

• 药剂与工艺 •

基于 Box-Behnken 设计-效应面法优化姜黄素-乳铁蛋白纳米粒制备工艺和体外评价研究

李岭慧^{1,2}, 廖婉^{1,2#}, 张倩^{1,2}, 余方坤^{1,2}, 谭立伟³, 李章才³, 胡琼丹^{1,2}, 张心洁^{1,2}, 廖洋洋^{1,2}, 侯曙光^{1,2,3*}, 李锐^{1,2*}

1. 成都中医药大学 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137
2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
2. 四川普锐特药业有限公司, 四川 成都 610041

摘要: 目的 运用 Box-Behnken 设计-效应面法优化姜黄素-乳铁蛋白纳米粒 (curcumin-lactoferrin nanoparticles, Cur-LF-NPs) 的制备处方工艺。方法 采用去溶剂化法制备 Cur-LF-NPs, 基于单因素实验结果, 选择反溶剂/溶剂体积比、乳铁蛋白/姜黄素投料比和 pH 值作为后续 Box-Behnken 设计优化实验的考察因素; 以包封率、粒径和分散系数经 CRITIC 权重分析计算后得到的综合评分作为评价指标, 使用 Design Expert 10 软件对数据进行拟合并验证优化后的处方工艺。最后对纳米粒形态、粒径电位、载药能力、稳定性及体外释放行为等进行表征评价。结果 经优化后的制备工艺条件为反溶剂/溶剂体积比 16:1、乳铁蛋白/姜黄素投料比 8:1、pH 值为 6。Cur-LF-NPs 粒径为 (72.6 ± 5.2) nm、PDI 为 0.084 ± 0.015 、 ζ 电位为 (24.5 ± 3.7) mV, 包封率 $(94.8 \pm 1.6)\%$ 、载药量 $(10.2 \pm 0.5)\%$ 。Cur-LF-NPs 体外释放相较于姜黄素原料药具有一定的缓释效果。结论 经 Box-Behnken 设计-效应面法筛选获得制备 Cur-LF-NPs 的最佳处方工艺, 该制剂粒径均一、载药能力强、稳定性好, 为后续的体内外研究提供稳定的制剂基础。

关键词: 姜黄素; 乳铁蛋白纳米粒; Box-Behnken 设计-效应面法; CRITIC 权重分析; 制备工艺筛选

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)19-5980-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.005

Optimization of curcumin-lactoferrin nanoparticles prescription process based on Box-Behnken design-response surface method and *in vitro* evaluation

LI Ling-hui^{1,2}, LIAO Wan^{1,2}, ZHANG Qian^{1,2}, YU Fang-kun^{1,2}, TAN Li-wei³, LI Zhang-cai³, HU Qiong-dan^{1,2}, ZHANG Xin-jie^{1,2}, LIAO Yang-yang^{1,2}, HOU Shu-guang^{1,2,3}, LI Rui^{1,2}

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
3. Sichuan Purity Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To optimize prescription process of curcumin lactoferrin nanoparticles (Cur-LF-NPs) by Box-Behnken design-response surface method. **Methods** Cur-LF-NPs were prepared by the desolvation method. Based on the results of single factor experiment, the anti-solvent/solvent volume ratio, lactoferrin/curcumin weight ratio and pH value were selected as the investigational factors for the subsequent Box-Behnken design optimization experiment. The comprehensive score of entrapment efficiency, particle

收稿日期: 2022-04-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073994); 四川省科技计划重点研发项目 (2020YFN0152); 四川省科技厅科技项目 (2020JDJQ0049); 农业部杂粮加工重点实验室开放课题 (2019CC02); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划 (QJJ2021002)

作者简介: 李岭慧, 女, 硕士研究生, 从事中药新制剂、新剂型和新技术研究。E-mail: 1354776917@qq.com

***通信作者:** 侯曙光, 男, 博士, 首席教授, 博士生导师, 从事创新型药物递送及药剂学研究。E-mail: shuguang.hou@scpurity.com

李锐, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药的化学分析、质量控制及体内代谢研究。E-mail: lirui@cdutcm.edu.cn

#共同第一作者: 廖婉, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事新制剂、新剂型及中药炮制工艺与机制研究。E-mail: liaowan@cdutcm.edu.cn

size and polydispersity coefficient obtained by CRITIC weight analysis and calculation were chosen as the evaluation parameters, and simulated and verified by Design Expert 10 software. Finally, the physical property of Cur-LF-NPs, including the morphology, particle size, potential, drug loading capacity, stability and *in vitro* release behavior were characterized and evaluated. **Results** The optimized prescription process were obtained as follows: the volume ratio of anti-solvent/ solvent was 16:1, the weight ratio of lactoferrin / curcumin was 8:1 and the pH value was 6. The particle size of Cur-LF NPs was (72.6 ± 5.2) nm, the PDI was 0.084 ± 0.015 , and the ζ potential was (24.5 ± 3.7) mV; The entrapment efficiency was $(94.8 \pm 1.6)\%$, and the drug loading was $(10.2 \pm 0.5)\%$. Compared with free curcumin, the *in vitro* release of Cur-LF-NPs has a certain sustained-release effect. **Conclusion** The process for the preparation of Cur-LF-NPs was optimized by the Box-Behnken design-response surface screening method, the Cur-LF-NPs showed uniform particle size, good drug loading capacity and acceptable stability. This study provided a solid preparation basis for future *in vitro* and *in vivo* research of Cur-LF-NPs.

Key words: curcumin; lactoferrin nanoparticles; Box-Behnken design-response surface method; CRITIC weight analysis; prescription process screening

姜黄素主要来源于姜科姜黄属多年生草本植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的根茎^[1]。作为世界公认的药食同源物质之一, 姜黄素既可作为食品调味剂和着色剂^[2], 也有研究报道其具有抗氧化、抗炎、促进肿瘤细胞凋亡和神经保护等药理活性^[3]。基于明确的神经保护药效作用, 姜黄素被广泛开展于如阿尔茨海默症^[4]、帕金森病^[5]及脑缺血^[6]等脑神经退化/损伤疾病治疗的研究。然而, 与大多数天然活性化合物相似, 水溶性差、口服生物利用度低等成药性缺陷限制了姜黄素在临床中的应用。不仅如此, 对于脑部疾病, 游离药物靶向性缺失及特殊的生理屏障-血脑屏障 (blood brain barrier, BBB)^[7]则进一步限制药物进入脑部发挥药效。近年来, 纳米载药技术的发展为药物的脑靶向递送提供了一系列研发策略, 如脂质体^[8]、微乳液^[9]、胶束^[10-11]等纳米制剂和细胞穿膜肽 (CPPs)^[12]、膜转运蛋白^[13] (如转铁蛋白和乳铁蛋白) 等修饰技术均有效提高了药物在脑组织的富集。其中, 作为人体内源性物质的乳铁蛋白, 不仅可实现对于 BBB 的高效透过^[14]及神经损伤部位的主动靶向^[15], 还因其来源广泛^[16]、可结合基团多^[17]、生物相容性高^[18]等优点, 具有成为药物脑部递送候选载体的潜力。

