# 香叶木素脂质体的处方优化及其体外释放

郭嘉斌，徐文霞，李红莲，孙文霞，任 静*
（成都大学药学院，四川抗菌素工业研究所，四川省药物制剂及装备工程技术研究中心，四川成都 610052）

**摘要**：为改善香叶木素的水溶性，采用薄膜超声分散法制备其脂质体，并首先以包封率、粒径为指标进行单因素试验初步筛选处方和工艺参数，再通过 Box-Behnken 设计 - 响应面法进一步优化。结果表明，所得的香叶木素脂质体优化处方工艺如下：脂药比（即大豆磷脂与香叶木素的质量比）5.26、胆固醇质量 6.31 mg、水化后磷脂浓度 1.19 mg/ml，在超声功率为 360 W、超声时间为 2 min 的条件下制备。优化的香叶木素脂质体粒径为（146±3）nm，ζ 电位为（－38.63±0.13）mV，包封率为（88.2±1.2）%，载药量为 14.6%。透射电镜照片显示所得脂质体大小均一，呈球形。体外释放试验中，48 h 累积释放率为 79.68%，释放行为结果符合 Weibull 方程（$r$=0.995 0）。

**关键词**：香叶木素；脂质体；薄膜超声分散法；Box-Behnken 设计 - 响应面法
**中图分类号**：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)02-0225-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.02.009

# Formulation Optimization and *in vitro* Release of Diosmetin Liposomes

GUO Jiabin, XU Wenxia, LI Honglian, SUN Wenxia, REN Jing*
(*Engineering Research Center for Pharmaceuticals and Equipments of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610052*)

**ABSTRACT**: The liposomes loaded with diosmetin were prepared by thin film ultrasonic dispersion method to improve poor water-soluble of diosmetin. With encapsulation efficiency and particle size as main indicators, single factor tests were carried out to find the test ranges of formulation and process parameters, followed by further optimization with response surface methodology coupled with Box-Behnken design. The optimal formulation and process parameters were as follows: lipid-drug ratio (namely the mass ratio of soybean phospholipids to diosmetin) was 5.26, cholesterol mass was 6.31 mg, and phospholipid concentration after hydration was 1.19 mg/ml, ultrasonic treatment of the obtained hydration liquid was conducted at 360 W for 2 min. The particle size, ζ potential, encapsulation efficiency and drug loading of the final diosmetin liposomes were (146±3) nm, (－38.63±0.13) mV, (88.2±1.2) % and 14.6%, respectively. The transmission electron microscopy analysis revealed that the liposomes were uniform in size and spherical in shape. The *in vitro* cumulative release at 48 h was 79.68%, and the diosmetin release behavior was conformed to the Weibull's equation ($r$=0.995 0).

**Key Words**: diosmetin; liposome; thin film ultrasonic dispersion method; Box-Behnken design-response surface methodology

**收稿日期**：2021-04-29
**基金项目**：四川省科技厅应用基础项目(2018JY0592)、国家级大学生创新创业大赛资助项目(202011079034X)
**作者简介**：郭嘉斌(1997—)，硕士研究生，专业方向：药物新剂型与新技术。
**通信作者**：任 静(1979—)，研究员，从事药物新剂型与新技术研究。
E-mail：renjing98@tom.com

黄酮类化合物具有复杂的生物学效应，包括抑制肿瘤增殖、调节酶活性以及与不同信号转导途径产生相互作用等[1]。香叶木素（diosmetin，**1**）是一种天然黄酮类化合物，主要来源于蓬子菜、菊花、柠檬、柑橘类等多种植物[2]。**1** 具有抗氧化、抗菌、

抗炎、抗肿瘤及雌激素样作用，作用机制涉及清除自由基、诱导细胞凋亡以及抑制细胞内信号传递等[3—4]。然而，**1** 水溶性差、生物利用度低，限制了其临床应用，目前尚未见上市药物。基于此，本研究设计制备了 **1** 脂质体处方，并通过单因素筛选及 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化处方。

## 1　仪器与试药

2695 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；RE-52AA 型旋转蒸发仪（上海康华生化仪器制造有限公司）；NanoBrook Omni 型多角度粒度及高灵敏ζ电位分析仪（美国布鲁克海文仪器公司）；JY92-IIDN 型超声波细胞破碎仪（上海沪析实业有限公司）；JEM-2010HR 型透射电镜（日本 Hitachi 公司）；SHH-150SD 型药品稳定性箱（重庆永生实验仪器厂）。

**1** 对照品（含量≥ 99.7 %，批号 MUST-15102404，mp 256 ～ 258 ℃）和 **1** 原料药（含量≥ 97.0 %，批号 MUST-19011010)（成都曼思特生物科技有限公司）；大豆磷脂［艾伟拓（上海）医药科技有限公司］；胆固醇（北京索莱宝科技有限公司）；硫酸鱼精蛋白（上海源叶生物科技有限公司）；甲醇、乙醇、磷酸和氯仿（成都市科隆化学品有限公司）；透析袋［截留分子量 10 000，斯百全化学（上海）有限公司］；水为自制纯化水。

