基于质量源于设计（QbD）制备大黄素固体脂质纳米粒

李　楠，邓艳平*

福建医科大学药学院，福建 福州　350122

摘　要：目的　通过质量源于设计（quality by design，QbD）理论制备大黄素固体脂质纳米粒（emodin solid lipid nanoparticle，Emo-SLN）。**方法**　利用鱼骨法和使用故障模式、影响和危害性分析（failure mode and effects criticality analysis，FMECA）方法筛选出关键质量属性（critical quality attributes，CQAs）、关键物料属性（critical material attributes，CMAs）以及关键工艺参数（critical process parameters，CPPs），并采用熔融-乳化法制备固体脂质纳米粒，用 Box-Behnken 设计（Box-Behnken design，BBD）优化制剂。**结果**　确定 CMAs 为脂质、表面活性剂、药脂比；CPPs 为超声功率；CQAs 为粒径、ζ 电位、包封率、载药量、体外释放率。通过 BBD 优化制剂，测得其 CMAs：脂质单辛酸丙二醇酯（Capryol™ 90），表面活性剂聚氧乙烯氢化蓖麻油（Cremophor® RH40），药脂比 1∶170；CPPs：超声功率 216 W；CQAs：粒径（138.900±1.143）nm，ζ 电位（−21.90±0.50）mV，包封率（98.28±1.43）%、载药量（0.23±0.01）%、体外释放表现为在 48 h 内累积释放率达 80%，具有缓释特性。**结论**　该项目利用 QbD 成功制备质量符合 CQAs 要求的 Emo-SLN，提高其生物利用度，从而促进其临床应用。

关键词：固体脂质纳米粒；质量源于设计；大黄素；熔融-乳化法；体外释放；鱼骨法；关键质量属性；关键物料属性；关键工艺参数；Box-Behnken 设计

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)07 - 2216 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.009

Preparation of solid lipid nanoparticles loaded with emodin based on quality by design principles

LI Nan, DENG Yanping

School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective　To prepare emodin loaded into solid lipid nanoparticles (Emo-SLN) based on the concept of quality by design (QbD). **Methods**　Critical quality attributes (CQAs), critical material attributes (CMAs), and critical process parameters (CPPs) were screened using a fish bone diagram and failure mode and effects criticality analysis (FEMCA). Subsequently, the Emo-SLN were developed using the melt-emulsification method and optimized by Box-Behnken design (BBD). **Results**　The CMAs were identified as lipid, surfactant, and drug-lipid ratio. The CPP was the ultrasound power. The CQAs included particle size, encapsulation rate, drug loading, and *in vitro* release. The formulation was optimized by BBD. Capryol™ 90 (lipid) was selected as the final composition along with Cremophor® RH40 as the surfactant component at a drug-lipid ratio of 1∶170. The ultrasound power was 216 W. The particle size of CQAs was (138.900 ± 1.143) nm, with a ζ potential of (−21.90 ± 0.50) mV and an encapsulation rate of (98.28 ± 1.43)%. Additionally, the drug loading was found to be (0.23 ± 0.01)%, and *in vitro* release demonstrated sustained release characteristics with cumulative release reaching up to 80% within 48 h. **Conclusion**　Emo-SLN meeting the requirements of CQAs was successfully prepared using QbD, which improved its bioavailability for its enhanced clinical application.

Key words: solid lipid nanoparticles; quality by design; emodin; melt-emulsification method; *in vitro* release; fish bone diagram; critical quality attributes; critical material attributes; critical process parameters; Box-Behnken design

纳米制剂的发展将带来更多创新或个性化的疗法，为攻克更多重大疾病带来希望[1]。基于此，常用纳米制剂如脂质体[2-3]、胶束[4-5]、固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticle，SLN）[6-7]等已经得到广

收稿日期：2023-08-18

基金项目：福建省科技厅面上基金（2020J01630）；福建省科技创新联合资金项目（2019Y9010）

作者简介：李　楠（1999—），女，硕士研究生，主要从事药物新制剂和新剂型研究。Tel: 18359879516　E-mail: linan0732@fjmu.edu.cn

***通信作者：**邓艳平，女，博士，副教授，硕士生导师，主要从事药物新制剂和新剂型研究。E-mail: YanpingDeng@fjmu.edu.cn

泛的应用。但纳米制剂的安全性、工艺及质量的可控性、关键设备及辅料对国外的过度依赖性等问题仍是需要应对的挑战[8]。

传统制剂的开发基于质量的检测和生产出发，而引入质量源于设计（quality by design，QbD）理念，改进制造过程，可确保最终产品的质量和安全。QbD 已经广泛应用于美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）和欧洲药物管理局（European Medicines Agency，EMA）。QbD 的基本内容（图 1）是：以预先设定的目标产品质量概况（quality target product profile，QTPP）作为研发的起点，在确定产品关键质量属性（critical quality attributes，CQAs）的基础上，基于风险评估和实验研究，确定关键物料属性（critical material attributes，CMAs）和关键工艺参数（critical process parameters，CPPs），进而建立能满足产品性能且工艺稳健的控制策略，最终完成设计、完善整体战略方案，实施产品和工艺的生命周期管理（包括持续改进）。QbD 原则[9-10]在近年来成功应用于开发纳米制剂递药系统如脂肪乳[11]、纳米粒[12]。

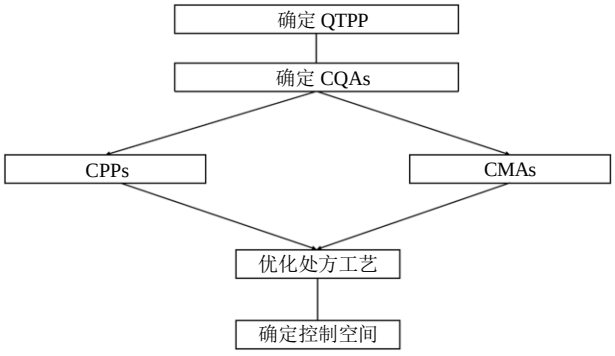

图 1 QbD 理念在处方工艺优化中的实施过程

Fig. 1 Implementation of QbD concept in prescription process optimization

因多酚类药物具有良好抗氧化、肿瘤预防作用，但大部分具有水溶性低、肠道壁通透性差、胃肠道代谢等缺点，阻碍了该类药物研发成口服制剂的发展进程[13]。而大黄素属于典型的多酚类药物，故本实验以大黄素为模型药物，利用 QbD 开发大黄素固体脂质纳米粒（emodin solid lipid nanoparticle，Emo-SLN）。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，安捷伦科技（中国）有限公司；DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器，巩义市予华仪器有限责任公司；ME104 E 型电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；Centrifuge 5430 R 型离心机，德国艾本德生命科学公司；ZQTY 50 型震荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；Sonics 型超声细胞破碎仪，上海书俊仪器设备有限公司；Anton Paar Litesizer™ 500 型激光纳米粒度/电位仪，安东帕（上海）商贸有限公司。

