

星点-效应面法优化芍药苷醇质体制备工艺

冯健男 杜守颖 白洁 陆洋 李鹏跃 武慧超

【摘要】 目的 Box-Behnken 效应面法优化芍药苷醇质体的制备工艺。**方法** 采用逆相蒸发法制备芍药苷醇质体。以磷脂与胆固醇比例(X_1)、磷脂浓度(X_2)、芍药苷浓度(X_3)为考察因素,包封率(Y)为评价指标,采用 Box-Behnken 效应面法对方工艺进行优化。**结果** 最佳处方为磷脂与胆固醇比例(mg/mg)=5.0,磷脂浓度(mg/mL)=18.0 mg/mL,芍药苷浓度(mg/mL)=5.2 mg/mL。包封率为 $(44.27 \pm 0.27)\%$,标准偏差均小于10%;粒径为 (167.77 ± 14.91) nm,多分散系数为 (0.41 ± 0.20) ($n=3$),变形性良好。**结论** 采用 Box-Behnken 效应面法对芍药苷醇质体处方进行优化是可行和有效的。

【关键词】 芍药苷; 醇质体; Box-Behnken 效应面法; 粒径; 变形性

【中图分类号】 R283 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.04.007

Preparation and formula optimization of Paeoniflorin ethosomes by Box-Behnken design and response surface method FEN Jian-nan, DU Shou-ying, BAI jie, et al. Department of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: DU Shou-ying, E-mail: dushouying@263.net

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制专项(2014ZX09301306-009)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[冯健男(硕士研究生)、杜守颖、白洁、陆洋、李鹏跃、武慧超]

作者简介: 冯健男(1989-), 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 新剂型与新技术。E-mail: 982166557@

qq.com

通讯作者: 杜守颖(1960-), 女, 博士, 教授。研究方向: 新剂型与新技术。E-mail: dushouying@263.net

【Abstract】 Objective To optimize the preparation technique for Paeoniflorin ethosome by Box-Behnken design and response surface method. **Methods** Paeoniflorin ethosomes was prepared by reverse phase evaporation. The effects of SPC- Cholesterol (X_1), concentration of SPC (X_2) and concentration of Paeoniflorin (X_3) were observed as metrics. The encapsulation efficiency (Y) was evaluated and the formula was optimized by Box-Behnken design and response surface method. **Results** The optimal formula was : $X_1 = 5.0$, $X_2 = 18.0$, and $X_3 = 5.2$. The encapsulation efficiency was $(44.27 \pm 0.27)\%$. The standardized deviations was below 10%. The average particle size was (167.77 ± 14.91) nm, PDI was (0.41 ± 0.20) ($n=3$), deformability was satisfactory. **Conclusion** Using Box-Behnken design and response surface method to prepare Paeoniflorin ethosomes is feasible and effective.

【Key words】 Paeoniflorin; Ethosomes; Box-Behnken design; Size; Deformability

芍药苷 (paeoniflorin, PF) 作为白芍总苷 (total glucosides of paeony, TGP) 的主要活性成分, 在临床上可用来治疗类风湿性关节炎^[1]。实验结果表明, 芍药苷可以通过抑制白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 的分泌抑制大鼠佐剂性关节炎的原发和继发性炎症^[2]。有文献报道^[3,4], 芍药苷微乳在降低关节炎指数、下调增高的 T 细胞和 B 细胞增殖反应、促进 T 细胞分泌 IL-2 等方面的作用较明显。

然而药代动力学表明芍药苷的口服生物利用度极低^[5-6], 单独给大鼠灌胃芍药苷, 其生物利用度只有 0.3%; 同时由于小肠的渗透性较差, 导致芍药苷吸收效果差^[7]。芍药苷的半衰期为 (88.87 ± 5.3) 分钟^[8], 因此, 临床治疗关节炎时, 需要多次、长期给药以达到有效的关节腔浓度, 服用次数每天需 3 次, 每天用量达 600 mg (以芍药苷计), 平均用药周期达 48 天^[9]。因此为充分发挥芍药苷的药效, 需改变传统口服给药方式。

