

- [24]

Yang L, Chen Q, Wang F, *et al.* Antiosteoporotic compounds from seeds of *Cuscuta chinensis*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(2): 553-560.
- [25]

Zeng K W, Wang X M, Ko H, *et al.* Hyperoside protects pri-
- mary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid β -protein via the PI3K/Akt/Bad/Bcl (XL) -regulated mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672 (1-3): 45-55.

水蜈蚣总黄酮固体脂质纳米粒处方的优化

田 茜¹, 贺敬霞¹, 何 晨¹, 田 璐¹, 尹蓉莉^{1*}, 杨军宣², 罗开沛¹
(1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137; 2. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

摘要: 目的 优化水蜈蚣 *Kyllinga brevifolia* Rottb. 总黄酮固体脂质纳米粒处方。**方法** 乳化蒸发-低温固化法制备固体脂质纳米粒。以总黄酮含量、泊洛沙姆 188 用量、单硬脂酸甘油酯用量为影响因素, 包封率和平均粒径为评价指标, Box-Behnken 效应面优化处方, 并通过透析法考察其体外释药性。**结果** 最佳处方为总黄酮含量 7%, 泊洛沙姆 188 用量 6.73%, 单硬脂酸甘油酯用量 3.49%, 包封率 99.30%, 平均粒径 76.5 nm。固体脂质纳米粒 8 h 时累积释放度为 53.83%, 24 h 时达 90.41%, 与 Ritger-Peppas 模型拟合度最高, 为药物扩散和脂质载体材料溶蚀的协同过程。**结论** 该方法稳定可行, 可为开发水蜈蚣新型制剂提供依据。
关键词: 水蜈蚣; 总黄酮; 固体脂质纳米粒; Box-Behnken 效应面法
中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)06-1170-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.012

Formulation optimization for *Kyllinga brevifolia* total flavonoids-loaded solid lipid nanoparticles

TIAN Qian¹, HE Jing-xia¹, HE Chen¹, TIAN Lu¹, YIN Rong-li^{1*}, YANG Jun-xuan², LUO Kai-pei¹
(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Traditional Chinese Medicine College of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

KEY WORDS: *Kyllinga brevifolia* Rottb.; total flavonoids; solid lipid nanoparticles; Box-Behnken response surface method

水蜈蚣系莎草科多年生草本植物水蜈蚣 *Kyllinga brevifolia* Rottb. 的全草, 其性平, 味辛、甘、微苦, 具有消炎、消肿、止痛、治疗乳糜尿等功效。临床上使用的水蜈蚣颗粒是其提取精制而成的制剂, 主要有效成分为总黄酮, 用于治疗乳糜尿^[1]。杨艳俊等^[2]采用微波辅助提取水蜈蚣总黄酮, 发现其不仅含挥发油、有机酸、酚类等成分, 还含有黄酮类化合物, 代表性成分有橙皮素、芸香

素、牡荆素、荭草素等^[3], 但水蜈蚣总黄酮难溶于水, 影响其体外释药, 而且口服生物利用度低, 限制了临床应用。
固体脂质纳米粒是正在发展的一种新型给药系统, 综合了脂质体和乳化剂的优点, 以天然或合成的生理相容性好、高熔点、室温下为固态的脂质为载体, 将药物包裹于类脂核中制成的固体脂质粒子, 其粒径在 10 ~ 1 000 nm 范围内, 可提高药物

收稿日期: 2016-08-05
基金项目: 重庆市科技计划项目 (cstc2014yykfA110020)
作者简介: 田 茜(1988—), 女, 硕士生, 药师, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 15882044956, E-mail: cherryrz@sina.com
* 通信作者: 尹蓉莉 (1952—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 13689056666, E-mail: yinronglili@163.com

生物利用度和稳定性^[4-7]。因此,本实验将采用 Box-Behnken 效应面法优化水蜈蚣总黄酮固体脂质纳米粒处方,考察其体外释药特性,为后续相关新剂型的研究奠定基础。

