

小白菊内酯脂质体的制备工艺优化及体外评价

丘炜桢¹, 卢光照², 俞千雪², 黄艳秋¹, 何永平¹, 朱煜¹, 张裕彦¹, 叶勇^{1,3*}, 刘悦^{2,4*}

1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

2. 海军军医大学 药理学系, 上海 200433

3. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室, 广西 南宁 530021

4. 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室, 上海 200433

摘要: 目的 运用 Box-Behnken 设计-效应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)优化小白菊内酯脂质体(parthenolide liposomes, Par-Lips)处方, 并对其进行质量表征及初步体外药效评价。方法 采用薄膜分散法制备 Par-Lips, 以包封率、载药量、 ζ 电位、粒径和 PDI 为考察指标, 通过单因素考察和 BBD-RSM 优化 Par-Lips 处方, 并对其进行制剂学评价, 同时采用 CCK-8 法考察其对胆管癌 TFK-1 细胞的体外药效作用。结果 Par-Lips 最佳处方工艺: 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG₂₀₀₀)用量为 68.68 mg, 膜材比为 150:1, 药脂比为 1:10.15。Par-Lips 包封率为 $(83.18 \pm 0.90)\%$, 载药量为 $(5.87 \pm 0.06)\%$, ζ 电位为 (-7.36 ± 0.02) mV、粒径为 (67.38 ± 0.33) nm、PDI 为 0.200 ± 0.003 。Par-Lips 体外释放相较于小白菊内酯原料药具有一定的缓释效果; 体外抗肿瘤活性实验表明, 相对于小白菊内酯原料药溶液, Par-Lips 体外抑制胆管癌 TFK-1 细胞生长效果显著($P < 0.001$)。结论 经 BBD-RSM 筛选获得 Par-Lips 的最佳处方工艺, 该制剂粒径均一、稳定性较好, 具有一定缓释作用, 且能显著抑制胆管癌 TFK-1 细胞生长。

关键词: 小白菊内酯; 脂质体; 胆管癌; 细胞毒性; Box-Behnken 设计-效应面法; 薄膜分散法; 制剂学; CCK-8 法; 抗肿瘤
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)08-2799-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.016

Optimization of preparation process and *in vitro* evaluation of parthenolide liposomes

QIU Weian¹, LU Guangzhao², YU Qianxue², HUANG Yanqiu¹, HE Yongping¹, ZHU Yu¹, ZHANG Yuyan¹, YE Yong^{1,3}, LIU Yue^{2,4}

1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

3. Guangxi Key Laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation, Nanning 530021, China

4. Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To optimize the formulation of parthenolide liposomes (Par-Lips) by Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM), and to characterize its quality and evaluate its efficacy *in vitro*. **Methods** Par-Lips was prepared by the thin-film hydration method. The encapsulation efficiency, drug loading, ζ potential, particle size and PDI were investigated. The formulation of Par-Lips was optimized through single factor and BBD-RSM, and the formulation of Par-Lips was evaluated. At the same time, CCK-8 assay was used to investigate its *in vitro* efficacy on bile duct cancer TFK-1 cells. **Results** The optimum formulation of Par-Lips was 68.68 mg of DSPE-PEG₂₀₀₀, the ratio of membrane to material was 150:1 and the ratio of drug to lipid was 1:10.15. The encapsulation efficiency of Par-Lips was $(83.18 \pm 0.90)\%$, the drug loading was $(5.87 \pm 0.06)\%$, the ζ potential was (-7.36 ± 0.02) mV, the particle size was (67.38 ± 0.33) nm, and the PDI was 0.200 ± 0.003 . The release of Par-Lips *in vitro* has a certain sustained release effect compared with parthenolide. The results of antitumor activity *in vitro* showed that compared with parthenolide solution,

收稿日期: 2024-11-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82473885)

作者简介: 丘炜桢(2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: JMM_1982aniy@163.com

*通信作者: 刘悦(1987—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药物分析研究。Tel: (021)8187126 E-mail: lyue2015@163.com

叶勇(1979—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事民族药药效物质及其新制剂研究。Tel: 13978679458 E-mail: yong-ye@163.com

Par-Lips significantly inhibited the growth of bile duct cancer TFK-1 cells *in vitro* ($P < 0.001$). **Conclusion** The optimal formulation process of Par-Lips was obtained by BBD-RSM. The preparation has uniform particle size, good stability, sustained release and can significantly inhibit the growth of bile duct cancer TFK-1 cells.

Key words: parthenolide; liposome; cholangiocarcinoma; cytotoxicity; Box-Behnken design-response surface method; thin-film hydration method; pharmaceutics; CCK-8 assay; antitumor

小白菊内酯 (parthenolide) 是一种倍半萜烯内酯类天然产物, 提取自菊科菊属草本植物小白菊 *Chrysanthemum parthenium* (L.) Cav., 其具有抗炎、抗肿瘤和抗菌等药理作用^[1-2], 对急性髓细胞白血病、前列腺癌、胰腺癌等多种癌症均有治疗效果^[3-6]。目前, 关于小白菊内酯抗肿瘤的作用机制已有报道, 其抗肿瘤作用与介导氧化应激、抑制线粒体活性、调节脱氧核糖核酸甲基化等密切相关^[7-8]。此外, 有研究发现小白菊内酯可通过调控氧化应激反应^[9]、血红素加氧酶-1 的表达^[10]促进胆管癌细胞凋亡, 从而抑制其增殖和迁移, 这表明小白菊内酯对胆管癌的治疗有一定的研究价值, 值得进行深入研究与探索。

然而, 由于小白菊内酯存在水溶性差^[11]、口服生物利用度低^[12]、生理条件下相对不稳定^[13]等缺点, 限制了其相关制剂的研发及临床应用。尽管研究人员们已经研制出一些关于小白菊内酯的纳米制剂^[14-16], 但大多存在包封率较低, 稳定性和缓释性不够理想等问题^[17-18]。因此, 通过寻找一种合适的方式以改善小白菊内酯的溶解度、稳定性及体外活性问题, 对于提高小白菊内酯在治疗胆管癌方面的临床疗效具有重要的现实意义。

脂质体 (liposomes) 是指将磷脂等类脂质分散于水中所形成的具有双分子层包裹水相结构的封闭小囊泡^[19], 其作为一种优良的药物递送载体, 具有延长药物半衰期、有效避免药物被快速降解、显著提高药物治疗指数并降低不良反应等特性^[20-21]。通过将小白菊内酯包载于脂质体内, 可有效改善小白菊内酯的稳定性和水溶性, 进而提高其生物利用度。近年来, Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 在制剂工艺筛选中被广泛应用^[22-24], 与常用的正交设计方法相比, 其实验结果准确度高、数学模型预测值与真实值更接近。

基于此, 本研究采用薄膜分散法制备小白菊内酯脂质体 (parthenolide liposomes, Par-Lips), 以包封率、载药量、 ζ 电位、粒径和 PDI 为评价指标, 通过单因素实验和 BBD-RSM 筛选出 Par-Lips 的最

佳处方工艺, 并对其进行制剂学表征与体外抗肿瘤活性评价, 旨在为后续体内抗胆管癌药效学、药动学等相关研究构建坚实的基础, 也为小白菊内酯的新剂型开发以及潜在的临床应用提供一定的实验依据和有价值的参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-10AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; KQ-800DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Sartorius SQP 型电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Zetasizer Nano ZS 型粒度分析仪, 英国马尔文公司; Hera cell 150i 型二氧化碳培养箱, 美国赛默飞世尔科技有限公司; LDC-5 型台式低速离心机, 上海泰坦科技股份有限公司; BCD-450WDENU1 型冰箱, 青岛海尔股份有限公司; R206D 型旋转蒸发仪, 上海申生科技有限公司; 超滤离心管, 截留相对分子质量 3 500, 美国 Millipore 公司; Sonifier 450D 型细胞破碎仪, 美国 Branson 公司; Aynergy H1 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; HT7800 型透射电子显微镜, 日本 Hitachi 公司。

