

星点设计 效应面法优化冬凌草甲素聚乳酸纳米粒的制备工艺

许洁,王菊,冯年平,赵继会,于燕燕,谭蓉(上海中医药大学中药学院,上海 201203)

摘要 目的:优化改良自乳化溶剂扩散法制备冬凌草甲素聚乳酸纳米粒的制备工艺。方法:采用星点设计-效应面法,以冬凌草甲素在有机相中的浓度、载体在有机相中的浓度和水相与有机相的比例为考察因素,以包封率、载药量及药物利用率为考察指标,根据星点设计原理进行实验安排,并用多元线性回归及二项式拟合建立指标与因素之间的数学模型,经效应面法预测最佳工艺条件。结果:优化的最佳因素范围为药物浓度 X_1 : 0.5~0.8 mg/mL;载体浓度 X_2 : 1.6~2.6 mg/mL;水油比 X_3 : 1~1.5。以优化条件制备的样品平均粒径为 98.5 nm,包封率为 $(28.86 \pm 0.93)\%$,载药量为 $(8.23 \pm 0.35)\%$ 。结论:星点设计-效应面法适用于冬凌草甲素聚乳酸纳米粒的工艺优化,所建立的数学模型预测性良好。

关键词 冬凌草甲素;纳米粒;改良自乳化溶剂挥发法;星点设计-效应面法

中图分类号:R943 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)05-0345-05

Optimized preparation of oridonin-loaded nanoparticles by central composite design and response surface method

XU Jie, WANG Ju, FENG Nian-ping, ZHAO Ji-hui, YU Yan-yan, TAN Rong(Department of Pharmaceutics, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the formulation of oridonin-loaded PLA nanoparticles with modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. **Methods:** Applying central composite design and response surface method, choose the concentration of drug in organic phase, the concentration of PLA in organic phase and the ratio of water phase to organic phase as the influence factors. The evaluation parameters included entrapment efficiency, drug loading rate and particle size. Experiments were done on the theory of central composite design. The data were simulated using multi-linear equation and second-order polynomial equation. The possibly optimal formulation was predicted by response surface method. **Results:** The range of the optimal conditions were the concentration of drug in organic phase 0.5~0.8 mg/mL, the concentration of PLA in organic phase 1.6~2.6 mg/mL, the ratio of water phase to organic phase 1~1.5. According to the optimal conditions, the mean particle size, entrapment efficiency and drug loading rate were 98.5 nm, $(28.86 \pm 0.93)\%$ and $(8.23 \pm 0.35)\%$, respectively. **Conclusion:** The central composite design and response surface method are useful for the optimization of preparing oridonin-loaded PLA nanoparticles. The established model could predict the parameter of the formulations exactly and properly.

KEY WORDS oridonin; nanoparticles; modified spontaneous emulsification solvent diffusion method; central composite design and response surface method

星点设计(central composite designs, CCD)又称中心组合设计,是一种多因素多水平优化设计,可用三维效应面进行数据处理及非线性方程拟合,模拟方程可较好的预测结果。冬凌草甲素(Oridonin, OR)是冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的主要抗癌成分,属于贝壳杉烯二萜类化合物。研究^[1-3]表明,OR对体外培养的人体食管癌 109细

胞、肝癌 BEL-7402细胞及白血病细胞等多种人体癌细胞有明显的细胞毒作用。将冬凌草甲素制备成聚乳酸纳米粒可以增加药物的靶向性和稳定性,降低药物的毒副作用,提高疗效。影响纳米粒包封率和载药量的因素有多种,本实验采用星点设计-效应面法优化改良自乳化溶剂扩散法(modified spontaneous emulsification solvent diffusion method)优化冬凌草甲素聚乳酸纳米粒的制备工艺。

项目资助:上海市博士点基金(2006B02),上海市教委重点学科项目(J50302),上海市科委资助(0852nm05300)。

作者简介:许洁(1981-),女,博士研究生, Tel: 13795320947。

通讯作者:冯年平. Tel & Fax: (021) 51322197, E-mail: npfeng@hotmail.com.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Agilent 1100高效液相色谱仪(美国 Agilent公司); Senco R206型旋转蒸发器