## 2　方法与结果

### 2.1　**1** 含量分析方法的建立

#### 2.1.1　色谱条件

色谱柱 Hypersil BDS $C_{18}$ 柱（4.6 mm×200 mm，5 μm）；流动相 甲醇：0.4%磷酸溶液（60 ∶ 40）；检测波长 343 nm；柱温 25 ℃；流速 1 ml/min；进样量 10 μl。

#### 2.1.2　专属性试验

取 **1** 甲醇溶液（6 μg/ml）、**1** 脂质体溶液（10 μg/ml）及空白脂质体溶液，按“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定。结果如图 1 所示，可见 **1** 在 6 min 附近出峰，辅料对 **1** 的测定无干扰。

#### 2.1.3　线性关系考察

精密称取 **1** 对照品 2.5 mg，置 50 ml 量瓶中，加入适量甲醇，超声溶解后定容，作为贮备液。精密移取适量贮备液，用甲醇稀释成 **1** 质量浓度为 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、10 μg/ml 的系列标准溶液。照“**2.1.1**”项下色谱条件下进行试验，记录峰面积。以 **1** 的质量浓度（$c$）为横坐标，测得的相应峰面积（$A$）为纵坐标，绘制标准曲线。所得回归方程为：$A$=42 861$c$+1 165.3（$r$=0.999 9），表明 **1** 在 0.125 ～ 10 μg/ml 内线性关系良好。

#### 2.1.4　精密度考察

选取低、中、高浓度（1、3 和 6 μg/ml）的 **1** 标准溶液，于 1 d 内分别连续测定 5 次，连续 5 d 测定，考察日内和日间 RSD。结果表明低、中、高浓度样品的日内 RSD（$n$=5）分别为 0.99%、0.55%、0.51%，日间 RSD（$n$=5）分别为 0.95%、1.14%、0.68%。

#### 2.1.5　稳定性考察

精密移取适量“**2.1.3**”项下的 **1** 贮备液，配制成一定浓度的 **1** 标准溶液，平行制备 3 份，分别置室温不避光、室温避光和药品稳定性试验箱的室温强光条件下保存，在 0、1、2、4、6、8、24 h 时取样进行 HPLC 分析，根据峰面积通过标准曲线计算 **1** 浓度。结果显示含量的 RSD（$n$=3）分别为 0.54%、0.79%、0.25%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

#### 2.1.6　回收率考察

精密移取适量“**2.1.3**”项下的 **1** 贮备液置 25 ml 量瓶中，同时加入适量的空白脂质体，用甲醇稀释并定容，分别配制成 4、5、6 μg/ml 的 **1** 样品溶液，照“**2.1.1**”项下色谱条件分别连续测定 5 次，根据峰面积计算 **1** 浓度。结果显示平均回收率（$n$=5）分别为（100.99±0.13）%、（101.33±0.09）%、（101.53±0.14）%。

### 2.2　**1** 脂质体的制备

采用薄膜超声法制备 **1** 脂质体，精密称取大豆磷脂 20 mg、胆固醇 5 mg 和 **1** 4 mg 置茄型烧瓶中，加入甲醇 20 ml，在 45 ℃下减压旋转蒸发，得到一层脂质薄膜，用水化介质 20 ml 水化脱膜，得到的混悬液用超声波细胞破碎仪进行超声即得 **1** 脂质体。

### 2.3　包封率的测定

在预试验中曾分别采用凝胶柱法和超滤法检测，前法不能将游离药物和脂质分离，后法所得滤

液中未测得药物。因此根据文献[5]，采用鱼精蛋白沉淀法测定 **1** 脂质体的包封率。

**2.3.1** 包封率测定方法的建立

取 **1** 甲醇溶液，加入空白脂质体 0.1 ml 和鱼精蛋白水溶液（10 mg/ml）0.2 ml，涡旋 30 s，混匀后静置 3 min，加入生理盐水至 1 ml，混匀，使 **1** 的质量浓度分别为 5、10、15 μg/ml。离心（5 634×*g*）5 min，吸取上清液，照“**2.1.1**”项下色谱条件测定，计算得高、中、低浓度样品的回收率（*n*=3）分别为（99.99±0.18）%、（99.79±0.21）%、（101.64±0.19）%，符合试验要求。

