

## $\beta$ -细辛醚脂质立方液晶纳米粒的 Bottom-up 法制备工艺优化及处方筛选

李绍林, 段 启\*, 赵珍东, 沈小钟, 夏 黎, 潘颖珊

广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

**摘要:** 目的 以 $\beta$ -细辛醚为模型药物, 制备 $\beta$ -细辛醚脂质立方液晶纳米粒( $\beta$ -asarone lipid cubic liquid crystal nanoparticles,  $\beta$ -A@LCNPs)载药系统。方法 采用 Bottom-up 法, 以 $\beta$ -A@LCNPs 的包封率、载药量、稳定性常数的归一化综合评分为质量考察指标, 分别通过单因素考察立方液晶制备工艺, 优化工艺参数, 并通过星点设计响应面法, 优选 $\beta$ -A@LCNPs 最佳处方。结果 优选的 $\beta$ -A@LCNPs 制备工艺参数为 60 °C 条件下, 配置 $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液, 而后 1000 r/min 匀速搅拌 1.5 h, 最后置于细胞超声仪, 200 W 超声 15 次, 每次 5 s, 间隔 10 s; 优选的 $\beta$ -A@LCNPs 处方为单油酸甘油酯 300 mg、 $\beta$ -细辛醚 20 mg、聚乙烯醇 27000 25 mg、水 40 mL。结论  $\beta$ -A@LCNPs 制备工艺简单易行, 重复性好; 所得 $\beta$ -A@LCNPs 立方结构形态完整, 均一稳定。

**关键词:**  $\beta$ -细辛醚; 脂质立方液晶; 响应面法; 纳米粒; Bottom-up 法; 包封率; 载药量; 稳定性常数

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2021)24 - 7464 - 09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.008

## Bottom-up preparation process optimization and prescription screening for $\beta$ -asarone lipid cubic liquid crystal nanoparticles

LI Shao-lin, DUAN Qi, ZHAO Zhen-dong, SHEN Xiao-zhong, XIA Li, PAN Ying-shan

Guang Dong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

**Abstract: Objective** To prepare  $\beta$ -asarone lipid cubic liquid crystal nanoparticles ( $\beta$ -A@LCNPs) drug delivery system with  $\beta$ -asarone as model drug. **Methods** The quality of  $\beta$ -A@LCNPs was evaluated by the normalized comprehensive score of encapsulation rate, drug loading capacity and stability constant. The preparation process of cubic liquid crystal was investigated by single factor, and the process parameters were optimized. The optimal formulation of  $\beta$ -A@LCNPs was optimized by response surface method of centroid design. **Results** The optimal preparation process parameters of  $\beta$ -A@LCNPs were as follows: Bottom-up method, 60 °C,  $\beta$ -A@LCNPs suspension was prepared, then 1000 r/min uniform stirring for 1.5 h, finally placed in the cell ultrasound instrument, 200 watt ultrasonic power, ultrasonic 15 times, 5 s each time, 10 s interval; The optimal prescription for  $\beta$ -A@LCNPs was glycerin monooleate 300 mg,  $\beta$ -asarone 20 mg, polyvinyl alcohol 27000 25 mg and water 40 mL. **Conclusion** The preparation process of  $\beta$ -A@LCNPs is simple, easy to perform and has good repeatability. The  $\beta$ -A@LCNPs were homogeneous and stable.

**Key words:**  $\beta$ -asarone; lipid cubic liquid crystal; response surface method; nanoparticles; Bottom-up method; encapsulation rate; drug loading capacity; stability constant

立方液晶纳米粒 (cubic liquid crystalline nanoparticles, LCNPs), 又称脂质立方液晶纳米粒或纳米立方体, 是两亲性脂质和表面活性剂在水中自发形成的双连续的立方液晶纳米分散体系, 即脂质和表面活性剂结合水形成立方液晶相<sup>[1-2]</sup>, 再以类

似固体纳米粒的形式分散在过量的水中形成分散体系, 是一种新型纳米载药系统, 其中水溶性药物可以包封在类脂立方液晶的水道中, 脂溶性的药物包封在脂质双分子层中, 两亲性分子可贯穿其中<sup>[3-4]</sup>。立方液晶介于层状液晶、六角液晶之间的一种相态,

收稿日期: 2021-07-31

基金项目: 广东省教育厅自然科学基金项目 (2017GKQNCX037); 广州市科技计划项目 (202102080588); 广东省医学基金项目 (B2021236); 广东省中医药局项目 (20211280)

作者简介: 李绍林 (1983—), 男, 博士, 主要从事中药新药与新技术研究。Tel: (020)28854910 E-mail: lisl@gdyzy.edu.cn

\*通信作者: 段 启 (1969—), 男, 教授, 主要从事中药制剂与炮制研究。Tel: (020)28854910 E-mail: duanq@gdyzy.edu.cn

具有更好的热力学稳定性、生物黏附性、生物可降解性、多样性包载药物能力等特点<sup>[5]</sup>，作为新型纳米载药系统在化学药、生物药、中药领域都有广泛应用研究，已成为国内外制剂研究的热点之一<sup>[6-8]</sup>。

LCNPs制备方法有Top-down法、Bottom-up法、热处理法、注入法、喷雾干燥法等。上述方法中，Bottom-up法是目前制备LCNPs常用的方法<sup>[9]</sup>。Bottom-up法是将脂质材料和稳定剂溶于有机溶剂中得到有机相，然后将有机相缓慢滴加到过量水中，在搅拌、超声等外界机械力分散作用下即可形成纳米级粒子<sup>[10]</sup>。Bottom-up法更容易在较小能量输出条件下产生粒子均匀、粒径较小的LCNPs。Bottom-up法制备纳米粒过程中因稳定剂加入，纳米粒分散体有较好的稳定性<sup>[11-12]</sup>。

$\beta$ -细辛醚为天南星科菖蒲属植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 有效成分，药理研究表明  $\beta$ -细辛醚药理作用广泛，具有保护神经系统、保护心血管、抗哮喘、抗肿瘤、驱虫等功效，具有极大的临床运用价值<sup>[13-14]</sup>，但  $\beta$ -细辛醚水溶性差，不稳定，且体内吸收、代谢速度极快，药物浓度起伏大，难以维持足够长的有效血药浓度，生物利用度低，制约了药物的临床应用<sup>[15]</sup>。采用新剂型改进药物，是解决药物存在问题的有效方法。本实验选取  $\beta$ -细辛醚为模型药物，采用 Bottom-up 法优化  $\beta$ -细辛醚脂质立方液晶纳米粒 ( $\beta$ -asarone lipid cubic liquid crystal nanoparticles,  $\beta$ -A@LCNPs) 的制备工艺，并通过星点设计响应面法筛选  $\beta$ -A@LCNPs 处方。

