

冰片鸦胆子油纳米乳的制备及对大鼠脑胶质瘤的抑瘤作用研究

吕长江¹, 张蓉蓉², 周军², 李颖芳², 王国伟², 李范珠^{2*} (1.杭州市红十字会医院, 杭州 310003; 2.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 筛选和优化冰片鸦胆子油纳米乳处方, 制备冰片鸦胆子油纳米乳, 并初步考察其对大鼠脑胶质瘤的抑瘤作用。方法 通过柱前衍生化处理, 建立 GC 测定鸦胆子油中油酸含量的分析方法; 采用转相法制备冰片鸦胆子油纳米乳; 绘制伪三元相图, 筛选最佳处方; 透射电子显微镜观察外观形态、激光粒度仪测定粒径分布和 Zeta 电位; 构建大鼠脑胶质瘤模型, 以瘤重和瘤体积变化为指标, 初步考察冰片鸦胆子油纳米乳对大鼠脑胶质瘤的抑瘤作用。结果 建立了 GC 测定鸦胆子油中油酸含量的分析方法, 筛选冰片鸦胆子油纳米乳最佳处方为油相肉豆蔻酸异丙酯 35%, 鸦胆子油(含 1% 冰片)35%, 乳化剂 Cremophor RH40 18%, Labrasol 12%, 纳米乳外观呈圆整球形, 平均粒径 $(47.60 \pm 0.57) \text{ nm}$, PDI 为 (0.22 ± 0.01) , Zeta 电位为 $(-1.06 \pm 0.12) \text{ mV}$, 载药量 $(0.424 \pm 0.005 \text{ 6}) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。抑瘤实验显示, 模型组、鸦胆子油注射剂组、鸦胆子油纳米乳组和冰片鸦胆子油纳米乳组的瘤重分别为 (1.32 ± 0.19) , (0.84 ± 0.08) , (0.76 ± 0.06) 和 $(0.57 \pm 0.10) \text{ g}$, 肿瘤体积分别为 (72.2 ± 9.4) , (44.2 ± 5.1) , (42.3 ± 4.9) 和 $(27.9 \pm 2.5) \text{ mm}^3$, 鸦胆子油注射剂组、鸦胆子油纳米乳组和冰片鸦胆子油纳米乳组的肿瘤抑制率分别为 36.49%, 42.80%和 56.94%。结论 所筛选的最佳处方采用转相法制备冰片鸦胆子油纳米乳, 粒径分布均匀, 油酸含量较高, 稳定性较好。同时冰片鸦胆子油纳米乳对大鼠胶质瘤相对具有较强的抑瘤作用, 初步推断冰片可能促进鸦胆子油跨过血脑屏障来提高抑瘤作用。

关键词: 鸦胆子油; 冰片; 纳米乳; 伪三元相图; 脑胶质瘤

中图分类号: R943; R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0780-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.002

Preparation of Borneol and *Brucea Javanica* Oil Nanoemulsion and Tumor Suppression Effect on Glioma in Rats

LÜ Changjiang¹, ZHANG Rongrong², ZHOU Jun², LI Yingfang², WANG Guowei², LI Fanzhu^{2*} (1. Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310003, China; 2. Zhejiang Chinese Medicine University, College of Pharmaceutical Science, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To select and optimize the prescription of borneol and *Brucea javanica* oil nanoemulsion (BBNE), and to prepare the BBNE, then to investigate its tumor suppression effect on glioma in rats. **METHODS** Establishing the GC analysis methods to determinate BBNE content by pre-column derivatization; applying the techniques of phase inversion to prepare BBNE; selecting and optimizing the prescription of BBNE by pseudo-ternary phase diagrams; using transmission electron microscope and laser granulometer to investigate the appearance shape, determination of particle size distribution and Zeta potential; building glioma tumor model in rats, and investigate BBNE tumor suppression effect by the index of tumor weight and volume. **RESULTS** The GC analysis method to determinate BBNE content was established successfully, the best prescription of BBNE was oil phase IPM 35%, *Brucea javanica* oil (containing 1% borneol) 35%, emulsifier Cremophor RH 18% and Labrasol 12%; the appearance of nanoemulsion was round and spherical, the average particle size was $(47.60 \pm 0.57) \text{ nm}$, the PDI was (0.22 ± 0.01) , the Zeta potential was $(-1.06 \pm 0.12) \text{ mV}$, and the drug loading capacity was $(0.424 \pm 0.005 \text{ 6}) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274089); 浙江省自然科学基金资助项目(LZ13H280001)