**2.3.2** **1** 脂质体包封率的测定

精密吸取 **1** 脂质体 100 μl 置 1.5 ml 离心管中，加入鱼精蛋白水溶液（10 mg/ml）200 μl，涡旋 30 s 后静置 3 min，加入生理盐水 700 μl，混匀。离心（5 634×*g*）5 min，可明显看到离心管底部有脂质体沉淀。移取上清液，经适当稀释后照“**2.1.1**”项下色谱条件测定，计算出 **1** 脂质体中游离药物的质量浓度（$c_0$）。另精密吸取 **1** 脂质体 100 μl 置 1.5 ml 离心管中，直接加入甲醇 900 μl 破乳，同样条件离心，取上清液，经适当稀释后照“**2.1.1**”项下色谱条件测定，计算出 **1** 脂质体中总药物的质量浓度（$c_1$）。最终根据游离药物与总药物计算包封率。

**2.4** 工艺参数的单因素筛选

**2.4.1** 水化介质

照“**2.2**”项下方法操作，得到一层脂质薄膜后分别使用纯化水、1% Tween-80 溶液、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.0，PBS）进行水化脱膜，得到的混悬液用超声波细胞破碎仪在 360 W 功率下超声 2 min，即得 **1** 脂质体。考察不同的水化介质对 **1** 脂质体包封率和粒径的影响，结果见表 1。采用纯化水时 **1** 脂质体的包封率较高，故选用。

**表 1** 水化介质对包封率和粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，*n*=3）

Tab.1 Effect of Hydration Medium on Encapsulation Efficiency and Particle Size（$\bar{x}\pm s$, *n*=3）

| 水化介质 | 包封率/% | 粒径/nm |
|---|---|---|
| 纯化水 | 90.2±0.9 | 180±6 |
| pH 7.4 PBS | 81.1±0.7 | 191±4 |
| 1% Tween-80水溶液 | 87.3±0.9 | 193±3 |

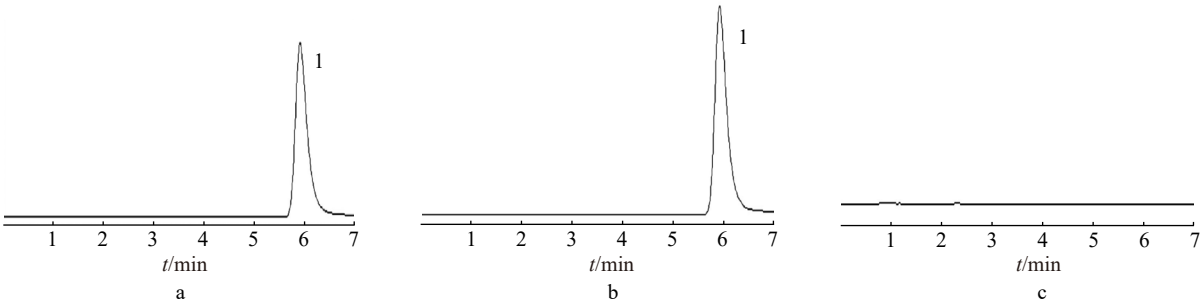
**2.4.2** 制备温度

分别在 35、40、45、50 ℃下旋蒸得到 **1** 脂质薄膜，选用纯化水 20 ml 水化，其他条件同“**2.4.1**”项，考察不同的制备温度对 **1** 脂质体包封率和粒径的影响，结果见表 2。不同的制备温度对包封率和粒径影响均较小，但试验中观察到成膜温度会影响膜的均匀度，综合考虑后选用 45 ℃。

**表 2** 温度对包封率和粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，*n*=3）

Tab.2 Effect of Temperature on Encapsulation Efficiency and Particle Size（$\bar{x}\pm s$, *n*=3）

| 制备温度/℃ | 包封率/% | 粒径/nm |
|---|---|---|
| 35 | 89.7±1.1 | 161±3 |
| 40 | 89.8±1.1 | 177±5 |
| 45 | 90.8±0.5 | 169±4 |
| 50 | 89.3±0.4 | 180±8 |




a：**1** 甲醇溶液，b：**1** 脂质体溶液，c：空白脂质体溶液

1－**1**

**图 1** 专属性试验结果

Fig.1 Results of Specificity Experiment

**2.4.3** 超声时间与功率

照“**2.4.1**”项下方法制备 **1** 脂质薄膜并水化，固定超声功率为 360 W 超声 2、4、6、8 min；固定超声时间为 2 min，超声功率为 120、240、360、480 W，考察不同的超声时间与功率对 **1** 脂质体包封率和粒径的影响，结果见表 3。超声时间会影响脂质体的分散，时间过短不能使脂质体分散到粒径足够小且均匀，时间过长则易破坏脂质体结构[6]。超声功率也会影响脂质体的聚集和分散。超声功率太高会破坏脂质体；太低则不足以分散整个胶体体系。综合考虑，选用 360 W 超声 2 min。

