

姜黄素纳米脂质载体的制备、优化及体外评价

康玉霞^{1,2}, 雷 丸^{1,2}, 王 济², 王晓娟^{2*}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 军事口腔医学国家重点实验室, 第四军医大学口腔医院药剂科, 陕西 西安 710032)

摘要: **目的** 制备、优化姜黄素纳米脂质载体, 并进行体外评价。**方法** 薄膜分散法制备姜黄素纳米脂质载体后, 以粒径和包封率为评价指标, 单因素和正交设计法优化处方和制备工艺。透射电镜观察其外观形态, 激光粒度分析仪测定其粒径、粒径分布及 Zeta 电位, 透析法测定其体外释放行为。**结果** 最优条件为投药量 10 mg, 固液比 2 : 5, 超声时间 6 min, 磷酸缓冲溶液 pH 值 6.5。不同磷脂酰丝氨酸比例 (0%、4%、8%、12%) 修饰的载体呈球形或类球形, 分布均匀, 平均粒径分别为 (212.1 ± 1.4)、(210.5 ± 1.3)、(207.6 ± 1.7)、(198.4 ± 1.7) nm, Zeta 电位分别为 (−1.33 ± 0.39)、(−18.01 ± 0.41)、(−45.31 ± 0.36)、(−45.56 ± 0.41) mV, 包封率分别为 (85.64 ± 0.67)%、(86.13 ± 0.56)%、(88.38 ± 0.34)%、(88.78 ± 0.58)%, 载药量分别为 (2.23 ± 0.03)%、(2.15 ± 0.03)%、(2.19 ± 0.04)%、(2.18 ± 0.02)%, 具有明显的缓释特性。**结论** 制备的姜黄素纳米脂质载体粒径分布均匀, 包封率和载药量均良好。

关键词: 姜黄素纳米脂质载体; 制备; 优化; 体外评价; 薄膜分散法; 单因素; 正交设计

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)05-1011-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.010

Preparation, optimization and *in vitro* evaluation of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers

KANG Yu-xia^{1,2}, LEI Wan^{1,2}, WANG Ji², WANG Xiao-juan^{2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. State Key Laboratory of Military Stomatology; Department of Pharmacy, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare and optimize curcumin-loaded nanostructured lipid carriers and to evaluate *in vitro* performance. **METHODS** For curcumin-loaded nanostructured lipid carriers prepared by film dispersion method, single factor test and orthogonal design method were applied to optimizing its formulation and preparation technology, with regard to indices of particle size and encapsulation efficiency. The morphology was studied by transmission electron microscopy, while the particle size, particle distribution and Zeta potential were determined by laser particle size analyzer, and the *in vitro* drug release behavior was investigated by dialysis method. **RESULTS** The following conditions were 10 mg for dosage, 2 : 5 for ratio of solid to liquid, 6 min for extraction time and 6.5 for pH value of phosphate buffer solution. The carriers modified by different ratios of phosphatidylserine (0%, 4%, 8% and 12%) were spherical or approximately spherical with homogeneous distribution. The mean sizes were (212.1 ± 1.4) nm, (210.5 ± 1.3) nm, (207.6 ± 1.7) nm and (198.4 ± 1.7) nm, the Zeta potentials were (−1.33 ± 0.39) mV, (−18.01 ± 0.41) mV, (−45.31 ± 0.36) mV and (−45.56 ± 0.41) mV, the encapsulation efficiencies were (85.64 ± 0.67)%, (86.13 ± 0.56)%, (88.38 ± 0.34)% and (88.78 ± 0.58)%, and the drug loading capacities were (2.23 ± 0.03)%, (2.15 ± 0.03)%, (2.19 ± 0.04)% and

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 陕西省中医药管理局中医药科研课题 (15-ZY021)

作者简介: 康玉霞 (1989—), 女, 硕士生, 从事中药药剂学研究。Tel: 15709248232, E-mail: 1039961519@qq.com

* 通信作者: 王晓娟 (1962—), 女, 主任药师, 硕士生导师, 从事天然药物化学与中药新制剂研究。Tel: (029) 84773189, E-mail:

wxjyh231@fmmu.edu.cn

(2.18 ± 0.02)%, respectively. An obvious slow-release character was observed. **CONCLUSION** The obtained curcumin-loaded nanostructured lipid carriers display a uniform particle size distribution with high encapsulation efficiency and drug loading capacity.

