量分数的 RSD 为 0.18%，表明方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取 RGD-Cur/Bai-Lip 溶液分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定，结果姜黄素峰面积的 RSD 为 2.58%，黄芩苷峰面积的 RSD 为 2.70%，表明 RGD-Cur/Bai-Lip 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.10 加样回收率试验 制备 RGD-Cur/Bai-Lip 供试品溶液 9 份，每份 2 mL，分别精密加入低、中、高质量浓度的姜黄素对照品溶液和黄芩苷对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分别进样分析。结果显示，姜黄素低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 97.89%、97.75%、99.48%，RSD 分别为 0.83%、0.31%、1.11%；黄芩苷低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 96.49%、96.48%、96.99%，RSD 分别为 1.04%、0.68%、0.58%，说明本方法回收率良好。

2.3 包封率和载药量的测定

2.3.1 姜黄素包封率的测定 滤膜法^[9]是根据脂溶性药物水溶性差，在水中易形成微粒沉淀的特性，将脂溶性药物脂质体挤压通过水系滤膜，而游离药物被截留在膜上，从而达到游离药物和脂质体分离的目的。姜黄素属于强脂溶性药物，在 PBS 中会形成较大的聚合物而无法通过水系滤膜，因此选择滤膜法测定姜黄素包封率。

(1) 滤膜法分离效果的考察：按“2.1”项下方法制备 2 mg/mL 的姜黄素原料药混悬液，经探头超声处理后定容至 20 mL 量瓶中，取 2 mL 样品于 10 mL 量瓶中，用甲醇-乙腈 1:1 混合溶液进行破乳；剩余样品经 0.8、0.45、0.22 μm 微孔滤膜滤过，然后用甲醇-乙腈 1:1 混合溶液进行破乳，并用 HPLC 分别测定两者的含量。结果显示，过膜前的含量为 $(945.1 \pm 8.8) \mu\text{g/mL}$ ，过膜后的含量仅为 $(41.2 \pm 4.2) \mu\text{g/mL}$ 。上述结果说明姜黄素游离药物基本被滤膜截留，证明了滤膜法能有效分离脂质体和游离药物。

(2) 滤膜法测定姜黄素包封率：将制备好的 RGD-Cur/Bai-Lip 样品依次过 0.8、0.45、0.22 μm 的

水系滤膜，用甲醇-乙腈 1:1 混合溶液破乳后得到质量浓度为 $C_{\text{包}}$ ，未过膜的脂质体破乳后测得浓度为 $C_{\text{总}}$ 。

$$\text{包封率} = C_{\text{包}} / C_{\text{总}}$$

$C_{\text{总}}$ 为药物总量， $C_{\text{包}}$ 为包进药物总量

2.3.2 黄芩苷包封率的测定 经过查阅文献和预实验发现，透析法^[10]在测定黄芩苷包封率时具有简单快捷、准确性高等优点，因此本实验最终采取透析法测定黄芩苷包封率。

精密量取 RGD-Cur/Bai-Lip 样品 5 mL，置于透析袋内作为内相，以 50 mL 5% 甲醇-水作为外相，将内置透析袋的烧杯置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 磁力搅拌器 (300 r/min) 计时。分别于 15、30、45、60、75、120、150、180 min 取透析液 30 mL，于旋转蒸发仪上完全旋干，然后加入 2 mL 甲醇溶解，过膜，进样 HPLC 测定，以确定黄芩苷的透析平衡时间。由图 3 可知，随着透析时间的延长，透析介质中黄芩苷游离药物的峰面积呈上升趋势，而在 45~60 min，峰面积出现平衡趋势，透析 60 min 后，峰面积呈大幅上升趋势，说明透析袋内被包封的脂质体开始被破坏，并通过透析袋进入透析介质中。因此最终确定透析平衡时间为 60 min，并通过以下公式计算包封率。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}}$$

$W_{\text{总}}$ 为药物总量， $W_{\text{游}}$ 为游离药物总量

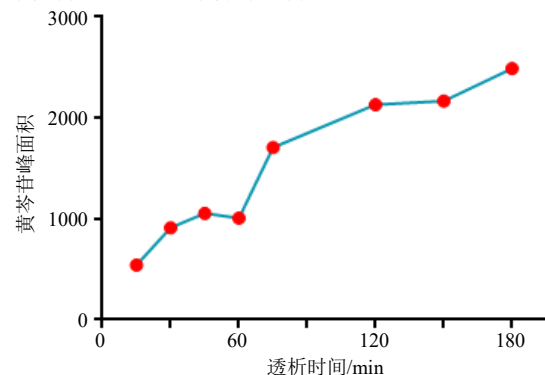


图 3 黄芩苷透析平衡图

Fig. 3 Dialysis balance diagram of baicalin

2.3.3 载药量的测定 精密量取 RGD-Cur/Bai-Lip 样品 2 mL 置于已干燥至恒定质量的称量瓶中，冷冻干燥 48 h，称定质量，计算供试品冻干粉净质量，将冻干粉加入甲醇-乙腈 1:1 混合溶液破乳，并定容至 10 mL，按照“2.2.1”项下色谱条件分别测定姜黄素和黄芩苷的含量。按照以下公式计算脂质体载药量。