乳铁蛋白是相对分子质量约为 80 000 的单体糖蛋白, 等电点 (PI) 为 8.0~8.5^[19]。将其作为纳米载体包载姜黄素治疗神经退行性疾病有多方面优势。其一, 乳铁蛋白生物相容性高, 是具有营养价值的美国 GRAS 认证原料^[20]; 其二, 乳铁蛋白具有脑靶向作用, 乳铁蛋白受体在脑内皮细胞和与神经退行性疾病相关的神经元中高度表达^[21]; 其三, 乳铁蛋白具有改善神经系统的功能。衰老和神经退化的大脑中含有较高水平的铁, 其作为铁转运蛋白能够通过参与铁的螯合作用来减轻氧化应激反应和改善铁代

谢来保护神经系统^[22]。综上所述, 将姜黄素包载于乳铁蛋白中有助于实现其脑组织高效递送及两者在神经损伤中的协同治疗作用。

尽管目前关于乳铁蛋白纳米粒的制备方法已有相关报道, 但制备工艺中非药用交联剂^[23]、有毒有机试剂的使用^[24], 使制剂的安全性有待商榷。因此, 本研究采用去溶剂化法制备姜黄素-乳铁蛋白纳米粒 (curcumin-lactoferrin nanoparticles, Cur-LF-NPs), 通过 Box-Behnken 设计-效应面法筛选提供了一种简单、安全的处方工艺, 并制备出粒径均一、载药能力强、稳定性好的 Cur-LF-NPs, 以期为后续的体内外评价建立制剂基础。

1 仪器与材料

Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪 (HPLC), 美国 Agilent 公司; XS205DU 型十万分之一电子天平、S210 型 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; WH620 型加热磁力搅拌器, WIGGENS 公司; Biosafer 900-92 型超声波细胞破碎仪, 南京赛飞生物科技有限公司; TG-1850 型台式高速离心机, 上海锦玟仪器设备有限公司; SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; SHA-C 型水浴恒温振荡器, 江苏科析仪器有限公司; Milli-Q 超纯水仪, 德国 Merck 公司; NanoBrook 90 Plus PALS 粒度仪, 美国 Brookhaven 公司; HT7800 型透射电子显微镜 (TEM), 日立公司; Victor Nivo 型全自动酶标仪, PerkinElmer 公司。

乳铁蛋白 (批号 A16GS145363, 质量分数 95%)、甘露醇 (批号 M24GS149532, AR 级)、海藻糖 (批号 S28J12H138585, BR 级) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 姜黄素 (批号 C12811019, AR 级) 购自成都麦克林生物科技有限公司; 姜黄素对照品 (批号 PS012299, 质量分数 98.5%) 购自成

都普思生物科技股份有限公司; CE 型透析袋(相对分子质量 8000~10 000), 冰醋酸、乙腈和甲醇为 HPLC 级, 无水乙醇为 AR 级, 购自成都科隆化学制品有限公司。

2 方法与结果

2.1 Cur-LF-NPs 溶液的制备

参考 Hasanpoor 等^[25]报道的去溶剂化法制备 Cur-LF-NPs。称取 48 mg 乳铁蛋白超声溶于 16 mL 超纯水中, 加入 5% 柠檬酸钠调节 pH 值至 6, 冰箱放置过夜以充分溶解, 为反溶剂相; 将 6 mg 姜黄素超声溶于 1 mL 无水乙醇中, 为溶剂相。使用注射器将姜黄素乙醇溶液以 1 mL/min 的速率缓慢地滴入磁力搅拌(400 r/min)中的乳铁蛋白溶液, 随后在探针超声仪上匀化制得的纳米粒(功率 900 W, 振幅 10%, 开 2 s、关 3 s, 循环 2 min)。最后通过 4000 r/min 离心 10 min 以分离游离姜黄素, 上清液过 0.22 μm 微孔滤膜即得 Cur-LF-NPs 溶液。空白 LF-NPs 的制备除不加姜黄素外同法制备。

2.2 包封率、载药量的测定

2.2.1 离心沉淀-滤膜法测定包封率 姜黄素极难溶于水, 未包封的游离药物常以微晶的形式存在于溶液中^[26], 故通过离心联合滤过的方式除去游离姜黄素。具体操作方法为取 1 mL “2.1” 项下探针超声前的 Cur-LF-NPs 置于 20 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声破坏纳米粒, 冷却后加甲醇定容, 采用 HPLC 法测得的药物质量浓度为加入药物总量(W_t); 吸取“2.1”项下离心-过膜后的 Cur-LF-NPs 1 mL 同上法处理后测得的质量浓度为被包封药物的量(W_e), 包封率按下列公式求得。

$$\text{包封率} = W_e / W_t$$

2.2.2 载药量 将 Cur-LF-NPs 冷冻干燥 48 h 后储存于棕色干燥器中, 备用。精密称取 Cur-LF-NPs 冻干粉($W_{\text{总}}$)至 20 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声破坏纳米粒, 冷却后加甲醇定容, 采用 HPLC 法测得的质量浓度为冻干粉中药物的量($W_{\text{药}}$), 载药量按下列公式求得。

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

2.3 方法学考察

2.3.1 色谱条件 色谱系统为 Agilent 1260 Infinity II 型 HPLC 系统; 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 4% 冰醋酸-乙腈(52:48); 检测波长 430 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积 10 μL ; 保留

时间 7.8 min 左右; 理论塔板数大于 12 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取姜黄素对照品 24.00 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度线, 配制质量浓度为 472.8 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液。移取相应体积的对照品母液, 用甲醇稀释配制质量浓度分别为 0.76、3.78、18.91、47.28、70.92、94.56、141.84 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取 1 mL “2.1” 项下的 Cur-LF-NPs 溶液至 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声破坏纳米粒, 冷却至室温后用甲醇稀释至刻度线, 即得; 空白 LF-NPs 供试品溶液同法制备。

2.3.4 专属性考察 分别取空白 LF-NPs 供试品溶液、Cur-LF-NPs 供试品溶液和姜黄素对照品溶液按“2.3.1”项下色谱条件进行测定。色谱图见图 1, 空白 LF-NPs 供试品溶液未出现干扰峰, 且 Cur-LF-NPs 供试品溶液和姜黄素对照品溶液出峰时间一致, 证明该色谱方法专属性良好。

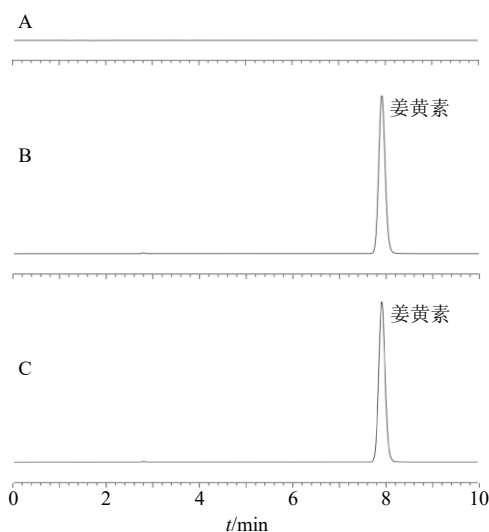


图 1 空白 LF-NPs 溶液 (A)、Cur-LF-NPs 供试品溶液 (B) 和姜黄素对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank LF-NPs solution (A), Cur-LF-NPs test solution (B) and curcumin reference substance (C)