## 1 仪器与试药

丹东百特 BT-90 纳米激光粒度仪，丹东百特仪器有限公司；Agilent 1200 型高效液相色谱仪，包括四元泵洗脱系统、自动进样器、在线脱气装置、柱温箱及光电二极管矩阵检测器，美国 Agilent 公司；VORTEX 4 涡旋振荡器，上海达姆实业有限公司；DDS-307A 电导率仪，上海仪电科学仪器公司；G220 透射电子显微镜 (TEM)，荷兰 FEI 公司；TG16.5 离心机，上海卢湘仪离心机公司；KQ-50TDB 高频数控超声仪，昆山超声仪器公司；TK-12B 型透皮扩散仪，上海凯锶科贸有限公司。

$\beta$ -细辛醚对照品，广东食品药品职业学院自制，HPLC 峰面积归一化法测得质量分数为 99.21%；石菖蒲，批号 201909160810，购自广州致信药业有限公司，经广东食品药品职业学院梁永枢副主任中药师鉴定为天南星科菖蒲属植物石菖蒲 *A. tatarinowii*

Schott 的干燥根茎；聚氧乙烯蓖麻油 (cremephor EL, CEL)、泊洛沙姆 407 (polyethylene-polypropylene glycol, F127)、单油酸甘油酯 (glyceryl monoolein, GMO)，德国 BASF 公司；聚乙烯醇 15000 (polyvinyl alcohol, PVA150)、聚乙烯醇 27000 (PVA)、烷基酚聚氧乙烯醚 (OP10 乳化剂)，上海麦克林生化科技有限公司；液相用甲醇、乙腈、乙醇为色谱纯；聚乙二醇 200 (PEG200)、PEG400、异丙醇、丙二醇、丙三醇、去氧胆酸钠、无水乙醇均为分析纯，购于广州化学试剂厂；水为双蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 $\beta$ -A@LCNPs 的制备

采用 Bottom-up 法制备  $\beta$ -A@LCNPs，精密称取适量 GMO 于 50 mL 烧杯中，取处方量  $\beta$ -细辛醚滴加无水乙醇至完全溶解，倒入上述烧杯中混匀，水浴至 60 °C，作为 A 相；精密称取适量 PVA 于 100 mL 烧杯中，加入适量蒸馏水，水浴至 60 °C，使 PVA 完全溶解，作为 B 相；将 A 相缓慢倒入 B 相中，60 °C 恒温条件下，以 800 r/min 磁粒搅拌 1.5 h，再于细胞超声破碎仪上超声 5 min (超声功率为 150 W，5 s/次，每次间隔 5 s)，即得  $\beta$ -A@LCNPs。

### 2.2 $\beta$ -细辛醚的含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)；流动相为甲醇-水 (65 : 35)；柱温 30 °C；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 253 nm；进样量 10  $\mu$ L；理论塔板数以  $\beta$ -细辛醚计不少于 3400。色谱图见图 1。

**2.2.2 对照品溶液制备** 精密称取  $\beta$ -细辛醚对照品适量，至棕色量瓶中，加甲醇定容，制成  $\beta$ -细辛醚浓度为 32.27  $\mu$ g/mL 的溶液，过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜，取续滤液，即得。

**2.2.3 供试品溶液制备** 精密吸取  $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液样品 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇定容，

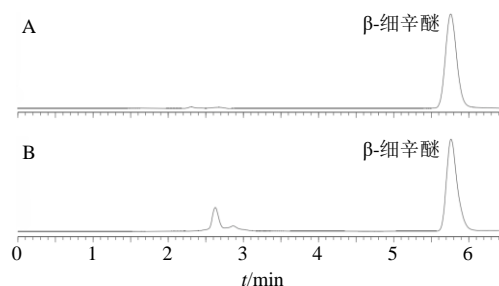


图 1  $\beta$ -细辛醚对照品 (A)、 $\beta$ -A@LCNPs 样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of  $\beta$ -asarone (A) and  $\beta$ -A@LCNPs sample (B)

过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.2.4 线性关系考察** 精密吸取  $\beta$ -细辛醚对照品溶液 1、2、4、6、8 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度摇匀, 备用。精密吸取上述对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 进样, 记录色谱图, 测定峰面积, 以峰面积 ( $Y$ ) 对进样量 ( $X$ ) 进行线性回归, 得回归方程  $Y=72\ 859.93 X-560.6$ ,  $r=0.999\ 99$ , 结果表明  $\beta$ -细辛醚在 32.27~258.16 ng, 峰面积与进样量呈良好线性关系。

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取上述对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 按“2.2.1”项色谱条件, 重复进样 6 次。结果  $\beta$ -细辛醚峰面积的 RSD 为 0.15%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 分别于制备后 0、0.5、1.0、3.0、6.0、12.0 h 精密吸取 10  $\mu\text{L}$  供试品溶液进样测定, 结果  $\beta$ -细辛醚峰面积的 RSD 为 1.23%, 表明供试品溶液在 12 h 内测定稳定性良好。

**2.2.7 重复性试验** 分别取 6 份  $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液样品, 照“2.2.3”项方法制得 6 份供试品溶液, 照“2.2.1”项色谱条件分别进样 10  $\mu\text{L}$  进行测定, 结果  $\beta$ -细辛醚质量分数的 RSD 为 0.93%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密量取 1 mL 已测定  $\beta$ -细辛醚含量的  $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液至 10 mL 棕色量瓶中, 共 6 份, 分别加入 2 mL 已知质量浓度的对照品溶液, 照“2.2.3”项方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件测定  $\beta$ -细辛醚含量, 计算回收率, 结果  $\beta$ -细辛醚的平均加样回收率为 99.81%, RSD 为 0.75%, 表明本方法  $\beta$ -细辛醚具有较好的加样回收率。