$$\text{载药量} = W_{\text{总}} / \text{冻干粉净质量}$$

$W_{\text{总}}$ 为复溶后冻干粉总药量

2.4 多指标组合赋权

2.4.1 层次分析法 (AHP) 确定权重 AHP 法^[11]是指将与决策有关的复杂元素层次化和系统化, 在此基础之上将定性和定量分析相结合的决策方法。运用层次分析软件 YAAHP V12.4.7361, 采用 1~9 标度法对姜黄素包封率 (y_1)、黄芩苷包封率 (y_2)、总载药量 (y_3) 这 3 个权重指标进行两两成对比较, 构建指标成对判断优先矩阵, 结果见表 1。然后根据和积法计算各指标的权重 W_{j1} , 根据公式 $CR = CI/RI$ (CR : 随机一致性比例因子, CI : 一致性指标, RI : 平均随机一致性指标), 得到 $CR = 0.0279 < 0.10$, 说明指标成对判断优先矩阵具有很好的一致性, 权重系数有效, 得 3 个分权重 [姜黄素包封率 (W_{AHP1})、黄芩苷包封率 (W_{AHP2})、总载药量 (W_{AHP3})]。

表 1 指标成对比较判断优先矩阵

Table 1 Judgment priority matrix of indexes pairwise comparison

指标	y_1	y_2	y_3
y_1	1	1	5
y_2	1	1	3
y_3	1/5	1/3	1

2.4.2 复相关系数法确定权重 复相关系数法^[12]属于客观赋权法中的独立权数法, 可以依据特征变量间信息重复性大小赋权。由于选取的特征变量间存在一定的相关性, 复相关系数法不仅能避免由于信息重复导致的某方面信息权数过大问题, 而且能客观反映特征变量各个方面的情况。应用 Eva Gear Version 2.1.7486 软件计算 RGD-Cur/Bai-Lip 制备工艺的 3 个评价指标的权重系数 W_{j2} , 得 3 个分权重 [姜黄素包封率 ($W_{\text{复相关系数法}1}$)、黄芩苷包封率 ($W_{\text{复相关系数法}2}$)、总载药量 ($W_{\text{复相关系数法}3}$)]。

2.4.3 拉开档次法确定权重 拉开档次法提出的基本原则是在指标赋权的过程中尽可能的突出多个被评价对象之间的整体差异, 以拉开各被评价对象的档次, 有利于最终结果的排序^[13]。应用 Eva Gear Version 2.1.7486 软件计算 RGD-Cur/Bai-Lip 制备工艺的 3 个评价指标的权重系数 W_{j3} , 得 3 个权重 [姜黄素包封率 ($W_{\text{拉开档次法}1}$)、黄芩苷包封率 ($W_{\text{拉开档次法}2}$)、总载药量 ($W_{\text{拉开档次法}3}$)]。

2.4.4 AHP-复相关系数法-拉开档次法组合权重的

确定 由 AHP 得到主观权重 W_{AHPj} , 由复相关系数法、拉开档次法得到客观权重分别为 $W_{\text{复相关系数法}j}$ 、 $W_{\text{拉开档次法}j}$, 则组合权重 W_j 按照下列公式计算^[14]。

$$W_j = W_{AHPj} W_{\text{复相关系数法}j} W_{\text{拉开档次法}j} / \sum (W_{AHPj} W_{\text{复相关系数法}j} W_{\text{拉开档次法}j})$$

RGD-Cur/Bai-Lip 制备工艺的各评价指标的权重值见表 2。

表 2 RGD-Cur/Bai-Lip 制备工艺评价指标的权重值

Table 2 Weight values of evaluation indexes of RGD-Cur/Bai-Lip preparation process

评价指标	W_{AHP1}	$W_{\text{复相关系数法}2}$	$W_{\text{拉开档次法}3}$	W_j
y_1	0.480 6	0.292 7	0.430 6	0.533 4
y_2	0.405 4	0.347 7	0.296 6	0.368 1
y_3	0.114 0	0.359 6	0.272 8	0.098 5

2.5 Plackett-Burman 设计 (PBD) 筛选因素

PBD 是一种在实验影响因素较多时, 可以用较少的实验次数快速准确的找到显著影响因素, 减小工作量的实验设计方法^[15]。通过文献查阅和预实验结果的综合分析可知, 影响 RGD-Cur/Bai-Lip 包封率和载药量的主要因素主要包括: 胆脂比 (x_1)、导脂比 (x_2)、总投药量 (x_3)、油水比 (x_4)、水合温度 (x_5)、超声时间 (x_6)、磷酸盐缓冲液的 pH 值 (x_7)。

采用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件进行 PBD 设计, 对上述主要影响因素进行考察, 每个因素取最低 (−1) 和最高 (+1) 2 个水平, 并以 y_1 、 y_2 、 y_3 3 个指标的综合评分 (Y) 为总评价指标, 运用层次分析软件 YAAHP V12.4.7361 和 Eva Gear Version 2.1.7486 软件对 3 个分指标进行组合赋权。PBD 设计因素与水平见表 3, 实验结果见表 4。

采用 Design-Expert.V 8.0.6.1 软件进行数据处理和分析, 得到其回归模型 $Y = 85.07 + 4.30 x_1 - 0.39 x_2 - 1.90 x_3 - 1.15 x_4 + 2.73 x_5 + 5.55 x_6 + 0.96 x_7$, 通过对实验数据进行多元回归分析, 结果见表 5, 回