2.3.5 线性关系考察 将“2.3.2”项下配制的 0.76、3.78、18.91、47.28、70.92、94.56、141.84 $\mu\text{g/mL}$ 一系列对照品溶液按“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。以对照品溶液质量浓度为横坐标(X), 对应的峰面积为纵坐标(Y), 得线性回归方程 $Y = 58\,893X - 20\,895$, $R^2 = 0.999\,8$, 结果表明姜黄素在 0.76~141.84 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.6 精密度试验 取低、中、高质量浓度(0.76、47.28、141.84 $\mu\text{g/mL}$)的姜黄素对照品溶液, 按

“2.3.1”项下的色谱条件,在同一天 9:00、15:00、21:00 时,将每个质量浓度连续进样 3 次,计算不同时间点间峰面积的 RSD 值,分别为 0.72%、0.12%、0.18%,可见日内精密度良好。连续 3 d 在 9:00 时将每个质量浓度连续进样 3 次,计算 3 d 间峰面积的 RSD 值,分别为 0.89%、0.44%、0.46%,可见日间精密度良好。

2.3.7 重复性试验 取新鲜制备的 Cur-LF-NPs 溶液,按“2.3.3”项下方法平行制得 6 份供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析。结果显示姜黄素平均质量浓度为 298.6 $\mu\text{g/mL}$, RSD 为 0.48%,表明该方法重复性良好。

2.3.8 稳定性试验 取“2.3.4”项下方法处理后的供试品溶液,于 0、6、12、24、48 h 进样测定姜黄素含量,计算其 RSD 为 1.48%,结果显示供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.9 加样回收率试验 按“2.1”项下方法配制一定质量浓度的 Cur-LF-NPs 供试品溶液,精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,超声破坏纳米粒后用甲醇稀释至刻度线,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算供试品质量浓度。取 9 份 1 mL 上述供试品溶液分别置于 10 mL 量瓶中,分为 3 组,每组 3 份;分别加入 1 mL 70.92、94.56、141.84 $\mu\text{g/mL}$ 姜黄素对照品溶液,同上法破坏纳米粒后进样测定,计算姜黄素的加样回收率。结果显示,各组样品的平均回收率分别为 96.3%、95.1%、96.1%,RSD 分别为 1.07%、1.03%、0.95%,可见本实验回收率良好。

2.4 单因素实验

根据前期预实验结果,对反溶剂/溶剂体积比、乳铁蛋白/姜黄素投料比、pH 值、磁搅转速、超声时间和超声功率进行单因素考察实验,以包封率和粒径作为评价指标,为后续 Box-Behnken 设计优化实验初筛对 Cur-LF-NPs 制备过程中影响较大的实验因素。

2.4.1 反溶剂/溶剂体积比 固定乳铁蛋白/姜黄素投料比 10:1, pH 值为 6、磁搅转速 400 r/min、探针超声 (45 W、2 min)。考察反溶剂/溶剂体积比为 4:1、8:1、12:1、16:1、20:1 时对 Cur-LF-NPs 包封率和粒径的影响,结果见表 1。文献数据^[27]表明,乳铁蛋白具有亲水区和疏水区,姜黄素主要依靠疏水作用力和氢键作用力与之结合。制备过程中,药物分子需要进入靶标蛋白结合空腔,因此,加入适量的乙醇可以与存在于靶标蛋白结合空腔中的水

表 1 反溶剂/溶剂体积比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Investigation of anti-solvent/solvent volume ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

反溶剂/溶剂体积比	包封率/%	粒径/nm
4:1	48.2 $\pm$ 3.6	168.2 $\pm$ 12.5
8:1	89.6 $\pm$ 1.5	124.5 $\pm$ 5.8
12:1	95.8 $\pm$ 0.6	119.3 $\pm$ 3.4
16:1	92.6 $\pm$ 1.8	114.5 $\pm$ 5.6
20:1	87.1 $\pm$ 2.3	131.6 $\pm$ 8.2

形成氢键,以促进空腔中水分子的外排^[28],从而增加姜黄素与靶标蛋白结合空腔的缔合效率,提高药物包封率。然而,制备体系中如果存在大量的乙醇便会与蛋白质之间形成氢键,从而破坏其内部原有的氢键结构使蛋白质变性^[29],引起蛋白质沉淀、溶液浑浊,药物包封率降低。由表 1 可知,当反溶剂/溶剂体积比小于 4:1 时,体系中含有较大比例的乙醇,包封率较低;随着反溶剂/溶剂体积比增加至 8:1 及以上时,包封率显著增大;当反溶剂/溶剂比超过 16:1 时,体系中较低的乙醇含量不能提供足够的去溶剂化能,即无法较好地排出靶标蛋白结合空腔中的水使更多的姜黄素进入其内,故包封率出现降低。本实验结果表明,反溶剂/溶剂体积比为 12:1 时包封率最高,且 8:1~16:1 粒径变化趋势不明显,因此,选择这一范围进行后续 Box-Behnken 设计优化实验。

2.4.2 乳铁蛋白/姜黄素投料比 固定反溶剂/溶剂体积比 12:1、pH 值为 6、磁搅转速为 400 r/min、探针超声 (45 W、2 min)。考察乳铁蛋白/姜黄素投料比为 6:1、8:1、10:1、12:1、14:1 对 Cur-LF-NPs 包封率和粒径的影响,结果见表 2。随着乳铁蛋白/姜黄素投料比不断增大,纳米粒包封率呈增大的趋势,粒径呈减小的趋势。当投料比为 8:1~14:1 时,纳米粒包封率和粒径变化皆趋向平稳,

表 2 乳铁蛋白/姜黄素投料比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Investigation of lactoferrin/curcumin weight ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

乳铁蛋白/姜黄素投料比	包封率/%	粒径/nm
6:1	68.2 $\pm$ 3.2	184.6 $\pm$ 8.3
8:1	87.2 $\pm$ 1.4	135.5 $\pm$ 5.3
10:1	91.8 $\pm$ 1.2	116.8 $\pm$ 9.2
12:1	95.1 $\pm$ 0.3	102.3 $\pm$ 2.8
14:1	96.4 $\pm$ 0.2	96.2 $\pm$ 1.2

包封率在 87.2%~96.4%，粒径为 96.2~135.5 nm。同时考虑到乳铁蛋白/姜黄素投料比影响纳米粒的载药量，故选择乳铁蛋白/姜黄素投料比为 8:1~12:1 进行后续 Box-Behnken 设计优化实验。

