

异戊酰紫草素脂质体的制备工艺优化及其质量评价

陈卫军², 秦冬梅^{1*}, 孟凌宇³, 高月锋⁴ (1. 石河子大学药学院, 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002; 2. 新疆第二医学院中医学院, 新疆 克拉玛依 834000; 3. 新疆医科大学第七附属医院药学部, 乌鲁木齐 830028; 4. 河南科技大学应用工程学院, 河南 三门峡 472000)

摘要:目的 制备包载异戊酰紫草素的脂质体制剂, 对其制备工艺进行优化, 并研究其理化性质, 为后期药理学研究提供基础。方法 采用薄膜分散法制备异戊酰紫草素脂质体 (IsoSHK-lip), 对异戊酰紫草素进行精密密度、稳定性、回收率的考察并绘制标准曲线, 采用响应面优化法, 以卵磷脂-胆固醇质量比 (A): 卵磷脂-异戊酰紫草素质量比以及 (B): 水和介质体积 (C) 为三个因素, 进行三因素三水平的制备方案优化, 并对最优方案制得的 IsoSHK-lip 进行粒径、多分散系数 (PDI)、Zeta 电位、形态表征以及稳定性考察。结果 响应面优化预测 IsoSHK-lip 最优制备条件为: 卵磷脂-胆固醇质量比为 8.82:1, 卵磷脂-异戊酰紫草素质量比为 30.65:1, 水和介质体积为 29.22 mL。重复制备最优结果的 IsoSHK-lip 得到平均包封率为 90.03%, 粒径均值为 117.48 nm, PDI 均值为 0.246, Zeta 电位均值为 -13.59 mV。并且稳定性实验表明, 4 °C 放置 7 d, IsoSHK-lip 粒径、PDI、Zeta 电位没有明显变化。透射电镜结果表明脂质体为近球形, 粒径在 100~200 nm 之间。结论 IsoSHK-lip 采用响应面法优化得到的最优结果重复制备 3 次后, 得到了近球形、粒径较小、粒径分布均匀、稳定性较好的 IsoSHK-lip, 为后续的药理学研究提供了剂型研究基础。

关键词: 异戊酰紫草素; 脂质体; 薄膜分散法; 响应面优化法; 包封率

doi: 10.11669/cpj.2024.19.008 中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)19-1843-10

Optimization of Preparation Process and Quality Evaluation of Isovaleryl Shikonin Liposomes

CHEN Weijun², QIN Dongmei^{1*}, MENG Lingyu³, GAO Yuefeng⁴ (1. MOE Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Second Medical Collage, Karamay 834000, China; 3. Department of Pharmacy, The Seventh Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumuqi 830028, China; 4. College of Applied Engineering, Henan University of Science and Technology, Sanmenxia 472000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare liposome formulations encapsulating isovaleryl shikonin, to optimise the preparation process. **METHODS** The isovalerylshikonin-liposome (IsoSHK-lip) were prepared by the thin film dispersion method. The UV absorption, standard curve, precision, stability and recovery of IsoSHK-lip were investigated. A response surface optimization method was used to optimize a 3-factor, 3-level preparation scheme with A: lecithin-cholesterol mass ratio, B: lecithin-isovalerylshikonin mass ratio and C: volume of hydrated solvent as the three factors. The particle size, polymer dispersity index (PDI), Zeta potential, morphological characterisation and stability of IsoSHK-lip were also investigated for the optimal solution. **RESULTS** The response surface optimization predicted that the optimal preparation conditions for IsoSHK-lip were: lecithin-cholesterol mass ratio of 8.82:1, lecithin-isovalerylshikonin mass ratio of 30.65:1, and volume of hydrated solvent of 29.22 mL. Repeated preparation of the optimal IsoSHK-lip resulted in an average encapsulation rate of 90.03%, a mean particle size of 117.48 nm, a mean PDI of 0.246, and a mean Zeta potential of -13.59 mV. The stability experiments showed that the particle size, PDI and Zeta potential of IsoSHK-lip did not change significantly after 7 d at 4 °C. Transmission electron microscopy showed that the IsoSHK-lip was subspherical with particle sizes in the range of 100–200 nm. **CONCLUSION** IsoSHK-lip is prepared by repeating the optimal results obtained by response surface methodology three times, resulting in a near spherical shape, smaller particle size, uniform particle size distribution and better stability of IsoSHK-lip, which provides the basis for subsequent pharmacological studies of dosage forms.

KEY WORDS: isovalerylshikonin; liposome; thin film dispersion; response surface optimization; encapsulation efficiency

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (81860730)

作者简介: 陈卫军, 男, 硕士, 副主任药师 研究方向: 中药民族药对代谢性疾病机制及新药研究 * 通讯作者: 秦冬梅, 女, 博士, 教授 研究方向: 中药民族药分离及其药效作用机制研究

新疆紫草[*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.] 又被称为新疆软紫草,是新疆地区的传统中药材。中医药将新疆软紫草用于治疗肿瘤、保肝抗炎、抗病毒及相关症状,并且其治疗病毒性肝炎、抗艾滋病病毒的效果显著^[1-2]。新疆软紫草化学成分主要为脂溶性和水溶性,脂溶性以萘醌类化合物为主,水溶性化合物以酚酸类、黄酮类化合物以及多糖等为主^[3]。大多数萘醌类化合物主要集中在紫草石油醚提取物中(紫草石油醚部位)^[2],据本课题组前期研究表明^[4],异戊酰紫草素(isovalerylshikonin, IsoSHK)为新疆软紫草的主要活性成分,但由于其存在水不溶性,不能缓释,以及生物利用率低等问题,因此,选取合适的药物载体包载异戊酰紫草素可以为后期的药理学研究提供研究基础。脂质体是由磷脂双分子层构成的囊泡,其亲水性头部基团朝向水性环境,脂溶性部分在脂质体内包载脂溶性药物^[5],由于其独特的性质,包括生物相容性和生物降解性,降低包封药物毒性、脂质体膜的生物亲和性导致其可促进药物的吸收以及靶向病变部位及组织,被认为是一种非常先进的药物输送系统^[6]。目前,脂质体作为抗癌药物的载体在临床应用广泛,脂质体在中药制剂的研发领域也越来越受人们关注。虽然脂质体一般被制备成注射剂来使用,但现在口服脂质体类制剂也被广泛研究,若能将中药活性成分与脂质体口服制剂结合到一起,不仅可以提高中药活性成分的稳定性,而且能实现药物靶向性,达到缓释、减毒的效果。