表 3 PBD 因素与水平

Table 3 Factors and levels of Plackett-Burman design

因素	低水平 (−1)	高水平 (+1)
x_1	1 : 10	1 : 14
x_2	1 : 18	1 : 36
x_3/mg	4	6
x_4	10	20
$x_5/^{\circ}\text{C}$	55	65
x_6/min	5	15
x_7	6.4	7.2

表 4 PBD 实验考察结果

Table 4 Results of Plackett-Burman design

序号	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	$y_1/\%$	$y_2/\%$	$y_3/\%$	$Y/\%$
1	1:14	1:18	6	20	55	15	7.2	95.19	82.68	2.59	90.92
2	1:10	1:36	6	20	55	5	6.4	46.68	77.88	3.71	65.54
3	1:14	1:36	4	10	55	15	6.4	98.79	89.21	2.64	95.61
4	1:14	1:18	4	10	65	5	7.2	89.73	79.75	2.61	86.84
5	1:14	1:18	6	20	65	5	6.4	80.31	76.22	4.03	83.81
6	1:10	1:18	4	10	55	5	6.4	75.22	72.30	2.65	76.12
7	1:10	1:18	4	20	55	15	7.2	91.40	75.03	1.73	83.70
8	1:10	1:36	4	20	65	5	7.2	87.67	80.08	1.3	82.66
9	1:14	1:36	4	20	65	15	6.4	97.65	90.97	3.12	96.87
10	1:10	1:18	6	10	65	15	6.4	77.94	90.96	3.3	86.67
11	1:10	1:36	6	10	65	15	7.2	87.97	91.69	2.29	89.91
12	1:14	1:36	6	10	55	5	7.2	78.95	80.13	3.00	82.13

归模型 P 值为 $0.0189 < 0.05$, F 值为 10.61, 说明差异有统计学意义。 $r=0.9489$, 说明模型合理, 拟合良好。

由图 4 可知, x_1 、 x_5 、 x_6 具有显著性差异 ($P <$

表 5 PBD 方差分析结果

Table 5 Results of PBD variance analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
x_1	7	221.71	221.71	21.87	0.009 5
x_2	1	1.81	1.81	0.18	0.694 4
x_3	1	43.40	43.40	4.28	0.107 3
x_4	1	15.82	15.82	1.56	0.279 6
x_5	1	89.33	89.33	8.81	0.041 2
x_6	1	369.41	369.41	36.45	0.003 8
x_7	1	11.10	11.10	1.09	0.354 4

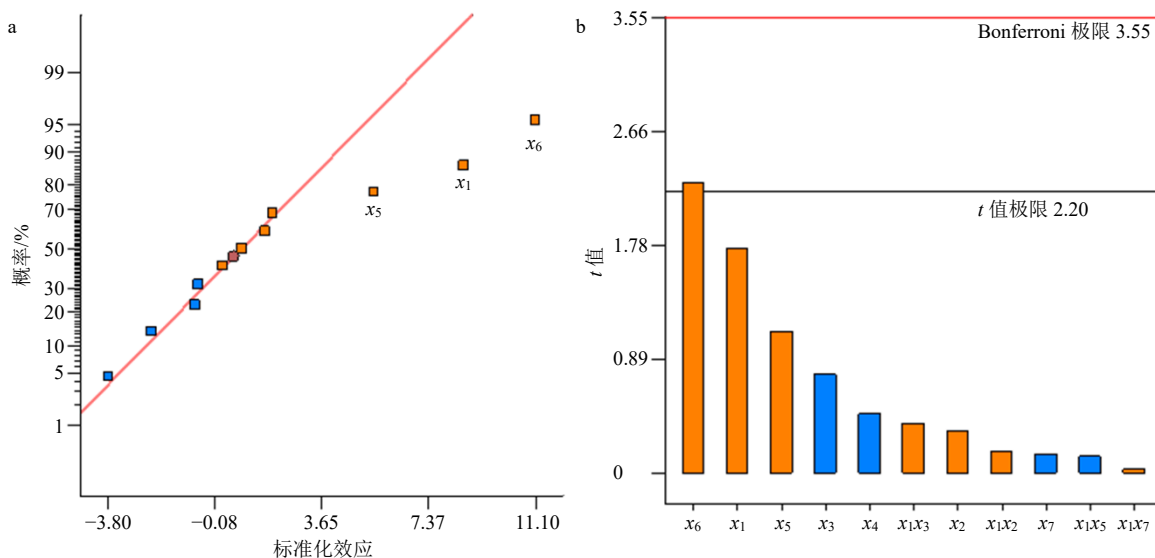


图 4 标准化效应的正态图 (a) 和 Pareto 图 (b)

Fig. 4 Normal plot (a) and Pareto plot (b) of standardization effect

0.01), x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_7 则无显著性影响 ($P > 0.05$), 显著性排列顺序为 $x_6 > x_1 > x_5 > x_3 > x_4 > x_7 > x_2$ 。其中超声时间是最大的影响因素, 超声时间太短, 达不到降低脂质体粒径和层数的效果, 而探头超声时间太长, 则可能破坏脂质体结构, 使脂质体中的药物泄漏, 出现包封率和载药量下降的现象。胆固醇是脂质体中的稳定剂, 当胆脂比较小时, 会使脂质体的稳定性下降, 出现沉淀现象, 而包封率和载药量也会随之降低。水合温度也是一个重要影响因素, 当水合温度过高时, 由于磷脂材料的热不稳定性, 会影响脂质体的包封率和载药量, 但水合温度过低则又达不到相变温度, 难以形成脂质体。