2.4.3 pH 值 固定反溶剂/溶剂体积比 12:1、乳铁蛋白/姜黄素投料比 10:1、磁搅转速 400 r/min、探针超声 (45 W、2 min)。考察 pH 值 4、5、6、7 对 Cur-LF-NPs 包封率和粒径的影响，结果见表 3。当 pH 值从 4 变化至 6 时，包封率逐渐增大；从 pH 值 6 变化至 7 时，包封率出现下降，原因可能是姜黄素的酚羟基在靠近中性至碱性条件下不稳定造成的。且 pH 值为 6 时纳米粒粒径最小，故选择 pH 值范围为 5~7 进行后续 Box-Behnken 设计优化实验。

表 3 pH 值考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Investigation of pH values ($\bar{x} \pm s, n=3$)

pH 值	包封率/%	粒径/nm
4	68.4±3.4	133.5±5.5
5	82.3±2.3	162.4±6.2
6	91.8±1.2	123.3±3.8
7	86.1±2.6	149.5±4.2

2.4.4 磁搅转速 固定反溶剂/溶剂体积比 12:1、乳铁蛋白/姜黄素投料比 10:1、pH 值为 6、探针超声 (45 W、2 min)。考察磁搅转速 200、400、600、800 r/min 对 Cur-LF-NPs 包封率和粒径的影响，结果见表 4。磁搅速度对包封率无显著影响；当磁搅转速从 200 r/min 增至 400 r/min 时，粒径明显减小，继续增加磁搅速度对粒径无显著影响。故选择磁搅速度为 400 r/min。

2.4.5 超声时间 固定反溶剂/溶剂体积比 12:1、乳铁蛋白/姜黄素投料比 10:1、pH 值为 6、磁搅转速 400 r/min、探针超声功率为 45 W。考察超声时间 0、2、5 min 对 Cur-LF-NPs 包封率和粒径的影响，结果见表 5。探针超声 2 min 与不超声相比，包封率略降低，粒径因为超声强烈的剪切作用而变小；

表 4 磁搅转速考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Investigation of magnetic stirring speed ($\bar{x} \pm s, n=3$)

磁搅转速/(r·min ⁻¹)	包封率/%	粒径/nm
200	91.2±1.6	143.3±6.2
400	94.3±1.3	122.1±3.5
600	91.8±1.5	123.8±3.6
800	92.2±2.8	118.6±2.3

表 5 超声时间考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Investigation of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	包封率/%	粒径/nm
0	93.2±0.6	116.8±4.6
2	92.7±1.5	101.2±2.9
5	85.1±1.2	146.6±7.3

但超声 5 min 时，较长的超声时间破坏了纳米体系的稳定性使药物泄漏，导致包封率明显降低、粒径显著增大，故选择超声时间为 2 min。

2.4.6 超声功率 固定反溶剂/溶剂体积比 12:1、乳铁蛋白/姜黄素投料比 10:1、pH 值为 6、磁搅转速 400 r/min、探针超声时间 2 min。考察超声功率 45、90、180 W 对 Cur-LF-NPs 包封率和粒径的影响，结果见表 6。超声功率对包封率和粒径的影响，同超声时间影响结果类似，故选择超声功率为 90 W。

表 6 超声功率考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Investigation of ultrasonic power ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声功率/W	包封率/%	粒径/nm
45	92.5±1.8	112.8±5.2
90	95.9±0.2	104.3±3.5
180	87.2±2.5	148.6±8.2

2.5 Box-Behnken 设计优化实验

2.5.1 Box-Behnken 设计实验因素 基于单因素实验结果，选择对 Cur-LF-NPs 制备过程中影响较大的 3 个因素作为考察因素，分别为反溶剂/溶剂体积比 (X_1)、乳铁蛋白/姜黄素投料比 (X_2) 和 pH 值 (X_3)，每因素设置 3 水平，以代码值表示：-1 (低水平)、0 (中水平)、+1 (高水平)；以包封率 (Y_1)、粒径 (Y_2) 和多分散系数 (polydispersity index, PDI, Y_3) 3 者经 CRITIC 权重分析加权后的综合评分 (Y) 作为评价指标，使用 Design Expert 10 软件对数据进行拟合并验证优化后的工艺。因素与水平见表 7。

2.5.2 CRITIC 权重分析法 CRITIC 法是以各评价指标间对比强度与冲突性为理论基础的客观权重赋值法，其中对比强度是指同一指标中不同方案取值的差距大小，以标准差表示，标准差越大，权重越大；冲突性又称相关性，2 个指标间相关性越强则冲突性越低，权重越小。此法适合于多指标评价体系^[30]。各指标权重分析前，先将星点设计实验得到的各指标数据进行归一化处理，转换为 0~1 的标准化数值。对于包封率来说取值越大越好，以公式

$S_{\text{包封率}} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ 进行数据转换; 对于粒径、PDI 来说取值越小越好, 以公式 $S_{\text{粒径/PDI}} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ 进行数据转换。然后通过网站 SPSS AU 进行权重分析, 结果见表 8。包封率、粒径和 PDI 的权重系数分别为 30.82%、26.37%、42.81%, 加权后综合得分公式为 $Y = (S_{\text{包封率}} \times 0.31 + S_{\text{粒径}} \times 0.26 + S_{\text{PDI}} \times 0.43)$, 实验结果见表 7。

表 7 Box-Behnken 实验设计和结果

Table 7 Experiment and results of Box-Behnken design

序号	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	Y_2/nm	Y_3	Y
1	16 (+1)	10 (0)	7 (+1)	88.0	72.6	0.078	82.5
2	8 (-1)	10 (0)	5 (-1)	73.5	186.2	0.199	12.7
3	16 (+1)	8 (-1)	6 (0)	95.3	79.4	0.067	93.6
4	12 (0)	10 (0)	6 (0)	90.5	76.6	0.083	84.2
5	16 (+1)	10 (0)	5 (-1)	93.3	77.6	0.118	80.9
6	12 (0)	12 (+1)	5 (-1)	91.3	97.8	0.106	76.0
7	12 (0)	10 (0)	6 (0)	92.7	80.4	0.087	85.7
8	12 (0)	10 (0)	6 (0)	91.1	79.4	0.096	81.8
9	16 (+1)	12 (+1)	6 (0)	94.3	67.6	0.048	98.6
10	12 (0)	12 (+1)	7 (+1)	92.8	86.9	0.084	85.0
11	12 (0)	10 (0)	6 (0)	92.2	82.5	0.092	83.5
12	8 (-1)	8 (-1)	6 (0)	80.5	145.8	0.262	18.8
13	8 (-1)	12 (+1)	6 (0)	85.7	121.1	0.164	51.3
14	12 (0)	10 (0)	6 (0)	91.5	77.3	0.820	85.6
15	12 (0)	8 (-1)	5 (-1)	85.5	103.4	0.160	55.7
16	12 (0)	8 (-1)	7 (+1)	87.9	108.4	0.142	61.6
17	8 (-1)	10 (0)	7 (+1)	82.2	150.4	0.256	21.4