因此,基于课题组前期对于 IsoSHK 药理作用的研究基础^[7],本研究将新疆软紫草主要活性成分 IsoSHK 包载于脂质体内部,并采用响应面优化法对异戊酰紫草素脂质体(isovalerylshikonin-liposome, IsoSHK-lip)的制备方案进行优化,并对 IsoSHK-lip 进行粒径、多分散系数(polymer dispersity index, PDI)、Zeta 电位以及外观形态等表征实验,以期开发一种包载新疆软紫草脂溶性活性成分的制剂并后续开展新疆软紫草脂溶性活性成分的药理作用研究。

1 材料与仪器

1.1 材料

IsoSHK,纯度 $\geq 98\%$,由本课题组前期提取分离制备得到,总量 6.2 g。

1.2 试剂

蛋黄卵磷脂(批号:427D021)、胆固醇(批号:1170035)、磷钨酸负染色液(体积分数 2%)(批号:

20220620)均购自 Solarbio 公司;磷酸盐缓冲液(PBS) pH 值 7.2~7.4(1×)(批号:2021/12,北京博奥拓达科技有限公司);甲醇(批号:20200726)、氯仿(批号:20200726)均购自天津市风船化学试剂科技有限公司;普通碳支持膜(北京中镜科仪技术有限公司)。

1.3 仪器

旋转蒸发器(上海爱朗仪器仪器有限公司,型号:EYELA N-1001);恒温水浴锅(上海爱朗仪器仪器有限公司,型号:EYELA SB-2000);循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司,型号:SHZ-D III);低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司,型号:DLSB-5/20);数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,型号:KQ-500DE);真空干燥仪(上海新苗医疗器械制造有限公司,型号:DZF-6050);电子天平(德国 Sartorius 公司,感量:0.01 mg,型号:BP211D);超纯水机(杭州永洁达净化科技有限公司,型号:UPWS-I-10T);激光粒度 Zeta 电位和绝对分子质量分析仪(英国马尔文仪器有限公司,型号:ZEN3600);紫外可见分光光度计(日本岛津公司,型号:UV-2600 22V CH);超声波细胞破碎仪(美国 Sonics & Materials 公司,型号:VCX130);恒温水浴振荡器(金坛市医疗仪器厂,型号:SHA-C);透射电子显微镜[日本日立公司,型号:HT7800(默认 80 kV)]。

2 实验方法

2.1 IsoSHK-lip 的制备

IsoSHK-lip 由薄膜分散法制备。首先精密称取一定比例蛋黄卵磷脂和胆固醇加入至 50 mL 甲醇和 30 mL 氯仿中溶解,再加入一定质量的 IsoSHK,混匀转入圆底烧瓶中,溶解后在 40 °C 下用旋转蒸发器蒸干成蜂窝状膜,然后加入一定体积 PBS(1×)溶液,40 °C 下使脂质膜旋转水合 1 h 得到 IsoSHK-lip 混悬液,用超声波细胞破碎仪探头在 85% 功率下冰浴超声破碎 7.5 min 3 次,0.45 和 0.22 μm 微孔滤膜过滤各 3 次,再超声 1 次,0.45 和 0.22 μm 微孔滤膜过滤各 3 次,即得 IsoSHK-lip。

2.2 IsoSHK-lip 包封率的测定

脂质体的双分子层结构和细胞形态结构相似,常被报道为理想的药物载体。脂质体的包封率是评价脂质体质量的一个重要指标。

取 IsoSHK-lip 混悬液 3 mL,与 3 mL 甲醇混匀后,经超声波细胞破碎仪超声溶解后静置 10 min,使

其破乳完全,将上述破乳完全溶液转移至离心管中,在4℃条件下12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,以甲醇为空白,记录吸光度A,采用标准曲线计算IsoSHK浓度,进而可得出IsoSHK总含量。

另取3 mL IsoSHK-lip 混悬液于离心管中,在5 500 r·min⁻¹、4℃条件下离心10 min后取下层沉淀,重复操作3次,每次沉淀加2 mL 甲醇溶解,以甲醇为空白,记录吸光度A,采用标准曲线计算IsoSHK浓度,进而计算游离的IsoSHK含量,然后根据公式1计算其包封率。

$$\text{包封率}(\%) = (C_{\text{总}} - C_{\text{游}}) / C_{\text{总}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

公式1中,C_总为IsoSHK总含量,C_游为未包载进脂质体中游离的IsoSHK含量。

2.3 脂质体中 IsoSHK 的测定

2.3.1 检测波长的选择 准确称取 IsoSHK 对照品 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,配制成 IsoSHK 对照品溶液(1 mg·mL⁻¹)。取适量 IsoSHK-lip 混悬液以及空白脂质体(Blank-liposome, Blank-lip)混悬液备用。精密移取 IsoSHK-lip 供试液、Blank-lip 供试液以及 IsoSHK 对照品适量,用甲醇稀释,用紫外分光光度计在 200~800 nm 内扫描,得到 IsoSHK、IsoSHK-lip 以及 Blank-lip 最大吸收峰波长,将上述 3 个波长进行对比观察,判断脂质体材料是否对 IsoSHK 紫外测定存在影响。实验结果见图 1, IsoSHK 与 IsoSHK-lip 在 518.5 nm 波长处有最大吸收峰,而 Blank-lip 在此波长处无吸收。

