

[制 剂]

复方一枝蒿提取物固体脂质纳米粒的制备

陈克玲¹, 郑瑞芳², 姜雯^{3*}

(1. 阿克苏地区药品检验所, 新疆阿克苏 843000; 2. 新疆医科大学中医学院, 新疆乌鲁木齐 830054; 3. 新疆医科大学第六附属医院, 新疆乌鲁木齐 830002)

摘要: 目的 制备复方一枝蒿提取物固体脂质纳米粒。方法 高剪切乳化超声法制备纳米粒。在单因素试验基础上, 以脂质、大豆卵磷脂、吐温-80 用量为影响因素, 粒径、包封率为评价指标, 星点设计-效应面法优化制备工艺。结果 最佳处方为脂质用量 154.74 mg, 大豆卵磷脂用量 75.18 mg, 吐温-80 用量 6.25%, 所得纳米粒为球形或类球形, 大小分布均匀, 平均粒径 (106.70 ± 0.28) nm, PDI 0.192 ± 0.48 , Zeta 电位 (-18.90 ± 0.57) mV, 包封率 $(90.20 \pm 0.95)\%$ 。在 4 °C 下保存 60 d、常温下保存 30 d 时, 纳米粒粒径、包封率无明显变化。结论 该方法稳定可靠, 可用于制备体外稳定性良好的复方一枝蒿提取物固体脂质纳米粒。

关键词: 复方一枝蒿提取物; 固体脂质纳米粒; 制备; 星点设计-效应面法

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)09-1949-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.011

Preparation of Compound Yizhihao extract-loaded solid lipid nanoparticles

CHEN Ke-ling¹, ZHENG Rui-fang², JIANG Wen^{3*}

(1. Aksu Regional Institute for Drug Inspection, Aksu 843000, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. The Sixth Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare Compound Yizhihao extract-loaded solid lipid nanoparticles. **METHODS** For the nanoparticles prepared by high-shear emulsion-ultrasonic method, consumption of lipid, soybean lecithin, Tween-80 were taken as influencing factors, together with particle size and encapsulation efficiency as evaluation indices, central composite design-response surface method was applied to optimizing the preparation on the basis of single factor test. **RESULTS** The optimal formulation was determined to be 154.74 mg for lipid consumption, 75.18 mg for soybean lecithin consumption, 6.25% for Tween-80 consumption, the obtained spherical or spherical-like nanoparticles demonstrated uniform size and distribution, with the average particle size of (106.70 ± 0.28) nm, PDI of 0.192 ± 0.48 , and Zeta potential of (-18.90 ± 0.57) mV. When stored at 4 °C for 60 d or room temperature for 30 d, the nanoparticles' particle size and encapsulation efficiency exhibited no obvious changes. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the preparation of Compound Yizhihao extract-loaded solid lipid nanoparticles with good *in vitro* stability.

KEY WORDS: Compound Yizhihao extract; solid lipid nanoparticles; preparation; central composite design-response surface method

固体脂质纳米粒是一种以具有生物相容性的脂质材料为载体的新型纳米粒给药系统^[1-2], 与普通纳米制剂相比, 其载药能力更强, 可有效提高药物溶解度、生物利用度、稳定性, 具有缓控释及靶向

作用, 对机体几乎无毒性, 理化性质稳定^[3-5], 给药途径多样^[6], 能大规模生产^[7-8]。近年来, 固体脂质纳米粒已被广泛用于制备多种中药有效成分制剂, 受到了越来越多的关注。

收稿日期: 2017-12-14

基金项目: 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市科技计划项目 (Y151310010)

作者简介: 陈克玲 (1968—), 女, 副主任药师, 从事制剂研究。Tel: (0997) 6310785, E-mail: 541801854@qq.com

* 通信作者: 姜雯 (1987—), 女, 主管药师, 从事中药、民族药研究。Tel: 15026018390, E-mail: 523524359@qq.com