KEY WORDS: curcumin-loaded nanostructured lipid carriers; preparation; optimization; *in vitro* evaluation; film dispersion method; single factor; orthogonal design

姜黄素是从姜科植物姜黄 *Curcuma longa* 根茎中提取出的一种多酚类天然药物^[1], 为姜黄发挥药理作用的主要活性成分^[2]。姜黄作为一种传统中药, 其味辛、苦、温, 归脾、肝经^[1], 具有行风、散风活血、调经止痛的功效^[3]。近年来研究发现, 姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗凝血、清除自由基、降血脂、抗动脉粥样硬化等多方面的药理作用^[4-5], 而且毒性低, 不良反应少, 已成为研究的热点^[6]。但是, 该成分几乎不溶于水, 易溶于乙醇、醋酸、丙酮、氯仿等溶剂, 易见光分解, 在中性和碱性条件下不稳定^[2], 这些缺点也限制了其应用。因此, 迫切需要运用药剂学的手段来改善姜黄素的水溶性及稳定性。

磷脂酰丝氨酸大量存在于凋亡细胞的外膜^[7-8], 能高效识别巨噬细胞上的受体而实现巨噬细胞靶向性^[7], 诱导生物体内凋亡细胞的清除^[8-9], 而巨噬细胞又是动脉粥样硬化斑块的主要炎症细胞^[8]。因此, 将采用生物内源性的磷脂酰丝氨酸作为膜材修饰纳米粒, 以具有明显抗动脉粥样硬化作用的姜黄素为模型药物进行包载, 制备磷脂酰丝氨酸修饰的姜黄素纳米粒。期望不仅可以提高姜黄素的水溶性和稳定性, 还可以借助磷脂酰丝氨酸介导的靶向巨噬细胞作用来增加纳米粒斑块靶向性, 进而更好地发挥抗动脉粥样硬化的疗效。

1 仪器与材料

BT125D 电子天平 (十万分之一, 德国 Sartorius 公司); KQ5200E 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); SENCO® R 系列旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); SHB-3 循环水多用真空泵 (郑州杜甫仪器厂); UV/VIS Lambda35 紫外光谱仪 (珀金埃尔默责任有限公司); YJ96-II 超声细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Nano-ZS90 激光粒度分析仪 (英国马尔文公司); LC-2010A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); SHA-C 水浴恒温振荡器 (金坛市杰瑞电器有限公司); LD5-10 低速离心机 (北京医用离心机厂)。姜黄素对照品 (含有量 98.9%, 批号 110823-201405, 中国食品药品检定研究院); 姜黄素原料

药 (含有量 98%, 阿拉丁试剂上海有限公司); 大豆磷脂 S100 (含有量 97%, 德国 Lipoid 公司); 磷脂酰丝氨酸 (含有量 > 70%, 上海将来实业股份有限公司); 三油酸甘油酯 (上海梯希爱化成工业发展有限公司); 胆固醇 (含有量 99%, 日本精细化工株式会社); 胆固醇油酸酯 (含有量 97%, 美国 Alfa Aesar 公司)。甲醇、乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 姜黄素纳米脂质载体的制备 分别精密称取处方量的大豆磷脂、磷脂酰丝氨酸、三油酸甘油酯、胆固醇、胆固醇油酸酯和姜黄素原料药混合物, 加 10 mL 氯仿超声溶解, 55 °C 下在旋转蒸发仪中挥去有机溶剂, 得到干燥的脂质薄膜。在 30 °C 下, 用磷酸盐缓冲液 (pH = 6.5) 对脂质薄膜进行 30 min 水化, 脂质混悬液超声处理 10 min, 再进行探头超声 (300 W) 6 min。最后, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 同时使粒径均匀。

2.2 包封率的测定

2.2.1 葡聚糖凝胶微柱对空白纳米脂质载体的吸附

取空白纳米脂质载体样品 0.5 mL, 滴加到葡聚糖凝胶微柱中心, 1 000 r/min 离心 2 min, 然后每次补充 0.5 mL 蒸馏水洗脱 2 min, 收集带有乳光的洗脱液, 无水乙醇破乳定容, 在 541 nm 波长处测定吸光度 A_1 。再取样品 0.5 mL, 无水乙醇破乳定容, 同法测定吸光度 A_2 。计算空白纳米脂质载体的回收率 $[(A_1/A_2) \times 100\%]$, 平均值为 98.9%, RSD 为 0.59% ($n=3$), 表明微柱对其几乎无吸附作用。