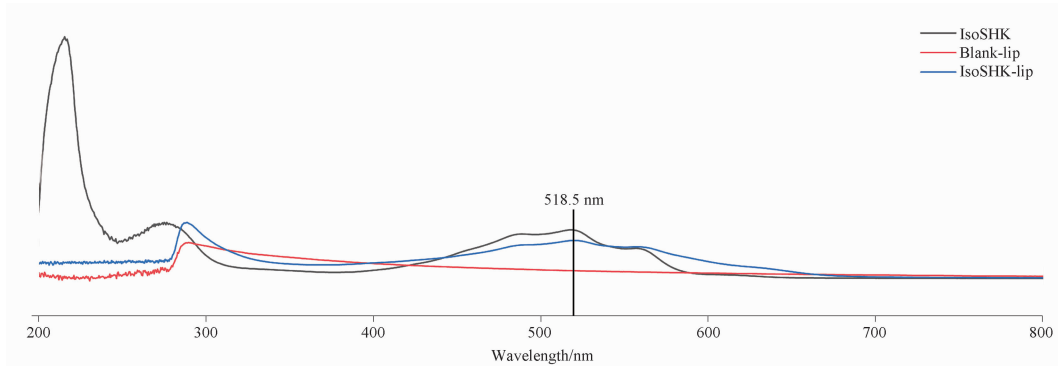


图1 异戊酰紫草素(IsoSHK)、空白脂质体、异戊酰紫草素脂质体(IsoSHK-lip)全波长扫描对比图

Fig. 1 Comparison of full-wavelength scanning of IsoSHK, blank-lip and IsoSHK-lip

2.3.2 IsoSHK 标准曲线的绘制 准确吸取 IsoSHK 对照品溶液(1 mg·mL⁻¹) 2 mL 于 50 mL 量瓶中,加甲醇定容,配制成 IsoSHK 储备液(40 μg·mL⁻¹),于 4℃ 冰箱保存备用。分别吸取 IsoSHK 储备液 2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,配制系列质量浓度为 8、16、24、32、40 μg·mL⁻¹ 对照品供试液,以甲醇为空白对照,在 518.5 nm 处测定吸光度 A,并绘制标准曲线方程。IsoSHK 的标准曲线为: $Y = 0.01571X +$

0.003056, $r^2 = 0.9993$ ($n = 3$),结果表明, IsoSHK 在 8~40 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.3.3 稳定性实验 精密吸取 IsoSHK 对照品供试液(40 μg·mL⁻¹),分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 用紫外分光光度计于 518.5 nm 进行测定,以甲醇为空白,测定并记录吸光度 A,采用标准曲线计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),确定对照品在 12 h 内的稳定性,结果见表 1,表明 IsoSHK 对照品供试液稳定性良好。

表 1 IsoSHK 稳定性检测实验

Tab. 1 Stability assay of isovalerylshikonin

Parameters	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
A	0.673	0.670	0.667	0.668	0.670	0.674	0.669
$\rho/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	42.64	42.45	42.26	42.33	42.43	42.71	42.39
$\rho(\text{Mean})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	42.46						
RSD/%	0.38						

2.3.4 精密度实验 精密吸取 IsoSHK 对照品供试液(8 μg·mL⁻¹),以甲醇为空白,用紫外分光光度计重

复测定 6 次,记录吸光度 A,采用标准曲线计算 RSD,结果见表 2,表明 IsoSHK 对照品供试液精密度良好。

表 2 IsoSHK 精密度检测实验

Tab. 2 Precision assay of isovalerylshikonin

Parameters	1	2	3	4	5	6
A	0.134	0.135	0.136	0.137	0.135	0.138
$\rho/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.34	8.40	8.46	8.53	8.38	8.59
$\rho(\text{Mean})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.45					
RSD/%	1.14					

2.3.5 回收率实验 精密称取 9 份已知浓度对照品供试液($24\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 2 mL, 每 3 份为一组, 第一组中加 2 mL $24\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ IsoSHK 对照品溶液, 第二组中加 2 mL $32\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ IsoSHK 对照品溶液, 第三组中加

入 2 mL $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ IsoSHK 对照品溶液, 以甲醇为空白, 测定并记录吸光度 A, 采用标准曲线计算标品回收率及其 RSD, 实验结果见表 3, 结果表明, 该标准曲线以及紫外测定 IsoSHK 含量的实验方法切实可行。

表 3 IsoSHK 回收率检测实验

Tab. 3 Recovery assay for isovalerylshikonin

Sample No.	$m(\text{IsoSHK})/\mu\text{g}$	$m(\text{Added})/\mu\text{g}$	Abs	$\rho/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Measured quantity})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Recovery/%	Mean recovery/%	RSD/%
1	48	48	0.393	24.82	99.29	106.84	108.40	1.70
2	48	48	0.395	24.95	99.79	107.91		
3	48	48	0.404	25.52	102.09	112.68		
4	48	64	0.463	29.28	117.11	107.98		
5	48	64	0.461	29.15	116.60	107.19		
6	48	64	0.467	29.53	118.13	109.57		
7	48	80	0.528	33.41	133.66	107.07		
8	48	80	0.529	33.48	133.91	107.39		
9	48	80	0.534	33.80	135.19	108.98		

2.4 单因素实验考察

通过对比分析大量文献可知, 脂胆比、药脂比、超声时间、水合介质类型及用量都对脂质体包封率有影响, 基于单因素实验, 本实验考察卵磷脂-胆固醇 (lecithin-cholesterol, EPC-Chol) 质量比 (A)、卵磷脂-异戊酰紫草素 (lecithin-isovalerylshikonin, EPC-IsoSHK) 质量比 (B)、水合介质 (hydrated solvent, HS) 体积 (C) 3 个不同因素对包封率的影响。

2.4.1 不同 EPC-Chol 质量比单因素实验 精密称取 90 mg EPC 和不同质量 Chol (10、13、18、30、90 mg) 加入至 50 mL 甲醇和 30 mL 氯仿中溶解, 随后置于圆底烧瓶中, 最后加入 3 mg IsoSHK, 如“2.1”所述制备 IsoSHK-lip, 再按照“2.2”项下方法测量并计算其包封率 (%)。

2.4.2 不同 EPC-IsoSHK 质量比单因素实验 精密称取 90 mg EPC 和 10 mg Chol 加入至 50 mL 甲醇和 30 mL 氯仿中溶解, 随后置于圆底烧瓶中, 最后将不同质量 IsoSHK 样品 (1、3、5、7、9 mg) 加入至圆底烧瓶, 按“2.1”项下所述制备 IsoSHK-lip, 再按照“2.2”项下方法测量并计算其

包封率 (%)。

2.4.3 不同 HS 体积单因素实验 精密称取 90 mg EPC 和 10 mg Chol 至 50 mL 甲醇和 30 mL 氯仿中溶解, 随后加入圆底烧瓶中, 最后再加入 3 mg IsoSHK, 旋蒸成膜后加入不同体积的 HS (10、20、30、40、50 mL), 按“2.1”项下所述制备 IsoSHK-lip, 再按照“2.2”项下方法测量并计算其包封率 (%)。

