

# 甘露糖修饰的千金藤素聚合物胶束的制备及表征

陈怡莹<sup>1,2,3</sup>, 周益<sup>1,2,3</sup>, 罗丽琴<sup>1,2,3</sup>, 姜婕<sup>1,2,3</sup>, 程炳铎<sup>1,2,3</sup>, 李元增<sup>1,2,3</sup>, 程欣<sup>1,2,3</sup>, 马云淑<sup>1,2,3,4\*</sup> (1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 昆明 650500; 3. 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 昆明 650500; 4. 云南省南药可持续利用重点实验室, 昆明 650500)

**摘要:**目的 制备千金藤素(cepharanthine, CEP)聚合物胶束, 并对其进行表征。方法 采用溶剂挥发法制备 CEP 聚合物胶束, 在单因素考察的基础上, 以包封率和载药量为指标, Box-Behnken 响应面法进行制备工艺优化, 并对其胶束的粒径分布、电位、体外释放等方面进行表征。结果 CEP 聚合物胶束的最佳工艺为: 取甘露糖-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(MA-PEG-PLGA) 50 mg, CEP 17.82 mg, 溶解于 0.25 mL 丙酮中, 逐滴加入 14 mL 的 PBS 溶液中, 温度为 60 °C, 以 1 000 r·min<sup>-1</sup> 的转速在磁力搅拌器上搅拌 4 h, 即得澄清的 CEP 聚合物胶束。优选得到的 CEP 聚合物胶束呈球形, 平均粒径为 (111.37 ± 3.51) nm、多分散系数(PDI)为 (0.21 ± 0.01)、Zeta 电位(-9.78 ± 2.15) mV; 体外释放结果显示, CEP 原料药在 10 h 内快速释放, 其胶束在 72 h 内分别释放 (79.99 ± 4.96)% 和 (71.66 ± 2.62)%, 说明制成胶束后, CEP 能实现缓释释放。冻干剂考察结果发现, 0.5% 的泊洛沙姆 188 冻干后复溶后粒径变化最小; 溶血试验结果显示, 将 CEP 制成胶束后, 溶血率明显降低。结论 本研究的优选处方及工艺可以用于 CEP-MA-PEG-PLGA 聚合物胶束的制备, 为后续 CEP 靶向制剂的研发奠定基础。

**关键词:** 千金藤素; 聚合物胶束; 甘露糖; Box-Behnken 响应面法; 冻干粉

doi: 10.11669/cpj.2024.19.007 中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)19-1834-09

## Preparation and Characterization of Mannose-Modified Cepharanthine Polymer Micelles

CHEN Yiyang<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Yi<sup>1,2,3</sup>, LUO Liqin<sup>1,2,3</sup>, JIANG Jie<sup>1,2,3</sup>, CHENG Bingduo<sup>1,2,3</sup>, LI Yuanzeng<sup>1,2,3</sup>, CHENG Xin<sup>1,2,3</sup>, MA Yunshu<sup>1,2,3,4\*</sup> (1. College of Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Yunnan Province University External Drug Delivery System and Preparation Technology Research Key Laboratory, Kunming 650500, China; 3. Yunnan Province Dai Medicine and Yi Medicine Primary Laboratory, Kunming 650500, China; 4. Yunnan Province Nanyao Sustainable Utilization Primary Laboratory, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare cepharanthine (CEP) polymer micelles and characterize them. **METHODS** The CEP polymer micelles were prepared by solvent evaporation method. Based on the single factor investigation, the preparation process was optimized by Box-Behnken response surface method with the entrapment efficiency and drug loading as indicators, and the particle size distribution, potential and *in vitro* release of the micelles were characterized. **RESULTS** The optimum process of CEP polymer micelle was as follows: 50 mg of MA-PEG-PLGA and 17.82 mg of CEP were dissolved in 0.25 mL of acetone, added dropwise into 14 mL of PBS solution at 60 °C and stirred on a magnetic stirrer at a speed of 1 000 r·min<sup>-1</sup> for 4 hours to obtain a clear CEP polymer micelle. The optimized CEP polymer micelles are spherical, with an average particle size of (111.37 ± 3.51) nm, a PDI of (0.21 ± 0.01) and a Zeta potential of (-9.78 ± 2.15) mV. *In vitro* release results showed that CEP was released rapidly within 10 h, and its micelles released (79.99 ± 4.96)% and (71.66 ± 2.62)% respectively within 72 h, indicating that CEP could be released slowly after being made into micelles. The results of freeze-drying agent investigation showed that 0.5% poloxamer 188 had the smallest change in complex particle size after freeze-drying. The results of hemolysis test showed that the hemolysis rate was obviously reduced after CEP was made into micelles. **CONCLUSION** The optimized formulation and technology in this study can be used for the preparation of CEP-MA-PEG-PLGA polymer micelles, which lays a foundation for the subsequent development of CEP targeted preparations.

**KEY WORDS:** cepharanthine; polymer micelle; mannose; Box-Behnken response surface method; freeze dried powder

千金藤素(cepharanthine, CEP)是从防己科千金藤属植物的块根中提取分离出的一种双苄基异喹啉类生物碱单体化合物<sup>[1]</sup>。CEP 具有抗炎、抗癌、抗病毒以及调节免疫等药理作用, 临床上主要用来治

**基金项目:** 国家自然科学基金项目资助(82174065); 云南省科技厅社会发展专项-重点研发计划项目资助(202303AC100025); 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题资助(202210ZD2207)

**作者简介:** 陈怡莹, 女, 硕士研究生 研究方向: 新型给药系统研究 \* **通讯作者:** 马云淑, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师 研究方向: 新型给药系统研究 Tel: (0871)65919920

疗白血病、贫血、脱发和蛇咬伤等<sup>[2]</sup>。近年来,CEP 因其显著的抗病毒作用,特别是对新型冠状病毒(SARS-CoV-2)病毒引起的新冠肺炎及其细胞因子风暴引起的急性肺损伤,具有显著抑制作用。CEP 可通过抑制核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活化、细胞因子产生、脂质过氧化以及一氧化氮产生等一系列反应减轻炎症反应<sup>[3-4]</sup>。然而,CEP 溶解性差,口服不易吸收,生物利用度低及体内滞留时间短等问题限制了其应用。因此,为了有效地实现药物的缓释,降低药物的不良反应,提高药物的生物利用度,并选择性地药物输送到炎症组织,将其制成纳米制剂。