2.2.2 葡聚糖凝胶微柱对姜黄素游离药物的吸附

取与载体等质量浓度的姜黄素溶液 0.5 mL, 滴加到微柱中心, 1 000 r/min 离心 2 min, 然后每次补充 0.5 mL 蒸馏水洗脱 2 min, 合并洗脱液, 无水乙醇定容, 在 426 nm 波长处测定吸光度 A_1 。再取 0.5 mL, 无水乙醇定容, 同法测定吸光度 A_2 , 计算微柱对姜黄素游离药物的吸附率, 公式为 $[(A_2 - A_1)/A_2] \times 100\%$, 测得平均值为 98.3%, RSD 为 0.67% ($n=3$)。

2.2.3 葡聚糖凝胶微柱对姜黄素和空白纳米脂质

载体物理混合物的吸附 取姜黄素溶液适量，加到空白载体中，取 0.5 mL 滴加到微柱中心，1 000 r/min离心 2 min，然后每次补充 0.5 mL 蒸馏水洗脱 2 min，收集带有乳光的部分，无水乙醇破乳定容，在 426 nm 波长处测定姜黄素的吸光度 A_1 。再取 0.5 mL，无水乙醇破乳定容，同法测定吸光度 A_2 ，计算微柱对混合物中姜黄素的吸附率，公式为 $[(A_2 - A_1) / A_2] \times 100\%$ ，测得平均值为 97.8%，RSD 为 1.04% ($n = 3$)，表明葡聚糖凝胶微柱能将混合物中的游离药物吸附截留。

2.2.4 分离效果验证 取姜黄素纳米脂质载体样品 0.5 mL，滴加到葡聚糖凝胶微柱中心，1 000 r/min离心 2 min，然后每次补充 0.5 mL 蒸馏水洗脱 2 min 至不再有乳光产生，0.5 mL 30% 乙醇溶液洗脱 2 min，收集每管洗脱液，无水乙醇定容，摇匀，过滤，测定吸光度。洗脱曲线见图 1。

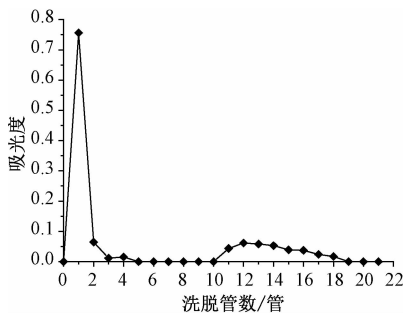


图 1 洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve

由图可知，姜黄素纳米脂质载体的出峰集中在第 1 管和第 2 管，在第三次离心后已完全洗脱；游离的姜黄素溶液在第 10 次离心时才大量被洗脱出来，表明葡聚糖微柱能将两者很好地分离开。

2.2.5 姜黄素纳米脂质载体包封率和载药量的测定 分别取姜黄素对照品及空白载体适量，无水乙醇溶解稀释后过滤，在 300 ~ 500 nm 波长范围内进行紫外扫描。结果，姜黄素的最大吸收波长为 426 nm，空白载体不干扰姜黄素的测定，见图 2。另取对照品适量，加无水乙醇配制成一系列质量浓度的标准溶液，分别测定吸光度。以标准溶液的吸光度 (Y) 对其质量浓度 (X) 进行线性回归，得回归方程 $Y = 0.170\ 2X - 0.016\ 9$ ($r = 0.999\ 7$)，表明姜黄素在 1.044 ~ 7.308 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系，精密度和回收率均良好，RSD 小于 2%，符合含有量测定方法学的要求。