2.5 Box-Behnken 响应面法优化 IsoSHK-lip 制备工艺及验证实验

以单因素实验结果为依据, 利用 Design Expert 13.0 软件设计了三因素三水平的响应面法实验, 以 EPC-Chol 质量比 (A)、EPC-IsoSHK 质量比 (B)、HS 体积 (C) 为主要考察因素, 分别用 A、B、C 来表示, 以 -1、0、1 表示自变量低、中、高 3 个水平, 以 IsoSHK-lip 的包封率 (%) 为响应值, 共有 17 个实验点, 响应面设计实验因素水平和编码表见表 4。

由 Box-Behnken 实验设计优化得到的最优 IsoSHK-lip 制备条件进行重复 3 次, 验证软件分析所得条件的可靠性。

表4 响应曲面设计实验因素水平和编码

Tab. 4 Response surface design experimental factor level and coding

Factors	Levels		
	-1	0	1
Lecithin-cholesterol mass ratio(A)	8:1	9:1	10:1
Lecithin-isovalerylshikon in mass ratio(B)	3:80	3:90	3:100
Volume of hydrated solvent/mL(C)	20	30	40

2.6 IsoSHK-lip 平均粒径、PDI、Zeta 电位的测定以及外观形态观察

取适量的 IsoSHK-lip 用 PBS 稀释后,用激光粒度 Zeta 电位和绝对分子量分析仪测定平均粒径、PDI、Zeta 电位,重复测定 3 次,求平均值。

在室温条件下, IsoSHK-lip 采用负染法染色。取 20 μL IsoSHK-lip 混悬液于封口膜上,将碳支持膜正面放于 IsoSHK-lip 混悬液滴上,吸附脂质体混悬液 5 min,之后将碳支持膜倒扣在滤纸上 2 min 吸干多余液体,稍干燥后在封口膜上滴加 20 μL 磷钨酸负染色液(2%),将碳支持膜正面扣在负染色液滴上,静置 2 min 后,将碳支持膜倒扣在滤纸上 2 min 吸干多余液体,放入 1.5 mL EP 管内保存,于透射电镜下观察并拍照。

2.7 IsoSHK-lip 稳定性研究

将 IsoSHK-lip 封装于西林瓶中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行保存,一周后取出,观察脂质体有无沉降,测定 IsoSHK-lip 粒径大小, PDI、Zeta 电位,判断其稳定性。

2.8 数据处理与分析

“2.3.2”项下部分实验数据采用 GraphPad Prism 9 软件进行处理和分析,其他部分实验数据采用 Origin 2018 以及 Excel 2019 软件进行分析处理。

3 结果

3.1 单因素实验对 IsoSHK-lip 包封率的影响

3.1.1 不同 EPC-Chol 质量比对 IsoSHK-lip 包封率的影响 如图 2 所示,当选取 EPC-Chol 质量比分别为 1:1、3:1、5:1、7:1、9:1 制备脂质体时, IsoSHK-lip 的包封率分别为 81.29%、84.68%、88.05%、91.95%、93.79%。实验结果表明,当 EPC-Chol 质量比为 9:1 时制备的脂质体包封率最大,综上所述,本实验选取 EPC-Chol 质量比为 9:1 进行下一步单因素实验。

3.1.2 不同 IsoSHK-EPC 质量比对 IsoSHK-lip 包封率的影响 如图 3 所示,选取 IsoSHK-EPC 的比例

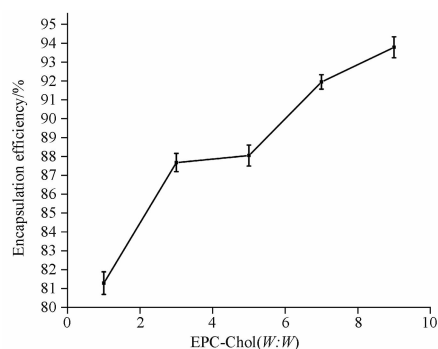


图2 卵磷脂-胆固醇(EPC-Chol)质量比对 IsoSHK-lip 包封率的影响。n=3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 2 Effects of lecithin-cholesterol mass ratio on the encapsulation efficiency. n=3, $\bar{x} \pm s$

为 1:90、1:30、1:18、7:90、1:9 制备脂质体时, IsoSHK-lip 的包封率分别为 87.15%、92.65%、82.71%、64.29%、66.00%。实验结果表明,当 IsoSHK-EPC 质量比为 1:30 时制备的脂质体包封率最大,综上所述,本实验选取 IsoSHK-EPC 质量比为 1:30 进行下一步单因素实验。

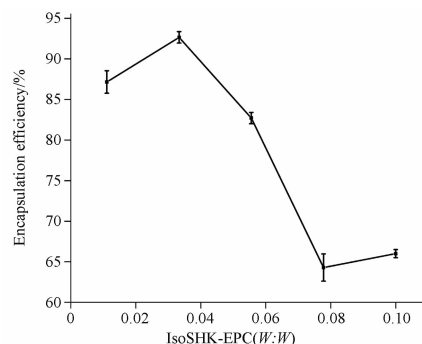


图3 异戊酰紫草素-卵磷脂(IsoSHK-EPC)质量比对 IsoSHK-lip 包封率的影响。n=3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effects of isovalerylshikon lecithin mass ratio on the encapsulation efficiency of IsoSHK-lip. n=3, $\bar{x} \pm s$

3.1.3 不同 HS 体积对 IsoSHK-lip 包封率的影响

如图 4 所示,选取水合介质 PBS 体积为 10、20、30、40、50 mL 制备脂质体时, IsoSHK-lip 的包封率分别为 84.39%、88.10%、92.65%、91.48%、83.04%。实验结果表明,当水合介质 PBS 体积为 30 mL 时制备的脂质体包封率最大。综上所述,本实验选取水合介质体积 30 mL 进行下一步实验。