在各类纳米制剂中,聚合物胶束以其稳定性与有效的载药能力受到高度关注。聚合物胶束通常由具有两亲性嵌段共聚物在水中自组装形成的壳-核结构,具有载药范围广、结构稳定、组织渗透性好、体内滞留时间长、靶向性好等特点<sup>[5]</sup>。聚合物胶束能增加疏水性药物的溶解度和稳定性,不易被网状内皮系统识别吞噬,并且可以通过炎症部位的高通透性和滞留效应实现药物胶束对癌组织和炎性组织的靶向作用。

甘露糖受体(mannose receptor, MR)是一种主要分布于巨噬细胞和树突状细胞表面的模式识别受体,甘露糖(mannose, MA)是其天然配体<sup>[6]</sup>,可通过内吞作用促进其入胞,特异性识别巨噬细胞的 MR,实现精准靶向,具有无毒、无免疫原性、生物相容性和生物可降解性良好等诸多优点<sup>[7]</sup>。炎症反应过程中,巨噬细胞被激活,MR 表达也相应增加。MR 作为肺泡巨噬细胞上高度表达的免疫受体,在糖蛋白清除、免疫反应和基质更新中起重要作用,在急性肺损伤的抗炎过程中也起着关键作用<sup>[8]</sup>。因此,本研究将 MA 修饰于聚合物胶束表面,将增强胶束对肺泡巨噬细胞的靶向性,提高其对炎症的治疗效果。

综上所述,本研究采用甘露糖-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(MA-PEG-PLGA)为载体,通过溶剂挥发法制备 MA-PEG-PLGA 聚合物胶束,并对聚合物胶束的包封率、载药量及粒径等进行详细表征。MA 修饰的 CEP 聚合物胶束可通过特异性结合巨噬细胞表面的 MR 达到靶向肺泡巨噬细胞的目的。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

安捷伦 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);R2000-30 型电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司);90PlusPALS 型激光粒度仪(美国布鲁克海文仪

器公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

### 1.2 材料

MA-PEG2000-PLGA5000(西安瑞禧生物科技有限公司)、CEP 原料药(含量 $\geq 98\%$ ,批号:M26HS179369,源叶生物)、CEP 对照品(源叶生物,含量 $\geq 98\%$ ,批号:M26HB179369);超滤离心管(内管 0.5 mL,外管 2 mL,截留相对分子质量 3000,型号:UFC 500396,密理博实验设备有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、甲醇、丙酮为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 MA-PEG-PLGA 聚合物胶束及 PEG-PLGA 聚合物胶束的制备

分别称取一定量的 MA-PEG-PLGA 和 CEP 置于 2 mL 离心管中,加入 1 mL 丙酮,超声使其充分溶解;逐滴加入 PBS 溶液中,在一定温度及转速下,搅拌一段时间,直至丙酮完全挥发,补足水相体积。过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜,最终得到 MA-PEG-PLGA 聚合物胶束。以包封率和载药量为考察指标,筛选胶束的最佳制备工艺。PEG-PLGA 聚合物胶束的制备方法将 MA-PEG-PLGA 替换为 PEG-PLGA,其他步骤同上。

### 2.2 CEP 含量测定方法学建立

**2.2.1 对照品溶液的配制** 精密称取 CEP 对照品 1.5 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇定容至刻度,超声溶解制成质量浓度为 150  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的 CEP 对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的配制** 精密吸取 CEP 聚合物胶体溶液 100  $\mu$ L,加入甲醇破乳并定容至 10 mL 量瓶中,即得供试品溶液。

**2.2.3 色谱条件** 采用 Agilent-Poroshell HPH-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,4  $\mu$ m);流动相:水(体积分数 0.2% 三乙胺)-乙腈(30:70);柱温:30  $^{\circ}$ C;检测波长:282 nm;进样体积:20  $\mu$ L;流速:1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>。

**2.2.4 标准曲线的建立** 精密称取 CEP 对照品 1.5 mg 置于 10 mL 量瓶中,甲醇超声溶解,定容至刻度。梯度稀释,配置质量浓度为 150、75、37.5、18.75、9.38、4.69、2.34  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的系列溶液,按“2.2.3”项下条件进样测定。以峰面积为纵坐标( $y$ )、CEP 浓度为横坐标( $x$ ),计算线性方程。

**2.2.5 专属性** 取适量 CEP、CEP-MA-PEG-PLGA 胶束溶液及 MA-PEG-PLGA 空白剂胶束溶液,按“2.2.2”项下方法处理样品,按照“2.2.3”项下方法

进样测定。

**2.2.6 精密性** 配置低、中、高浓度的 CEP 供试品溶液,1 d 内重复进样 3 次,连续进样 3 d,计算日间和日内精密性。实验结果表明,分别配置 25、50、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品溶液,每天不同时间段测定峰面积,考察其日内精密性,共测 3 d,考察日间精密性。

**2.2.7 稳定性** 将 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CEP 供试品溶液在室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h,进样测定,记录峰面积。结果显示,CEP 含量测定相对标准偏差(RSD)值为 0.17%,说明 CEP 对照品溶液 24 h 内稳定性良好。

**2.2.8 重复性** 将 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 CEP 供试品溶液重复进样 6 次,记录峰面积。

**2.2.9 加样回收率** 分别取 202  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CEP 溶液 0.5、1、1.5 mL 到 0.5 mL 空白胶束溶液中,甲醇破乳定容至 5 mL,计算 CEP 的加样回收率。

### 2.3 包封率及载药量的测定

取 500  $\mu\text{L}$  聚合物胶束溶液于 UFC 500396 超滤离心管中,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取 100  $\mu\text{L}$  滤液转移到 10 mL 量瓶,定容后超声,测定  $M_{\text{游离}}$ ,再取 100  $\mu\text{L}$  聚合物胶束转移至 10 mL 量瓶,定容超声,测定  $M_{\text{总}}$ ,按公式 1~2 分别计算包封率和载药量。