作者简介: 吕长江, 女, 副主任药师 Tel: 18958008970 E-mail: 106433093@qq.com *通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)86633030 E-mail: lifanzhu@zjctcm.net

tumor inhibition experiments showed that the tumor weight and volume of Saline injection group, *Brucea javanica* oil injection group, *Brucea javanica* oil nanoemulsion group and BBNE group were (1.32 ± 0.19) , (0.84 ± 0.08) , (0.76 ± 0.06) , (0.57 ± 0.10) g and (72.2 ± 9.4) , (44.2 ± 5.1) , (42.3 ± 4.9) , (27.9 ± 2.5) mm³, respectively, and the tumor inhibition rates were 36.49%, 42.80%, 56.94%.

CONCLUSION The prescription is very well because the BBNE has uniform particle size distribution, higher drug content and better stability, and that BBNE has better tumor suppression effect on glioma in rat show borneol may promote *Brucea javanica* oil across the blood-brain barrier to improve tumor suppression effect preliminarily.

KEY WORDS: *Brucea javanica* oil; borneol; nanoemulsion; pseudo-ternary phase diagrams; glioma

鸦胆子油(*Brucea javanica* oil)为苦木科植物鸦胆子(*Brucea javanica* L. Merr)的干燥成熟果实中提取得到的脂肪油, 主要活性成分为不饱和脂肪酸——油酸和亚油酸, 其中油酸含量达到60%^[1]。药理研究发现鸦胆子油有低毒、高效和抗肿瘤谱广等诸多优点, 可用于治疗肺癌、肝癌、胃癌和乳腺癌等恶性肿瘤^[2-4], 还可用于抑制脑胶质瘤, 并能降低颅内压, 显示出良好的应用前景^[5]。主要上市制剂为注射用鸦胆子油乳剂, 但由于乳剂属于多相的动力学不稳定分散体系, 粒径较大, 易发生破乳分层现象, 并且由于血脑屏障导致鸦胆子油入脑药物浓度较低^[6-7], 因此其临床应用受到一定限制。冰片是龙脑香科植物龙脑香树脂的提取物,《本草纲目》记载冰片有“引药上行”之功效, 在许多中成药中作为“药引”, 可以促进药物跨过血脑屏障, 作为脑部病变的引经药, 应用于脑靶向给药系统^[8-9]。

本研究针对鸦胆子油及其纳米乳存在的不足, 研制了新型冰片鸦胆子油纳米乳(borneol and *Brucea javanica* oil nanoemulsion, BBNE)。采用转相法进行制备, 并借助伪三元相图筛选纳米乳最佳处方和制备工艺, 初步考察 BBNE 理化性质和对大鼠脑胶质瘤的抑瘤作用, 为鸦胆子油治疗脑胶质瘤制剂开发提供参考, 为纳米乳给药系统的研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

GC-2010 气相色谱仪(日本岛津公司); JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司); 380 ZLS 激光粒度测定仪(美国 Nicomp 公司); 大鼠脑立体定位仪(日本 Narishige 公司); Bio-RAD 680 酶标仪(美国 Bio-RAD 公司); ZEISS Axiovert 200 荧光倒置显微镜(德国 Carl Zeiss 公司); Thermo Scientific Forma II CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); CP225D 电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆

山市超声仪器有限公司); HZ-92125 恒温振荡器(江苏太仓市科教器材厂); DF-101S 集热式恒温搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂); HJ-6B 多头测速加热搅拌机(金坛市金伟实验仪器厂); TGL-16B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); pH 仪(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

鸦胆子油(江西省吉水县康民本草药用油提炼厂, 批号: 0110914); 油酸对照品(中国食品药品检定所, 批号: 111621-201004, 纯度 $\geq 98\%$); 冰片(浙江中医药大学中药饮片厂, 批号: 101201); 正己烷(美国 TEDIA 天地试剂公司, 批号: 1203063); 三氟化硼乙醚(江苏永华精细化学品有限公司, 批号: 20120901); 卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20100601); 吐温 80(成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20090708); 波洛沙姆 F188(德国 BASF 公司, 批号: WPWA544C); Cremopher RH 40(德国 BASF 公司, 批号: 79062488Q); Cremopher EL(德国 BASF 公司, 批号: 61623988Q); SolutolHS15(德国 BASF 公司, 批号: 27927024U); PEG400(上海浦东高南化工厂, 批号: 021032); Labrasol(法国 GATTEFOSSE 公司, 批号 135760); 肉豆蔻酸异丙酯(IPM, 阿拉丁化学试剂公司, 批号: 47116); 脑胶质瘤细胞株(中国科学院上海细胞研究所); 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); DMEM 高糖培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司); 鸦胆子油注射乳(浙江九旭药业有限公司, 批号: 20120510, 规格: 10 mL·支⁻¹); 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 Wistar 大鼠, 30 只, 体质量 (280 ± 20) g, ♂, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。所有动物实验均按照浙江大学动物饲养和使用指南操作。

