分类号： 密级：



**硕** 士 研 究 生 学 位 论 文

论文题目（中文） 甘草次酸囊泡包裹的 N-乳糖酰壳聚

糖纳米粒的制备及质量评价

论文题目（外文） Preparation and Quality Assessment of

Glycyrrhetnic Acid Vesicles cocoon N-

Galactosylated Chitosan Nanoparticles

研 究 生 姓 名 张亚会

学 科、专 业 中药学

研 究 方 向 中药制药工艺研究

导师姓名、职称 李喜香主任中药师

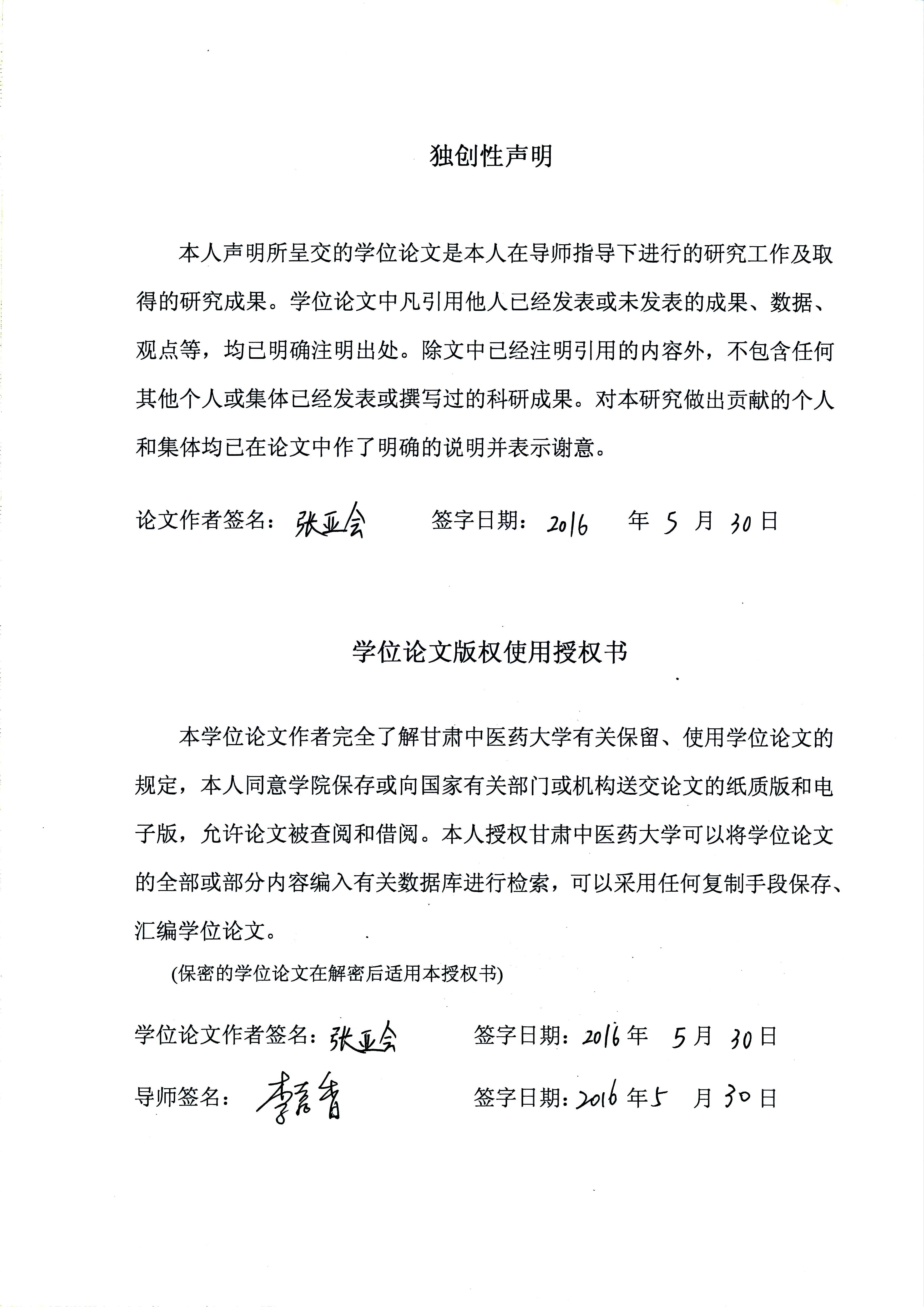
论 文 工 作

起 止 年 月 2014 年 01 月至 2015 年 11 月

论 文 提 交 日 期 2016 年 03 月

论 文 答 辩 日 期 2016 年 05 月

学位 授予日 期 2016 年 06 月



目 录

[摘](#_Toc686383473)[要](#_Toc686383473) 4

**[Abstract](#_Toc686383474)** 5

[缩略词](#_Toc686383475) 6

[前](#_Toc686383476)[言](#_Toc686383476) 7

[第一部分 甘草次酸](#_Toc686383477)**[N-](#_Toc686383477)**[乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备](#_Toc686383477) 8

**[1](#_Toc686383478)** [试验材料](#_Toc686383478) 8

**[1.1](#_Toc686383479)** [试验仪器](#_Toc686383479) 8

**[1.2](#_Toc686383480)** [试验药品](#_Toc686383480) 8

**[2](#_Toc686383481)** [方法与结果](#_Toc686383481) 8

**[2.1](#_Toc686383482)** [甘草次酸](#_Toc686383482)**[N-](#_Toc686383482)**[乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备](#_Toc686383482) 8

**[2.2](#_Toc686383483)** [甘草次酸含量测定方法的建立](#_Toc686383483) 9

**[2.3](#_Toc686383484)** [处方与工艺单因素考察](#_Toc686383484) 13

**[2.4](#_Toc686383485)** [处方优化](#_Toc686383485) 16

**[2.5](#_Toc686383486)** [最佳处方工艺](#_Toc686383486) 21

**[2.6](#_Toc686383487)** [最佳工艺验证](#_Toc686383487) 21

**[3](#_Toc686383488)** [小结](#_Toc686383488) 22

[第二部分 甘草次酸](#_Toc686383489)**[N-](#_Toc686383489)**[乳糖酰壳聚糖纳米粒的质量评价](#_Toc686383489) 22

**[1](#_Toc686383490)** [试验材料](#_Toc686383490) 22

**[1.1](#_Toc686383491)** [试验仪器](#_Toc686383491) 22

**[1.2](#_Toc686383492)** [试验药品](#_Toc686383492) 22

**[2](#_Toc686383493)** [方法与结果](#_Toc686383493) 23

**[2.1](#_Toc686383494)** [外观形态](#_Toc686383494) 23

**[2.2](#_Toc686383495)** [粒径、](#_Toc686383495)**[Zeta](#_Toc686383495)**[电位](#_Toc686383495) 23

**[2.3](#_Toc686383496)** [载药量及包封率](#_Toc686383496) 23

**[2.4](#_Toc686383497)** [稳定性](#_Toc686383497) 23

**[3](#_Toc686383498)** [小结](#_Toc686383498) 25

[第三部分 甘草次酸类脂囊泡的制备](#_Toc686383499) 26

**[1](#_Toc686383500)** [试验材料](#_Toc686383500) 26

**[1.1](#_Toc686383501)** [试验仪器](#_Toc686383501) 26

**[1.2](#_Toc686383502)** [试验药品](#_Toc686383502) 26

**[2](#_Toc686383503)** [方法与结果](#_Toc686383503) 26

**[2.1](#_Toc686383504)** [甘草次酸类脂囊泡的制备](#_Toc686383504) 26

**[2.2](#_Toc686383505)** [甘草次酸分析方法的建立](#_Toc686383505) 26

**[2.3](#_Toc686383506)** [甘草次酸类脂囊泡包封率的测定](#_Toc686383506) 31

**[2.4](#_Toc686383507)** [单因素试验](#_Toc686383507) 31

**[2.5](#_Toc686383508)** [处方工艺优化](#_Toc686383508) 36

**[2.6](#_Toc686383509)** [验证工艺](#_Toc686383509) 44

**[3](#_Toc686383510)** [小结](#_Toc686383510) 45

[第四部分 甘草次酸类脂囊泡的质量评价](#_Toc686383511) 45

**[1](#_Toc686383512)** [试验材料](#_Toc686383512) 45

**[1.1](#_Toc686383513)** [试验仪器](#_Toc686383513) 45

**[1.2](#_Toc686383514)** [试验药品](#_Toc686383514) 45

**[2](#_Toc686383515)** [方法与结果](#_Toc686383515) 45

**[2.1](#_Toc686383516)** [外观形态](#_Toc686383516) 45

**[2.2](#_Toc686383517)** [粒径、电位测定](#_Toc686383517) 45

**[2.3](#_Toc686383518)** [包封率](#_Toc686383518) 45

**[2.4](#_Toc686383519)** [稳定性](#_Toc686383519) 45

**[3](#_Toc686383520)** [小结](#_Toc686383520) 46

[第五部分 囊泡包裹的甘草次酸](#_Toc686383521)**[N-](#_Toc686383521)**[乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备](#_Toc686383521) 47

**[1](#_Toc686383522)** [试验材料](#_Toc686383522) 47

**[1.1](#_Toc686383523)** [试验仪器](#_Toc686383523) 47

**[1.2](#_Toc686383524)** [试验药品](#_Toc686383524) 47

**[2](#_Toc686383525)** [方法与结果](#_Toc686383525) 47

**[2.1](#_Toc686383526)** [类脂囊泡包裹的纳米粒的制备](#_Toc686383526) 47

**[2.2](#_Toc686383527)** [包封率与载药量](#_Toc686383527) 47

**[2.3](#_Toc686383528)** [单因素考察](#_Toc686383528) 48

**[2.4](#_Toc686383529)** [工艺验证](#_Toc686383529) 50

[第六部分 囊泡包裹的甘草次酸](#_Toc686383530)**[N-](#_Toc686383530)**[乳糖酰壳聚糖纳米粒的质量评价](#_Toc686383530) 51

**[1](#_Toc686383531)** [试验材料](#_Toc686383531) 51

**[1.1](#_Toc686383532)** [试验仪器](#_Toc686383532) 51

**[1.2](#_Toc686383533)** [试验药品](#_Toc686383533) 51

**[2](#_Toc686383534)** [方法与结果](#_Toc686383534) 51

**[2.1](#_Toc686383535)** [外观形态](#_Toc686383535) 52

**[2.2](#_Toc686383536)** [粒径及](#_Toc686383536)**[Zeta](#_Toc686383536)**[电位](#_Toc686383536) 52

**[2.3](#_Toc686383537)** [体外释放度](#_Toc686383537) 52

**[3](#_Toc686383538)** [小结](#_Toc686383538) 52

[结](#_Toc686383539)[论](#_Toc686383539) 54

[结](#_Toc686383540)[语](#_Toc686383540) 54

[均匀。](#_Toc686383541) 54

[参考文献](#_Toc686383542) 54

[附](#_Toc686383543)[录](#_Toc686383543) 56

[附录](#_Toc686383544)**[1](#_Toc686383544)** [甘草次酸](#_Toc686383544)**[N-](#_Toc686383544)**[乳糖酰壳聚糖纳米粒实物图与透射电镜图](#_Toc686383544) 56

[附录](#_Toc686383545)**[2](#_Toc686383545)** [甘草次酸类脂囊泡实物图](#_Toc686383545) 56

[附录](#_Toc686383546)**[3](#_Toc686383546)** [透析法结合紫外分光光度法测定](#_Toc686383546)**[GA-Ni](#_Toc686383546)**[包封率](#_Toc686383546) 56

[附录](#_Toc686383547)**[4](#_Toc686383547)** [体外释放度](#_Toc686383547) 56

[文献综述](#_Toc686383548) 56

[参考文献](#_Toc686383549) 58

[攻读硕士期间取得的学术成果](#_Toc686383550) 62

摘 **要**

目的及意义：

本试验采用类脂囊泡对甘草次酸N-乳糖酰壳聚糖纳米粒进行包裹，制备具有核壳结构的囊泡纳米粒自组装体，可有效的结合类脂囊泡和纳米粒的优势，达到被动靶向和主动靶向结合的效果，起到提高药物的靶向性并促进吸收的目的。为中药肝靶向新剂型的发展提供试验依据。

研究方法：

离子交联法制备甘草次酸N-乳糖酰壳聚糖纳米粒，正交试验设计优选Nps制备工艺各项参数；薄膜分散-超声法制备类脂囊泡，星点设计-响应面法优选制备工艺各项参数；薄膜分散-超声法制备囊泡包裹的N-乳糖酰壳聚糖纳米粒，单因素考察筛选处方工艺。透射电子显微镜观察外观形态，激光粒度分析仪测定平均粒径、多分散系数及Zeta电位，超速离心法结合高效液相色谱法测定载药量与包封率、反透析法结合紫外分光光度法研究体外释放度，综合评价其理化性质。研究结果：

通过处方优化，确定甘草次酸N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的最佳处方工艺为：甘草次酸质量浓度为0.2 mg/mL，N-乳糖酰壳聚糖质量浓度为2 mg/mL，N-乳糖酰壳聚糖溶液与三聚磷酸钠（TPP）溶液的体积比为20∶3；类脂囊泡的最佳处方工艺为Span-80∶Chol=11∶5，水合温度70℃，水合时间为51 min，超声

时间为60 min；类脂囊泡包裹的纳米粒的最佳处方工艺为：囊泡与纳米粒的质

量比为8∶1；水合温度为50℃；水合时间为40 min。类脂囊泡包裹的纳米粒平均粒径为（414.40±10.98）nm，Zeta电位为-(20.46±0.87) mV，载药量为（1

3.99±0.16）%，包封率为（87.19±0.31）%.1 h内释放7.2%, 12 h内释放76.8%，

24 h时释放度接近85%。研究结论：

离子交联法制备了甘草次酸N-乳糖酰壳聚糖纳米粒，制备的纳米粒粒径适宜，载药量和包封率较高，制备工艺稳定、可行；薄膜分散-超声法制备的甘草次酸类脂囊泡粒径较小，包封率较高，且制备的囊泡包裹的甘草次酸N-乳糖酰壳聚糖纳米粒粒径未明显增大，包封率高，所带电荷的电位稳定性高，且体外缓

1

释作用明显。

**关键字：**甘草次酸；纳米粒； N-乳糖酰壳聚糖；囊泡；体外释放

2

**Abstract**

Objectives and Meaning:

In this experiment, lipidvesicles were wrapped on glycyrrhetinic acid N-galactosylated chitosan nanoparticles, to prepare vesicles nanoparticles co-self-assembly architectures with core shell structure. Advantage can be effectively combined with lipid vesicles and nanoparticles to Achieve theeffect ofpassive and actively targeting of combination and the purpose of improve the target of the drug and promote the absorption. To provide an experimental basis for the development that the new dosage forms of traditional Chinese medicine liver targeting.