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

$$\text{载药量}(\%) = (M_{\text{总}} - M_{\text{游离}}) / M_{\text{辅料} + \text{药物总质量}} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

### 2.4 单因素考察

**2.4.1 投药量** 以包封率及载药量为指标,10 mL PBS 溶液,50 mg MA-PEG-PLGA 及适量 CEP 溶解于 1 mL 丙酮中,投药量为 25、12.5、8.3、6.25 及 5 mg,考察不同投药量对聚合物胶束的影响。

**2.4.2 水相体积** 以包封率及载药量为指标,50 mg MA-PEG-PLGA 及 5 mg CEP 溶解于 1 mL 丙酮中,水相体积分别为 6、8、10、12、14 mL,考察不同水相体积对聚合物胶束的影响。

**2.4.3 搅拌速度** 以包封率及载药量为指标,50 mg MA-PEG-PLGA 及 5 mg CEP 溶解于 1 mL 丙酮中,水相体积为 10 mL,搅拌速度分别为 600、800、1 000、1 200、1 400  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,考察搅拌速度对聚合物胶束的影响。

**2.4.4 有机相体积** 以包封率及载药量为指标,50 mg MA-PEG-PLGA 及 5 mg CEP 溶解于 1 mL 丙酮中,水相体积为 10 mL,搅拌速度为 1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,有机相体积分别为 0.25、0.5、1、1.5、2 mL,考察不同

有机相体积对聚合物胶束的影响。

**2.4.5 温度** 以包封率及载药量为指标,50 mg MA-PEG-PLGA 及 5 mg CEP 溶解于 1 mL 丙酮中,水相体积分别为 10 mL,温度分别为 20、30、40、50、60  $^{\circ}\text{C}$ ,考察不同温度对聚合物胶束的影响。

### 2.5 Box-Behnken 设计-响应面法优化制备工艺

根据单因素结果,选取温度(X1)和投药量(X2)与水相体积(X3)为因素,在 3 水平上进行优化研究,以药物的包封率(Y1)与载药量(Y2)为响应值,建立数学模型优化制备工艺,以包封率及载药量为指标,选择投药量、水相体积及温度 3 个因素,设计 3 因素 3 水平试验方案,Design-Expert 12 分析处理试验结果。

表 1 MA-CEP-PEG-PLGA 胶束工艺因素水平表

Tab.1 Table of technological factors of MA-CEP-PEG-PLGA micelle polymerizations

Factors	Levels		
	-1	0	1
Temperature(X1)	20	40	60
Dosage(X2)	5	15	25
Water phase volume(X3)	14	10	6

### 2.6 工艺验证

根据确定的最佳工艺条件制备 3 批样品,与预估值进行比较。

### 2.7 CEP 聚合物胶束的表征

**2.7.1 体外释放** 分别取 1 mL CEP 原料药溶液、1 mL CEP-PEG-PLGA 及 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束溶液置于透析袋中(相对分子质量为 3 500),在 40 mL 含 0.5% 聚山梨酯-80 的 PBS 溶液中进行体外释放,取样时间为 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72 h,取样 1 mL,取样后补加同新鲜介质 1 mL,过滤,测定 CEP 含量,计算累计释放率,并对体外释放进行拟合。

**2.7.2 粒径及电位** 将 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束溶液置于样品池中,设定仪器参数,在常温条件下,使用激光纳米粒度分析仪测定其粒径、多分散系数(PDI)和 Zeta 电位。

**2.7.3 冻干保护剂考察** 选取甘露醇、蔗糖、乳糖、海藻糖、葡萄糖、PEG6000 以及泊洛沙姆 188(P188)对 CEP-MA-PEG-PLGA 的冻干保护进行考察,取 1 mL 新制 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束置于离心管中,加入一定量的冻干保护剂,将两者混匀,于  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中分别预冻过夜,后立即进行冷

冻干燥。以不加任何冻干保护剂的胶束溶液作为对照,所得冻干粉加入原体积的 PBS 复溶。同时测定冻干粉复溶后胶束的粒径、PDI 评价冻干前后胶束的变化。

**2.7.4 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束的微观形态** 按照最佳处方工艺制备 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min 取上清液,超纯水稀释 50 倍,20 μg·mL<sup>-1</sup>的磷钨酸进行负染,透射电镜下观察胶束的微观形态,并拍照记录。

**2.7.5 CEP 聚合物胶束体外溶血试验** 取 4 mL SD 大鼠全血,1 200 r·min<sup>-1</sup>条件下离心 5 min,弃去上清液。加入生理盐水洗涤红细胞至上清液无色,再用生理盐水稀释制备成体积分数 2% 的红细胞悬液。稀释制备 CEP 质量浓度依次为 10、20、30 μg·mL<sup>-1</sup>的 CEP 原料药溶液、CEP-PEG-PLGA、CEP-MA-PEG-PLGA 胶束溶液和 CEP-PEG-PLGA、CEP-MA-PEG-PLGA 混合胶束冻干制剂水化溶液

(生理盐水水化)。取 0.5 mL 的药物溶液置于 1.5 mL 离心管,加入等体积的体积分数 2% 红细胞悬液混匀,将离心管置于 37℃ 温度条件下孵育 3 h 后,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,取 200 μL 上清液使用酶标仪检测 540 nm 处的吸光度(A)。分别使用生理盐水和超纯水加入等体积体积分数 2% 红细胞悬液作为阴性对照和阳性对照,溶血率按公式 3 计算:

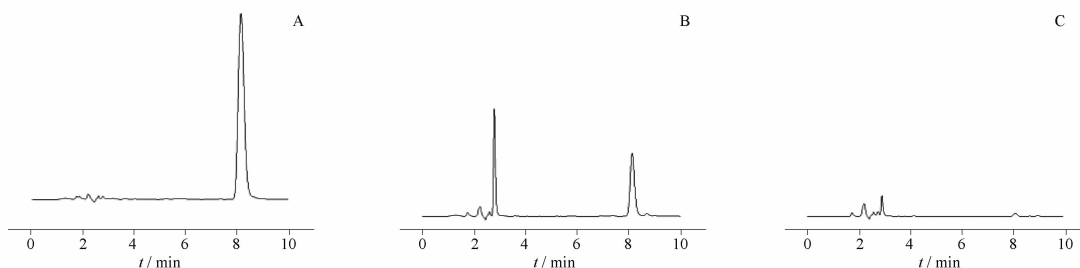
$$\text{溶血率}(\%) = (A_{\text{样}} - A_{\text{阴性组}}) / (A_{\text{阳性组}} - A_{\text{阴性组}}) \times 100\% \quad \text{公式(3)}$$

### 3 结果与讨论

#### 3.1 CEP 含量测定方法学考察结果

**3.1.1 线性关系** 得到的线性关系为  $y = 10.197x - 17.874$  ( $r^2 = 0.9992$ ),结果表明,CEP 质量浓度在 2.34 ~ 150 μg·mL<sup>-1</sup>内线性关系良好。

**3.1.2 专属性** 结果见图 1,CEP 峰形良好,无空白辅料干扰,说明该方法专属性良好。



A - 千金藤素;B - 千金藤素-甘露糖-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(CEP-MA-PEG-PLGA);C - 空白甘露糖-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(MA-PEG-PLGA)。

A - CEP;B - CEP-MA-PEG-PLGA;C - blank MA-PEG-PLGA.

图 1 千金藤素(CEP)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC diagram of CEP

**3.1.3 精密度** 结果显示,CEP 供试品溶液低、中、高浓度的日内精密度 RSD 值分别为 0.26%、0.22%、0.58%,日间精密度分别为 0.13%、0.17%、0.33%,均小于 3%,说明仪器精密度良好。

**3.1.4 稳定性** 结果显示,CEP 含量测定 RSD 值为 0.17%,说明 CEP 供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

**3.1.5 重复性** 结果显示,CEP 含量测定 RSD 值为 0.70%,说明该方法重复性良好。

**3.1.6 加样回收率** 结果显示,CEP 低、中、高 3 种浓度的平均加样回收率分别为 102.97%、101.35%、98.84%,RSD 值分别为 0.63%、0.47%、0.40%,均小于 3%,说明该方法测定 CEP 的回收率高。

#### 3.2 单因素考察

**3.2.1 投药量** 结果见表 2,随着投药量的增加,

胶束的包封率先增大后减小,但载药量呈增加的趋势,当投药量过高时,液体出现混浊,药物大量沉淀,而载药量的增加小于投药量的增加。且投药量对包封率及载药量影响较大,后续将对 5 ~ 25 mg 投药量进行优化。

表 2 投药量对胶束包封率及载药量的影响。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 Effect of dosage on micelle encapsulation efficiency and drug loading. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Dosage/mg	Encapsulation efficiency/%	Drug loading/%
25	66.29 ± 6.65	22.10 ± 2.22
12.5	81.21 ± 3.59	16.24 ± 1.18
8.3	88.98 ± 3.41	12.71 ± 0.13
6.25	87.98 ± 2.92	9.78 ± 0.20
5	85.63 ± 3.36	7.78 ± 0.30

**3.2.2 水相体积** 结果见表3,随着水相体积的增大,包封率及载药量先增大后减小,后有增大趋势,且影响较大。说明水相体积越大,聚合物胶束能充分分散在 PBS 中,包封率及载药量越高。但随着水相体积加大,可能是会导致载体的浓度降低,从而使包载药物的能力变弱。因此,后续需对 6~14 mL 水相体积进行优化。

**表3** 水相体积对胶束包封率及载药量的影响。n=3,  $\bar{x} \pm s$

**Tab.3** Effects of water phase volume on micelle encapsulation efficiency and drug loading. n=3,  $\bar{x} \pm s$

Water phase volume /mL	Encapsulation efficiency /%	Drug loading /%
6	77.75 ± 1.09	12.96 ± 1.83
8	84.97 ± 0.64	14.16 ± 1.12
10	79.82 ± 1.45	13.30 ± 2.24
12	89.25 ± 1.14	14.87 ± 0.17
14	88.12 ± 5.52	14.87 ± 0.79

**3.2.3 搅拌速度** 结果见表4,随着搅拌速度的增大,包封率及载药量先增大后减小,总体对其影响较小。这可能是搅拌速度较低时,混合不够均匀,形成的载药胶束较少,而搅拌速度较高时,形成的载药胶束会被破坏,释放出药物。当搅拌速度为 1 000 r · min<sup>-1</sup>时,包封率及载药量最大,故选择搅拌速度 1 000 r · min<sup>-1</sup>。

**表4** 搅拌速度对胶束包封率及载药量的影响。n=3,  $\bar{x} \pm s$

**Tab.4** Effects of stirring speed on micelle encapsulation efficiency and drug loading. n=3,  $\bar{x} \pm s$

Stirring speed /r · min <sup>-1</sup>	Encapsulation efficiency /%	Drug loading /%
600	80.51 ± 3.81	13.08 ± 0.63
800	81.89 ± 4.37	13.65 ± 0.73
1 000	84.03 ± 2.68	14.51 ± 0.45
1 200	83.98 ± 0.74	14.16 ± 0.12
1 400	83.44 ± 4.44	14.14 ± 0.73

**3.2.4 有机相体积** 结果见表5,随着有机相体积的增大,包封率及载药量逐渐减小,但其影响较小。说明有机溶剂体积越大,溶剂越难挥发,残留在水相中越多。当有机溶剂体积为 0.25 mL 时,包封率及载药量最大,故选择有机溶剂体积为 0.25 mL。

**3.2.5 温度** 结果见表6,随着温度的升高,包封率及载药量先增大后减小,且影响较大。随着温度的升高,辅料和药物能充分分散在水相中,越容易

**表5** 有机相体积对胶束包封率及载药量的影响。n=3,  $\bar{x} \pm s$

**Tab.5** Effects of organic phase volume on micelle encapsulation efficiency and drug loading. n=3,  $\bar{x} \pm s$

Organic phase volume /mL	Encapsulation efficiency /%	Drug loading /%
0.25	84.56 ± 7.94	14.09 ± 1.32
0.5	80.55 ± 4.05	13.43 ± 0.67
1	83.37 ± 5.11	13.89 ± 0.85
1.5	81.67 ± 7.06	13.61 ± 1.18
2	80.21 ± 3.33	13.36 ± 0.56