复方一枝蒿是由一枝蒿、板蓝根、大青叶组成的复方^[9]，其中一枝蒿为新疆地产植物，系维吾尔族习用药材，具有抗氧化、抗菌、抗病毒等功效，临床上常用于治疗感冒、胃痛、腹胀、荨麻疹等^[10-12]；板蓝根具有清热、解毒、凉血等功效，临床上常用于治疗流行性感冒、温毒发斑、肝炎、麻疹等^[13-14]；大青叶具有清热解毒、凉血消斑的功效，临床上常用于治疗病毒性流行感冒、肝炎等^[15-16]，全方具有抗炎、抗菌、抗病毒、提高免疫力等作用，可治疗流行性感冒、病毒性感冒、肝炎等多种疾病^[17-19]，而且疗效确切。但复方一枝蒿吸湿性较强，容易潮解，使其贮存稳定性和临床疗效受到较大限制，故本实验将制备复方一枝蒿提取物固体脂质纳米粒，并通过星点设计-效应面法进行优化，以期得到包封率高、稳定性良好的相关制剂。

1 材料

1.1 仪器 电子天平（美国丹佛仪器公司）；Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦科技公司）；IKA[®] DS 磁力搅拌器（德国 IKA 公司）；D-500 均质分散乳化机（德国维根斯公司）；JY 92-II N 超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；JM21200EX 透射电镜（日本电子株式会社）；Nano S90 激光粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；TGL-16 K 高速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）。

1.2 试药 复方一枝蒿提取物（新疆维吾尔自治区药物研究所）。一枝蒿酮酸（中国科学院新疆理化技术研究所，含有量 > 98%）；山嵛酸甘油酯 COMPRITOL 888 ATO（法国嘉法狮集团）；大豆卵磷脂（上海艾维特有限公司）；Tween-80（天津市科密欧化学试剂开发中心）。水为去离子水（自制）。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 Reliasil C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相 0.4% 甲酸-甲醇（45 : 55）；检测波长 242 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 °C；进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取一枝蒿酮酸 5.00 mg，置于 25 mL 量瓶中，甲醇溶解定容，即得（质量浓度为 200.0 μg/mL）。

2.1.3 供试品溶液制备 精密吸取提取物纳米粒溶液 1 mL，加入 3 mL 甲醇破膜，超声 15 min，冷

却，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.1.4 阴性供试品溶液制备 精密吸取空白纳米粒溶液 1 mL，其他操作同“2.1.3”项，即得。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液，甲醇倍比稀释成 2.00、4.00、8.00、16.00、32.00、64.00、128.00 μg/mL，分别精密吸取 10 μL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以一枝蒿酮酸质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得到回归方程为 $Y = 20.142X - 67.218$ （ $R^2 = 0.9998$ ），在 2.00 ~ 128.00 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得一枝蒿酮酸峰面积 RSD 为 0.59%，表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL，在“2.1.1”项色谱条件下于 12 h 内每隔 2 h 进样测定 1 次，测得一枝蒿酮酸峰面积 RSD 为 0.63%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 6 份，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得一枝蒿酮酸峰面积 RSD 为 0.58%，表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密吸取阴性供试品溶液 0.5 mL，共 3 份，加入 0.5 mL 对照品溶液至质量浓度为 100.00 μg/mL，混匀，加入 3 mL 甲醇破膜，超声破乳 15 min，0.22 μm 滤膜过滤，续滤液在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得一枝蒿酮酸平均加样回收率为 99.03%，RSD 为 1.23%。

2.2 纳米粒制备 将处方量山嵛酸甘油酯、复方一枝蒿提取物、大豆卵磷脂溶于 5 mL 无水乙醇中，85 °C 下熔融，不断搅拌至澄清透明形成油相；将处方量吐温-80 和蒸馏水混合均匀，加热至与油相相同的温度，作为水相。在磁力搅拌下，将水相加到油相中，混合均匀后高速剪切（18 000 r/min）5 min 形成初乳，再探头超声（320 W）5 min，冷却至室温，即得。

2.3 透射电镜（TEM）观察 取“2.2”项下溶液 1 mL，蒸馏水稀释 10 倍后滴于铜网上，2% 磷钨酸染色，室温下静置 30 min 晾干，置于 TEM 下观察，结果见图 1。由图可知，所得纳米粒为球形或类球形，大小分布均匀。