2 方法

2.1 鸦胆子油 GC 分析方法

2.1.1 鸦胆子油衍生化方法^[1,10] 鸦胆子油衍生化处理:取鸦胆子油适量,加正己烷 10 mL,精密量取 5 mL,置具塞试管中,用氮气吹干,加入 0.5 mol·L⁻¹ KOH 甲醇 2 mL,于 65℃水浴皂化 25 min,放冷加 15%三氟化硼乙醚 2 mL,于 65℃水浴甲酯化 15 min,冰浴 5 min,加正己烷 2 mL,振摇 2 min,加饱和 NaCl 溶液 1 mL,使溶液上浮至瓶颈,取上层,加 0.5 g 无水 Na₂SO₄,振摇脱水,吸取上清液,即得。

2.1.2 色谱条件 色谱柱:Stabilwax-DA(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);FID 检测器;进样口温度:250℃;检测器温度:250℃;柱温:170℃;升温速率:10℃·min⁻¹,最终柱温:220℃,保温 3 min;载气为氮气,流速:0.5 mL·min⁻¹;进样量:0.5 μL。

2.1.3 对照品和供试品溶液的制备 精密称取油酸对照品 30 mg,溶于 10 mL 正己烷,配制成含油酸 3.0 mg·mL⁻¹的对照品贮备液。取冰片鸦胆子油纳米乳适量,加 0.5 g 无水硫酸钠超声破乳 30 min。用石油醚萃取 3 次(4, 2, 2 mL)后,合并石油醚层,用氮气吹干,加入正己烷 2 mL 溶解,制备成供试品溶液。

2.1.4 专属性考察 取油酸对照品贮备液、空白纳米乳、鸦胆子油纳米乳供试品溶液分别按照“2.1.1”项下衍生化方法处理后进样记录色谱图。

2.1.5 标准曲线的制备 分别精密吸取油酸对照品贮备液适量,按照“2.1.1”项下衍生化方法处理,分别制备成浓度为 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75 mg·mL⁻¹的梯度溶液。进样检测,重复 6 次,以峰面积 $A(\text{mV}\cdot\text{s})$ 为纵坐标,浓度 $C(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标绘制标准曲线。

2.1.6 精密度和回收率试验 精密吸取对照品贮备液 0.7, 0.15, 0.23 mL 于 10 mL 量瓶,配制成低、中、高 3 个浓度分别为 0.21, 0.45, 0.69 mg·mL⁻¹的对照品溶液,然后按照“2.1.1”项下衍生化方法处理后进样测定,每个浓度连续测定 5 次,连续测定 5 d,计算日内、日间精密度。分别取空白辅料适量,按相当于鸦胆子油中油酸含量的 80%, 100%, 120%加入不同量的油酸对照品,按照“2.1.1”项下衍生化方法处理后进样测定,平行测定 3 次,计算加样回收率。

2.1.7 稳定性和重复性试验 取同一样品溶液室温下放置,于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定,考察

鸦胆子油稳定性。精密量取鸦胆子油 20 mg, 6 份,分别溶于 10 mL 正己烷,按照“2.1.1”项下衍生化方法处理后进样测定,计算 RSD。

2.2 BBNE 的制备

2.2.1 制备方法 参考文献[11]采用转相法制备 BBNE:将乳化剂和助乳化剂加入油相中组成混合体系 20 mL,搅拌均匀,然后采用注射器向混合体系中缓慢恒定滴加水相 5 mL·min⁻¹,边加边磁力搅拌 300 r·min⁻¹,开始时,体系为黏度较小的澄清油相,加入水相后体系变混浊,当水相加到临界点时,体系会突然变为粘稠透亮,同时难以搅拌,此时为液晶相或凝胶相;继续滴加水相并不断搅拌,当水相加到一定量时,体系会突然变稀恢复澄清状态,最终滴加水相 35 mL;形成水包油(O/W)型纳米乳。