2.6 Box-Behnken 设计优化实验

Box-Behnken 响应面设计 (BBD) 是一种寻找多因素系统中最优条件的数理统计方法, 是指通过一定数量的实验次数对各个影响因素及其相互作用进行分析, 最终得到直观三维曲面模型以进行实验优化^[16-17]。通过 PBD 实验结果, 最终确定超声时间 (x_6)、胆脂比 (x_1)、水浴温度 (x_5) 作为 Box-Behnken 响应面设计的 3 个主要影响因素, 每个因素取低 (-1)、中 (0)、高水平 (+1), 实验设计因素与水平见表 6, 以 y_1 、 y_2 和 y_3 的综合评分为响应值 Y , 运用 AHP 法-复相关系数法-拉开档次法对 3 个分指标进行组合赋权。实验结果见表 7。

表 6 BBD 因素与水平

Table 6 Factors and levels of Box-Behnken design			
因素	低水平 (−1)	中水平 (0)	高水平 (+1)
x_1	1 : 10	1 : 12	1 : 14
$x_5/^\circ\text{C}$	55	60	65
x_6/min	5	10	15

表 7 BBD 实验考察结果

Table 7 Results of Box-Behnken design							
序号	x_1	$x_5/^\circ\text{C}$	x_6/min	$y_1/\%$	$y_2/\%$	$y_3/\%$	$Y/\%$
1	60	60	15	81.77	74.75	2.36	85.62
2	72	60	10	92.79	80.93	2.52	94.89
3	84	65	10	95.03	66.68	1.81	87.37
4	72	60	10	95.29	75.59	2.50	93.81
5	72	65	15	85.92	78.05	2.19	88.76
6	72	60	10	90.94	79.38	2.54	93.27
7	72	60	10	91.37	81.27	2.25	93.36
8	84	55	10	75.97	70.56	2.45	80.91
9	60	65	10	73.67	72.38	1.94	78.74
10	84	60	5	82.68	75.39	2.49	86.84
11	60	60	5	64.01	78.35	1.96	76.21
12	84	60	15	88.18	72.93	1.02	88.93
13	72	65	5	77.95	73.09	2.01	81.62
14	72	60	10	92.51	79.92	2.35	93.72
15	60	55	10	65.36	60.25	2.09	69.35
16	72	55	5	72.97	62.45	2.90	77.21
17	72	55	15	83.40	68.36	1.94	82.24

通过 Design-Expert.V8.0.6.1 软件进行多元线性回归和二次多项式回归,并以拟合优度 (R^2) 和置信度 (P) 作为模型判定标准,结果见表 8。通过模型拟合得到的二次多项式回归方程为 $Y=93.81+4.27x_1+3.35x_5+2.96x_6-0.73x_1x_5-1.83x_1x_6+0.53x_5x_6-6.39x_1^2-8.33x_5^2-3.02x_6^2$ 。由方差分析结果可知,回归模型 P 值 <0.0001 ,失拟度检验 F 值为 6.36, P 值为 $0.0529 > 0.05$,表明其失拟项水平不显著,模型拟合较好;回归方程的决定系数 $R^2=0.9751 > 0.95$,说明方程拟合程度良好,可以解释在 97.51% 范围内响应值的变异;信噪比值为 $25.634 > 4$,表明模型合理,可用于进行实验分析。

根据模型拟合结果,将其中一个因素固定,进行综合评分 Y 对其他两个因素的拟合,以 Y 为评价指标对交互因素的等高线与 3D 效应曲面图见图 5。优化后最终确定的处方结果为胆脂比 1 : 12,水

表 8 BBD 方差分析结果

Table 8 Results of Box-Behnken design variance analysis					
方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	873.29	97.03	70.51	<0.0001
x_1	1	145.61	145.61	105.8	<0.0001
x_5	1	89.65	89.65	65.14	<0.0001
x_6	1	70.03	70.03	50.89	0.0002
x_1x_5	1	2.15	2.15	1.56	0.2519
x_1x_6	1	13.40	13.40	9.73	0.0168
x_5x_6	1	1.11	1.11	0.81	0.3984
x_1^2	1	171.79	171.79	124.83	<0.0001
x_5^2	1	292.16	292.16	212.30	<0.0001
x_6^2	1	38.47	38.47	27.95	0.0011
残差	7	9.63	1.38		
失拟项	3	7.96	2.65		
净误差	4	1.67	0.42	6.36	0.0529
总离差	16	882.92			

合温度为 60°C , 超声时间为 10 min。

2.7 验证性实验

对响应面实验得到的最优工艺处方进行验证性实验,即在胆脂比 1 : 12,水合温度 60°C ,超声时间 10 min 的工艺条件下进行验证,结果发现实际值与预测值较为接近,相对偏差较小,预测性良好,说明 RGD-Cur/Bai-Lip 的制备工艺稳定可靠,具体见表 9。

2.8 RGD-Cur/Bai-Lip 的表征

2.8.1 脂质体的形态观察 由图 6 可见,制备的 RGD-Cur/Bai-Lip 外观呈亮黄色,澄清透明,无沉淀,对光透视可见淡蓝色乳光,稳定性较好。置于透射电镜下观察, RGD-Cur/Bai-Lip 形态圆整,呈类球形,分散均匀。