形成胶束;但温度越高,会导致包载的药物渗漏,导致包封率及载药量下降。因此,后续需对温度 20~60 °C 进行优化。

**表6** 温度对胶束包封率及载药量的影响。n=3,  $\bar{x} \pm s$

**Tab.6** Effects of temperature on micelle encapsulation efficiency and drug loading. n=3,  $\bar{x} \pm s$

T/°C	Encapsulation efficiency /%	Drug loading /%
20	74.31 ± 4.29	13.05 ± 0.72
30	82.94 ± 3.22	13.49 ± 0.53
40	85.60 ± 0.44	13.60 ± 0.07
50	87.77 ± 2.24	15.13 ± 0.37
60	82.60 ± 6.02	13.7 ± 0.10

### 3.3 Box-Behnken 设计-响应面法优化制备工艺

结果见表7,包封率(EE/%) = 80.48 + 1.43A - 13.43B + 3.02C + 0.072 5AB + 0.420 0AC + 3.15BC + 2.38A<sup>2</sup> - 3.59B<sup>2</sup> - 2.33C<sup>2</sup>,模型 P < 0.000 1,具有显著性,失拟项 P > 0.1,不具有显著性,且 B、C、BC、B<sup>2</sup>都具有显著性,影响胶束包封率的影响因素从大到小排序为:投药量 > 水相体积 > 温度。载药量(DL/%) = 18.78 + 1.39A + 5.36B + 1.31C + 1.29AB - 0.997 5AC + 1.18BC - 1.06A<sup>2</sup> - 4.56 B<sup>2</sup> - 0.236 0C<sup>2</sup>,模型 P < 0.000 1,具有显著性,失拟项 P > 0.1,不具有显著性,且 A、B、C、AB、AC、BC、B<sup>2</sup>都具有显著性,影响胶束包封率的影响因素从大到小排序为:投药量 > 温度 > 水相体积。Design Expert 12 优化出的最佳工艺为投药量为 18.82 mg,温度为 60 °C,水相体积为 14 mL,预测包封率为 82.23%,载药量为 21.03%。结果见图 2~3。

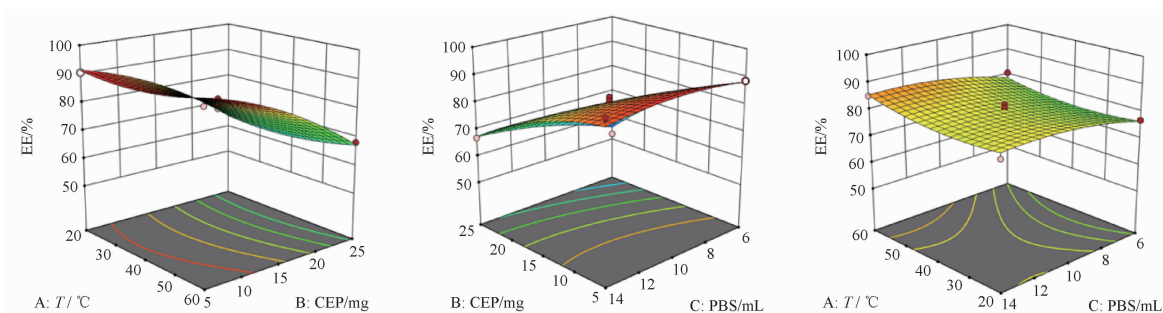
### 3.4 工艺验证

根据确定的最佳工艺条件制备 3 批样品,与预测值进行比较,结果见表8,各指标实测值与预测值的差异较小,RSD 值均小于 5%,表明优化后的胶束处方重现性良好。

表7 MA-PEG-PLGA 聚合物胶束 Box-Behnken 设计-响应面试验结果

Tab.7 MA-PEG-PLGA polymer micellar Box-Behnken design-response surface methodology

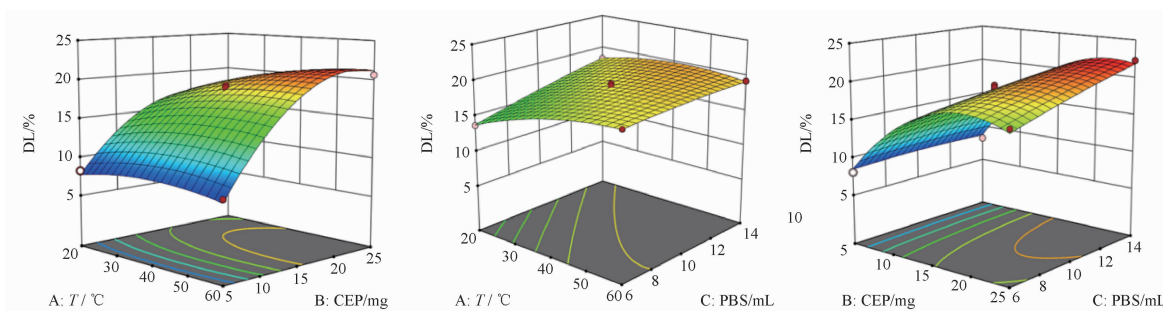
Serial number	X1/°C	X2/mg	X3/mL	Y1/%	Y2/%
1	40	15	10	81.11	18.72
2	40	25	14	66.86	22.29
3	20	25	10	66.86	15.43
4	20	15	6	76.86	13.72
5	60	15	14	85.03	19.26
6	20	15	14	79.6	18.37
7	40	15	10	82.37	19.01
8	40	15	10	80.85	18.66
9	40	15	10	79.09	19.3
10	60	15	6	80.61	18.6
11	20	5	10	90.52	8.23
12	40	5	6	88.56	8.05
13	40	25	6	52.06	17.35
14	60	25	10	68.15	20.67
15	40	5	14	90.75	8.25
16	40	15	10	78.96	18.22
17	60	5	10	91.52	8.32



A - 温度; B - CEP 投药量; C - 磷酸盐缓冲液 (PBS) 体积。  
A - temperature; B - CEP dosage; C - PBS volume.