2.2.2 绘制伪三元相图筛选处方 研究中以 IPM 与冰片鸦胆子油(含 1%冰片)混合均匀(1:1)成为油相混合物(OS)作为油相,将乳化剂和助乳化剂按一定质量比(3:1, 3:2, 1:1)混合均匀后成为混合乳化剂(MS),低温时水浴加热溶化溶解。将 MS 与 OS 分别按质量比(9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9)称取 MS 与 OS,分别置于小烧杯中,25℃下,恒温磁力搅拌器搅拌使充分混匀。在搅拌状态下,用装有水相的注射器滴定以上的混合物体系,观察可能发生的变化,记录变“澄清透明”的相变化点及加入的水量。记录不同的 MS 与 OS 的比例,用 Origin 8.0 软件绘制伪三元相图,比较纳米乳区域面积的大小来进一步筛选 BBNE 最佳处方。

在前期的预实验研究中,已经筛选确定了乳化剂与助乳化剂的组合分别是 Solutol HS15 与正丁醇、Solutol HS15 与 Labrasol、Cremopher RH 与正丁醇、Cremopher RH 与 Labrasol。

2.2.3 形态、粒径和 Zeta 电位的测定 取适量 BBNE 滴于铜网上,静置 10 min 后用滤纸片吸干,再滴加 2.0%磷钨酸溶液于铜网上负染 5 min,自然挥干,用透射电子显微镜观察 BBNE。采用激光粒度测定仪测定 BBNE 平均粒径和 Zeta 电位。

2.2.4 载药量的测定 精密量取按照最优处方自制得到的 BBNE 2 mL, 6 份,置于 50 mL 具塞洁净试管中,按照“2.1.3”和“2.1.1”项下方法处理后进样测定计算 BBNE 的载药量。

2.2.5 稳定性试验 取 BBNE 适量,分别用蒸馏

水、5%葡萄糖注射液及 0.9%氯化钠注射液稀释观察,并在不同时间点,测定其 pH 值及粒径,测试稀释稳定性。取适量 BBNE 于 $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 h、 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后,观察形态,测定粒径,测试离心稳定性。取适量 BBNE 密封保存,于室温下放置,分别于 1, 2, 3, 4 个月后观察形态测定粒径,测试长期稳定性。

2.3 BBNE 对大鼠脑胶质瘤抑瘤作用初步研究

2.3.1 脑胶质瘤大鼠模型的建立 健康 Wistar 大鼠 30 只, ♂, 体质量 280~300 g, 用 10%的水合氯醛腹腔注射麻醉, 在大鼠脑立体定位仪引导下将微量加样器中的 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 大鼠胶质瘤细胞 15 μL 细胞悬液缓慢注入大鼠右侧尾状核部位(针尖对准颅骨前囟正中, 将针尖向右移 3 mm、向后移 1 mm)。用骨蜡封住颅骨开口, 将颅顶皮肤缝合, 用碘氟进行消毒。细胞接种完毕后, 注意保持大鼠体温和呼吸道通畅, 予以侧卧位放入鼠笼, 直至大鼠恢复正常活动和饮食, 饲养观察三周。

2.3.2 动物分组与给药方案 选取造模成功大鼠

24 只, 随机分为 4 组: 模型组(生理盐水); 阳性组, 鸦胆子油注射剂($2\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$); 鸦胆子油纳米乳组(未加入冰片, $2\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 折合鸦胆子油量); BBNE 组($2\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 折合鸦胆子油量)。分别大鼠尾静脉注射给药, 连续给药 1 周, 自由饮食饮水。

2.3.3 抑瘤作用的评价 大鼠称重后颈椎脱臼处死, 取出完整脑组织, 分离肿瘤块并称重, 将肿瘤块用 4%多聚甲醛固定, 测量肿瘤长短径, 按照公式分别计算各组肿瘤体积、各组肿瘤抑制率。肿瘤体积= $a^2\cdot b\cdot\pi\cdot 6^{-1}$ (a 为肿瘤短径, b 为肿瘤长径); 肿瘤抑制率=(模型组平均瘤重-给药组平均瘤重) $\cdot$ 模型组平均瘤重 $^{-1}\cdot 100\%$ 。

