

因素^[10]。通过调节处方中 HPMC 与乳糖的比例, 可实现结肠定位所需要的 5~6 h 时滞。另外, 片质量也是重要的影响因素。预实验中 HPMC 与乳糖的比例为 1:4, 最初片质量设定为 160 mg, 结果发现释药时滞大于 12 h, 故将片质量调整为 100 mg, 释药时滞减少为 8 h。在此基础上, 考察 HPMC 和乳糖的比例对脉冲释药胶囊释药时滞的影响。

参考文献:

[1] Jeong Y I, Ohno T, Hu Z, *et al.* Evaluation of an intestinal pressure-controlled colon delivery capsules prepared by a dipping method [J]. *J Controlled Release*, 2001, 71 (2): 175-182.

[2] 张建伟, 刘 力, 徐德生. 结肠定位释药系统的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(21): 1802-1804.

[3] 叶晓丽, 王选深, 王彬辉, 等. pH 依赖-时滞型大黄素结肠定位微丸的制备及体外释药研究 [J]. 中草药, 2011, 42 (10): 1956-1962.

[4] Yang L B, Chu J S, Fix J A. Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro/in vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2002, 235(1-2): 1-15.

[5] 徐 文, 孙 进, 张婷婷, 等. HPLC 法测定冬凌草甲素的平衡溶解度和表观油水分配系数 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(4): 220-222.

[6] 张文静, 黄启来, 华子春. 冬凌草甲素抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 生命科学, 2010, 22(5): 416-420.

[7] 李津明. 落叶松阿拉伯半乳聚糖滴丸制备工艺及其速释机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(16): 1249-1251.

[8] 吴 芳, 张志荣, 丁 洪. 灌注法制备脉冲给药装置的新型非渗透性胶囊体 [J]. 华西药理学杂志, 2006, 21(1): 5-7.

[9] 车珂科, 朱照静, 李欣宇. 口服溶蚀塞型脉冲胶囊体的研制 [J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(7): 858-861.

[10] 刘 静, 张良珂, 汪程远, 等. 5-氨基水杨酸结肠定位柱塞型脉冲胶囊的制备与体外释放 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(2): 99-102.

[11] 郭 涛, 郑春丽, 宋洪涛, 等. 双氯芬酸钠脉冲控释微丸的研究 [J]. 药科学报, 2003, 38(9): 707-710.

[12] Liu J, Zhang L, Jia Y, *et al.* Preparation and evaluation of pectin-based colon-specific pulsatile capsule *in vitro* and *in vivo* [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(11): 1927-1934.

[13] Krögel I, Bodmeier R. Pulsatile drug release from an insoluble capsule body controlled by an erodible plug [J]. *Pharm Res*, 1998, 15(3): 474-481.

[14] 刘 静, 张良珂, 贾运涛, 等. 非渗透性胶囊体的制备及性质考察 [J]. 中国药房, 2012, 23(37): 3500-3502.

鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体的制备与评价

张壮丽¹, 赵 宁^{2*}, 王亚飞², 赵志鸿¹, 张小俊¹, 王桂芳¹

(1. 河南省医药科学研究院药化科, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450001)

摘要: **目的** 制备并评价鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体。**方法** 采用熔融乳化-超声分散法, 在单因素考察的基础上利用正交实验设计, 优化了制剂处方及制备工艺。采用气相色谱法, 建立了纳米结构脂质载体中鱼腥草挥发油的定量测定方法, 并从外观、形态、粒径分布、包封率、载药量及短期稳定性等方面对制剂进行评价。**结果** 最佳处方为单硬脂酸甘油酯 0.12 g, 辛酸癸酸三甘油酯 0.08 g, 泊洛沙姆 188 0.533 g, 蛋黄卵磷脂 0.267 g, 鱼腥草挥发油 0.1 g, 重蒸馏水加至 20 mL; 最佳工艺为初乳搅拌 20 min, 超声分散 10 min, 超声振幅 100%。所制备的纳米粒平均粒径约为 (70.76 ± 1.74) nm, Zeta 电位为 (- 25.40 ± 1.08) mV, 包封率 90.33%, 载药量 5.76%。**结论** 所制备的鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体粒径小, 包封率高, 物理稳定性较好。

关键词: 鱼腥草; 挥发油; 纳米结构脂质载体; 熔融乳化-超滤离心; 气相色谱 (GC)

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)03-0546-10

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.03.015

Preparation and evaluation of nanostructured lipid carrier loaded with volatile

收稿日期: 2015-05-18

基金项目: 河南省省属科研单位社会公益项目预研专项 (2013, 2014); 河南省重点科技攻关计划项目 (142102310433)

作者简介: 张壮丽 (1978—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药新药。Tel: (0371) 66658204, E-mail: zzl7814@163.com

* **通信作者:** 赵 宁 (1990—), 女, 硕士生, 研究方向为新剂型与新型给药系统。Tel: 18703675693, E-mail: zhaoningwyxx@

oil from *Houttuynia cordatu* Thunb.

ZHANG Zhuang-li¹, ZHAO Ning^{2*}, WANG Ya-fei², ZHAO Zhi-hong¹, ZHANG Xiao-jun¹, WANG Gui-fang¹

(1. Department of Medicinal Chemistry, Henan Provincial Academy of Medical Sciences, Zhengzhou 450052, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

KEY WORDS: *Houttuynia cordatu* Thunb.; volatile oil; nanostructured lipid carrier; melting emulsification and centrifugal ultrafiltration; gas chromatography (GC)

鱼腥草挥发油是鱼腥草 *Houttuynia cordatu* Thunb. 的主要活性部位^[1], 具有抗病毒、抗菌、抗炎、提高机体免疫力、抗过敏、抗肿瘤等药理作用^[2-8], 目前临床应用于消炎抗菌。中药挥发油溶解性差、易挥发、性质不稳定, 直接使用时生物利用度低, 刺激性大, 药效不稳定。若将纳米制剂技术应用于中药挥发油, 不仅能提高药物的稳定性和生物利用度, 加强靶向及缓释作用, 还可减少不良反应, 开发出顺应性更好的给药途径的药物^[9]。