Research method:

The glycyrrhetinic acid N-galactosylated chitosan nanoparticles were prepared by ionic cross-linking, orthogonal design optimize the preparation process of the glycyrrhetinic acid N-galactosylated chitosan nanoparticles; The film dispersion-ultrasonic method for the preparation of lipid vesicles, the central composite design-response surface methodology optimize the preparation process of lipid vesicles; The film dispersion-ultrasonic method for the preparation of the glycyrrhetinic acid N- galactosylated chitosan nanoparticles encapsulated in lipid vesicles, The preparation process were optimized through single factor. Appearance ofnanoparticles was observed by transmission electron microscope, The average particle size, Zeta PDI and potential were measured by Zetasizer, Combine Over speed freezing centrifugation and HPLC to the exploration of its encapsulation efficiency and drug loading, Research the drug release behaviorinvitro by reversedialysis method and ultraviolet spectrophotometer method, Comprehensive

Evaluation of its physical and chemical properties. Research results:

Through prescription optimization, the glycyrrhetinic acid N- galactosylated chitosan nanoparticles optimal prescription was as follows: concentration of glycyrrhetinic and N- galactosylated chitosan was 0.2 and 2 mg/mL, ratio of N- galactosylated chitosan and TPP (1.0 mg/mL) \_solutions was 20∶3; The glycyrrhetinic acid similar liposome

Vesicles optimal prescription was as follows: Span-Chol ratio of11:5, hydration

3

Temperature was 70℃, hydration time was 51min, ultrasonic time of 60 min; The similar liposome vesicles cocoon nanoparticles optimal prescription as follows: the

Vesicles and the quality of the nanoparticles ratioof 8:1, hydration temperature was 50℃, hydration time was 40 min. The similar liposome vesicles cocoon nanoparticles,

Its mean diameter was(414.40±10.98) nm, Zeta potential was -(20.46±0.87) mV, the drug-loading efficiency and encapsulation efficiency were(13.99±0.16) % and

( 87.19±0.31) %. The release degree of 7.2 within 1 h, The release degree of 76.8

Within 12 h and 24 h release degree close to 85%. Research conclusion:

The glycyrrhetinic acid N-galactosylated chitosan nanoparticles were prepared by ionic cross-linking, preparation of nanoparticle size appropriate, drug loadingand encapsulation efficiency high, prepared process is stable and feasible; The film dispersion-ultrasonic method for the preparation of glycyrrhetinic acid simil-ar liposome vesicles, itsparticle size smaller, encapsulation efficiency higher, and the preparation of similar liposome vesicles cocoon nanoparticle. The particle size was not significantly increase, high encapsulation efficiency and stability of the charge of high potential, and the in vitro release effect is obvious.

**Key words:** Glycyrrhetinic acid; Nanoparticles; N- galactosylated chitosan; Vesicles: In vitro release

4

# 缩略词

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文名称** |
| CHOL | Cholesterol | 胆固醇 |
| CS | Chitosan | 壳聚糖 |
| GA | Glycyrrhetinic acid | 甘草次酸 |
| GA-Ni | Glycyrrhetinic acid niosomes | 甘草次酸类脂囊泡 |
| N-GC | N-galactosylated chitosan | N-乳糖酰壳聚糖 |
| Nps | Nanoparticles | 纳米粒 |
| Ni | Niosomes | 类脂囊泡 |
| TPP | Sodium tripolyphosphate | 三聚磷酸钠 |

GA-N-GC-Nps Glycyrrhetinic acid N-galactosylated chitosan Nanoparticles

甘草次酸N-乳糖酰壳聚糖纳米粒

5

前 **言**

近些年来，慢性病毒性肝炎、肝硬化、肝癌等肝脏疾病在我国发病率和死亡率逐年呈上升趋势，严重影响人们生活质量和生命健康。现代药理研究表明，甘草主要成分之一的甘草次酸(Glycyrrhetinic acid, GA)对肝炎病毒有一定抑制作用[1-3]，临床上常用来治疗慢性肝炎及肝癌。因GA制备成普通制剂，很难到达肝脏部位，故不能充分发挥其作用。因此，提高药物靶向性成为试验研究重点。

目前，GA常规剂型有注射剂和片剂，微球、脂质体等新剂型近年来也有相关文献报道，被动靶向设计的新剂型如脂质体和微球等，生物利用度较低且靶向性不高，易受到体内复杂环境的破坏。GA在水中溶解度小，平衡溶解度仅为6.32

mg/mL，油水分配系数P＝48978（lgP4.69），口服基本不吸收，普通注射剂的生物利用度低，严重影响其临床疗效的充分发挥[4-5]，因此，本试验旨在提高GA生物利用度。

壳聚糖(Chitosan, CS)，是一种聚阳离子天然高分子材料，无免疫原性[6]，且具有良好的生物可降解性与相容性[7]，在脂质体[8]、纳米粒[9]、微球[10]等给药系统中广泛应用，是一种具有广阔应用前景的新型载体材料。研究表明，提高肝主动靶向的重要方式是肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体介导途径，脂质体、纳米粒等是其常用的载体系统，其中纳米粒具有药物泄漏慢、靶向性好、细胞亲和性强的特点。因此，本试验首先以N-乳糖酰壳聚糖（N-galactosylated chitosan, N-GC）为载体制备具有主动靶向的N-乳糖酰壳聚糖纳米粒(N-galactosylated chitosan Nanoparticle, N-GC-NPs)，达到提高靶向性并促进其吸收的目的。

类脂囊泡（Niosomes, Ni）,是由非离子型表面活性剂自组装形成的密封双分子膜结构[11]。不像脂质囊泡易水解、氧化、泄漏药物[12]。与脂质体相比，其制备材料不含磷脂，避免了磷脂的氧化降解，且制备工艺简单，成本低，同时兼具缓释作用，提高药效和降低毒性的优点且有成本低、稳定性高、易得等优点。因此，采用甘草次酸类脂囊泡对具有主动靶向甘草次酸N-乳糖酰壳聚糖纳米粒

（Glycyrrhetinic acid N-galactosylated chitosan Nanoparticles, GA-N-GC-NPs）进行包裹，达到增加药物的溶解性、改变其体内分布、提高靶向性的目的。

本试验创新之处一是首次以N-GC为纳米载体材料，制备主动肝靶向

6

GA-N-GC-NPs。二是首次以GA-Ni包裹GA-N-GC-NPs，制备具有双重靶向性能的壳结构复合体。

本试验首先以GA为模型药物，以N-GC为载体材料，采用离子交联法[13-17]制备GA-N-GC-NPs胶体溶液，冷冻干燥法制备其冻干粉；在单因素试验的基础上，以N-GC溶液与三聚磷酸钠（Sodium tripolyphosphate, TPP）溶液的体积比、N-GC溶液浓度、TPP溶液浓度等因素进行正交试验优化制备工艺；对优化工艺所得纳米粒（Nanoparticles, Nps）通过透射电子显微镜观察其形态、激光粒度测定仪测定其粒径、超速离心法考察其包封率及载药量。其次，采用薄膜分散-超声法[18-24]制备GA-Ni，在单因素试验基础上，以Span-80∶Chol（v/v）、水合温度、水合时间、超声时间作为考察因素，以包封率为评价指标，采用星点设计-效应面法优化处方与工艺，对优化工艺所得NPs,透射电镜观察其形态、激光粒度测定仪测定其粒径、紫外分光光度法考察其包封率。最后，采用薄膜分散-超声法制备GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs，单因素考察Ni与Nps的比例、水合温度、水合时间的最佳处方组合；通过透射电子显微镜观察优化工艺所制得纳米粒形态、激光粒度测定仪测定其粒径、超速离心法考察其包封率及载药量、透析法考察其体外释药特性。从而增加药物的靶向性能，提高其生物利用度，降低甘草次酸的不良反应，为临床药物治疗肝病以及新型中药靶向制剂的研制提供理论和实验依据，使其更好的应用于临床，为广大患者带来福音。

7

# 第一部分 甘草次酸**N-**乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备

离子交联法是目前壳聚糖纳米粒使用最多的制备方法之一，该方法不使用有机溶剂，反应条件温和，室温下即可进行，制备的Nps有较高的药物包封率、可保持完整的药物活性。本部分主要考察N-GC与TPP溶液浓度、N-GC与TPP的体积比、pH值、搅拌条件等因素对NPs粒径及多分散系数(Polydispersity index, PDI)的影响，在单因素试验的基础上结合正交试验优化制备工艺，为进一步的质量评价奠定试验基础。

## **1** 试验材料

### **1.1** 试验仪器

Waters高效液相色谱仪，Waters 717自动进样器，Waters1525泵，Waters 2487双通道紫外检测器（美国，Waters公司）；OptimaMAX-XP台式超速离心机（美国，Beckman公司）；Zetasizer Nano 3600激光动态散射仪（英国，Malvern公司）；冷冻干燥机

（Scientz-18N，宁波新芝生物科技股份有限公司）；多头磁力加热搅拌器（HJ-6，巩义市予华仪器有限责任公司）；超声波清洗机（SB-3200DTT，宁波新芝生物科技股份有限公司）；电子分析天平（FA1004，上海良平仪器仪表有限公司）；CP225D电子天平（德国，Sartorius公司）；旋涡混合器（XH-T，金坛市医疗仪器厂）；酸度计（PHS-3C，杭州奥立龙仪器有限公司）。

### **1.2** 试验药品

CS（脱乙酰度97%，潍坊海之源生物制品有限公司，批号：HZY-CTS140428）；N-GC（中国医药工业集团四川抗菌素研究所合成，批号：20130525）；GA（质量分数

≥98%，西安富捷药业有限责任公司，批号：BW20121209Q）；GA对照品（中国食品药品检定研究院，供含量测定用，批号：110723-201413）；TPP（国药集团化学试剂有限公司，分析纯，批号：20130620）；水为超纯水；甲醇为色谱纯；其余试剂均为分析纯。

## **2** 方法与结果

### **2.1** 甘草次酸**N-**乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备

8

取处方量的N-GC溶解于1%醋酸水溶液中，制得澄清的N-GC溶液，再将适量的药物GA加入N-GC溶液中溶解，10%氢氧化钠调节该溶液的pH值在5～6间，磁力搅拌下将1.0 mg/mL TPP溶液在室温下以1滴/2秒的速度均匀逐滴加入其中，待溶液刚产生淡蓝色乳光停止滴加，继续搅拌30 min，0.45µm微孔滤膜过滤，即得GA-N-GC-NPs胶体溶液。若不加GA，同法可制备空白纳米粒胶体（N-GC-NPs）。

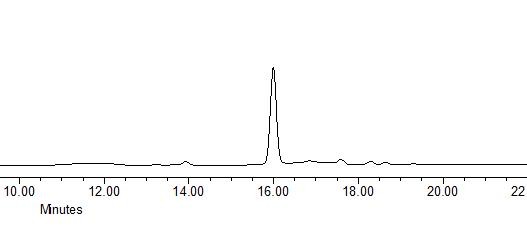
### **2.2** 甘草次酸含量测定方法的建立

#### 2.2.1 色谱条件[25-27]

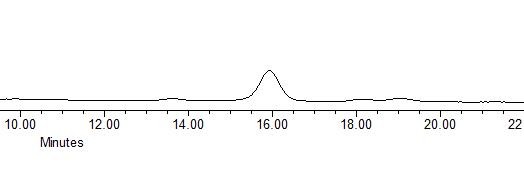
色谱柱为Hypersil ODS-C18柱（250 mm×4.6 mm, 5μm）；流动相为甲醇-水-冰醋酸（70∶29∶1）；体积流量1.0 mL/min；柱温为室温；检测波长250 nm；进样量20μL。

#### 2.2.2 专属性

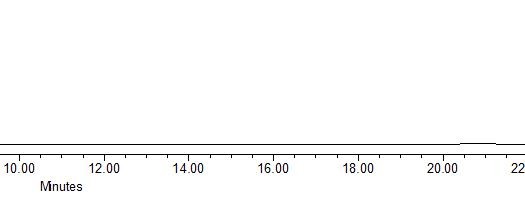
分别取适量的GA溶液（质量浓度为0.2 mg/mL）、GA-N-GC-NPs胶体溶液、空白N-GC-NPs胶体溶液，加甲醇稀释，超声破乳，过0.22μm微孔滤膜，取滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。GA色谱峰峰型良好，辅料及溶剂对样品测定无干扰。见图1-1。



A



B



C

图1-1 GA对照品(A)、GA-N-GC-NPs (B)和N-GC-NPs (C)样品HPLC 图

#### 2.2.3 供试品溶液的制备

制备GC质量浓度为2 mg/mL的GA-N-GC-NPs混悬液，精密吸取1 mL的GA-N- GC-NPs混悬液，于10 mL的容量瓶中，加入1%醋酸溶液定容至刻度，即得供试品溶液。

#### 2.2.4 线性及其范围

精密称取GA供试品适量，加甲醇溶解，制成400μg/mL的GA供试品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件分别进样2、5、10、15、20μL。以峰面积的积分值（A）对进样质量浓度（C）作图，得回归曲线，如图1-2。

9



图1-2 GA标准曲线

结果表明，GA在40～400μg/mL与峰面积积分值线性关系良好，其回归方程A＝1189.9C-6246.1，r＝0.9979。

#### 2.2.5 稳定性试验

精密称取0.08 g GA样品，置1000 mL容量瓶中定容至刻度，配置成质量浓度为80

μg/mL的溶液，分别于0、4、8、12、18、24 h测定其峰面积，并计算各自浓度，结果如表1-1所示。

表1-1 稳定性试验结果

时间（h）0 4 8 12 18 24 *X*±SD（μg/mL）RSD(%)

浓度（μg/mL）79.74 80.06 80.02 79.84 80.01 79.87 79.92±0.13 0.16

结果表明，GA在流动相中24 h内稳定。

#### 2.2.6 精密度试验

分别制备高、中、低（200、100、40μg/mL）3个质量浓度的GA对照品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，1 d进样6次，连续进样6 d，计算日间与日内精密度，结果如表1-2 。

表1-2 精密度试验结果（n=6）

浓度（μg/mL）

日内日间

*X*±SD（μg/mL）RSD(%) *X*±SD（μg/mL）RSD(%)

40 39.84±0.48 1.20 39.93±0.74 1.85

100 100.26±0.41 0.41 101.35±1.46 1.44

200 200.34±1.54 0.77 200.63±2.95 1.47

由上表可知，高、中、低三个浓度的日内精密度分别为0.77%、0.41%、1.20%，日

10

间精密度分别为1.47%、1.44%、1.85%，且均小于2%，表明高效液相色谱法测定GA

含量，其精密度符合方法学要求。

#### 2.2.7 回收率试验

精密称量GA对照品溶液4 mg、10 mg、20 mg，分别加入100 mL空白纳米粒混悬液，使浓度分别为40、100、200μg/mL，置于超声波清洗器中超声溶解，超速冷冻离心

（4℃, 30 000 r/min, 45 min），取上清液过0.45μm微孔滤膜，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，每个浓度平行操作6次，计算其回收率，结果如表1-3所示。

表1-3 回收率实验结果（n=6）

| 浓度（μg/mL） | 峰面积 | 测得浓度（μg/mL） | 回收率（%） | X ±SD(%) | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 41361.80 | 40.01 | 100.03 |  |  |
|  | 41219.01 | 39.89 | 99.73 |  |  |
|  | 41314.20 | 39.97 | 99.93 |  |  |
| 40 | 41492.69 | 40.12 | 100.30 | 99.94±0.31 | 0.32 |
|  | 41088.12 | 39.78 | 99.45 |  |  |
|  | 41456.99 | 40.09 | 100.23 |  |  |
|  | 117027.54 | 103.6 | 103.60 |  |  |
|  | 115183.20 | 102.05 | 102.05 |  |  |
|  | 116991.84 | 103.57 | 103.57 |  |  |
| 100 | 112351.23 | 99.67 | 99.67 | 102.18±1.75 | 1.71 |
|  | 112743.90 | 100.00 | 100.00 |  |  |
|  | 116242.21 | 102.94 | 102.94 |  |  |
|  | 227128.99 | 196.13 | 98.07 |  |  |
|  | 231864.79 | 200.11 | 100.06 |  |  |
|  | 231543.52 | 199.84 | 99.92 |  |  |
| 200 228247.49 | | 197.07 | 98.54 99.34±0.88 0.89 | | |
| 231769.60 | | 200.03 | 100.02 | | |
| 231579.21 | | 199.87 | 99.94 | | |

由上表可知，GA在高、中、低三种浓度中的平均回收率分别为（99.34±0.88）%，

11

（102.18±1.75）%，(99.94±0.31) %，相对标准偏差分别为0.89%，1.71%，0.32%，均小于2.0%，表明该法测定GA含量，准确度高。

### **2.3** 处方与工艺单因素考察

#### 2.3.1 N- GC质量浓度

GA质量浓度为0.1 mg/mL, TPP质量浓度为1.0 mg/mL, N-GC溶液与TPP溶液的体积比20∶3，N-GC质量浓度分别为0.5、1.0、2.0、3.0 mg/mL，按“2.1”项下方法制备GA-N-GC-NPs. 考察N-GC质量浓度对GA-N-GC-NPs平均粒径和PDI的影响。结果见表1-4.