醇质体是一种含醇脂质体。醇质体在传递过程中, 一方面可能与角质层脂质融合将药物直接释放到细胞内发挥作用, 另外醇质体还可以通过变形透过比自身小的角质层细胞间隙并进入血液循环, 易于到达皮肤深部, 提高药物的经皮速率, 增加药物在皮肤内的滞留时间^[10]。本实验拟制备高渗透性芍药苷醇质体载药系统, 以充分发挥芍药苷的药效, 为后期新型透皮给药系统的研究提供参考和依据。

1 材料

日本岛津高效液相色谱仪 (LC-20AT 四元泵、Model 1690 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器); KQ5200DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Sartorius BS110S 型电子分析天平 (北京

赛多利斯科学仪器有限公司); SCIENTZ IID 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 涡旋混合器 (大龙兴创实验仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Ultracel YM-30 超滤管 (Millipore); Zetasize Nano ZS 纳米粒度仪 (英国 Malvern 公司); 恒温磁力搅拌器 (金坛市鸿科仪器厂); 气体减压器 (上海减压器厂有限公司); 纯氮气 (氧立来有限公司)。

芍药苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110736-201438); 芍药苷提取物 ($\geq 98\%$, 南京泽朗生物科技有限公司); 大豆磷脂酰胆碱 S-100 (Lipoid S 100, 德国 Lipoid 公司, 批号 F20090050); 胆固醇 (Cholesterol, 美国 Amresco 公司); 纯净水 (娃哈哈集团有限公司); 无水乙醇 (北京化工厂); 无水乙醚 (北京化工厂); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 醇质体的制备

将磷脂和胆固醇的无水乙醚溶液作为油相; 于室温下将芍药苷的醇溶液加入油相中, 摇匀后冰浴探头式超声, 使形成油包水型乳剂; 将上述乳剂快速转移至 250 mL 旋转蒸发瓶中, 室温减压蒸发至凝胶状; 涡旋使凝胶部分塌陷, 减压蒸发残留乙醚得醇质体混悬液; 探头式超声, 即得。4℃ 遮光密闭保存。

2.2 包封率的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Merck C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.4% 冰醋酸溶液 (14:86); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃。

2.2.2 低速离心-超滤法测定包封率 精密移取醇质体 0.4 mL, 置于截留分子量为 30 kD 的超滤离心管 6000 rpm^[11] 中, 离心 30 分钟, 吸取 0.2 mL 滤液,

定容至 2 mL, 超声处理后, 测定芍药苷含量为 W_1 ; 精密移取醇质体溶液 0.2 mL, 加甲醇定容至 5.0 mL, 超声溶解, 测定芍药苷含量为 W_2 , 计算包封率公式为 $EE\% = (1 - W_1/W_2) \times 100\%$ 。

2.3 芍药苷醇质体的单因素考察

以包封率为指标, 分别对磷脂和胆固醇质量比、磷脂浓度和芍药苷浓度进行单因素考察。结果显示: 随着磷脂和胆固醇质量比的增加包封率逐渐增大, 当磷脂和胆固醇比例为 5:1 时, 包封率最高为 $(24.85 \pm 4.14)\%$; 随着磷脂浓度的增加, 包封率也逐渐增大, 当磷脂浓度为 13.6 mg/mL 时, 芍药苷浓度为 2.8 mg/mL 时, 包封率达到最大为 $(36.87 \pm 5.11)\%$ 。

2.4 Box-Behnken 法优化醇质体处方

2.4.1 Box-Behnken 法分析因素水平的选取和试验设计 在单因素考察的基础上, 选择对芍药苷醇质体包封率影响显著的三个因素: 磷脂与胆固醇比例 (X_1)、磷脂浓度 (X_2)、芍药苷浓度 (X_3) 作为因素, 设计因素水平见表 1。以包封率 (Y) 作为响应值, 共设计了 17 次试验。试验结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平表