本实验采用熔融乳化-超声分散法制备鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体, 以纳米粒径及 Zeta 电位为评价指标, 在单因素考察的基础上利用正交实验设计, 优化了制剂处方及制备工艺。采用气相色谱法, 建立了纳米结构脂质载体中鱼腥草挥发油的定量测定方法, 并从外观、形态、粒径分布、包封率、载药量及稳定性等方面对制剂进行评价。

1 材料与仪器

1.1 主要材料 鱼腥草挥发油(原药材购自四川江油, 由河南中医学院药学院董成明教授鉴定。将鱼腥草干燥粉碎后, 称取 100 g, 装入 2 000 mL 圆底烧瓶中, 加 10 倍量蒸馏水, 混匀并浸泡 10 h 后, 水蒸气蒸馏提取, 回流 10 h, 收集浅黄色挥发油, 精密称定质量, 4 ℃ 下封装保存备用)。单硬脂酸甘油酯(天津市科密欧化学试剂有限公司); 山嵛酸甘油酯(法国嘉法狮公司); 辛酸/癸酸甘油三酯、泊洛沙姆 188(德国巴斯夫股份公司); 蛋黄卵磷脂(上海艾伟特医药科技有限公司)。甲基正壬酮对照品(中国食品药品检定研究院)

1.2 主要仪器 7890A 气相色谱仪、Hp-5MS 毛细管色谱柱(美国安捷伦公司); JEM-2100 透射电镜(日本电子株式会社); ZS90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(马尔文仪器中国有限公司); VCX130 超声细胞破碎仪(美国 Sonics 公司); YRT-3 熔点仪(天津大学精密仪器厂); 超滤离心管(100 kDa,

密理博中国有限公司)

2 方法

2.1 甲基正壬酮测定方法 目前, 鱼腥草挥发油的测定主要以含有量高、性质比较稳定的甲基正壬酮为定量指标^[10]。

2.1.1 样品溶液制备 精密量取纳米结构脂质载体 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 移取 4 mL, 置于 25 mL 圆底烧瓶中, 加正己烷 5 mL, 密封, 室温水浴超声萃取 20 min, 静置, 取正己烷层。再加正己烷 5 mL, 超声萃取 10 min, 收集合并正己烷层, 定容至 10 mL, 0.22 μm 滤膜过滤, 即得。

2.1.2 色谱条件 采用气相色谱法, 检测纳米结构脂质载体中挥发油含量。HP-5MS 石英毛细管色谱柱; 载气为氦气; 尾吹气为氮气; 进样口、氢火焰离子化检测器温度 280 ℃; 空气体积流量 450 mL/min; H₂ 体积流量 40 mL/min; 柱体积流量 1 mL/min; 进样量 1 μL; 分流比 20 : 1; 程序升温(70 ℃ 保持 5 min, 5 ℃/min 升至 100 ℃, 2 ℃/min 升至 123 ℃, 保持 3 min, 30 ℃/min 升至 280 ℃, 保持 10 min)。

2.1.3 系统适用性试验 取空白制剂和载药制剂, 按照“2.1.1”项下方法处理样品, 并制备甲基正壬酮对照品溶液。3 种样品溶液在“2.1.2”项色谱条件下进样检测, 记录色谱图。

2.1.4 精密度考察 分别制备高、中、低质量浓度甲基正壬酮溶液, 连续进样 5 次, 测定日内精密度, 连续 5 d; 每天进样 1 次, 测定日间精密度。

2.1.5 检测限及定量限 配制系列质量浓度的甲基正壬酮溶液, 在“2.1.2”项色谱条件下进样, 分别计算不同浓度样品溶液色谱峰的信噪比(S/N)。S/N 为 10 : 1 时的样品质量浓度为定量限, 而 3 : 1 时的质量浓度为检测限。

2.1.6 加样回收率 精密量取相当于处方量 80%、100%、120% 的甲基正壬酮溶液, 加入到挥

发油含有量已知的纳米结构脂质载体中，平行 3 份，按“2.1.1”项下方法制备样品溶液，在“2.1.2”项色谱条件下进样检测，计算回收率。

2.1.7 线性关系考察 配制甲基正壬酮对照品母液（1.640 4 mg/mL），按比例稀释成系列质量浓度（4.986 8、9.973 63、16.010 3、20.012 9、24.999 70、50.032 2、100.064 4、149.932 6、199.964 8、249.997 0、350.061 4、399.929 5 μg/mL）溶液，在“2.1.2”色谱条件下进样，记录峰面积。以对照品溶液质量浓度为横坐标（*X*），色谱峰面积为纵坐标（*Y*），进行线性回归分析。

2.2 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体的制备

2.2.1 熔融乳化-超声分散法 将表面活性剂加适量重蒸馏水超声溶解，作为水相；固/液脂质水浴熔融后加入处方量的挥发油混匀，作为油相，电磁搅拌下将水浴等温的水相缓慢加到油相中搅拌，形成初乳，然后超声分散，冷水浴冷却固化，0.22 μm 微孔滤膜滤过，加水定容至设定处方量，即得鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体的胶体分散体系。

2.2.2 空白纳米结构脂质载体制备工艺影响因素考察 预设处方为单硬脂酸甘油酯 0.32 g，辛酸/癩酸三甘油酯 0.08 g，蛋黄卵磷脂 0.2 g，泊洛沙姆 188 0.2 g，加重蒸馏水至 20 mL，进行制备工艺考察。

2.2.2.1 制备温度 熔点测定仪测定固体脂质及固/液脂质混合物的熔点，用于确定制备温度。

2.2.2.2 单因素试验设计 采用“2.2.2.1”项下方法筛选出的制备温度，选择搅拌时间、超声时间、超声振幅 3 个因素作为单因素考察对象，按“2.2.1”项下方法制备空白纳米结构脂质载体，以粒径为评价指标，考察上述因素对其的影响。各因素水平见表 1。