表 8 CRITIC 分析结果

Table 8 Results of CRITIC

指标	指标对比强度	指标冲突性	权重/%
包封率	0.263	0.224	30.82
粒径	0.280	0.180	26.37
PDI	0.298	0.275	42.81

2.5.3 Box-Behnken 设计实验结果与分析 Box-Behnken 设计因素及实验结果经 Design Expert 10 拟合后符合 2 次多项回归模型: $Y = 84.18 + 31.43 X_1 + 10.15 X_2 + 3.15 X_3 - 6.88 X_1 X_2 - 1.78 X_1 X_3 + 0.77 X_2 X_3 - 19.40 X_1^2 + 0.80 X_2^2 - 15.40 X_3^2$, 其显著性检验结果见表 9。该模型的 $P < 0.000 1$ (极显著), 且失拟项的 $P = 0.277 1 > 0.05$ (不显著), 证明 2 次多项回归模型能较好的反应综合评分 (Y) 与反溶剂/溶剂体积比 (X_1)、乳铁蛋白/姜黄素投料比 (X_2) 和

表 9 响应面二次回归模型的方差分析

Table 9 ANOVA for response surface quadratic model

误差源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	11 737.31	9	1 304.15	381.68	<0.000 1
X_1	7 900.25	1	7 900.25	2 312.14	<0.000 1
X_2	824.18	1	824.18	241.21	<0.000 1
X_3	79.38	1	79.38	23.23	0.001 9
$X_1 X_2$	189.06	1	189.06	55.33	0.000 1
$X_1 X_3$	12.60	1	12.60	3.69	0.096 3
$X_2 X_3$	2.40	1	2.40	0.70	0.429 2
X_1^2	1 585.08	1	1 585.08	463.90	<0.000 1
X_2^2	2.68	1	2.68	0.78	0.405 4
X_3^2	998.89	1	998.89	292.34	<0.000 1
残差	23.92	7	3.42		
失拟项	13.93	3	4.64	1.86	0.277 1
净误差	9.99	4	2.50		
总离差	1 1761.23	16			

pH 值 (X_3) 之间的关系。模型的变异系数为 2.71, 表明模型稳定; 决定系数和校正决定系数分别为 0.998 0、0.995 4, 表明模型具有良好的拟合程度, 并能解析 99.54% 响应面值变化情况; 预测决定系数为 0.979 7, 表明该模型具有较好的预测性。

各因素交互作用的三维效应面图和二维等高线图如图 2 所示, 其中固定 1 个因素, 绘制另外 2 个因素的交互作用对综合评分的影响情况。为了得到较高的载药量, 根据软件预测的最佳制备工艺为反溶剂/溶剂体积比为 16:1、乳铁蛋白/姜黄素投料比为 8:1、pH 值为 6, 在此条件下预测的综合评分结果为 93.7, 合意性为 0.971。

2.5.4 处方工艺的验证实验 测定最佳制备工艺条件下的 3 个批次的包封率、粒径和 PDI, 按 “2.5.2” 求得综合评分并与预测值相比较, 计算实际值与预测值之间的偏差, 结果见表 10。3 个批次的平均相对偏差为 1.2%, 可知实测值与预测值的结果相近且验证实验的重复性较好, 证明了使用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 Cur-LF-NPs 制备工艺结果可靠、重现性高。

偏差 = (实际值 - 预测值) / 预测值

2.6 纳米粒形态观察

由图 3-A 可知, 优化后的纳米粒制剂外观呈清透亮的黄色, 无沉淀和不溶性微粒存在。使用 TEM 观察纳米粒的微观形貌, 用滴管吸取少量 Cur-LF-NPs 并滴加于专用铜网上, 使用 2.0% 磷钨酸钠

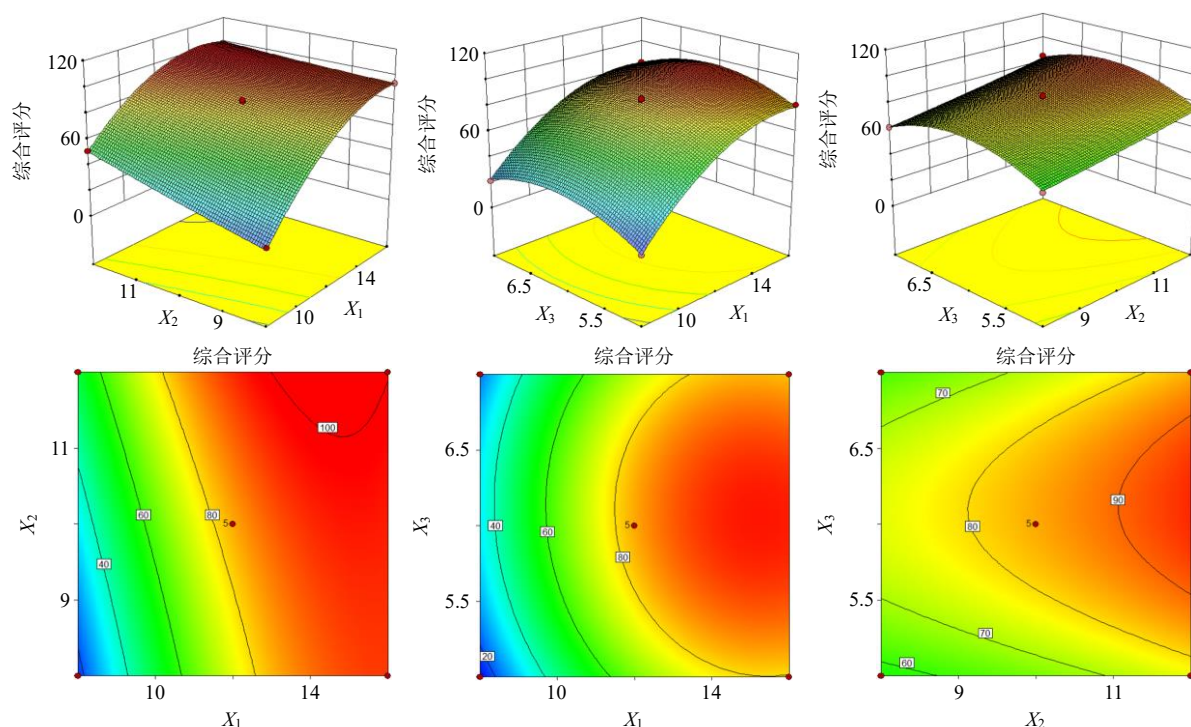


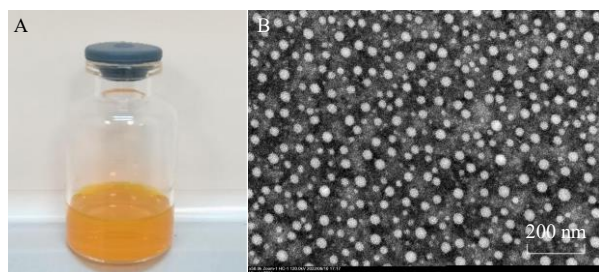
图 2 各因素对综合评价的效应面和等高线图

Fig. 2 Effect surface chart and contour map of various factors on comprehensive score