水平	X_1 磷脂/胆固醇 (mg/mg)	X_2 磷脂浓度 (mg/mL)	X_3 芍药苷浓度 (mg/mL)
-1	3	6.8	2.8
0	5	17	5.6
1	7	27.2	8.4

2.4.2 多元二项式模型回归拟合结果 根据各项指标 F 检验的结果, 再采用 Design-Expert 8.0 进行二次拟合, 得到如下简化模型: $Y = 42.87 + 0.67 \times X_1 + 1.65 \times X_2 - 3.50 \times X_3 + 0.83 \times X_1 \times X_2 + 0.47 \times X_1 \times X_3 - 3.11 \times X_2 \times X_3 - 21.34 \times X_1^2 - 17.44 \times X_2^2 - 12.70 \times X_3^2$ ($R^2 = 0.9777$)。

通过方程可以看出, 在所选取的各因素水平范围内, 对芍药苷醇质体包封率的影响为: $X_3 > X_2 > X_1$, 同时各因素存在交互作用。

2.4.3 方差和显著性检验 方程 Y 的 R^2 为 0.9777, 方差分析结果显示 Y 失拟检验的 $P > 0.05$, 说明方程 Y 回归模型拟合情况理想, 其校正决定系数 R_{adj}^2 为 0.9490, 表明模型响应值的变化有 94.90% 来源于自变量, 实验误差较小, 可较好地描述各因素与响应值之间的关系, 故可以准确分析和

预测包封率; 显著性检验可知, 模型的一次项中, X_3 (芍药苷浓度) 最显著 ($P = 0.0360$); 二次项 X_1^2 和 X_2^2 ($P < 0.0001$) 极显著, X_3^2 ($P < 0.05$) 显著。

表 2 Box-Behnken 实验设计及响应值 ($n=3$)

序列号	X_1 (mg/mg)	X_2 (mg/mL)	X_3 (mg/mL)	Y (%)
1	5(0)	27.2(1)	2.8(-1)	24.85
2	5(0)	6.8(-1)	2.8(-1)	12.19
3	3(-1)	17(0)	2.8(-1)	8.81
4	5(0)	17(0)	5.6(0)	43.76
5	3(-1)	17(0)	8.4(1)	5.48
6	7(1)	27.2(1)	5.6(0)	4.68
7	3(-1)	27.2(1)	5.6(0)	3.98
8	5(0)	27.2(1)	8.4(1)	7.03
9	7(1)	6.8(-1)	5.6(0)	2.83
10	5(0)	6.8(-1)	8.4(1)	6.82
11	5(0)	17(0)	5.6(0)	38.4
12	3(-1)	6.8(-1)	5.6(0)	5.16
13	5(0)	17(0)	5.6(0)	45.52
14	5(0)	17(0)	5.6(0)	41.92
15	7(1)	17(0)	2.8(-1)	11.24
16	7(1)	17(0)	8.4(1)	8.3
17	5(0)	17(0)	5.6(0)	44.74

2.4.4 工艺参数预测和优化 根据二次多项回归方程拟合结果, 固定其中一个因素水平, 即作为中心点值, 绘出 Y 与其他两个因素的三维效应曲面图和等高线图, 预测芍药苷醇质体最佳处方配比, 见图 1。

从图 1 三维曲面图可看出, 在所选取的各因素水平范围内, 醇质体包封率在 X_1 值、 X_2 值和 X_3 值均存在极大值。当磷脂和胆固醇比例 (X_1) 值大于 5 时, Y 值随着 X_1 值的增大而减小; 当磷脂浓度 (X_2) 值大于 17 mg/mL 时, Y 值随着 X_2 值的增大而降低; 当芍药苷浓度 (X_3) 大于 5.6 mg/mL 时, Y 值随着 X_3 值的增大而降低。