3.2 响应面法优化 IsoSHK-lip 制备工艺及验证实验

3.2.1 响应面实验结果 根据单因素实验结果,选取 EPC-Chol 质量比 9:1 (A)、EPC-IsoSHK 质量比

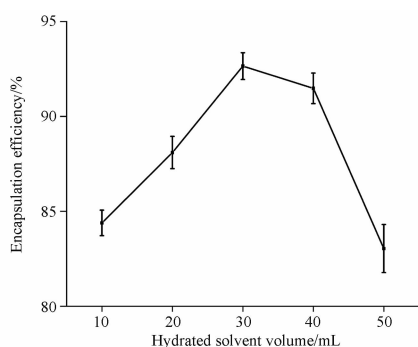


图4 水合溶剂体积对 IsoSHK-lip 包封率的影响。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 Effects of the volume of hydrated solvent on the encapsulation efficiency of IsoSHK-lip. n = 3, $\bar{x} \pm s$

30:1 (B)、HS 体积为 30 mL (C) 设计响应面实验因素水平和编码,如表 4 所示,采用三因素三水平,选

取了 Box-Behnken 响应面设计的主要优化因素水平进行分析,Box-Behnken 实验设计方案及实验结果见表 5。通过 Design Expert 13.0 软件分析,得到 EPC-Chol 质量比 (A)、EPC-IsoSHK 质量比 (B)、HS 体积 (C) 与包封率 (Y, %) 的响应面二次模型回归和方差分析表,见表 6。

该模型的 P 值 < 0.000 1 (P < 0.01) (表 6), F 值为 30.53, 差异是极显著的, 这表明该模型具有统计学意义, 并且该模型失拟 P 值为 0.430 9 (P > 0.05), F 值为 1.15, 说明该模型失拟值不具有显著性, 表明该回归模型具有很好的拟合效果, 符合实验要求, 可用该模型对实验结果进行统计分析, 其中编码因素 AB、A²、B²、C² 差异极显著, 编码因素 B 差异显著, 编码因素 A、C、AC、BC 的影响并不明显。

表 5 Box-Behnken 实验设计方案及实验结果

Tab. 5 Box-Behnken experimental design scheme and experimental results

No.	Factors			Encapsulation efficiency (Y) / %	Particle size / nm	PDI index	Zeta potential / mV
	EPC-Chol mass ratio (A)	IsoSHK-EPC mass ratio (B)	Volume of hydrated solvent (C) / mL				
1	9:1	80:3	40	81.99	113.7	0.220	-12.63
2	9:1	80:3	20	83.85	113.8	0.246	-12.33
3	10:1	80:3	30	84.06	112.2	0.238	-11.74
4	8:1	100:3	30	87.69	113.4	0.225	-11.28
5	9:1	30:1	30	89.22	115.9	0.236	-11.85
6	9:1	30:1	30	89.03	118.6	0.237	-12.14
7	9:1	100:3	20	84.04	113.4	0.229	-12.24
8	10:1	30:1	20	84.36	114.8	0.235	-12.65
9	9:1	30:1	30	88.91	115.3	0.225	-12.74
10	10:1	100:3	30	81.23	124.6	0.267	-12.66
11	10:1	30:1	40	82.66	111.4	0.237	-13.00
12	9:1	30:1	30	90.04	113.4	0.229	-11.96
13	9:1	100:3	40	84.95	113.4	0.231	-12.32
14	9:1	30:1	30	90.60	115.1	0.229	-11.28
15	8:1	30:1	40	83.06	117.5	0.240	-12.36
16	8:1	30:1	20	84.98	107.9	0.241	-12.08
17	8:1	80:3	30	81.35	115.5	0.231	-11.86

该模型关于包封率 (Y, %) 与 EPC-Chol 质量比 (A)、EPC-IsoSHK 质量比 (B) 以及 HS 体积 (C) 的二次多项回归方程如下: $Y = 89.56 - 0.596 3A + 0.832 5B - 0.571 3C - 2.29AB + 0.055 0AC + 0.692 5BC - 2.96A^2 - 3.02B^2 - 2.84C^2$ ($r^2 = 0.975 2$), 该模型的信噪比高 (14.727 2), 即可用于预测, 方程的决定系数 $r^2 = 0.975 2 > 0.95$, 表明实测值与预测值间有高度的相关性, 能准确地预测试剂情况, Adjusted $r^2 = 0.943 2$, 表明模型响应值的变化有 94.32% 来源于所选自变量, 该实验误差较小, 上

述拟合相关评估指标均符合实验要求, 表明该回归方程比较符合实际操作情况, 自变量与包封率之间的线性关系显著, 可以用此模型对 IsoSHK-lip 的包封率进行分析预测。本模型中 3 个因素对包封率的影响大小顺序为: EPC-IsoSHK 质量比 (B) > EPC-Chol 质量比 (A) > HS 体积 (C)。

3.2.2 三因素对于 IsoSHK-lip 包封率的交互作用

现就 EPC-Chol 质量比 (A)、EPC-IsoSHK 质量比 (B)、HS 体积 (C) 三因素对 IsoSHK-lip 包封率的交互作用进行响应面可视化分析。

表6 响应面二次模型回归和方差分析表

Tab. 6 Response surface quadratic model regression and analysis of variance

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F	P
Model	155.84	9	17.32	30.53	<0.000 1 ²⁾
A	2.84	1	2.84	5.01	0.060 1
B	5.54	1	5.54	9.78	0.016 7 ¹⁾
C	2.61	1	2.61	4.60	0.069 1
AB	21.02	1	21.02	37.07	0.000 5 ²⁾
AC	0.01	1	0.01	0.02	0.888 0
BC	1.92	1	1.92	3.38	0.108 5
A ²	36.89	1	36.89	65.05	<0.000 1 ²⁾
B ²	38.34	1	38.34	67.60	<0.000 1 ²⁾
C ²	33.84	1	33.84	59.67	0.000 1 ²⁾
Residual	3.97	7	0.57		
Lack of fit	1.84	3	0.61	1.15	0.430 9
Pure error	2.13	4	0.53		
Cor total	159.81	16			

注:与模型组比,¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$, vs model group.