1.2 试药

小白菊内酯原料药, 质量分数 98.54%, 批号 269872, 购自上海皓元生物医药科技有限公司; 小白菊内酯对照品, 批号 DST240311-021, 质量分数 99.28%, 购自成都乐美天医药科技有限公司; 大豆卵磷脂 (批号 SY-SO-230607)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀, 批号 C20128)、胆固醇 (批号 C20392), 购自艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司; 甲醇 (批号 67-56-1)、乙腈 (批号 75-05-8), 购自美国 Fisher 公司; 三氯甲烷, 批号 20220901, 购自国药集团化学试剂有限公司; 娃哈哈饮用纯净水, 批号 111319SD, 购自杭州娃哈哈集团有限公司; CCK-8 试剂盒, 批号 C0039, 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; RPMI1640 培养基, 批号 6123120, 购自美国 Gibco 公司。

2 方法与结果

2.1 Par-Lips 的制备

精密称取小白菊内酯原料药 23 mg、大豆卵磷脂 233.80 mg、胆固醇 0.78 mg、DSPE-mPEG₂₀₀₀ 68.67 mg 于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 3.5 mL 三氯甲烷充分溶解, 于转速 25 r/min、50 °C 下减压旋转蒸发 30 min 以除去有机溶剂, 得到干膜后, 加入 50 °C 预热过的磷酸盐缓冲液 (PBS、pH 7.4) 12 mL 充分水化 30 min, 经细胞破碎仪超声处理 45 min (功率 80 W、超声 2 s、间隔 2 s), 过 0.22 μm 微孔滤膜即可得到 Par-Lips, 于 4 °C 下保存。空白脂质体 (blank liposome, B-Lips) 的制备方法与 Par-Lips 一致, 但不加入小白菊内酯原料药。

2.2 HPLC 法测定小白菊内酯的含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-Pack VP-ODS C₁₈ 分析柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (60:40); 检测波长为 209 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 20 μL。

2.2.2 溶液的制备

(1) 小白菊内酯对照品溶液: 取小白菊内酯对照品适量, 精密称定, 置于 5 mL 棕色量瓶中, 以甲醇为溶剂, 超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得小白菊内酯对照品溶液。

(2) Par-Lips 供试品溶液: 精密吸取 Par-Lips 溶液 0.1 mL, 置于 5 mL 棕色量瓶中, 以甲醇为溶剂, 超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得 Par-Lips 供试品溶液。

(3) B-Lips 供试品溶液: 精密吸取 B-Lips 溶液 0.1 mL, 置于 5 mL 棕色量瓶中, 以甲醇为溶剂, 超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得 B-Lips 供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密称定 10.00 mg 小白菊内酯对照品, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 摇匀, 制备得 1.000 mg/mL 的小白菊内酯对照品溶液。用小白菊内酯对照品溶液配制 5、10、25、50、100、150 μg/mL 系列质量浓度的对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以小白菊内酯对照品溶液的峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程 $Y=21\,887X+5\,490.1$, $r=0.999\,9$, 结果表明小白菊内酯在 5~150 μg/mL 线性关系良好。

2.2.4 专属性考察 取 B-Lips 供试品溶液、Par-Lips 供试品溶液和小白菊内酯对照品溶液, 按照

“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 分别记录 HPLC 图。结果 (图 1) 表明, 在此色谱条件下, 小白菊内酯色谱峰峰形良好, 辅料对其测定无干扰。

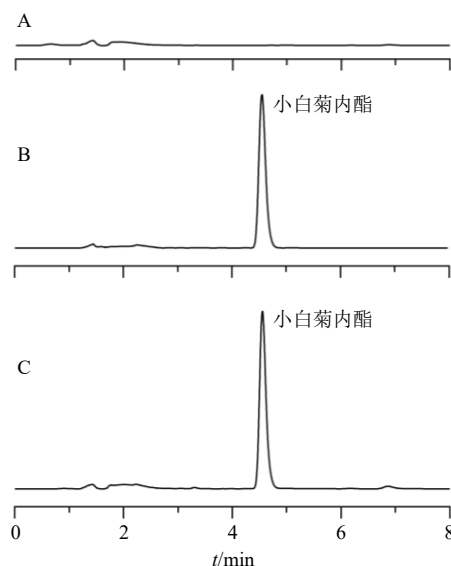


图 1 B-Lips 供试品溶液 (A)、小白菊内酯对照品溶液 (B) 和 Par-Lips 供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of B-Lips test sample solution (A), parthenolide reference substance solution (B) and Par-Lips test solution (C)

2.2.5 精密度考察

(1) 日内精密度: 取“2.2.2 (2)”项下 Par-Lips 供试品溶液 6 份, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 1 d 内连续进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算其 RSD。结果表明, 小白菊内酯峰面积的 RSD 为 0.78%, 其日内精密度较好。

(2) 日间精密度: 取“2.2.2 (2)”项下 Par-Lips 供试品溶液 6 份, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 连续进样测定 6 d, 记录峰面积, 计算其 RSD。结果表明, 小白菊内酯峰面积的 RSD 为 1.64%, 其日间精密度较好。

(3) 仪器精密度: 取低、中、高质量浓度 (小白菊内酯 60、75、90 μg/mL) 的 Par-Lips 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 1 d 内连续进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算其 RSD。结果表明, 低、中、高质量浓度 (60、75、90 μg/mL) Par-Lips 供试品溶液中小白菊内酯峰面积的 RSD 分别为 0.66%、0.16%、0.92%, 其仪器精密度较好。

2.2.6 稳定性考察 取“2.2.2 (2)”项下 Par-Lips 供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、8、16、24 h 进样测定, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定,

记录峰面积, 计算其 RSD。结果表明, Par-Lips 供试品溶液中小白菊内酯峰面积的 RSD 为 1.08%, 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取按照“2.2.2 (2)”项下方法制备的 Par-Lips 供试品溶液 6 份, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算得小白菊内酯质量分数的 RSD 为 0.91%, 表明该实验方法重复性较好。

2.2.8 加样回收率考察 分别取 Par-Lips 100 μL 至 9 个 5 mL 棕色量瓶中, 分别加入 150、200、250 μL 小白菊内酯对照品溶液, 即为低、中、高质量浓度 (60、75、90 $\mu\text{g/mL}$) 3 组, 每组平行 3 份。甲醇定容至刻度线后, 取 600 μL 置于截留相对分子质量 3 500 的超滤离心管中, 以 4 000 r/min 离心 (离心半径 6.5 cm) 60 min, 取续滤液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算得小白菊内酯的平均加样回收率分别为 97.47%, RSD 为 1.93%, 结果表明脂质体膜材对小白菊内酯定量测定无明显影响。

2.2.9 样品测定 取各待测样品, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 并根据“2.2.3”项下回归方程计算小白菊内酯含量。

2.3 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位的测定

2.3.1 包封率、载药量的测定 取 Par-Lips 100 μL 至 5 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定小白菊内酯总质量 (W_2)。另取 Par-Lips 600 μL 至截留相对分子质量 3 500 超滤离心管中, 4 000 r/min 离心 (离心半径 6.5 cm) 60 min, 取续滤液于 5 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容至刻度线, 进样 HPLC 测定小白菊内酯游离药物质量 (W_1), 分别按照公式 (1) (2) 计算小白菊内酯的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_2 - W_1) / W_2 \quad (1)$$

$$\text{载药量} = (W_2 - W_1) / (W_2 + W_3) \quad (2)$$

W_1 为游离药物的质量, W_2 为系统中药物的总质量, W_3 为系统中辅料的质量

2.3.2 粒径及 ζ 电位的测定 取 Par-Lips 100 μL , 采用纯水稀释 10 倍, 混匀, 置于粒径样品池中, 采用 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI); 另取 Par-Lips 100 μL , 采用纯净水稀释 10 倍, 混匀, 置于 ζ 电位样品池中, 采用 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定 ζ 电位, 每份样品平行测定 3 次。