2.4 粒径、Zeta 电位测定 将“2.2”项下纳米粒溶液稀释 10 倍后加入适宜的测量杯中，测定其

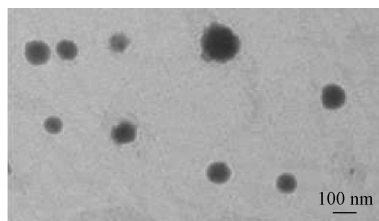


图1 纳米粒透射电镜图

Fig. 1 TEM image of nanoparticles

粒径, 再将其加入带电极的比色皿中测定 Zeta 电位, 结果见图 2。由图可知, 所得纳米粒平均粒径为 (106.70 ± 0.28) nm, Zeta 电位为 (-18.90 ± 0.57) mV, 多分散指数为 0.192 ± 0.48 。

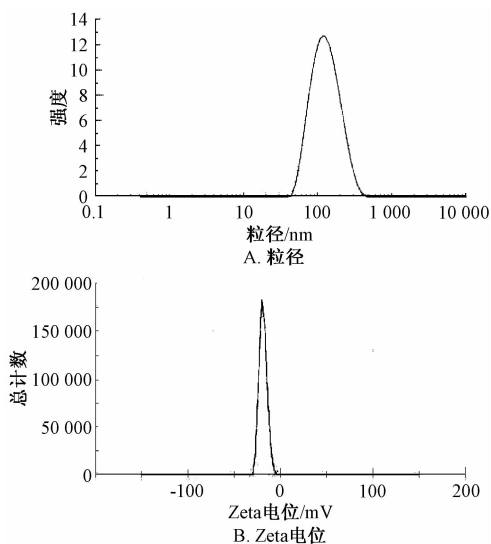


图2 纳米粒粒径、Zeta 电位测定结果

Fig. 2 Results of particle size and Zeta potential determination of nanoparticles

2.5 包封率测定 采用超滤离心法。精密吸取“2.2”项下纳米粒溶液 0.5 mL 加入超滤离心管中 (30 K), 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 在“2.1.1”项色谱条件下测定, 计算游离一枝蒿酮酸质量, 记为 $W_{游}$ 。再精密吸取 0.5 mL, 加入 3 倍甲醇破膜, 超声 30 min 破乳, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 在“2.1.1”项色谱条件下测定, 计算一枝蒿酮酸总质量, 记为 $W_{总}$ 。然后, 计算包封率, 公式为包封率 = $[(W_{总} - W_{游}) / W_{总}] \times 100\%$, 结果为 $(90.20 \pm 0.95)\%$ 。

2.6 单因素试验

2.6.1 山嵛酸甘油酯用量 按“2.2”项下方法制备纳米粒, 固定提取物用量为 15 mg, 大豆卵磷脂用量为 100 mg, 吐温-80 用量为 4%, 选择山嵛酸甘油酯用量 50、100、150、200 mg, 考察纳米

粒粒径、包封率变化。结果, 4 种用量下纳米粒平均粒径分别为 (94.29 ± 0.57) 、 (103.70 ± 1.14) 、 (113.24 ± 1.37) 、 (120.78 ± 0.79) nm, 包封率分别为 $(58.18 \pm 0.95)\%$ 、 $(69.07 \pm 1.07)\%$ 、 $(89.25 \pm 0.74)\%$ 、 $(90.13 \pm 0.88)\%$, 故确定山嵛酸甘油酯用量为 150 mg。

2.6.2 大豆卵磷脂用量 按“2.2”项下方法制备纳米粒, 固定提取物用量为 15 mg, 山嵛酸甘油酯用量为 150 mg, 吐温-80 用量为 4%, 选择大豆卵磷脂用量 50、75、100 mg, 考察纳米粒粒径、包封率变化。结果, 3 种用量下纳米粒平均粒径分别为 $(118.28 \pm 0.65)\%$ 、 $(108.09 \pm 0.82)\%$ 、 (136.62 ± 0.31) nm, 包封率分别为 $(67.10 \pm 1.43)\%$ 、 $(89.09 \pm 1.24)\%$ 、 $(90.50 \pm 0.60)\%$, 故确定大豆卵磷脂用量为 75 mg。

2.6.3 吐温-80 用量 按“2.2”项下方法制备纳米粒, 固定提取物用量为 15 mg, 山嵛酸甘油酯用量为 150 mg, 大豆卵磷脂用量为 75 mg, 选择吐温-80 用量 2%、4%、8%, 考察纳米粒粒径、包封率变化。结果, 3 种用量下纳米粒平均粒径分别为 $(175.50 \pm 0.92)\%$ 、 $(106.87 \pm 1.73)\%$ 、 (124.30 ± 0.85) nm, 包封率分别为 $(57.02 \pm 1.04)\%$ 、 $(84.98 \pm 0.83)\%$ 、 $(86.27 \pm 1.02)\%$, 故确定吐温-80 用量为 4%。