如图5所示,等高线呈现明显的椭圆形,并且3D曲面图呈现凸起状态,随着EPC-Chol质量比(A)和EPC-IsoSHK质量比(B)的增大,脂质体的包

封率先变大后变小,如表5所示,AB的P值为0.000 5($P < 0.01$),表明EPC-Chol质量比(A)和EPC-IsoSHK质量比(B)对IsoSHK-lip包封率的交互作用极显著,当IsoSHK-lip包封率在A-B为8.82:1时存在极大值,这是因为胆固醇可增加脂质体膜中双分子排列的紧密程度,起到稳定脂质体的作用,随着胆固醇的相对用量减少,在相同质量的脂质中,脂质体膜的刚性降低,总表面积增大,所包裹的药物增加,包封率增加,但随着磷脂的用量进一步增大,脂质双分子膜不对称型和通透性增大,药物渗漏较多,导致包封率下降。

如图6所示,等高线未呈现明显椭圆形,但3D曲面图呈现凸起状态,如表5所示,AC的P值为0.888 0($P > 0.05$),表明EPC-Chol质量比(A)和HS体积(C)对IsoSHK-lip包封率的交互作用并不显著。

如图7所示,等高线未呈现明显椭圆形,但3D曲面图呈现凸起状态;如表5所示,BC的P值为0.108 5($P > 0.05$),表明EPC-IsoSHK质量比(B)和HS体积(C)对IsoSHK-lip包封率的交互作用并不显著。

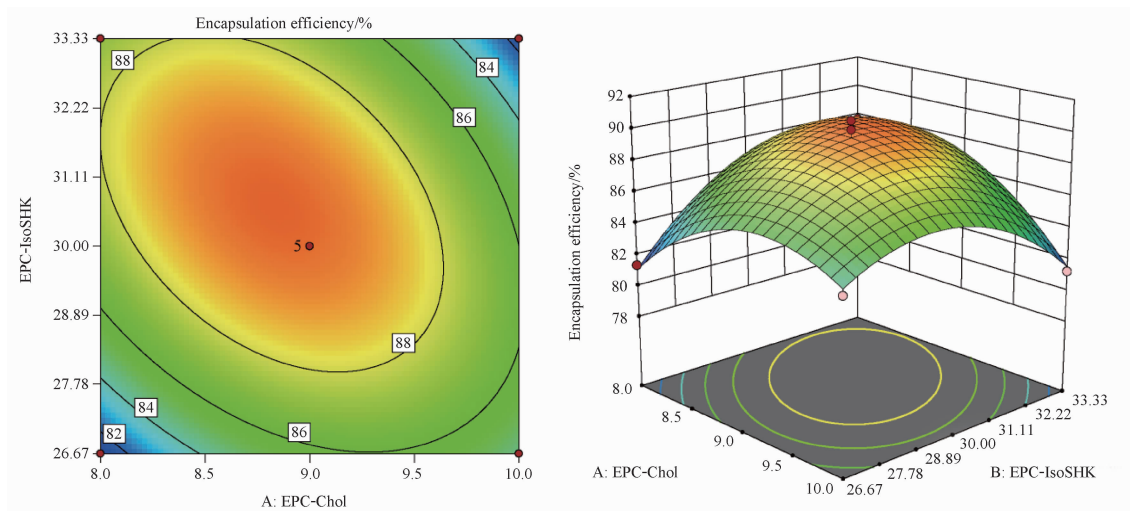


图5 EPC-Chol质量比(A)与EPC-IsoSHK质量比(B)对IsoSHK-lip包封率(Y)的等高线图和三维效应面图

Fig. 5 Contour map and 3D surface map of the effect of A and B on the encapsulation efficiency ratio (Y) of IsoSHK-lip

3.2.3 最优结果验证实验 通过Design Expert 13.0软件中的Numerical优化模块预测IsoSHK-lip最优制备条件为: EPC-Chol质量比为8.82:1, EPC-IsoSHK质量比为30.65:1, HS体积为29.22 mL。按比例换算,应称量EPC:90 mg, Chol:10.20 mg, IsoSHK:2.94 mg。按最优制备条件制备IsoSHK-lip,测得IsoSHK-lip的3次包封率为:

90.06%、90.26%、89.75%,平均包封率为90.03%,包封率预测值为89.72%,指标的实测值与预测值RSD为0.24%,表明该模型预测的可靠性、可信度高,该工艺稳定可行。

3.3 IsoSHK-lip稳定性研究

采用激光粒度Zeta电位和绝对分子量分析仪测定最优制备工艺重复3次制备的IsoSHK-lip的

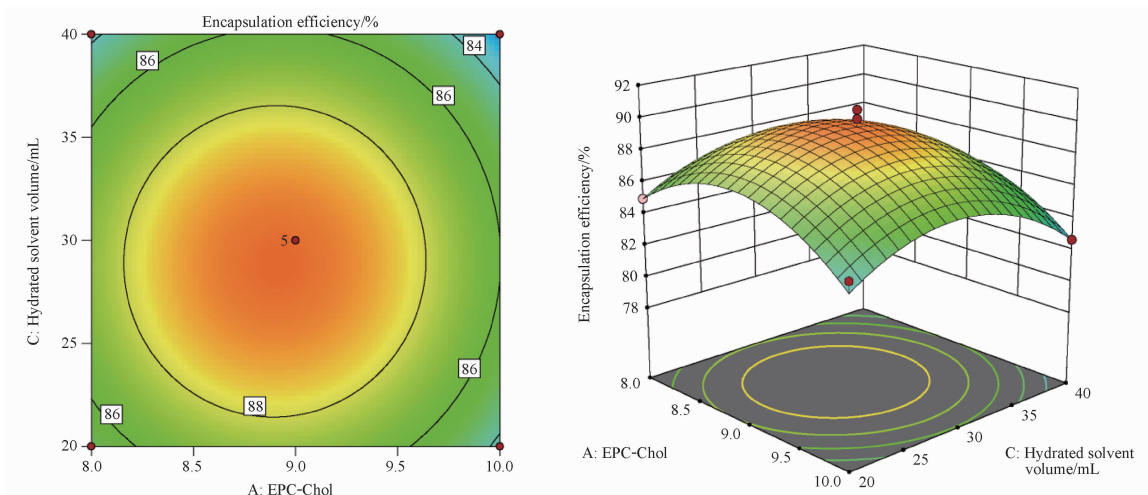


图6 EPC-Chol 质量比(A)与HS 体积(C)对 IsoSHK-lip 包封率(Y)的等高线图和三维效应面图

Fig. 6 Contour map and 3D surface map of the effect of A and C on the encapsulation efficiency ratio (Y) of IsoSHK-lip