2.4 单因素考察 Par-Lips 处方工艺参数

2.4.1 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量考察 固定处方中小白菊内酯 (24.00 mg)、胆固醇 (15.44 mg)、大豆卵磷脂 (266.82 mg) 的用量, 仅调整 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量分别为 16、32、48、64、80 mg, 按照“2.1”项下方法制备 Par-Lips, 以包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价, 结果见表 1。当 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量逐渐增加时, 包封率和载药量呈先下降后上升的趋势; 粒径和 ζ 电位呈现增大趋势, 而 PDI 则呈现下降趋势。当 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量为 80 mg 时, 包封率、载药量、PDI、 ζ 电位较好, 故选择 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量为 80 mg 进行后续工艺优化试验。

2.4.2 大豆卵磷脂与胆固醇物质的量比 (膜材比) 考察 固定处方中小白菊内酯 (24.00 mg)、大豆卵磷脂 (272.88 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ (80.00 mg) 的用量, 仅调整膜材比分别为 90:0、90:0.5、82:8、74:16、66:24、58:32、50:40, 按“2.1”项下方法制备 Par-Lips, 以包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价, 结果见表 2。随着 Par-Lips 中胆固醇用量的增加, 包封率和载药量呈下降的趋势, 有可能是胆固醇较多时不利于小白菊内酯在辅料中的溶解。当膜材比为 90:0.5 时, 包封率、载药量、粒径、PDI 和 ζ 电位均较好。

表 1 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量对 Par-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of DSPE-mPEG₂₀₀₀ dosage on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI and ζ potential of Par-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DSPE-mPEG ₂₀₀₀ 用量/mg	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
16	68.11 $\pm$ 2.72	5.07 $\pm$ 0.21	70.85 $\pm$ 0.80	0.245 $\pm$ 0.003	-4.80 $\pm$ 0.48
32	67.73 $\pm$ 2.83	4.89 $\pm$ 0.21	74.64 $\pm$ 0.75	0.239 $\pm$ 0.002	-6.73 $\pm$ 0.37
48	67.09 $\pm$ 2.46	4.71 $\pm$ 0.17	71.85 $\pm$ 0.21	0.236 $\pm$ 0.004	-6.77 $\pm$ 0.49
64	72.56 $\pm$ 2.38	4.95 $\pm$ 0.16	72.76 $\pm$ 0.59	0.219 $\pm$ 0.001	-7.82 $\pm$ 0.56
80	77.29 $\pm$ 1.34	5.13 $\pm$ 0.09	74.97 $\pm$ 0.45	0.200 $\pm$ 0.007	-7.43 $\pm$ 0.57

表 2 膜材比对 Par-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Effects of film ratio on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI and ζ potential of Par-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

膜材比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
90:0	81.97 $\pm$ 0.91	5.22 $\pm$ 0.06	72.81 $\pm$ 0.48	0.221 $\pm$ 0.005	-7.90 $\pm$ 0.17
90:0.5	82.42 $\pm$ 0.31	5.24 $\pm$ 0.02	67.24 $\pm$ 0.79	0.196 $\pm$ 0.006	-7.78 $\pm$ 0.47
82:8	72.03 $\pm$ 2.60	4.74 $\pm$ 0.06	71.62 $\pm$ 0.79	0.192 $\pm$ 0.003	-5.30 $\pm$ 0.14
74:16	60.85 $\pm$ 1.18	4.01 $\pm$ 0.07	75.47 $\pm$ 0.37	0.206 $\pm$ 0.006	-6.19 $\pm$ 0.17
66:24	46.52 $\pm$ 1.75	3.13 $\pm$ 0.10	78.02 $\pm$ 1.11	0.185 $\pm$ 0.003	-5.88 $\pm$ 0.23
58:32	36.16 $\pm$ 1.21	2.38 $\pm$ 0.03	81.15 $\pm$ 0.65	0.200 $\pm$ 0.008	-5.64 $\pm$ 0.40
50:40	29.32 $\pm$ 1.03	1.93 $\pm$ 0.02	87.48 $\pm$ 0.82	0.212 $\pm$ 0.004	-6.29 $\pm$ 0.18

胆固醇在脂质体中具有调节磷脂双分子层流动性、使磷脂在脂质体膜中排列更紧密等作用,同时适量的胆固醇能提高药物包封率和制剂稳定性^[25],故选择膜材比为 90:0.5 进行后续工艺试验。

2.4.3 小白菊内酯与大豆卵磷脂质量比 (药脂比) 考察 固定处方中大豆卵磷脂 (272.88 mg)、胆固醇 (0.77 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ (80.00 mg) 的用量,仅调整药脂比分别为 1:50、1:25、1:16.5、1:12.5、1:10、1:5,按照“2.1”项下方法制备 Par-

Lips,以包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价,结果见表 3。随着小白菊内酯用量的增加,Par-Lips 的包封率总体呈现减小的趋势,这可能是因为在大豆卵磷脂与胆固醇用量不变的情况下,其对小白菊内酯包载能力有限。可见小白菊内酯用量对 Par-Lips 的指标影响较大。当药脂比为 1:10 时载药量最大,粒径、PDI 和 ζ 电位绝对值大小也相对理想,故选择药脂比为 1:10 进行后续工艺优化试验。

表 3 药脂比对 Par-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effects of drug-lipid ratio on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI and ζ potential of Par-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药脂比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1:50	85.34 $\pm$ 1.11	1.30 $\pm$ 0.01	74.00 $\pm$ 0.29	0.202 $\pm$ 0.003	-7.14 $\pm$ 0.34
1:25	81.80 $\pm$ 1.00	2.45 $\pm$ 0.03	72.14 $\pm$ 0.69	0.205 $\pm$ 0.003	-7.04 $\pm$ 0.19
1:16.5	76.42 $\pm$ 2.84	3.41 $\pm$ 0.12	71.50 $\pm$ 0.88	0.206 $\pm$ 0.002	-7.44 $\pm$ 0.32
1:12.5	75.43 $\pm$ 0.49	4.38 $\pm$ 0.01	70.73 $\pm$ 1.11	0.214 $\pm$ 0.000	-7.31 $\pm$ 0.16
1:10	73.47 $\pm$ 1.26	5.15 $\pm$ 0.10	69.52 $\pm$ 1.01	0.218 $\pm$ 0.002	-7.34 $\pm$ 0.09
1:5	34.34 $\pm$ 0.31	4.59 $\pm$ 0.01	71.18 $\pm$ 0.97	0.218 $\pm$ 0.011	-12.67 $\pm$ 1.11

2.4.4 水浴温度考察 固定处方中小白菊内酯 (27.28 mg)、胆固醇 (0.77 mg)、大豆卵磷脂 (272.88 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ (80.00 mg) 的用量,仅调整水浴温度分别为 45、50、55、60、65 $^{\circ}\text{C}$,按照“2.1”项下方法制备 Par-Lips,以包封率、载药量、粒径、

PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价,结果见表 4。在水浴温度达到 50 $^{\circ}\text{C}$ 后,包封率和载药量有所下降,因为当温度升高到相变温度以上时,大豆卵磷脂流动性会增强,有利于药物包封;但水浴温度对于 Par-Lips 的包封率和载药量无显著影响 ($P>$