**2.2.9 样品定量测定** 按“2.2.3”项方法制备供试品进样液, 依照“2.2.1”项色谱条件进样, 测定  $\beta$ -细辛醚峰面积, 代入线性方程, 计算出样品中  $\beta$ -细辛醚的含量。

## 2.3 $\beta$ -A@LCNPs 质量考察指标测定

**2.3.1  $\beta$ -A@LCNPs 包封率及载药量的测定** 称取一定量  $\beta$ -细辛醚 ( $W_{\text{td}}$ ), 按“2.1”项方法制备得  $\beta$ -A@LCNPs 溶液, 将  $\beta$ -A@LCNPs 溶液采用高速离心法, 13 485  $\times g$  离心 10 min, 分离得到上清液和  $\beta$ -A@LCNPs 沉淀。吸取上清液, 按照“2.2.1”项色谱条件检测分析上清液中游离的  $\beta$ -细辛醚含量, 测定游离  $\beta$ -细辛醚质量 ( $W_{\text{fd}}$ ); 取下层沉淀, 采用冷冻干燥法将其干燥得  $\beta$ -A@LCNPs, 并精密

称定, 得纳米粒总质量 ( $W_{\text{LCNPs}}$ )。根据公式 (1)、(2) 分别计算  $\beta$ -A@LCNPs 包封率和载药量。

$$\text{包封率}=(W_{\text{td}}-W_{\text{fd}})/W_{\text{td}} \quad (1)$$

$$\text{载药量}=(W_{\text{td}}-W_{\text{fd}})/W_{\text{LCNPs}} \quad (2)$$

**2.3.2 稳定性常数 ( $K_e$ ) 的测定** 采用离心-可见光分光光度法测定  $\beta$ -A@LCNPs 的  $K_e$ 。具体测定方法为量取  $\beta$ -A@LCNPs, 检测波长 450 nm, 采用可见光分光光度法测定其浊度为  $T_0$ ; 900  $\times g$  离心 30 min, 吸取上层液, 可见光分光光度法同波长测定离心后上层液的浊度为  $T$ , 根据公式 (3) 计算  $K_e$ 。

$$K_e=(T_0-T)/T_0 \quad (3)$$

**2.3.3 归一化总评价值 ( $D$ ) 计算<sup>[16]</sup>** 综合考量  $\beta$ -A@LCNPs 的包封率、载药量及  $K_e$  值, 作为制剂质量评价因素, 因而采用 Derringer's 法将包封率、载药量和  $K_e$  转换为  $D$  值。根据 Hassan 法分别求 Partial 期望值 ( $d_i$ ), 其中包封率及载药量值越大, 表示  $\beta$ -A@LCNPs 质量越好, 而  $K_e$  值越小, 则说明  $\beta$ -A@LCNPs 质量越好, 根据公式 (4) 分别将包封率及载药量归一化为 Partial 期望值, 记为  $d_1$ 、 $d_2$ ; 根据公式 (5) 将  $K_e$  归一化为 Partial 期望值, 记为  $d_3$ , 再根据公式 (6) 将  $d_1$ 、 $d_2$ 、 $d_3$  转化为  $D$  值。

$$d_{xi}=(x_i-L)/(U-L) \quad (4)$$

$$d_{xi}=(U-x_i)/(U-L) \quad (5)$$

$$D=(d_1d_2d_3)^{1/3} \quad (6)$$

$L$  为响应值中的最小值,  $U$  为响应值中的最大值,  $d_{xi}$  为每个因素 Partial 期望值,  $x_i$  为参数实测值

## 2.4 单因素法考察 $\beta$ -A@LCNPs 制备工艺及处方

经前期预试验, 采用 Bottom-up 法制备  $\beta$ -A@LCNPs, 以载药量、包封率及  $K_e$  的  $D$  值为  $\beta$ -A@LCNPs 质量评价指标, 保持其他条件等同, 考察单个因素变化对  $D$  值的影响, 初选工艺及处方。

**2.4.1 搅拌时间考察** 采用 Bottom-up 法制备  $\beta$ -A@LCNPs, 取  $\beta$ -细辛醚 20 mg 滴加无水乙醇至完全溶解, 加入装有 0.20 g GMO 的烧杯中, 水浴至 60  $^{\circ}\text{C}$ , 作为 A 相; 称取 20 mg PVA 加入装有 40 mL 蒸馏水中水浴至 60  $^{\circ}\text{C}$ , 使 PVA 完全溶解, 作为 B 相; 将 A 相缓慢倒入 B 相中, 重复上述操作, 平行制备 5 份样品, 备用; 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温条件下, 以 1000 r/min 匀速搅拌, 分别搅拌 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h, 考察不同搅拌时间对制备  $\beta$ -A@LCNPs  $D$  值的影响。测定各样品包封率、载药量、 $K_e$  值, 并计算  $D$  值, 结果见表 1。可知, 搅拌时间在 1.5 h 内, 随着搅拌时间增长,  $\beta$ -A@LCNPs 的  $D$  值增加, 当

表1 搅拌时间对包封率、载药量、 $K_e$ 和 $D$ 值的影响

Table 1 Effect of stirring time on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$  and  $D$  values

搅拌时间/h	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
0.5	30.26	2.68	16.21	0.36
1.0	46.23	4.03	15.34	0.47
1.5	51.32	4.46	14.31	0.51
2.0	50.62	4.40	16.54	0.50
2.5	47.53	4.14	17.73	0.48

搅拌时间超过 1.5 h,  $\beta$ -A@LCNPs 的  $D$  值反而呈下降趋势, 这可能由于搅拌时间过长, 搅拌剪切力破坏已形成纳米粒的系统结构, 致使药物溶出, 载药量及包封率下降, 因此, 选择搅拌时间 1.5 h。

**2.4.2 搅拌速率考察** 参照“2.3.1”项方法平行配置 5 份  $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液, 60 °C 恒温条件下, 分别以 500、800、1000、1200、1500 r/min 不同搅拌速度, 搅拌 1.5 h, 考察不同搅拌速度对制备  $\beta$ -A@LCNPs  $D$  值的影响。测定各样品包封率、载药量、 $K_e$  值, 并计算  $D$  值, 结果见表 2。可知, 搅拌速度在 1000 r/min 内, 随着搅拌速度增加,  $\beta$ -A@LCNPs 的  $D$  值增加, 当搅拌速度超过 1000 r/min 时,  $\beta$ -A@LCNPs 的  $D$  值反而呈下降趋势, 这可能由于搅拌速度小, 纳米粒子不容易分散开, 易沉; 而速度过快, 纳米粒子间碰撞加剧, 粒子聚集而析出,  $D$  值较小, 因此, 选择搅拌速度 1000 r/min。