1 仪器与材料

UV-1102 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);79HW-1 型恒温磁力搅拌器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);Sartorius-BT2245 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);JY92-II 探头超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);超速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司);Zeta-sizer Nano 电位分析仪、Master-sizer 3000 粒度分析仪(英国 Malvern 公司);ZRS-8G 型智能溶试验仪(天津天大天发科技有限公司)。水蜈蚣总黄酮提取物(以芦丁计,含有量≥85%,南京泽朗医药科技有限公司);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-201202);单硬脂酸甘油酯(上海太伟药业有限公司);泊洛沙姆 188(Fluronic F-68,成都市科龙化工试剂厂)。水为双蒸水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 固体脂质纳米粒制备 采用乳化蒸发-低温固化方法^[6, 8-10]。称取处方量水蜈蚣总黄酮、单硬脂酸甘油酯,溶于适量无水乙醇(80℃恒温水浴)中,构成油相;适量泊洛沙姆 188 溶于 25 mL 双蒸水(80℃恒温水浴)中,构成水相。将熔融好的油相在磁力搅拌下(600 r/min)缓慢加入水相,制得淡黄色初乳,探头式超声细胞粉碎仪处理 10 min(700 W、80℃左右恒温),得到淡黄色透明的胶体溶液,将其快速分散于 50 mL 0~2℃双蒸水中,冰浴下继续搅拌至充分冷却,即得。

2.2 物理混合物制备 按“2.1”项下比例将原料药与处方中各辅料进行物理混合,置于研钵中混匀,即得。

2.3 总黄酮含量测定^[11]

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 11.02 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入无水乙醇适量,超声溶解并定容至刻度,即得 220.4 μg/mL 对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液及空白溶液制备 精密量取固体脂质纳米粒分散体 2 mL,置于 25 mL 量瓶中,无水乙醇定容,25 000 r/min 低温离心 15 min,取上清液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。再按“2.1”项下方法制备空白溶液。

2.3.3 检测波长选择 称取芦丁对照品、供试品适量,无水乙醇溶解,配成一定质量浓度的溶液,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 4% 氢氧化钠 10 mL,无水乙醇定容至刻度,以空白试剂为对照,在 200~800 nm 波长范围内进行扫描。结果,对照品、供试品溶液均在 507 nm 波长处有稳定的最大吸收峰,空白无干扰,故选择 507 nm 作为检测波长。

2.3.4 标准曲线绘制 精密量取芦丁对照品溶液 2、3、4、5、6、7 mL,置于 25 mL 量瓶中,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 4% 氢氧化钠 10 mL,无水乙醇定容至刻度,以空白试剂为参比,在 507 nm 波长处测定吸光度。以质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y)进行回归,得回归方程为 $Y = 0.011\ 6X - 0.000\ 9$ ($r = 0.999\ 9$),在 17.63~61.71 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.5 包封率测定 采用低温超速离心法。取固体脂质纳米粒 2 mL,置于超速离心管中,25 000 r/min 离心 1 h,吸取上清液,按“2.2.4”项下方法显色,在 507 nm 波长处测定吸光度,代入标准曲线,测得游离总黄酮质量浓度($M_{游}$)。再另取 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释定容至刻度,同法测定($M_{总}$),计算包封率,公式为 包封率 = $[(M_{总} - M_{游}) / M_{总}] \times 100\%$ 。

2.3.6 粒径的测定 取新鲜制备的纳米粒混悬液 5 mL,双蒸水稀释 125 倍,装入样品池,采用 Master-sizer 3000 粒度分析仪测定其粒径。

2.4 处方优化

2.4.1 试验设计 在单因素试验基础上,选择总黄酮含量(A)、泊洛沙姆 188 用量(B)、单硬脂酸甘油酯用量(C)作为影响因素,包封率(Y_1)和平均粒径(Y_2)作为评价指标,Box-Behnken 效应面法进行优化。因素水平见表 1。