表1-4 N-GC质量浓度对GA-N-GC-NPs的影响

| N-GC 浓度/(mg/mL) | 粒径/(nm) | 多分散系数/(PDI) |
| --- | --- | --- |
| 0.5 | 104.1 | 0.467 |
| 1.0 | 204.7 | 0.245 |
| 2.0 | 238.6 | 0.275 |
| 3.0 | 398.0 | 0.357 |

结果表明，N-GC质量浓度在0.5～3.0 mg/mL均能形成纳米粒，随着N-GC质量浓度的增大，平均粒径呈逐渐增大趋势，PDI先降低后增大，制备好的纳米粒胶体溶液静置后较稳定，未出现絮凝状沉淀。N-GC质量浓度在1.0～2.0 mg/mL时粒径和PDI较适宜。

#### 2.3.2 TPP溶液的质量浓度

N-GC质量浓度为1.0 mg/mL, GA质量浓度为0.1 mg/mL, N-GC溶液与TPP溶液的体积比20∶3，TPP溶液的质量浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL，按“2.1”项下方法制备GA-N-GC-NPs. 结果见表1-5.

表1-5 TPP溶液的浓度对GA-N-GC-NPs的影响

TPP浓度（mg/mL）粒径（nm）多分散系数（PDI）

| 0.5 | 248 | 0.346 |
| --- | --- | --- |
| 1.0 | 371 | 0.212 |
| 1.5 | 405 | 0.486 |
| 2.0 | 1000 | 1.000 |

结果表明，TPP质量浓度对粒径和PDI都有影响。当TPP的质量浓度为1.0 mg/mL

12

时PDI较小，分布较均匀，随着TPP质量浓度的增大，平均粒径和PDI呈增大趋势，当TPP的质量浓度大于2.0 mg/mL，制备的纳米粒分布不均匀，且体系不稳定，静置状态下会产生絮状沉淀。可能是TPP加入过多，导致N-GC的聚合量过大引起微粒团聚，物理稳定性降低。

#### 2.3.3 GC与TPP的体积比

GA质量浓度为0.1 mg/mL, TPP质量浓度为1.0 mg/mL, N-GC与TPP溶液的体积比分别为20∶1、20∶3、20∶5、20∶7，按“2.1”项下方法制备GA-N-GC-NPs. 结果见表1-6.

表1-6 N-GC溶液与TPP溶液体积比对GA-N-GC-NPs影响

| N-GC:TPP(V/V) | 粒径（nm） | 多分散系数（PDI） |
| --- | --- | --- |
| 20:1 | 247.8 | 0.417 |
| 20:3 | 312.5 | 0.253 |
| 20:5 | 423.1 | 0.384 |
| 20:7 | 524.6 | 0.476 |

结果表明，N-GC溶液与TPP溶液的体积比在试验选定的范围20∶1～20∶7均能形成纳米粒，随着TPP比例的增加，粒径呈增大趋势，PDI先减小后增大。当TPP的比例过大时，反应体系中负电荷磷酸根阴离子相对过量，与N-GC发生过度的聚合交联作用，容易发生聚集，进一步形成沉淀。在本试验研究的N-GC与TPP体积比20∶3～

20∶7范围内，所生成的GA-N-GC-NPs室温下静置24 h后，体系状态基本无变化。

#### 2.3.4 GA质量浓度

N-GC质量浓度为0.1 mg/mL, TPP质量浓度为1.0 mg/mL, N-GC溶液与TPP溶液的体积比为20∶3，GA质量浓度分别为0.05、0.1、0.2、0.3 mg/mL，按“2.1”项下方法制备GA-N-GC-NPs. 结果见表1-7.

表1-7 GA浓度对GA-N-GC-NPs的影响

| GA 浓度（mg/mL） | 粒径（nm） | 多分散系数（PDI） |
| --- | --- | --- |
| 0.05 | 359.6 | 0.334 |
| 0.1 | 289.2 | 0.244 |
| 0.2 | 286.8 | 0.267 |
| 0.3 | 571.0 | 0.512 |

结果表明，药物的投药量在0.05～0.3 mg/mL范围内，随着药量的增大，粒径与PDI

13

均呈先减小后增大的趋势，考虑到投药量较大时，GA-N-GC-NPs的载药量虽然会有所增加，但包封率可能降低。当药物浓度在0.1～0.2 mg/mL时GA-N-GC-NPs的粒径和均匀性比较适宜。

#### 2.3.5 pH 值

GA质量浓度为0.1 mg/mL, TPP质量浓度为1.0 mg/mL, N-GC质量浓度为1.0 mg/mL, N-GC溶液与TPP溶液的体积比20∶3，用10%的氢氧化钠调节体系的pH值为3、4、5、6，按“2.1”项下方法制备GA-N-GC-NPs。结果见表1-8。

表1-8 pH对GA-N-GC-NP的影响

| pH 值 | 粒径（nm） | 多分散系数（PDI） |
| --- | --- | --- |
| 3 | 溶液澄清透明 | — |
| 4 | 326.3 | 0.232 |
| 5 | 304.7 | 0.241 |
| 6 | 溶液分层 | — |

结果表明，反应体系的pH值过大或过小，溶液浑浊，即出现絮状沉淀，静置迅速分层。pH值大于5时GA-N-GC-NPs出现分层，稳定性降低。可能的原因是由于pH值增大后，即在酸性不足的条件下，N-乳糖酰壳聚糖中NH3+数目降低，更多以NH2原型存在，故无法在TPP阴离子周围形成稳定的GA-N-GC-NPs。综合GA-N-GC-NPs成形性和稳定性，确定制备体系的pH值为5。

#### 2.3.6 搅拌速度

GA质量浓度为0.1 mg/mL, TPP质量浓度为1.0 mg/mL, N-GC溶液与TPP溶液的体积比为20∶3，N-GC质量浓度为1.0 mg/mL，搅拌时的转速分别为600、720、840、

1000、1200 r/min，按“2.1”项下方法制备GA-N-GC-NPs. 结果见表1-9.

表1-9 搅拌速度对GA-N-GC-NPs的影响

| 转速（r/min） | 粒径（nm） | 多分散系数（PDI） |
| --- | --- | --- |
| 600 | 319.2 | 0.273 |
| 720 | 286.2 | 0.254 |
| 840 | 286.7 | 0.266 |
| 1000 | 297.4 | 0.257 |
| 1200 | 304.1 | 0.318 |

结果表明，搅拌主要是为了加速离子聚合反应，在一定的时间形成尽可能多的纳米

14

粒子，并避免加入TPP时局部浓度过高导致N-GC过度交联，形成微米级粒子。搅拌速度小于600 r/min平均粒径较大，搅拌速度在720～1000 r/min时，对平均粒径与PDI影响不明显，而且转速过快不利于试验顺利进行。故本试验搅拌速度选择720 r/min。

#### 2.3.7 搅拌时间

GA质量浓度为0.1 mg/mL, TPP质量浓度为1.0 mg/mL, N-GC质量浓度为1.0

mg/mL, GC溶液与TPP溶液的体积比为20∶3，TPP滴加完毕后室温下Nps胶体溶液分别用磁力搅拌器搅拌10、30、60、120 min。结果见表1-10。

表1-10 搅拌时间对GA-N-GC-NPs的影响

| 搅拌时间（min） | 粒径（nm） | 多分散系数（PDI） |
| --- | --- | --- |
| 10 | 371.4 | 0.312 |
| 30 | 293.2 | 0.224 |
| 60 | 289.3 | 0.227 |
| 120 | 302.0 | 0.218 |

结果表明，搅拌时间太短，粒径较大且不均匀，搅拌时间超过30 min对平均粒径与PDI的影响不大。聚合反应完成后，增加搅拌时间，会导致被包封的药物重新游离进入胶体溶液中，综合考虑时间成本等因素选择搅拌时间30 min。

### **2.4** 处方优化

预试验结合单因素试验的结果，选取N-GC溶液与TPP溶液的体积比（A）、GA质量浓度（B）、N-GC质量浓度（C）作为考察因素，每个因素选取3个水平，因素水平见表1-11。

表1-11 正交试验因素水平表

因素

水平

A （N-GC**∶**TPP） B （GA(mg/mL)） C （N-GC(mg/mL)）

1 20:3 0.10 1.0

2 5:1 0.15 1.5

3 4:1 0.20 2.0

15

以包封率（a）、载药量（b）、平均粒径（c）为评价指标筛选最佳处方组成，按

L9（34）正交设计试验[28]优化处方。应用综合加权评分法对试验结果进行综合分析，三个评价指标的权重系数分别为0.4、0.4、-0.2的权重，综合评分公式为：Y=0.4\*a/ 58.11+0.4\*b/ 7.01-0.2\*c/ 549.5。正交试验设计方案及结果见表1-12，方差分析见表1-13。

表1-12 正交试验设计方案及结果

| 试验号 | A | B | C | 包封率  /% | 载药量  /% | 平均粒径  /nm | 综合  评分 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 20∶3 (1) | 0.10 (1) | 1.0 (1) | 26.51 | 3.60 | 284.2 | 0.287 |
| 2 | 20∶3 | 0.15 (2) | 1.5 (2) | 41.73 | 5.76 | 367.7 | 0.485 |
| 3 | 20∶3 | 0.20 (3) | 2.0 (3) | 51.76 | 7.01 | 315.4 | 0.643 |
| 4 | 5∶1 (2) | 0.10 | 1.5 | 21.36 | 2.58 | 305.6 | 0.185 |
| 5 | 5∶1 | 0.15 | 2.0 | 35.86 | 3.60 | 402.1 | 0.307 |
| 6 | 5∶1 | 0.20 | 1.0 | 45.21 | 2.67 | 549.5 | 0.261 |
| 7 | 4∶1 (3) | 0.10 | 2.0 | 32.13 | 4.19 | 401.4 | 0.318 |
| 8 | 4∶1 | 0.15 | 1.0 | 33.23 | 3.98 | 423.7 | 0.304 |
| 9 | 4∶1 | 0.20 | 1.5 | 58.11 | 3.58 | 532.3 | 0.406 |
| K1 | 1.415 | 0.790 | 0.852 |  |  |  |  |
| K2 | 0.753 | 1.096 | 1.076 |  |  |  |  |
| K3 | 1.028 | 1.310 | 1.268 |  |  |  |  |
| R | 0.221 | 0.174 | 0.139 |  |  |  |  |

通过表1-12极差分析R值可知，考察指标为包封率、载药量和平均粒径时，其三个因素的影响程度大小为：N-GC溶液与TPP溶液的体积比（A）＞GA质量浓度（B）

＞N-GC质量浓度（C），数值直观分析表明A1＞A3＞A2，B3＞B2＞B1，C3＞C2＞C1，最佳工艺为A1 B3 C3。

16

表1-13 方差分析表

| 方差来源 | 离均差平方和 | 均方 | F 值 | P |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A | 0.074 | 0.0370 | 25.38 | ＜0.05 |
| B | 0.046 | 0.0230 | 15.68 |  |
| C | 0.029 | 0.0145 | 9.95 |  |
| D（误差） | 0.00 | 0.00 | 1.00 |  |
| 注：F0.05(2, 2) = 19 |  |  |  |  |

由表1-13方差分析可知，因素A对粒径、包封率和载药量有显著性影响（p＜0.05），而B、C对其影响不显著。综合以上各个因素的考虑，确定最佳工艺为A1B3C3，即N-GC溶液与TPP溶液的体积比为20∶3，GA质量浓度为0.2 mg/mL, N-GC质量浓度为 2

mg/mL。

### **2.5** 最佳处方工艺

将40 mg N-GC和3.5 mg的GA分别溶解于1%的醋酸溶液中，制得2.0 mg/mL的N-GC澄清溶液和0.175mg/mL的GA溶液，备用。在室温条件下，将GA的醋酸溶液在磁力搅拌（720 r/min）状态下，加入N-GC醋酸水溶液中，用0.10 g/mL NaOH调节溶液的pH值至5，再将1.0 mg/mL TPP溶液以每滴/2秒的速度缓慢均匀的滴入其中，直至溶液刚产生淡蓝色乳光为止，继续搅拌30 min，0.45μm的微孔滤膜滤过，即得GA-N-GC-NPs胶体溶液。

### **2.6** 最佳工艺验证

为进一步考察所优化工艺的稳定性及可靠性，按照正交试验结果得出的最优工艺，制备3批GA-N-GC-NPs。验证结果见表1-14。

17

表1-14 GA-N-GC-NPs验证试验结果

| NO. | 载药量/% | 包封率/% | PDI | 平均粒径/nm |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 7.61 | 50.94 | 0.2113 | 307.15 |
| 2 | 8.07 | 51.88 | 0.2311 | 321.47 |
| 3 | 8.54 | 51.75 | 0.1988 | 302.18 |
| x ±SD | 8.07±0.47 | 51.42±0.43 | 0.214±0.017 | 310.27±10.12 |

由上表可知，GA-N-GC-NPs的载药量、包封率、PDI及平均粒径均变化小，，表明制备工艺稳定性可行。

## **3** 小结

1.本部分成功建立了高效液相色谱法用于甘草次酸体外药物分析方法，方法学考察表明，该法样品预处理操作简便，灵敏度高，结果稳定，准确可靠。

2.本部分采用离子交联法成功制备GA-N-GC-NPs。在单因素试验的基础上，通过正交设计优化制备工艺，制备工艺稳定、可行，为后期的质量评价试验奠定了基础。

18

# 第二部分 甘草次酸**N-**乳糖酰壳聚糖纳米粒的质量评价

本部分主要对最佳处方工艺制备的GA-N-GC-NPs进行质量评价，包括采用激光粒度仪测定Nps的PDI和平均粒径，采用透射电子显微镜观察Nps的外观形态，采用超速离心法结合高效液相法测定Nps的包封率、载药量，为进一步制备GA-Ni包裹的

GA-N-GC-NPs奠定基础。

## **1** 试验材料

### **1.1** 试验仪器

TECNAIG2 F30透射电子显微镜（荷兰，Philips-FEI公司）；Zetasizer Nano 3600激光动态散射仪（英国，Malvern公司）；OptimaMAX-XP台式超速离心机（美国，Beckman公司）；Waters高效液相色谱仪，Waters1525泵，Waters 717自动进样器，Waters 2487双通道紫外检测器（美国，Waters公司）；Scientz-18N冷冻干燥机；XH-T旋涡混合器（金坛市医疗仪器厂）；CP225D电子天平（德国，Sartorius公司）。

### **1.2** 试验药品

GA-N-GC-NPs（自制，批号20140910），甲醇为色谱纯；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

## **2** 方法与结果

### **2.1** 外观形态

GA-N-GC-NPs混悬液外观基本无色、澄清、乳光明显。吸取少量GA-N-GC-NPs溶液，15%的乙醇稀释至适当倍数，滴至有碳膜的铜网上，稍干后用2%磷钨酸负染，用滤纸吸取铜网边缘多余液体，用透射电子显微镜（Transmission Electron Microscopy，

TEM）观察Nps的形态并摄片，见图2-1。可见Nps基本呈圆形或类圆形，大小及分布较均匀，粒子之间未见明显粘连和聚集现象。

19



图2-1 GA-N-GC-NPs透射电镜图

### **2.2** 粒径、**Zeta**电位

室温下，取适量GA-N-GC-NPs胶体溶液，用纯水分散，稀释到适当的浓度，用激光粒度分析仪测定纳米粒平均粒径和Zeta电位，粒径分布见图2-2，电位见图2-3。



图2-2 GA-N-GC-NPs平均粒径图



图2-3 GA-N-GC-NPs Zeta电位图

由图2-2, 2-3可得出，GA-N-GC-NPs的平均粒径为（310.27±10.12）nm，多分散系数为（0.214±0.017）。Zeta电位为（31.70±1.51）mV。一般来说，NPs表面电位大于