**表 3　超声时间与功率对包封率和粒径的影响**（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.3　Effects of Ultrasonic Time and Power on Encapsulation Efficiency and Particle Size ($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

| 功率/W | 时间/min | 包封率/% | 粒径/nm |
|---|---|---|---|
| 120 | 2 | 89.5±0.7 | 198±5 |
| 240 | 2 | 88.3±0.6 | 165±6 |
| 360 | 2 | 90.1±0.3 | 156±10 |
| 480 | 2 | 87.1±0.7 | 161±6 |
| 360 | 2 | 88.9±0.5 | 161±4 |
| 360 | 4 | 90.0±0.4 | 167±8 |
| 360 | 6 | 89.6±5.8 | 184±4 |
| 360 | 8 | 89.2±0.4 | 265±12 |

**2.5** 处方参数的单因素筛选

在上述参数工艺优化的基础上，以下继续采用单因素试验优化脂质体的处方参数。

**2.5.1** 脂药比

称取大豆磷脂 20 mg，**1** 分别 10、4、2.5 和 1.8 mg（即大豆磷脂与 **1** 的质量比分别为 2、5、8、11），其他条件同“**2.4**”项下优化结果，考察不同的脂药比对 **1** 脂质体包封率和粒径的影响，结果见表 4。由粒径和包封率结果可见，在脂药比 2 ～ 8 内存在最优脂药比。

**2.5.2** 胆固醇用量

在上述优化结果的基础上，考察胆固醇分别为 3、6、9、12 mg 时所得 **1** 脂质体的包封率和粒径，结果见表 5。胆固醇在脂质体中的作用是穿插在磷脂双分子层中起到稳定作用，根据包封率与粒径的结果，可见在胆固醇用量 3 ～ 9 mg 内存在最优用量。

**表 4　脂药比对包封率和粒径的影响**（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.4　Effect of Ratio of Phospholipid to Drug on Encapsulation Efficiency and Particle Size ($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

| 脂药比 | 包封率/% | 粒径/nm |
|---|---|---|
| 2 | 71.2±2.1 | 182±7 |
| 5 | 91.9±0.8 | 157±8 |
| 8 | 86.1±1.3 | 163±8 |
| 11 | 80.5±1.8 | 171±5 |

**表 5　胆固醇对包封率和粒径的影响**（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.5　Effect of Cholesterol on Encapsulation Efficiency and Particle Size ($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

| 胆固醇/mg | 包封率/% | 粒径/nm |
|---|---|---|
| 3 | 78.6±0.4 | 196±7 |
| 6 | 90.0±0.9 | 157±7 |
| 9 | 87.8±1.2 | 153±9 |
| 12 | 76.4±0.8 | 224±14 |

**2.5.3** 磷脂浓度

在上述优化结果的基础上，将经过旋蒸得到的脂质薄膜用纯化水水化至磷脂质量浓度分别为 0.5、1.25、2、2.5 mg/ml，考察不同的磷脂浓度对 **1** 脂质体包封率和粒径的影响，结果见表 6，可见磷脂质量浓度在 0.5 ～ 2 mg/ml 内存在最优解。并且，磷脂质量浓度过高时，制备的脂质体溶液中有时可见较小的颗粒状物质。

**表 6　磷脂质量浓度对包封率和粒径的影响**（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.6　Effect of Mass Concentration of Phospholipid on Encapsulation Efficiency and Particle Size ($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

| 磷脂质量浓度/mg·ml$^{-1}$ | 包封率/% | 粒径/nm |
|---|---|---|
| 0.5 | 89.8±0.3 | 150±13 |
| 1.25 | 90.9±0.3 | 147±5 |
| 2 | 88.7±0.8 | 172±4 |
| 2.5 | 78.7±0.9 | 221±8 |

**2.6** Box-Behnken 设计 - 响应面法优化处方

**2.6.1** 优化编码及水平

在上述试验基础上，选择对 **1** 脂质体影响较显著的 3 个因素：以脂药比（$X_1$）、胆固醇用量（$X_2$）和磷脂浓度（$X_3$）作为考察因素，以包封率（$Y_1$）、粒径（$Y_2$）为评价指标，采用 Box-Behnken 设计 - 响应面法对 **1** 脂质体处方进行优化。因素水平见表 7，表 8 为试验安排和结果。

**表 7 Box-Behnken 设计的因素及水平**

Tab.7 Factors and Levels for Box-Behnken Design

| 因素 | 水平 | | |
|---|---|---|---|
| | －1 | 0 | 1 |
| $X_1$ | 2 | 5 | 8 |
| $X_2$/mg | 3 | 6 | 9 |
| $X_3$/mg·ml$^{-1}$ | 0.5 | 1.25 | 2 |