2.8.2 粒径分布与 Zeta 电位 根据实验优化的最优工艺条件制备 RGD-Cur/Bai-Lip,采用激光粒度分析仪测定其粒径及 Zeta 电位,结果见图 7。RGD-Cur/Bai-Lip 的平均粒径为 $(101.10 \pm 0.62)\text{nm}$,分散系数 (PDI) 为 0.1910 ± 0.0143 , Zeta 电位为 $(1.59 \pm 0.07)\text{mV}$,说明 RGD-Cur/Bai-Lip 粒径分布较均匀,分散性好,不易发生絮凝。

2.8.3 稳定性考察 常温放置 RGD-Cur/Bai-Lip,并对其粒径、Zeta 电位以及包封率连续 7 d 进行测定,考察其稳定性。如表 10 所示,粒径、电位和包封率均变化不大,第 7 天测定的平均粒径为 $(117.30 \pm 0.56)\text{nm}$, Zeta 电位为 $(0.95 \pm 0.96)\text{mV}$,姜黄素

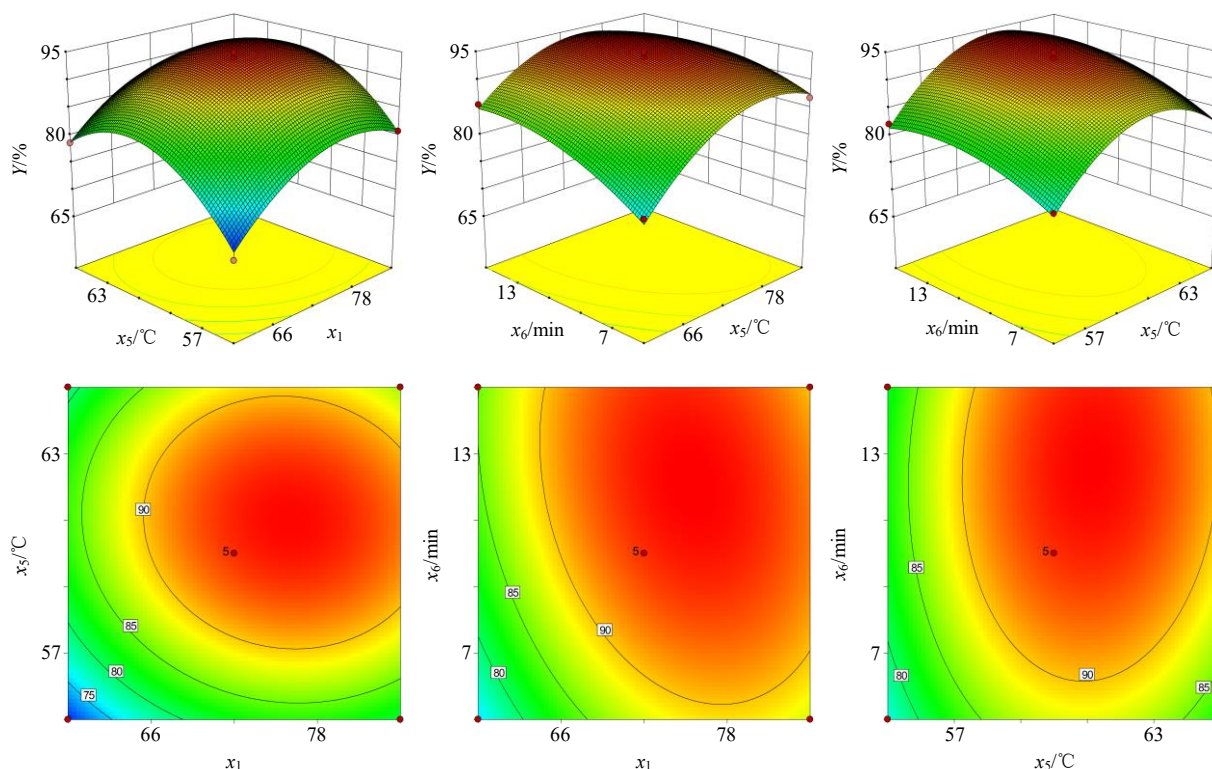


图 5 各因素间交互作用的 3D 效应曲面图及等高线图

Fig. 5 Contour map and 3D effect surface map of interaction among various factors

表 9 验证性实验结果

Table 9 Confirmatory experimental results

实验 次数	y ₁ /%	y ₂ /%	y ₃ /%	Y/%		相对偏 差/%
				实际值	预测值	
1	97.50	75.97	2.36	94.71	92	1.14
2	89.12	76.35	2.25	89.94		
3	96.21	78.48	2.19	94.54		

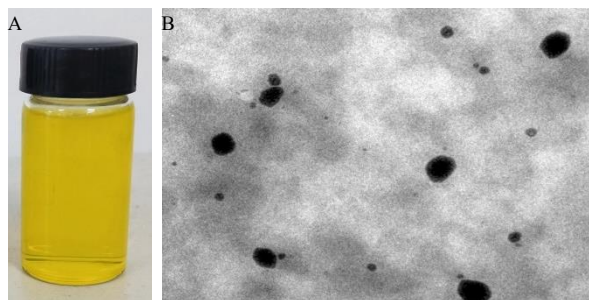


图 6 RGD-Cur/Bai-Lip 的外观形态 (A) 和显微形态 (B)
Fig. 6 Appearance (A) and micromorphology (B) of RGD-Cur/Bai-Lip