表 1 因素水平
Tab.1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A 总黄酮/%	4	7	10
B 泊洛沙姆 188/%	3	5	7
C 单硬脂酸甘油酯/%	2	4	6

2.4.2 数据处理及模型拟合 结果见表 2,方差

分析见表 3~4。

表 2 试验设计与结果 (n=3)

Tab. 2 Design and results of tests (n=3)					
试验号	A	B	C	Y ₁ 包封率/%	Y ₂ 平均粒径/nm
1	0	1	1	98.21	60.8
2	0	1	-1	99.02	95.7
3	-1	-1	0	97.96	167.5
4	0	0	0	98.82	154.4
5	-1	0	1	96.85	218.3
6	0	0	0	99.01	145.4
7	0	-1	1	97.30	166.2
8	-1	1	0	98.11	45.3
9	0	0	0	99.05	159.3
10	-1	0	-1	98.41	126.5
11	0	0	0	98.78	159.5
12	1	0	-1	98.72	182.1
13	0	-1	-1	99.01	110.1
14	1	0	1	97.78	158.6
15	0	0	0	99.07	158.1
16	1	1	0	99.32	129.1
17	1	-1	0	98.01	127.3

表 3 方差分析 (包封率)

Tab. 3 Analysis of variance for entrapment efficiency				
来源	离均差平方和	自由度	F 值	P 值
模型	7.60	9	53.60	<0.000 1
A	0.76	1	49.59	0.000 2
B	0.71	1	44.95	0.000 3
C	3.15	1	199.97	<0.000 1
AB	0.34	1	21.35	0.002 4
AC	0.096	1	6.10	0.042 8
BC	0.20	1	12.65	0.008 9
A ²	1.14	1	72.41	<0.000 1
B ²	0.024	1	1.52	0.256 9
C ²	0.99	1	63.00	<0.000 1
残差	0.11	7	—	—
失拟项	0.037	3	0.66	0.617 6
纯误差	0.074	4	—	—
总和	7.71	16	—	—

二项式模型拟合方程分别为 $Y_1 = 98.95 + 0.31A + 0.30B - 0.63C + 0.29AB + 0.16AC + 0.23BC - 0.52A^2 - 0.075B^2 - 0.49C^2$, $R^2 = 0.985\ 7$; $Y_2 = 155.34 + 4.94A - 30.02B + 11.19C + 31.00AB - 28.83AC - 22.75BC + 12.57A^2 - 50.61B^2 + 3.47C^2$, $R^2 = 0.976\ 2$, 表明模型拟合度理想, 可用于分析和预测。方差分析表明, Y_1 模型中除 B^2 外, 其他因素均显著 ($P < 0.001$); Y_2 模型中除 A 和 C^2 外, 其他因素均显著 ($P < 0.001$)。

2.4.3 效应面分析 采用 Design Expert 软件绘制三维效应面图, 结果见图 1。

表 4 方差分析 (平均粒径)

Tab. 4 Analysis of variance for average particle size				
来源	离均差平方和	自由度	F 值	P 值
模型	28 851.67	9	31.96	<0.000 1
A	195.03	1	1.94	0.205 8
B	7 212.00	1	71.91	<0.000 1
C	1 001.26	1	9.98	0.015 9
AB	3 844.00	1	38.33	0.000 4
AC	3 323.52	1	33.14	0.000 7
BC	2 070.25	1	20.64	0.002 7
A ²	665.02	1	6.63	0.036 7
B ²	10 783.66	1	107.52	<0.000 1
C ²	50.63	1	0.50	0.500 4
残差	702.05	7	—	—
失拟项	561.76	3	5.34	0.069 7
纯误差	140.29	4	—	—
总和	29 553.72	16	—	—

2.4.4 处方验证 根据 Design Expert 软件综合评价得出最佳处方, 即总黄酮含量 7%, 泊洛沙姆 188 用量 6.73%, 硬脂酸甘油酯用量 3.49%。按“2.1”项下方法制备 3 批样品, 按“2.2.5”、“2.2.6”项下方法分别测定包封率与平均粒径, 结果见表 5。由表可知, 包封率与平均粒径的实测值与预测值偏差较小, 均在 $\pm 5\%$ 以内, 表明模型预测良好。