**表 8 自变量和因变量**

Tab.8 Independent Variables and Dependent Variables

| 标准顺序 | 运行顺序 | 因素 | | | 响应 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $X_1$ | $X_2$/mg | $X_3$/mg·ml$^{-1}$ | $Y_1$/% | $Y_2$/nm |
| 6 | 1 | 8 | 6 | 0.5 | 79.2 | 187 |
| 17 | 2 | 5 | 6 | 1.25 | 89.2 | 143 |
| 15 | 3 | 5 | 6 | 1.25 | 88.7 | 137 |
| 3 | 4 | 2 | 9 | 1.25 | 77.2 | 199 |
| 11 | 5 | 5 | 3 | 2.0 | 75.4 | 177 |
| 9 | 6 | 5 | 3 | 0.5 | 82.3 | 169 |
| 14 | 7 | 5 | 6 | 1.25 | 89.1 | 154 |
| 8 | 8 | 8 | 6 | 2.0 | 77.4 | 192 |
| 4 | 9 | 8 | 9 | 1.25 | 77.2 | 163 |
| 10 | 10 | 5 | 9 | 0.5 | 77.4 | 159 |
| 12 | 11 | 5 | 9 | 2.0 | 76.9 | 173 |
| 16 | 12 | 5 | 6 | 1.25 | 91.2 | 134 |
| 1 | 13 | 2 | 3 | 1.25 | 79.1 | 170 |
| 5 | 14 | 2 | 6 | 0.5 | 81.7 | 192 |
| 13 | 15 | 5 | 6 | 1.25 | 91.6 | 147 |
| 7 | 16 | 2 | 6 | 2.0 | 72.3 | 189 |
| 2 | 17 | 8 | 3 | 1.25 | 74.1 | 181 |

**2.6.2** 多元二次回归方程的建立

应用 Design Expert 8.0 软件对结果进行方差分析以及多元二次回归方程拟合。拟合得到的回归方程模型见式①和②。

$Y_1$=90.01－0.32$X_1$－0.27$X_2$－2.34$X_3$+1.26$X_1X_2$+1.9$X_1X_3$+1.6$X_2X_3$－6.69$X_1^2$－6.37$X_2^2$－5.61$X_3^2$（$r$=0.971 4；模型：$F$=26.44，$P$=0.000 1，有统计意义；失拟项：$P$=0.229 2，无统计意义） ①

$Y_2$=143－3.37$X_1$－0.37$X_2$+3$X_3$－11.75$X_1X_2$+2$X_1X_3$+1.5$X_2X_3$+27.87$X_1^2$+7.37$X_2^2$+19.13$X_3^2$（$r$=0.932 8；模型：$F$=10.80，$P$=0.002 4，有统计意义；失拟项：$P$=0.472 3，无统计意义） ②

**2.6.3** 方差分析和显著性检验

上述 2 个拟合方程的相关系数分别为 0.971 4 和 0.932 8，说明模型的拟合程度良好，可用此模型对 **1** 脂质体的处方进行分析和预测。模型①中 $X_3$（$P$=0.005 1）、$X_1^2$（$P$<0.000 1）、$X_2^2$（$P$=0.003 2）和 $X_3^2$（$P$=0.000 2）有极显著影响，其他项不显著；模型②中 $X_1^2$（$P$=0.000 2）和 $X_3^2$（$P$=0.001 7）有极显著影响，$X_1X_2$（$P$=0.021 8）有显著影响，其他项不显著。

**2.6.4** 响应面优化与预测

应用 Design Expert 8.0 软件绘制影响 **1** 脂质体包封率与粒径的等高图与三维响应面图，由图 2 可知，当其中 1 个单因素取中值时，随着另外 2 个单因素的不断增大，**1** 脂质体的包封率均保持先增加后降低的变化趋势。由图 3 可知，当其中 1 个单因素取中值时，随着另外 2 个单因素的不断增大，**1** 脂质体的粒径则均呈现先减小后增大的变化趋势。

拟合得到的优化处方为 $X_1$=5.26，$X_2$=6.31 mg，$X_3$=1.19 mg/ml，此时 $Y_1$=89.9%，$Y_2$=143 nm。按上述优化结果制备了 3 批脂质体，每批 17.6 ml，测得其包封率和粒径分别为（88.2±1.2）%和（146±3）nm（$n$=3），与预期结果的偏差在 5%以内，最终计算处方载药量为 14.6%。