表 1 单因素试验因素水平

水平	因素		
	搅拌时间/min (A)	超声时间/min (B)	超声振幅/% (C)
1	5	3	40
2	10	5	60
3	20	10	80
4	30	15	100

2.2.2.3 正交试验设计 根据“2.2.2.2”项下实验结果，选择搅拌时间、超声时间和振幅 3 个因素作 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，按照“2.2.1”项下方法制备空白纳米结构脂质载体，以粒径分布为评

价指标，筛选最佳制备工艺。正交试验因素水平见表 2。

表 2 正交设计因素和水平

水平	因素		
	搅拌时间/min (A)	超声时间/min (B)	超声振幅/% (C)
1	10	5	60
2	20	10	80
3	30	15	100

2.2.2.4 工艺验证 处方为单硬脂酸甘油酯 0.32 g，辛酸/癩酸三甘油酯 0.08 g，蛋黄卵磷脂 0.2 g，泊洛沙姆 188 0.2 g，加重蒸馏水至 20 mL。按“2.2.2.3”项下最佳工艺条件平行制备 3 批空白纳米结构脂质载体，检测其粒径分布。

2.2.3 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体处方筛选

2.2.3.1 固体脂质种类筛选 选择泊洛沙姆 188-蛋黄卵磷脂（1：1）作为复合乳化剂，用量 2%；挥发油投药量 1%；辛酸/癩酸三甘油酯作为液体脂质，固-液脂质比 4：1，总脂质用量 2%。分别采用单硬脂酸甘油酯、山嵛酸甘油酯作为固体脂质，按“2.2.1”项下方法制备鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体，考察固体脂质种类对其的影响。

2.2.3.2 固-液脂质比例筛选 挥发油投药量 0.5%，单硬脂酸甘油酯-辛酸癩酸三甘油酯作为固-液脂质，其余条件不变，考察固-液脂质比例为 9：1、8：2、7：3、6：4 时对纳米结构脂质载体的影响。

2.2.3.3 脂质用量筛选 固液脂质比 7：3，其余条件不变，考察脂质用量为 0.5%、1%、2%、3%、4%、5% 时纳米结构脂质载体的粒径分布和表面电位。

2.2.3.4 乳化剂配比及用量筛选 总脂质用量 1%，其余条件不变，考察乳化剂配比及用量对纳米结构脂质载体的影响。

2.2.3.5 投药量筛选 泊洛沙姆 188-蛋黄卵磷脂比例 2：1，复合乳化剂用量 4%，其余条件不变，考察投药量为 0.25%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4% 时纳米结构脂质载体性状的变化情况。

2.2.3.6 正交试验优化处方 依据单因素试验结果，选择乳化剂量、脂质用量、固/液脂质比和投药量 4 个因素作 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，按照“2.2.1”项下方法制备鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体，检测其粒径分布和 Zeta 电位，并以粒径

分布为评价指标，筛选最佳处方。正交试验因素水平见表3。

表3 正交设计因素和水平

Tab. 3 Factors and levels of orthogonal design

水平	因素			
	乳化剂/% (A)	脂质/% (B)	固-液脂质比 (C)	投药量/% (D)
1	2	1	8:2	0.1
2	3	1.5	7:3	0.25
3	4	2	6:4	0.5

2.2.3.7 处方验证 按照“2.2.3.6”项下最佳处方条件，采用“2.2.1”项下方法平行制备3批鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体，检测其粒径分布和Zeta电位。

2.3 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体制剂学评价 纳米给药系统能明显改变药物在体内的吸收、分布与代谢行为，通常具有缓释、控释等作用，而小于100 nm的颗粒可有效避免血液的首过清除效应。这些特性取决于载体自身的制剂学性质，包括粒径、Zeta电位、包封率、释放特性等，故有必要对纳米结构脂质载体的制剂学性质进行详细评价。

2.3.1 形态观察 透射电镜观察鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体的表面形态。将其混悬液适当稀释后，滴至覆有支持膜的铜网上，红外灯下烘干水分，观察纳米结构脂质载体纳米粒形态并拍照。

2.3.2 粒径分布及Zeta电位 粒度分析是纳米载药系统的主要表征方面之一，通过一定的检测手段来精确测量纳米颗粒的粒径，并对粒径分布进行分析。多分散系数(PdI)是粒径分布的衡量指标，PdI值越小，粒径分布越窄，纳米粒度越均匀；PdI值越大，粒径分布范围越宽，纳米粒间可能因相互碰撞造成聚集、团聚，物理稳定性差。

Zeta电位是指颗粒的剪切面电位，其绝对值越大，表示颗粒所携带的正或负电荷越多，颗粒之间的排斥力越大，整个体系相对稳定；反之则稳定性越差。

将鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体稀释10倍，采用马尔文纳米粒度及Zeta电位分析仪检测其粒径分布及Zeta电位，平行3次，求出平均值。

2.3.3 包封率

2.3.3.1 包封药量测定 准确量取鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体1 mL，置于超滤管内管中，8 000 r/min离心20 min，收集纳米粒，按照“2.2.1”项下方法制备样品溶液，在“2.1.2”项色谱条件下进样检测，记录甲基正壬酮峰面积。再

代入“2.1.7”项下标准曲线计算样品质量浓度。

2.3.3.2 总药量测定 准确量取鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体1 mL，按照“2.2.1”项下方法制备样品溶液，在“2.1.2”项色谱条件下进样检测，记录甲基正壬酮峰面积。再代入“2.1.7”项下标准曲线计算样品质量浓度。

然后，按照如下公式计算制剂的包封率。

包封率 = (系统中包封的药量/系统中包封与未包封的总药量) × 100%

2.3.4 载药量 载药量(DL)是指纳米粒中所含药物的质量百分率，即载药量 = (包封药量/纳米粒总质量) × 100%

2.4 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体稳定性研究

2.4.1 影响因素试验

2.4.1.1 高温对纳米结构脂质载体的影响 制备一批鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体，密封分装于洁净的西林瓶中，60 ℃下避光放置10 d，于第0、5和10天取样，观察外观变化，并检测其粒径分布和包封率。