图2 以包封率为指标的三维响应面曲线图

Fig.2 Three-dimensional response surface curve with encapsulation efficiency as index



A - 温度; B - CEP 投药量; C - PBS 体积。  
A - temperature; B - CEP dosage; C - PBS volume.

图3 以载药量为指标的三维响应面曲线图

Fig.3 Three-dimensional response surface curve with drug loading as index

### 3.5 CEP 聚合物胶束的表征

3.5.1 体外释放 结果见图4,表9。CEP在10 h 内快速释放完全,而 CEP-PEG-PLGA 胶束及

CEP-MA-PEG-PLGA 胶束 72 h 内分别释放 (79.99 ± 4.96)% 和 (71.66 ± 2.62)%。零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 方程对其的

表 8 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束最佳工艺验证结果

Tab. 8 CEP-MA-PEG-PLGA micelles best process verification results

No.	Encapsulation efficiency/%	Drug loading/%
1	80.31	21.11
2	81.25	21.36
3	81.11	21.32
RSD	0.63	0.62

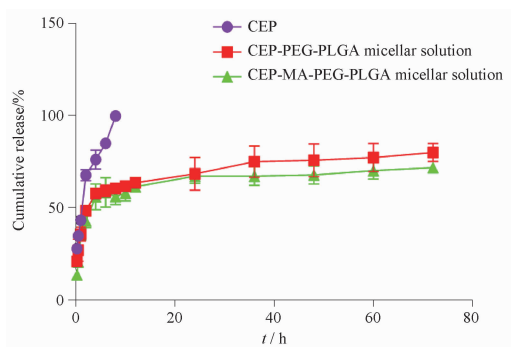
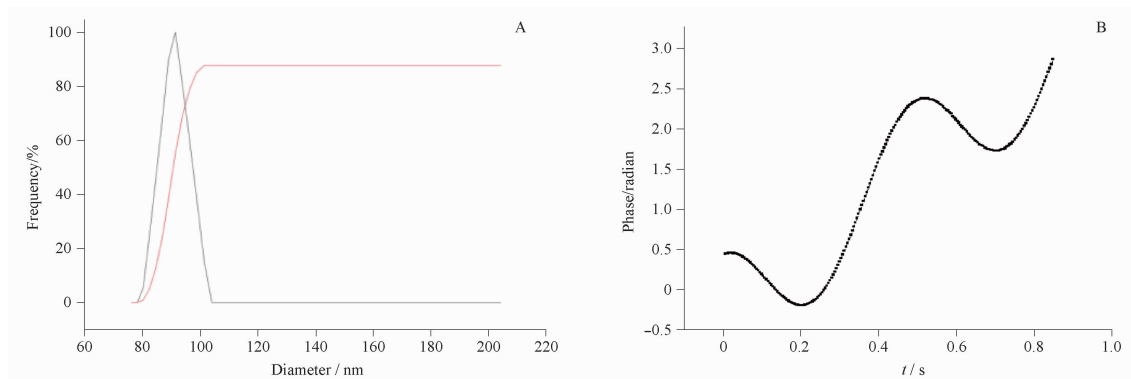


图 4 CEP 聚合物胶束体外释放图。n = 6,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 The release of CEP polymer micelle *in vitro*. n = 6,  $\bar{x} \pm s$

体外释放度进行拟合度分析。结果显示, CEP 原料药溶液符合 Higuchi 模型, 而聚合物胶束的体外释放曲线符合一级动力学方程, 表明将 CEP 制成聚合物胶束后, 提高了药物溶解度和稳定性, 聚合物胶束具有缓释作用, 具备后续开发的潜力。



A - 粒径分布图; B - 电位图。

A - particle size distribution diagram; B - potential diagram.

图 5 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束粒径及电位图

Fig. 5 Particle size and potential diagram of CEP-MA-PEG-PLGA polymer micelle

3.5.4 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束的微观形态 结果显示, 电镜下胶束呈球形, 大小均一, 分散性良好, 见图 6。从色泽、疏松程度及表面状态等角度观察, 聚合物胶束主要以球形纳米微粒形式分散, 冻干后

表 9 CEP 及其胶束不同释放模型方程拟合

Tab. 9 Equation fitting of CEP and its micelle different release models

Samples	Models	Equations	$r^2$
CEP solution	Zero order release	$Q = 36.68t + 8.44$	0.88
	Primary release	$Q = 87.66(1 - e^{-0.87t})$	0.89
	Higuchi model	$Q = 29.40(t^{1/2}) + 17.82$	0.96
CEP-PEG-PLGA micellar solution	Zero order release	$Q = 0.61t + 45.60$	0.56
	Primary release	$Q = 68.48(1 - e^{-0.71t})$	0.84
	Higuchi model	$Q = 6.22(t^{1/2}) + 34.90$	0.78
CEP-MA-PEG-PLGA micellar solution	Zero order release	$Q = 0.51t + 42.38$	0.44
	Primary release	$Q = 68.01(1 - e^{-0.65t})$	0.92
	Higuchi model	$Q = 5.69(t^{1/2}) + 32.17$	0.65

3.5.2 粒径及电位 图 5 结果显示, CEP-MA-PEG-PLGA 胶束粒径为  $(111.37 \pm 3.51)$  nm、PDI 为  $(0.21 \pm 0.01)$ 、Zeta 电位  $(-9.78 \pm 2.15)$  mV。表明胶束粒径较小, 且分散均匀。

3.5.3 冻干保护剂考察 表 10 结果显示, 无冻干保护剂的胶束对比冻干之前, 粒径变化最大;  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  海藻糖和  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  葡萄糖冻干保护作用最差。从外观看, 其中 PEG6000 及 P188 组冻干粉细腻, 结构完整, 用纯水复溶后无结块, 其他组均存在肉眼可见的不溶颗粒。综合复溶后各保护剂冻干后的纳米粒, 发现  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  188 冻干后粒径及 PDI 变化最小, 聚合物胶束质地松软, 保护剂为单个的 P188 时为最佳, 因此选择  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 P188 对该聚合物胶束进行冻干保护。