**2.7 1** 脂质体的体外表征

**2.7.1 1** 脂质体的粒径测定

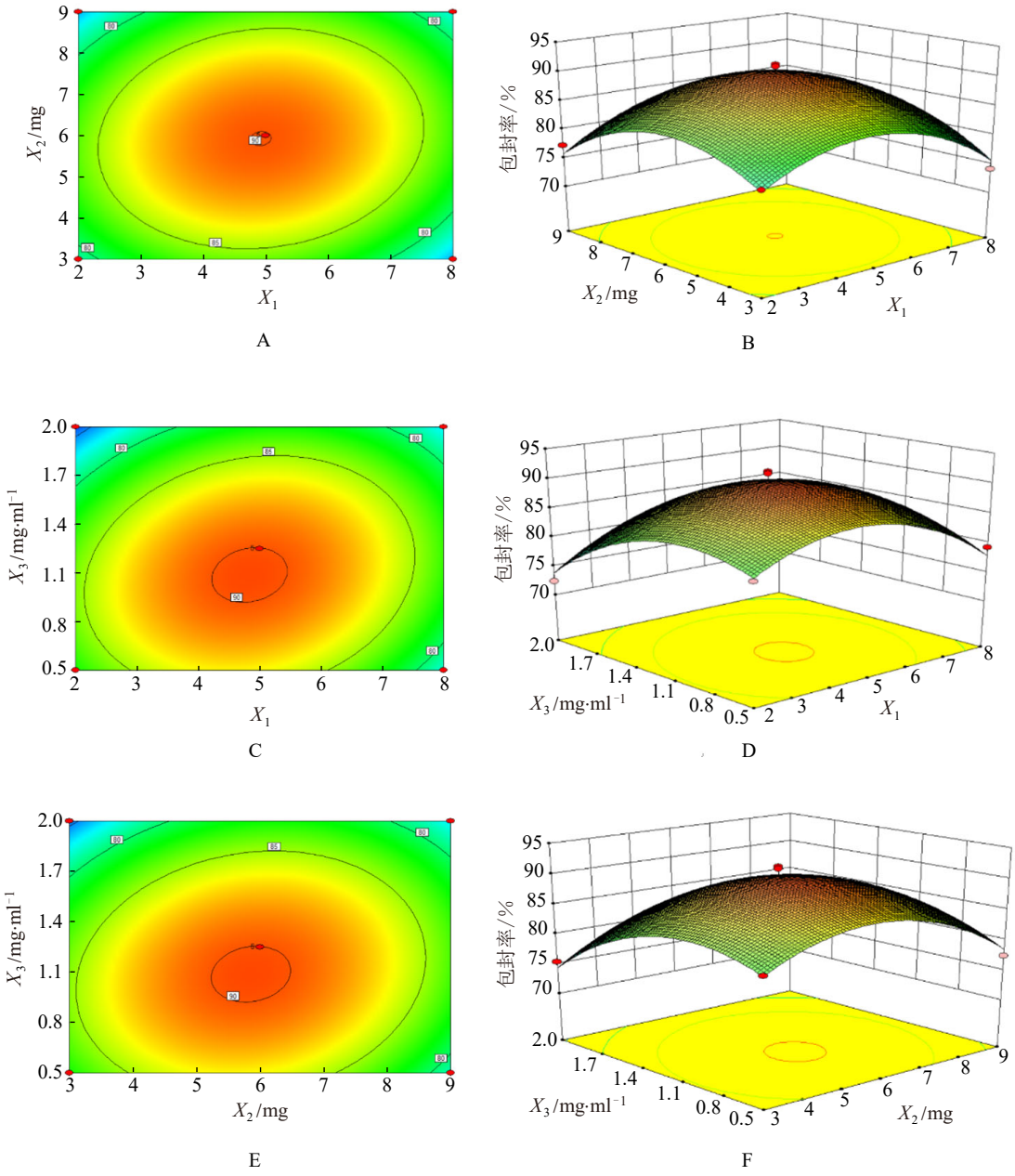
采用激光粒度测定仪，选择“Correlator Layout”为“Nanoparticles”，在 90°条件下测得 **1** 脂质体粒径为（146±3）nm（$n$=3），分布见图 4；测得 ζ 电位为（－38.63±0.13）mV（$n$=3）。

**2.7.2** 透射电镜下 **1** 脂质体的形态观察

取适量 **1** 脂质体滴在喷碳铜网表面，尽量使液体铺满整个铜网，放置适当时间使脂质体吸附，使用 2.0%磷钨酸溶液将脂质体染色后置透射电镜下观察形态，结果见图 5。由于大豆磷脂为脂溶性材料，染色后在电镜下呈亮色，图 5 中可看到明显的亮色球体，并且粒径均一，外观呈球形。

**2.7.3 1** 脂质体的体外释放试验

以 1% Teween-80 水溶液作为体外释放介质，精密移取 **1** 脂质体和 **1** 水溶液（**1** 先用少量 DMSO 溶解，再用纯化水稀释至所需体积，保证 **1** 在溶液中分散均匀）各 2 ml，分别加至处理好的透析袋（截留分子量为 1 000）中，将两端封紧，保证透析袋中的溶液不渗漏。然后将透析袋放入装有