2.4.5 根据 Box-Behnken 法优化醇质体处方的试验结果进行优化 得到优化后的处方磷脂与胆固醇比例 (mg/mg) = 5.03, 磷脂浓度 (mg/mL) = 17.62 mg/mL, 芍药苷浓度 (mg/mL) = 5.19 mg/mL。考虑操作可行性, 按照处方磷脂与胆固醇比例 (mg/mg) = 5.0, 磷脂浓度 (mg/mL) = 18.0 mg/mL, 芍药苷浓度 (mg/mL) = 5.2 mg/mL 制备 3 批芍药苷醇质体, 测定包封率。结果见表 3。试验值和模型预测值对比, 结果绝对偏差小于 10%, 说明模型 Y 可

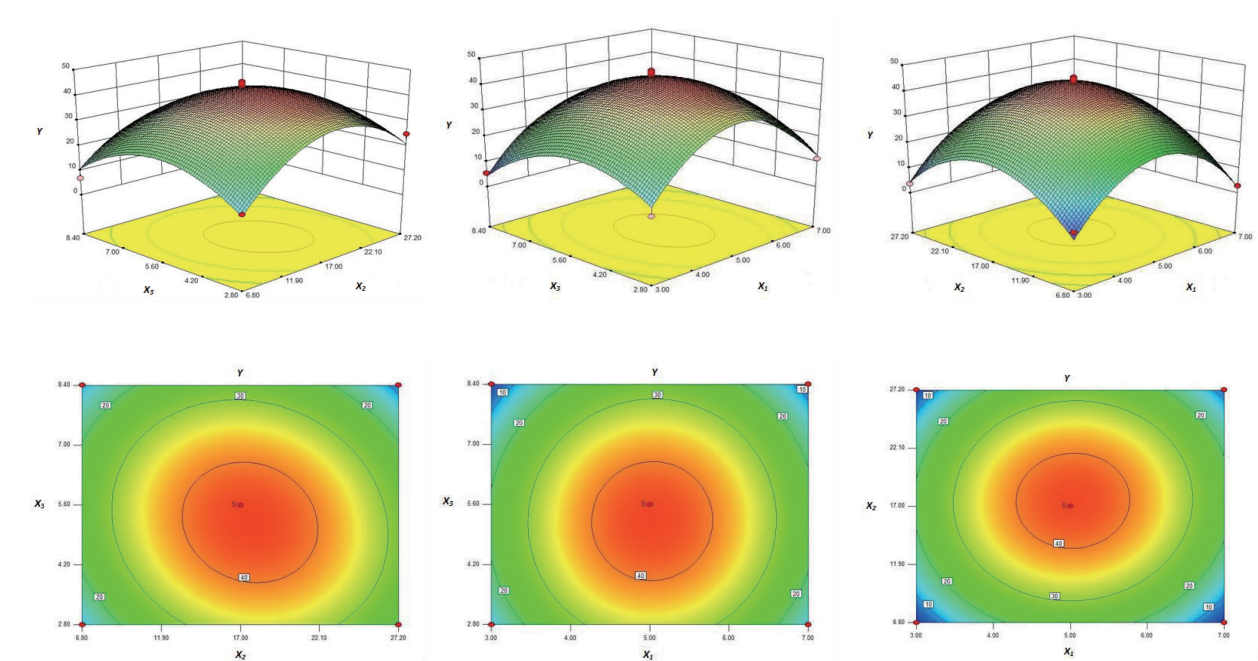


图 1 效应值 Y 与 $(X_1$ 和 $X_2)$ 、 $(X_1$ 和 $X_3)$ 、 $(X_2$ 和 $X_3)$ 三因素的三维曲面图(A)和等高线图(B)

表 3 优化处方的预测值和观察值($\bar{x} \pm s, n=3$)