2.4.1.2 强光照对纳米结构脂质载体的影响 制备一批鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体，密封分装于洁净的西林瓶中，放置在光照箱中，于25 ℃，(4 500 ± 500) lx照度下放置10 d，于第0、5和10天取样，观察外观变化，并检测其粒径分布和包封率。

2.4.2 短期储藏稳定性试验 将鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体密封分装于洁净的西林瓶中，避光放置在4 ℃和室温3个月，于第1、7、15、30、60和90天取样，观察外观变化，检测粒径和包封率。

3 结果与分析

3.1 制剂含量分析方法的建立

3.1.1 系统适用性试验 由甲基正壬酮对照品溶液、挥发油纳米结构脂质载体样品溶液及空白纳米结构脂质载体样品溶液的GC色谱图(图1~3)可知，在设定的色谱条件下，甲基正壬酮出峰时间为19.63 min，而空白样品在该位置无色谱峰出现，说明制剂辅料对挥发油含有量测定无影响，该方法专属性良好。

3.1.2 精密度考察 分别取低、中、高3种质量浓度的对照品溶液，气相色谱检测记录峰面积，结果见表4。由表可知，3种质量浓度对照品溶液色谱峰面积的日间及日内RSD值均小于3%，表明仪器的精密度良好。

3.1.3 检测限及定量限 计算系列质量浓度甲基

正壬酮溶液色谱峰的信噪比（S/N）。结果，S/N=3时对应的样品质量浓度为1.509 2 μg/mL，即检测限；S/N=10所对应的样品质量浓度为4.986 8 μg/mL，即定量限。

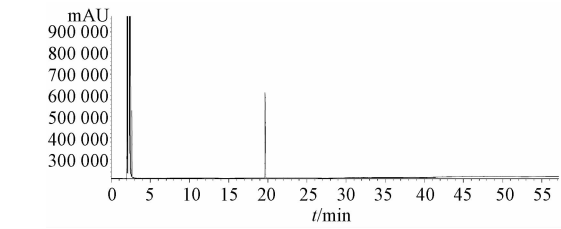


图1 甲基正壬酮溶液 GC 色谱图
Fig. 1 GC chromatogram of 2-undecanone

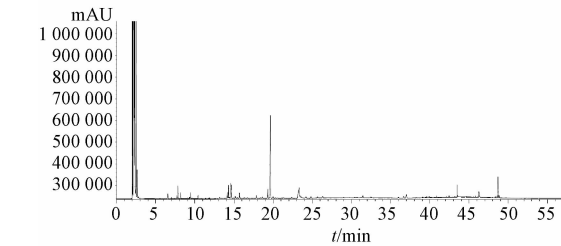


图2 纳米结构脂质载体样品 GC 色谱图
Fig. 2 GC chromatogram of nanostructured lipid carrier sample

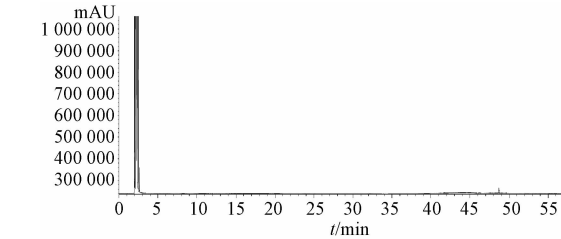


图3 空白纳米结构脂质载体样品 GC 色谱图
Fig. 3 GC chromatogram of blank nanostructured lipid carrier sample

表4 精密度试验结果（n=5）

Tab. 4 Results of precision tests (n=5)		
质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	日内 RSD/%	日间 RSD/%
12. 158	2. 61	2. 69
60. 79	2. 59	1. 18
1 215. 8	0. 52	1. 45

3. 1. 4 加样回收率（表5） 由表可知，3种质量浓度的加样回收率均在95%~105%之间，而且RSD值较小，说明该方法准确度良好。

3. 1. 5 线性关系考察 以甲基正壬酮对照品溶液质量浓度(μg/mL)为横坐标（X），峰面积(A)为纵坐标（Y），标准曲线方程为Y=6 962. 3X - 550

11 527（r=0. 999 9），表明在4. 986 8~399. 929 5 μg/mL范围内线性关系良好。

表5 加样回收率试验结果

Tab. 5 Results of recovery tests				
编号	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	RSD/%
1	147. 498 2	140. 941 5	95. 50	1. 40
2		144. 732 8	98. 12	
3		143. 837 5	97. 47	
4	184. 367 5	180. 226 8	97. 75	2. 58
5		185. 949 6	100. 86	
6		189. 705 5	102. 90	
7	221. 361 0	214. 067 2	96. 70	4. 31
8		231. 592 5	104. 62	
9		230. 084 9	103. 94	

3. 2 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体的制备

3. 2. 1 空白纳米结构脂质载体制备工艺影响因素

3. 2. 1. 1 制备温度 不同种类脂质熔点测定结果见表6。由表可知，固体脂质中加入液态脂质能使熔点降低，黏度减小，更有利于小粒径纳米粒的形成，并选择以单硬脂酸甘油酯为固体脂质的纳米结构脂质载体制备温度60℃，以山嵛酸甘油三酯为固体脂质的纳米结构脂质载体制备温度75℃。

表6 不同种类脂质体的熔点

脂质种类	初熔温度/ 终熔温度/	
	℃	℃
单硬脂酸甘油酯	55. 1	57. 3
山嵛酸甘油三酯	71. 4	72. 4
单硬脂酸甘油酯/辛酸癸酸三甘油酯(9:1)	53. 6	54. 5
单硬脂酸甘油酯/辛酸癸酸三甘油酯(8:2)	51. 4	54. 5
单硬脂酸甘油酯/辛酸癸酸三甘油酯(7:3)	52. 3	54. 6
山嵛酸甘油三酯/辛酸癸酸三甘油酯(9:1)	69. 1	70. 7
山嵛酸甘油三酯/辛酸癸酸三甘油酯(8:2)	67. 3	69. 6
山嵛酸甘油三酯/辛酸癸酸三甘油酯(7:3)	65. 6	67. 8