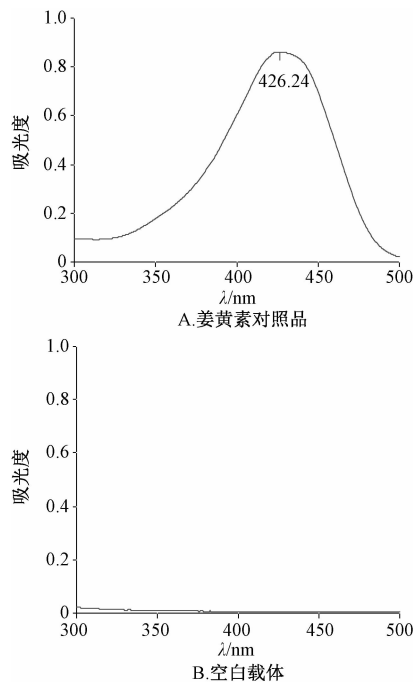


图 2 紫外扫描图谱
Fig. 2 Ultraviolet scanning profiles

取姜黄素纳米脂质载体样品 0.5 mL，滴加到微柱中心，1 000 r/min 离心 2 min，然后每次补充 0.5 mL 蒸馏水洗脱 2 min，收集带有乳光的部分，置于 100 mL 量瓶中，无水乙醇破乳定容，摇匀，过滤，测定吸光度，测定姜黄素的质量浓度为 2.85 $\mu\text{g/mL}$ ，按下式计算包封率 (EE) 和载药量 (LD)。

$$EE = \frac{m}{m_1} \times 100\%$$

$$LD = \frac{m}{m_1 + m_2} \times 100\%$$

其中， m 为药量， m_1 为投药量， m_2 为载体材料质量。

2.3 单因素考察

2.3.1 磷脂酰丝氨酸/磷脂摩尔比例的确定 根据预实验结果，采用薄膜分散法制备磷脂酰丝氨酸修饰的姜黄素纳米脂质载体。固定其他条件，制备磷脂酰丝氨酸比例分别为 0%、4%、8%、12%、20% 的纳米脂质载体，制备方法同“2.1”项，激光粒度分析仪测定其粒径。然后，测定其包封率，方法同“2.2.5”项。结果见表 1。

由表可知，当磷脂酰丝氨酸比例在 0% ~ 12% 时，对药物粒径和包封率的影响不大；但当在 20% 时，包封率显著减小。因此，本实验选择磷脂酰丝氨酸的比例分别为 0%、4%、8% 和 12%。

表 1 不同比例磷脂酰丝氨酸对粒径、多分散系数及包封率的影响 ($n=3$)

Tab. 1 Effects of different ratios of phosphatidylserine on particle size, polydispersity index and entrapment efficiency ($n=3$)

磷脂酰丝氨酸/%	粒径/nm	多分散系数	包封率/%
0	223.6	0.016	77.98
4	214.4	0.010	76.40
8	214.5	0.044	80.44
12	194.2	0.087	78.48
20	156.8	0.089	49.69

另外,在考察磷脂酰丝氨酸修饰的姜黄素纳米脂质载体制备工艺和处方因素时,固定磷脂酰丝氨酸用量为 8%,以粒径和包封率为考察指标来进行优化。

2.3.2 成膜温度 固定其它条件,以 55、65、75、85 ℃ 的成膜温度分别制备姜黄素纳米脂质载体,制备方法同“2.1”项,激光粒度分析仪测定其粒径。然后,测定其包封率,方法同“2.2.5”项。结果见表 2。

表 2 不同成膜温度对粒径、多分散系数及包封率的影响 ($n=3$)

Tab. 2 Effects of different film-forming temperatures on particle size, polydispersity index and entrapment efficiency ($n=3$)

成膜温度/℃	粒径/nm	多分散系数	包封率/%
55	196.7	0.101	82.43
65	198.6	0.081	79.13
75	195.3	0.052	78.38
85	200.9	0.020	66.51

由表可知,随着成膜温度的升高,包封率呈下降的趋势,可能是由于温度过高,导致药物和脂质发生氧化的缘故。因此,成膜温度选择 55 ℃。

2.3.3 水合时间 固定其它条件,以 15 min、30 min、1 h、1.5 h 水合时间分别制备姜黄素纳米脂质载体,制备方法同“2.1”项,激光粒度分析仪测定其粒径。然后,测定其包封率,方法同“2.2.2”项。结果见表 3。

表 3 不同水合时间对粒径、多分散系数及包封率的影响 ($n=3$)

Tab. 3 Effects of different hydration time on particle size, polydispersity index and entrapment efficiency ($n=3$)

水合时间/min	粒径/nm	多分散系数	包封率/%
15	193.1	0.133	74.83
30	199.6	0.112	79.02
60	198.3	0.120	77.77
90	200.2	0.140	79.78

由表可知,水合时间为 15 min 时,包封率较低,可能是药物未能与脂质充分接触,水合不完全;在 30 min 时,包封率增大;但继续延长后,粒径和包封率无明显变化,故水合时间选择 30 min。