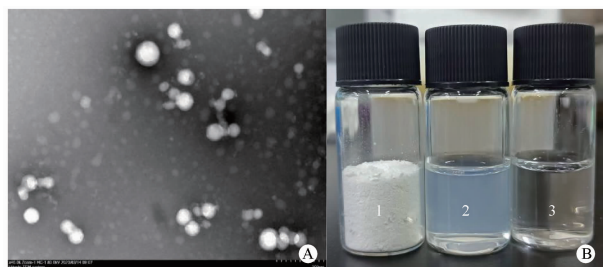
的胶束颗粒分散均匀, 疏松细腻, 表面平整的白色粉末状态。

3.5.5 CEP 聚合物胶束体外溶血试验 结果见表 11。CEP 原料药的溶血率均高于胶束溶液及其

表 10 不同冻干保护剂的冻干效果。n=3,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 10 Freeze-drying effects of different freeze-drying protectants. n=3,  $\bar{x} \pm s$

Sample	Exterior	Grain size/nm	PDI
Before lyophilization	Homogeneous solution	111.37 ± 3.51	0.21 ± 0.01
No lyoprotectant	Severe collapse	245.61 ± 4.08	0.40 ± 0.01
5 mg · mL <sup>-1</sup> Trehalose	Severe collapse	131.44 ± 6.23	0.28 ± 0.01
10 mg · mL <sup>-1</sup> Trehalose	Collapse to some extent	153.31 ± 9.67	0.37 ± 0.03
15 mg · mL <sup>-1</sup> Trehalose	Collapse to some extent	156.34 ± 3.12	0.37 ± 0.06
5 mg · mL <sup>-1</sup> Glucose	Severe collapse	211.39 ± 4.00	0.33 ± 0.02
10 mg · mL <sup>-1</sup> Glucose	Collapse to some extent	160.29 ± 7.20	0.33 ± 0.07
15 mg · mL <sup>-1</sup> Glucose	Collapse to some extent	164.14 ± 9.31	0.35 ± 0.01
5 mg · mL <sup>-1</sup> Mannitol	Collapse to some extent	156.92 ± 3.84	0.44 ± 0.02
10 mg · mL <sup>-1</sup> Mannitol	Slight collapse	308.51 ± 6.04	0.46 ± 0.16
15 mg · mL <sup>-1</sup> Mannitol	Slight collapse	129.85 ± 4.85	0.31 ± 0.01
5 mg · mL <sup>-1</sup> PEG6000	The surface is loose and porous, with uniform milky white color and uniform color	123.38 ± 8.01	0.24 ± 0.06
10 mg · mL <sup>-1</sup> PEG6000	The surface is loose and porous, with uniform milky white color and uniform color	149.67 ± 7.46	0.28 ± 0.03
15 mg · mL <sup>-1</sup> PEG6000	The surface is loose and porous, with uniform milky white color and uniform color	148.25 ± 7.79	0.34 ± 0.06
5 mg · mL <sup>-1</sup> P188	The surface is loose and porous, with uniform milky white color and uniform color	125.62 ± 4.71	0.27 ± 0.07
10 mg · mL <sup>-1</sup> P188	The surface is loose and porous, with uniform milky white color and uniform color	145.43 ± 1.82	0.35 ± 0.04
15 mg · mL <sup>-1</sup> P188	The surface is loose and porous, with uniform milky white color and uniform color	148.44 ± 6.57	0.29 ± 0.02
5 mg · mL <sup>-1</sup> Lactose	Collapse to some extent	129.65 ± 6.85	0.34 ± 0.08
10 mg · mL <sup>-1</sup> Lactose	Collapse to some extent	145.71 ± 6.97	0.37 ± 0.05
15 mg · mL <sup>-1</sup> Lactose	Collapse to some extent	153.44 ± 3.47	0.20 ± 0.05
5 mg · mL <sup>-1</sup> Sucrose	Collapse to some extent	147.16 ± 8.91	0.30 ± 0.03
10 mg · mL <sup>-1</sup> Sucrose	Collapse to some extent	142.79 ± 5.21	0.39 ± 0.02
15 mg · mL <sup>-1</sup> Sucrose	Collapse to some extent	152.24 ± 4.58	0.34 ± 0.01



A - 电镜图 × 40 000; B - 表观图; 1 - 胶束冻干粉; 2 - 胶束溶液; 3 - 纯水。  
A - electron microscope diagram × 40 000; B - apparent diagram; 1 - Micellar freeze-dried powder; 2 - Micellar solution; 3 - Pure water.

图 6 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束电镜及表观图

Fig. 6 Electron microscope and apparent diagram of CEP-MA-PEG-PLGA polymer micelle

冻干粉,并随浓度的升高而增大;CEP-PEG-PLGA 胶束的溶液及其冻干粉、CEP-MA-PEG-PLGA 胶束的溶液及其冻干粉溶血率在 0.42% ~ 2.69% 之间,均小于 5%,将 CEP 包载后,溶血率下降,表明聚合物胶束具有良好的血液相容性,说明静脉注射时不会引起溶血,安全性高。

#### 4 讨论与结论

本研究中最佳工艺制备的 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束的封装率为 (80.89 ± 0.51)%,载药量为

表 11 不同浓度 CEP 及其胶束溶血率。n=3,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 11 Different concentrations of CEP and its micelle hemolysis rate. n=3,  $\bar{x} \pm s$

Samples	$\rho/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Hemolysis rate/%
CEP solution	10	2.68 ± 1.52
	20	4.86 ± 0.88
	30	11.36 ± 2.65
CEP-PEG-PLGA micelle Freeze dried powder	10	0.42 ± 0.02
	20	1.56 ± 0.18
	30	2.17 ± 0.52
CEP-MA-PEG-PLGA micelle Freeze dried powder	10	1.43 ± 1.68
	20	0.83 ± 0.34
	30	1.65 ± 1.07
CEP-PEG-PLGA micelle solution	10	0.52 ± 0.18
	20	1.24 ± 0.80
	30	1.03 ± 0.16
CEP-MA-PEG-PLGA micelle solution	10	1.96 ± 1.47
	20	2.28 ± 0.74
	30	2.69 ± 0.97