3. 2. 1. 2 初乳搅拌时间 纳米结构脂质载体粒径分布随乳化搅拌时间的变化情况见表7。由表可知，在一定时间范围内，其粒径随搅拌时间的延长而逐渐减小，多分散系数（PDI）也随之降低，说明粒度分布更均匀。为缩短制备时间，选择搅拌10 min来考察其他因素对纳米结构脂质载体的影响。

表7 搅拌时间对纳米结构脂质载体粒径的影响

Tab. 7 Effect of stirring time on the particle size of nano-structured lipid carrier			
编号	搅拌时间/min	平均粒径/nm	多分散系数
1	5	147. 1	0. 261
2	10	141. 2	0. 271
3	20	135. 5	0. 259
4	30	134. 2	0. 251

3.2.1.3 超声分散时间与振幅 纳米结构脂质载体粒径分布随超声分散时间的变化情况见表 8。由表可知,在一定时间范围内,超声分散时间越长,所得纳米粒径越小,而且粒度分布更均匀。

表 8 超声分散时间对纳米结构脂质载体粒径的影响
Tab.8 Effect of ultrasonic time on the particle size of nanostructured lipid carrier

编号	超声时间/min	平均粒径/nm	PDI
1	3	154.1	0.246
2	5	143.2	0.270
3	10	141.2	0.265
4	15	133.0	0.254

3.2.1.4 超声振幅 纳米结构脂质载体粒径分布随超声振幅变化情况见表 9。由表可知,超声分散时的振幅对粒径影响较大,纳米粒粒径随其增大而减小,但对粒径分布的影响较小。

表 9 超声振幅对纳米结构脂质载体粒径的影响
Tab.9 Effect of ultrasonic amplitude on the particle size of nanostructured lipid carrier

编号	超声振幅/%	平均粒径/nm	PDI
1	40	186.6	0.297
2	60	156.0	0.251
3	80	153.7	0.251
4	100	138.2	0.252

3.2.1.5 正交试验筛选最佳工艺 根据单因素试验结果,选择搅拌时间、超声时间和振幅 3 个因素作 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以粒径为评价指标,进行方差分析及直观分析,结果见表 10 和表 11。

表 10 方差分析
Tab.10 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
A(搅拌时间)	18.442	2	1.839	19	>0.05
B(超声时间)	65.149	2	6.496	19	>0.05
C(超声振幅)	195.162	2	19.460	19	<0.05
误差	10.030	2	—	—	—

按检验水准 $\alpha = 0.05$, 3 个因素中仅超声振幅对纳米粒径具有显著性影响 ($P < 0.05$)。

直观分析结果显示,极差值 $C > B > A$, 即 3 个因素对粒径的影响程度顺序为 C(超声振幅) > B(超声时间) > A(搅拌时间); 均值 $K_{A1} > K_{A2} > K_{A3}$, $K_{B1} > K_{B3} > K_{B2}$, $K_{C1} > K_{C2} > K_{C3}$, 由于纳米粒径越小越好,故较优水平为 $A_3B_2C_3$, 但因为 K_{A2} 与 K_{A3} 非常接近,从缩短生产周期的角度考虑,决定选择 A_2 。综上所述,最佳因素水平为 $A_2B_2C_3$, 即初乳搅拌 20 min, 超声分散 10 min, 振幅 100%。

表 11 直观分析
Tab.11 Intuitive analysis

编号	搅拌时间/ min (A)	超声时间/ min (B)	超声振幅/ % (C)	误差 (D)	平均粒径/ nm
1	1	1	1	1	139.7
2	1	2	2	2	127.7
3	1	3	3	3	121.0
4	2	1	2	3	129.6
5	2	2	3	1	119.7
6	2	3	1	2	132.1
7	3	1	3	2	124.5
8	3	2	1	3	127.6
9	3	3	2	1	126.0
K_1	129.467	131.267	133.133	128.467	
K_2	127.133	125.000	127.767	128.100	
K_3	126.033	126.367	121.733	126.067	
R	3.434	6.267	11.4	2.4	

3.2.1.6 最佳工艺验证 按照最佳工艺制备的空白纳米结构脂质载体粒径小,粒度均匀,而且 Zeta 电位绝对值较大,说明纳米粒稳定。同时,纳米粒径的 RSD 为 1.18%,表明该工艺重复性好,稳定可靠,具有实际应用价值。结果见表 12。

表 12 验证试验结果
Tab.12 Results of verification tests

编号	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
1	134.6	0.244	-26.8
2	133.1	0.258	-24.2
3	136.3	0.272	-33.2

3.2.2 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体处方筛选
3.2.2.1 固体脂质种类筛选 两种固体脂质相比,单硬脂酸甘油酯纳米结构脂质载体的粒径更小,粒度分布均匀,而且稳定性更好,其平均粒径 RSD 为 2.21%,而山嵛酸三甘油酯纳米结构脂质载体的平均粒径 RSD 为 5.64%。因此,选择单硬脂酸甘油酯作为纳米结构脂质载体的固体脂质。筛选结果见表 13。

表 13 固体脂质种类对纳米结构脂质载体粒径及 Zeta 电位的影响
Tab.13 Effects of solid lipid type on the particle size and Zeta potential of nanostructured lipid carrier

脂质种类	编号	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
单硬脂酸甘油酯	1	139.3	0.234	-23.4
	2	139.1	0.238	-21.6
	3	144.6	0.247	-23.3
山嵛酸三甘油酯	1	180.5	0.286	-23.8
	2	174.5	0.339	-25.8
	3	161.5	0.400	-25.3