表 5 处方验证结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Results of formulation verification ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)			
指标	预测值	实测值	偏差/%
包封率/%	99.18	99.30 \pm 0.5	0.13
平均粒径/nm	74.0	76.5 \pm 4.1	3.42

注: 偏差 = (实测值 - 预测值) / 预测值

2.5 体外释药测定 采用透析法^[12]。精密量取固体脂质纳米粒、物理混合物适量 (与固体脂质纳米粒含等量的原料药) 放于透析袋, 扎紧后置于溶出仪中, 以 200 mL 0.2% SDS 溶液为释放介质, 设定转速为 50 r/min, 温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 于 1、2、4、6、8、10、12、24、30、36、48 h 取样 2 mL, 补加等体积等温溶出介质, 按“2.3.4”项下方法测定, 计算相应累积释放度, 结果见图 2。由图可知, 物理混合物在 8 h 时的累积释放度为 65.47%, 24 h 时达到 83.40%; 固体脂质纳米粒释药较缓, 8 h 时为 53.83%, 24 h 时达到 90.41%, 表明其释药开始有突释效应, 可能是未被包封的游离药物以及附着在固体脂质纳米粒表面的药物迅速释放, 从而使其达到缓释作用。

再分别采用零级、一级、Ritger-Peppas、Weibull、Hixcon-Crowell、Higuchi 模型对体外释药数据进行拟合, 结果见表 6, 可知 Ritger-Peppas 模