包封率为 93.37%，黄芩苷包封率为 75.63%，表明 RGD-Cur/Bai-Lip 在 7 d 内稳定性较好。

2.8.4 体外释放度考察 基于文献查阅和前期预实验摸索，最终选择以含有 30%乙醇的 PBS 溶液^[18]

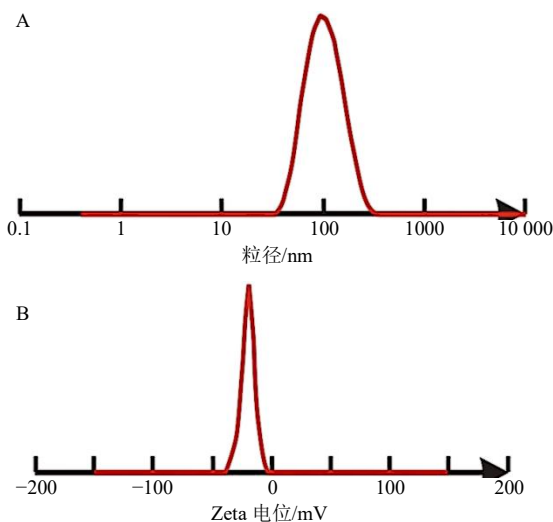


图 7 RGD-Cur/Bai-Lip 的粒径 (A) 及 Zeta 电位 (B) 分布
Fig. 7 Particle size (A) and Zeta potential (B) distribution of RGD-Cur/Bai-Lip

作为释放介质，对 RGD-Cur/Bai-Lip 进行体外释放度研究，分别精密吸取 3 mL 的 RGD-Cur/Bai-Lip 溶液、姜黄素原料药混悬液、黄芩苷原料药混悬液装入透析袋，在释放介质中于 37 °C 水浴，150 r/min 动态透析，分别在 0.5、2、4、6、8、10、12、24 h 吸取 2 mL，然后分别补入同等体积的释放介质，分

表 10 稳定性测定结果 ($n=3$)
Table 10 Stability test results ($n=3$)

存放时间/d	平均粒径/nm	电位/mV	包封率/%	
			姜黄素	黄芩苷
1	91.95	0.77	95.64	78.96
2	90.69	0.35	95.21	78.87
3	101.10	0.50	95.17	77.96
4	95.01	1.36	94.93	77.43
5	113.57	1.05	94.79	76.91
6	107.07	1.59	94.92	75.72
7	117.57	0.95	93.37	75.63

别测定样品中的姜黄素和黄芩苷的含量, 根据下列公式^[19]计算脂质体的累积释放度并绘制释放曲线, 结果见图 8。

$$Q = (V_{\text{补}} \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_{\text{总}} C_n) / M$$

Q 指累积释放度, $V_{\text{补}}$ 指释放介质的补入体积, C_i 指第 i 次取样时释放的药物浓度, $V_{\text{总}}$ 指释放介质的总体积, C_n 指第 n 次取样时的药物浓度, M 指脂质体样品中的药物含量

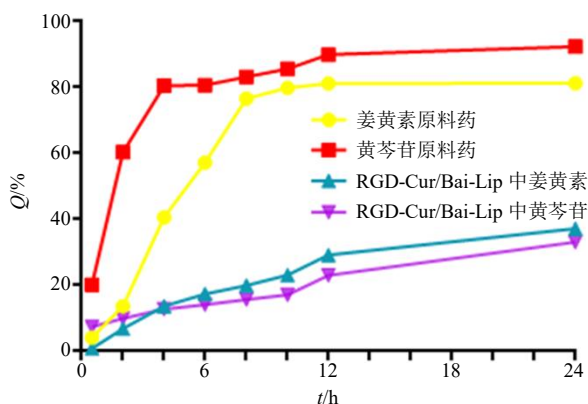


图 8 姜黄素原料药、黄芩苷原料药及 RGD-Cur/Bai-Lip 的体外释放曲线

Fig. 8 *In vitro* release profile of curcumin suspension, baicalin suspension and RGD-Cur/Bai-Lip

结果表明, 姜黄素原料药混悬液、黄芩苷原料药混悬液在 12 h 时 Q_n 均达到了 80% 以上, 而 RGD-Cur-Lip 和 RGD-Bai-Lip 的 Q_n 仅为 29% 和 23% 左右, 在 24 h 时, Q_n 达到了 37% 和 33% 左右。通过 Origin 2019b 软件, 分别应用零级方程、一级方程、Higuchi 方程对 RGD-Cur/Bai-Lip 进行曲线拟合, 拟合结果见表 11。根据拟合相关系数 R^2 可知, RGD-Cur/Bai-Lip 均符合 Higuchi 方程, 表明 RGD-Cur/Bai-Lip 具有良好的缓释作用。