表 10 验证实验结果

Table 10 Results of confirmatory experiment

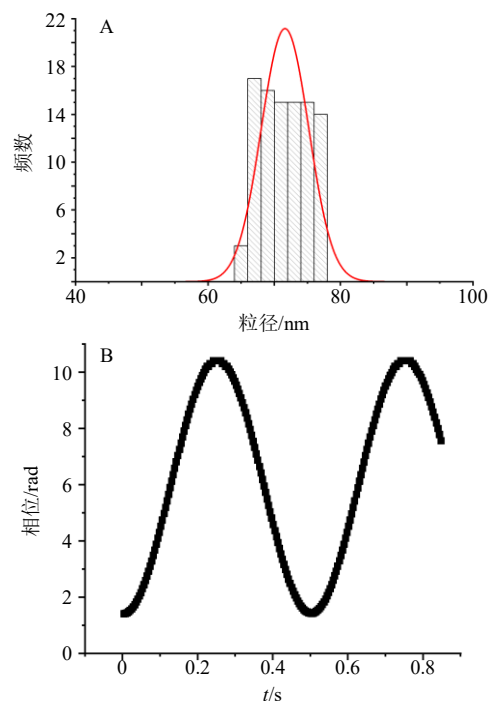
批次	包封率/ %	粒径/ nm	PDI	综合评价		偏差/ %
				实测值	预测值	
1	95.0	68.5	0.082	92.5	93.7	-1.2
2	95.3	73.9	0.070	94.2		0.5
3	96.4	67.4	0.096	92.0		-1.8

图 3 Cur-LF-NPs 的外观 (A) 和 TEM 图 (B, $\times 50\,000$)
Fig. 3 Appearance (A) and TEM (B, $\times 50\,000$) of Cur-LF-NPs

负染色, 自然挥干后观察。TEM 图 3-B 显示纳米粒呈规则圆球状。

2.7 粒径、 ζ 电位、包封率和载药量的测定

使用 NanoBrook 90 Plus PALS 粒度仪对优化后的纳米粒进行粒径和电位的测定, 结果见图 4。平行多组实验后 Cur-LF-NPs 的平均粒径为 (72.6 ± 5.2) nm; 多分散指数 (polydispersity index, PDI)

图 4 Cur-LF-NPs 的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B) 图Fig. 4 Particle size (A) and ζ potential (B) of Cur-LF-NPs

为 0.084 ± 0.015 ; ζ 电位值为 (24.5 ± 3.7) mV。优化后的纳米粒粒径小于 100 nm 且分布均一, 体系带正电荷, 呈现良好的稳定性。

按照“2.2”项下所述方法测定优化后的纳米粒的包封率与载药量, 平行多组实验得出 Cur-LF-NPs

的包封率为 $(94.8 \pm 1.6)\%$ 、载药量为 $(10.2 \pm 0.5)\%$ ，表明其具有良好的载药能力。

2.8 稳定性试验

2.8.1 物理稳定性 作为药物递送系统，需要考察 Cur-LF-NPs 在各体系中的物理稳定性。取适量 Cur-LF-NPs，分别加入超纯水、生理盐水、PBS 缓冲液 (pH 7.4、5.0) 和含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释 10 倍。混匀后滴加于 96 孔板中，在恒温振荡器中以 37 °C、100 r/min 的条件孵育 24 h，以相应的溶剂作为阴性对照，每组设置 3 个复孔。分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 用酶标仪测定各体系在 685 nm 波长下的吸光度 (A) 值，结果见图 5。可知 24 h 内各体系中的 Cur-LF-NPs 在 685 nm 波长处的 A 值变化情况稳定，未见纳米粒团聚或崩解产生较强的光散射^[31]，初步证明 Cur-LF-NPs 的物理稳定性良好。

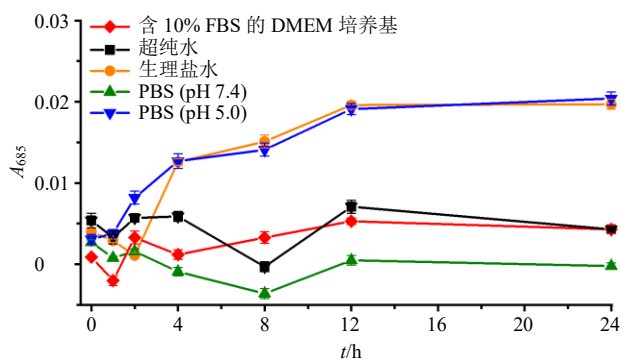


图 5 Cur-LF-NPs 在各体系中的物理稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Physical stability of Cur-LF-NPs in various systems ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8.2 储存稳定性 将 Cur-LF-NPs 分别置于室温 25 °C (7 d) 和冰箱 4 °C (30 d) 条件下，记录粒径和 PDI 值随储存时间的变化情况，结果见表 11。可知纳米粒在室温 2 d 内粒径、PDI 几乎无变化，从第 5 天开始粒径和 PDI 的增长速率明显加快但肉眼未见纳米粒团聚现象，到第 7 天开始出现不溶性微粒。纳米粒在 4 °C 冰箱内放置 30 d 内粒径和 PDI 较稳定。

2.9 冷冻干燥工艺考察

选择 0.5%、2%、5% 的甘露醇、乳糖和海藻糖作为冻干保护剂，以冻干前后粒径、PDI 和 ζ 电位值的变化情况优选合适的冻干保护剂及用量，结果见表 12。选择 2% 的海藻糖作为冻干保护剂，制得的冻干品复溶后的粒径、PDI 和 ζ 电位值与冻干前的参数基本一致。冻干品外观图见图 6，形为饱满

表 11 Cur-LF-NPs 在室温和 4 °C 条件下的储存稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Storage stability of Cur-LF-NPs at room temperature and 4 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	室温 (25 °C)		t/d	4 °C	
	平均粒径/nm	PDI		平均粒径/nm	PDI
0	73.6 ± 2.3	0.103 ± 0.013	0	70.2 ± 1.5	0.093 ± 0.007
1	82.2 ± 5.5	0.076 ± 0.025	2	70.5 ± 2.8	0.102 ± 0.015
2	74.4 ± 4.2	0.088 ± 0.023	4	76.4 ± 5.2	0.094 ± 0.019
3	98.8 ± 8.7	0.104 ± 0.015	7	84.6 ± 8.1	0.094 ± 0.005
4	107.4 ± 10.6	0.108 ± 0.031	12	94.5 ± 1.4	0.099 ± 0.010
5	136.8 ± 5.9	0.134 ± 0.035	18	95.2 ± 3.9	0.121 ± 0.015
6	152.4 ± 10.5	0.164 ± 0.033	25	97.5 ± 6.2	0.116 ± 0.018
7	189.5 ± 22.7	0.236 ± 0.059	30	97.7 ± 4.6	0.093 ± 0.024