3 结果

3.1 鸦胆子油衍生化 GC 分析方法

3.1.1 专属性考察 油酸对照品、空白纳米乳、BBNE 供试品溶液气相进样得色谱图见图 1。可见杂质峰与油酸峰分离较好, 且峰形良好, 测定干扰较小, 专一性良好, 油酸的出峰时间为 11.5 min 左右。

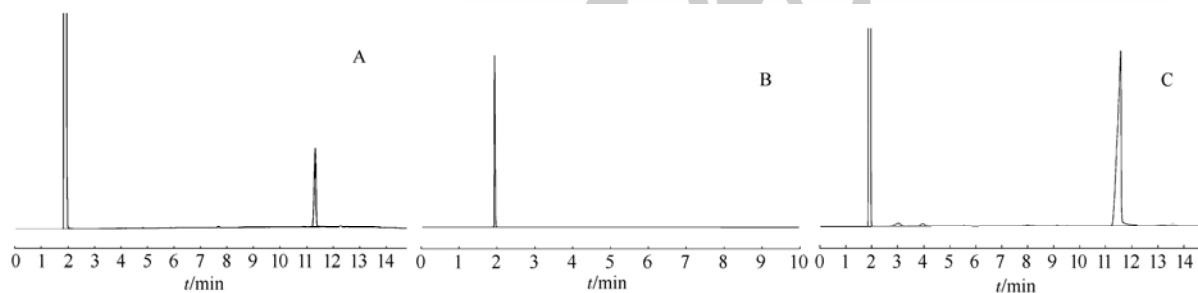


图 1 气相色谱图

A-油酸对照品; B-空白纳米乳; C-BBNE

Fig. 1 GC chromatogram

A-control of oleic acid; B-blank nanoemulsion; C-BBNE

3.1.2 标准曲线和方法学考察结果 油酸在 $0.15\sim 0.70\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系, 回归方程: $A=346\ 583C-3\ 039.5$, $r=0.999\ 9$ 。低、中、高 3 种浓度的回收率分别为 99.8%, 98.3%, 99.4%; 日内精密度 RSD 分别为 0.14%, 0.16%, 0.5%, 日间精密度 RSD 分别为 1.1%, 1.0%, 1.5%。油酸的稳定性 RSD 为 1.24%; 重复性 RSD 为 1.26%, 均符合方法学要求。

3.2 BBNE 的制备

3.2.1 最佳处方的确定 通过比较伪三元相图的区域面积, 可以得到 Cremopher RH40 为乳化剂与 Labrasol 为助乳化剂, 且乳化剂和助乳化剂的 $K_m=3:2$ 时区域面积最大, 最终筛选 BBNE 的处

方以 IPM 为油相, Cremopher RH40 为乳化剂与 Labrasol 为助乳化剂, 且乳化剂和助乳化剂的 K_m 值为 3:2。最终处方为: 油相 IPM 35%、鸦胆子油(含 1%冰片)35%、乳化剂 Cremopher RH40 18%、Labrasol 12%。结果见图 2。

3.2.2 外观形态 BBNE 负染后通过透射电镜观察形态, 可见呈圆整球形、大小分布均匀、粒子相互之间分散无黏连, 结果见图 3。结果表明, 成功制得的冰片鸦胆子油 O/W 型纳米乳。

3.2.3 粒径及 Zeta 电位 BBNE 平均粒径(47.60 ± 0.57)nm, PDI 为(0.22 ± 0.01), Zeta 电位为(-1.06 ± 0.12)mV, 粒径在纳米乳的最佳粒径范围内^[12], 粒径分布范围窄, 利于纳米乳体系的稳定。结果见