3.2.2.2 固-液脂质比例筛选 纳米结构脂质载体的粒径分布及 Zeta 电位随固液脂质比例变化情况

见表 14。由表可知，随着液体脂质比例的增大，纳米粒径逐渐减小，PDI 值也总体降低。

表 14 固/液脂质比例对纳米结构脂质载体粒径及 Zeta 电位的影响

Tab. 14 Effects of lipid solid/liquid ratio on the particle size and Zeta potential of nanostructured lipid carrier

固-液脂质比	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
9 : 1	160. 3	0. 270	-28. 8
8 : 2	161. 3	0. 256	-25. 7
7 : 3	140. 0	0. 268	-26. 8
6 : 4	137. 5	0. 255	-24. 5

3. 2. 2. 3 脂质用量筛选 随着体系中脂质总量的增加，纳米结构脂质载体粒径呈明显增大的趋势，PDI 与 Zeta 电位的变化均表明体系的物理稳定性降低。由于脂质量 0. 5% 与 1% 的粒径差别不大，考虑到单位体积制剂中，脂质量越大，所能承载的挥发油越多。因此，结合粒径分布及体系稳定性，选择适宜的脂质用量为 1%。筛选结果见表 15。

表 15 脂质用量对纳米结构脂质载体粒径及 Zeta 电位的影响

Tab. 15 Effects of lipid dosage on the particle size and Zeta potential of nanostructured lipid carrier

脂质用量/%	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
0. 5	111. 6	0. 280	-32. 7
1	115. 7	0. 245	-29. 9
2	151. 0	0. 252	-25. 6
3	176. 9	0. 242	-21. 2
4	196. 8	0. 270	-15. 4
5	196. 3	0. 326	-16. 8
6	188. 8	0. 493	-10. 0

3. 2. 2. 4 乳化剂配比及用量筛选 单独使用泊洛沙姆 188 制得的纳米结构脂质载体稳定性很差；单独使用蛋黄卵磷脂制得的纳米结构脂质载体粒径很大，而且粒度分布不均，如两者结合使用，则能显著弥补对方的缺陷。复合表面活性剂用量相等时，泊洛沙姆 188 比例越大，纳米结构脂质载体粒径越小；复合表面活性剂配比固定时，用量越大，则粒径越小。综合考虑粒径及体系稳定性，选择复合乳化剂为泊洛沙姆 188-蛋黄卵磷脂（2 : 1），用量 4%。筛选结果见表 16。

3. 2. 2. 5 投药量筛选 随着挥发油投药量的增加，纳米结构脂质载体的粒径呈先减小后增大的趋势，Zeta 电位绝对值也随之先增大后减小。鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体的体系呈淡黄色，而且随投药量增加，颜色逐渐加深。另外，3 ~ 7 号样品瓶内

壁附着一圈细小的油滴，可能是未被包封的过量挥发油。从节省成本的角度出发，选择投药量 0. 5%。筛选结果见表 17。

表 16 乳化剂的成分及用量对纳米结构脂质载体粒径及 Zeta 电位的影响

Tab. 16 Effects of constituent and dosage of emulsifier on the particle size and Zeta potential of nanostructured lipid carrier

编号	A(泊洛沙姆 188)- B(蛋黄卵磷脂)	用量/ %	平均粒径/ nm	PDI	Zeta 电位/ mV
1	1 : 0	2	69. 81	0. 208	-12. 3
2	0 : 1	2	171. 70	0. 328	-28. 0
3	1 : 1	1	113. 10	0. 175	-19. 8
4	1 : 1	2	101. 90	0. 213	-23. 0
5	1 : 1	4	95. 10	0. 263	-27. 2
6	2 : 1	1	85. 13	0. 179	-20. 0
7	2 : 1	2	71. 80	0. 230	-13. 8
8	2 : 1	4	71. 30	0. 255	-26. 1
9	4 : 1	1	60. 84	0. 171	-15. 2
10	4 : 1	2	63. 81	0. 255	-8. 88
11	4 : 1	4	66. 71	0. 270	-16. 1
12	8 : 1	1	54. 02	0. 167	-4. 69
13	8 : 1	2	53. 26	0. 253	-9. 09
14	8 : 1	4	61. 06	0. 397	-16. 4

表 17 挥发油量对纳米结构脂质载体粒径及 Zeta 电位的影响

Tab. 17 Effects of volatile oil dosage on the particle size and Zeta potential of nanostructured lipid carrier

编号	投药量/%	平均粒径/nm	PdI	Zeta 电位/mV
1	0. 25	73. 44	0. 283	-15. 6
2	0. 5	74. 52	0. 271	-19. 3
3	1. 0	67. 85	0. 248	-17. 5
4	1. 5	64. 70	0. 218	-20. 4
5	2. 0	55. 00	0. 214	-27. 3
6	2. 5	59. 91	0. 229	-27. 1
7	3. 0	60. 63	0. 208	-25. 0

3. 2. 2. 6 正交试验优化处方 根据单因素试验结果，选择乳化剂量、脂质用量、固-液脂质比和投药量 4 个因素作 $L_9(3^4)$ 正交试验设计。以粒径为评价指标，正交试验方差分析显示，被考察的 4 个因素对纳米粒粒径的影响均不明显。直观分析见表 18。

直观分析结果显示，极差值 $B > D > A > C$ ，即 4 个因素对粒径的影响程度顺序为 B（脂质量）> D（投药量）> A（乳化剂量）> C（固/液脂质比）；均值 $K_{A1} > K_{A2} > K_{A3}$ ， $K_{B3} > K_{B2} > K_{B1}$ ， $K_{C1} > K_{C2} > K_{C3}$ ， $K_{D1} > K_{D2} > K_{D3}$ ，由于纳米粒径越小越好，故最佳因素水平为 $A_3B_1C_3D_3$ ，即复合乳化剂泊洛沙姆 188-蛋黄卵磷脂（2 : 1）用量