表2 搅拌速率对包封率、载药量、 $K_e$ 、 $D$ 值的影响

Table 2 Effect of stirring rate on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$  and  $D$  values

搅拌速率/(r·min <sup>-1</sup> )	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
500	35.56	3.13	18.81	0.39
800	47.13	4.11	17.14	0.47
1000	52.35	4.54	15.56	0.51
1200	49.72	4.32	16.83	0.49
1500	47.63	4.15	18.13	0.48

**2.4.3 超声功率考察** 参照“2.3.1”项方法平行配置 5 份  $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液, 60 °C 恒温条件下, 1000 r/min 转速, 匀速搅拌 1.5 h, 而后分别置于细胞超声仪, 分别以 100、150、200、250、300 W 超声处理 10 次, 每次 5 s, 间隔 10 s, 测定各样品包封率、载药量、 $K_e$ , 并计算  $D$  值, 结果见表 3。可知, 超声功率对样品的  $D$  值影响较大, 当超声功率 > 200 W 时, 随着超声功率的增加, 包封率及载药量下降,

表3 超声功率对包封率、载药量、 $K_e$ 和 $D$ 值的影响

Table 3 Influence of ultrasonic power on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$ ,  $D$  values

超声功率/W	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
100	45.59	3.98	16.89	0.46
150	52.65	4.57	15.54	0.51
200	56.39	4.88	14.14	0.54
250	50.98	4.43	16.21	0.50
300	48.24	4.20	17.91	0.48

$D$  值减小, 这可能由于超声功率过大对纳米粒子结构造成破坏, 因而确定超声功率为 200 W。

**2.4.4 超声次数考察** 参照“2.3.1”项方法平行配置 5 份  $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液, 60 °C 恒温条件下, 1000 r/min 转速, 匀速搅拌 1.5 h, 而后分别置于细胞超声仪, 设定超声功率为 200 W, 分别超声 5、10、15、20、25 次, 每次 5 s, 间隔 10 s, 测定各样品包封率、载药量、 $K_e$ , 并计算  $D$  值, 结果见表 4。可知, 当超声次数超过 15 次时,  $\beta$ -A@LCNPs 的  $D$  值减小, 说明超声次数过多导致晶型发生改变, 药物渗漏, 包封率下降, 载药量下降。所以, 综合考虑选择超声次数为 15 次。

表4 超声次数对包封率、载药量、 $K_e$ 和 $D$ 值的影响

Table 4 Influence of ultrasonic frequency on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$ ,  $D$  values

超声次数	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
5	38.59	3.39	16.89	0.42
10	49.65	4.32	16.14	0.49
15	56.39	4.88	13.54	0.54
20	46.98	4.10	15.27	0.48
25	41.24	3.61	17.41	0.43

**2.4.5 GMO 用量考察** 参照“2.3.1”项方法平行配置 GMO 量分别为 0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 g, 其余各量等同 (PVA 20 mg、 $\beta$ -细辛醚 20 mg、水 40 mL)  $\beta$ -A@LCNPs 悬浊液, 60 °C 恒温条件下, 1000 r/min 转速, 匀速搅拌 1.5 h, 而后置细胞超声仪, 200 W, 超声 15 次, 每次 5 s, 间隔 10 s, 测定各样品包封率、载药量、 $K_e$  值, 并计算  $D$  值, 结果见表 5。可知, GMO 加入量对该载药系统的  $D$  值具有明显影响, 当 GMO 用量为 0.25 g 时,  $D$  值最大, 这与 GMO 用量对纳米粒子结构稳定有关, 需进一步优选用量。

**2.4.6 投药量考察** 保持其他条件等同 (GMO 0.25

g、PVA 20 mg、水 40 mL), 分别配置不同投药量(10、15、20、25、30 mg), 同等制备工艺(参照“2.3.5”项), 制备  $\beta$ -A@LCNPs, 分别测定各样品包封率、载药量、 $K_e$  值, 并计算  $D$  值, 结果见表 6。可知, 投药量 < 20 mg, 随着投药量增加  $D$  值增大, 当投药量 > 20 mg, 随着投药量增加  $D$  值减小, 说明投药量对  $\beta$ -A@LCNPs 制备的  $D$  值有较大影响, 需做进一步考察优化。

表 5 GMO 用量对包封率、载药量、 $K_e$  和  $D$  值的影响

Table 5 Effect of GMO dosage on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$  and  $D$  values

GMO 量/g	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
0.15	41.57	3.64	23.89	0.43
0.20	54.15	4.69	16.94	0.52
0.25	57.19	4.94	12.54	0.55
0.30	58.98	5.09	15.51	0.55
0.35	50.24	4.37	19.41	0.49

表 6 投药量对包封率、载药量、 $K_e$  和  $D$  值的影响

Table 6 Effect of dosage on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$  and  $D$  values

投药量/mg	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
10	76.17	2.74	13.81	0.49
15	74.25	3.96	13.14	0.55
20	72.58	5.10	13.54	0.60
25	55.38	4.88	15.51	0.53
30	51.44	5.41	21.41	0.53

**2.4.7 稳定剂种类筛选** 保持其它条件等同(GMO 0.25 g、 $\beta$ -细辛醚 20 mg、水 40 mL), 分别称取你 20 mg 不同稳定剂(F127、PVA150、PVA), 同等制备工艺(参照“2.3.5”项), 制备  $\beta$ -A@LCNPs, 分别测定各样品包封率、载药量、 $K_e$  值, 并计算  $D$  值, 结果见表 7。可知, PVA 作稳定剂时, 包封率、载药量、 $K_e$  及  $D$  值最大, 故选择 PVA 作为  $\beta$ -细辛醚 LCNPs 载药系统稳定剂。

**2.4.8 稳定剂 PVA 用量考察** 保持其他条件等同

表 7 不同稳定剂对包封率、载药量、 $K_e$  和  $D$  值的影响

Table 7 Effect of different stabilizer on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$  and  $D$  values

稳定剂种类	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
F127	55.57	3.95	24.19	0.48
PVA150	66.15	4.67	15.94	0.56
PVA	71.59	5.04	13.24	0.59