±25 mV时，NPs胶体溶液可以稳定存在，不易发生凝集[29]。

### **2.3** 载药量及包封率

包封率（entrapmentefficiency, EE）是指胶体溶液中NPs载体携带的药物量占体系

20

中总药物量的百分率。载药量（drug-loading amount, DL）是指NPs中所含药物的质量百分率。载药量和包封率是评价NPs优劣的两个重要指标[30-31]，本试验采用低温超速离心结合高效液相法测定GA-N-GC-NPs的包封率和载药量。

精密量取适量制备的GA-N-GC-NPs胶体溶液，置于10 mL的Beckman离心管中，低温超速（30000 r/min, 4℃）离心45 min，准确量取上清液1 mL，转移至10 mL的量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，过0.22μm微孔滤膜，取续滤液20μL按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算上清液中GA的含量，即为未被纳米粒包封的游离药物含量记作W1，GA的理论投料量记作W2；按下式计算包封率：

包封率（EE）%＝(W2－W1) /W2×100%

取离心后的沉淀物，纯化水充分洗涤3次，置-70℃冰箱中预冷冻成块状，转移至真空冷冻干燥机中冷冻干燥，得到纳米粒冻干粉末，精密称定其总质量，记作W。按下式计算载药量。

载药量（DL）%＝(W2－W1) /W×100%

由试验结果得到，GA-N-GC-NPs的包封率为（51.42±0.43）%，载药量为（8.07±0.47）%。

### **2.4** 稳定性

将制备的GA-N-GC-NPs胶体溶液分别保存于4℃条件下的冰箱与室温（20-25℃）下，分别在0、15 d及1、2、4、6个月定时取样测定其包封率、pH值并观察其粒径大小变化，综合考察其稳定性，结果见表2-1。

表2-1 4℃和室温下GA-N-GC-NPs的稳定性

pH值包封率/%平均粒径/nm

| 时间 | 4℃ | 室温 | 4℃ | 室温 | 4℃ | 室温 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0d | 5.00 | 5.00 | 50.00 | 50.00 | 302.2 | 302.2 |
| 15d | 4.98 | 4.96 | 49.95 | 49.93 | 304.6 | 311.4 |
| 1 个月 | 4.95 | 4.91 | 49.91 | 49.89 | 309.1 | 317.5 |
| 2 个月 | 4.93 | 4.87 | 49.88 | 49.85 | 313.3 | 328.2 |
| 4 个月 | 4.91 | 4.82 | 49.84 | 49.76 | 316.1 | 344.6 |
| 6 个月 | 4.83 | 4.73 | 49.76 | 49.64 | 323.9 | 419.3 |
|  |  |  | 21 |  |  |  |

由表2-1可知，4℃条件下贮藏的Nps仍是淡蓝色乳光的胶体溶液，包封率和粒径没有明显变化，具有一定的稳定性。保存于室温条件下的NPs的胶体溶液随着保存时间的延长有絮凝状聚集沉淀出现，粒径明显增大。

## **3** 小结

经优化工艺制备的GA-N-GC-NPs胶体溶液外观基本无色、澄清、乳光明显；透射电子显微镜观察Nps的形态，电镜下观察Nps基本呈圆形或类圆形，大小及分布较均匀，粒子之间未见明显粘连或聚集现象。激光粒度测定仪测定Nps的平均粒径和多分散系数，其平均粒径为（310.27±10.12）nm，PDI为（0.214±0.017），Zeta电位为（31.70±1.51）

mV。超速冷冻离心结合高效液相法测定包封率和载药量，包封率为（51.42±0.43）%，载药量为（8.07±0.47）%。包封率、载药量较高，为下一步囊泡包裹GA-N-GC-NPs的制备奠定了基础。

22

# 第三部分 甘草次酸类脂囊泡的制备

Ni是在亲水介质中由Chol和非离子表面活性剂自组装形成的具有闭合结构的双分子膜体系[32]。与脂质体有相似的行为与优点，并且不易泄漏，具有更好的体外、体内稳定性。本部分试验以非离子表面活性剂和Chol为囊材，薄膜分散-超声法制备甘草次酸类脂囊泡（Glycyrrhetinic acid niosomes, GA-Ni），并采用星点设计-响应面法优化制备工艺及处方，为GA-Ni的质量评价提供基础。

## **1** 试验材料

### **1.1** 试验仪器

CP225D电子天平（德国，Sartorius公司）；UV-1800紫外分光光度仪（日本，

SHIMADZU公司）；Zetasizer Nano 3600激光动态散射仪（英国，Malvern公司）；TECNAIG2 F30透射电子显微镜（荷兰，Philips-FEI公司）；RE-3000旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；HJ-6多头磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；SB-3200DT超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）。

### **1.2** 试验药品

甘草次酸对照品（批号110723-201413，质量分数为98.5%，供含量测定用，中国食品药品检定研究院）；甘草次酸（批号BW20121209Q，质量分数≥98%，西安富捷药业有限责任公司）；司盘60（批号201304291），司盘80（批号201305151）、吐温80

（批号201302151）均购自成都艾科达化学试剂有限公司；胆固醇（批号20120329，国药集团化学试剂有限公司）；透析袋（截留分子量：8000-14000，北京博奥拓达科技有限公司）；氯仿、乙醇、甲醇等其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

## **2** 方法与结果

### **2.1** 甘草次酸类脂囊泡的制备

以非离子表面活性剂和Chol为囊材，采用薄膜分散-超声法制备GA-Ni。精密称取

23

处方量的GA，非离子表面活性剂与Chol加入圆底烧瓶中，加入适量的氯仿∶乙醇（4∶1, v/v）混合溶液使溶解，旋转蒸发仪上50℃减压回收有机溶剂，至烧瓶内壁形成均匀透明的一层薄膜，加入适量的超纯水控温并搅拌一定时间，薄膜溶胀水合，使贴壁的类脂囊泡从壁上脱落，然后将此混悬液超声（功率180 W，频率40 KHz）一定时间使之分散均匀，即得乳白色的GA-Ni混悬液，4℃条件下保存，备用。若不加GA，同法可制备空白Ni混悬液。

### **2.2** 甘草次酸分析方法的建立

#### 2.2.1 对照品溶液的制备

取干燥至恒重的GA对照品2.0 mg，精密称定，置100 mL的容量瓶中，用适量甲醇溶解，定容至刻度，摇匀，作为对照品储备液。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

精密量取“2.1”项下GA-Ni混悬液1 mL于10 mL的容量瓶中，加入乙醇适量，超声破乳，定容至刻度，即得供试品溶液，备用。

#### 2.2.3 检测波长的确定[33-36]

分别将“2.2.1”项下的GA对照品溶液、“2.2.2”项下的类脂囊泡供试品溶液及空白的Ni混悬液用乙醇稀释至适宜的浓度，用UV-1800紫外分光光度仪在200～400 nm内进行光谱扫描。

结果显示，GA最大吸收波长为250 nm，空白囊泡的辅料及溶剂对GA的检测基本无干扰，故以250 nm作为检测波长。

#### 2.2.4 线性及其范围

称取GA对照品适量，精密称定，置于10 mL量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成16μg/mL的GA储备液。分别精密量取上述储备液0.25, 0.5，1.25，2.5，5

mL于10 mL的容量瓶中，用甲醇稀释成质量浓度分别为0.4、0.8、2.0、4.0, 8.0μg/mL的系列溶液。以甲醇为空白溶剂，在250 nm处测定吸光度值（A）。以吸光度值（A）对浓度C（μg/mL）作图，得回归曲线，如图3-1。

24



图3-1 GA的标准曲线图

结果表明，GA在0.4～8.0µg/mL范围内与吸光度值线性关系良好，其回归方程为：

A=0.019C+0.067, r=0.9979（n=5）。

#### 2.2.5 精密度试验

分别取“2.2.4”项下0.4、8、16μg/mL的GA对照品溶液3mL,平行取样6份，在波长250 nm处测定吸光度值，日内重复测定6次，日间连续6 d测定，记录吸光度值，计算日内与日间精密度的RSD，结果如表3-1所示。

表3-1 精密度试验结果（n=6）

浓度（μg/mL）

日内日间

*X*±SD（μg/mL）RSD(%) *X*±SD（μg/mL）RSD(%)

0.4 0.402±0.002 0.38 0.401±0.004 0.94

8 8.06±0.04 0.54 7.95±0.11 1.34

16 16.04±0.13 0.81 16.00±0.25 1.58

上表结果显示，高、中、低三个浓度的日内RSD分别为0.81%、0.54%、0.38%，日间RSD分别为1.58%，1.34%，0.94%，均小于2%，表明紫外分光光度法测定GA含量，其精密度符合方法学要求。

#### 2.2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液，分别于0，4，8，12，18，24 h，在波长250 nm处测定其吸光度，结果如表3-2所示。

表3-2 稳定性试验结果

| 时间（h） | 0 | 4 | 8 | 12 | 24 | X ±SD（μg/mL） | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 吸光度 A | 0.145 | 0.148 | 0.146 | 0.147 | 0.148 | 0.148±0.002 | 1.41 |

结果表明，供试品在常温条件下24 h内基本稳定。

25

#### 2.2.7 回收率试验

精密称取GA对照品适量，用适量空白纳米粒混悬液溶解并稀释，使其浓度分别为0.4、8、16μg/mL，置于超声波清洗器中超声破乳，在250 nm处测定吸光度，每个浓度平行操作6次，计算回收率，结果如表3-3所示。

表3-3 回收率实验结果（n=6）

| 浓度（μg·mL-1） | 吸光度 A | 浓度 | 回收率（%） | X ±SD(%) | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.0748 | 0.411 | 102.80 |  |  |
|  | 0.0747 | 0.406 | 101.50 |  |  |
|  | 0.0745 | 0.397 | 99.25 |  |  |
| 0.4 |  |  |  | 100.83±1.91 | 1.90 |
|  | 0.0748 | 0.411 | 102.80 |  |  |
|  | 0.0744 | 0.392 | 98.00 |  |  |
|  | 0.0747 | 0.403 | 100.75 |  |  |
|  | 0.2192 | 8.01 | 100.10 |  |  |
|  | 0.2196 | 8.03 | 100.38 |  |  |
|  | 0.2194 | 8.02 | 100.25 |  |  |
| 8 |  |  |  | 99.96±1.20 | 1.19 |
|  | 0.2209 | 8.10 | 101.30 |  |  |
|  | 0.2188 | 7.99 | 99.88 |  |  |
|  | 0.2156 | 7.82 | 97.75 |  |  |
|  | 0.3712 | 16.01 | 100.10 |  |  |
|  | 0.3720 | 16.05 | 100.31 |  |  |
| 16 | 0.3733 | 16.12 | 100.75 | 100.73±0.56 | 0.56 |
|  | 0.3746 | 16.19 | 101.20 |  |  |
|  | 0.3758 | 16.25 | 101.56 |  |  |
|  | 0.3725 | 16.08 | 1.005 |  |  |

26

由上表可知，GA在高、中、低三种浓度的平均回收率分别为（100.73±0.56）%、

（99.96±1.20）%、(100.83±1.91) %，相对标准偏差分别为0.56%、1.19%、1.90%均小于2.0%，表明紫外分光光度法测定GA含量，其准确度高。

### **2.3** 甘草次酸类脂囊泡包封率的测定

#### 2.3.1 反透析时间的确定

精密量取3 mL的GA-Ni混悬溶液，置于100 mL的容量瓶中，用乙醇定容，转移至锥形瓶中。再精密量取乙醇6 mL，置于已处理的透析袋中，两端扎紧，室温下磁力搅拌。在透析过程中，分别于1、2、4、6、8、10 h吸取透析袋内的透析液3 mL，同时在透析袋内补充3 mL乙醇，测定其游离的药物浓度，计算包封率[37]。药物包封率的变化曲线见图3-2。



图3-2 反透析平衡时间的考察

由图可见，在8 h时药物包封率已经达到最大值，且在8-10 h时药物包封率不在发生变化，说明已达到平衡。故透析平衡时间为8 h。

#### 2.3.2 GA-Ni包封率测定

精密量取GA-Ni混悬溶液3 mL，置于100 mL的容量瓶中，用乙醇稀释并定容至刻度，再将此溶液转移至100 mL锥形瓶中。再精密量取乙醇6 mL，置于已处理过的透析袋中，两端扎紧，放入锥形瓶中，室温下磁力搅拌8 h时取出透析袋内的透析液，按紫外分光光度法在250 nm处测定GA吸光度，计算游离药物的浓度，计为m1，按以下公式计算：

EE%=（1-W1/W）×100%

其中，EE%为包封率，W1为游离的药物的量，W为GA-Ni混悬溶液中药物的总量。

27

### **2.4** 单因素试验

#### 2.4.1 表面活性剂的选择

表面活性剂和Chol的浓度均为0.1 mg/mL, GA的浓度为0.6 mg/mL，表面活性剂：

Chol=1∶1（v/v），按“2.1”项下方法制备GA-Ni，按“2.3.2”项下方法测定包封率，考察不同类型的表面活性剂及其配比对GA-Ni包封率的影响，见表3-4、3-5。

表3-4 表面活性剂种类对GA-Ni包封率的影响

表面活性剂类型包封率/%

Span-60 49.17

Span-80 75.62

Tween-80 66.80

表3-5 Span-60与Tween-80比例对GA-Ni包封率的影响

| Span-60: Tween-80 | 包封率/% | |
| --- | --- | --- |
| 1:2 | 36.80 | |
| 2:3 | 21.81 | |
| 1:1 | 40.33 | |
| 3:2 | 22.69 | |
| 2:1 | 15.64 | |
| 表 3-6 Span-80 与 Tween-80 比例对 GA-Ni 的影响 | | |
| Span-80: Tween-80 |  | 包封率/% |
| 1:2 |  | 40.17 |
| 2:3 |  | 57.97 |
| 1:1 |  | 30.63 |
| 3:2 |  | 40.33 |
| 2:1 |  | 12.10 |
|  | 28 |  |

由表3-4可知，Span-80与Tween-80制备的GA-Ni的包封率较高，且Span-80制备的GA-Ni混悬液外观均一，稳定性较好。

由表3-5、3-6可知，Span-60与Tween-80的不同比例制备得到的GA-Ni的包封率均比较低，制备过程中形成的混悬液不均匀。由于GA的水溶性较差，采用脂溶性的Span做囊材，包封效果较好。所以采用Span-80作为表面活性剂。

#### 2.4.2 Span80与Chol比例的选择

Span-80与胆固醇的浓度均为0.1 mg/mL, GA质量浓度0.6 mg/mL，水合温度55℃，

水合时间40 min，超声时间40 min，按“2.1”项下方法制备GA-Ni，“2.3.2”项下方法测定包封率，考察Span-80溶液与Chol溶液的体积比对GA-Ni包封率的影响，见表3-7。

表3-7 Span-80与Chol的比例对GA-Ni包封率的影响

| Span-80：Chol | 包封率/% |
| --- | --- |
| 1:3 | 50.36 |
| 1:1 | 69.14 |
| 2:1 | 72.34 |
| 3:1 | 62.08 |

由表3-7可知，Span-80溶液与Chol溶液在试验考查的比例范围内均能形成Ni。当二者的体积比为1: 1～2:1时，Chol起到了良好的稳定双层膜的作用，包封率较高。这可能是因为Chol是常用的膜添加剂，Chol与表面活性剂混合后可以填充在由表面活性剂单体形成的分子空隙中，赋予双层膜一定的刚性[38]，使膜的流动性降低，增加膜的稳定性，降低渗透性，提高包封率。有利于囊泡的形成。。

#### 2.4.3 GA质量浓度的筛选

Span-80与Chol的浓度均为0.1 mg/mL，体积比为1: 1，水合温度55℃，水合时间40 min，超声时间40 min，按“2.1”项下方法制备GA-Ni，按“2.3.2”项下方法测定包封率，考察GA质量浓度对GA-Ni包封率的影响，见表3-8。