1.2 样品与试剂

单辛酸丙二醇酯（Capryol™ 90，批号 85883-73-4）、油酰聚氧乙烯甘油酯（Labrafil M 1944 CS，批号 192796）、单月桂酸丙二醇酯（Lauroglycol™ 90，批号 127903）、单亚油酸甘油酯（Maisine™，批号 125116）、山嵛酸甘油酯（Compritol 888 ATO，批号 156632）、单双硬脂酸甘油酯（批号 143048）、双硬脂酸甘油酯（Percirol ATO 5，批号 131343）、硬脂酰聚氧乙烯甘油酯（Gelucire 50/13，批号 121651）、月桂酰聚氧乙烯-32 甘油酯（Gelucire 44/14，批号 125008）、二乙二醇单乙醚（Transcutol® HP，批号 145272）均为法国 Gattefossé 公司惠赠；聚乙二醇 400（PEG 400，批号 20101214）、聚山梨酯 20（Tween 20，批号 20200303）、聚山梨酯 80（Tween 80，批号 20100502）均为南京威尔集团有限公司所产；曲拉通 X-100（Triton X-100，批号 20131918）由国药集团化学试剂有限公司所产；中链甘油三酯（MCT，批号 19985）、丙二醇二辛酸酯（propylene dioctanoate，批号 131202）、三乙酸甘油酯（triacetin，批号 Z16J7Y9191）均由北京凤礼精求商贸有限责任公司所产；聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯（Solutol® HS15，批号 96146968E0）、聚氧乙烯氢化蓖麻油（Cremophor® RH40，批号 16894024UO）均为德国 BASF 公司惠赠。大黄素对照品，批号 518-82-1，质量分数≥98%，购于上海麦克林生化科技股份有限公司；甲醇为色谱纯试剂，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Emo-SLN 的 QbD 评价

2.1.1 QTPP 大黄素对光敏感、易氧化分解，为使用和贮存带来不便；且由于大黄素难溶于水，且存在胃肠道代谢，以口服给药为途径，将其制成 SLN，可提高其溶解度，使药物稳定性增加，提高药物在人体的生物利用度的同时还可减少药物剂量，提高患者用药依从性。为改善大黄素难溶和不稳定等一系列问题，以安全、稳定且有效的口服 SLN 为目标产品，通过查阅文献，结合临床用药的特点，总结

上述目标产品的质量概况，结果如表 1 所示。

2.1.2　CQAs　CQAs 是“物理、化学、生物学或微生物学性质或特点，应在适宜的限度、范围或分布内以保证预期药品的质量”[17]。根据大黄素的性质和鱼骨图法[18]，得表 2 及图 2 中的 CQAs 包含的粒径、包封率、载药量、体外释放等参数。

表 1　Emo-SLN 的 QTPP

Table 1　QTPP for Emo-SLN

QTPP	目标
剂型	SLN
给药途径	口服给药
药效学	结肠癌[14]、胰腺癌[15]、乳腺癌[16]
剂量	结肠癌小鼠 ig 50 mg·kg^{-1}、胰腺癌小鼠 ig 50 mg·kg^{-1}、乳腺癌小鼠 ig 400 mg·kg^{-1}

2.1.3　制剂的风险评估　根据 Emo-SLN 的 CQAs，对制剂进行风险评估[19]，以评估每种属性可能对制剂 CQAs 的影响。使用故障模式、影响和危害性分析（failure mode and effects criticality analysis，FMECA）方法（表 3、4）进行评估[20]。

表 2　Emo-SLN 的 CQAs

Table 2　CQAs of Emo-SLN

CQAs	依据
粒径	合适的粒径，有利于药物跨膜吸收
包封率	安全性和有效性、稳定性；包封率过低会导致药物稳定性降低
载药量	安全性和有效性、稳定性；载药量过低药物稳定性降低
体外释放	安全性和有效性

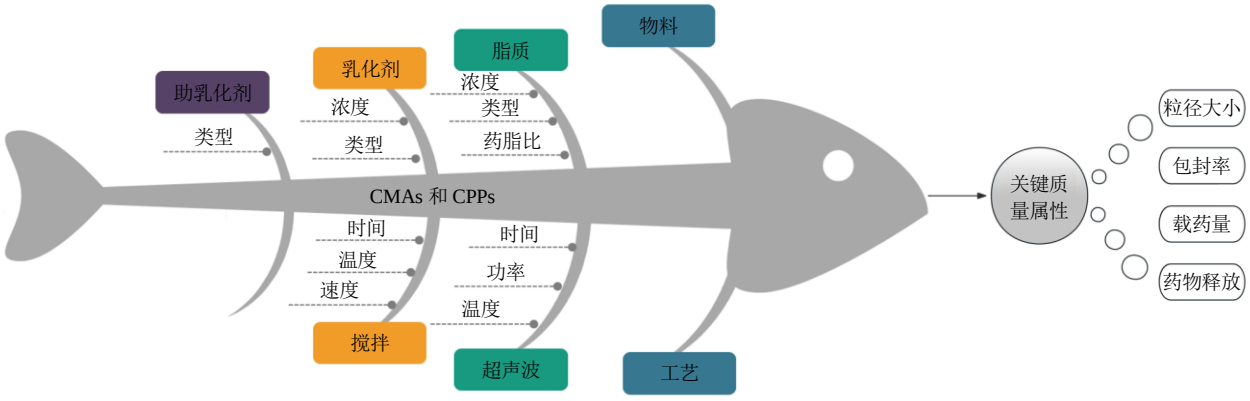

图 2　Emo-SLN 的鱼骨图

Fig. 2　Fish bone diagram of Emo-SLN

表 3　FMECA 法进行风险评估

Table 3　FMECA methods for risk assessment

项目	数值	风险程度	关键程度
严重度（*S*）、概率（*P*）、可检测性（*D*）	1	低	广泛接受的风险；无需进一步研究
	3	中	风险可接受；为降低风险，可能需要进一步研究
	5	高	风险不可接受；需进一步研究以降低风险

表 4　FMECA 法的风险优先系数（RPN）评价标准

Table 4　FMECA methods for risk priority number (RPN) evaluation criterion

RPN	关键程度
RPN＜6	广泛接受的风险；无需进一步研究
6≤RPN＜18	风险可接受；为降低风险，可能需要进一步研究
RPN≥18	风险不可接受；需进一步研究以降低风险