2.3.4 超声时间 固定其它条件,以 3、6、9、12 min 超声时间分别制备姜黄素纳米脂质载体,制备方法同“2.1”项,激光粒度分析仪测定其粒径。然后,测定其包封率,方法同“2.2.5”项。结果见表 4。

表 4 不同超声时间对粒径、多分散系数及包封率的影响 ($n=3$)

Tab. 4 Effects of different ultrasonic time on particle size, polydispersity index and entrapment efficiency ($n=3$)

超声时间/min	粒径/nm	多分散系数	包封率/%
3	258.1	0.185	67.63
6	198.3	0.120	64.78
9	188.3	0.111	54.32
12	176.1	0.144	49.61

由表可知,超声时间对粒径和包封率均有较大的影响,随着超声时间延长,两者均呈下降的趋势。综合分析,超声时间应控制在 3~9 min,具体情况有待作进一步考察。

2.3.5 投药量 固定其它条件,以 5、10、15、20 mg 投药量分别制备姜黄素纳米脂质载体,制备方法同“2.1”项,激光粒度分析仪测定其粒径。然后,测定其包封率,方法同“2.2.5”项。结果见表 5。

表 5 不同投药量对粒径、多分散系数及包封率的影响 ($n=3$)

Tab. 5 Effects of different dosages on particle size, polydispersity index and entrapment efficiency ($n=3$)

投药量/mg	粒径/nm	多分散系数	包封率/%
5	181.3	0.053	82.09
10	195.8	0.062	87.10
15	239.4	0.071	54.78
20	187.2	0.064	51.60

由表可知,投药量对粒径和包封率均有较大影响。当投药量在 15 mg 以下时,粒径逐渐增大,包封率先增大后减小;当在 15 mg 以上时,粒径减小,但包封率也较低。因此,投药量应控制在 10 mg 左右,具体情况有待作进一步考察。

2.3.6 固液态脂质比 固定其它条件,以 2:1、2:3、2:5、2:7 固液比分别制备姜黄素纳米脂质载体,制备方法同“2.1”项,激光粒度分析仪测

定其粒径。然后，测定其包封率，方法同“2.2.5”项。结果见表6。

表6 不同固液比对粒径、多分散系数及包封率的影响 (n=3)

Tab.6 Effects of different ratios of solid to liquid on particle size, polydispersity index and entrapment efficiency (n=3)

固液比	粒径/nm	多分散系数	包封率/%
2:1	195.0	0.016	57.69
2:3	201.2	0.045	75.08
2:5	191.3	0.049	87.10
2:7	185.8	0.062	59.90

由表可知，固液比对粒径影响不大，但对包封率有较大影响。随着液态脂质比例的增加，包封率先增大后减小，最终将固液比控制在2:5左右的范围内，具体情况有待作进一步考察。

2.3.7 磷酸缓冲溶液的pH值 固定其它条件，以pH值5.0、6.5、7.0、7.4的磷酸缓冲溶液分别制备姜黄素纳米脂质载体，制备方法同“2.1”项，激光粒度分析仪测定其粒径。然后，测定其包封率，方法同“2.2.5”项。结果见表7。

表7 不同pH值磷酸缓冲溶液对粒径、多分散系数及包封率的影响 (n=3)

Tab.7 Effects of different pH values of phosphate buffer solution on particle size, polydispersity index and entrapment efficiency (n=3)

pH值	粒径/nm	多分散系数	包封率/%
5.0	302.5	0.257	58.30
6.5	189.8	0.153	79.13
7.0	192.9	0.060	62.32
7.4	197.6	0.037	61.55

由表可知，磷酸缓冲溶液的pH值对粒径和包封率均有较大影响。pH为6.5时，粒径较小，而且包封率较高；当pH值进一步增加时，包封率下降，可能是由于姜黄素在中性条件下不稳定，导致包封率较低。因此，将磷酸缓冲溶液的pH值控制在6.5左右，具体情况有待作进一步考察。

2.4 正交设计法优化处方和制备工艺

2.4.1 正交试验设计 根据单因素考察的结果，选择影响姜黄素纳米脂质载体粒径和包封率的4个主要参数作为考察对象，即投药量(A)、固液比(B)、超声时间(C)、磷酸缓冲溶液的pH值(D)，每个因素选取3个水平，按正交设计L₉(3⁴)表进行试验，优选最佳处方和制备工艺。因素水平见表8。