29

表3-8 GA质量浓度对GA-Ni包封率的影响

| GA/（ mg/mL） | 包封率/% |
| --- | --- |
| 0.2 | 52.04 |
| 0.4 | 63.45 |
| 0.6 | 75.67 |
| 0.8 | 59.89 |
| 1.0 | 57.28 |

由表3-8可知，当GA质量浓度为0.6 mg/mL时，包封率出现最大值，随着药物质量浓度的增大，包封率出现下降的趋势，说明囊泡的包封容量是有限的，这与相关文献的研究结果是一致的[39]。

#### 2.4.4 Chol与水合介质体积比的筛选

Span-80与Chol的浓度均为0.1 mg/mL，体积比为1: 1，GA质量浓度0.6 mg/mL，水合温度55℃，水合时间40 min，超声时间40 min, Chol与水合介质的体积比分别为

1: 1，1:2，1:3，1:4，1:5，按“2.1”项下方法制备GA-Ni，按“2.3.2”项下方法测定包封率，考查水合介质体积对GA-Ni包封率的影响，见表3-9。

表3-9 Chol与水合介质体积比对GA-Ni包封率的影响

| Chol：水 | 包封率/% |
| --- | --- |
| 1:1 | 31.46 |
| 1:2 | 64.28 |
| 1:3 | 80.40 |
| 1:4 | 65.74 |
| 1:5 | 40.10 |

由表3-9可知，当Chol溶液与水溶液的体积比为1: 1时，在旋转蒸发回收有机溶剂过程中，烧瓶瓶壁上的薄膜分散不均匀，水合后混悬液表面出现片状漂浮物。故本实验选择Chol溶液与水溶液的体积比为1: 3。

#### 2.4.5 水合温度

Span-80与Chol的浓度均为0.1 mg/mL，体积比为1: 1，GA质量浓度0.6 mg/mL，水合时间40 min，超声时间40 min, Chol溶液与水溶液的体积比为1: 3，按“2.1”项下

30

方法制备GA-Ni，按“2.3.2”项下方法测定包封率，考查水合温度对GA-Ni包封率的影响，见表3-10。

表3-10 水合温度对GA-Ni包封率的影响

温度/℃包封率/%

25 34.97

40 48.89

55 64.28

70 73.07

由表3-10可知，水合温度在55℃～70℃时GA-Ni的包封率较高，而且制备过程较短。水合温度应该保持在Span-80的相变温度以上，若温度过低，形成Ni的膜的流动性大，可能导致包封率的下降。因此确定55℃～70℃作为水合温度进一步优化。

#### 2.4.6 水合时间

Span-80与Chol的浓度均为0.1 mg/mL，体积比为1: 1，GA质量浓度为0.6 mg/mL，超声时间为40 min, Chol溶液与水溶液的体积比为1: 3，按“2.1”项下方法制备GA-Ni，按“2.3.2”项下方法测定包封率，考查水合温度对GA-Ni包封率的影响，见表3-11。

表3-11 水合时间对GA-Ni包封率的影响

| 水合时间/min | 包封率/% |
| --- | --- |
| 10 | 78.20 |
| 40 | 84.06 |
| 70 | 79.66 |
| 100 | 70.87 |
| 130 | 72.43 |

由表3-11可知，水合时间10 min时形成的混悬液不均匀，稳定性较低。时间延长时包封率有略微的变小，40 min～70 min较为适宜，均能形成均一的GA-Ni。

#### 2.4.7 超声时间

按上述优化的处方组成制备GA-Ni，水合温度55℃，水合时间40 min，考察超声时间对GA-Ni包封率的影响，见表3-12。

31

表3-12

超声时间对GA-Ni包封率的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 超声时间/min |  | 包封率/% |
| 20 |  | 78.20 |
| 40 |  | 69.14 |
| 60 |  | 91.39 |
| 80 |  | 81.86 |
| 100 |  | 73.80 |

由上表可知，超声60 min左右时GA-Ni包封率最高。这可能是由于对药物的包封及形成，均需要囊泡从外部获取能量[40]，在一定时间范围内，超声有利于对药物的包封和囊泡的形成，但一部分较大的多室囊泡由于超声时间过长被打碎，部分药物被释放出来，造成包封率下降[41]。

### **2.5** 处方工艺优化

#### 2.5.1 试验设计

综合考虑上述因素对囊泡包封率的影响，在单因素试验的基础上，选Span-80∶Chol

（v/v）（A）、水合温度（B）、水合时间（C）、超声时间（D）作为考察因素，以包封率为评价指标，采用星点设计-效应面法[42-46]优化处方与工艺，优选因素与水平见表3-13，试验设计及结果见表3-14，方差分析见表3-15。

表3-13 星点设计因素水平表

水平

X1(Span-80: Chol/v/v) X2(水合温度/℃) X3(水合时间/min) X4（超声时间/min）

| 编码 |  | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| -1.682 | 3:05 | 49.89 | 29.77 | 33.18 |
| -1 | 1:01 | 55 | 40 | 40 |
| 0 | 3:02 | 62.5 | 55 | 50 |
| 1 | 2:01 | 70 | 70 | 60 |
| 1.682 | 7:03 | 75.11 | 80.23 | 66.82 |

32

表3-14 实验设计及结果

| No. | Span-80:Chol/(v/v) | 水合温度/℃ | 水合时间/min | 超声时间/min | 包封率/% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 3:2 | 62.50 | 55.00 | 50 | 80.52 |
| 2 | 3:2 | 62.50 | 80.23 | 50 | 63.85 |
| 3 | 3:2 | 62.50 | 29.77 | 50 | 69.15 |
| 4 | 1:1 | 70.00 | 40.00 | 60 | 67.04 |
| 5 | 3:2 | 62.50 | 55.00 | 66.82 | 84.68 |
| 6 | 3:2 | 49.89 | 55.00 | 50 | 61.16 |
| 7 | 3:2 | 62.50 | 55.00 | 50 | 82.21 |
| 8 | 1:1 | 55.00 | 70.00 | 40 | 49.81 |
| 9 | 7:3 | 62.50 | 55.00 | 50 | 54.67 |
| 10 | 2:1 | 55.00 | 70.00 | 60 | 31.33 |
| 11 | 3:2 | 75.11 | 55.00 | 50 | 55.32 |
| 12 | 2:1 | 55.00 | 40.00 | 60 | 50.81 |
| 13 | 3:2 | 62.50 | 55.00 | 33.18 | 68.03 |
| 14 | 1:1 | 70.00 | 70.00 | 60 | 61.21 |
| 15 | 3:2 | 62.50 | 55.00 | 50 | 81.38 |
| 16 | 2:1 | 70.00 | 40.00 | 40 | 44.09 |
| 17 | 1:1 | 55.00 | 40.00 | 40 | 59.44 |
| 18 | 2:1 | 70.00 | 70.00 | 40 | 44.26 |
| 19 | 3:2 | 62.50 | 55.00 | 50 | 87.32 |
| 20 | 3:2 | 62.50 | 55.00 | 50 | 81.92 |
| 21 | 3:5 | 62.50 | 55.00 | 50 | 31.61 |

33

表3-15 方差分析

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 模型 | 5615.32 | 14 | 401.09 | 42.13 | <0.0001 | significant |
| A | 265.88 | 1 | 265.88 | 27.93 | 0.0019 |  |
| B | 17.05 | 1 | 17.05 | 1.79 | 0.2293 |  |
| C | 139.73 | 1 | 139.73 | 14.68 | 0.0086 |  |
| D | 138.61 | 1 | 138.61 | 14.56 | 0.0088 |  |
| AB | 37.22 | 1 | 37.22 | 3.91 | 0.0954 |  |
| AC | 1.85 | 1 | 1.85 | 0.19 | 0.6745 |  |
| AD | 79.16 | 1 | 79.16 | 8.31 | 0.0279 |  |
| BC | 68.74 | 1 | 68.74 | 7.22 | 0.0362 |  |
| BD | 768.83 | 1 | 768.83 | 80.76 | 0.0001 |  |
| CD | 31.40 | 1 | 31.40 | 3.30 | 0.1192 |  |
| A2 3023.74 | | 1 | 3023.74 | 317.62 | <0.0001 |  |
| B2 1179.96 | | 1 | 1179.96 | 123.95 | <0.0001 |  |
| C2 531.82 | | 1 | 531.82 | 55.86 | 0.0003 |  |
| D2 92.00 | | 6 | 92.00 | 9.66 | 0.0209 |  |
| 残差 | 57.12 | 2 | 9.52 |  |  |  |
| 失拟项 | 28.44 | 4 | 14.22 | 1.98 | 0.2522 | Not significant |
| 纯误差 | 28.68 | 20 | 7.17 |  |  |  |
| 总变异 | 5672.44 |  |  |  |  |  |

由表3-15方差分析可知，A、C、D一次项自变量，AD、BC、BD、A2、B2、C2、

D2二次项自变量显著（P<0.05），且模型显著性检验P<0.01，表明该模型具有统计学意义。失拟P=0.2522> 0.05，说明无失拟因素存在，即可以用该模型代替真实的实验点进行分析；变异系数=4.95%，校正系数R2=0.9899，表明该模型变异小，模型拟合度好。

#### 2.5.2 响应面回归分析结果

因变量为包封率，自变量为Span-80∶Chol（v/v）、水合温度、水合时间、超声时间，对试验进行响应面回归分析，结果如图3-3所示。

34





图3-3 薄膜分散-超声法回归模型数据点的分布图

由图3-3回归模型数据点的分布图可知，试验预测值与实测值、参数的正态分布图均基本分布在同一条直线上，没有异常数据点，说明此试验制备工艺研究可用该模型来进行预测和分析。回归方程为：包封=82.89+6.86A-1.74B-3.20C+4.95D+3.35AB-0.48AC

-4.89AD+2.93BC+15.23BD-1.98CD-14.22A2-8.89B2-5.97C2-2.48D2. 通过三维响应曲面分

析A、B、C、D四个因素分别对包封率的影响情况，如图3-4所示。



图3-4 薄膜分散-超声法中因素对包封率影响的响应面

由图3-4可知，两种因素相互作用均能出现最优值，表明四种因素对其包封率均有

35

较大的影响。以包封率为评价指标，得到薄膜分散-超声法制备工艺的最佳拟合方案如表3-16所示。

表3-16 最佳拟合方案

| Number | Span-80:Chol | 水合温度/℃ | 水合时间/min | 超声时间/min | 包封率/% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2: 1 | 69.35 | 51.19 | 60 | 80.66 |

通过对试验结果进行分析，确定薄膜分散-超声法制备GA-Ni的最佳工艺为Span-80∶Chol=2: 1，水合温度69.35℃，水合时间为51.19 min、超声时间为60 min，其预测包封率为80.66%。结合实际试验操作，确定最佳工艺为Span-80∶Chol=2: 1，水合温度70℃，水合时间为51 min，超声时间为60 min。

### **2.6** 验证工艺

为进一步考察最佳工艺的可靠性及稳定性，按照最优工艺，制备3批GA-Ni。工艺验证结果见表3-17。

表3-17 验证试验结果

|  | 粒径/nm | PDI | Zeta 电位/mV | 包封率/% |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 256.02 | 0.243 | -26.51 | 81.50 |
| 2 | 260.88 | 0.221 | -21.21 | 85.06 |
| 3 | 251.11 | 0.289 | -27.60 | 78.40 |
| x ±SD | 256.0±4.89 | 0.251±0.03 | -(25.10±3.41) | 81.65±3.33 |

由表3-17可以看出，GA-Ni的PDI、平均粒径、Zeta电位及包封率的验证试验结果均较稳定，说明优选出的制备工艺比较稳定。

## **3** 小结

1.本部分成功建立了紫外分光光度法用于GA体外药物分析方法，方法学考察表明，其方法简便，精密度和灵敏度高，专属性强。

2.本部分采用薄膜分散-超声法制备GA-Ni。在单因素试验的基础上，通过星点设计-效应面法优化Ni的处方组成和制备工艺。结果表明，制备工艺稳定、可行，薄膜分散-超声法适用于GA-Ni的制备。

36

# 第四部分 甘草次酸类脂囊泡的质量评价

本部分主要对最佳处方工艺制备的GA-Ni进行质量评价，包括采用透射电子显微镜观察纳米粒的外观形态，激光粒度仪测定平均粒径和PDI，反透析法结合紫外分光光度法测定GA-Ni的包封率，为进一步制备GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs奠定基础。

## **1** 试验材料

### **1.1** 试验仪器

Zetasizer Nano 3600激光动态散射仪（英国，Malvern公司）；TECNAIG2F30透射电子显微镜（荷兰，Philips-FEI公司）；CP225D电子天平（德国，Sartorius公司）；UV-1800紫外分光光度仪（日本，SHIMADZU公司）；RE-3000旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；HJ-6多头磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；透析袋（截留分子量：8000-14000，北京博奥拓达科技有限公司）。

### **1.2** 试验药品

GA-Ni（自制，批号20150222），甲醇为色谱纯；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

## **2** 方法与结果

### **2.1** 外观形态

取少量GA-Ni混悬液，用15%的乙醇稀释10倍，滴至有碳膜的铜网上，稍干后用滤纸吸干边缘混悬液，透射电子显微镜下观察类脂囊泡的形态。见图4-1。可见GA-Ni基本呈圆形，分布较均匀。





图4-1 GA-Ni的透射电镜照片

37

### **2.2** 粒径、电位测定

取适量GA-Ni混悬液，经适当稀释，用激光动态散射仪测定GA-Ni平均粒径和Zeta

电位。粒径分布见图4-2, Zeta电位见图4-3。



图4-2 GA-Ni平均粒径图



图4-3 GA-Ni Zeta电位图

由图4-2, 4-3可知GA-Ni胶体溶液的平均粒径为（256.0士4.89）nm，多分散系数为（0.251士0.03），Zeta电位为-(25.10士3.14) mV。

### **2.3** 包封率

精密量取GA-Ni胶体溶液3 mL，置于100 mL的容量瓶中，用乙醇稀释并定容至刻度，再将此溶液转移至100 mL锥形瓶中。再精密量取乙醇6 mL，置于已处理过的透析袋中，两端扎紧，放入锥形瓶中，室温下磁力搅拌8 h时取出透析袋内的透析液，按紫外分光光度法在250 nm处测定GA吸光度，计算游离药物的浓度，按“2.3.2”项下公式计算包封率。GA-Ni的包封率为（81.65士3.33）%。

### **2.4** 稳定性

将制得的类脂囊泡置于4℃与室温（18～25℃）下保存，在0 h、24 h、15 d、30 d

38

取样，观察类脂囊泡的外观形态。

表4-1 4℃和室温下GA-Ni的稳定性

平均粒径/nm多分散系数包封率/%

| 时间 | 4℃ | 室温 | 4℃ | 室温 | 4℃ | 室温 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0 h | 302.2 | 302.2 | 0.255 | 0.255 | 78.00 | 78.00 |
| 24 h | 304.6 | 311.4 | 0.265 | 0.287 | 76.95 | 67.93 |
| 15 d | 309.1 | 317.5 | 0.338 | 0.371 | 69.91 | 56.29 |
| 30 d | 313.3 | 328.2 | 0.380 | 0.410 | 64.88 | 51.85 |

结果表明，胶体溶液在4℃条件下，24 h无变化，15 d出现部分分层的现象；室温条件下，0～30 d其外观无变化，仍为乳白色的均匀混悬液，但后期多分散系数呈现变大趋势，且包封率下降明显，可能有部分胶体粒子聚集。

## **3** 小结

经优化工艺制备的类脂囊泡透射电子显微镜观察外观形态，激光粒度仪测定平均粒径和多分散系数，反透析法结合紫外分光光度法测定囊泡的包封率。类脂囊泡呈圆形或类圆形，分布较均匀。其平均粒径为（256.0士4.89）nm，多分散系数为（0.251士0.03），Zeta电位为-(25.10士3.14) mV，包封率为（81.65士3.33）%，包封率较高，为下一步Ni包裹GA-N-GC-NPs的制备奠定了基础。