4%，混合脂质单硬脂酸甘油酯-辛酸癸酸三甘油酯（6：4）用量 1%，挥发油投药量 0.5%。综上所述，最佳处方为单硬脂酸甘油酯 0.12 g，辛酸癸酸三甘油酯 0.08 g，泊洛沙姆 1 880.533 g，蛋黄卵磷脂 0.267 g，鱼腥草挥发油 0.1 g，重蒸馏水加至 20 mL。

表 18 直观分析
Tab. 18 Intuitive analysis

编号	乳化剂/% (A)	脂质/% (B)	固-液脂质比 (C)	投药量/% (D)	平均粒径/ nm
1	1	1	1	1	82.14
2	1	2	2	2	83.52
3	1	3	3	3	84.54
4	2	1	2	3	72.12
5	2	2	3	1	82.43
6	2	3	1	2	85.04
7	3	1	3	2	72.72
8	3	2	1	3	79.03
9	3	3	2	1	85.87
K ₁	83.400	75.66	82.070	83.480	
K ₂	79.863	81.66	80.503	80.427	
K ₃	79.207	85.15	79.897	78.563	
R	4.193	9.49	2.173	4.917	

3.2.2.7 最佳处方验证 按照正交试验所得的最佳工艺及处方，按“2.2.1”项下方法平行制备 3 批纳米结构脂质载体，检测其粒径分布和 Zeta 电位，结果见表 19。由表可知，按照最佳工艺及处方制备的鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体粒径小，而且粒度分布均匀，Zeta 电位绝对值较大，说明纳米粒稳定。同时，纳米粒径的 RSD 为 2.46%，表明其重复性好，稳定可靠，具有实际应用价值。

表 19 验证试验结果
Tab. 19 Results of verification tests

编号	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mv
1	72.75	0.258	-26.3
2	69.53	0.258	-25.7
3	70.00	0.272	-24.2

3.3 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体制剂学评价
3.3.1 形态观察 透射电镜下观察鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体，见图 4。由图可知，纳米粒呈圆球状，轮廓规整，粒度分布比较均匀，无团聚现象。
3.3.2 粒径分布及 Zate 电位 将鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体稀释 10 倍，马尔文纳米粒度及 Zeta 电位分析仪检测其粒径分布及 Zeta 电位，平行 3

次，计算平均值。结果见图 5~6。

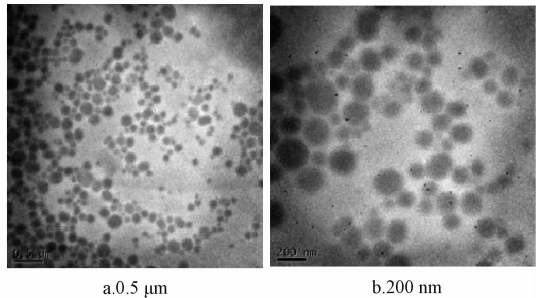


图 4 纳米结构脂质载体透射电镜图
Fig. 4 Transmission electron micrographs of nanostructured lipid carrier

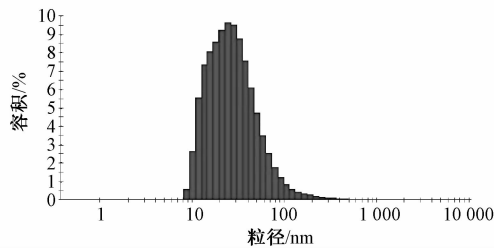


图 5 纳米结构脂质载体粒径分布
Fig. 5 Particle size distribution of nanostructured lipid carrier

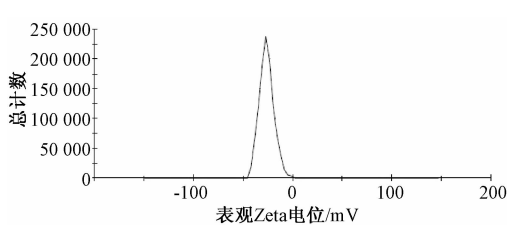


图 6 纳米结构脂质载体 Zeta 电位分布
Fig. 6 Zeta potential distribution of nanostructured lipid carrier

鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体的粒度呈单峰分布，平均粒径为 (70.76 ± 1.74) nm，粒径介于 10~100 nm 之间的纳米粒约占总数的 96.4%。
由图可知，鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体的 Zeta 电位为 (-25.40 ± 1.08) mV，体系较稳定。
3.3.3 包封率和载药量 平行制备 3 批鱼腥草挥发油-纳米结构脂质载体，按照“2.3.4”和“2.3.5”项下方法检测其包封率和载药量，结果见表 20。由表可知，纳米结构脂质载体的载药量为 5.76%，包封率为 90.33%，符合药典标准 ($>80\%$)。

表 20 纳米结构脂质载体包封率和载药量

Tab. 20 Entrapment efficiencies and drug loadings of nanostructured lipid carrier

编号	包封率/%	载药量/%
1	89.00	5.68
2	92.31	5.88
3	89.67	5.73
平均值($\bar{x} \pm s$)	90.33 $\pm$ 1.75	5.76 $\pm$ 0.10

3.4 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体稳定性研究

3.4.1 影响因素试验

3.4.1.1 高温对纳米结构脂质载体的影响 在 60℃下, 纳米结构脂质载体平均粒径未发生明显变化, 到第 5 天时出现少量粒度在 10~30 nm 之间的粒子, 到第 10 天时降至 10~20 nm 之间, 而且包封率略有降低, 可能是由于高温而导致一小部分不稳定的纳米粒破碎。新制备的纳米结构脂质载体体系呈淡黄色, 澄清透明, 随着时间延长, 颜色逐渐加深, 透明度下降, 但无沉淀析出。具体见表 21。

表 21 高温对纳米结构脂质载体的影响

Tab. 21 Effect of high temperature on nanostructured lipid carrier

时间/d	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
0	69.49	0.236	89.00
5	72.14	0.239	87.06
10	74.35	0.249	86.57

3.4.1.2 强光照对纳米结构脂质载体的影响 强光照对纳米结构脂质载体的粒径和包封率均无明显影响, 但观察到其体系澄清度有所下降, 颜色变为淡乳白色。具体见表 22。