(GMO 0.25 g、 $\beta$ -细辛醚 20 mg、水 40 mL), 分别称取不同剂量 PVA (10、15、20、25、30 mg), 同等制备工艺(参照“2.3.5”项), 制备  $\beta$ -A@LCNPs, 分别测定各样品包封率、载药量、 $K_e$  值, 并计算  $D$  值, 结果见表 8。可知, 投药量 < 20 mg, 随着投药量增加  $D$  值增大, 当投药量 > 20 mg, 随着投药量增加  $D$  值减小, 说明说明 PVA 在一定范围内可以参与脂质立方液晶结构的组装并能支撑整个骨架, 但是当用量超过 20 mg, 其又可能会导致结构的破坏或者晶型结构的转变, 导致包封率、载药量、 $K_e$  及  $D$  值下降, 需做进一步考察优化。

表 8 PVA 用量对包封率、载药量、 $K_e$  和  $D$  值的影响

Table 8 Effect of PVA dosage on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$  and  $D$  values

PVA/mg	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
10	55.34	4.08	13.81	0.51
15	65.35	4.70	13.14	0.56
20	73.98	5.20	13.54	0.61
25	65.38	4.54	15.51	0.55
30	57.74	3.96	21.41	0.49

**2.4.9 分散相水量考察** 保持其它条件等同(GMO 0.25 g、PVA 20 mg、 $\beta$ -细辛醚 20 mg), 分别量取不同体积分散水相(20、30、40、50、60 mL), 同等制备工艺(参照“2.3.5”项), 制备  $\beta$ -A@LCNPs, 分别测定各样品包封率、载药量、 $K_e$  值, 并计算  $D$  值, 结果见表 9。可知, 随着水相体积增加, 该递释系统  $D$  值增加, 当水相体积 > 30 mL 时,  $D$  值几乎不变。原因可能当水含量少,  $\beta$ -A@LCNPs 的浓度大, 纳米粒易相互黏合, 药物易析出; 水相体积大, 纳米粒能较好的分散, 不聚集, 载药量、包封率较高,  $K_e$  较小,  $D$  值变大。考虑该载药系统的药物浓度, 需对水相用量进一步优选。

**2.5 星点设计响应面法优化  $\beta$ -A@LCNPs 处方**

通过单因素法考察发现 GMO 量、 $\beta$ -细辛醚量、

表 9 分散相水量对包封率、载药量、 $K_e$  和  $D$  值的影响

Table 9 Effect of dispersed phase water amount on encapsulation rate, drug loading capacity,  $K_e$  and  $D$  values

水相/mL	包封率/%	载药量/%	$K_e$ /%	$D$
20	50.78	3.63	15.84	0.47
30	62.35	4.41	14.14	0.54
40	69.41	4.89	13.54	0.58
50	69.32	4.88	13.56	0.58
60	67.46	4.76	14.21	0.57

PVA 量及水相对  $\beta$ -A@LCNPs 质量综合评分影响较大, 并采用星点设计响应面法对  $\beta$ -A@LCNPs 处方进一步优化。

**2.5.1 试验设计** 选取 GMO 量 ( $X_1$ )、 $\beta$ -细辛醚量 ( $X_2$ )、PVA 量 ( $X_3$ )、水相 ( $X_4$ ) 4 个因素作为自变量, 每个因素设 5 水平, 用代码值  $-\alpha$ 、 $-1$ 、 $0$ 、 $+1$ 、

$+\alpha$  来表示 (4 因素星点设计的  $\alpha=1.682$ )。代码值所代表的实际操作物理量见因素水平表 10。分别测定各试验样品的包封率、载药量和  $K_e$ , 参照“2.2.3”项下方法, 计算  $D$  值, 作为  $\beta$ -A@LCNPs 综合评价考察指标, 采用星点设计优化处方, 试验安排及结果见表 10。

表 10 星点设计试验安排及结果

Table 10 Test arrangement and results of centroid design

试验号	$X_1/\text{mg}$	$X_2/\text{mg}$	$X_3/\text{mg}$	$X_4/\text{mL}$	包封率/%	载药量/%	$K_e/\%$	$D$
1	300 (+1)	25 (+1)	25 (+1)	20 (-1)	0.69	0.32	0.84	0.57
2	300 (+1)	25 (+1)	15 (-1)	20 (-1)	0.90	0.39	0.87	0.68
3	300 (+1)	15 (-1)	25 (+1)	40 (+1)	0.89	0.43	0.91	0.70
4	200 (-1)	25 (+1)	15 (-1)	40 (+1)	0.50	0.35	0.84	0.53
5	300 (+1)	15 (-1)	15 (-1)	40 (+1)	0.86	0.25	0.86	0.57
6	200 (-1)	15 (-1)	25 (+1)	20 (-1)	0.71	0.33	0.82	0.58
7	200 (-1)	25 (+1)	25 (+1)	40 (+1)	0.71	0.47	0.84	0.66
8	200 (-1)	15 (-1)	15 (-1)	20 (-1)	0.84	0.40	0.87	0.66
9	165.91 (-1.682)	20 (0)	20 (0)	30 (0)	0.70	0.35	0.85	0.59
10	334.09 (+1.682)	20 (0)	20 (0)	30 (0)	0.70	0.33	0.88	0.59
11	250 (0)	11.59 (-1.682)	20 (0)	30 (0)	0.98	0.27	0.94	0.63
12	250 (0)	28.41 (+1.682)	20 (0)	30 (0)	0.68	0.45	0.86	0.64
13	250 (0)	20 (0)	11.59 (-1.682)	30 (0)	0.89	0.40	0.88	0.68
14	250 (0)	20 (0)	28.41 (+1.682)	30 (0)	0.72	0.52	0.86	0.68
15	250 (0)	20 (0)	20 (0)	13.18 (-1.682)	0.82	0.38	0.88	0.65
16	250 (0)	20 (0)	20 (0)	46.82 (+1.682)	0.85	0.39	0.91	0.67
17	250 (0)	20 (0)	20 (0)	30 (0)	0.92	0.33	0.93	0.66
18	250 (0)	20 (0)	20 (0)	30 (0)	0.99	0.30	0.94	0.65
19	250 (0)	20 (0)	20 (0)	30 (0)	0.84	0.39	0.89	0.66
20	250 (0)	20 (0)	20 (0)	30 (0)	0.78	0.36	0.90	0.63
21	250 (0)	20 (0)	20 (0)	30 (0)	0.78	0.33	0.85	0.60