39

# 第五部分 囊泡包裹的甘草次酸**N-**乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备

Ni包裹的NPs结构结合了NPs和Ni的优点，Ni包裹NPs组装体的核壳结构，使其内核可以作为疏水性药物的容器，外壳可对药物起保护作用，避免NPs体内循环时未到达靶部位/细胞前被复杂的环境所破坏，具有结构稳定、载药量高、靶向性能较好的优点。本部分试验采用单因素试验考察GA-Ni包裹GA-N-GC-NPs的处方组成与制备工艺，超速离心法结合高效液相法验证最佳工艺。

## **1** 试验材料

### **1.1** 试验仪器

CP225D电子天平（德国，Sartorius公司）；Zetasizer Nano 3600激光动态散射仪（英国，Malvern公司）；OptimaMAX-XP台式超速离心机（美国，Beckman公司）；HJ-6多头磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；RE-3000旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）透析袋（截留分子量：8000-14000，北京博奥拓达科技有限公司）。

### **1.2** 试验药品

GA-Ni（自制，批号20150508），甲醇为色谱纯；水为超纯水。

## **2** 方法与结果

### **2.1** 类脂囊泡包裹的纳米粒的制备

采用GA-Ni薄膜与GA-N-GC-NPs胶体溶液直接水化的方式制备Ni包裹的NPs。按第三部分“2.1”项下薄膜分散-超声法制备GA-Ni，减压回收有机溶剂，待圆底烧瓶内壁形成一层均匀的干燥囊泡薄膜，将新制备的GA-N-GC-NPs胶体溶液作为水相，水化洗脱囊泡薄膜50 min，超声分散（功率180 W，频率40 KHz）10 min，即得Ni包裹的NPs。

40

### **2.2** 包封率与载药量

精密量取适量制备的GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs胶体溶液，置于10 mL 的

Beckman离心管中，低温超速（30000 r/min, 4℃）离心45 min，准确量取上清液1 mL，转移至10 mL的量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，过0.22μm微孔滤膜，取续滤液20

μL按第一部分“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算上清液中GA的含量，即为未被纳米粒包封的游离药物含量记作W1，GA的理论投料量记作W2；按下式计算包封率：

包封率（EE）%＝(W2－W1) /W2×100%

取离心后的沉淀物，纯化水充分洗涤3次，置-70℃冰箱中预冷冻成块状，转移至真空冷冻干燥机中冷冻干燥，得到囊泡冻干粉末，精密称定其总质量，记作W。按下式计算载药量。

载药量（DL）%＝(W2－W1) /W×100%

### **2.3** 单因素考察

#### 2.3.1 Ni与Nps的比例

按优化后的最佳处方制备GA-N-GC-NPs，按“2.1”项下方法制备Ni包裹的NPs，水合温度为55℃，水合时间为50 min，考察Ni与NPs的质量比对Ni包裹的NPs形成的影响。结果见表5-1。

表5-1 Ni与NPs的质量比对GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs的影响

| GA-Ni/GA-GC-NPs(w/w) | Zeta 电位/mV | 粒径/nm | 多分散系数 |
| --- | --- | --- | --- |
| 4:1 | 25.9 | 458.7 | 0.240 |
| 6:1 | -13.7 | 470.1 | 0.271 |
| 8:1 | -19.5 | 477.5 | 0.204 |
| 10:1 | -20.4 | 421.0 | 0.350 |
| 12:1 | -20.5 | 430.7 | 0.473 |

由表5-1可知，不同比例的GA-Ni与GA-N-GC-NPs制备的Ni包裹的NPs的电位变化可见，增加Ni的质量的比例，Ni包裹的NPs的表面电荷转为负电荷，当Ni与NPs质量比大于8: 1时，表面电位基本保持在-20 mV左右，不再显著增加。Ni包覆于NPs表面后，复合体的粒径增大，但是包覆过多的Ni后（10:1），其粒径反而下降，多分散系数也有变大的趋势，可能的原因是过多的Ni的游离于Ni包裹的NPs胶体溶液中，导

41

致均一性降低。综合考虑，选择二者的比例为8: 1。

#### 2.3.2 水合温度

按优化后的最佳处方制备GA-N-GC-NPs，Ni与NPs质量为8: 1，按“2.1”项下方法制备Ni包裹的NPs，水合时间为50 min，考察水合温度对Ni包裹的NPs形成的影响。结果见表5-2。

表5-2 水合温度对GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs的影响

| 水合温度/℃ | Zeta 电位/mV | 粒径/nm | 多分散系数 |
| --- | --- | --- | --- |
| 35 | -14.1 | 400.1 | 0.311 |
| 40 | -15.7 | 452.7 | 0.272 |
| 45 | -21.0 | 443.0 | 0.260 |
| 50 | -20.4 | 421.0 | 0.221 |
| 55 | -17.6 | 466.9 | 0.296 |

从表5-2可见，温度对GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs形成有一定的影响，低于40℃时，Zeta电位较低，40-50℃时，Zeta电位较稳定，且多分散系数较小。因此，水合温度确定为50℃。

#### 2.3.3 水合时间

按优化后的最佳处方制备GA-N-GC-NPs，Ni与NPs质量为8: 1，“2.1”项下方法制备Ni包裹的NPs，水合温度为50℃，考察水合时间对Ni包裹的NPs形成的影响。结果见表5-3。

表5-3 水合时间对GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs的影响

| 水合时间/min | Zeta 电位/mV | 粒径/nm | 多分散系数 |
| --- | --- | --- | --- |
| 20 | -17.0 | 398.7 | 0.240 |
| 30 | -19.1 | 400.1 | 0.231 |
| 40 | -22.0 | 416.9 | 0.276 |
| 50 | -21.0 | 415.2 | 0.251 |
| 60 | -20.7 | 422.7 | 0.411 |

由表5-3可见，水合时间对Ni包裹的NPs的粒径影响不显著，但当水合时间小于

42

30 min时，对烧瓶壁内囊泡薄膜的洗脱不完全，水合时间为40 min 较适宜。

### **2.4** 工艺验证

通过以上单因素试验考察，确定Ni包裹的NPs的最终处方组成和制备工艺为：Ni与NPs质量比为8: 1，水合温度50℃，水合时间40 min，水合过程完成后超声分散10 min。按确定的处方与工艺条件制备三批GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs。

表 5-4 最佳验证工艺

|  | 粒径/nm | Zeta 电位/mV | 载药量 | 包封率/% |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 403.51 | -20.79 | 13.81 | 87.53 |
| 2 | 414.24 | -21.12 | 14.11 | 86.91 |
| 3 | 425.26 | -19.47 | 14.06 | 87.14 |
| x ±SD | 414.40±10.98 | -(20.46±0.87) | 13.99±0.16 | 87.19±0.31 |

由上表可知，试验得到GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs混悬溶液呈乳状，平均粒径为

（414.40±10.98）nm，平均电位-(20.46±0.87) mV，平均载药量（13.99±0.16）%，平均包封率为（87.19±0.31）%。

43

# 第六部分 囊泡包裹的甘草次酸**N-**乳糖酰壳聚糖纳米粒的质量评价

本部分主要对最佳处方工艺制备的GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs进行质量评价，包括采用透射电子显微镜观察形态，激光粒度仪测定平均粒径和PDI，超速离心法结合高效液相法测定包封率与载药量、紫外分光光度法研究体外释放度，为进一步进行细胞摄取等研究奠定基础。

## **1** 试验材料

### **1.1** 试验仪器

CP225D电子天平（德国，Sartorius公司）；TECNAIG2 F30透射电子显微镜（荷兰，Philips-FEI公司）；Zetasizer Nano 3600激光动态散射仪（英国，Malvern公司）；OptimaMAX-XP台式超速离心机（美国，Beckman公司）；UV-1800紫外分光光度仪（日本，SHIMADZU公司）；透析袋（截留分子量：8000-14000，北京博奥拓达科技有限公司）；SB-3200DT超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）。

### **1.2** 试验药品

GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs（自制，批号20150724），乙醇为分析纯；水为超纯水。

## **2** 方法与结果

### **2.1** 外观形态

取少量GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs混悬溶液，用15%的乙醇适当稀释，滴至有碳膜的铜网上，稍干后用滤纸吸干边缘溶液，透射电子显微镜下观察其形态，透射电镜照片见图6-1。

44



图6-1 GA-Ni包裹的GA-GC-NPs透射电镜图

由图6-1可见，GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs基本呈球形，分布较均匀。

### **2.2** 粒径及**Zeta**电位

取适量GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs混悬溶液，经适当稀释，用激光动态散射仪测定GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs平均粒径图6-2, Zeta电位图见图6-3。



图6-2 GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs的平均粒径图



图6-3 GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs的Zeta电位图

由图6-2可知，GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs的平均粒径为（414.4±10.98）nm，PDI为（0.257±0.07），由图6-3可知，GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPsZeta电位为- (20.46±0.87)

45

mV。

### **2.3** 体外释放度

分别精密量取GA溶液和GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs胶体溶液各3 mL，置于已经蒸馏水处理过的面积相同的透析袋内，两端扎紧，分别置于60 mL pH 7.4的磷酸盐缓冲液（含0.5%的十二烷基硫酸钠）中，于（37±0.5）℃恒温状态下磁力搅拌（100 r/min），分别于不同时间点取样为3 mL，同时补充等量同温的释放介质，样品以甲醇为空白在250 nm 出测定吸光度。计算其中GA的浓度，并计算体外释放度，其体外释放曲线见图6-4。



图6-4 GA-Ni包裹的GA-GC-NPs体外释放曲线

由图6-4可知，GA原料药在1 h时已经累计释放46.1%, 4 h内基本释放完全。而GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs 1 h内释放7.2%, 12 h内释放76.8%, 24 h内释放度接近85%, GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs缓释作用明显。

## **3** 小结

优化工艺制备的GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs，采用透射电子显微镜观察其外观形态，电镜下观察呈圆形，大小及分布均匀，粒子之间未见明显粘连现象。激光粒度测定仪测定平均粒径和多PDI，其平均粒径为（414.40±10.98）nm，PDI为（0.257±0.07），

Zeta电位为-(20.46±0.87) mV。反透析法结合紫外分光光度法测定包封率，平均载药

46

量（13.99±0.16）%，平均包封率为（87.19±0.31）%。包封率高，载药量增大，所带电荷的电位稳定性高，且体外缓释作用明显。

47

结 **论**

1、以N-GC为载体材料，GA为研究药物，TPP为离子交联剂，离子交联法制备了

GA-N-GC-NPs，制备的NPs粒径适宜，载药量和包封率较高，制备工艺稳定、可行。

2、以Span-80为囊材，Chol为膜添加剂，采用薄膜分散-超声法制备GA-Ni，在单因素试验的基础上，采用星点设计-效应面法优化了GA-Ni的处方组成和制备工艺。制备的GA-Ni粒径较小，包封率较高，薄膜分散-超声法适用于GA-Ni的制备。

3、在干燥的GA-Ni膜中直接加入GA-N-GC-NPs进行水合，制备的GA-Ni包裹GA-N- GC-NPs粒径未明显增大，包封率较高，所带电荷的电位稳定性高，且体外缓释作用明显。

结 **语**

慢性肝炎、肝硬化等肝脏疾病的诊治以药物治疗为最主要的方式，甘草次酸口服吸收差，生物利用度不高，且长期服用易产生类醛固酮增多症的不良反应。因此提高药物的靶向性[47-50]，增加生物利用度是研究的关键。本项目以甘草次酸为研究药物，结合囊泡和纳米粒的制剂学优势，制备核壳结构的囊泡包裹的纳米粒，其具有被动和主动靶向的双重特征，起到保护药物的稳定性和提高生物利用度的作用。

壳聚糖的脱乙酰度是指壳聚糖分子总糖残基数中脱除乙酰基的糖残基数所占的百分比，是壳聚糖重要的技术指标之一[51-52]。在前期预实验研究中发现，脱乙酰度对纳米粒包封率的大小有极大影响[53]。壳聚糖的脱乙酰度越高，纳米粒的包封率呈现变高的趋势，而粒径有变小的趋势，这与相关文献报道一致。可能的原因是高脱乙酰度，壳聚糖分子中游离的氨基数目多，在形成纳米粒的酸性条件下，解离成带正电荷氨基，可与更多的离子交联剂交联，因此包封率较高。同时，较高的脱乙酰度意味着单个壳聚糖分子中氨基基团增加，对于同等量的TPP，需要更多的壳聚糖分子与之交联，导致了粒径的增加[54]。壳聚糖被半乳糖修饰后会使游离氨基的数目减少，导致包封率会稍有下降。

囊泡的制备方法主要有薄膜分散-超声法、反向蒸发法、高压乳化法及注入法，其中高压乳化法和反向蒸发法适用于水溶性药物，注入法制得的囊泡粒径较大。而甘草次酸为脂溶性的药物，所以本项目采用薄膜分散-超声法制备类脂囊泡，囊泡粒径较小且

48

# 均匀。

已有研究表明，制备的干燥囊泡薄膜与纳米粒混悬液在直接水化时能够通过静电作用自发形成核壳结构的囊泡纳米粒复合体，粒子表面所带电位的变化可作为衡量纳米粒上囊泡包被效率的指标[55]。本试验研究发现，增加囊泡质量的比例，囊泡纳米粒复合体的表面电荷转为负电荷，当囊泡与纳米粒质量为8: 1时，表面电位基本保持在-20 mV左右，不再增加。这说明囊泡在N-GC-NPs表面形成了稳定的包覆层。

本试验基于囊泡与纳米粒的制剂学优势，制备了GA-Ni包裹的GA-N-GC-Nps复合体，并对其进行了形态、均一性、粒径、Zeta电位、包封率及体外释放度研究，综合评价了其体外释药特性。而其靶向性如何，还有待于进一步通过细胞摄取实验和体内靶向试验考查。接下来本项目将进行以人源肝HepG2细胞为肿瘤模型，考察囊泡包裹的纳米粒对模型细胞的毒性和亲和性；大鼠体内的药动学研究和小鼠组织分布研究等实验，综合评价其靶向性能。

参考文献

[1] 袁琼英, 厚钰, 石碧坚, 等. 甘草甜素的药动学比较[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 903-905.

[2] 郭波红, 程怡, 林绿萍. 甘草次酸脂质体的制备及其药剂学性质的研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 380-383.

[3] 张亚会, 李喜香, 包强, 等. 甘草次酸-壳聚糖纳米粒的制备及其质量评价[J]. 中草药, 2015, 46(15): 2232-2 237.

[4] 刘育辰, 陈有根, 王丹, 等. 甘草化学成分研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1251-1255.

[5] 陈莹, 赵博, 乔佳, 等. HPLC法同时测定甘草中18α-甘草酸和18β-甘草酸的含量[J]. 中国药房, 2014, 25 (4): 746-748.

[6] 胡玮, 张学农. 肝靶向乳糖化去甲斑蟊素/N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的研制[D]. 苏州: 苏州大学, 2011.

[7] 张文元, 杨亚冬, 房国坚. 壳聚糖-丝素复合支架材料与骨髓间充质干细胞相容性的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3084-3086.

[8] 仲博, 张岭, 张莉, 等. 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂的制备及体外透皮研究[J]. 中草药, 2012, 43(1): 7 0-73.

[9] 何黎黎, 邓黎. 林芸竹. 红景天苷壳聚糖纳米粒的制备及其体外释放性能研究[J]. 中草药, 2013, 44(5): 5

52-556.

49

[10] 李纳, 汤丹丹, 王丽雯, 等. 喷雾干燥法制备姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球干粉吸入剂及其表征[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2475-2481.

[11] 魏颖慧, 陈苹苹, 李范珠, 等. 囊泡及微粒经皮给药系统的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(3): 224-228.

[12] 张琳华, 何颖娜, 马桂蕾, 等. 叶酸靶向紫杉醇聚合物纳米囊泡的制备及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(22): 1742-1748.