2.7 工艺优化 在“2.6”项结果基础上, 选择脂质用量 (X_1)、大豆卵磷脂用量 (X_2)、吐温-80 用量 (X_3) 为影响因素, 粒径 (Y_1)、包封率 (Y_2) 为评价指标, 星点设计-效应面法进行优化。因素水平见表 1, 结果见表 2。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	X_1 脂质/mg	X_2 大豆卵磷脂/mg	X_3 吐温-80/%
-1.618	50.00	50.00	2.00
-1	90.54	60.13	3.22
0	150.00	75.00	5.00
1	209.46	90.00	6.78
1.618	250.00	100.00	8.00

然后, 通过 Expert Design 7.0 软件分析数据, 分别进行二项式、多元线性回归方程拟合, 以 P 值和拟合优度 (R^2) 作为模型评价标准。结果, 多元线性回归方程为 $Y_1 = 116.70 + 4.87X_1 - 0.66X_2 - 4.12X_3$ ($R^2 = 0.35$, $P = 0.06$)、 $Y_2 = 82.04 + 6.05X_1 + 1.02X_2 + 2.79X_3$ ($R^2 = 0.45$, $P = 0.02$), 二项式方程为 $Y_1 = 108.28 + 4.87X_1 -$

表2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	因素			指标	
	X ₁ 脂质/ mg	X ₂ 大豆卵 磷脂/mg	X ₃ 吐温- 80/%	Y ₁ 粒径/ nm	Y ₂ 包封 率/%
1	150.00	75.00	5.00	108.26	89.37
2	90.54	60.13	6.78	110.28	69.15
3	150.00	75.00	5.00	108.26	89.37
4	209.46	60.13	3.22	126.30	76.13
5	150.00	75.00	5.00	108.26	89.37
6	150.00	75.00	5.00	108.26	89.37
7	150.00	75.00	5.00	108.26	89.37
8	150.00	75.00	2.00	124.60	72.28
9	250.00	75.00	5.00	137.41	90.20
10	90.54	89.87	6.78	118.94	73.51
11	150.00	75.00	5.00	108.26	89.37
12	90.54	60.13	3.22	124.32	78.59
13	150.00	100.00	5.00	115.90	88.71
14	90.54	89.87	3.22	110.62	70.94
15	50.00	75.00	5.00	118.29	63.02
16	150.00	75.00	8.00	103.43	88.01
17	209.46	89.87	3.22	130.44	79.22
18	209.46	60.13	6.78	119.67	86.29
19	209.46	89.87	6.78	122.09	87.51
20	150.00	50.00	5.00	122.16	81.00

$$0.66X_2 - 4.12X_3 + 1.45X_1X_2 - 1.16X_1X_3 + 2.58X_2X_3 +$$

$6.78X_1^2 + 3.66X_2^2 + 1.89X_3^2 (R^2 = 0.91, P = 0.0003)$ 、
 $Y_2 = 89.45 + 6.05X_1 + 1.02X_2 + 2.79X_3 + 0.95X_1X_2 +$
 $3.17X_1X_3 + 1.27X_2X_3 - 5.00X_1^2 - 2.09X_2^2 - 3.75X_3^2$
 $(R^2 = 0.91, P = 0.0005)$ 。由此可知，二项式方程
拟合效果较好，最优处方为脂质用量 154.74 mg，
大豆卵磷脂用量 75.18 mg，吐温-80 用量为
6.25%。响应面分析见图3。

2.8 验证试验 按“2.2”项下方法制备3批纳
米粒，测定粒径、包封率，结果见表3，可知该工
艺参数准确，重复性良好。

表3 验证试验结果 (n=3)

Tab. 3 Results of verification tests (n=3)

指标	实测值	预测值	偏差/%
粒径/nm	108.79	106.70	-1.95
包封率/%	89.36	90.20	0.93

注：偏差 = [(预测值 - 实测值) / 预测值] × 100%

2.9 稳定性试验 将所得纳米粒分别于常温、
4℃下保存，于15、30、60 d测定粒径、包封率
变化，结果见表4。由表可知，在4℃下保存60 d、
常温下保存30 d时，纳米粒粒径、包封率无明显
变化，表明其体外稳定性良好。