(上海申生科技有限公司);激光粒度散射仪(Nicomp 380/ZLS,美国);微量电子分析天平(Sartorius CP225D);2-16k型超速冷冻离心机(德国 SIGMA公司);PHILIPS TECNA I 12透射电镜(荷兰 Philips公司);85-2型数显双向恒温磁力搅拌器(金坛市医疗仪器厂)。OR I对照品(>98%,中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号 1046-050512);OR I原料药(97.3%,杭州华东医药集团康润制药有限公司,批号 200705)。聚乳酸(PLA, Mr 15 000,山东省医疗器械研究所),F-68(Poloxamer188,德国 BASF公司),Sephadex G-50 medium葡聚糖凝胶(瑞典 Pharmacia公司)。甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 冬凌草甲素聚乳酸纳米粒(OR I NP)的制备方法 采用改良自乳化溶剂扩散法制备。称取处方量的冬凌草甲素和 PLA,溶于适量丙酮-乙醇(3:2)的混合溶剂中。在恒温匀速搅拌(0, 600 r/min)下,将上述有机相缓缓加到一定量的1% F-68溶液的水相中,40 °C减压除去有机溶剂,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

1.2.2 OR I的 HPLC测定

1.2.2.1 色谱条件 色谱柱:ODS-Kromasil C₁₈柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(60:40);检测波长:238 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μL。

1.2.2.2 标准曲线与回收率 OR I标准溶液配制:精密称取 OR I对照品 7.68 mg置 10 mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,作为储备液。分别精密量取 10、50、100、400、1 000、2 500 μL储备液,置 10 mL量瓶中,流动相稀释至刻度,制成浓度分别为 0.768、3.84、7.68、30.72、76.8、192 μg/mL的 OR I标准溶液。分别取 20 μL标准溶液进 HPLC分析,以 OR I的峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归。另取空白纳米粒溶液测定 3.84、30.72、192 μg/mL 3个浓度的加样回收率。

1.2.3 SephadexG-50凝胶柱层析法测定 OR I NP的包封率和载药量 取 OR I NP液 0.5 mL,用丙酮溶解并定容至 10 mL,离心(15 000 r/min, 30 min),取上清液进样 20 μL测定,得药物总量(WT)。另将溶胀 24 h以上的 SephadexG-50装柱(50 cm ×1 cm),精密量取 OR I NP液 1 mL上样,以水洗脱,每 2 mL为一个流份,收集 35个流份,分离得到纳米粒液及其后的游离药物溶液,进样测定,得游离药物量(W_r)。另设制备时 PLA的投入量为 WP,按下式计算包封率(EE)和载药量(DL)。

$$\text{包封率 (entrapment efficiency, EE, \%)} = (\text{WT} - \text{W}_r) / \text{WT} \times 100\%$$

$$\text{载药量 (drug loading rate, DL, \%)} = (\text{WT} - \text{W}_r) / [\text{WP} + (\text{WT} - \text{W}_r)] \times 100\%$$

1.2.4 星点设计-效应面法优化 OR I NP处方 在单因素考察的基础上,选择 OR I在有机相中的浓度(X₁)、载体在有机相中的浓度(X₂)和水相与有机相的比例(X₃)三个影响显著的因素,以包封率、载药量和平均粒径为评价指标,采用三因素五水平的星点设计对 OR I NP的制备工艺和处方进行优化。代码取 1.732,因素水平设计如表 1所示。

表 1 星点设计优化 OR I NP的制备工艺的试验因素水平表

参数	水平				
	-1.732	-1	0	1	1.732
X ₁ (mg/mL)	0.20	0.33	0.50	0.67	0.80
X ₂ (mg/mL)	1.00	1.42	2.00	2.58	3.00
X ₃ (W/O)	0.50	0.71	1.00	1.29	1.50

1.2.5 优化处方的验证 按照所选处方重复 3次实验,将所选因素的值带入所得的回归方程求出预测值与和测得的实际值并进行比较。

1.2.6 OR I NP粒径的测定与形态学观察 将纳米溶液用超纯水稀释,置于 Zeta Potential/Particle Sizer NICOMPIM 380ZLS上进行粒径分布和 zeta电位的测定,样品稳定时间为 6 min。另取纳米粒胶体溶液适当稀释,在铜网上用 2.0%的磷钨酸负染,低温干燥后在 PHILIPS TECNA I 12透射电镜上进行观察。