指标	预测值	观察值	预测误差
包封率(%)	43.18	44.27 \pm 0.27	3.43

注: 预测误差=(预测值-观察值)/观察值

以较好地描述因素和响应值之间的关系,能较好地预测分析芍药苷醇质体的处方。

2.5 芍药苷醇质体的粒径分布

按照优化处方制备 3 批芍药苷醇质体,分别稀释 100 倍后,通过激光粒度分析仪测定粒径分布,结果呈单峰正态,平均粒径为 (167.77 ± 14.91) nm,多分散系数为 (0.41 ± 0.20) ($n=3$),见图 2。

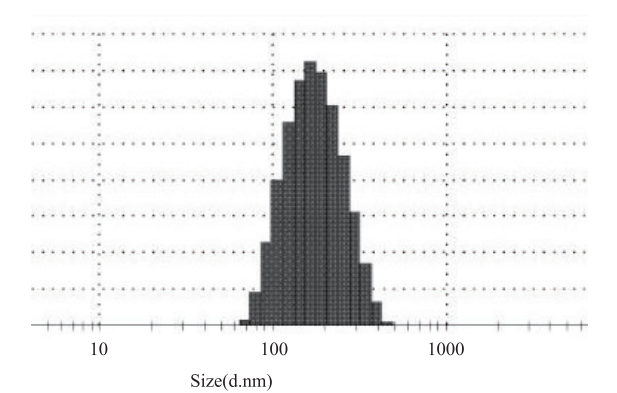


图 2 芍药苷醇质体的粒径分布图

2.6 变形性考察

考察芍药苷醇质体在外压(0.1、0.2 和 0.3 MPa)作用下,具有变形透过孔径为 0.22 μ m 微孔滤膜的能力^[12]。先观测芍药苷醇质体 3 mL 透过滤膜的时间,再观测 3 mL 水透过滤膜的时间,计算相对透过速率(P),见公式,结果见表 4。结果表明,随着压力的升高, P 值相应变大。在 0.3 MPa 压强作用下,芍药苷醇质体的 P 值平均达到 62%,可见芍药苷醇质体具有较好的变形性。

表 4 芍药苷醇质体透过滤膜时间($n=3, s$)

	0.1MPa	0.2MPa	0.3MPa
芍药苷醇质体	>600	129	37
水	64	41	23
相对透过速率(P)	11	34	62

注: $P=V_{\text{醇质体}}/V_{\text{水}} \times 100\%$

3 讨论

全文曾尝试引入包封率、载药量和综合评价指标 OD 值^[13],结果以载药量和 OD 值得到的方程拟合情况不好,故无法兼顾包封率和载药量两个指标。最终选择包封率作为优化指标,通过 Box-Behnken 效应面法优化处方并构建 Y 模型,模型拟合情况良好,能反映处方的包封率。经验证,

优化处方的包封率的预测值与试验值吻合情况良好。

通过拟合方程和方差分析,发现处方因素之间存在一定的交互作用,按照对包封率的影响排序: $X_2X_3 > X_1X_2 > X_1X_3$,但进一步通过方差分析可见交互作用并不显著;从拟合方程和方差分析得到二次项 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对 Y 值影响均显著。三维曲面图可看出,响应值均为一曲面,均呈现先升后降的趋势。 $X_1=5$ 时包封率存在极大值,这是因为胆固醇可增加醇质体膜的致密性,稳定醇质体膜,随着胆固醇用量的相对减小,在相同质量的脂质膜中,醇质体膜的刚性降低,总表面积增大,所包封的药物含量增加,包封率增加,但随着磷脂用量的相对增加,醇质体膜的不对称性和通透性随之增加,药物渗漏增加,致使包封率下降; $X_2=17$ 时,包封率存在极大值,这是因为包封率通常随着磷脂浓度的升高而增大,但如果磷脂浓度过大,容易形成多室脂质体,使内水相体积变小,导致包封率也变小^[14]; $X_3=5.6$ 时,包封率存在极大值,这是由于当药物用量过小,醇质体膜内外药物浓度差较小,不利于药物的包裹,导致包封率降低;同时,磷脂对药物的结合量存在饱和值^[15],当达到该饱和浓度时,药物将以游离态存在,包封率也将降低。