表 4 水浴温度对 Par-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effects of water bath temperature on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI and ζ potential of Par-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水浴温度/ $^{\circ}\text{C}$	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
45	79.10 $\pm$ 3.80	5.67 $\pm$ 0.28	70.70 $\pm$ 0.16	0.220 $\pm$ 0.002	-8.61 $\pm$ 0.26
50	81.73 $\pm$ 0.81	5.86 $\pm$ 0.05	71.43 $\pm$ 0.09	0.223 $\pm$ 0.003	-8.18 $\pm$ 0.25
55	79.97 $\pm$ 0.72	5.73 $\pm$ 0.03	68.81 $\pm$ 0.61	0.209 $\pm$ 0.006	-7.20 $\pm$ 0.14
60	80.94 $\pm$ 0.45	5.79 $\pm$ 0.03	71.34 $\pm$ 0.26	0.242 $\pm$ 0.019	-8.21 $\pm$ 0.15
65	81.28 $\pm$ 2.19	5.82 $\pm$ 0.15	70.41 $\pm$ 0.14	0.216 $\pm$ 0.008	-8.95 $\pm$ 0.36

0.05), 考虑到三氯甲烷自身的沸点相对较低 (61.7 °C, 标准大气压下), 挥发除去容易, 且水浴温度为 50 °C 时, Par-Lips 的包封率和载药量最大, 故选择水浴温度为 50 °C 进行后续工艺优化试验。

2.4.5 超声时间考察 固定处方中小白菊内酯 (27.28 mg)、胆固醇 (0.77 mg)、大豆卵磷脂 (272.88 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ (80.00 mg) 的用量, 仅调整超声时间分别为 0、15、30、45、60 min, 按照“2.1”项下方法制备 Par-Lips, 以包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价, 结果见表 5。在超声时间大于 15 min 后, 包封率和载药量有所下降, 可能是因为超声时间过长导致部分药物泄

漏, 但粒径和 PDI 相对较大。在考虑超声分散均匀以及包封率和载药量最大的情况下选择超声时间为 45 min 进行后续工艺优化试验。

2.4.6 旋转速度考察 固定处方中小白菊内酯 (27.28 mg)、胆固醇 (0.77 mg)、大豆卵磷脂 (272.88 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ (80.00 mg) 的用量, 仅调整旋转速度分别为 25、50、75、100、125 r/min, 按照“2.1”项下方法制备 Par-Lips, 以包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价, 结果见表 6。随着旋转速度的增加, 包封率和载药量呈现出先下降、再上升、后下降的趋势, 可能是较快的旋转速度破坏了脂质体的稳定性, 导致部分药

表 5 超声时间对 Par-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of ultrasonic time on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI and ζ potential of Par-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	45.82 $\pm$ 2.25	3.28 $\pm$ 0.14	300.47 $\pm$ 11.29	0.393 $\pm$ 0.042	-9.23 $\pm$ 0.09
15	84.18 $\pm$ 1.49	6.03 $\pm$ 0.10	77.60 $\pm$ 1.95	0.267 $\pm$ 0.022	-8.30 $\pm$ 0.34
30	79.45 $\pm$ 2.64	5.69 $\pm$ 0.13	69.05 $\pm$ 0.14	0.213 $\pm$ 0.004	-7.21 $\pm$ 0.08
45	82.95 $\pm$ 0.68	5.93 $\pm$ 0.04	68.85 $\pm$ 0.95	0.221 $\pm$ 0.008	-8.46 $\pm$ 1.11
60	82.24 $\pm$ 1.44	5.89 $\pm$ 0.09	68.76 $\pm$ 0.69	0.242 $\pm$ 0.015	-8.08 $\pm$ 0.09

表 6 旋转速度对 Par-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effects of rotation speed on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI and ζ potential of Par-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

旋转速度/(r·min ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
25	85.19 $\pm$ 0.89	6.10 $\pm$ 0.02	68.84 $\pm$ 0.23	0.222 $\pm$ 0.002	-7.89 $\pm$ 0.64
50	83.13 $\pm$ 1.85	5.95 $\pm$ 0.11	67.97 $\pm$ 0.51	0.227 $\pm$ 0.003	-7.57 $\pm$ 0.13
75	83.97 $\pm$ 0.41	6.02 $\pm$ 0.01	69.27 $\pm$ 0.54	0.228 $\pm$ 0.004	-7.76 $\pm$ 0.44
100	83.16 $\pm$ 0.24	5.96 $\pm$ 0.02	69.33 $\pm$ 0.72	0.227 $\pm$ 0.003	-7.57 $\pm$ 0.76
125	82.71 $\pm$ 1.07	5.92 $\pm$ 0.04	67.95 $\pm$ 1.04	0.242 $\pm$ 0.008	-7.64 $\pm$ 0.65

物泄漏, 同时也阻碍了体系中粒子间的碰撞, 导致沉降, 从而使得 Par-Lips 的平均粒径及 PDI 增大。当旋转速度为 25 r/min 时载药量和包封率最大, 粒径、PDI 和 ζ 电位绝对值大小也相对理想, 故选择旋转速度为 25 r/min 进行后续工艺优化试验。

2.5 BBD-RSM 优化 Par-Lips 处方

2.5.1 优化方案设计 根据单因素实验结果, 选择对 Par-Lips 包封率和载药量的影响最大的 3 个因素: DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量 (X_1)、膜材比 (X_2) 和药脂比 (X_3), 以包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2)、粒径 (Y_3) 和 PDI (Y_4) 为评价指标进行 BBD-RSM 实验设计优化, 各个因素的水平见表 7。由于各条件对 ζ 电位的影响并不显著, 所以未选取其作为评价指标。

此外, 为了更直观地评价试验结果, 在实验过程中常引入归一化综合值^[26] (outside diameter, OD 值), 其目的是将具有不同量纲的多个指标转化为相同的量纲, 以便在同一标准下对它们进行比较和加权求和。因此, 将包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2)、粒径 (Y_3) 和 PDI (Y_4) 化为归一化综合值, 来考察指标的综合效果。对于欲达到最大化的指标, 如包封率、载药量, 计算方式为公式 (3); 对于欲达到最小化的指标, 如粒径, 计算方式为公式 (4), OD 值计算公式为式 (5)。

$$d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (3)$$

$$d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (4)$$

$$OD = (\prod_{i=1}^n d_i)^{1/n} \quad (5)$$

表 7 BBD-RSM 设计实验因素水平及试验结果

Table 7 Experimental factor level and experimental results of BBD-RSM

序号	X ₁ /mg	X ₂	X ₃	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /nm	Y ₄	OD 值	序号	X ₁ /mg	X ₂	X ₃	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /nm	Y ₄	OD 值
1	72 (0)	190 (+1)	7.5 (-1)	57.59	5.54	66.98	0.238	0	10	72	170	10.0	81.35	5.91	67.71	0.226	0.439 1
2	80 (+1)	170 (0)	7.5	56.74	5.24	68.31	0.215	0	11	72	170	10.0	80.13	5.80	68.57	0.230	0.416 2
3	72	150 (-1)	12.5 (+1)	82.53	4.75	70.38	0.202	0.442 0	12	80	150	10.0	79.43	5.48	69.08	0.180	0.458 1
4	64 (-1)	150	10.0 (0)	81.11	5.88	69.21	0.213	0.449 8	13	64	170	12.5	79.29	4.77	68.32	0.218	0.400 0
5	64	190	10.0	76.56	5.78	66.79	0.239	0.365 9	14	72	170	10.0	80.67	5.85	68.32	0.221	0.436 6
6	80	190	10.0	81.21	5.88	67.21	0.224	0.442 9	15	72	170	10.0	82.84	6.01	67.54	0.225	0.458 4
7	72	190	12.5	83.49	5.02	67.78	0.232	0	16	64	170	7.5	56.23	5.42	69.14	0.236	0
8	72	170	10.0	84.51	6.13	68.32	0.218	0.482 6	17	80	170	12.5	80.37	4.62	68.57	0.209	0.416 6
9	72	150	7.5	59.51	5.49	69.25	0.219	0									

Y_i 为实际测量值; $Y_{\max}$ 和 $Y_{\min}$ 分别为各指标可接受的最大值和最小值; 对于公式 (3), 当试验中某指标等于或超过 $Y_{\max}$ 将设为 1, 反之小于 $Y_{\min}$ 则设为 0; 对于公式 (4), 当试验中某指标等于或超过 $Y_{\max}$ 将设为 0, 反之小于或等于 $Y_{\min}$ 则设为 1