图 4 和图 5。

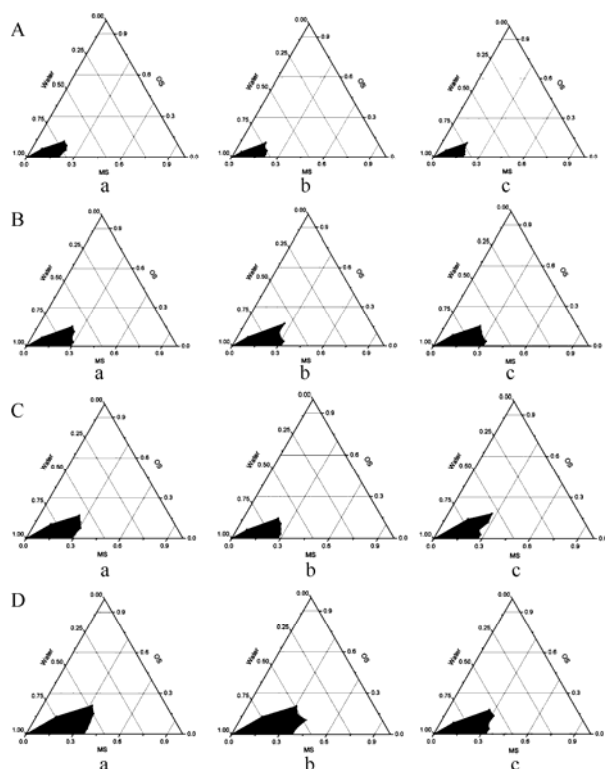


图 2 伪三元相图筛选乳化剂和助乳化剂及与油相的比例 A-Solutol HS15 和正丁醇; B-Solutol HS15 和 Labrasol; C-Cremopher RH40 和正丁醇; D-Cremopher RH40 和 Labrasol; a- $K_m=3:1$; b- $K_m=3:2$; c- $K_m=1:1$

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagrams of selecting and optimizing the prescription of BBNE

A-Solutol HS15 and *n*-butyl alcohol; B-Solutol HS15 and Labrasol; C-Cremopher RH40 and *n*-butyl alcohol; D-Cremopher RH40 and Labrasol; a- $K_m=3:1$; b- $K_m=3:2$; c- $K_m=1:1$

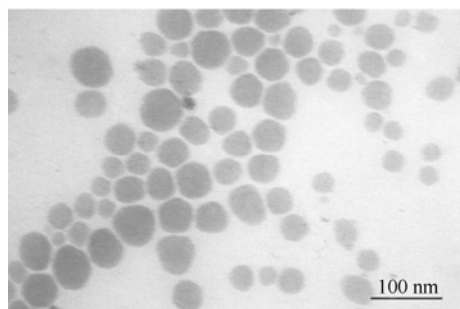


图 3 BBNE 透射电镜照片

Fig. 3 TEM Photograph of BBNE

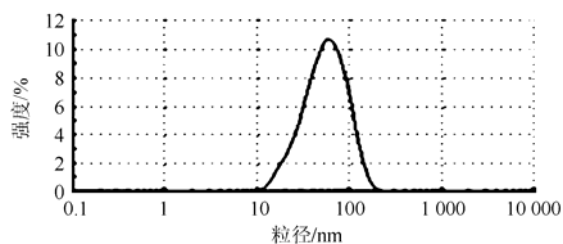


图 4 BBNE 的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of BBNE

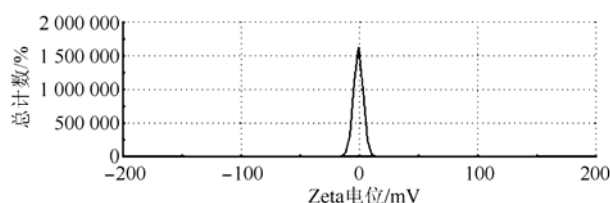


图 5 BBNE 的 Zeta 电位

Fig. 5 Zeta potential distribution of BBNE

3.2.4 油酸的含量 测定 BBNE 中的油酸含量为 $(0.4241 \pm 0.0056) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2.5 稳定性 考察了 BBNE 与溶剂配伍后的稳定性。在稀释过程中纳米乳的状态仍保持澄清带有淡蓝色乳光的均匀透明状态，且稀释后的纳米乳不分层、没有药物析出、无沉淀，说明其配伍稳定性好，且 pH 值接近中性，静止放置 48 h 内粒径无明显变化，符合静脉注射的要求。在离心稳定性试验后，纳米乳均能保持均匀透明的稳定状态。长期 30 h 存放下，BBNE 仍保持稳定状态，粒径无明显改变，纳米乳稳定性较好。结果见表 1。