表 12 冻干工艺考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 Study on freeze-drying process ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
冻干前	76.5 ± 4.2	0.078 ± 0.010	22.6 ± 1.1
无冻干保护剂	95.2 ± 1.0	0.090 ± 0.021	9.2 ± 1.5
0.5%乳糖	148.9 ± 17.4	0.267 ± 0.020	8.1 ± 0.9
2%乳糖	191.4 ± 10.2	0.264 ± 0.012	15.2 ± 2.2
5%乳糖	297.4 ± 64.3	0.369 ± 0.026	10.9 ± 1.9
0.5%甘露醇	87.2 ± 0.8	0.096 ± 0.028	7.3 ± 0.7
2%甘露醇	115.3 ± 8.5	0.151 ± 0.022	15.8 ± 1.4
5%甘露醇	386.2 ± 41.9	0.373 ± 0.086	12.1 ± 0.6
0.5%海藻糖	72.3 ± 2.6	0.183 ± 0.016	9.9 ± 1.6
2%海藻糖	73.4 ± 1.9	0.097 ± 0.015	21.3 ± 0.5
5%海藻糖	77.2 ± 3.8	0.165 ± 0.024	6.2 ± 0.4



图 6 冻干品外观

Fig. 6 Appearance of lyophilized product

圆整的饼状样，色泽均一，复溶时间短。

2.10 体外释放实验

采用透析袋法考察姜黄素原料药溶液与 Cur-LF-NPs 的体外释放情况。各取 1 mL 姜黄素 50% DMSO 溶液与 Cur-LF-NPs 分别装入蒸馏水洗涤后的透析

袋中, 质量浓度均为 300 $\mu\text{g/mL}$ 。随后浸入预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 30 mL 含 30%乙醇的 PBS 缓冲液中 (pH 7.4、5.0)。恒温摇床的水浴温度为 (37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 转速为 100 r/min, 分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 完全更换等体积的释放介质, 平行 3 组实验, 用 HPLC 法测定透析液中姜黄素的质量浓度, 按公式计算累积释放度 (Q), 结果见图 7。

$$Q = (V \times \sum_{i=1}^n C_i) / M$$

V 为释放介质体积, C_i 为各个时间点测得的姜黄素质量浓度, M 为初始透析袋内药物含量

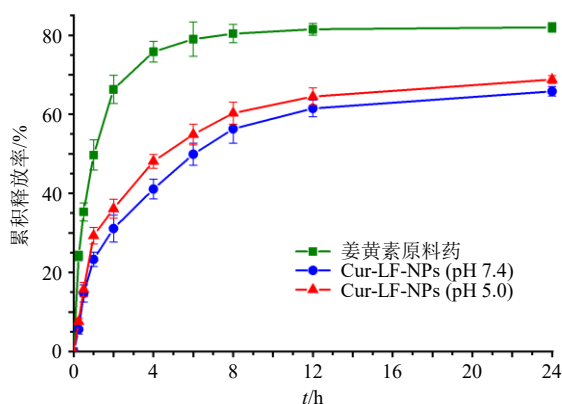


图 7 姜黄素原料药和 Cur-LF-NPs 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 *In vitro* release curves of curcumin solution and Cur-LF-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

由图 7 可知, Cur-LF-NPs 相较于姜黄素原料药具有一定的缓释效果; 且 Cur-LF-NPs 在中性 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 和酸性 PBS 缓冲液 (pH 5.0) 中的释放行为相似。通过 Origin 2018 软件, 分别应用零级方程、一级方程和 Higuchi 方程对两者的体外释放行为进行拟合, 结果见表 13。姜黄素原料药和 Cur-LF-NPs 体外释放均符合一级方程, 证明了 2 者通过扩散控制机制主导姜黄素的释放行为^[32]。

3 讨论

姜黄素极难溶于水, 制成纳米制剂后其抗肿瘤效果得到明显改善^[33]。经实验测得其在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下于水中的饱和溶解度仅为 (11.33 $\pm$ 0.73) ng/mL, 因此改善姜黄素在水中的分散性是促进其临床发展应用的前提。乳铁蛋白作为多功能糖蛋白^[17], 既可作为配体修饰于载体上发挥靶向作用; 也可充当载体递送活性药物、其本身也是活性分子具有抗微生物、抗癌和神经保护等药理作用。本实验拟设计、筛选 Cur-LF-NPs 的制备工艺, 以期获得充分发挥乳

表 13 姜黄素原料药和 Cur-LF-NPs 体外释放的拟合结果
Table 13 Fitting results of *in vitro* release of curcumin solution and Cur-LF-NPs

样品	拟合模型	拟合结果	R^2
姜黄素 (pH 7.4)	零级方程	$Q = 1.96 t + 52.27$	0.375 6
	一级方程	$Q = 79.80(1 - e^{-1.05 t})$	0.979 0
	Higuchi 方程	$Q = 12.83 t^{1/2} + 36.76$	0.654 3
Cur-LF-NPs (pH 7.4)	零级方程	$Q = 2.58 t + 20.05$	0.631 0
	一级方程	$Q = 62.22(1 - e^{-0.33 t})$	0.974 9
	Higuchi 方程	$Q = 14.86 t^{1/2} + 6.32$	0.896 6
Cur-LF-NPs (pH 5.0)	零级方程	$Q = 2.59 t + 23.57$	0.574 9
	一级方程	$Q = 63.70(1 - e^{-0.43 t})$	0.974 3
	Higuchi 方程	$Q = 15.25 t^{1/2} + 9.16$	0.860 7

铁蛋白靶向、运载和治疗活性作用的姜黄素纳米制剂, 并用于后期脑部神经退行性疾病的治疗。

本实验采用去溶剂化法制备 Cur-LF-NPs, 通过单因素考察结合 Box-Behnken 设计-效应面法筛选最佳制备处方工艺。优选反溶剂/溶剂体积比, 利用适当的乙醇去溶剂化能使姜黄素紧密的结合于乳铁蛋白的疏水区域; 优选乳铁蛋白/姜黄素投料比, 以期最大程度的发挥乳铁蛋白的载体利用率从而提高纳米粒的载药量; 优选 pH 值, 为纳米粒的生成和稳定提供适宜的条件。优化后的 Cur-LF-NPs 粒径小于 100 nm, 有利于穿过紧密的脑组织间隙到达作用部位; 且该纳米粒具有理想的包封率 (94.8 $\pm$ 1.6) % 和载药量 (10.2 $\pm$ 0.5) %; 其体外释放 24 h 后累积释放量达 60% 以上, 相较于姜黄素原料药展现出一定的缓释效果。

对于体外释放研究, 在前期预实验中, 采取每个时间点进行取液并补液的方法, 但随着纳米粒释放时间的延长, 透析袋内外游离姜黄素质量浓度差越来越小, 使其后的释放不能满足最佳漏槽条件。透析袋内纳米粒释放出的游离姜黄素未能及时透过透析袋而在其内形成了大量结晶, 且经透析 72 h 后仍无法释放, 累积释放量仅为 (28.3 $\pm$ 2.6) %。故正式实验时采取每个时间点完全更换释放介质的动态透析方法进行体外释放研究, 这与体内不断流动、更替的体液循环相似。