2 结果与讨论

2.1 OR I的 HPLC测定标准曲线 结果表明,OR I浓度在 0.768~192 μg/mL范围内,A与 C线性关系良好:A=22 982.3C+2 263.8(r=0.9998)。三种浓度样品的平均回收率为 99.26±2.47%。

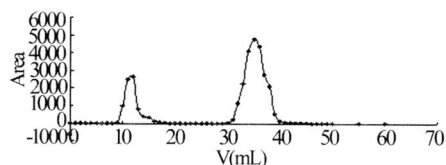


图 1 OR I NP在 SephadexG-50凝胶柱上的洗脱曲线

2.2 SephadexG-50凝胶柱层析法的洗脱曲线 OR I NP在 SephadexG-50凝胶柱上的洗脱曲线见图 1。OR I NP的出峰体积为 9~18 mL,为淡蓝色乳光的胶体溶液;游离 OR I的出峰体积为 30~44 mL,为澄清透明的无色溶液,表明凝胶柱层析法可以将纳

米粒与游离药物完全分开。OR I药物溶液通过该凝胶柱的回收率为 98.72%,表明凝胶柱可以用来测定 OR IHP的包封率。

2.3 星点设计 效应面法优化 OR IHP处方结果
 根据试验处方安排,制备纳米粒,冰箱保存,测定 20 个处方的包封率、载药量和粒径。本试验采用总评“归一值”法进行综合考察^[4],优选 OR IHP的最佳处方。包封率和载药量值越大越好,拟定包封率和载药量的可接受的最大值和最小值分别为 35%、18%和 12%、2%;粒径其可接受的最大值和最小值设定为 180 nm和 80 nm。采用线性归一化法^[5]对

每个指标进行数学转换,求“归一值”。对于包封率和载药量,当 Y_i 小于最小值时, d_i 定为 0;当 Y_i 大于最大值时, d_i 定为 1;当 Y_i 处于二者之间时,采用公式 $d_i = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}}$ 计算。对于粒径,其值越小越好,当 Y_i 小于最小值时, d_i 定为 1;当 Y_i 大于最大值时, d_i 定为 0;当 Y_i 处于二者之间时,采用公式 $d_i = \frac{Y_{\max} - Y_i}{Y_{\max} - Y_{\min}}$ 计算。总评 OD = $(d_1 \cdot d_2 \cdot d_3)^{1/3}$ 。试验安排表及结果见表 2,其中 15~20#处方为重复实验,各指标的结果用均值表示。

表 2 三因素五水平星点设计试验安排表与实验结果

	X ₁ (mg/mL)	X ₂ (mg/mL)	X ₃ (W/O)	包封率 (%)	载药量 (%)	粒径 (nm)	OD
1	0.33	1.42	0.71	24.04	5.23	133	0.3033
2	0.67	1.42	0.71	23.86	10.15	107	0.5566
3	0.33	2.58	0.71	25.78	3.17	158	0
4	0.67	2.58	0.71	27.89	6.79	124	0.4695
5	0.33	1.42	1.29	25.04	5.44	84.2	0.5116
6	0.67	1.42	1.29	26.31	11.07	82	0.7552
7	0.33	2.58	1.29	27.67	3.39	105.5	0.3690
8	0.67	2.58	1.29	30.17	7.30	95.8	0.6650
9	0.20	2.00	1.00	24.04	2.35	128	0.1572
10	0.80	2.00	1.00	23.84	8.71	93	0.5724
11	0.50	1.00	1.00	24.28	10.83	105	0.5940
12	0.50	3.00	1.00	26.68	4.26	138	0.2703
13	0.50	2.00	0.50	25.87	6.07	145	0.2380
14	0.50	2.00	1.50	28.38	6.62	118	0.5054
15~20	0.50	2.00	1.00	34.03	7.84	103	0.7178