表 1 不同介质稀释后 BBNE 的稳定性

Tab. 1 The stability of BBNE after dilution of different medium

稀释介质	放置时间/h	外观	pH 值	粒径
灭菌注射用水	0	透明淡蓝色乳光	5.70	45.60±0.57
	24	透明淡蓝色乳光	5.73	45.40±0.36
	48	透明淡蓝色乳光	5.76	49.70±0.28
5%葡萄糖注射液	0	透明淡蓝色乳光	5.12	46.90±0.66
	24	透明淡蓝色乳光	5.34	47.70±0.78
	48	透明淡蓝色乳光	5.68	50.40±0.34
0.9%氯化钠注射液	0	透明淡蓝色乳光	5.60	45.60±0.56
	24	透明淡蓝色乳光	5.72	46.50±0.19
	48	透明淡蓝色乳光	5.75	49.80±0.38

3.3 BBNE 对大鼠脑胶质瘤抑瘤作用

称取各组瘤重，模型组、阳性组、鸦胆子油纳米乳组和 BBNE 组的瘤重分别为 (1.32 ± 0.19) ， (0.84 ± 0.08) ， (0.76 ± 0.06) 和 $(0.57 \pm 0.10) \text{g}$ ；肿瘤体积分别为 (72.2 ± 9.4) ， (44.2 ± 5.1) ， (42.3 ± 4.9) 和 $(27.9 \pm 2.5) \text{mm}^3$ ；阳性组、鸦胆子油纳米乳组和 BBNE 组的肿瘤质量抑制率分别为 36.49%，42.80%，56.94%，表明对大鼠胶质瘤均有抑制作用，且 BBNE 组对大鼠胶质瘤的抑制作用强于阳性组和鸦胆子油纳米乳组 ($P < 0.05$)。结果见图 6 和图 7。

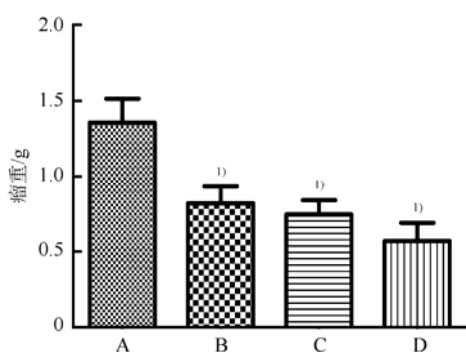


图6 各组瘤重对比情况

与模型组比较, $^{1)}P<0.05$; A-模型组; B-阳性组; C-鸦胆子油纳米乳组; D-BBNE 组

Fig. 6 Tumor weight of groups respectively

Compared with model group, $^{1)}P<0.05$; A-model group; B-Brucea javanica oil injection group; C-Brucea javanica oil nanoemulsion group; D-BBNE group

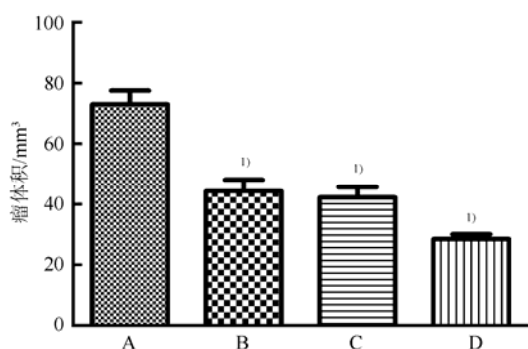


图7 各组瘤体积对比情况

与模型组比较, $^{1)}P<0.05$; A-模型组; B-阳性组; C-鸦胆子油纳米乳组; D-BBNE 组

Fig. 7 Tumor volume of groups respectively

Compared with model group, $^{1)}P<0.05$; A-model group; B-Brucea javanica oil injection group; C-Brucea javanica oil nanoemulsion group; D-BBNE group

4 讨论

鸦胆子油中的脂肪酸特别是长碳链脂肪酸极性较强, 高温下不稳定, 易发生聚合、脱酸、裂解等副反应, 分析中易造成损失, 难以直接进行气相色谱分析^[1,13]。因此, 对脂肪酸的色谱分析进行脂肪酸衍生化处理, 本实验采用三氟化硼乙醚进行甲酯化, 在甲酯化的过程中, 甲酯化时间和温度的变化均对油酸的测定产生一定的影响。在甲酯化时间为 15 min, 甲酯化温度为 65 °C 时, 出峰面积最大, 随着时间的延长和温度的升高, 峰面积反而减小。因此, 为了达到较好的衍生化效果, 应注意选择甲酯化时间和温度。