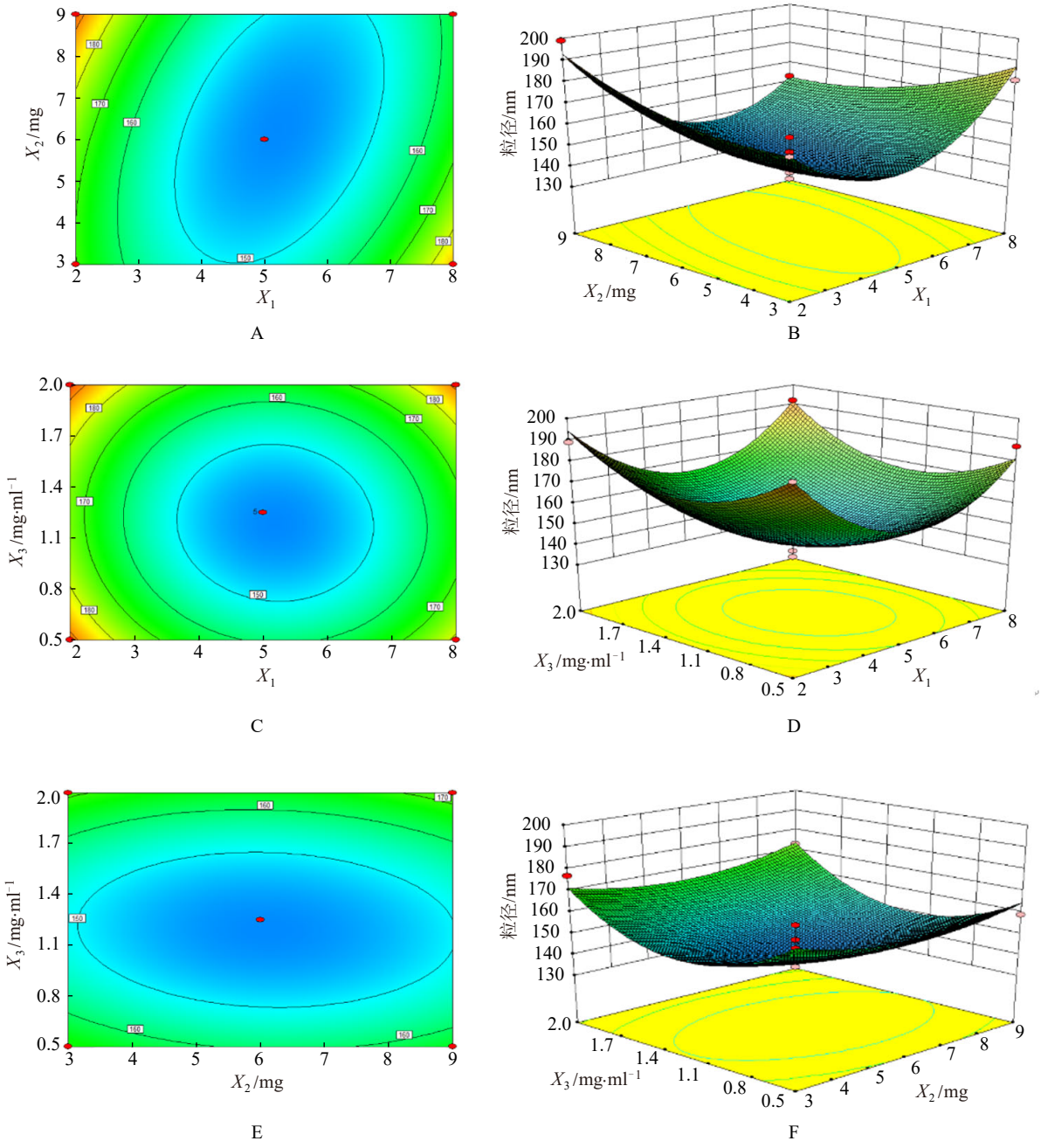



A 和 B：自变量 $X_1$ 和 $X_2$ 的影响，C 和 D：自变量 $X_1$ 和 $X_3$ 的影响，E 和 F：自变量 $X_2$ 和 $X_3$ 的影响

**图 2　因变量 $Y_1$ 的等高线图与 3D 响应面图**

Fig.2　Contour Plots and 3D Surface Response Plots of Dependent Variable $Y_1$

1% Teween-80 水溶液 25 ml 的离心管中；将该离心管置 (37±0.5)℃恒温振荡器中，在 100 r/min 的转速条件下振荡 72 h，分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72 h 时取样 0.5 ml（同时补充同温等量 1% Teween-80 水溶液），适当稀释后照“**2.1.1**”项下色谱条件检测，计算各采样点的累积释放率（$Q$），绘制释放曲线图，结果见图 6，**1** 脂质体在 24 h 时释放了 79.68%。体外释放数据的拟合结果显示，**1** 脂质体的释放符合 Weibull 方程 $Q$=0.888 3$t$ − 3.116 9（$r$=0.995 0）。