RPN=$S\times P\times D$

SLN 主要由原料药、脂质、表面活性剂（乳化剂）、助表面活性剂（助乳化剂）和水组成。脂质主要作为 SLN 的载体，可提高大黄素的溶解度，影响 SLN 的安全性和稳定性。表面活性剂作为 SLN 中的重要成分，可降低界面势能，与其稳定性和安全性高度相关。根据相关文献及制剂经验，采用 FMECA 法对 Emo-SLN 的处方变量包括：原料药、表面活性剂、脂质和助表面活性剂进行风险评估。结果如表 5 所示。采用熔融乳化法制备 SLN，其中，相转变温度、超声功率、超声时间是影响该制剂 SLN 制备的关键因素。对其进行风险评估（表 6），并对 SLN 进行 QbD 评价（图 3）。

表 5 处方变量的风险评估

Table 5 Risk assessment of formulations

材料	参数	*S*	*P*	*D*	RPN	风险评估
原料药	粒径和分布	2	2	2	8	低
	体外释放	5	5	5	125	高
	包封率	5	5	5	125	高
	载药量	5	5	5	125	高
表面活性剂	粒径和分布	4	4	5	8	高
	体外释放	3	3	3	27	中
	包封率	1	1	1	1	低
	载药量	1	1	1	1	低
脂质	粒径和分布	3	3	3	27	中
	体外释放	4	4	5	80	高
	包封率	4	4	5	80	高
	载药量	4	4	5	80	高
助表面活性剂	粒径和分布	3	3	3	27	中
	体外释放	3	3	3	27	中
	包封率	2	1	1	2	低
	载药量	2	1	1	2	低

2.2 Emo-SLN 的 CMAs 筛选

分别于相应的脂质、表面活性剂、助表面活性剂中加入过量大黄素，置于恒温摇床避光振摇 24 h 后取出，于 37 ℃、10 000 r/min 离心（离心半径为 10 cm）15 min。取上清液，用 0.45 μm 滤膜滤过后进样 HPLC 分析，计算大黄素的溶解度。结果如表 7、8 所示，选择 Capryol™ 90 为脂质，Cremophor® RH40 作为表面活性剂。

表 6 工艺变量的风险评估

Table 6 Risk assessment of processes

工艺变量	参数	*S*	*P*	*D*	RPN	风险评估
相转变温度[21]	包封率	5	5	5	125	高
	粒径和分布	3	3	3	27	中
	载药量	5	5	5	125	高
	体外释放	2	1	1	2	低
超声功率[22]	包封率	3	3	3	27	中
	粒径和分布	5	5	5	125	高
	载药量	3	3	3	27	中
	体外释放	2	2	2	8	低
超声时间[23]	包封率	3	3	3	27	中
	粒径和分布	5	5	5	125	高
	载药量	3	3	3	27	中
	体外释放	2	2	2	8	低

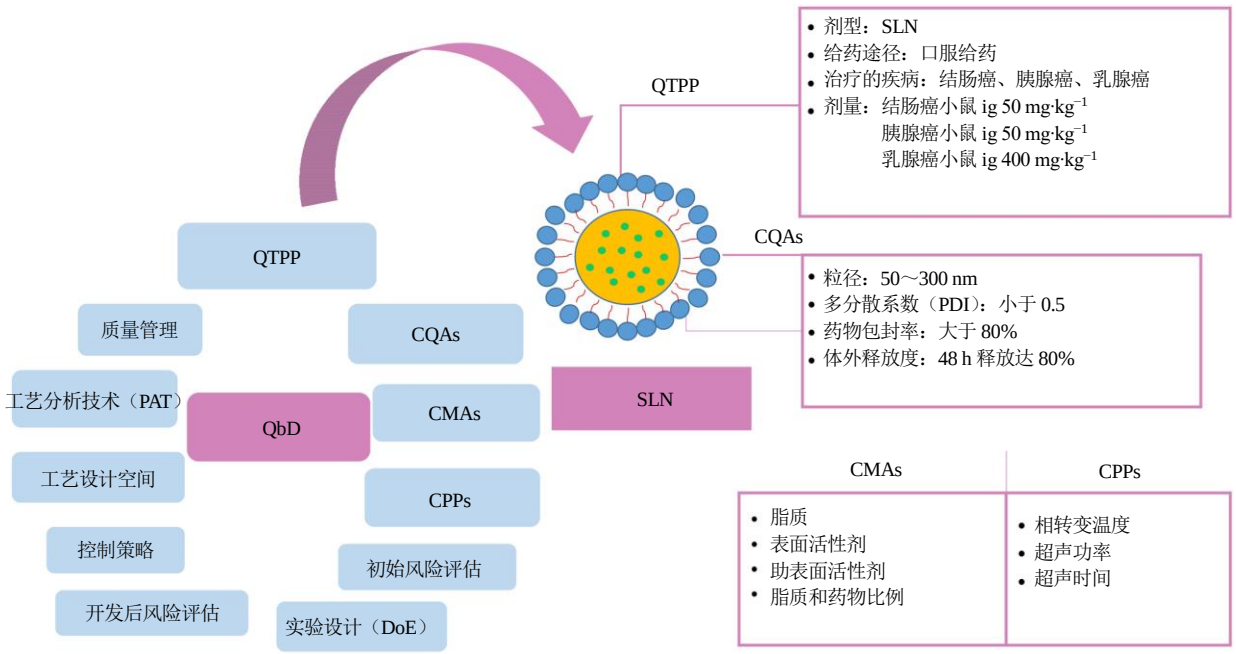

图 3 SLN 的 QbD 评价图

Fig. 3 Diagram of QbD evaluation for SLN

2.3 Emo-SLN 的制备

以 50 ℃为制备温度，选用熔融乳化法，于 50 ℃分别加水及处方量的大黄素与脂质 Capryol™ 90（质量比 1∶160）、表面活性剂 Cremophor® RH40、助表面活性剂 Transcutol® HP 混匀，搅拌 3 min，于超声细胞破碎仪（功率 200 W，超声时间 5 min，工作 2 s，暂停 2 s）破碎，2～8 ℃保存 12 h 后过 0.8 μm 的滤膜，即得 Emo-SLN。

表 7　大黄素在脂质中的溶解度

Table 7　Solubility of emodin in lipids

脂质	溶解度/(mg·mL^{-1})
Capryol™ 90	14.75±0.33
Lauroglycol™ 90	14.26±0.97
Gelucire 44/14	8.38±0.17
Percirol ATO 5	7.22±0.16
Gelucire 50/13	5.59±0.98
Maisine™	5.44±0.23
单双硬脂酸甘油酯	2.22±0.13
Compritol 888 ATO	1.53±0.78
Labrafil M 1944 CS	1.34±0.18