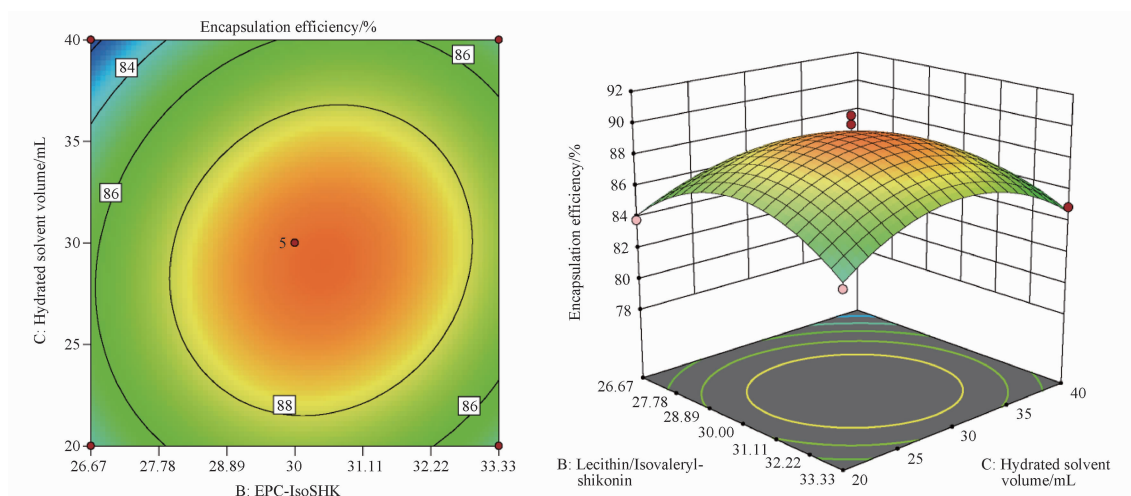


图7 EPC-IsoSHK 质量比(B)与HS 体积(C)对 IsoSHK-lip 包封率(Y)的等高线图和三维效应面图

Fig. 7 Contour map and 3D surface map of the effect of B and C on the encapsulation efficiency ratio (Y) of IsoSHK-lip

粒径、Zeta 电位、PDI, 留样一周后再次测定 IsoSHK-lip 的粒径、Zeta 电位、PDI。如表 7 所示, 不同批次的 IsoSHK-lip 的粒径基本稳定于 117.48 nm 左右, PDI 均值为 0.246, Zeta 电位均值为 -13.59 mV。由表 7 可看出, 3 批不同的 IsoSHK-lip 均具有相近的包封率, 且稳定于 90% 左右, 粒径和 PDI 较小。在 4 °C 放置 7 d 后, 不同批次 IsoSHK-lip 的粒径、PDI 以及 Zeta 电位变化较小, 较为稳定, 表明 IsoSHK-lip 在 4 °C 放置 7 d 后稳定性良好。

3.4 IsoSHK-lip 的外观形态

IsoSHK-lip 透射电镜观察结果见图 8。图 8A 为透射电镜观察 IsoSHK-lip 整体形态图, 制备的 IsoSHK-lip 大多数为近圆形的不规则形状, 部分呈圆形或椭圆形, 粒子大小并不均一, 部分粒子间存在

聚集的现象, 可能是由于过滤时存在一定的问题, 未使用脂质体挤出器进行过滤挤压, 所以制备工艺中的过滤挤出有待加强, 也有可能是因为透射电镜样品制样时存在问题, 该问题需在后续研究中进行多方面的考察。

图 8B 为透射电镜观察 IsoSHK-lip 内部结构图, 制备的 IsoSHK-lip 内部结构为微型泡囊体, 并且箭头指向的脂质体为多室结构, 该图表明脂质体制备成功, 并且内部将 IsoSHK 包裹, 结构为多室脂质体。

4 讨论

由于新疆软紫草具有抗炎、抗肿瘤、抗菌等多种药理活性^[2,8], 在制剂领域的开发与研究是近年来热门的课题之一, 各种新疆软紫草的制剂研究在

表7 不同批次 IsoSHK-lip 7 d 内 4 °C 放置稳定性结果汇总表

Tab.7 Summary of stability results of different batches of IsoSHK-lip at 4 °C in 7 d

No.	Stable at 4 °C in 7 d			
	Sampling time/d	Particle size/nm	PDI index	Zeta potential /mV
1	0	117.6	0.247	-13.6
		118.7	0.234	-13.2
		117.5	0.251	-13.9
	7	118.7	0.242	-13.1
		117.3	0.248	-13.0
		117.9	0.248	-13.6
2	0	116.7	0.238	-13.9
		117.6	0.255	-13.9
		117.9	0.250	-13.3
	7	117.9	0.249	-13.2
		117.5	0.260	-13.0
		118.6	0.252	-13.6
3	0	116.8	0.234	-13.6
		116.5	0.257	-13.7
		118.0	0.249	-13.2
	7	117.9	0.238	-12.9
		117.5	0.242	-13.3
		117.2	0.254	-13.2

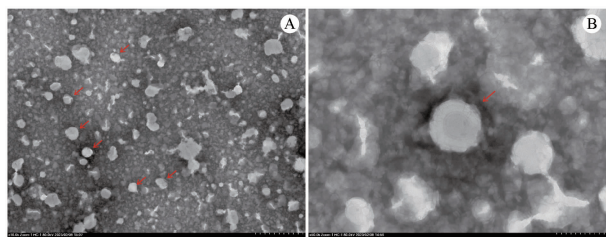


图8 IsoSHK-lip 透射电镜图
A - IsoSHK-lip 形态图(×10 000); B - IsoSHK-lip 内部结构图(×50 000)。
A - IsoSHK-lip morphology diagram(×10 000); B - IsoSHK-lip internal structure diagram(×50 000).