2.5.2 模型及方差分析 采用 Design-Expert V 13.0 软件以综合指标 OD 值对 X_1 、 X_2 、 X_3 进行拟合, 得 OD 值的 2 次多元回归方程为 $Y=0.446\ 6+0.012\ 7\ X_1-0.067\ 6\ X_2+0.157\ 3\ X_3+0.017\ 2\ X_1X_2+0.004\ 2$

$X_1X_3-0.110\ 5\ X_2X_3+0.038\ 1\ X_1^2-0.055\ 5\ X_2^2-0.280\ 6\ X_3^2$, $R^2=0.947\ 7$, $P<0.01$ 。由 R^2 与 P 值和可知, 该预测模型拟合情况较好; 且方程的失拟项 P 值均大于 0.05, 差异不具有统计学意义, 因此该方程预测结果可靠性较高, 可反映实际情况。对方程中各项系数进行了统计检验, OD 值方差分析见表 8。

2.5.3 效应面评估与预测 采用 Design Expert V 13.0 绘制因变量对自变量的三维曲面图。分别固定

表 8 方差分析结果 (OD 值)

Table 8 ANOVA results (OD value)

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.639 9	9	0.071 1	14.080 0	0.001 1	极显著	X_1^2	0.006 1	1	0.006 1	1.210 0	0.307 4	
X_1	0.001 3	1	0.001 3	0.257 1	0.627 7		X_2^2	0.013 0	1	0.013 0	2.570 0	0.152 9	
X_2	0.036 6	1	0.036 6	7.250 0	0.031 0	显著	X_3^2	0.331 4	1	0.331 4	65.640 0	<0.000 1	极显著
X_3	0.198 0	1	0.198 0	39.220 0	0.000 4	极显著	残差	0.035 3	7	0.005 0			
X_1X_2	0.001 2	1	0.001 2	0.233 7	0.643 6		失拟项	0.032 8	3	0.010 9	17.400 0	0.009 3	极显著
X_1X_3	0.000 1	1	0.000 1	0.013 6	0.910 3		纯偏差	0.002 5	4	0.000 6			
X_2X_3	0.048 8	1	0.048 8	9.670 0	0.017 1	显著	总离差	0.675 2	16				

DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量 (X_1)、膜材比 (X_2) 和药脂比 (X_3) 因素中之一, 得到另外 2 个因素的交互作用对综合指标 OD 值影响的结果见图 2。根据 BBD-RSM 实验优化结果, 得到最佳处方为 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量为 68.670 4 mg, 膜材比为 150 : 1, 药脂比为 1 : 10.155 8。考虑到实际可操作性以及仪器的精确度, 将最优条件调整为 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量 68.68 mg, 膜材比 150 : 1, 药脂比 1 : 10.15, 最优条件下的考察指标理论值如下: 包封率为 83.16%, 载药量为 5.89%, 粒径为 69.49 nm, PDI 为 0.209。在此处方工艺条件下平行制备 3 批 Par-Lips, 结果见表 9。

2.6 Par-Lips 的制剂学评价

2.6.1 Par-Lips 外观和丁达尔现象 观察最优处方

新制备的 Par-Lips、小白菊内酯溶液外观。结果如图 3 所示, Par-Lips 呈淡乳白色, 小白菊内酯溶液外观无混浊, 较为澄明; 当红外光射入时, 产生了丁达尔现象, 而小白菊内酯溶液没有出现明显的丁达尔效应, 表明 Par-Lips 制备成了脂质体。

2.6.2 粒径和 ζ 电位的测定 取最优处方新制备的 Par-Lips 100 μ L, 采用纯净水稀释 10 倍, 混匀, 于 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定其粒径为 (67.38 ± 0.33) nm、PDI 为 0.200 ± 0.003 、 ζ 电位为 (-7.36 ± 0.02) mV, 结果见图 4。

2.6.3 TEM 形态观察 将最优处方新制备的 Par-Lips 用纯净水适当稀释, 取少许滴至铺有碳膜的铜网上, 用 2% 磷钨酸染色, 晾干后, 于透射电子显微

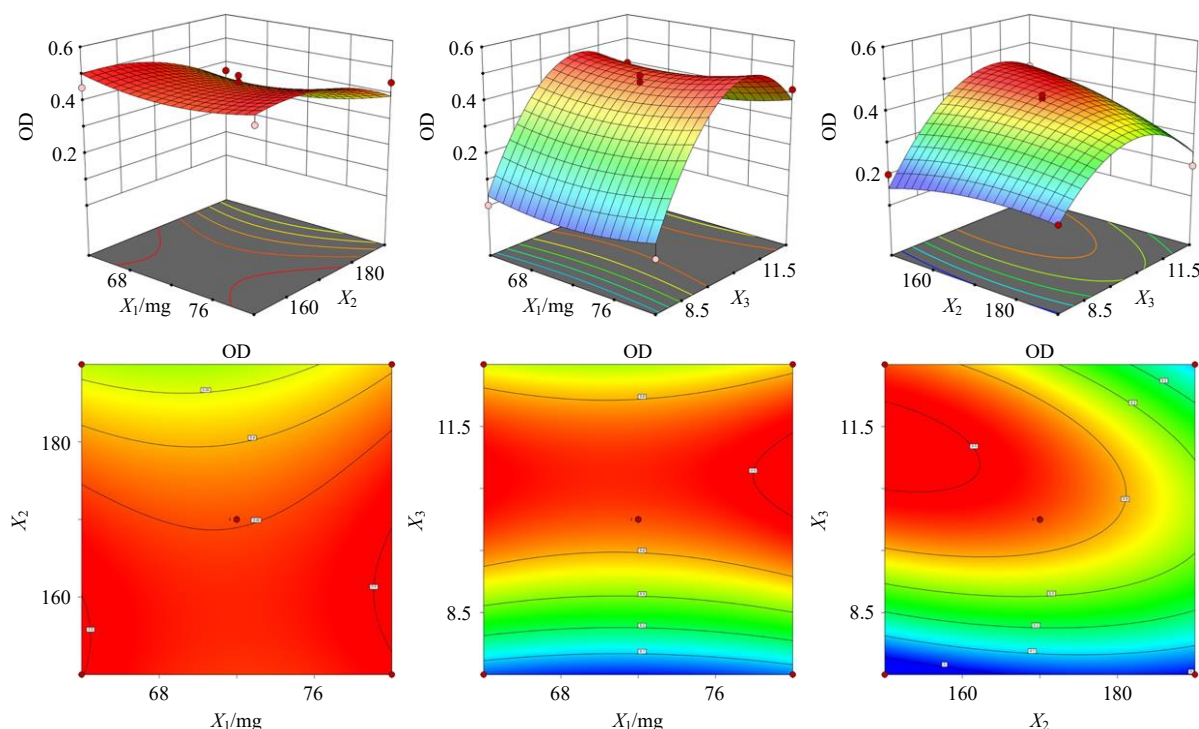


图 2 因素间交互作用的响应面 2D 图和 3D 图 (OD 值)

Fig. 2 Response surface 2D plot and 3D plot of interaction between factors (OD value)

表 9 最优处方的验证

Table 9 Validation of optimal prescription

序号	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	OD 值
验证1	82.63	5.83	67.32	0.196	-7.39	0.491 5
验证2	82.46	5.82	67.00	0.203	-7.35	0.481 9
验证3	84.45	5.95	67.81	0.203	-7.33	0.500 8
验证均值	83.18	5.87	67.38	0.200	-7.36	0.491 4
RSD	0.03	0.40	3.04	4.09	1.74	1.83
最优处方理论值	83.16	5.89	69.49	0.209	-7.49	0.482 6