表 8　大黄素在表面活性剂中的溶解度

Table 8　Solubility of emodin in emulsifiers

表面活性剂	溶解度/(mg·mL^{-1})
Solutol® HS 15	37.27±0.51
Cremophor® RH40	34.62±1.86
Tween 20	31.47±0.71
Tween 80	25.60±1.39
Triton X-100	8.83±0.27
Triacetate	5.05±0.23
丙二醇二辛酸酯	4.06±0.12
MCT	3.35±0.11

2.4　SLN 的质量控制研究

2.4.1　含量测定　选用 HPLC 法[24]进行测定，色谱条件如下：色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为水-甲醇（10∶90）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 265 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

精密称取 1 mg 大黄素，溶解于甲醇溶液中，作为大黄素对照品溶液。并按“2.3”项下的方法制备空白 SLN（除了不加大黄素其余步骤同上）。取适量的空白 SLN 按其与甲醇体积比（1∶9）的比例下加入甲醇，涡旋破乳后，以流动相稀释；同法操作，进样稀释后的 Emo-SLN 和大黄素对照品溶液，对比 3 个样品的出峰时间，判断辅料是否会对样品产生干扰，以及制得的 Emo-SLN 检测到的色谱峰是否为大黄素的样品峰。如图 4 所示，表明溶剂和辅料在该色谱条件下对药物大黄素的测定没有干扰，结果表明药物大黄素测定的专属性良好。在 100～2 500 μg/mL 呈良好的线性关系；精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验均符合要求。

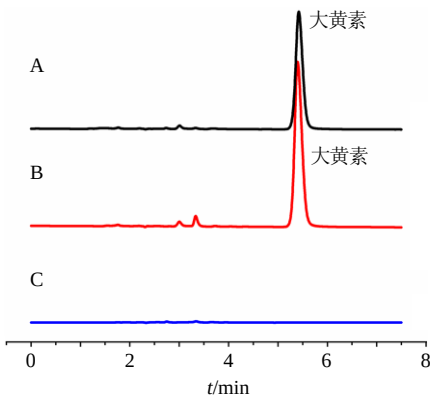

图 4　Emo-SLN (A)、大黄素对照品 (B) 和空白 SLN (C) 的 HPLC 图

Fig. 4　HPLC of Emo-SLN (A), emodin reference substance (B) and blank SLN (C)

2.4.2　Emo-SLN 的形态、粒径和 ζ 电位　吸取 5 μL Emo-SLN 溶液滴到铜网上，静置 1 h，滴加 2%的磷钨酸至铜网表面，负染 1～2 min，室温自然晾干。置于 TEM 下，逐渐放大至 30 000 倍，观察其形态。所制 SLN 用超纯水稀释 100 倍后，用激光纳米粒度仪测定其粒径、ζ 电位和多分散系数（polydispersity index，PDI）。

2.4.3　包封率和载药量测定　取一定量体积 Emo-SLN 溶液，按其与甲醇体积比（1∶9）的比例加入甲醇进行破乳，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，在“2.4.1”项下色谱条件进样检测，即可测得 $W_{总}$。再另取 1 mL Emo-SLN 溶液于 30 000×*g*、4 ℃下高速离心（离心半径为 10 cm）1 h，取上层乳液，同法测定，即得 $W_{游离}$。按如下公式计算包封率和载药量。

$$包封率=W_{游离}/W_{总}$$

$$载药量=(W_{总}-W_{游离})/(W_{总}-W_{游离}+W_{脂质})$$

$W_{游离}$、$W_{总}$、$W_{脂质}$分别为 Emo-SLN 的未包载药物量、总药物含量和 SLN 内除了大黄素以外的所有脂质辅料的质量

2.4.4　稳定性考察　将 Emo-SLN 置于 2～8 ℃冰箱，于不同时间（0、7、21、32 d）取样检测其粒径和 PDI。

2.4.5　安全性考察　以体外溶血实验考察 Emo-SLN 的安全性。选用《中国药典》2020 年版中的方法测定[25]，取健康家兔的新鲜血液，1 000 r/min 离心（离心半径为 10 cm）10 min，弃去上清液。将所得红细胞用生理盐水配成 2.0%的混悬液备用；取 300 μL 的 30、50、70 μmol/L Emo-SLN 溶液加入 2.5 mL 该红细胞悬液后再加入 2.2 mL 生理盐水，均匀混合后，放入 37 ℃恒温水浴孵育 60 min，后 1 800

r/min 离心（离心半径为 10 cm）10 min。取上清，用紫外分光光度计测定波长 540 nm 下的吸光度（A）值。以生理盐水为空白对照组，以超纯水为阳性对照组，每组设 3 个平行复孔。按照下列公式计算溶血率。

$$溶血率=(A_{实验}-A_{生理盐水})/(A_{蒸馏水}-A_{生理盐水})$$

2.4.6 体外释放实验 采用透析袋法[26]进行体外释放测定。分别取 1 mg/mL Emo-SLN 溶液及大黄素溶液 1 mL，以 200 mL 0.05 g/mL 十二烷基硫酸钠（SDS）为溶出介质[27]，温度为 37 ℃，转速为 8 r/min，分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、7.0、19.0、24.0 h 取样 1 mL，同时补充超纯水 1 mL，样品处理后以 HPLC 进行测定。

2.5 Emo-SLN 的处方优化试验设计

2.5.1 处方优化试验设计 通过文献报道[26-29]，综合考虑上述列出的 CMA、CPP，选择以药脂比（1∶X_1）、表面活性剂用量（X_2）、超声功率（X_3）为自变量，并以 SLN 的粒径（Y_1）、PDI（Y_2）和包封率（Y_3）为评价指标，基于单因素实验结果，确定 3 个自变量的设计范围：药脂比（X_1 160～300）、表面活性剂用量（X_2 3%～5%）和超声功率（X_3 200～300 W）。根据 Box-Behnken 设计（BBD）响应面原理[30]，本实验采用 3 因素 5 水平的星点设计，并根据响应面试验进行优化分析。操作步骤同“2.3”项。试验设计及结果见表 9～12。可得出粒径的回归方程为 $Y_1=286.49-39\,913.53\,X_1+11.43\,X_2+0.19\,X_3$，