(21.28 ± 0.13)% ;预实验发现,影响聚合物胶束封装率及载药量的因素有:有机溶剂及水相的选择、药辅比、温度、水相体积等,其中辅料的选择是影响药物封装率的最大因素,辅料与药物亲和力越强,则封装率和载药量越高。CEP 在水相中溶解度仅为  $3.98 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[10]</sup>,本研究中 PEG 与 PLGA 两者共价结合可避免网状内皮系统吞噬,其不仅具

有良好的生物相容性和可降解性,而且可有效改善药物水溶性、增加药物稳定性以及减轻免疫原性<sup>[11-12]</sup>。CEP-MA-PEG-PLGA 胶束可使药物主动靶向到炎症部位,具有延长药物作用时间,减少不良反应、提高疗效等优点。

聚合物胶束的载药方法有多种,主要有物理包裹、化学偶联和静电吸附等方式。制备方法有直接溶解法、透析法、溶剂挥发法<sup>[13]</sup>。预实验发现,薄膜分散法制备的 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束水化过程容易整块膜脱落,胶束难以成型,包封率及载药量都较低;透析法制备的胶束载药量高,但包封率较低,且胶束粒径较大,稳定差,容易产生沉淀。结果发现,溶剂挥发法制备的胶束包封率、载药量及稳定性都较好,最终确定该方法为制备 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束的方法。制备过程中使用丙酮作为有机溶剂,使用 60 ℃ 作为溶剂挥发及胶束成型温度,既保证丙酮完全挥发,也获得了成型性好、包封率及载药量较高的胶束。对聚合物胶束体外释放性能研究中,CEP 10 h 内已完全释放,而 CEP-MA-PEG-PLGA 胶束仍然处于释放状态,72 h 才达到释放稳态,说明将 CEP 制成聚合物胶束后,有效提高了药物溶解度和稳定性,降低药物的突释,有效控制药物的释放速率。Zeta 电位显示,MA-CEP-PEG-PLGA 胶束的电位为  $(-9.78 \pm 2.15) \text{ mV}$ ,说明胶束的稳定性较差;因此,将其冻干,本研究考察了蔗糖、乳糖、甘露醇、海藻糖、PEG6000 等 7 种冻干保护剂的效果,结果显示,只有 PEG6000 和 P188 能得到分散性良好的冻干产物,而其他糖类保护剂制备的载药胶束的冻干产品皱缩严重,且分散性很差。有研究显示,PEG 和 P188 在冻干过程中主要能对聚乙二醇链结构的胶束起到立体稳定剂的作用,阻止聚合物胶束发生聚集,达到稳定的效果<sup>[14]</sup>。本研究最终选择质量分数 0.5% 的 P188 作为冻干保护剂,能最大限度地保护胶束的立体结构,冻干前后粒径及 PDI 较小,复溶后胶束澄清透明,无明显沉淀。为了验证 CEP-MA-PEG-PLGA 聚合物胶束的安全性,本研究通过体外溶血试验考察胶束的红细胞溶血率,结果显示,10、20、30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 种质量浓度条件下,CEP 的溶血率均高于其胶束溶液及冻干粉,说明 CEP 制成胶

束后体外安全性较好,静脉注射不会产生溶血。

## REFERENCES

- [1] CUI J Y. Overview of pharmacological effects of cepharanthine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(9): 502-505.
- [2] CHRISTIAN B. Cepharanthine: An update of its mode of action, pharmacological properties and medical applications [J]. *Phyto-medicine*, 2019, 62: 152956. DOI:10.1016/j.phymed.2019.152956.
- [3] LU C, ZHENG J, DING Y, et al. Cepharanthine loaded nanoparticles coated with macrophage membranes for lung inflammation therapy [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28: 2582-2593.
- [4] ROGOSNITZKY M, OKEDIJI P, KOMAN I. Cepharanthine: a review of the antiviral potential of a Japanese-approved alopecia drug in COVID-19 [J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(6): 1509-1516.
- [5] CHAI Y, XU K, CHANG H B, et al. Research progress of polymeric micelles as drug carriers [J]. *Chem Res* (化学研究), 2018, 29(5): 522-528.
- [6] LU Y, YUAN F J, ZHENG S H, et al. Mannose modification enhances tumor targeting and immunotherapeutic effects of resiquimod liposomes [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2022, 57(22): 1917-1925.
- [7] SI J Q, LU Y, CAI J X, et al. Optimization of mannose-modified celastrol liposome formulation and targeting evaluation *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53(21): 6726-6733.
- [8] SU M, HU H, ZHAO X, et al. Construction of mannose-modified polyethyleneimine-block-polycaprolactone cationic polymer micelles and its application in acute lung injury [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(5): 1080-1095.
- [9] HE C X, SUN Y L, JIA J, et al. Preparation and characterization of ternary self-assembled nanomicelles of quercetin [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2022, 57(22): 1911-1916.
- [10] FEI W L, QIN L, CHEN Q Q, et al. Optimization of cepharanthine hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin microspheres preparation process by response surface methodology [J]. *Contem Chem Ind* (当代化工), 2022, 51(8): 1845-1849.
- [11] ZHANG W J, WANG Q, WU M T, et al. Research progress on the application of PEG-PLGA bloc copolymer in nano drug delivery systems [J]. *J Pharm Res* (药学研究), 2019, 38(9): 532-538.
- [12] ZHU Z Z, WANG S X, WANG Y L, et al. Preparation and optimization of doxorubicin-loaded PEG-PLGA nanoparticles [J]. *Guangzhou Chem Ind* (广州化工), 2022, 50(7): 85-87.
- [13] LI Y Y, SUN X K, LI W, et al. Research progress in polymeric micelle drug-loading system [J]. *Chem Bioeng* (化学与生物工程), 2018, 35(5): 1-4, 10.
- [14] YANG Z L, LI X R, YANG K W, et al. Freeze-Drying and *in vitro* release kinetics of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 2007, 75(19): 2169-2174.

(收稿日期:2023-07-05)