表8 因素水平
Tab.8 Factors and levels

水平	因素			
	A 投药量/mg	B 固液比	C 超声时间/min	D pH值
1	10	2:4	4	5.8
2	12.5	2:5	6	6.5
3	15	2:6	8	7.0

2.4.2 正交试验结果 根据表8，采用正交设计助手Ⅱ专业版软件进行设计，按照软件给出的结果制备姜黄素纳米脂质载体，并测定包封率。结果见表9，方差分析见表10。

表9 正交试验结果
Tab.9 Results of orthogonal tests

编号	A 投药量/mg	B 固液比	C 超声时间/min	D pH值	包封率/%
1	1	1	1	1	77.69
2	1	2	2	2	89.48
3	1	3	3	3	68.92
4	2	1	2	3	61.25
5	2	2	3	1	41.59
6	2	3	1	2	67.35
7	3	1	3	2	35.36
8	3	2	1	3	53.35
9	3	3	2	1	43.99
K ₁	78.70	61.43	66.13	54.42	
K ₂	56.73	61.47	64.91	67.40	
K ₃	47.57	60.09	51.96	61.17	
k ₁	26.23	20.48	22.04	18.14	
k ₂	18.91	20.49	21.64	22.47	
k ₃	15.86	20.03	17.32	20.39	
R	31.13	1.39	14.17	12.97	

表10 方差分析
Tab.10 Analysis of variance

方差来源	SS	V	MS	F	显著性
A	1 826.42	2	913.21	105.87	*
B	17.25	2	8.63	1.00	—
C	573.13	2	286.56	33.23	*
D	146.84	2	73.42	8.51	—
误差	17.25	2	—	—	—

注：临界值F_{0.05}(2, 2) = 19.00, *P<0.05

由表9可知，各因素对包封率的影响依次为A>C>D>B，即投药量的影响最大，其次是超声时间，再次是磷酸缓冲溶液的pH值，而固液比的影响最小。

由表10可知，投药量和超声时间对包封率的影响均具有显著性差异(P<0.05)。按照正交试验结果，最优工艺条件为A₁B₂C₂D₂，即投药量为10mg，固液比为2:5，超声时间为6min，磷酸缓冲溶液的pH值为6.5。

2.4.3 验证试验 结合既定的工艺和参数，按照

最佳处方和工艺条件，制备3批姜黄素纳米脂质载体，并测定包封率，结果见表11。由表可知，在优化工艺条件下的平均包封率为88.78%，而且较为稳定，粒径和载药量均较为理想，说明该方案可行，而且工艺的重复性良好。

表 11 验证试验结果 (n=3)

Tab. 11 Results of verification tests (n=3)			
编号	包封率/%	粒径/nm	载药量/%
1	88.42	211.6	2.23
2	89.13	205.8	2.15
3	88.78	207.9	2.19
$\bar{x} \pm s$	88.78 ± 0.36	208.40 ± 1.85	2.19 ± 0.04

2.5 姜黄素纳米脂质载体理化性质的表征

2.5.1 形态学研究 在最佳处方和制备工艺条件下，制备不同磷脂酰丝氨酸比例的姜黄素纳米脂质载体，分别用适量去离子水稀释至一定倍数，滴加在覆盖碳膜的铜网上，晾干，透射电镜下观察形态和大小，结果见图3。由图可知，姜黄素纳米脂质载体为黑色类球形的实心结构，大小均一。