表 9 响应面实验设计及结果

Table 9 Design and results of response surface method

序号	X_1	X_2/%	X_3/W	Y_1	Y_2	Y_3	序号	X_1	X_2/%	X_3/W	Y_1	Y_2	Y_3
1	300 (−1)	3 (−1)	250 (0)	232.90	0.217	0.809 1	10	220	5	200	158.79	0.113	0.955 7
2	160 (+1)	3	250	112.32	0.200	0.924 3	11	220	3	300	230.70	0.225	0.863 6
3	300	5 (+1)	250	302.90	0.227	0.808 8	12	220	5	300	205.70	0.123	0.807 9
4	160	5	250	167.22	0.042	0.899 7	13	220	4	250	204.20	0.665	0.877 1
5	300	4 (0)	200 (−1)	230.40	0.113	0.863 6	14	220	4	250	238.70	0.673	0.897 7
6	160	4	200	121.06	0.065	0.984 0	15	220	4	250	165.69	0.613	0.988 8
7	300	4	300 (+1)	209.40	0.071	0.818 5	16	220	4	250	181.65	0.074	0.992 0
8	160	4	300	108.81	0.193	0.801 7	17	220	4	250	179.15	0.073	0.864 8
9	220 (0)	3	200	167.24	0.114	0.867 3							

表 10 粒径 (Y_1) 的回归模型方差分析

Table 10 Variance analysis of established regression model for particle size (Y_1)

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	28 955.46	3	9 651.82	10.22	0.001 0	残差	12 274.14	13	944.16		
X_1	27 166.64	1	27 166.64	28.77	0.000 1	失拟项	8 997.58	9	999.73	1.22	0.456
X_2	1 045.39	1	1 045.39	1.11	0.312	纯误差	1.08	4	0.27		
X_3	743.44	1	743.44	0.79	0.391	总变异	41 229.60	16			

表 11 PDI (Y_2) 的回归模型方差分析

Table 11 Variance analysis of established regression model for PDI (Y_2)

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	586.03	9	65.11	4.54	0.029 4	X_1^2	51.44	1	51.44	3.58	0.100 0
X_1	20.77	1	20.77	1.45	0.268 0	X_2^2	195.43	1	195.43	13.62	0.007 8
X_2	78.75	1	78.75	5.49	0.051 7	X_3^2	2.09	1	2.09	0.15	0.714 0
X_3	53.41	1	53.41	3.72	0.095 1	残差	100.46	7	14.35		
X_1X_2	70.56	1	70.56	4.92	0.062 1	失拟项	99.38	3	33.13	122.98	0.000 2
X_1X_3	72.00	1	72.00	5.02	0.060 1	纯误差	1.08	4	0.27		
X_2X_3	25.50	1	25.50	1.78	0.224 0	总变异	686.49	16			

表 12　包封率 (Y_3) 的回归模型方差分析

Table 12　Variance analysis of established regression model for encapsulation efficiency (Y_3)

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	395.32	6	65.89	2.25	0.122 5	X_2X_3	90.63	1	90.63	3.10	0.108 7
X_1	124.11	1	124.11	4.25	0.066 3	残差	292.19	10	29.22		
X_2	1.85	1	1.85	0.063 4	0.806 3	失拟项	140.00	6	23.33	0.613 3	0.718 1
X_3	133.82	1	133.82	4.58	0.058 0	纯误差	152.19	4	38.05		
X_1X_2	1.48	1	1.48	0.050 5	0.826 7	总变异	687.51	16			
X_1X_3	43.43	1	43.43	1.49	0.250 8						

R^2=0.702 3，R_{adj}^2=0.633 6，R_{pred}^2=0.456 0；PDI 的回归方程为 Y_2=140.00−19 834.48 X_1−31.24 X_2−0.17 X_3−2 876.71 X_1X_2+58.12 X_1X_3−0.05 X_2X_3+1.70 X_1^2+6.81 X_2^2+2.80×10^{-4} X_3^2，R^2=0.853 7，R_{adj}^2=0.665 5，R_{pred}^2=0.488 0；模型相关系数 R^2 分别为 0.702 3、0.853 7，这说明该试验模型与实际试验拟合较好，实际试验中约 70.23%、85.37%的结果可以通过拟合模型进行解释。校正后的决定系数 R^2_{adj} 分别为 0.633 6、0.665 5，与 R^2 相对接近，说明 2 模型均有较好的准确性和通用性。

而包封率的回归方程为 Y_3=−59.09+156.46 X_1+25.31 X_2+0.52 X_3−4.16 X_1X_2−0.45 X_1X_3−0.10 X_2X_3，R^2=0.5750，R_{adj}^2=0.320 0，R_{pred}^2=0.108 2；该试验模型与实际试验拟合一般，且数据间无显著性差异，故后续以 PDI 为主，判断不同因素对其影响。由表 10 可以看出，对于粒径影响的因素顺序为药脂比＞表面活性剂＞超声功率；由表 11 可以看出，对于 PDI 影响的因素顺序为表面活性剂＞超声功率＞药脂比。两模型的 *P* 值均＜0.05，响应面回归模型达到了显著性水平。

2.5.2　Box-Behnken 响应面交互作用　在回归模型方差分析结果的基础上，采用 Design-Expert 13 软件依据 Y_1、Y_2，在回归模型方差分析结果的基础上绘制响应面图及等高线图，分析药脂比、表面活性剂用量和超声功率对 Emo-SLN 中大黄素粒径、PDI 的影响（图 5）；3D 响应曲面和等高线图可直观反