2.4 OR IHP星点设计数学模型的拟和 用 Statistica统计软件分别以包封率、载药量、平均粒径和总评 OD值对所选三个因素进行多元线性和非线性拟合,对方程中的各项系数进行 *t* 检验,并以 $P < 0.5$ 进行逐步递减回归。多元线性回归方程为:

$$\text{包封率} = 24.5271 + 0.8204X_1 + 0.98761X_2 + 0.0079X_3 \quad (r=0.3681)$$

$$\text{载药量} = -0.6204 + 11.7775X_1 + 0.4878X_2 + 0.5655X_3 \quad (r=0.7701)$$

$$\text{平均粒径} = 122.9414 - 37.7806X_1 - 2.9810X_2 + 15.3518X_3 \quad (r=0.6836)$$

$$\text{OD} = 0.8051 + 0.6980X_1 + 0.0486X_2 - 0.0615X_3 \quad (r=0.7460)$$

二项式方程:

$$\begin{aligned} \text{包封率} = & 22.4762 + 89.9037X_1 - 17.5412X_2 \\ & + 11.3532X_3 - 88.1654X_1^2 + \\ & 4.2927X_2^2 - 10.2130X_3^2 \quad (r=0.9111) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{载药量} = & 23.2770X_1 - 1.0976X_2 - 6.6922X_3 \\ & + 1.7265X_1X_2 + 6.2181X_1X_3 - \end{aligned}$$

$$19.9231X_1^2 + 0.4428X_2^2 + 2.0628X_3^2 \quad (r=0.8651)$$

$$\begin{aligned} \text{平均粒径} = & 43.2515 - 86.4176X_1 + 71.2031X_2 \\ & + 37.0004X_3 - 51.9003X_1X_2 - \\ & 141.4300X_1X_3 + 14.1457X_2X_3 + \\ & 252.0499X_1^2 - 16.2778X_2^2 + \\ & 30.7140X_3^2 \quad (r=0.9081) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{OD} = & 0.4251 + 3.7555X_1 - 0.8923X_2 + \\ & 0.3199X_1X_2 + 0.7761X_1X_3 - 0.0621X_2X_3 \\ & - 4.2145X_1^2 + 0.2104X_2^2 - 0.3869X_3^2 \\ & \quad (r=0.9134) \end{aligned}$$

从拟合方程的相关系数 *r* 值可见,3个指标及综合 OD值均采用二项式方程拟合效果较好。三个因素对包封率、载药量和粒径均有影响,交互作用也较明显。

2.5 效应面优化 OR IHP处方和工艺 用 origin6.0软件分别绘制总评 OD值对所选三个因素中任意两个因素的效应面(response surface)三维图和二维等高线图,结果见图 2。

可知,随着药物浓度的升高,OD值逐渐升高,但超过 0.8 mg/mL后又有下降趋势;载体浓度越小 OD值越大,在药物浓度较大和水油比 1.5左右时变化不明显;水油比越大,OD值越大。综合考虑各个指标,预测各因素的最佳范围为药物浓度 X_1 : 0.5 ~ 0.8 mg/mL;载体浓度 X_2 : 1.6 ~ 2.6 mg/mL;水油比 X_3 : 1 ~ 1.5。结合实际操作与制剂目的,最终选择 $X_1 = 0.5$ mg/mL, $X_2 = 2.5$ mg/mL, $X_3 = 1$ 为制作处方,并进行验证。即冬凌草甲素 10 mg、PLA-15K50 mg共溶于 20 mL 丙酮乙醇 3:2 的混合液中,600 r/min 搅拌下倒入 20 mL 1% F-68 水溶液中,稳定 5 min,于 40 °C 减压除去有机试剂,过 0.8 μm 的微孔滤膜,即得 OR HNP 胶体溶液,置 4 °C 冰箱保存。