2.8.5 溶血性考察 根据《中国药典》2020 年版规

表 11 RGD-Cur/Bai-Lip 中姜黄素和黄芩苷的体外释放拟合结果

成分	拟合模型	拟合结果	R^2
姜黄素	零级方程	$Q_n = 1.4838k + 6.1947$	0.8720
	一级方程	$Q_n = 42.8398(1 - e^{-0.0853t})$	0.9885
	Higuchi 方程	$Q_n = 8.9540x^{1/2} - 4.8911$	0.9823
黄芩苷	零级方程	$Q_n = 1.0821k + 7.6475$	0.9762
	一级方程	$Q_n = 37.6016(1 - e^{-0.0784t})$	0.8007
	Higuchi 方程	$Q_n = 6.0679x^{1/2} + 0.7714$	0.9249

定对 RGD-Cur/Bai-Lip 的溶血性进行评估。取 EP 管 27 只, 分为 3 组, 分别为空白 Lip 组、Cur/Bai-Lip 组、RGD-Cur/Bai-Lip 组, 每组 9 只, 对其进行编号 (各组中 1~6 号管为供试品管, 7 号管为阴性对照管, 8 号管为阳性对照管, 9 号管为供试品对照管)。按表 12 所示依次加入 2% 红细胞混悬液、生理盐水、去离子水, 混匀后, 立即置于 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温箱中进行温浴。3 h 后观察溶血和凝聚反应, 结果见图 9。结果可见所有组别均无溶血现象, 表明 RGD-Cur/Bai-Lip 无溶血性, 可以用于后续动物实验的静脉给药。

表 12 溶血实验设计方案

Table 12 Design scheme of hemolysis experiment

序号	样品/mL	2% 红细胞混悬液/mL	0.9% NaCl 溶液/mL	去离子水/mL
1	0.2	2.5	2.3	0
2	0.3	2.5	0.3	0
3	0.4	2.5	0.4	0
4	0.5	2.5	0.5	0
5	0.6	2.5	0.6	0
6	0.7	2.5	0.7	0
7	0	2.5	0	0
8	0	2.5	0	2.5
9	0.7	0	4.3	0

3 讨论

本实验通过 Plackett-Burman 筛选实验设计结合 Box-Behnken 响应面实验对方进行了优化, 确定的最优工艺条件为胆脂比 1:12, 水合温度 60°C , 探头超声时间为 10 min。工艺优化后得到的 RGD-Cur/Bai-Lip 包封率较高, 平均粒径在 110 nm 以下, 粒径分布均匀, 满足肝靶向脂质体预期的粒径要求。此外, 通过溶血性实验和体外释放度考察,

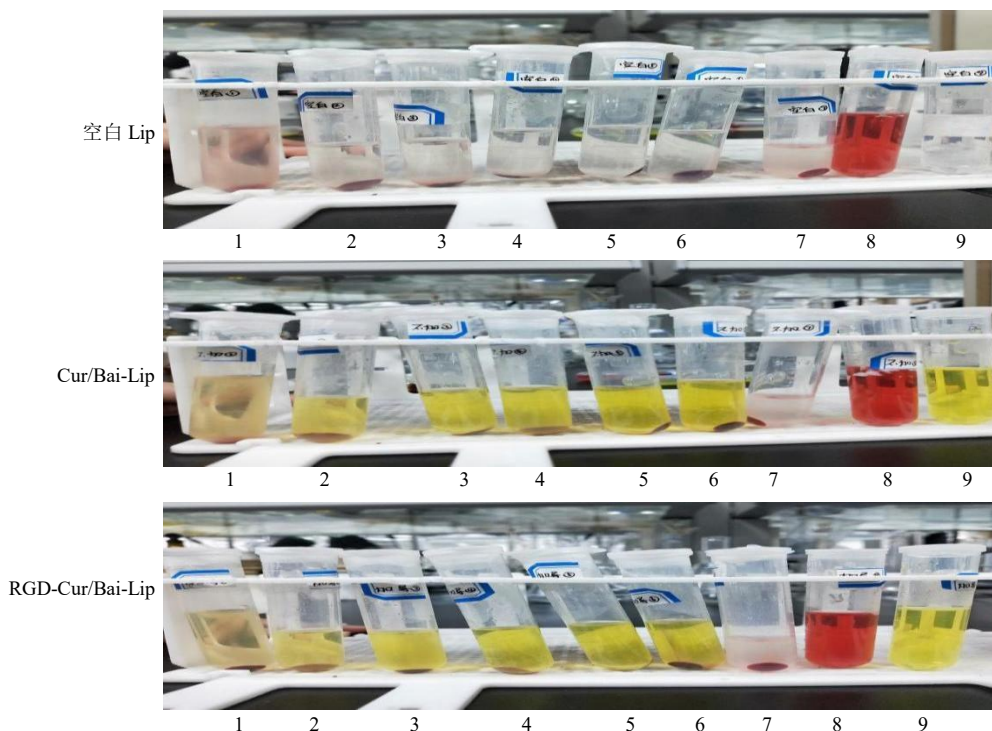


图 9 溶血性评估图

Fig. 9 Picture of hemolytic assessment

发现 RGD-Cur/Bai-Lip 无溶血反应，并具有良好的缓释作用。

RGD-Cur/Bai-Lip 的 Zeta 电位较小，代表其静电斥力不足以将粒子与粒子排斥开来，理论上易发生聚集，但稳定性实验却发现 RGD-Cur/Bai-Lip 在 7 d 内粒径、电位及包封率均无较大变化，原因可能在于 RGD 环肽表面修饰了含有亲水的 DSPE-PEG 链，其亲水性与空间效应减少了粒子之间的聚集或吸附现象，可以增强其稳定性。此外，存在 RGD-Cur/Bai-Lip 包封率较高，但总载药量较低的现象。有研究表明^[20]，当投药量达到脂质体辅料负载能力的上限时，随着投药量的增加，载药量反而会下降。由于制备脂质体的主要辅料大多都是磷脂和胆固醇等天然成分，对药物的负载能力有限，因此脂质体等纳米制剂大多存在载药量不高的问题。将在后续实验中对提高载药量作进一步的研究。