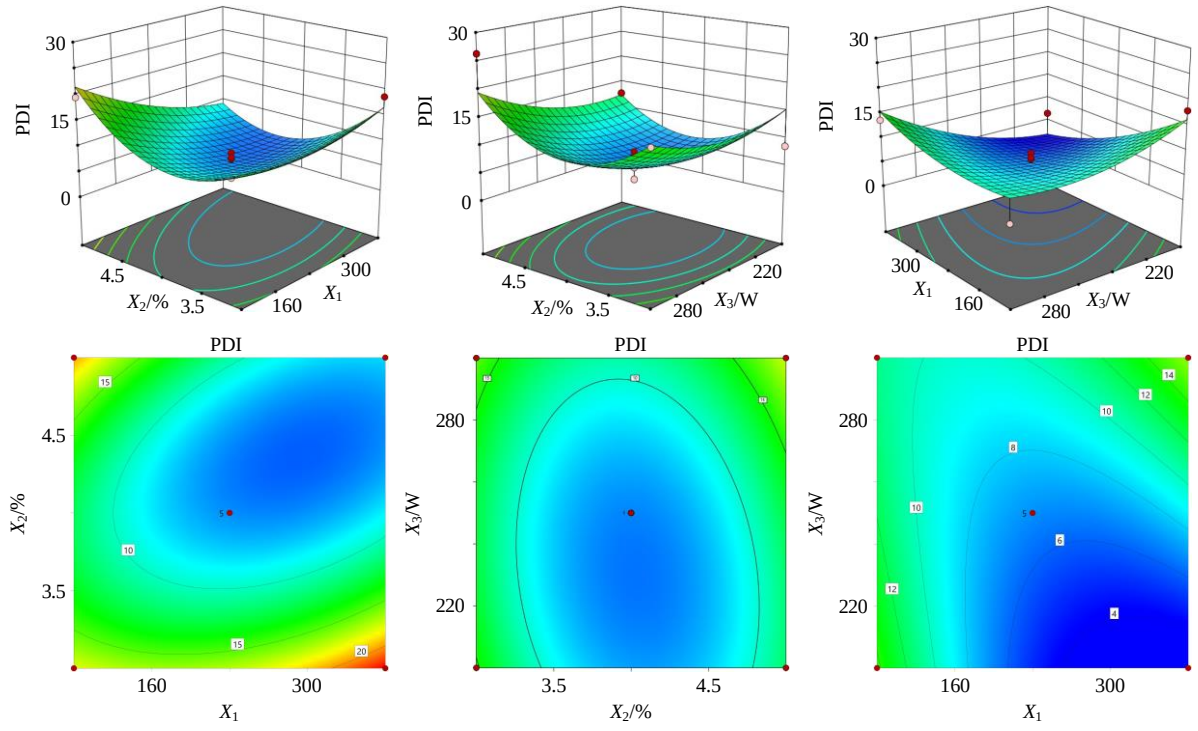

图 5　药脂比、表面活性剂用量、超声功率对 PDI 交互影响的响应面图和等高线图

Fig. 5　Response surface diagram and contour plots illustrating interaction effects of drug-lipid ratio, surfactant concentration and ultrasonic power on PDI

映交互作用对响应值的影响程度，曲面越陡，等高线越密集，则影响越显著，等高线越接近椭圆，2 个因素的交互作用越强[31]。

药脂比与超声功率对 PDI 的影响最大，药脂比与表面活性剂对其影响次之，表面活性剂与超声功率对其影响最小（图 5）。在药脂比较低的情况下，随着表面活性剂比例的增加，PDI 先减少后增加（图 5）；当药脂比在较高水平时，反之，响应面的倾斜度较高，坡度较为陡峭，且等高线呈椭圆形，说明药脂比和表面活性剂的交互作用对 PDI 的影响较大；同理，说明超声功率和表面活性剂的交互作用对 PDI 的影响较小（图 5）；药脂比和超声功率的交互作用对 PDI 的影响较大（图 5）。

2.6 Emo-SLN 的制备工艺验证

根据“2.5”项设计所得的最优条件进行实验：药脂比为 1∶170，表面活性剂比例为 4.13%，超声功率为 216.14 W，据此平行制备 3 批 Emo-SLN，对该处方设计进行验证，将测定的粒径、PDI 与“2.5”项预期结果进行比较（表 13）。由表 13 可知，预测值与实测值间的偏差均小于 1，二者较为接近，说明该模型较为可靠。综上，选择药脂比为 1∶170，表面活性剂用量为 4%，超声功率为 216 W 为最优处方，该处方的包封率为（98.28±1.43）%，载药量为（0.23±0.01）%。实验发现制备的 Emo-SLN 为球形，无黏连，大小均一，且粒径在 100～200 nm，ζ 电位（−21.90±0.50）mV（图 6～8），分散性良好（PDI 小于 0.3），符合 CQAs 要求。

表 13 预测值与实际值的比较 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 13 Comparison of predictive value and actual value ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

优化指标	Y_1/nm	Y_2
预测值	145.90	4.10
实测值	146.89±3.41	5.65±1.05
偏差	0.50	0.77

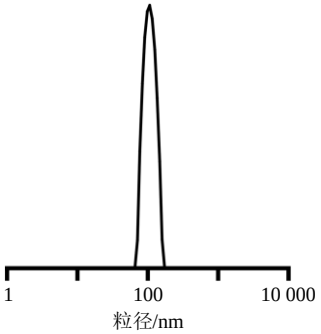

图 6 Emo-SLN 的粒径分布图

Fig. 6 Particle size distribution of Emo-SLN

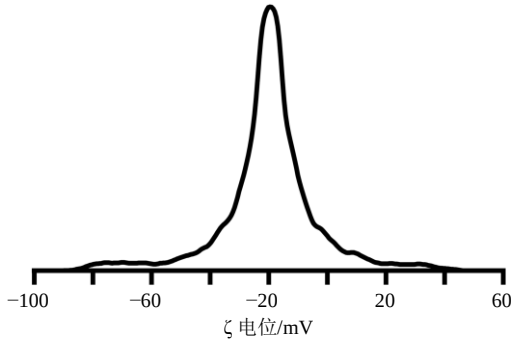

图 7 Emo-SLN 的电位分布图

Fig. 7 Potential distribution of Emo-SLN

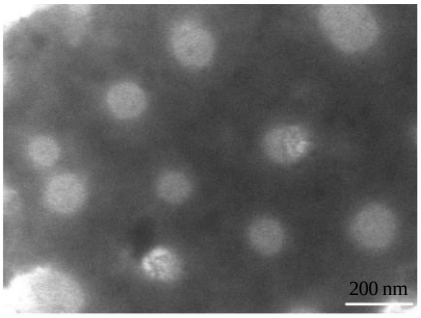

图 8 Emo-SLN 的透射电镜图

Fig. 8 TEM image of Emo-SLN

根据上述最佳条件制备的 Emo-SLN 在 2～8 ℃储存 32 d 内，其粒径（RSD 均小于 1.5%）和分散系数（RSD 均小于 0.01%）变化微小（表 14），说明其具有良好稳定性。

Emo-SLN 的溶血性实验结果如表 15 和图 9 所

表 14 Emo-SLN 的稳定性 (2～8 ℃, $\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 14 Stability of Emo-SLN at (2—8 ℃, $\bar{x} \pm s$, n = 3)

t/d	粒径/nm	PDI
0	138.90±1.14	0.063±0.006
7	108.63±1.38	0.152±0.005
14	143.87±0.25	0.087±0.007
21	127.77±0.46	0.238±0.006
32	136.30±0.28	0.086±0.003

表 15 Emo-SLN 的体外溶血率 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 15 *In vitro* hemolytic rate of Emo-SLN ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组别	浓度/(μmol·L^{-1})	溶血率/%
水	−	100
生理盐水	−	0
Emo-SLN	30	−0.660±0.085
	50	2.027±0.439
	70	3.864±0.455