镜 (transmission electron microscope, TEM) 下观察并拍照, 结果见图 5, Par-Lips 成类球形, 可观察到类脂质双分子层。经 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定 Par-Lips 得到的平均粒径小于 TEM 的测量结果, 这可能是由于在检测过程中 Par-Lips 通过水合作用吸附水分子, 形成包被层而致使检测得到的粒径变大, 而新制备得到的脂质体能够均匀地分散在溶液当中, 无团聚现象发生。

2.6.4 储存稳定性考察 将同批次按最优处方新制备的 Par-Lips 置于 4 °C 条件下储存, 分别在 1~14 d 和 30 d 取样, 分别进行载药量、包封率、渗漏率以及粒径、PDI、ζ 电位测定, 以考察脂质体的稳定性, 按照公式 (1) (2) (6) 分别计算 Par-Lips 的包封率、载药量和渗漏率。结果如表 10 所示, Par-

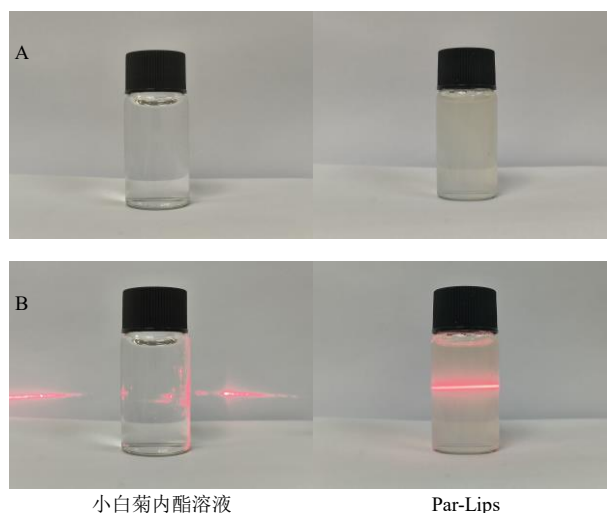


图 3 小白菊内酯溶液和 Par-Lips 的外观图 (A) 和丁达尔现象 (B)

Fig. 3 Appearance (A) and Dardel phenomenon (B) of parthenolide solution and Par-Lips

Lips 在 4 °C 环境中放置 30 d, 其外观性状无明显变化, 仍呈均一、稳定状态, 粒径、PDI 以及 ζ 电位变化幅度较小。脂质体的渗漏率是评价脂质体储藏稳定性的重要指标之一。在 4 °C 条件下, 随着时间的延长, Par-Lips 渗漏率逐步增加, 包封率和载药量呈现下降的趋势, 14 d 内 Par-Lips 的小白菊内酯的渗漏率小于 15%, 表明 Par-Lips 在 4 °C 条件下贮

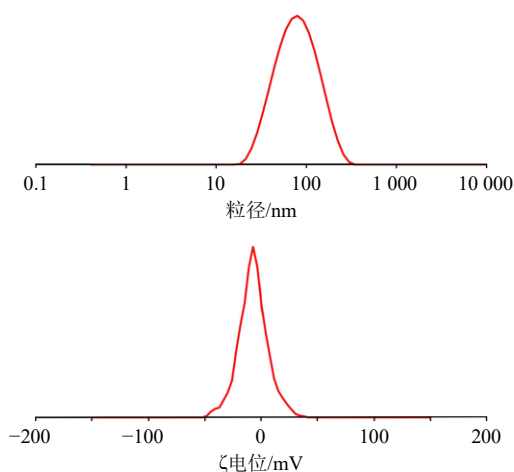


图 4 Par-Lips 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)
Fig. 4 Particle size (A) and ζ potential (B) of Par-Lips

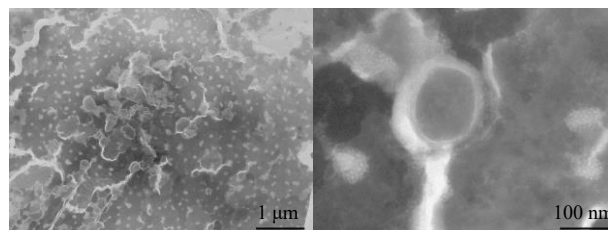


图 5 Par-Lips 的 TEM 图
Fig. 5 TEM of Par-Lips

藏相对良好，具有一定的稳定性。

渗漏率 = (初始脂质体的包封率 - 贮藏后脂质体的包封率) / 初始脂质体的包封率 (6)

2.6.5 血清稳定性考察 取 5 mL 新制备的 Par-Lips，与等体积含有 10% 胎牛血清的 PBS (pH 7.4)

表 10 储藏稳定性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Storage stability test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

储藏时间/d	载药量/%	包封率/%	渗漏率/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	5.69 ± 0.01	80.76 ± 0.25	0	68.72 ± 0.07	0.222 ± 0.005	-5.75 ± 0.25
2	5.67 ± 0.01	80.50 ± 0.18	0.32 ± 0.01	68.90 ± 0.60	0.215 ± 0.004	-5.70 ± 0.58
4	5.52 ± 0.03	78.38 ± 0.51	2.95 ± 0.01	69.78 ± 0.23	0.218 ± 0.004	-5.93 ± 0.47
6	5.45 ± 0.10	77.38 ± 1.46	4.19 ± 0.02	68.83 ± 0.16	0.211 ± 0.004	-5.38 ± 0.11
8	5.27 ± 0.20	74.40 ± 2.80	7.51 ± 0.03	70.08 ± 0.27	0.216 ± 0.004	-6.25 ± 0.30
10	5.18 ± 0.16	73.44 ± 2.28	9.07 ± 0.03	70.37 ± 0.41	0.216 ± 0.002	-6.65 ± 0.23
12	5.09 ± 0.12	72.26 ± 1.67	10.53 ± 0.02	69.80 ± 0.60	0.214 ± 0.007	-6.26 ± 0.41
14	4.94 ± 0.07	70.09 ± 1.01	13.21 ± 0.01	70.04 ± 0.53	0.215 ± 0.009	-6.91 ± 0.57
30	4.26 ± 0.04	60.41 ± 0.46	24.96 ± 0.01	71.26 ± 0.31	0.217 ± 0.003	-6.66 ± 0.61

混合并密封，于 37 °C 下孵育 0、1、2、4、8、12、24、48 h 时，取适量 Par-Lips 测定其粒径、PDI 和 ζ 电位，结果如表 11 所示。在 24 h 内，Par-Lips 粒径、PDI 及 ζ 电位变化均较小，但 24 h 后，其粒径、PDI 开始呈增大趋势，可能是 Par-Lips 发生聚集或者蛋白吸附现象^[27]，从而影响脂质体的功能和稳定性，使其粒径、PDI 增大。

表 11 血清稳定性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Serum stability test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

储藏时间/h	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	68.19 ± 1.28	0.168 ± 0.003	-6.01 ± 0.31
1	67.45 ± 2.07	0.172 ± 0.006	-6.43 ± 0.45
2	68.38 ± 0.96	0.179 ± 0.003	-5.92 ± 0.03
4	67.15 ± 1.91	0.169 ± 0.005	-6.25 ± 0.05
8	68.00 ± 0.86	0.183 ± 0.003	-6.72 ± 0.42
12	67.72 ± 1.26	0.165 ± 0.001	-6.31 ± 0.41
24	67.19 ± 1.34	0.167 ± 0.003	-6.12 ± 0.14
48	121.47 ± 1.06	0.299 ± 0.039	-5.56 ± 0.14