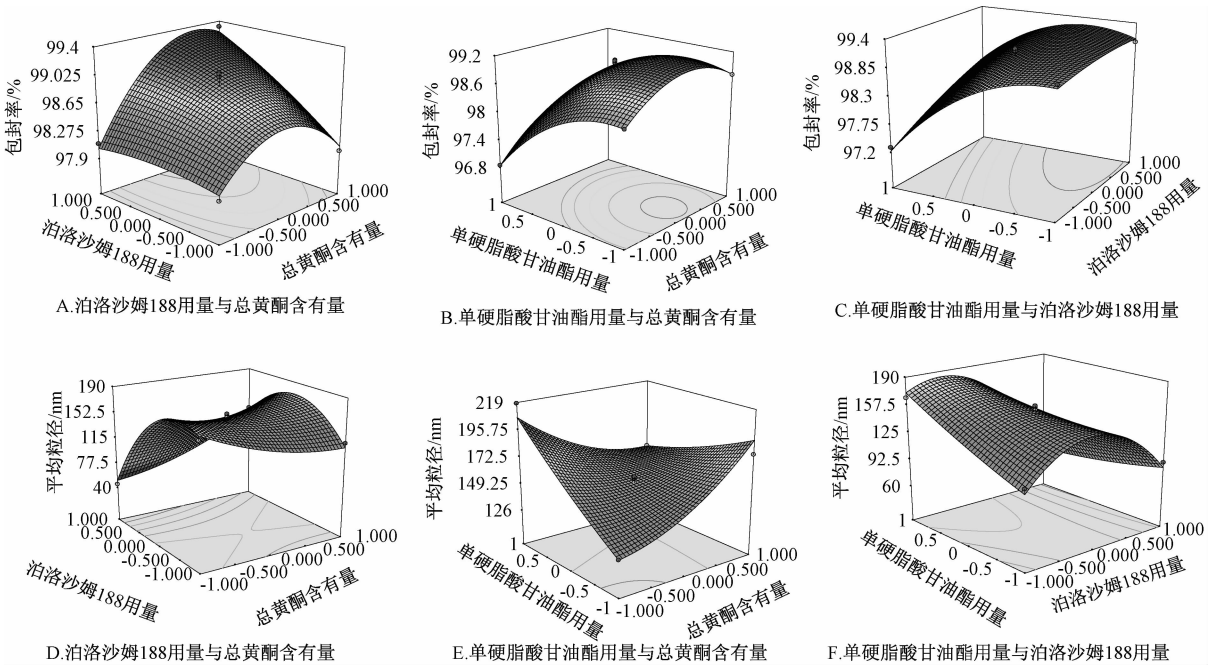


图1 各因素与响应值的效应面图

Fig. 1 Response surface plots of various factors and response values

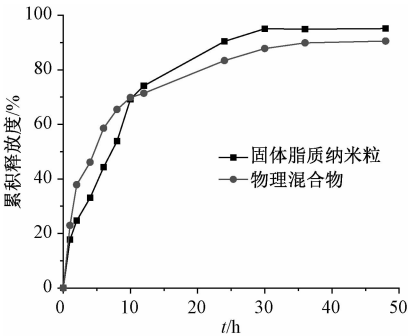


图2 固体脂质纳米粒与物理混合物的体外释放曲线

Fig. 2 *In vitro* release curves of solid lipid nanoparticles and physical mixture

型拟合的相关系数最大。在 Ritger-Peppas 方程 $\ln Q = n \ln t + b$ (n 为释放指数) 中, n 值为该药物的释放机制形式^[13]。根据表 6 各释药方程拟合, 可知固体脂质纳米粒的释放指数 n 为 0.470 6, 介于 0.45 ~ 0.89 之间, 表明其释放机制为药物扩

散和脂质载体材料溶蚀的协同过程; 原料药为 0.337 3, 小于 0.45, 表明其为 Fick's 扩散。

3 讨论

乳化蒸发-低温固化法制备水蜈蚣总黄酮固体脂质纳米粒时, 操作简单, 而且粒子分散度较好。参考文献 [9, 14-15], 预试验过程分别以硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、中链甘油三酸酯 (MCT) 为脂质载体, 发现硬脂酸为载体时粒子稳定性极差, 易形成絮状物; 双硬脂酸甘油酯为载体时粒子之间有黏连, 而且大小不均; MCT 为载体时粒子有肉眼可见的颗粒, 并出现分层现象; 单硬脂酸甘油酯为载体时粒子稳定性较好, 其大小和形态均匀, 故最终选择其作为脂质载体。乳化剂常选用表面活性剂, 可有效降低油相与水相的表面张力, 促进粒子分散, 形成稳定相, 本实验选择吐温 80 和泊洛沙姆 188 作为乳化剂, 发现前者乳化的粒子稳定性不佳, 易聚集; 后者形成的粒子稳定

表 6 体外释放曲线拟合方程

模型	固体脂质纳米粒		物理混合物	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
零级模型	$Q = 0.016\ 6t + 0.356\ 7$	0.767\ 7	$Q = 0.012\ 3t + 0.456\ 2$	0.728\ 0
一级模型	$\ln(1 - Q) = -0.070\ 5t - 0.306\ 4$	0.915\ 6	$\ln(1 - Q) = -0.045\ 1t - 0.557\ 4$	0.918\ 0
Ritger-Peppas 模型	$\ln Q = 0.470\ 6\ln t - 1.658\ 3$	0.955\ 1	$\ln Q = 0.337\ 3\ln t - 1.249\ 4$	0.931\ 4
Weibull 模型	$\ln\ln[1/(1 - Q)] = 0.055\ 9t - 0.917\ 8$	0.777\ 5	$\ln\ln[1/(1 - Q)] = 0.038\ 1t - 0.555\ 6$	0.722\ 7
Hixcon-Crowell 模型	$(100 - Q)^{1/3} = -0.013\ 7t + 0.878\ 5$	0.881\ 2	$(100 - Q)^{1/3} = -0.009\ 5t + 0.821\ 7$	0.866\ 1
Higuchi 模型	$Q = 0.144\ 4t^{1/2} + 0.109\ 5$	0.903\ 9	$Q = 0.108\ 3t^{1/2} + 0.268\ 1$	0.881\ 3