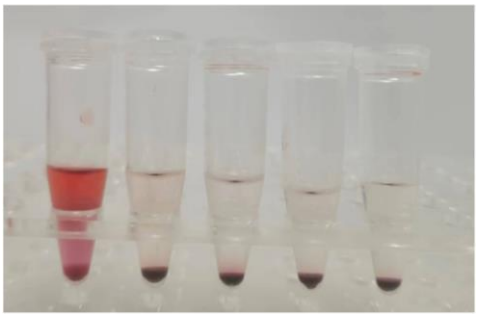

图 9　Emo-SLN 与红细胞、水、生理盐水孵育后的图片

Fig. 9　Picture of Emo-SLN at different concentrations incubated with red blood cells, water and saline

示，其在 30～70 μmol/L 浓度范围内无溶血现象（溶血率测定结果均小于 5%），从而证明其不会引起体外红细胞溶血。

大黄素原料药与 Emo-SLN 体外释放结果如图 10 所示，相对原料药，Emo-SLN 的释放仅有 30% 左右（7 h），说明 Emo-SLN 具有缓释的作用。对其进行动力学方程拟合，结果如表 16 所示，发现其体外释药行为符合一级线性方程，Q_t＝80.003 (1－$e^{-0.084\,t}$)，R^2＝0.988 3。

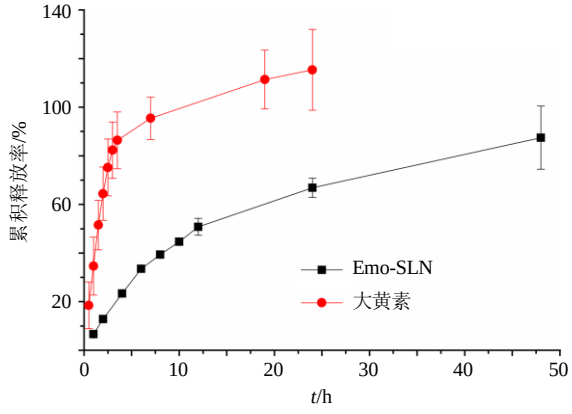

图 10　Emo-SLN 和大黄素溶液的体外释放情况（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 10　*In vitro* release profiles of Emo-SLN and free emodin ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

表 16　Emo-SLN 的药物释放模型

Table 16　Drug release kinetic models of Emo-SLN

模型	回归方程	R^2
一级线性方程	Q＝80.00 (1－$e^{-0.084\,t}$)	0.988
零级线性方程	Q＝1.45 t＋21.58	0.799
Higuchi	Q＝12.675 $t^{1/2}$＋0.437	0.954
Ritger-Peppas	Q＝9.949 4 $t^{0.654}$	0.973

3　讨论

根据国家药品监督管理局发布的国家药品标准关于大黄配方颗粒[32]，1 g 含总蒽醌以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的总量计，应为 10.0～25.0 mg。可见目前使用的处方中大黄素含量较低，且给药剂量大，故已上市并在临床上长期使用的大黄素制剂几乎没有。开发一个可供临床使用的大黄素纳米制剂迫在眉睫。

2021 年国家药品监督管理局药品审评中心（CDE）发布的《纳米药物质量制研究技术指导原则（试行）》中也有引入 QbD 的概念，且在该指导原则中提及纳米药物应重点关注可能与体内行为相关的质量指标，如粒径、药物释放度以及与其特性相关的性能指标，如结构形态、包封率、载药量、纳米粒稳定性等，同时也需对纳米药物进行全过程质量控制，包括纳米药物用到的原料药、辅料、制备的工艺参数等[33]。

故本研究引入 QbD 理念对该 Emo-SLN 工艺进行全面且深入的分析。首先，确认 Emo-SLN 的质量概况，采用鱼骨图法和查阅文献，确定其 CQAs（粒径、包封率、载药量、体外释放），再采用风险管理工具筛选出影响其质量的潜在 CMAs（脂质、表面活性剂、助表面活性剂、脂质与药物质量比）。

实验发现大黄素在脂质材料 Capryol™ 90，表面活性剂 Solutol® HS 15 中的溶解度比较好，且熔点较低。但因 Solutol® HS 15 是一种亲水性极强的辅料[亲水亲油平衡值（HLB）为 14～16]，Capryol™ 90 为水不溶性的脂质（HLB 值为 5），二者无法均匀地混合，混合后静置即会分层，所以本实验采用溶解度次之的 Cremophor® RH40 作为表面活性剂材料，其他皆选用上述药物在其溶解度最大的材料。经查阅文献[34]，发现，助表面活性剂 Transcutol® HP 的溶解度大于 PEG 400，所以选择 Transcutol® HP 作为助表面活性剂。选用的脂质 Capryol™ 90[35]可能增加脂质和蛋白质区域的肠脂膜流动性，从而通过跨细胞途径促进肠道对胰岛素的吸收，且 Capryol™ 90 是一种生物利用度增强剂，因此，此脂质有望促进大黄素在肠道的吸收，增强其在肠道的生物利用度。且有文献报道[36] Cremophor® RH40 有可能影响经细胞色素 CYP3A4 转化的药物代谢及处置，增加药物的生物利用度，对药物的临床应用产生显著影响；以 Cremophor® RH40 为辅料的大黄素纳米乳通过减少在 MDCK II 细胞高表达的葡萄

糖醛酸转移酶醛酸化而增加跨细胞渗透，可作为提高大黄素口服生物利用度的一种有前途的策略[37]。Cremophor® RH40 的这一特点可针对大黄素存在的首关消除效应，从而提高大黄素在体内的生物利用度。且 Cremophor® RH40 与 Capryol™ 90 合用，一方面有望提高大黄素在肠道的吸收，另一方面又可降低大黄素在肠道的代谢。

Emo-SLN 中大黄素的溶解度为大黄素溶液的近 10 倍，显著地提高了药物的溶解度。基于 QbD 设计，并筛选了 CMAs 及 CPPs，17 组样品测得的包封率均大于 80%，较其他 Emo-SLN 的包封率提高了 25%左右[38]，PDI 小于 0.5，表面活性剂比例较其他的大黄素纳米制剂小[23]，可减少表面活性剂的毒性，安全性更大，以上结果均符合 CQAs 的要求。本实验以 QbD 为理论基础，成功设计 Emo-SLN 的开发，并为 SLN 及其他纳米药物的开发研究提供了思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Kong X Y, Qi Y H, Wang X Y, *et al*. Nanoparticle drug delivery systems and their applications as targeted therapies for triple negative breast cancer [J]. *Prog Mater Sci*, 2023, 134: 101070.