将姜黄素或黄芩苷包载于脂质体中用于治疗肝纤维化的研究已有报道，但肝纤维化病因及机制复杂，多条途径和通路都可引起肝纤维化，姜黄素和黄芩苷可通过不同的途径和通路抑制肝纤维化：姜黄素抑制 HSC 活化、增殖以抗肝纤维化；黄芩苷通过抗氧化应激作用来逆转肝纤维化。通过构建姜黄素/黄芩苷共递送纳米脂质体，使两药合用，通过多

途径抑制肝纤维化，发挥协同作用，疗效更佳。HSC 的激活和增生是肝纤维化发生发展过程中的关键环节，抑制 HSC 的活化可有效抗肝纤维化。RGD 环肽能够特异性地与 HSC 表面的整合素结合，阻止细胞的增殖分化。用 RGD 环肽对姜黄素/黄芩苷共递送纳米脂质体进行修饰，构建靶向于 HSC 的 RGD-Cur/Bai-Lip 载药系统，可以最大限度地姜黄素和黄芩苷运送至 HSC，实现精准靶向给药，更好地发挥其协同抗肝纤维化作用。但其对 HSC 的靶向作用还需通过体内外研究得到进一步的证实。本实验主要研究了 RGD-Cur/Bai-Lip 的制备工艺及表征，为其后续抗肝纤维化体内外药效学评价和靶向性研究提供了制剂基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rockey D C, Bell P D, Hill J A. Fibrosis: A common pathway to organ injury and failure [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(12): 1138-1149.
- [2] 周新刚, 刘红刚. Hedgehog 信号通路在肝脏疾病中的研究进展 [J]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2017, 9(3): 30-35.
- [3] 连娜琦. 姜黄素抑制肝星状细胞 Hedgehog 信号通路抗肝纤维化作用研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [4] 常虹, 郭凯, 孟洪宇, 等. 中药有效成分作用于肝星状

- 细胞抗肝纤维化分子机制研究进展 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(1): 148-153.
- [5] Bhavsar D, Subramanian K, Sethuraman S, *et al.* 'Nano-in-nano' hybrid liposomes increase target specificity and gene silencing efficiency in breast cancer induced SCID mice [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 119: 96-106.
- [6] 喻雪琴, 张诗婉, 陈芳, 等. 趋化因子在肝纤维化发生发展中作用的研究进展 [J]. 山东医药, 2020, 60(25): 92-95.
- [7] Li L J, Wang H Y, Ong Z Y, *et al.* Polymer- and lipid-based nanoparticle therapeutics for the treatment of liver diseases [J]. *Nano Today*, 2010, 5(4): 296-312.
- [8] 杨建宏. RGD 修饰的氧化苦参碱聚合物泡囊抗肝纤维化作用的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [9] 柯学, 王长江, 严菲. 滤膜法测定多西紫杉醇脂质体的包封率 [J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(4): 314-316.
- [10] 董博宇. β -榄香烯-姜黄素复方脂质体的制备与联用多西他赛抗肺癌作用的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [11] 刘淑兰, 周艺林, 林鹏, 等. Box-behnken 响应面法优化紫红生肌软膏的醇提工艺 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(4): 528-535.
- [12] 谭馨, 邓光明. 基于 GRC-MCC 的 k -类 SVM 分类算法 [J]. 统计与决策, 2020, 36(22): 10-14.
- [13] 郭亚军, 阮泰学, 宫诚举. 基于主客观信息综合判断的非线性拉开档次法 [J]. 运筹与管理, 2017, 26(6): 149-154.
- [14] 于亚田, 王智群, 冯建安, 等. 基于 Box-Behnken 及 PCA-G1-熵权法优选青香乳康颗粒中挥发油的提取及包合工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3631-3636.
- [15] 马秉智, 李丽, 赫军, 等. Plackett-Burman 设计结合响应面法优化苦豆子效应成分的提取工艺 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(12): 953-959.
- [16] 张小雯, 孙敬蒙, 汪卓明, 等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 响应面法优化马来酸桂哌齐特脂质体的制备及表征 [J]. 医药导报, 2021, 40(2): 240-247.
- [17] 宁双成, 周莉莉, 王敏, 等. 星点设计-效应面法优化斑蝥素纳米结构脂质载体处方工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4114-4122.
- [18] Li R, Deng L, Cai Z, *et al.* Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 80: 156-164.
- [19] 冯宇飞, 常书源, 秦国昭, 等. 星点设计-效应面法优化 pH 值响应及线粒体靶向双功能金丝桃苷脂质体的处方及其体外评价 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 5934-5942.
- [20] 任婧, 张丹参, 侯文书, 等. 姜黄素长循环脂质体的制备及表征 [J]. 河北科技大学学报, 2018, 39(6): 532-539.

[责任编辑 郑礼胜]