表 22 强光照对纳米结构脂质载体的影响

Tab. 22 Effect of strong light on nanostructured lipid carrier

日期/d	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
0	69.49	0.236	89.00
5	68.97	0.261	86.57
10	64.23	0.265	87.34

3.4.2 短期稳定性考察

3.4.2.1 外观变化 在 90 d 的考察期内, 室温下放置的纳米结构脂质载体外观基本未发生变化, 到第 90 天时体系仍澄清透明。但 4℃下其外观变化明显, 到 15 d 时体系较第 1 天明显浑浊, 第 30 天时水分散液已完全不透明, 第 90 天时体系已变为白色乳状液。

3.4.2.2 粒径和包封率变化 纳米结构脂质载体在室温下放置 90 d 后, 平均粒径无明显变化, 但

包封率显著下降, 第 30 天时已低于药典要求 ($\geq 80\%$), 第 90 天时降至 64.44%; 在 4℃下随时间的延长, 其粒径明显增大, 粒度分布范围变宽, 系统稳定性降低, 包封率也显著减少。在相同时间下, 放置在室温的纳米结构脂质载体粒径明显小于放置在 4℃者。因此, 纳米结构脂质载体应选择室温条件下保存。具体见表 23。

表 23 纳米结构脂质载体在室温及 4℃下的稳定性

Tab. 23 Stabilities of nanostructured lipid carrier at room temperature and 4℃

温度	时间/d	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
室温	1	69.49	0.236	89.00
	7	73.73	0.271	88.65
	15	71.30	0.268	81.56
	30	72.53	0.278	79.38
	60	71.92	0.258	72.21
	90	73.49	0.275	64.44
4℃	1	69.49	0.236	89.00
	7	82.12	0.187	88.48
	15	92.97	0.175	82.91
	30	128.70	0.195	76.61
	60	182.40	0.324	75.63
	90	244.68	0.450	67.28

4 讨论

包封率测定过程中分离纳米粒与游离药物的方法有很多, 如超速离心法、葡聚糖凝胶柱色谱法、透析法、超滤离心法等。前期实验发现, 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体经高速离心后, 纳米粒上浮, 放置一段时间后重新扩散, 不利于其收集, 而葡聚糖凝胶色谱柱也无法将所制备的纳米粒与游离药物很好地分离。若选择适当型号的超滤管, 通过超滤离心法则可将分散体系中的水分滤除, 从而得到浓集的纳米粒。因此, 本实验最终采用超滤法测定纳米结构脂质载体包封率, 考虑到制剂粒径分布, 选择截留分子质量为 100 kDa 的超滤管。

本实验采用熔融乳化-超声分散法, 制备了鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体, 平均粒径约为 (70.76 $\pm$ 1.74) nm, Zeta 电位为 (−25.40 $\pm$ 1.08) mV, 包封率 90.33%, 载药量 5.76%。稳定性试验结果表明, 高温会导致其外观颜色的改变, 故该制剂应放置在室温条件下密闭保存。

纳米结构脂质载体以生物相容性好、可降解的固-液混合脂质为载体材料, 尤其适用于包载挥发油类药物, 为其提供稳定的包封环境, 并能有效改善难溶性药物的吸收和分布行为^[11], 提高药物的生物利用度。文献 [12-14] 报道, 粒径在 50 nm 左右的纳米粒可直接通过消化道上皮细胞, 吸收进

人体循环或淋巴循环系统，从而有效降低口服给药的肝脏首过效应。因此，基于纳米结构脂质载体的这些特点，有希望开发出新型鱼腥草挥发油口服制剂。

参考文献：

[1] 洪佳璇, 徐淑媛, 江 丽, 等. 鲜品鱼腥草挥发油成分分析[J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(5): 375- 377.

[2] 刘金娟, 杨成流, 陈永强, 等. 鱼腥草地下茎提取物诱导胃癌细胞 SGC-7901 凋亡机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 257-261.

[3] Tang Y J, Yang J S, Lin C F, *et al.* *Houttuynia cordata* Thunb extract induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HT-29 human colon adenocarcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(5): 1051-1056.

[4] 张 薇, 卢芳国, 潘双银, 等. 鱼腥草中挥发油的提取分析及其抗菌抗病毒作用的研究[J]. 实用预防医学, 2008, 15(2): 312- 316.

[5] 吴慧芬, 洪佳璇, 唐法娣. 鲜鱼腥草油对哮喘豚鼠肺组织 TGF- β_1 、LTD $_4$ 、ET-1 含量的影响[J]. 中国中医药科技, 2013, 20(5): 484-485.

[6] Shin S, Joo S S, Jeon J H, *et al.* Anti-inflammatory effects of a *Houttuynia cordata* supercritical extract [J]. *J Vet Sci*, 2010, 11(3): 273-275.

[7] Li W F, Fan T, Zhang Y M, *et al.* *Houttuynia cordata* Thunb. volatile oil exhibited anti-inflammatory effects *in vivo* and inhibited nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages *in vitro* [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(11): 1629-1639.

[8] 金元宝. 超临界 CO $_2$ 萃取中药材挥发油抑菌活性检测研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.

[9] 李绍林, 汪小根. 中药纳米载药系统的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2014, 30(6): 843-845.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 208-209.

[11] 阮婧华, 杨付梅, 张金洁, 等. 槲皮素纳米结构脂质载体增加口服吸收机制研究 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(5): 368-373.

[12] Bargoni A, Cavalli R, Caputo O, *et al.* Solid lipid nanoparticles in lymph and plasma after duodenal administration to rats [J]. *Pharm Res*, 1998, 15(5): 745-750.

[13] Hussain N, Jaitley V, Florence A T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 50(1-2): 107-142.

[14] Guillaume E, Amaury H, Sophie C, *et al.* Pharmacokinetics of DTPA entrapped in conventional and long-circulating liposomes of different size for plutonium decorporation [J]. *J Controlled Release*, 2005, 110(1): 177-188.