**2.5.2 模型拟合** 将所得数据用 Design-Expert 8.0.5b 软件进行响应面试验分析<sup>[17]</sup>, 以各考察指标的  $D$  值为响应值, 对各因素进行多元线性回归和二项式拟合。多元线性回归方程  $D=0.71-0.009 5 X_1-0.03 X_2-0.043 X_3+0.007 7 X_4$ ,  $r=0.245 1$ ,  $P>0.05$ ; 二项式拟合方程  $D=0.012 X_1-0.007 X_2-0.043 X_3+0.023 X_4+0.026 X_1X_2+0.094 X_1X_3+0.038 X_1X_4+0.023 X_2X_3-0.018 X_2X_4-0.02 X_3X_4-0.002 8 X_1^2+0.008 7 X_2^2-0.026 X_3^2-0.088 X_4^2$ ,  $r=0.997 5$ ,  $P<0.01$ 。

从拟合方程的相关系数可见, 多元线性回归方程的相关系数较低, 表示自变量与因变量之间线性相关性较差, 可见多元线性回归拟合度不佳, 预测

性较差, 因此该数学模型不合适。而多元二项式拟合方程相关系数较高, 拟合效果较好。其中,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  及  $X_4^2$  项为 4 因素对指标的单独作用, 而  $X_1X_2$ 、 $X_2X_3$ 、 $X_1X_3$ 、 $X_2X_4$ 、 $X_1X_4$  和  $X_3X_4$  项为因素的交互作用, 方程从整体上反映了各因素及其相互作用对指标值的影响。

**2.5.3 方差分析** 采用 ANOVA 分析响应面的回归参数。表 11 中统计分析数据显示给出了线性项、二次项、以及交互项对各考察指标综合得分的影响, 其中 GMO 量 ( $X_1$ )、PVA 量 ( $X_3$ ), 对响应值 (综合评分  $D$  值) 的曲面效应显著 ( $P<0.05$ ); GMO 量 ( $X_1$ ) 与 PVA 量 ( $X_3$ ) 的交互项 ( $X_1X_3$ )、水量的二次项 ( $X_4^2$ ) 对响应值 ( $D$  值) 的曲面效应极显



表 11 响应面二次模型的方差分析结果

Table 11 Variance analysis results of response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.250	14	0.018	6.71	<0.001 3	$X_3X_4$	$3.040 \times 10^{-3}$	1	$3.040 \times 10^{-3}$	1.140	0.326 1
$X_1$	$7.610 \times 10^{-4}$	1	$7.610 \times 10^{-4}$	0.29	0.023 5	$X_1^2$	$1.170 \times 10^{-4}$	1	$1.170 \times 10^{-4}$	0.044	0.840 8
$X_2$	$3.380 \times 10^{-4}$	1	$3.380 \times 10^{-4}$	0.13	0.733 8	$X_2^2$	$1.130 \times 10^{-3}$	1	$1.130 \times 10^{-3}$	0.420	0.539 0
$X_3$	0.025	1	0.025	9.51	0.021 6	$X_3^2$	$9.930 \times 10^{-3}$	1	$9.930 \times 10^{-3}$	3.730	0.101 6
$X_4$	$3.040 \times 10^{-3}$	1	$3.040 \times 10^{-3}$	1.14	0.326 1	$X_4^2$	0.120	1	0.120	43.320	0.000 6
$X_1X_2$	$2.320 \times 10^{-3}$	1	$2.320 \times 10^{-3}$	0.87	0.386 8	残差	0.016	6	0.110		
$X_1X_3$	0.071	1	0.071	26.7	0.002 1	失拟项	$2.154 \times 10^{-3}$	2	$1.077 \times 10^{-3}$	0.310	0.748 4
$X_1X_4$	$4.730 \times 10^{-3}$	1	$4.730 \times 10^{-3}$	1.78	0.231 0	纯误差	0.014	4	0.130		
$X_2X_3$	$4.140 \times 10^{-3}$	1	$4.140 \times 10^{-3}$	1.56	0.258 8	总误差	0.270	20			
$X_2X_4$	$1.090 \times 10^{-3}$	1	$1.090 \times 10^{-3}$	0.41	0.546 7						

著 ( $P < 0.01$ )；在所选取的各因素水平范围内，按照对响应值 ( $D$  值) 的影响排序： $PVA$  量 ( $X_3$ )  $>$   $GMO$  量 ( $X_1$ )  $>$  水 ( $X_4$ )  $>$   $\beta$ -细辛醚 ( $X_2$ )。二项式回归方程失拟检验不显著，说明未知因素对试验结果干扰很小。拟合检验极显著，说明该方程与实际情况拟合很好，较好地反应了  $\beta$ -A@LCNPs 综合得分 ( $D$  值) 与  $GMO$ 、 $\beta$ -细辛醚、 $PVA$ 、水不同配方用量的关系，可以对条件范围内不同配方的