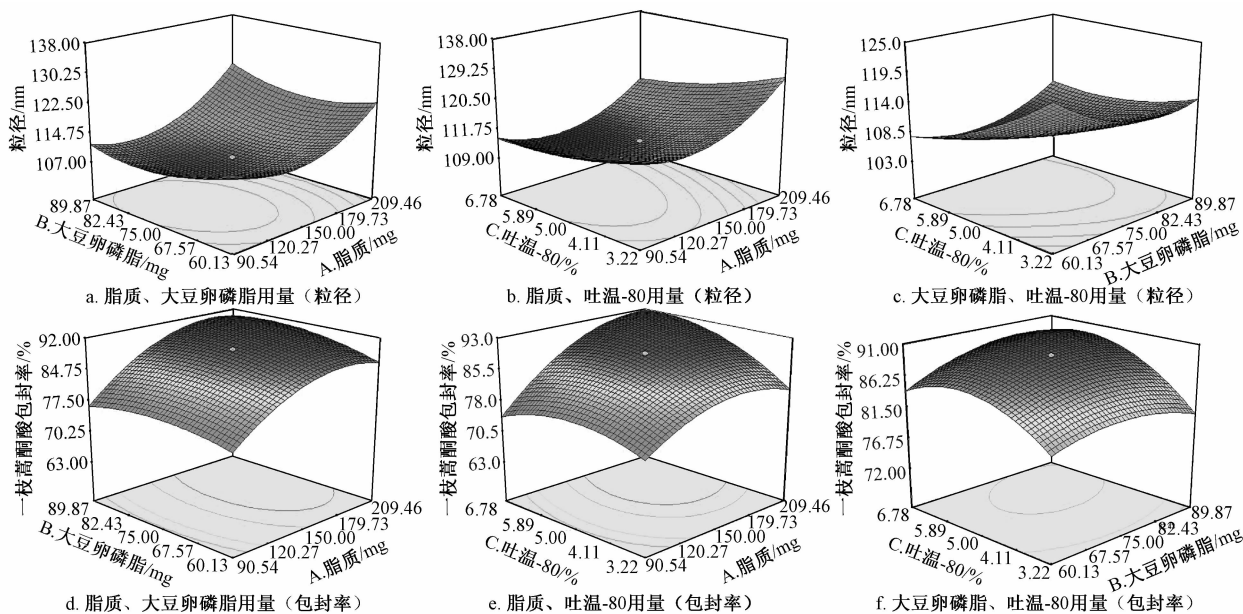


图3 各因素响应面图

Fig. 3 Response surface plots for various factors

表4 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 4 Results of stability tests ($\bar{x} \pm s, n=3$)

参数	4℃			常温		
	15 d	30 d	60 d	15 d	30 d	60 d
粒径/nm	106.70 ± 0.28	110.52 ± 0.55	118.17 ± 1.26	106.70 ± 0.28	117.90 ± 0.91	129.02 ± 1.07
包封率/%	90.20 ± 0.95	88.19 ± 0.69	83.65 ± 1.10	90.20 ± 0.95	81.77 ± 0.67	76.38 ± 1.16

3 讨论

固体脂质纳米粒有着粒径较小、分布较窄、比表面积较大的特点,使得药物可高浓度地富集于纳米粒表面,增加其与小肠的接触时间和面积,从而提高生物利用度。此外,纳米粒中的亲脂性脂质材料可增加其细胞膜透过率,增加细胞内药物浓度。目前,已有多篇关于中药及复方固体脂质纳米粒的研究报道,发现该类制剂可有效改善中药(复方)溶解性及体内药物浓度^[20-24]。

脂质材料的不规则晶型结构可使药物镶嵌于其中,在一定程度上提高纳米粒的包封率和稳定性。本实验选择山嵛酸甘油酯作为脂质材料,它由山嵛酸单甘油酯、二甘油酯、三甘油酯组成,构成了复杂而不规则的晶型结构,使其具有更多空间结构来加载药物,从而提高了复方一枝蒿提取物固体脂质纳米粒的包封率。