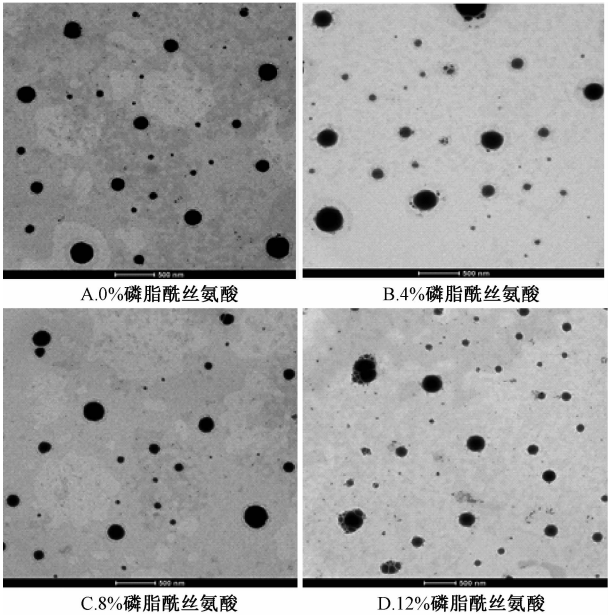


图 3 透射电镜图

Fig. 3 Transmission electron microscope images

2.5.2 粒径和 Zeta 电位的测定 在最佳处方和制备工艺条件下，制备不同磷脂酰丝氨酸比例的姜黄素纳米脂质载体，用适量去离子水稀释后，激光粒度分析仪测定其粒径和 Zeta 电位，结果见表12。由表可知，随着磷脂酰丝氨酸比例的增加，Zeta 电位呈现下降的趋势，说明已成功插入磷脂单层膜中；当磷脂酰丝氨酸比例大于8%时，Zeta 电位趋于恒定，说明已达到饱和状态。

表 12 不同磷脂酰丝氨酸比例对粒径、多分散系数和 Zeta 电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab. 12 Effects of different ratios of phosphatidylserine on particle size, polydispersity index and Zeta potential ($\bar{x} \pm s$, n=3)

磷脂酰丝氨酸/%	粒径/nm	多分散系数	电位/mV
0	212.1 ± 1.4	0.006 ± 0.001	-1.33 ± 0.39
4	210.5 ± 1.3	0.010 ± 0.003	-18.01 ± 0.41
8	207.6 ± 1.7	0.044 ± 0.002	-45.31 ± 0.36
12	198.4 ± 1.7	0.087 ± 0.003	-45.56 ± 0.41

2.5.3 包封率和载药量的测定 在最佳处方和制备工艺条件下，制备不同磷脂酰丝氨酸比例的姜黄素纳米脂质载体，测定药物的包封率和载药量，方法同“2.2.5”项，结果见表13。

表 13 不同磷脂酰丝氨酸比例对包封率和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab. 13 Effects of different ratios of phosphatidylserine on entrapment efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s$, n=3)

磷脂酰丝氨酸/%	包封率/%	载药量/%
0	85.64 ± 0.67	2.23 ± 0.03
4	86.13 ± 0.56	2.15 ± 0.03
8	88.38 ± 0.34	2.19 ± 0.04
12	88.78 ± 0.58	2.18 ± 0.02

2.5.4 体外释放 以含5%十二烷基硫酸钠的磷酸缓冲溶液(0.05 mol/L, pH=6.5)200 mL为释放介质，水浴恒温振荡，100次/min，温度(37.0 ± 0.5)℃。吸取含不同磷脂酰丝氨酸比例的载体样品溶液3 mL，装入释放介质浸泡过夜的透析袋(8 000~14 000 Da)中，透析夹夹紧，分别于0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、72、96、120 h吸取释放液2 mL，0.22 μm微孔滤膜过滤，按下述色谱条件测定姜黄素的含量。同时，补充等量同温的新鲜释放介质，按下式计算各取样点各样品的累积释放率。释放曲线见图4。

累积释放率 = $\frac{W_{\text{释放}}}{W_{\text{总}}} \times 100\%$

色谱条件为Diamondsil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-4%冰醋酸(48:52)；体积流量为1.0 mL/min；检测波长为426 nm；进样量为20 μL，空白载体、释放介质均不干扰姜黄素的测定。另取姜黄素对照品适量，加无水乙醇配制成一系列质量浓度的标准溶液，分别进样测定。以姜黄素标准溶液的峰面积(Y)对其质量浓度(X)进行线性回归，得回归方程Y = 147 945X - 8 514.9 (r = 0.999 8)，表明姜黄素在

0.01 ~4.93 μg/mL 范围内呈良好的线性关系,其精密度和回收率均良好,RSD 小于 2%,符合含有量测定方法学的要求。

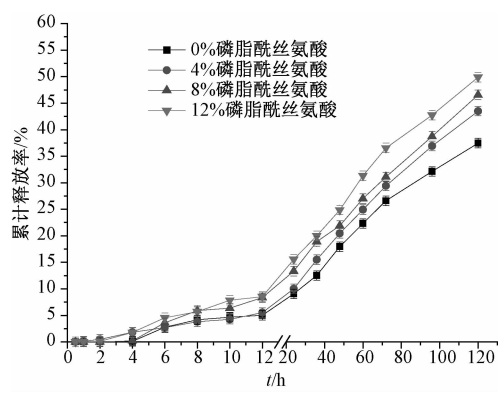


图 4 累计释放曲线 (n=3)