研究中采用绘制伪三元相图筛选乳化剂和助乳化剂, 并确定最佳处方。在筛选处方中除了考虑纳米乳形成的区域面积外, 还应该综合考虑乳

化剂和助乳化剂用量少、粒径小、乳化速度快、稳定性高的原则^[12-13]。伪三元相图相对于正交设计和均匀设计筛选处方, 虽然试验次数较多, 但是精度高, 具有良好的预测性, 可以直接获取较佳处方^[14]。相对于星点设计效应面优化法, 仍有一定的缺点, 特别是星点设计效应面优化法所建立的数学模型描绘效应面, 可以通过在较优区域的多个效应所选择的较佳条件进行叠加, 缩小较佳条件范围, 因此 BBNE 处方可以运用星点设计效应面优化法做进一步的研究。研究中所制备 BBNE 粒径小、稳定性高、载药量大, 可以归功于处方中 IPM 油相, 能够将鸦胆子油相溶, 使药物与各辅料相互溶解, 从而增加系统的含药量; 选择的 Cremophor RH40 和 Labrasol 乳化能力强, 纳米乳粒径小, 保持很高的稳定性。

初步考察 BBNE 对大鼠脑胶质瘤的抑瘤作用, BBNE 相对于鸦胆子油注射乳和鸦胆子油纳米乳, 具有更强的抑瘤作用, 初步探索冰片可以运用于治疗脑胶质瘤剂型设计中达到“引药上行”的功效, 与文献一致^[8-9], 为鸦胆子油治疗脑胶质瘤制剂开发提供了参考。BBNE 抑瘤作用的增强可能与冰片能够促进药物跨血脑屏障, 增加药物脑部靶向性, 提高药物的治疗效果有关, 在后期药效学研究中将做进一步探讨。

REFERENCES

- [1] LIU D, HAN F, LI W, et al. GC determination of four fatty acids in *Brucea javanica* (L.) Merr. oil simultaneously [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2011, 28(11): 882-885.
- [2] NIE Y L, LIU K X, MAO X Y, et al. Effect of injection of *Brucea javanica* oil emulsion plus chemoradiotherapy for lung cancer: a review of clinical evidence [J]. J Evid Based Med, 2012, 5(4): 216-219.
- [3] XU X, XU D H, JIANG B, et al. Effects of *Brucea javanica* oil on expression of vascular endothelial growth factor in A549 cell line [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(21): 2517-2520.
- [4] WANG F, CAO Y, LIU H Y, et al. Experimental studies on the apoptosis of HL-60 cells induced by *Brucea javanica* oil emulsion [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2003, 28(8): 759-762.
- [5] YIN S C, SHI W J, ZHAO X Q, et al. The experimental study of effect of *Brucea javanica* oil emulsion on C6 glioma cells [J]. Chin J Neuro-Oncol(中国神经肿瘤杂志), 2012, 10(1): 10-13.
- [6] YU Y L, TANG X, CUI F D. Pharmacokinetics of oleic acid in compound *Brucea javanica* oil submicron emulsions for injection in rats [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2008, 25(5): 337-341.
- [7] CUI Y, WU Z, LIU X, et al. Preparation, safety, pharmacoki-

- netics, and pharmacodynamics of liposomes containing *Brucea javanica* oil [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2010, 11(2): 878-884.
- [8] WU X, OUYANG L N, XIANG D W, et al. Enhancing effect of Borneolum Syntheticum and Acori Talarinowii Rhizoma on penetrating blood-brain barrier of hydroxysafflor yellow A [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(4): 734-737.
- [9] LÜ X X, SUN M J, SUN F Z. Research of bornrol promote drugs through blood-brain barrier [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(7): 878-881.
- [10] HUANG J Z, CHEN X G, GAO M H. Determination of oleic acid in Fructus Bruceae Oil Oral emulsion by gas chromatography [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2012, 23(2): 197-199.
- [11] YU Y L, LU Y, TANG X, et al. Formulation, preparation and evaluation of an intravenous emulsion containing *Brucea javanica* oil and Coix Seed oil for anti-tumor application [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(4): 673-680.
- [12] YANG F, YU X H, QIAO F, et al. Formulation and characterization of *Brucea javanica* oil microemulsion for improving safety [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2014, 40(2): 266-277.
- [13] SHAO A, CHEN G, JIANG N, et al. Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and granule formulations of *Brucea javanica* oil [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(8): 993-1003.
- [14] PENG X H, CUI M Q, CI Z M, et al. Research on the formation of *Brucea javanica* oil self-microemulsifying system [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33(9): 1520-1524.
- 收稿日期: 2013-11-21