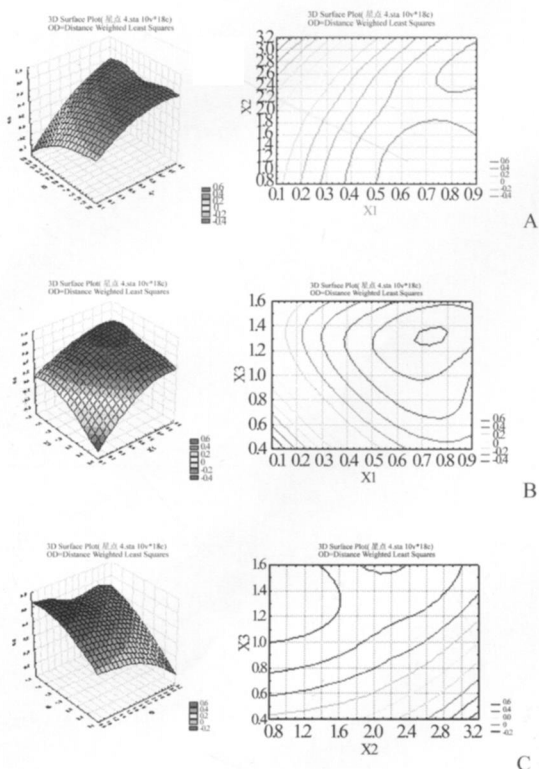


图 1 OD与三个考察因素的三维图(左)和等高线图(右)
A-OD值对因素 X_1 和 X_2 ; B-OD值对因素 X_1 和 X_3 ;
C-OD值对因素 X_2 和 X_3

2.6 优化处方的验证 预测值与实际值比较的结果见表 3。可见各指标的模拟方程的预测性良好,最大偏差不过 5%,表明所建立的模型方程预测性较好。

表 3 OR HNP 优化处方预测值与实际值的比较 (n=3)

参数	预测值	实测值	偏差 (%)
包封率 (%)	28.79	28.86	-0.22
载药量 (%)	8.51	8.23	3.27
粒径 (nm)	98.78	95.8	3.02
OD	0.6487	0.6754	-4.12

注:偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值 × 100%

2.7 验证处方的表征 所选处方制备的纳米粒溶液呈淡蓝色乳光透明溶液。测得平均粒径 95.8 nm, Chi Squared 为 0.63, 多分散系数 P. I 为 0.075, 所制备的纳米粒粒径较小且粒径分布较窄。测得所制备的纳米粒溶液的 zeta 电位为 -11.44 mV。透射电镜下所制纳米粒颗粒圆整,大部分粒子的直径小于 100 nm,与粒径分布的结果一致。粒径分布图与透射电镜图见图 3。

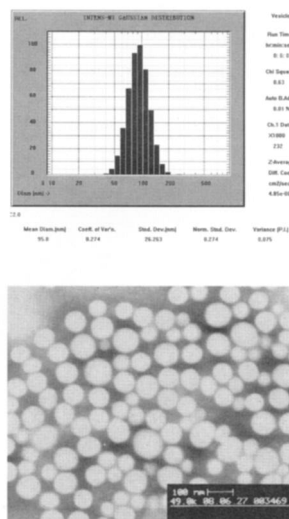


图 3 验证处方的纳米粒径分布图与 OR HNP 透射电镜图

2.8 讨论

2.8.1 影响纳米粒制备工艺的因素很多,如制备方法、载体浓度、药物浓度、水相与有机相的比例、药载比、载体类别与分子量、表面活性剂的种类与浓度、搅拌速度与温度等。在预试验的基础上,选择对纳米粒的制备影响最显著的三个因素:药物的浓度、载体浓度和水相与有机相的比例进行考察。

2.8.2 包封率和载药量是评价纳米粒制备工艺的重要指标。包封率是指制剂中的药物量与制剂中总药量的比值,载药量是指制剂中的总药物量与制剂总量的比值。包封率和载药量越高,制备工艺越好。纳米粒的粒径对纳米粒在体内的分布影响很大:由于肝窦窗孔一般为 150 nm,粒径大于 100 nm 就容易被网状内皮系统的巨噬细胞内吞,形成肝、脾等被动靶向;纳米粒粒径小于 50 nm 时,能穿过肝脏内皮或淋巴传递到达骨髓;而在粒径 50 ~ 150 nm 范围内,纳米粒在体内易形成长循环系统,减少了单核吞噬系统对纳米粒的吞噬,使纳米粒更容易因肿瘤的 EPR 效应而靶向肿瘤。因此,我们选择包封率、载药量和平均粒径作为评价 OR HNP 制备工艺的指标。在采用综合指标 (overall desirability, OD) 考察

(下转第 369 页)