Fig. 4 Accumulative release curves (n=3)

由图可知,不同磷脂酰丝氨酸比例的姜黄素纳米脂质载体均表现出明显的缓释特性,并且随着其比例的增加,药物的释放逐渐加快,可能是由于磷脂酰丝氨酸的插入导致磷脂单层膜的排列紧密度降低,使得药物较快地从磷脂单层膜中释放出来。体外释药曲线方程拟合结果表明,不同磷脂酰丝氨酸比例姜黄素纳米脂质载体的体外释放曲线均符合一级动力学模型。

3 讨论

关于制备方法的选择,本实验考察了乳化蒸发法-低温固化法^[10]、溶剂扩散法^[11]、薄膜分散法^[12],由于所采用的有机溶剂为氯仿,与水互不相溶,而且前两种方法的有机相与水相混合时,会有颗粒析出,故选择薄膜分散法。

本实验采用生物相容性的脂质为膜材,对姜黄素进行包载,制备纳米脂质载体,水合介质为 pH 6.5 的磷酸缓冲溶液,可直接用于注射给药,改善了姜黄素水溶性差、易见光分解、在中性介质中不稳定等不足之处。

在单因素考察的基础上,选择对姜黄素纳米脂质载体粒径和包封率影响最显著的因素进行正交试验设计,优选出最佳处方和制备工艺为投药量 10 mg,固液比 2 : 5,超声时间 6 min,磷酸缓冲溶液 pH 值 6.5。通过验证,发现该工艺优越、合理、可重复性高,可作为筛选处方和工艺的一种切实有效的手段。

在体外释放实验中,不同磷脂酰丝氨酸比例的姜黄素纳米脂质载体在 120 h 内的累计释放量约为 40%,具有明显的缓释特性,并且体外释放曲线均符合一级动力学模型,进一步表明该载药系统符合缓释型释药系统。

本实验联合单因素和正交试验设计,优选出最佳处方和制备工艺。所得的姜黄素纳米脂质载体外观性状良好,粒径较小,而且分布均匀,包封率和载药量均较为理想,4℃下放置 1 周后性质稳定,表明该工艺参数合理,可为后续的研究提供可靠的制剂保障。

参考文献:

[1] 李高文,徐英,库宝善,等. 姜黄素的中枢药理作用研究进展[J]. 神经药理学报, 2011, 1(2): 48-57.

[2] 王春彬,高大中. 姜黄素的研究进展以及在心血管疾病中的应用[J]. 心血管病学进展, 2005, 26(6): 614-616.

[3] 覃小艳,徐智,陈军宝,等. 姜黄素药学研究进展[J]. 长江大学学报, 2012, 9(7): 77-80.

[4] 阳巍,廖端芳,庾勤慧. 姜黄素抗动脉粥样硬化研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32(1): 55-58.

[5] Li X L, Lu Y, Sun Y, et al. Effect of curcumin on permeability of coronary artery and expression of related proteins in rat coronary atherosclerosis heart disease model[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 7247-7253.

[6] 狄建彬,顾振纶,赵笑东,等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(5): 附录 18-附录 21.

[7] Ogawa M, Umeda I O, Kosugi M, et al. Development of ¹¹¹In-labeled liposomes for vulnerable atherosclerotic plaque imaging[J]. *J Nucl Med*, 2014, 55(1): 115-120.

[8] Kansal S, Tandon R, Dwivedi P, et al. Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: a system for intervention in visceral leishmaniasis[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(11): 2650-2660.

[9] Maisseyeu A, Mihai G, Kampfrath T, et al. Gadolinium-containing phosphatidylserine liposomes for molecular imaging of atherosclerosis[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(11): 2157-2163.

[10] 陈大兵,吕万良,杨天智,等. 紫杉醇表面修饰脂质纳米粒的制备和性质[J]. 北京大学学报, 2002, 34(1): 57-60.

[11] Hu F Q, Jiang S P, Du Y Z, et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, 45(3-4): 167-173.

[12] Wang M T, Jin Y, Yang Y X, et al. In vivo biodistribution, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects of liver targeting dexamethasone acetate loaded nanostructured lipid carrier system[J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5: 487-497.