$\beta$ -A@LCNPs 进行质量评价 (综合评分  $D$  值) 进行预测。

**2.5.4 响应面优化、预测与验证** 根据二次多项式模型，应用 Design-Expert 8.0.5b 软件绘制各考察指标综合得分与各自变量间的三维响应曲面图及等高线图，结果见图 2。

结合二次回归模型进行预测分析， $\beta$ -A@LCNPs  $D$  值最大值为 0.745 5，此时最优处方  $GMO$  300 mg、

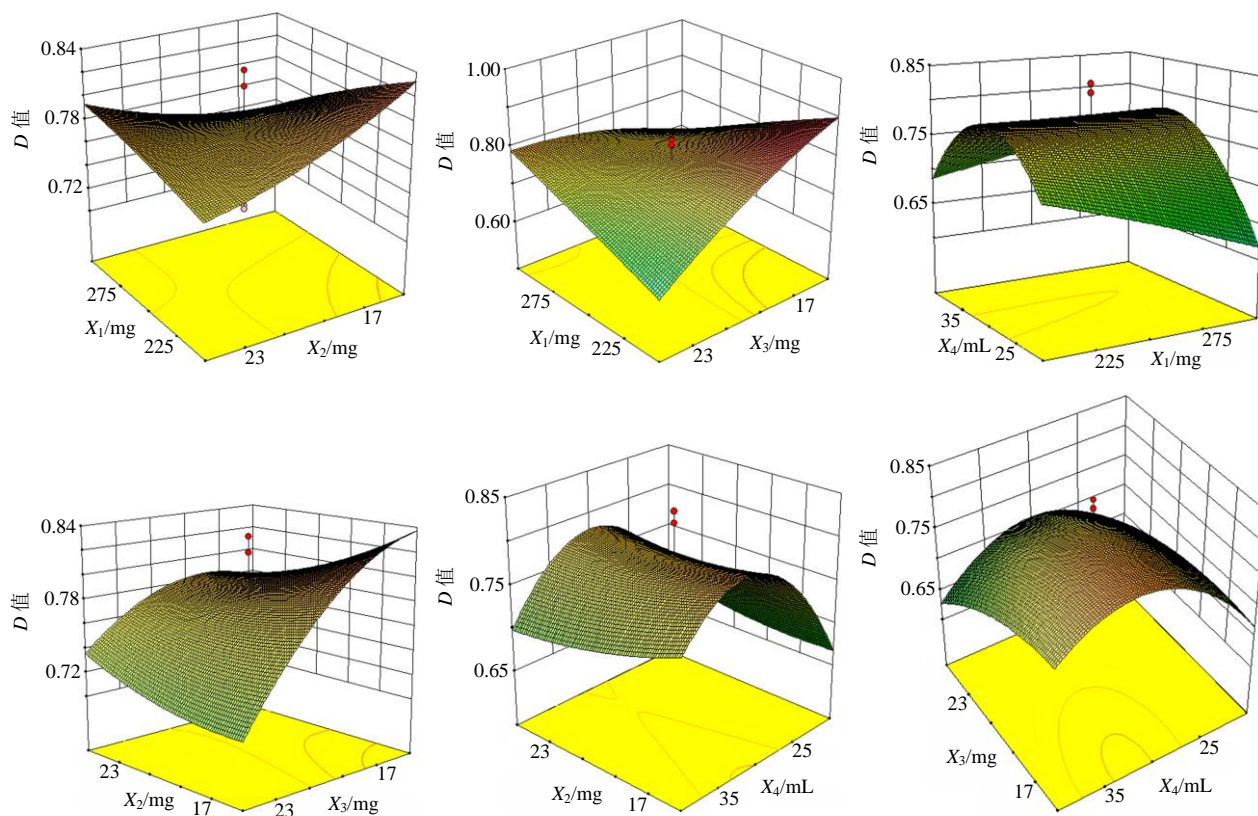


图 2 各因素间对  $\beta$ -A@LCNPs  $D$  值的影响

Fig. 2 Influence of factors on  $D$  value of  $\beta$ -A@LCNPs

β-细辛醚 20 mg、PVA 25 mg、水 40 mL。

按最优处方，配制 3 份 β-A@LCNPs，对每份样品进行质量综合评价得分进行实验验证，结果 β-A@LCNPs 包封率平均值为 90.78%、载药量平均值为 5.31%、 $K_e$  平均值为 7.21%， $D$  值平均为 0.72，实际值与预测值相比偏差率为 -2.91%，RSD 为 1.36%，表明所建立的数学模型具有良好的预测性，所选处方重现性好，工艺稳定。

### 2.6 β-A@LCNPs 粒径分布测试

按 β-A@LCNPs 最优处方及工艺平行制备 3 份样品，用蒸馏水稀释 10 倍，分别测定其粒径分布，结果显示，β-A@LCNPs 粒径分布成正态分布，平均粒径为  $(85.28 \pm 3.26)$  nm，多分散系数 (PDI) 为  $0.190 \pm 0.003$ 。

### 2.7 β-A@LCNPs TEM 观察

按 β-A@LCNPs 最优处方及工艺制备 β-A@LCNPs 样品，稀释 100 倍，滴在样品台上，放置于干燥皿中自然干燥。样品干燥后放入离子溅射仪中镀金膜，再将样品置于透射电镜中观察<sup>[18]</sup>，结果见图 3。由图 3 可见，β-A@LCNPs 在水中分散较好，且粒径大小差异较小。通过放大电镜倍数发现，β-A@LCNPs 为立方体结构，外观完整，且存在空间结构堆积。

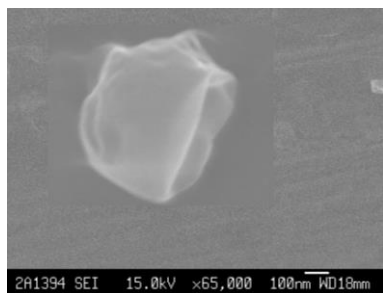


图 3 β-A@LCNPs 的 TEM 图

Fig. 3 TEM image of β-A@LCNPs

表 12 β-A@LCNPs 与 β-细辛醚乳液体外经皮渗透动力学参数 (n = 3)

Table 12 *In vitro* percutaneous permeation kinetics of β-asarone LCNPs and β-asarone emulsion (n = 3)

样品	动力学方程	r	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_{12}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
β-A@LCNPs	$Y=96.32 X-3.52$	0.995	$96.32 \pm 2.13$	$1\ 152.32 \pm 21.12$
β-细辛醚乳液	$Y=31.34 X-2.46$	0.997	$31.34 \pm 1.26$	$373.62 \pm 10.23$

制备为 LCNPs 载药体系，通过单因素方法分别考察搅拌时间、搅拌速率、超声功率、超声次数、对 β-A@LCNPs 制备工艺进行考察优化，确立最佳制备工艺。并在单因素考察处方剂量对 β-A@LCNPs 质量影响的基础上，采用星点设计响应面法，以

### 2.8 体外经皮渗透考察

分别配制相同药物浓度 (载药量 5.31%) 的 β-A@LCNPs (按最优处方与制备工艺制备) 与 β-细辛醚乳液 (精密称取 20 mg β-细辛醚，滴加无水乙醇至完全溶解，再加入 10 mL 聚氧乙烯蓖麻油，搅拌均匀，而后逐滴加入 30 mL 蒸馏水，边滴边搅拌均匀，即得<sup>[19]</sup>) 进行体外经皮渗透考察。

取 β-A@LCNPs 和 β-细辛醚乳液各 5 mL，分别加入 Franz 扩散池<sup>[20]</sup>，渗透膜为小鼠腹部脱毛全皮，所用鼠皮的厚度均一，有效扩散面积为  $4.50\text{ cm}^2$ ，接收池体积为 18 mL，接收介质为 32 °C 生理盐水，200 r/min 匀速磁力搅拌，以 β-细辛醚为考察指标，分别于 1、2、4、6、8、10、12 h 抽取 5 mL 接收液 (同时补加 5 mL 空白接收液)，过  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔，参照“2.2.1”项下方法，测定接收液中 β-细辛醚含量，以上试验，β-A@LCNPs 和普通乳分别平行做 3 组试验，取均值，绘制渗透曲线，拟合参数，得药物体外经皮渗透动力学曲线方程见表 12，通过比较体外经皮渗透动力学参数稳态透皮速率 ( $J_s$ ) 和单位面积累积渗透量 ( $Q_n$ )，可以看出 β-A@LCNPs 较 β-细辛醚乳液透皮速率提升了 3 倍，制剂透皮性能得到显著提升。

$$Q_n = C_n/A$$

$$J_s = dQ/dt$$

$$C_n = C_{ni} + V_0/V \sum_{i=1}^{n-1} C_{ps}$$

$C_n$  为  $t$  时间药物的校正质量浓度， $C_{ni}$  为  $t$  时间药物的测定质量浓度， $C_{ps}$  为  $t$  时前药物的测定质量浓度， $V_0$  为每次取样体积， $V$  为接收液的总体积， $Q_n$  为  $t$  时间单位面积累积渗透量， $A$  为有效扩散面积