3 讨论

3.1 透皮促透剂的选择 理论上说氮酮和水溶性氮酮都是良好的透皮吸收促进剂,本研究中比较了两种不同的氮酮对西替利嗪凝胶剂透皮效果的影响。结果发现氮酮比水溶性氮酮的透皮效果好,使用 3%的水溶性氮酮 10 h 的累积透过量为 $410.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,而 2%氮酮 10h 的累积透过量为 $1195.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,要大大优于水溶性氮酮。因此本研究中选用 2%氮酮为西替利嗪凝胶剂的促透剂。

3.2 辅料及 pH 的选择 由于卡波姆为类丙烯酸与丙烯基蔗糖交联的高分子聚合物,在低浓度时形成澄明溶液,能增加溶液黏度,延长药液与皮肤接触时间,使药物缓慢持续地释放,减少给药次数,提高患者用药依从性,因此在处方中使用卡波姆 940,可以使溶液黏度较适宜经皮腔给药。另外在处方中加入甘油和薄荷脑,前者作为保湿剂,后者可增加皮肤清凉效果并起到止痒效果。

3.3 西替利嗪凝胶剂的渗透性能 西替利嗪凝

胶剂体外透皮试验,发现皮肤中的成分对西替利嗪的出峰无干扰,药物以一级动力学透过皮肤,渗透速率为 $110.03 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$,表明西替利嗪凝胶具有良好的透皮效果,可用于皮肤过敏性疾病的治疗。

参考文献:

- [1] Deborah M, Campoli-Richards, Micaela Mt-T, *et al* Cetirizine, a review of its pharmacological properties and clinical potential in allergic rhinitis, pollen-induced asthma, and chronic urticaria[J]. *Drugs*, 1990, 40(5): 762.
- [2] 刘继勇,胡晋红,朱全刚,等. 盐酸西替利嗪巴布剂的研制及体外释放特性[J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(7): 616.
- [3] 王雪明,王德隆. 复方甘草酸铵凝胶剂的制备[J]. *中国药师*, 2007, 10(7): 675.
- [4] 杨敏. HPLC法测定盐酸西替利嗪片的含量[J]. *中国药品标准*, 2002, 3(3): 156.
- [5] 鲁莹,吉小欣,高申,等. 利多卡因-卵磷脂微乳处方的初步研究[J]. *药学实践杂志*, 2004, 22(3): 141.

收稿日期: 2009-04-03

(上接第 348页)

综合效果时,每个指标必须确定其可以接受的最大值和最小值,以使所得的 d_i 更能真实的反映出指标的变化趋势,依据星点设计每个处方的实测值,我们分别选择 35%、18%、12%、2% 和 180 nm、80 nm 作为包封率、载药量和平均粒径的可接受的最大值和最小值。最终优选的处方与建立的 OD 值二项式方程所预测的结果较一致。

2.8.3 试验表明,药载比和药物在水相中的浓度对纳米粒的包封率、载药量和平均粒径影响也很大;而药物在有机相中的浓度、载体在有机相中的浓度以及油水相相比的变化都直接影响药载比和药物在水相中的浓度。因此,当改变一个因素时,对其它因素也会有一定的影响,因此容易产生因素间的交互作用。

2.8.4 本试验所制备的 OR INP 最终为经凝胶柱 除去游离药物的冻干粉针剂。所制备的 OR INP 的包封率为 28.86%,载药量 8.23%,经过凝胶柱

分离游离药物并冻干后,所得的纳米粉针剂中药物在纳米粒中的量占整个制剂的 98.42%,载药量 8.17%,可以满足治疗要求。

参考文献:

- [1] Zhang JF, Liu JJ, Liu PQ, *et al* Oridonin inhibits cell growth by induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells[J]. *Hepatol Res*, 2006, 35(2): 104.
- [2] Ikeze T, Chen S S, Tong X J, *et al* Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(4): 1187.
- [3] 刘加军,潘祥林,伍新尧,等. 冬凌草甲素诱导白血病 K562 细胞凋亡的机制[J]. *肿瘤研究与临床*, 2003, 15(4): 222.
- [4] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J]. *中国药理学杂志*, 2000, 34(8): 530.
- [5] 罗杰英. 现代物理药剂学理论与实践[M]. 上海:上海科技文献出版社, 2005: 391.

收稿日期: 2009-02-18

欢迎订阅 2010年《药学实践杂志》

全年订价: 48元

邮发代号: 4 - 664