乳化剂可降低表面张力,修饰固体脂质纳米粒,减小粒径,其联合使用可有效降低纳米粒之间的聚集,从而降低其沉降。本实验选择吐温-80、大豆卵磷脂作为乳化剂,前者可作用于油相和水相表面,减小复方一枝蒿提取物固体脂质纳米粒的粒径;后者可增加纳米粒成膜性,并减小其粒径,提高其包封率。

Zeta 电位是纳米粒表面所带的电荷数,其数值较大时可增加纳米粒之间的排斥力,从而减小其聚集。本实验发现,复方一枝蒿提取物固体脂质纳米粒表面所带的负电荷可有效降低其沉降,稳定性良好。

参考文献:

[1] Schubert M A, Müller-Goymann C C. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 61(1-2): 77-86.

[2] Müller R H, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs I. Preparation by a size-reduction technique [J]. *Int J Pharmaceut*, 1998, 160(2): 229-237.

[3] Gonçalves L M, Maestrelli F, Mannelli L D, et al. Development of solid lipid nanoparticles as carriers for improving oral bioavailability of glibenclamide [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 102: 41-50.

[4] Luo Y C, Teng Z, Li Y, et al. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 122: 221-229.

[5] Neves A R, Queiroz J F, Weksler B, et al. Solid lipid nanoparticles as a vehicle for brain-targeted drug delivery: two new strategies of functionalization with apolipoprotein E [J]. *Nano-*

technology, 2015, 26(49): 495103.

[6] Melike Ü, Gülgün Y. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives [J]. *Int J Nanomed*, 2007, 2(3): 289-300.

[7] Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 47(2-3): 165-196.

[8] Hou D Z, Xie C S, Huang K J, et al. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs) [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(10): 1781-1785.

[9] 刘循, 刘燕, 姚华, 等. 复方一枝蒿颗粒对小鼠抗炎和免疫功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13): 185-189.

[10] 方美珠, 晁群芳, 兰雁, 等. 新疆一枝蒿提取物抑菌作用的研究 [J]. *食品科技*, 2011, 36(1): 160-162, 166.

[11] 李治建, 古力娜·达吾提, 斯拉甫·艾白. 一枝蒿有效部位抗乙型肝炎病毒作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(3): 149-150.

[12] 肖威, 斯拉甫·艾白, 李治建. 新疆一枝蒿抗炎作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(12): 2836-2838.

[13] 黄家娣. 板蓝根化学成分和药理作用综述 [J]. *中国现代药物应用*, 2009, 3(15): 197-198.

[14] 陈凯, 窦月, 陈智, 等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(18): 275-278.

[15] 李微, 陈发奎, 尹相武, 等. 大青叶的化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(1): 15-16, 44.

[16] 仲卫国, 许清华, 孟繁德. 大青叶的研究进展 [J]. *人参研究*, 2011, 23(3): 38-41.

[17] 陈蕾, 姜雯, 潘晓梅, 等. 复方一枝蒿微丸抗炎、免疫及抗菌作用研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2016, 39(2): 179-183.

[18] 葛海涛, 苏恺琪, 王晓磊, 等. 复方一枝蒿片抗炎作用和对免疫功能影响的研究 [J]. *中外医学研究*, 2014, 12(8): 5-7.

[19] 姜雯, 姚华, 陈强, 等. 复方一枝蒿微丸抗甲型 H1N1 流感病毒的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 135-137.

[20] 王岚, 刘颖, 冯年平. 脂质纳米粒给药系统体外释放方法研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 350-356.

[21] 盛欢欢, 邹小广, 杨涛, 等. 星点设计-效应面法优化穿心莲总内酯固体脂质纳米粒处方 [J]. *中成药*, 2012, 34(8): 1473-1479.

[22] 盛欢欢, 杨涛, 李岩, 等. HPLC 法测定穿心莲总内酯固体脂质纳米粒载药量与包封率 [J]. *中成药*, 2012, 34(3): 458-462.

[23] 姚艳胜, 季鹏, 刘畅, 等. 柚皮素固体脂质纳米粒冻干粉的制备及其大鼠肺部给药药动学研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(4): 591-598.

[24] 张小飞, 邢传峰, 果秋婷. 川陈皮素固体脂质纳米粒的制备 [J]. *中成药*, 2014, 36(9): 1857-1862.