2.6.6 体外释药特性研究 量取相同药物质量浓度的小白菊内酯甲醇溶液与 Par-Lips 溶液各 3 mL，放入活化后的透析袋（相对分子质量 3 500）中，两端扎牢置于 150 mL 的 PBS (pH 7.4) 释放介质中，于 (37.0 ± 0.5) °C 恒温振荡器中振荡，分别于 5、10、15、30 min 及 1、2、4、6、8、10、12、24、48、72 h 时取释放液 5 mL，并补充等量等温的相同 pH 值的释放介质。过 0.22 μm 滤膜，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定，记录峰面积，计算小白菊内酯的累积释放率 (M)，绘制释放曲线，并进行释药数学模型拟合。由图 6 和表 12 可知，小白菊内酯溶液释放相对较快，1 h 累积释放率达到 80% 以上，在 4 h 时已基本释放完全，但在 24 h 后其累积释放率有所降低，这可能与小白菊内酯稳定性差、易降解有关。而 Par-Lips 在 1、4 h 时的累积释放率分别为 39.39%、76.04%，表明小白菊内酯制成脂质体剂型后，可在一定程度上延缓小白菊内酯释放，具有一定的缓控释作用。将小白菊内酯与 Par-Lips 释放

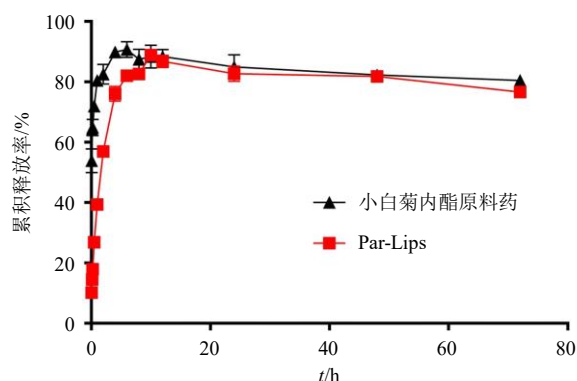


图 6 小白菊内酯和 Par-Lips 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Release profiles *in vitro* of parthenolide and Par-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 12 小白菊内酯原料药和 Par-Lips 的释药模型拟合方程

Table 12 Drug release model fitting equations of parthenolide bulk drug and Par-Lips

释药模型拟合方程	小白菊内酯原料药			Par-Lips		
	拟合方程	R^2	SEM	拟合方程	R^2	SEM
零级方程 $M_t = kt$	$M_t = 0.0012t + 0.7765$	0.0058	0.0112	$M_t = 0.0067t + 0.4987$	0.2200	0.0663
一级方程 $M_t = a(1 - e^{-kt})$	$M_t = 0.8394(1 - e^{-9.0543t})$	0.7087	0.0003	$M_t = 0.8291(1 - e^{-0.6799t})$	0.9817	0.0001
Higuchi 方程 $M_t = kt^{1/2}$	$M_t = 0.0207t^{1/2} + 0.7361$	0.2122	0.0008	$M_t = 0.0831t^{1/2} + 0.3595$	0.4753	0.0037
Riger-Peppas 方程 $M_t = at^k$	$M_t = 0.7617t^{0.2804}$	0.7795	0.0002	$M_t = 0.4595t^{0.5575}$	0.9418	0.0004

5 000 个的密度接种于 96 孔板中, 并使每孔含有细胞悬液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁后, 吸去旧培养基, 分别加入质量浓度为 4、8、16、24、32 $\mu\text{mol/L}$ 的 Par-Lips、游离的小白菊内酯样品, 选取未加入药物的孔作为对照组, 每组设 6 个复孔, 置于条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中再继续培养 24、48 h。吸弃旧培养基, 加入 10 μL CCK-8 溶液继续培养 2 h, 测定细胞在 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 按下式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

CCK-8 实验结果如表 13 所示。在胆管癌 TFK-1 细胞模型中, 给药 48 h 后随着小白菊内酯药物物质

数据按零级释药方程、一级释药方程、Higuchi 释药方程、Riger-Peppas 释药方程进行模型拟合, 以拟合相关系数 (R^2) 最大和均方误差 (mean-square error, SEM) 最小为最佳的拟合结果, 结果见表 12。小白菊内酯的释放曲线符合 Riger-Peppas 动力学释药模型, 这意味着药物的扩散和骨架的溶蚀是协同作用的过程, 而不是简单的扩散过程; 而 Par-Lips 符合一级动力学模型, 其可以反映药物在特定介质中的释放速率和最终质量浓度, 有利于预测 Par-Lips 在体内的实际释放速率。

2.7 体外细胞毒性试验

取对数生长期的胆管癌 TFK-1 细胞, 以每孔

量浓度的增加, 小白菊内酯给药组的细胞存活率从 $(108.81 \pm 2.27)\%$ 降至 $(20.55 \pm 2.41)\%$, Par-Lips 给药组的细胞存活率, 从 $(110.33 \pm 2.70)\%$ 降至 $(3.55 \pm 0.53)\%$, 这表明小白菊内酯和 Par-Lips 对胆管癌 TFK-1 细胞的生长起抑制作用, 且呈现出明显的剂量相关性。在低药物质量浓度 (4、8、16 $\mu\text{mol/L}$) 下, 小白菊内酯抑制胆管癌 TFK-1 细胞生长的能力优于 Par-Lips, 这可能是由于脂质体处于缓慢释放期, 当游离药物和表面药物耗尽后, 小白菊内酯通过脂质屏障缓慢扩散或者随着脂质膜重排或融合引起结构坍塌, 使得药物缓慢持续释放。此外, 不同释放介质 (如培养基、组织液等) 的性

表 13 不同给药组对 TFK-1 细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 13 Inhibitory effect of different administration groups on proliferation of TFK-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	24 h 细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
小白菊内酯原料药	100.00 $\pm$ 0.01	109.47 $\pm$ 4.86	64.45 $\pm$ 4.86	21.54 $\pm$ 0.36	21.05 $\pm$ 2.40	20.61 $\pm$ 0.16
Par-Lips	100.00 $\pm$ 0.01	115.08 $\pm$ 2.80	86.41 $\pm$ 4.00***	24.86 $\pm$ 1.61	9.26 $\pm$ 1.50***	5.02 $\pm$ 0.10***
组别	48 h 细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
小白菊内酯原料药	100.00 $\pm$ 0.16	108.81 $\pm$ 2.27	60.63 $\pm$ 3.81	22.36 $\pm$ 0.79	21.70 $\pm$ 2.29	20.55 $\pm$ 2.41
Par-Lips	100.00 $\pm$ 0.03	110.33 $\pm$ 2.70	80.93 $\pm$ 2.76***	23.05 $\pm$ 0.49	5.79 $\pm$ 0.22***	3.55 $\pm$ 0.53***

同一质量浓度下与小白菊内酯原料药比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs parthenolide bulk drug at the same mass concentration.

质也会影响药物的释放速率。而在高药物质量浓度(32 $\mu\text{mol/L}$)下, Par-Lips 相较于小白菊内酯, 展现出更强的胆管癌 TFK-1 细胞杀伤能力($P<0.001$), 这说明将小白菊内酯制备成脂质体可在一定程度增强其对胆管癌 TFK-1 细胞的毒性作用。

3 讨论

小白菊内酯是草本植物小白菊的主要活性成分, 具有抗炎、调节免疫、治疗头痛和风湿等功效, 但其存在水溶性差、稳定性不佳等缺点, 很大程度上限制了小白菊内酯的研发及临床应用^[28-29]。脂质体是由一种具有类生物膜排列有序的脂质双分子层组成的球形囊状物, 其作为一种优良的药物递送载体, 具有提高药物溶解度、降低药物不良反应、生物相容性好、增强肿瘤靶向性等显著优势^[30-31], 将小白菊内酯制备成脂质体有利于其在临床的进一步应用与开发。因此, 在本研究中, 利用单因素考察结合 BBD-RSM 优化 Par-Lips 处方, 并评估其在提高药物成药性能以及对体外细胞药效作用的影响。