A 和 B：自变量 $X_1$ 和 $X_2$ 的影响，C 和 D：自变量 $X_1$ 和 $X_3$ 的影响，E 和 F：自变量 $X_2$ 和 $X_3$ 的影响

**图 3 因变量 $Y_2$ 的等高线图与 3D 响应面图**

Fig.3 Contour Plots and 3D Surface Response Plots of Dependent Variable $Y_2$

## 3 讨论

本试验在前期脂质体包封率测定中采用了凝胶柱色谱法、超滤膜法[7]，均未达到良好的分离效果。通过查阅文献得知鱼精蛋白等电点为 pH 10～12[8]，高于脂质体溶液，通过正电荷的鱼精蛋白对荷负电的脂质体进行絮凝、离心、沉淀，能达到良好的分离效果，因此采用鱼精蛋白沉淀法测定包封率。体外试验结果显示，采用超声法制备的 **1** 脂质体的体外释放程度相较于原料药显著提高，在 48 h 内有一定的缓释效果，提示借助制剂学手段对 **1** 进行剂型改造有望提高 **1** 的生物利用度。

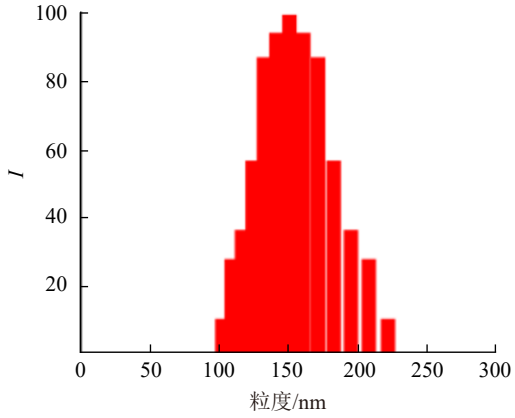



**图 4　1 脂质体粒度分布**

Fig.4　Distribution of Particle Size of **1** Liposomes

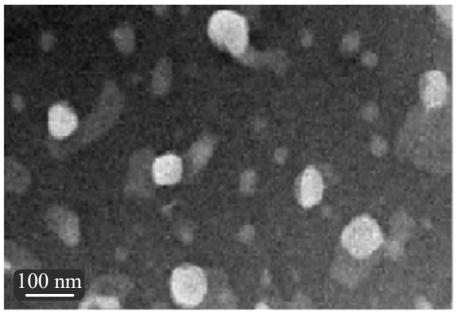



**图 5　1 脂质体透射电镜照片**（×300 000）

Fig.5　Transmission Electron Microscopical Image of **1** Liposomes (×300 000)

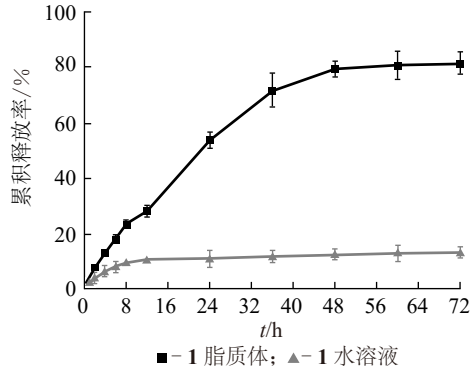



**图 6　体外释放情况**（*n*=3）

Fig.6　*In vitro* Release Profiles (*n*=3)

## 参考文献：


[1]　CHANDLER D, WOLDU A, RAHMADI A, *et al*. Effects of plant-derived polyphenols on TNF-alpha and nitric oxide production induced by advanced glycation end products [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, **54**(S2): S141-S145.

[2]　曾雪君, 袁　勇, 郭新红, 等. 香叶木素在大鼠小肠的吸收及 UGT 代谢特性[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2016, **34**(4): 457-462.

[3]　CLERE N, FAURE S, MARTINEZ M C, *et al*. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2011, **9**(2): 62-77.

[4]　PATEL K, GADEWAR M, TAHILYANI V, *et al*. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, **19**(10): 792-800.

[5]　刘卫斌, 薛彦宁, 秦永刚. 鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J]. 中国药房, 2010, **21**(39): 3695-3697.

[6]　DOU J, GU N. Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells [J]. *Tumour Biol*, 2010, **31**(4): 243-253.

[7]　李唐棣, 吕立勋, 赵琳琳. 凝胶法和超滤法测定rhGH脂质体包封率的比较[J]. 北方药学, 2013, **10**(8): 59-61.

[8]　陈丽萍, 吴智敏, 杨　畅, 等. 广藿香酮传递体包封率测定方法的筛选研究[J]. 中南药学, 2019, **17**(11): 1864-1868.