图8 IsoSHK-lip 透射电镜图

Fig.8 Electron photomicrograph of IsoSHK-lip

临床上已经开始得到认可,主要包括油剂、栓剂、膏剂等治疗烧、烫伤的外用制剂等,现紫草剂型以复方制剂较为多见^[9]。由于紫草素及其衍生物的低水溶性,水中分散性差,常常被制备成乳剂、膏剂、以及纳米制剂等。近几年也发现紫草素使用微囊包载后进行药理学研究^[10]。本实验将紫草素衍生物 IsoSHK 制备成脂质体,解决了 IsoSHK 的低水溶性这一缺点,有望提高 IsoSHK 的生物利用度。

脂质体制备方法的选择对于脂质体的粒径、结构会产生很大的影响,制备方法的选择一般会

根据药物的性质以及用药目的来决定。Su 等^[11]采用乙醇注入法制备紫草素提取物脂质体以及碱化紫草素脂质体,其制备的脂质体放置长时间会发生凝聚、溶胀或者聚集的现象,并且存在渗漏的现象,稳定性较差。所以本研究采用薄膜分散法制备异戊酰紫草素脂质体,此种制备方法可获得多室脂质体,经超声处理后得到单室脂质体,显著提高脂溶性药物的溶解度,增加药物的靶向性和生物利用度,并且能够减少用药次数和给药剂量,提高疗效,并减少药物残留^[12]。可通过脂质体挤出器过滤以及超声破碎等方法减小脂质体的粒径。

作为一种新型制剂,脂质体要想在临床上发挥出更好的疗效,首先需要有更高的包封率。因此,包封率不仅是脂质体制备工艺的重要的评价指标之一^[13],而且也是区别于普通制剂发挥靶向、低毒性、缓释等特点的关键点^[14]。本实验采用天然磷脂——蛋黄卵磷脂作为脂质体的制备材料,并且在制备过程中加入一定量的胆固醇,能加强 IsoSHK-lip 的稳定性,减少脂质体团聚,降低药物渗漏。

在脂质体制备过程中水合溶剂的选择也是一个很重要的因素,选择合适的水合溶剂会直接影响脂质体的包封率,本研究以脂质体的包封率为因变量,选取了 A: EPC-Chol 质量比、B: EPC-IsoSHK 质量比以及 C: HS 体积作为实验的 3 个因素,采用响应面法对 IsoSHK-lip 的制备方法进行优化,最后确定最佳的制备工艺条件为: EPC-Chol 质量比为 8.82:1, EPC-IsoSHK 质量比为 30.65:1, HS 体积为 29.22 mL。按照上述最优比例重复制备 3 次脂质体得到的包封率均值为 90.03%。以此方法制备的 IsoSHK-lip 粒径稳定在 116 ~ 118 nm, Zeta 电位为 -13 ~ -14 mV 左右, PDI 为 0.23 ~ 0.25, 实验结果表明 IsoSHK-lip 的粒径较小, PDI 指数较低, 并且 IsoSHK-lip 的包封率达到 90% 以上, 表明该脂质体分散性良好, 包封率较优。

综上所述,本研究先对异戊酰紫草素的检测波长、稳定性、精密度以及回收率进行考察,并对异戊酰紫草素脂质体、空白脂质体、异戊酰紫草素的全波长扫描进行检测,表明异戊酰紫草素在 518.5 nm 处有紫外吸收,并且脂质体材料对异戊酰紫草素的紫外吸收无影响,之后采用响应面优化法对 IsoSHK-lip 的制备方法进行优化,对优化后的制备工艺进行重复验证,并对 IsoSHK-lip 的粒径、PDI、Zeta 电位以及

外观形态进行表征,本研究优化后的 IsoSHK-lip 制备工艺为后续课题组新疆软紫草的药理作用研究提供了一定的研究基础。

REFERENCES

- [1] XU J Y, WU S, LI Y H, *et al.* Research progress on the antiviral effects of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. and its active ingredients [J]. *Chin Med Biotechnol* (中国医药生物技术), 2019, 14(6): 549-552,499.
- [2] KUMAR A, SHASHNI S, KUMAR P, *et al.* Phytochemical constituents, distributions and traditional usages of *Arnebia euchroma*: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 1-16.
- [3] LIAO M, ZHANG S Y. Chemical Constituents from the Roots of *Arnebia euchroma* [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2020, 43(11): 2701-2706.
- [4] QIN D, YAO J, MENG L, *et al.* Effects of extracts from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst on apoptosis of HepG2 and its anti-hepatocellular carcinoma in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2023, 39(7): 1312-1319.
- [5] PATNI B S, CHUPIN V V, TORCHILIN V P. New developments in liposomal drug delivery [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 10938-10966.
- [6] HE H, LU Y, QI J, *et al.* Adapting liposomes for oral drug delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*(药学学报 英文), 2019, 9(1): 36-48.
- [7] DU M, LV B, MENG L, *et al.* Mechanism of *Arnebia euchroma* against hepatocarcinoma based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2022, 28(24): 75-86.
- [8] WANG Y, ZHU Y, XIAO L, *et al.* Meroterpenoids isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. and their cytotoxic activity in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Fitoterapia*, 2018, 131: 236-244.
- [9] LI C, CHANG K, YANG J, *et al.* Research progress of the anti-inflammatory effects of Radix *Arnebiae* and its preparations [J]. *World Chin Med*(世界中医药), 2018, 13(6): 1363-1367.
- [10] LOU C, CHANG C, WU Z, *et al.* The optimal extracting process, manufacturing technique and biological evaluation of *Lithospermum erythrorhizon* microcapsules [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 48: 165-171.
- [11] SU M Y, CHEN J J, ZHENG W Z. Preparation and properties of shikonin liposome gel [J]. *Chem Enterp Manag*(化工管理), 2018, (19): 41-42.
- [12] WU Z Y, WANG T T, SONG Y H, *et al.* Optimization on conditions of podophyllotoxin-loaded liposomes using response surface methodology and its activity on PC3 cells [J]. *J Liposome Res*, 2019, 29(2): 133-141.
- [13] LIU L Y, ZHANG R, ZHANG S Q, *et al.* Determination of encapsulation efficiency of insulin nanoparticles by minicolumn centrifugation-HPLC method [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2022, 57(3): 214-219.
- [14] XI N, WANG Y H, WANG L S, *et al.* Preparation of mitochondrial targeting curcumin TPP-PEG-PLGA liposomes and study on promoting hepatoma cell apoptosis [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2022, 57(17): 1438-1446.

(收稿日期:2023-04-10)