[2] Fu M, Tang W, Liu J J, *et al*. Combination of targeted daunorubicin liposomes and targeted emodin liposomes for treatment of invasive breast cancer [J]. *J Drug Target*, 2020, 28(3): 245-258.

[3] 于洋, 孔亮, 刘婉滢, 等. Angiopep-2 修饰白藜芦醇脂质体的处方优化与体外评价 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7706-7713.

[4] 邵艳寻, 郭切切, 张舒迪, 等. 乳糖酸修饰的黄芩苷自组装胶束载药系统的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6216-6225.

[5] Yang X Q, Yu T, Zeng Y P, *et al*. Tumor-draining lymph node targeting chitosan micelles as antigen-capturing adjuvants for personalized immunotherapy [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 240: 116270.

[6] 张心洁, 廖洋样, 廖婉, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒和微胶囊的制备、表征及体内药动学的比较研究 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1386-1396.

[7] Pandian S R K, Pavadai P, Vellaisamy S, *et al*. Formulation and evaluation of rutin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of brain tumor [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(4): 735-749.

[8] 成羽溪, 郭相孚, 代文兵, 等. 纳米制剂的研究进展 [J]. 中国基础科学, 2022, 24(2): 9-19.

[9] Cunha S, Costa C P, Moreira J N, *et al*. Using the quality by design (QbD) approach to optimize formulations of lipid nanoparticles and nanoemulsions: A review [J]. *Nanomedicine*, 2020, 28: 102206.

[10] Rawal M, Singh A, Amiji M M. Quality-by-design concepts to improve nanotechnology-based drug development [J]. *Pharm Res*, 2019, 36(11): 153.

[11] Deng Y P, Zhong G F, Wang Y, *et al*. Quality by design approach for the preparation of fat-soluble vitamins lipid injectable emulsion [J]. *Int J Pharm*, 2019, 571: 118717.

[12] Deng Y P, Shen L, Yang Y, *et al*. Development of nanoparticle-based orodispersible palatable pediatric formulations [J]. *Int J Pharm*, 2021, 596: 120206.

[13] Teng H, Chen L. Polyphenols and bioavailability: An update [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(13): 2040-2051.

[14] Dai G L, Wang D, Ma S T, *et al*. ACSL4 promotes colorectal cancer and is a potential therapeutic target of emodin [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154149.

[15] Li N, Wang C L, Zhang P, *et al*. Emodin inhibits pancreatic cancer EMT and invasion by up-regulating microRNA-1271 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3366-3374.

[16] Li F, Song X Y, Zhou X Q, *et al*. Emodin attenuates high lipid-induced liver metastasis through the AKT and ERK pathways *in vitro* in breast cancer cells and in a mouse xenograft model [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e17052.

[17] Singh J. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use [J]. *J Pharmacol Pharmacother*, 2015, 6(3): 185-187.

[18] 陈海溶, 丁杨, 刘贞贞, 等. 基于质量源于设计 (QbD) 理念的葛根总黄酮-甘草酸纳米粉体的制备与质量评价 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7384-7392.

[19] Kola S N S, Verma R, Pai K G, *et al*. A quality by design approach on polymeric nanocarrier delivery of gefitinib: Formulation, *in vitro*, and *in vivo* characterization [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 12: 15-28.

[20] 石红, 黄晓建, 郑坤武, 等. 药物口服固体制剂制粒工艺风险的 FMEA 分析 [J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(23): 85-87.

[21] Silva A C, González-Mira E, García M L, *et al*. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 86(1): 158-165.

[22] Leong T S H, Wooster T J, Kentish S E, *et al*. Minimising

oil droplet size using ultrasonic emulsification [J]. *Ultrason Sonochem*, 2009, 16(6): 721-727.

[23] Perazzo A, Preziosi V, Guido S. Phase inversion emulsification: Current understanding and applications [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2015, 222: 581-599.

[24] Deng Y P, Zhang Y J, Huang Y L, *et al*. Preparation, crystal structures, and oral bioavailability of two cocrystals of emodin with berberine chloride [J]. *Cryst Growth Des*, 2018, 18(12): 7481-7488.

[25] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 238-246.

[26] Wang S P, Chen T K, Chen R E, *et al*. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies [J]. *Int J Pharm*, 2012, 430(1/2): 238-246.

[27] Zhang X Y, Liu J P, Qiao H, *et al*. Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology [J]. *Powder Technol*, 2010, 197(1/2): 120-128.

[28] Cuong D M, Jeon J, Morgan A M A, *et al*. Accumulation of charantin and expression of triterpenoid biosynthesis genes in bitter melon (*Momordica charantia*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(33): 7240-7249.

[29] 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.

[30] 谢青璇, 李小芳, 谢龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1614-1622.

[31] 李琪, 张慧, 安超, 等. 响应面法优化苦瓜甙的提取工艺及其 HPLC 测定 [J]. 安徽农业大学学报, 2022, 49(1): 175-180.

[32] 国家药品监督管理局. 大黄 (药用大黄) 配方颗粒 [S/OL]. (2021-04-25) [2023-08-15]. https://www.chp.org.cn/ydw/u/cms/www/202104/28154910xy53.

[33] 国家药品监督管理局. 纳米药物质量控制研究技术指导原则 (试行) [S/OL]. (2021-08-27) [2023-08-15]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/95945bb17a7dcde7b68638525ed38f66.

[34] Shi Y B, Li H L, Li J C, *et al*. Development, optimization and evaluation of emodin loaded nanoemulsion prepared by ultrasonic emulsification [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2015, 27: 46-55.

[35] Ukai H, Imanishi A, Kaneda A, *et al*. Absorption-enhancing mechanisms of Capryol 90, a novel absorption enhancer, for improving the intestinal absorption of poorly absorbed drugs: Contributions to *trans*- or *para*-cellular pathways [J]. *Pharm Res*, 2020, 37(12): 248.

[36] 任秀华, 斯陆勤, 曹磊, 等. 聚氧乙烯醚类表面活性剂对大鼠体内细胞色素 P450 3A 活性的影响 [J]. 药学学报, 2008, 43(5): 528-534.

[37] Zhang T P, Dong D, Lu D Y, *et al*. Cremophor EL-based nanoemulsion enhances transcellular permeation of emodin through glucuronidation reduction in UGT1A1-overexpressing MDCKII cells [J]. *Int J Pharm*, 2016, 501(1/2): 190-198.

[38] 张洪, 成蓓. 大黄素固体脂质纳米粒的制备及理化性质研究 [J]. 中国药师, 2010, 13(3): 326-329.

[责任编辑 郑礼胜]