[13] 张洪, 沈瑶, 闰士君, 等. 青蒿琥酯-壳聚糖纳米粒的制备及质量评价[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(5): 349-355.

[14] 姚倩, 侯世祥, 卢懿, 等. 白藜芦醇壳聚糖纳米粒的制备及理化性质[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(6): 444- 447.

[15] 王彦, 赖克方, 张巧, 等. 离子凝胶法制备壳聚糖纳米微粒的影响因素分析[J]. ft东医药2011, 51(27): 13-15.

[16] 朱云峰, 曹青日, 杨世林, 等. 甘草酸二铵-壳聚糖纳米粒制备与药效学评价[J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (16): 2138-2141.

[17] 冯炜玮, 陈志伟. 去甲斑鳌素-羟丙基壳聚糖纳米粒的制备及其体外抗肿瘤性能研究[D]. 淄博: ft东理工大学, 2012. [18] 钟萌, 杨林, 黄开顺. 阿奇霉素囊泡的制备及处方考察[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(8): 614-617. [19] 陈洪轩, 徐志杰, 肖衍宇. 蛇床子素非离子囊泡的制备和质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(1): 33-36.

[20] 何文, 冯敏, 丁鼎. N-三甲基壳聚糖包衣的维生素A棕搁酸酷脂质体的制备及其体外释药[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(11): 921-925.

[21] 施斌, 方超, 游美羡, 等. 不同聚乙二醇相对分子质量对包载轻基喜树碱的PEG-PHDCA纳米囊泡体外释放和体内药动学行为的影响[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(21): 1643-1646. [22] 冯永良, 黄岭, 肖玉秀. 注射用葛根素脂质体的制备及其包封率测定[J]. 中国药师, 2010, 13(11): 1617-1619.

[23] 王建筑, 王欣欣, 毕研平, 等. 丹皮酚非离子型类脂囊泡的研制[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1467-1470． [24] 朱铉, 扶艳, 苏美琴, 等. 紫杉醇囊泡的研制及大鼠体内的药动学特征[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(5): 36 5-371.50

[25] 夏爱晓, 宋倩倩, 孙渊, 等. 硫酸长春新碱固体脂质纳米粒的制备及其性质考察[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(2): 163-168.

[26] 陈丹飞, 王婷, 王国伟, 等. 葛根素纳米脂质体的制备及体外释放特性研究[J]. 甘肃中医学院学报, 201 4, 31(3): 41-46.

[27] 吴艳丽, 赫宝华. 青光眼用葛根素柔性脂质体温敏凝胶的研究[D]. 西安: 西北大学, 2015.

[28] Jiang Q L, Hai L, Chen L, et al. Synthesis of a novel multivalent galactoside with high hepat ocytetargeting for gene delivery [J]. Chin Chem Lett, 2008, 19(2): 127-129. [29] 李榕, 张朝跃. rhBMP-2-rhVEGF壳聚糖纳米粒的制备与体外释放的实验研究[D]. 长沙: 中南大学, 20 13.

[30] Troutier A L, Ladavière C. An overview of lipid membrane supported by colloidal particles[J]. Adv Colloid Interfac, 2007, 133(1): 1-21.

[31] Diebold Y, Jarrín M, Sáez V, et al. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle com plexes (LCS-NP) [J]. Biomaterials, 2007, 28(8): 1553-1564.

[32] 袁悦, 王红霞, 刘岩, 等. 类脂囊泡作为5-氟尿嘧啶药物载体的研究[J]. 分子科学学报, 2010, 26(6): 420-423.

[33] 曹艳花, 刘珊珊. 通便灵片质量标准研究[J]. 食品与药品, 2011, 13(1): 33-35.

[34] 徐力. 正交试验优化飞燕草总黄酮提取工艺[J]. 中国当代医药, 2011, 18(31): 154-155.

[35] 金玲, 王锦玉, 仝燕, 等. 五倍子提取物喷雾膜剂体外释放评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 15 4-155.

[36] 张萌萌, 史国兵, 颜鸣, 等. LC-MS/MS法测定人血浆中去甲万古霉素的血药浓度[J]. 中国药师, 2013, 1 6(7): 990-993.

[37] 钟萌, 尹华峰, 藤永真, 等反透析法测定. 阿奇霉素囊泡的包封率[J]. 光谱实验室, 2012, 29(5): 2940-2942.

[38] 张波, 王启平, 王慧云, 等. 正交实验优化甲氨蝶呤囊泡的制备[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(4): 247-25 0.

[39] 张波, 王慧云, 全先高, 等. 5-氟尿嘧啶的囊泡制备及体外释放研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(25): 42-46.

[40] 杜美菊, 翠霞, 李娜, 等. 甲氨蝶呤囊泡的制备和体外释放性能研究[J]. 应用化工, 2005, 34(12): 757-759.51

[41] 张波, 王慧云, 全先高, 等. 非离子表面活性剂囊泡作为头孢匹胺钠药物载体的研究[J]. 济宁医学院学报, 2011, 34(4): 236-240.

[42] 卢浩扬, 林媛媛, 车俊秀, 等. 星点设计-效应面法优化芷苟散温敏凝胶的处方及其鼻勃膜渗透特性研究[J]. 中草药, 2014, 45(13): 1845-1849.

[43] 靳士晓, 韩晋, 靳世英, 等. 星点设计-效应面法优化甘草酸磷脂/胆盐混合胶束处方[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 48-50.

[44] 陈伟, 夏红, 吴伟. 星点设计-效应面法优化水飞蓟素滴丸的制备工艺[J]. 中草药, 2005, 36(5): 679-683.

[45] 孙丹丹, 徐新刚, 生立高, 等. 星点设计-效应面法优化熊果酸自微乳给药系统[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 46-50.

[46] 李颖, 曾茂贵, 郑岌, 等. 星点设计-效应面法优化鱼腥草挥发油-p-环糊精包合物的制备工艺[J]. 中草药, 2014, 45(13): 1855-1862.

[47] 廖正根, 韩锡镇, 李翔, 等. 三七总皂苷复合纳米囊泡的理化性质及对大鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(11): 899-903.

[48] 甘莉, 蒋敏, 王静, 等; 新型核壳纳米粒脂质体用于家兔眼表基因转染的体内外研究[A]; 全国青年药学工作者最新科研成果交流会[C]; 2012年.

[49] 贺连香, 何剪太. 半乳糖化白蛋白磁性阿霉素纳米粒联合交变磁场对肝癌的影响研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.

[50] 郭立文, 汪森明. 表柔比星壳聚糖隐形纳米粒的制备及其抗肿瘤活性的检测[D]. 广州: 南方医科大学, 2009.

[51] 王钦, 张学农. 去甲斑蝥素N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备与性质研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.

[52] 韩媛媛, 周长忍. 羧甲基壳聚糖复合磷酸钙骨水泥的制备与性能研究[D]. 广州: 暨南大学, 2007.

[53] 蒋新宇, 周春ft. 抗癌药物纳米粒载体系统的制备及其性能研究[D]. 长沙: 中南大学, 2005.

[54] 匡长春. 分子参数对壳聚糖纳米粒体内外性质影响研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2005.

[55] LI J, CHEN Y-C, TSENG Y-C, et al. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery [J]. J Control Release, 2010, 142(3): 416-421.

52

附 **录**

**附录1** 甘草次酸**N-**乳糖酰壳聚糖纳米粒实物图与透射电镜图



实物图电镜图

**附录2** 甘草次酸类脂囊泡实物图



实物图

**附录3** 透析法结合紫外分光光度法测定**GA-Ni**包封率



**附录4** 体外释放度



53

# 文献综述

**1甘草的研究概况**

甘草又名国老、甜草、灵通、棒草，为豆科植物甘草（Glycyrrhiza uralensis Fisch.）、光果甘草（Glycyrrhiza glabra L.）或胀果甘草（Glycyrrhiza inflata Bat.）的干燥根及根茎，最早见于神农本草经，被视为上品之药[1-2]。所谓“十方九草，无草不成方”，其中的草即是指甘草，可见甘草被中医大量的用于中药复方。

**1.1甘草的功效**

甘草其味甘，性平，归心、肺、脾、胃经，常作佐使药入方，如治疗咽喉肿痛可与射干、桔梗、牛蒡子相配伍，治疗疮疡肿毒可与连翘、金银花相配伍，发挥其清热解毒的功效；其与白术、茯苓相配伍达到补脾益气的功效；如其配伍芍药可共同发挥缓急止痛之功效；如治疗咳喘见风寒表证者可配伍麻黄、桂枝、杏仁；甘草药性温和，能缓和药性，可与诸药相配伍，达到调和诸药的功效[3]。

**1.2甘草次酸概述**

甘草酸（Glycyrrhizic, GL）是甘草中皂苷类成分含量最高的，由两分子葡萄糖醛酸和一分子GA组成，有18α和18β两种差向异构体[4-6]，其中18β型GA具有抑菌作用[7-8]. GA是甘草酸的苷元，由甘草酸水解脱去糖链生成，化学结构如图1。GA在水中的平衡溶解度为6.32 mg/L，属于溶解度较小的亲脂性化合物[9]。



图1 甘草次酸化学结构式

**1.3 GA的药理作用**

相关研究发现，GA具有镇咳、消痰、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、保肝的作用[10-11]。

54

Anderso和Tillman最早发现GA与氢化可的松在结构上具有一定的相似性，进行了大量皮肤疾病的临床试验，结果表明GA对炎症具有较好的拮抗作用[12]；GA也可通过上调病毒周期蛋白表达，下调与潜伏相关的核抗原活性，阻止相关疱疹病毒的复制，从而诱导疱疹病毒潜伏感染的细胞凋亡[13]，从而可达到对艾滋病的预防和治疗的目的；大鼠灌服GA，可阻断四氯化碳产生的自由基对肝脏损伤，加速肝功能恢复，从而起到保护肝脏的作用[14-17]。此外，GA对多种肿瘤细胞也有不同程度的抑制作用[18-20]，且在抗溃疡[21]、免疫调节[22]、调节血脂等方面具有一定的作用。GA呈现出多方面的药理作用，尤其在保肝护肝方面呈现独特的优势。

**2肝靶向给药系统研究概况**

由于治疗肝脏疾病的药物在肝脏中有效治疗浓度较低，导致药物的生物利用度很低。且易对其他脏器产生毒副作用，严重影响其临床疗效的充分发挥[23]。因此，如何提高药物在病灶部位的浓度，改变体内分布特征，即提高靶向性，降低毒副作用，已成为国内外研究的热点。

靶向制剂是尽可能的是药物到达病灶部位，降低药物对其他正常器官及组织的毒副作用，最大限度的发挥药物疗效，使制剂具有控缓释特性[24]，分为主动和被动靶向两大类。肝靶向制剂发挥作用，一种方式是通过肝实质细胞膜上受体-配体的特异相互作用，对药物进行修饰，达到药物的细胞靶向作用[25]，另一种是通过纳米粒、脂质体、囊泡等新型药物载体分布特征，使药物被动到达靶向肝脏[26-27]。相关人员通过对不同的肝靶向途径进行研究，发现去唾液酸糖蛋白受体(Asialoglycoprotein receptor, ASGP-R)介导途径使肝脏对药物的吸收迅速[28-30]。

**3壳聚糖纳米粒研究概况**

NPs是纳米级别的小型粒子，属于胶体粒子大小的范畴，，其形态多为固态胶体颗粒，活性部分附着于粒子表面或包裹于粒子内部[31-33]. CS在中性和碱性条件下不溶，溶于pH<6.5的稀酸，可与盐酸、乙酸等无机和有机酸成盐[34-36]。在稀酸中，其葡萄糖氨基解离为R-NH3+，形成聚阳离子凝胶溶液，性质比较活泼，可以进行N位交联等多种化学反应，CS的化学结构式，如图2所示。

55



图2 壳聚糖的化学结构式

**3.1壳聚糖的修饰**

CS分子含有游离的羟基和氨基，两个基团可以通过羧基化、酰化等反应生成各种不同性能的衍生物。因此，对CS的修饰，可利用β-D-半乳糖可以被肝细胞中的ASGP-

R特异性识别的特性，将其与壳聚糖交联酰化，制得N-GC[37-38]，成为新型肝靶向特异性主动载体材料，见图3。



图3 N-乳糖酰壳聚糖的结构式

**3.2壳聚糖纳米粒的制备方法**

CS-NPs的制备方法主要有复凝聚法、离子交联法、乳化交联法、共价交联法等。其中，复凝聚法是CS阳离子与另一种带负电荷的大分子药物通过静电吸附，降低

溶解度凝聚成纳米粒的方法。Mao[39]等通过方法优化，探讨了DNA和CS的浓度、缓冲液pH值和反应温度等参数，最终形成了未被破坏的DNA-CS-NPs。

离子交联法，又称离子凝胶法，该方法常用的离子交联剂有三聚磷酸钠(Sodium tri polyphosphate, TPP)、硫酸钠和柠檬酸钠等。其中TPP是一种多聚阴离子，可与CS上的氨基阳离子发生分子间相互作用，制得NPs。是目前CS-NPs制备研究中使用最多的方法，该方法不使用有机溶剂，易于得到均一、可调整粒径范围的NPs[40-47]。姚倩[48]等以白藜芦醇为模型药物，TPP为离子交联剂，在弱酸性条件下制备白藜芦醇NPs，对

影响NPs性质的酸性条件、CS和离子聚合物的浓度、白藜芦醇加入顺序、搅拌时间等

56

因素进行考察。赵静[49]等用该法制备黄芩苷-血根碱离子对CS-NPs，确定了CS用量、T PP用量、投药量等处方因素。此外，离子交联法反应条件温和，具有较高的药物包封率及可保持完整的药物活性的特点。

乳化/溶剂扩散法是将疏水性药物溶解在亲水性有机溶剂中，加入含有乳化剂的CS溶液，制备得到CS-NPs的沉淀。戴东波[50]等以二氯甲烷-丙酮为混合有机相，聚乙烯醇为水相，乳化/溶剂扩散法制备了姜黄素聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物纳米粒，平均粒径为（129.24±1.45）nm，包封率为（82.15±1.07）%。

共价交联法中使用的交联剂有一定毒性，会降低细胞的存活率[51-53]，故该法在应用于临床时有局限性。此外CS-NPs的制备方法还有，去溶剂法（沉淀法）、乳滴聚结法、自组装法等[54]。

**4非离子表面活性剂囊泡研究概况**

**4.1囊泡的概述**

Ni是以各种非离子表面活性剂为载体材料，通过自身闭合形成的双分子层微型或多室囊泡状载体[55-56]，是第二代柔性囊泡。Ni结构与脂质体十分相似，也具有封闭的双层结构，不易泄漏，较稳定。但与脂质体相比，其制备材料不含磷脂，避免了磷脂的氧化降解，且制备工艺简单，成本低，同时兼具缓释作用，提高药效和降低毒性的优点[57-58]。

**4.2囊泡的制备方法**

常用的Ni的制备方法包括冷冻干燥法、pH梯度法、有机溶剂注入法、薄膜分散-超声法、逆相蒸发法、挤压法、前体囊泡法以及自发形成囊泡等。冷冻干燥法是将适量表面活性剂与一定量的药物及水、有机溶剂等溶解混匀后，密封、冷冻、真空处理，冻干粉充N2气保存。赵应征[59]等采用冷冻干燥法制备空白囊泡，对四种影响囊泡质量的因素结合实际操作情况考察，得到冷冻干燥法制备空白囊泡的最佳工艺。生物碱类药物的主动载药方法有pH梯度法和硫酸铵梯度，相关实验证实，采用硫酸铰梯度法制备的载药囊泡包封率低，且易渗漏，故生物碱类药物常用pH梯度法。胡杰[60]等采用pH梯度法，优选马钱子总碱囊泡的制备工艺，实验发现：pH梯度大于4.0时，马钱子总碱囊泡的主要考察指标包封率高达86.9%，且比较稳定，不容易发生渗漏。将表面活性剂溶解于有机溶剂（乙醚或乙醇）中，在一定的温度、搅拌下将上述溶液注入水溶液中，减压除去有机溶剂后即为均匀的Ni溶液。刘丹[61]等采用乙醇注入法制备芹菜素囊泡，实