纳米载体实现不同部位靶向的首要条件是适宜的粒径, 粒径在 50~200 nm 的纳米颗粒, 具有一定的高渗透性和滞留效应, 可以有效地渗透到肿瘤组织中, 增加药物在肿瘤处的蓄积, 使治疗更有效^[32]。在 TEM 下可观察到 Par-Lips 呈球形或类球形分布, 且外层有一层脂质层包裹, 粒径为(67.38 ± 0.33) nm、 ζ 电位为(-7.36 ± 0.02) mV, 这表明其符合实体瘤的高通透性和滞留效应要求, 具备通过血管间隙进入实体瘤细胞的条件, 有利于提高 Par-Lips 在体内的循环时间, 减少免疫识别和清除, 从而提高药物的疗效和减少不良反应。

此外, Par-Lips 的体外溶出曲线拟合结果显示, 其一级方程为最佳拟合模型($R^2=0.9817$), 与小白菊内酯溶液相比, 具有一定的缓释作用。一级动力学模型表示药物释放速率与药物浓度成正比关系, 其有利于预测 Par-Lips 在体内的实际释放速率。

在体外药效研究发现, Par-Lips 对胆管癌 TFK-1 细胞在 24、48 h 内都具有明显的抑制作用, 且在高药物浓度(32 $\mu\text{mol/L}$)下, Par-Lips 相较于小白菊内酯, 展现出更强的胆管癌 TFK-1 细胞杀伤能力($P<0.001$), He 等^[33]关于小白菊内酯的研究也得到了相似的试验结果, 其不仅可以呈浓度相关性诱导胆管癌 TFK-1 细胞的增殖抑制和凋亡, 还能通过介导谷氨酰胺和谷氨酸代谢、谷胱甘肽代谢和脂肪酸

代谢通路以起到抗胆管癌的作用。

综上所述, 本研究通过 BBD-RSM 优化制备的 Par-Lips 粒径较小, 具有一定的缓释效应和较高的稳定性, 能显著增加对胆管癌 TFK-1 细胞增殖的抑制作用, 其不仅为治疗胆管癌提供了一定的基础理论依据, 还为该制剂的进一步开发应用提供了有益的探索。然而, 脂质纳米药物从体外设计到体内性能验证、从动物到人体的临床转化仍面临困难和挑战。因此, 后续研究将进行 Par-Lips 的体内抗胆管癌药效学、药动学等相关研究, 以期 Par-Lips 的开发与应用提供更为全面的研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Freund R R A, Gobrecht P, Fischer D, *et al.* Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide [J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37(4): 541-565.
- [2] Berdan C A, Ho R, Lehtola H S, *et al.* Parthenolide covalently targets and inhibits focal adhesion kinase in breast cancer cells [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(7): 1027-1035.e22.
- [3] Kawasaki B T, Hurt E M, Kalathur M, *et al.* Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: An integrated molecular profiling approach [J]. *Prostate*, 2009, 69(8): 827-837.
- [4] Liu D J, Liu Y, Liu M H, *et al.* Reversing resistance of multidrug-resistant hepatic carcinoma cells with parthenolide [J]. *Future Oncol*, 2013, 9(4): 595-604.
- [5] Diamanti P, Cox C V, Moppett J P, *et al.* Parthenolide eliminates leukemia-initiating cell populations and improves survival in xenografts of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2013, 121(8): 1384-1393.
- [6] Zhou J B, Zhang H, Gu P H, *et al.* NF-kappaB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 111(3): 419-427.
- [7] Liu Z F, Liu S J, Xie Z L, *et al.* Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(2): 505-514.
- [8] Kim S L, Kim S H, Trang K T T, *et al.* Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil in combination with parthenolide in human colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(2): 479-486.
- [9] Kim J H, Liu L, Lee S O, *et al.* Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6312-6320.
- [10] Yun B R, Lee M J, Kim J H, *et al.* Enhancement of

- parthenolide-induced apoptosis by a PKC- α inhibition through heme oxygenase-1 blockage in cholangiocarcinoma cells [J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42(11): 787-797.
- [11] 孙英辉, 尚海花, 慈小燕, 等. 基于药物转运体的小白菊内酯衍生物 ACT001 的跨膜转运机制和耐药性研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3711-3719.
- [12] Liu X C, Wang X B. Recent advances on the structural modification of parthenolide and its derivatives as anticancer agents [J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20(11): 814-829.
- [13] Lesiak K, Koprowska K, Zalesna I, *et al.* Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells *in vitro* [J]. *Melanoma Res*, 2010, 20(1): 21-34.
- [14] Gill K K, Kaddoumi A, Nazzal S. Mixed micelles of PEG(2000)-DSPE and vitamin-E TPGS for concurrent delivery of paclitaxel and parthenolide: Enhanced chemosensitization and antitumor efficacy against non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46(1/2): 64-71.
- [15] Jin X, Lu X Y, Zhang Z H, *et al.* Indocyanine green-parthenolide thermosensitive liposome combination treatment for triple-negative breast cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 3193-3206.
- [16] Liang P, Wu H Y, Zhang Z H, *et al.* Preparation and characterization of parthenolide nanocrystals for enhancing therapeutic effects of sorafenib against advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Pharm*, 2020, 583: 119375.
- [17] Jin X, Zhou J P, Zhang Z H, *et al.* The combined administration of parthenolide and ginsenoside CK in long circulation liposomes with targeted tLyp-1 ligand induce mitochondria-mediated lung cancer apoptosis [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup3): S931-S942.
- [18] Gao W, Wei S, Li Z, *et al.* Nano magnetic liposomes-encapsulated parthenolide and glucose oxidase for ultra-efficient synergistic antitumor therapy [J]. *Nanotechnology*, 2020, 31(35): 355104.
- [19] Wu X W, Dai X X, Liao Y Y, *et al.* Investigation on drug entrapment location in liposomes and transfersomes based on molecular dynamics simulation [J]. *J Mol Model*, 2021, 27(4): 111.
- [20] Liu P, Chen G L, Zhang J C. A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives [J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1372.
- [21] Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications [J]. *Int J Pharm*, 2021, 601: 120571.
- [22] Khot K B, D S S, Gopan G, *et al.* Enhancing selegiline hydrochloride efficacy: Box Behnken-optimized liposomal delivery *via* intranasal route for Parkinson's disease intervention [J]. *J Liposome Res*, 2024, 34(4): 575-592.
- [23] Pornpitchanarong C, Aye K C, Arunprasert K, *et al.* Computational designed and optimized liposomal curcumin-embedded bifunctional cross-linked hydrogels for wound healing [J]. *Gels*, 2024, 10(9): 598.
- [24] Sharma S, Gupta P, Kawish S M, *et al.* Novel chitosan-coated liposomes coloaded with exemestane and genistein for an effective breast cancer therapy [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(8): 9735-9752.
- [25] 郭瑞光, 李维峰, 侯俊玲, 等. 植物固醇在脂质体中的应用研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(12): 1092-1094.
- [26] 麦婉婷, 钟华帅, 苏晓丹, 等. Box-Behnken 响应面优化蛇葡萄素纳米结构脂质载体处方工艺及体外评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(16): 4982-4991.
- [27] Corbo C, Molinaro R, Taraballi F, *et al.* Effects of the protein Corona on liposome-liposome and liposome-cell interactions [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 3049-3063.
- [28] Ghantous A, Sinjab A, Herceg Z, *et al.* Parthenolide: From plant shoots to cancer roots [J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18(17/18): 894-905.
- [29] Jorge J, Neves J, Alves R, *et al.* Parthenolide induces ROS-mediated apoptosis in lymphoid malignancies [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9167.
- [30] 周伟成, 刘宇灵, 陈颖翀, 等. 去氢骆驼蓬碱包合物脂质体的制备及体外性质评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(24): 7696-7705.
- [31] 丁欢欢, 姜先梅, 刘红梅, 等. 藤黄酸和雷帕霉素共载脂质体的制备及协同抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(9): 2896-2911.
- [32] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 131-135.
- [33] He Y P, Yu Q X, Ma X Y, *et al.* A metabolomics approach reveals metabolic disturbance of human cholangiocarcinoma cells after parthenolide treatment [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 328: 118075.

[责任编辑 郑礼胜]