### 3 讨论

本研究采用 Bottom-up 法将模型药物 β-细辛醚

β-A@LCNPs 各组分为考察因素，结合 Design-Expert 4 因素 5 水平设计安排试验，以 β-A@LCNPs 质量综合评分 ( $D$  值) 为评价指标，优选出最佳 β-A@LCNPs 处方，优选的 β-A@LCNPs 制备工艺、处方稳定可行。



目前国内多采用绘制三元相图液晶区筛选立方液晶处方,但往往存在可选择区域范围广,考察指标相对主观,最终确立的处方多是预设的考察参数优选,无法动态连续筛选指标,精确度不高。本实验 LCNPs 最佳处方筛选,在单因素考察指标参数范围的基础上,采用星点设计响应面法,各因素对效应的影响并非线性,且考虑到多因素间的交互作用,区别于线性设计的正交设计或均匀设计筛选处方,星点设计通过多次试验结果参数进行模型拟合优化,找到拟合度最佳方程,指标参数具有连续性,多元高次方程综合考量单因素及因素间的协同效应,推算出最佳配方,验证及重复性好,工艺稳定。星点设计响应面法筛选立方液晶处方,预测指导性更强,具有较好的推广应用价值,为  $\beta$ -A@LCNPs 制备工艺提供了科学、合理的理论和实验依据。

立方液晶载药系统制备方法有热融法、喷雾干燥法、Top-down 法、Bottom-up 法,其中热融法、喷雾干燥法所需温度高,对温度敏感性药物不适宜<sup>[21]</sup>, Top-down 法在制备过程需要更高能量,系统温度高,纳米粒在高温条件下容易碰撞引起絮凝<sup>[3]</sup>,本文选用 Bottom-up 法加入有机溶剂有助  $\beta$ -细辛醚溶解,制备方法简单,制备工艺稳定可靠,制备的  $\beta$ -A@LCNPs 质量以包封率、载药量、稳定性为评价指标的综合评分高、质量好。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 阮世发, 乡世健, 洪军辉, 等. 积雪草苷立方液晶制备工艺与含量测定方法研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(6): 54-56.
- [2] 李绍林. 脂质立方液晶纳米粒载药系统的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2020, 36(20): 3261-3264.
- [3] 荀子杰, 邓盛齐, 陶静, 等. 适于规模放大的姜黄素脂质立方液晶制备工艺探讨 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(8): 946-951.
- [4] 杨杰, 田兰, 柴东坤, 等. 脂质立方液晶作为药物载体的靶向作用研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(7): 79-85.
- [5] 田勇, 李见春, 李婷婷, 等. 富马酸噻硫平脂质立方液晶制备工艺研究 [J]. 中国药业, 2020, 29(17): 25-28.
- [6] 刘丽丽, 史焯女, 方蕾, 等. 马钱子总碱-白芍总苷脂质立方液晶纳米粒制备及体外评价 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4076-4083.
- [7] 单倩倩, 蒋晓静, 桂双英, 等. 雷公藤甲素立方液晶的制备及体外评价. 中国药学杂志, 2019, 54(9): 726-733.
- [8] 岳鹏飞, 刘阳, 谢锦, 等. 药物纳米晶体制备技术 30 年发展回顾与展望 [J]. 药科学报, 2018, 53(4): 529-537.
- [9] 郝秀华, 孙悦, 王蕾, 等. 星点设计优化野黄芩素制备工艺 [J]. 特产研究, 2019, 41(2): 6-10.
- [10] 房盛楠. 盐酸普萘洛尔立方液晶凝胶的制备与评价 [D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
- [11] 王清清, 陈明龙, 胡霞, 等. 马来酸噻吗洛尔立方液晶纳米粒眼用制剂的制备和表征 [J]. 药科学报, 2018, 53(11): 1894-1900.
- [12] 徐玲霞, 冯文珍, 申宝德, 等. 吴茱萸次碱脂质立方液晶纳米粒包封率的测定方法研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4373-4376.
- [13] 杨雪鸥, 唐智勇, 黄雪梅, 等. 石菖蒲  $\beta$ -细辛醚研究进展 [J]. 中药材, 2016, 39(3): 686-690.
- [14] 兰焯荣, 刘素香, 张铁军, 等. 细辛醚的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 252-257.
- [15] 刘春玲, 侯广玉, 孙艳, 等.  $\beta$ -细辛醚对 AD 大鼠海马神经元蛋白质组图谱的影响 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(24): 187-188.
- [16] Sug H. A method for normalization of relation schema based on data to abide by the third normal form [J]. WSEAS Transactions on Mathematics, 2020, 19(8): 216-225.
- [17] 祝露佳, 陈礼迎, 郑爽, 等. 星点设计-效应面法优化银杏内酯 B 纳米冻干制剂的制备工艺及其体外释放研究 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5439-5447.
- [18] 唐明华, 郭军, 陈木子. 透射电镜三维重构确定金纳米粒子的立体结构 [J]. 分析科学学报, 2017, 33(4): 499-502.
- [19] 赵瑛, 王莉.  $\beta$ -细辛醚鼻用微乳凝胶的制备及其释放度考察 [J]. 抗感染药学, 2019, 16(5): 743-747.
- [20] 周刚, 付晓婷, 潘静茹, 等. 他克莫司软膏透皮一致性的体外 Franz 扩散池测定比较研究 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(12): 2126-2133.
- [21] 曾令军, 房盛楠, 张灵娜, 等. 盐酸普萘洛尔立方液晶纳米粒的制备及体外评价 [J]. 中国药师, 2020, 23(6): 1094-1101.

[责任编辑 郑礼胜]