性较好，粒度分散理想。由于泊洛沙姆 188 是分子非离子表面活性剂，故选择其作为乳化剂。测定包封率的常用方法有透析法、膜分离技术（膜滤与超滤）、凝胶柱色谱法、低温超速离心法等，其中透析法耗时费力；膜分离技术操作简便，但材料成本高，而且重复性性差；凝胶柱色谱法测定结果较准确，但操作繁琐，故本实验采用低温超速离心法，其操作简便，测定结果准确，可广泛用于工业大生产，具有一定实用价值。

通过对体外累积释放度进行数学模型拟合，发现水蜈蚣总黄酮固体脂质纳米粒属于 Ritger-Peppas 模型拟合（ $R^2 = 0.955\ 1$ ）。描述圆柱形、薄片形、球形粒子的结构常采用该模型，其中对于球形粒子的释药评价根据 n 值大小，一般可为 3 种情况^[16]：①药物释放遵循 Fick's 扩散定律；②粒子制剂释药包括药物扩散与骨架溶蚀协同过程；③ 粒子制剂释药属于零级释放，其释放速率主要取决于骨架载体材料的溶蚀速率，而本实验结果可推测该药物的释放机制为药物扩散与骨架溶蚀的协同作用。

目前，正交设计和均匀设计常用于制剂工艺处方优化，其试验次数较少，但精度不够，不适合非线性数学模型的拟合^[17]；星点设计-效应面法与 Box-Behnken 效应面法均可在因素与响应值之间建立非线性数学模型拟合，适用于多因素多水平试验设计，预测性较好，精度较高。由于 Box-Behnken 效应面法的试验次数比星点设计-效应面法少，故本实验选用前者对水蜈蚣总黄酮固体脂质纳米粒进行处方优化，其操作简便，具有可行性。

参考文献：

[1] 王亚莉,程 龙. 水蜈蚣颗粒质量标准研究[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(6): 14-15.

[2] 杨艳俊,王亚红,曲小姝,等. 微波辅助提取水蜈蚣总黄酮工艺研究[J]. 吉林化工学院学报, 2012, 29(9): 62-65.

[3] 葛立军,朱振洪,陈蒋丽,等. 响应面法优化水蜈蚣总黄酮的提取及其抗氧化性研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(4): 461-467.

[4] 琚 辉,郝存江,尹 飞. 固体脂质纳米粒制备方法的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1580-1582.

[5] 许海玉,张铁军,赵 平,等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 30-35.

[6] 琚 辉,郝存江,尹 飞,等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征[J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.

[7] 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): 1473-1478.

[8] Zhao X L, Yang C R, Yang K L, *et al.* Preparation and characterization of nanostructured lipid carriers loaded traditional Chinese medicine, zedoary turmeric oil [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36(7): 773-780.

[9] 张 卿,张良珂,袁 佩,等. 和厚朴酚固体脂质纳米粒的制备及性质研究[J]. 中草药, 2011, 42(4): 691-693.

[10] 张小飞,果秋婷,王 芳,等. Box-Behnken 效应面法优化长春西汀固体脂质纳米粒处方[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(13): 1083-1088.

[11] 孙彩霞,尹蓉莉,赵俊霞,等. 水蜈蚣总黄酮固体分散体的制备及其性质研究[J]. 中草药, 2014, 45(14): 2018-2021.

[12] Hao J F, Fang X S, Zhou Y F. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6(1): 683-692.

[13] 陆 彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.

[14] 杨 涛,盛欢欢,程雪梅,等. 星点设计-效应面法优化穿心莲内酯固体脂质纳米粒处方[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(9): 752-755.

[15] 严春临,张 季,刘 敏,等. 星点设计-效应面法优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒处方[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1307-1313.

[16] 郭 涛,刘丛丛,张 琦,等. 星点设计-效应面法优化淫羊藿苷固体脂质纳米粒制备工艺[J]. 解放军药学报, 2012, 28(4): 300-304.

[17] 刘艳杰,项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 455-457.