储存稳定性考察中, 发现 Cur-LF-NPs 溶液的稳定性受时间、温度等因素影响较大, 且在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的稳定性也仅为 1 个月左右, 这不利于其长期储存备用。因此, 拟通过将 Cur-LF-NPs 制备成冻干粉以延长其稳定时间。冷冻干燥技术是储存和稳定纳

米粒的常用方法,但蛋白质的高级结构可能会在长时间的低温冷冻和干燥失水的情况下受到破坏。糖类作为常见的冻干保护剂,可提供羟基替代失去的水的羟基与蛋白质结合,从而稳定蛋白质原有的氢键结构,称为“水替代假说”^[34]。经本实验筛选,2%的海藻糖作为冻干保护剂能较好的稳定 Cur-LF-NPs 的物理化学性质,冻干复溶前后未见明显的粒径、PDI 和 ζ 电位值的变化。

综上,本实验通过 Box-Behnken 设计-效应面法筛选制备了一种工艺简单、绿色安全且性质稳定的 Cur-LF-NPs,为后续该纳米制剂的体内脑靶向研究和相关神经退行性疾病的药效评价提供了稳定的制剂基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李曼菱,邹志余,张蕊.姜黄素的临床应用研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(43): 51.
- [2] Mehanny M, Hathout R M, Geneidi A S, *et al.* Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; Curcumin and its derivatives [J]. *J Control Release*, 2016, 225: 1-30.
- [3] Jiang J L, Jin X L, Zhang H, *et al.* Identification of antitumor constituents in curcuminoids from *Curcuma longa* L. based on the composition-activity relationship [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70: 664-670.
- [4] Reddy P H, Manczak M, Yin X, *et al.* Protective effects of Indian spice curcumin against amyloid- β in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(3): 843-866.
- [5] del Prado-Audelo M L, Caballero-Florán I H, Meza-Toledo J A, *et al.* Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(2): 56.
- [6] 刘小艳,田野,刘骥飞,等.姜黄素对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2019,24(11): 1305-1309.
- [7] 马一星,叶青.突破血脑屏障纳米药物递送系统的研究进展[J].中国药事,2016,30(2): 141-149.
- [8] Singh M, Devi S, Rana V S, *et al.* Delivery of phytochemicals by liposome cargos: Recent progress, challenges and opportunities [J]. *J Microencapsul*, 2019, 36(3): 215-235.
- [9] Shinde R L, Devarajan P V. Docosahexaenoic acid-mediated, targeted and sustained brain delivery of curcumin microemulsion [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 152-161.
- [10] Zhang L, Yang S L, Wong L R, *et al.* *In vitro* and *in vivo* comparison of curcumin-encapsulated chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and curcumin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes administered intranasally as therapeutic strategies for Alzheimer's disease [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(11): 4256-4269.
- [11] Pitombeira N A O, Veras Neto J G, Silva D A, *et al.* Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117: 610-615.
- [12] Lin T T, Liu E G, He H N, *et al.* Nose-to-brain delivery of macromolecules mediated by cell-penetrating peptides [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(4): 352-358.
- [13] Mourtas S, Canovi M, Zona C, *et al.* Curcumin-decorated nanoliposomes with very high affinity for amyloid- β 1-42 peptide [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1635-1645.
- [14] 赵超越,张云杰,姜晓艺,等.乳铁蛋白作为靶向功能分子的研究进展[J].中国生化药物杂志,2014,34(9): 181-184.
- [15] El-Fakharany E M. Nanoformulation of lactoferrin potentiates its activity and enhances novel biotechnological applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt A): 970-984.
- [16] Sabra S, Agwa M M. Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutical and nanotechnological applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 1046-1060.
- [17] Elzoghby A O, Abdelmoneem M A, Hassanin I A, *et al.* Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand [J]. *Biomaterials*, 2020, 263: 120355.
- [18] 唐慧娴,张振海,赵志英,等.乳铁蛋白作为药物载体的研究进展[J].药学学报,2015,50(6): 675-681.
- [19] Wang B, Timilsena Y P, Blanch E, *et al.* Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(4): 580-596.
- [20] Kumari S, Kondapi A K. Lactoferrin nanoparticle mediated targeted delivery of 5-fluorouracil for enhanced therapeutic efficacy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 232-237.
- [21] Kondapi A K. Targeting cancer with lactoferrin nanoparticles: Recent advances [J]. *Nanomedicine*, 2020, 15(21): 2071-2083.
- [22] Ndayisaba A, Kaundlstorfer C, Wenning G K. Iron in neurodegeneration - Cause or consequence? [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 180.
- [23] Pandey A P, More M P, Karande K P, *et al.* Optimization of desolvation process for fabrication of lactoferrin nanoparticles using quality by design approach [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(6): 1-14.

- [24] Zhang Z H, Wang X P, Ayman W Y, *et al.* Studies on lactoferrin nanoparticles of gambogic acid for oral delivery [J]. *Drug Deliv*, 2013, 20(2): 86-93.
- [25] Hasanpoor Z, Mostafaie A, Nikokar I, *et al.* Curcumin-human serum albumin nanoparticles decorated with PDL1 binding peptide for targeting PDL1-expressing breast cancer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 159: 137-153.
- [26] 吴斯宇, 曾盈蓉, 唐聘, 等. 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 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6834-6844.
- [27] Araújo J F, Bourbon A I, Simões L S, *et al.* Physicochemical characterisation and release behaviour of curcumin-loaded lactoferrin nanohydrogels into food simulants [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 305-317.
- [28] 邵胜男. 酶交联及乙醇去溶剂化法制备乳清蛋白-锌纳米微粒及其特性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [29] 蒋良. 浅谈对蛋白质变性及其变化形式的认识 [J]. *化学教与学*, 2017(6): 9-12.
- [30] 王敏, 林茂, 高仕琴, 等. 白藜芦醇纳米粒的制备及其对阿尔茨海默模型大鼠认知功能影响的初步考察 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2020, 37(5): 412-418.
- [31] 钟雪梅, 鲜静, 石金凤, 等. 红细胞膜包被的雷公藤甲素-红素仿生共载脂质体的制备及表征研究 [J]. *药学报*, 2021, 56(12): 3252-3260.
- [32] Tai K D, Rappolt M, He X Y, *et al.* Effect of β -sitosterol on the curcumin-loaded liposomes: Vesicle characteristics, physicochemical stability, *in vitro* release and bioavailability [J]. *Food Chem*, 2019, 293: 92-102.
- [33] 张惜琴, 范媛媛, 梁靓靓, 等. 姜黄素纳米制剂抗消化系统肿瘤的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(7): 1440-1445.
- [34] 李文慧, 王珏, 李玲, 等. 海藻糖水替代机制对冻干红细胞保护作用的探讨 [J]. *中国输血杂志*, 2018, 31(3): 240-243.

[责任编辑 郑礼胜]