57

验发现，该制备方法获得的囊泡包封率为(69.48士2.5) %，平均粒径为（148士5.03）n m，且在4℃下密封保存3个月包封率变化小，渗漏率低。薄膜分散法是指减压蒸发除去溶解有表面活性剂的有机溶剂，使表面活性剂在器壁形成一层均匀的薄膜，再用水化介质水化，振摇，得均匀的Ni溶液。超声波法主要是采用超声波设备减小囊泡粒径的方法，一般与其他方法联用。陈洪轩[62]等采用薄膜分散-超声法制备蛇床子素非离子囊泡，考察优化囊泡的形态、分布、平均粒径和包封率。结果表明，蛇床子素非离子囊泡外观呈球形或椭圆形，多分散系数为0.171，平均粒径为246 nm，包封率为87.4%，说明超声波振荡法与薄膜分散法联用，制备的囊泡粒径与PDI均小，且包封率高。薄膜分散-超声法也是目前囊泡的制备方法中使用最广泛的一种方法。

**5囊泡包裹的壳聚糖纳米粒研究概况**

**5.1囊泡包裹的壳聚糖纳米粒的概述**

Ni包裹的NPs是指一定浓度的Ni和NPs分散在水溶液中自组装形成具有Ni外壳和NPs核心的组装体，也被称为核壳纳米组装体。

**5.2囊泡包裹的壳聚糖纳米粒的制备**

Ni与NPs溶液在一定温度下水化，Ni接触到NPs以后产生融合作用，在NPs的周围重组成连续的双分子层。目前，其制备方法主要有两种：（1）直接将旋干的Ni与分散的NPs溶液水合；（2）将制备好的Ni与NPs溶液混合。

**6存在的问题**

CS作为载体材料在药物技术领域取得了一定的的实验成果，但其本身的一些性质使其作为载体仍存在一些问题。一方面，CS是碱性多糖，不溶于水和有机溶剂，可溶于弱酸，这就在很大程度上限制了壳聚糖纳米粒的产业化制备，对生产设备及工艺提出了较高要求。另一方面，CS的分子量，脱乙酰度，黏度对于壳聚糖纳米粒的粒径大小有显著地影响。影响纳米粒的粒径大小，从而影响其应用的靶向性。然而，不同的生产厂家，生产出的相同分子量或者脱乙酰度的CS的粘度等其它参数均有所不同，这在很大程度上造成其很难被广泛应用到实际生产中。药物制备过程中，不可避免的会使用到一些有机溶剂，这对药物用于临床也有一定程度的影响。

**7结语与展望**

58

GA具有较高的肝靶向性和肝组织分布特征，是一类具有广阔前景的肝靶向载体，将来关于GA的研发将主要集中在两个方向，一是研发甘草次酸衍生物，以获得更多药理活性和加强肝靶向性；二是改良剂型，研发肝靶向性强，性质更加稳定，缓释效果理想的载药材料。

N-GC-NPs进入体循环后在肝、脾或骨髓等网状内皮细胞丰富的部位具有被动靶向性，一般可以提高生物利用度几倍左右，但仍偏低。研究表明，适宜粒径的NPs能够通过胃肠道上皮细胞有效吸收，如通过派伊尔集结的M细胞核肠上皮细胞进入体循环。载药NPs通过胃肠道上皮屏障后，要到达肝靶细胞还要经历复杂的体内转运过程，且靶向修饰材料一般通过酯键、糖苷键或酰胺键与载体相连，暴露于粒子表面，在胃肠道或溶酶体中由于各种因素影响容易发生断链，在NPs降解或溶蚀时容易发生脱落。

因此，有必要在GC-NPs的表面再进行第二层包裹，起到保护和促进其吸收的作用，提高稳定性和生物利用度。Ni在胃肠道环境下稳定性强于脂质体而弱于NPs，具有高包封率以及优良的促进吸收作用，可提高生物利用度数倍并延长药物释放。

本试验结合Nps和Ni的制剂学优势，制备GA-Ni包裹的GA-N-GC-NPs，并对其进行体外质量评价，使外面的Ni对内核起保护作用，核壳结构复合体的内核即N-GC- NPs作为疏水性药物GA的容器[63]，避免在达到病灶组织的靶细胞之前被循环系统复杂的环境降解或破坏，达到保护并促进其药物吸收的目的。

参考文献

[1] 刘洋洋, 刘春生, 曾斌芳, 等. 甘草种质资源研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(24): 3593-3598. [2] 张淙, 戴雪伶, 林昌君, 等. 甘草中的活性物质在心脑血管疾病治疗中的应用[J]. 北京联合大学学报, 2010, 24(4): 69-72.

[3] 高雪岩, 王文全, 魏胜利, 等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 26 95-2700.

[4] Zhang Q, Ye M. Chemical analysia of chinese herbal medicine Gan-Cao(li-corice)[J]. J Chromatr ogr A, 2009, 1216(11): 1954-1969.

[5] 刘育辰, 陈有根, 王丹, 等. 甘草化学成分研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1251-1255.

[6] 陈莹, 赵博, 乔佳, 等. HPLC 法同时测定甘草中18α-甘草酸和18β-甘草酸的含量[J]. 中国药房, 2014, 259

5(4):746-748.

[7] 张秋峰, 陈晓辉, 易丽昕, 等. 甘草酸差向异构体在大鼠体内的药动学研究[J]. 中南药学, 2010, 8(5): 350-353.

[8] 吴锡铭, 吕坚, 茹仁萍, 等. 甘草酸18H差向异构体的比较研究[J]. 中国药学杂志, 1993, 28(4): 215-218.

[9] 郭波红, 程怡, 林绿萍, 等. 甘草次酸平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 221-223.

[10] 王趱. 甘草次酸及其衍生物的研究与应用[J]. 辽宁化工, 2006, 35(6): 347-349.

[11] 吴勇杰. 甘草次酸钠的镇咳, 消痰, 降低气道阻力作用的研究[J]. 兰州医学院学报, 1996, 20(2): 23-25.

[12] 彭子模. 甘草次酸及其衍生物的研究现状和展望[J]. 中医药学报, 1998, 1: 32-35. [13] Curreli F, Friedman-Kien A E, Flore O. Glycyrrhizic acid alters Kaposisarcoma-associated herpesvirus latency. triggering p53-mediated apoptosis in transformed Blymphocytes[J]. Cl in Invest, 2005, 115(3): 642-652.

[14] Van Rossum T G, Vulto A G, De Man R A, et al． Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C [J]. ALiment Pharmacol Ther, 1998, 12(3): 199-205.

[15] 赵营, 张玉林, 徐林刚, 等. 甘草酸、甘草次酸及苦参碱等对实验性胆汁淤积大鼠作用的比较[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(3): 256-260.

[16] Jeong HG, ou HJ, Park SJ, et al. Hepatoprotective effects of 18 beta-glycyrrhetinic acid on carbo n tetrachloride-induced liver injury; Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression [J]. Pharmacol Res, 2002, 46(3): 221-227.

[17] 夏海珊, 陈少茹, 钟月春, 等. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现况[J]. 中国医药导报, 2014, 11(18): 162-165.

[18] 金敏, 吴红金. 甘草次酸药理作用的研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(11): 1712-1715.

[19] 陶春祥. 甘草酸的药用研究[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 17(15): 2285.

[20] 包金风. 甘草次酸药理作用研究进展[J]. 兰州医学院学报, 1994, 20(1): 50-52.

[21] 刘波, 陆明, 刘凡, 等. 野甘草乙醇提取物对胃HK-ATP酶活性作用的研究[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 6(26): 100-101.

[22] 田莉, 曾斌芳, 燕雪花. 甘草在消化系统和免疫系统的药理作用及临床应用[J]. 新疆中医药, 2009, 27 (4): 91-92.60

[23] 贺玲, 李健和. 肝靶向给药系统的研究进展[J]. 中国当代医药, 2010, 17(9): 15-18.

[24] 王晓梅, 唐星. 雌二醇鼻腔给药脑靶向制剂的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.

[25] 谢建萍, 谭德明. 肝靶向β-雌二醇纳米粒制备及抗肝纤维化的实验研究[D]. 长沙: 中南大学, 2006.

[26] 贺连香, 何剪太. 半乳糖化白蛋白磁性阿霉素纳米粒联合交变磁场对肝癌的影响研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.

[27] 朱建勤, 方唯硕. 熊果酸水溶性前药与齐墩果酸A环衍生物的合成[D]. 北京: 北京协和医学院, 2009.

[28] 薛克昌, 蒋永培. 肝靶向十六酸拉米夫定酯固体脂质纳米粒的实验研究[D]. 第四军医大学, 2002. [29] Hashida M, Nishikawa M, Takakura Y. Hepatic targeting ofdrugs and poteins by chemical modi fication [J]. J Controlled Release, 1995, 36(1/2): 99-107.

[30] CHUNG T W, YANG J, AKAIKE T et al. Preparation of alginate/galactosyla-ed chitosan scaff old for hepatocyte attachment[J]. Bioma-terials, 2002, 23(14): 2827-2834.

[31] 王钦, 张学农. 去甲斑蝥素N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备与性质研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.

[32] 郭立文, 汪森明. 表柔比星壳聚糖隐形纳米粒的制备及其抗肿瘤活性的检测[D]. 广州: 南方医科大学, 2009.

[33] 吴立明, 习温瑜, 管正红. 壳聚糖纳米粒制备的研究进展[J]. 齐鲁药事, 2008, 27(10): 682-685.

[34] 吴立明, 邓树海. 灯盏花素壳聚糖纳米粒的研究[D]. 济南: ft东大学, 2008.

[35] 王振旺, 何应. 乳化交联法制备壳聚糖微球及其包载药物的研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.

[36] 蒋新宇, 周春ft. 抗癌药物纳米粒载体系统的制备及其性能研究[D]. 长沙: 中南大学, 2005.

[37] 王钦, 章良, 胡玮, 等. 去甲斑蝥素N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备与体外抗肿瘤活性[J]. 中国药学杂志, 2009.

[38] Zhang C. Cheng Y, Qu GW, et al. Prepsrstion snd charsclerization of galactosylated chitosan coate d BAS microsphere containing 5-FU [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(3): 390-397.

[39] Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulation for delivery of DNA and siRNA[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(1): 12-27.

[40] 黄小龙, 张黎明. 壳聚糖基载药纳米微粒制备研究进展[J]. 功能高分子学报, 2003, 16(4): 593-598.

[41] 郝英魁, 杨学东. 载药壳聚糖纳米粒的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(17): 1292-1295.

[42] 陈明霞, 张玉杰. 重组水蛭素-2(rhv2）壳聚糖纳米粒鼻腔给药的[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.

[43] 王凤川, [陈彦模](http://www.qianluntianxia.com/search/lunwen/tutor/%E9%99%88%E5%BD%A6%E6%A8%A1). 载金属离子含羧基多糖基纳米材料的制备及其结构性能表征[D]. 上海: 东华大学, 261

007.

[44] 李正艳, 何应. 壳聚糖纳米载体用于细胞因子缓释制剂的研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.

[45] 颜承云, 陈大为. 5-FU-N-琥珀酰壳聚糖纳米粒制备及肿瘤靶向性研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.

[46] 王美香, 祖元刚. 叶酸靶向HCPT壳聚糖纳米粒制备工艺研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.

[47] 刘占军, 于九皋. 接枝壳聚糖纳米粒的制备及负载药物性能研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.

[48] 姚倩, 侯世祥, 卢懿, 等. 白藜芦醇壳聚糖纳米粒的制备及理化性质[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(3): 444- 447.

[49] 赵静, 曾建国, 邹剑锋, 等. 黄芩苷-血根碱离子对壳聚糖纳米粒的制备及表征[J]. 中草药, 2012, 43(4): 6 76-682.

[50] 戴东波, 尤佳, 何雯洁, 等. 姜黄素聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物纳米粒的制备及其质量评价[J]. 中草药, 2014, 45(2): 194-199.

[51] 舒洪灶, 许玉杰. 新型放射性核素促排剂壳聚糖-乙二胺四乙酸(CTS-EDTA)纳米粒体内促排作用研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.

[52] 孙燕, 万錒俊. 壳聚糖改性及负载治疗PTCA术后再狭窄药物研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2008.

[53] 曹海, 高峰. 新型β-环糊精固载壳聚糖的合成及其纳米给药系统的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 201 2.

[54] 安世昌, 孙健. 复合壳聚糖纳米微球PLGA/nHA缓释载体系统的制备及其对蛋白类药物缓释作用的实验研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2011.

[55] 童春义, 刘选明. 基于硒纳米颗粒的新型生物材料研制与表征方法研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2008.

[56] 姚金凤, 郭晨阳, 杨红, 等. 壳聚糖纳米粒在药物输送中的应用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 4 0(1): 90-94.

[57] 王志钢, 臧琛, 李慧, 等. 非离子表面活性剂囊泡作为眼用制剂载体的研究进展[J]. 中成药, 2010, 32(1 2): 2144-2147.

[58] 王志钢, 张保献. 葛根及其复方眼用新剂型的研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2011.

[59] 赵应征, 王辰允, 张彦等. 药学进展[J]. 冷冻干燥法制备空白囊泡的工艺条件优选, 2004, 28(2): 84-86.

[60] 胡杰, 吴珍珍, 胡克菲, 等. 马钱子总碱囊泡的制备与评价[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14): 1955-1958.

[61] 刘丹, 胡海洋, 陈大为, 等. 芹菜素囊泡的体内药动学和组织分布研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26 (6): 423-429.62

[62] 陈洪轩, 徐志杰, 肖衍宇. 蛇床子素非离子囊泡的制备和质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(1):

33-36.

[63] 吉顺莉, 李博, 李贞, 等. 米粒组装体作为药物载体的研究进展[J]. 江苏大学学报(医学版) 2010, 20(2): 1 80-184.

63

致 **谢**

时光飞快，三年的研究生学习将划上一个句号。即将离开校园生活，站在人生的十字路口，心中难免感慨，感恩之情发自肺腑。

首先，我向在生活和科研上给予我关心和悉心指导的导师李喜香表示衷心的感谢！李老师在学习、治学和作风等方面严谨、实事求是的态度及思维熏染了我，她不仅在科研上指导我，在生活上也提醒我为人处世该有的态度，我将终生难忘这种教诲，祝愿恩师身体健康、事事顺心！

同时，特别感激在生活和学习上永远默默支持、关心我的父母，祝愿他们身体健康，少一些压力，多一份快乐！

其次，衷心感谢我的带教老师包强、李季文，学姐王雪梅，是你们不厌其烦的在实验方面指导我，在论文撰写方面给予我建议。同时也特别感谢牟倩倩、钱梦茹等人在我实验实施过程中给予的帮助。

最后，由衷感谢百忙之中评阅论文和参与答辩的的各位专家教授！

64

# 攻读硕士期间取得的学术成果

**一、发表的文章**

[1]张亚会，李喜香，包强等.甘草次酸-壳聚糖纳米粒的制备及其质量评价[J].中草药,2015,4 6(15)：2232-2237.

[2]李喜香，张亚会，刘效栓，等.甘草次酸类脂囊泡的制备及处方工艺优化[J].中草药,2016, 47(2)：240-245.

[3]李喜香，张亚会，刘效栓，等.补脑软胶囊制剂处方研究[J]，中国中医药信息杂志,2015,22 (12)：90-93.

**二、参与课题**

1.甘肃省科学技术厅项目：

亚麻木酚素缓释片的开发研究；甘草次酸口服囊泡包裹的纳米载体构建及肝靶向特性研究

2. 兰州市科学技术局项目：

补脑软胶囊的开发研究；基于化学转化法破壁富集甘草药渣中总黄酮的开发研究

**三、获得奖项**

在学期间所参与课题“亚麻木酚素缓释片的开发研究”获甘肃省药学发展奖二等奖

65