文献报道的水溶性药物的醇质体的包封率从10%~86.42%不等^[16-17],这与制备方法、载体材料、处方水平等多种因素有关。实验制备的芍药苷醇质体包封率并不高,若进一步提高芍药苷这种水溶性药物的包封率,下一步可以考虑从优选载体材料、扩大各因素水平的设置以及在逆相蒸发法的第一步首先制备成更加稳定的乳剂等方面进行研究。

参 考 文 献

- [1] 周婷,赵福涛.芍药苷治疗类风湿关节炎及其他疾病的研究进展[J].医学综述,2013,19(13):2382-2384.
- [2] 王晓玉,魏伟,唐丽琴,等.芍药苷对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及其产生细胞因子的影响[J].安徽医科大学学报,2007,42(2):189-192.
- [3] 陈镜宇,凌琳,张玲玲,等.芍药苷、白芍双苷、白芍总苷、芍药苷微乳、芍药苷类脂复合物对大鼠佐剂性关节炎及免疫功能的影响[C]//第十届全国抗炎免疫药理学学术会议论文集,2010.

- [4] 凌琳,陈镜宇,包旻,等.芍药苷微乳与芍药苷对大鼠佐剂性关节炎作用的比较[J].安徽医科大学学报,2011,46(3):240-244.
- [5] Liu Z Q, Jiang Z K, Zhou H, et al. Pharmacokinetic Interaction of Paeoniflorin and Sinomenine: Pharmacokinetic Parameters and Tissue Distribution Characteristics in Rats and Protein Binding Ability In Vitro[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2005, 99(4):381-391.
- [6] Chan K, Liu Z Q, Jiang Z H, et al. The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat gut sac model. [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103(3):425-432.
- [7] Zhong Q L, Zhi H J, Liang L, et al. Mechanisms Responsible for Poor Oral Bioavailability of Paeoniflorin: Role of Intestinal Disposition and Interactions with Sinomenine[J]. Pharmaceutical Research, 2006, 23(12):2768-2780.
- [8] 谭妍,沈国林,庄笑梅,等.芍药苷的体外代谢性质[J].国际药学研究杂志,2013,40(5):625-629.
- [9] 王巧.芍药质量控制方法与白芍总苷药物动力学研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2005.
- [10] 祝伟伟,翟光喜,赵军.醇质体的研究进展[J].食品与药品,2007,(1):46-49.
- [11] Lin J, Wang X, Wu Q, et al. Development of Salvianolic acid B-Tanshinone II A-Glycyrrhetic acid compound liposomes: Formulation optimization and its effects on proliferation of hepatic stellate cells[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 462(1-2):11-18.
- [12] 林碧雯.卢立康唑醇质体的研制及局部药效学研究[D].北京:中国人民解放军医学院,2014.
- [13] 程怡,吴琼,余秋强,等.Box-Behnken效应面法优化多西他赛长循环脂质体处方[J].中草药,2012,43(10):1946-1950.
- [14] 郝爱军,邓英杰,杨静文,等.影响替加脂脂质体包封率的因素[J].沈阳药科大学学报,2005,22(5):327-330.
- [15] 戚明,蒋国强,丁富新.胰岛素脂质体的制备及在电致孔下的经皮渗透[J].中国医药工业杂志,2005,36(12):751-753.
- [16] Fang Y P, Huang Y B, Wu P C, et al. Topical delivery of 5-aminolevulinic acid-encapsulated ethosomes in a hyperproliferative skin animal model using the CLSM technique to evaluate the penetration behavior. [J]. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 2009, 73(3):391-398.
- [17] LIU Xing yan, HE Zhi wei, LI Cai long, et al. Preparation of a ligustrazine ethosome patch and its evaluation in vitro and in vivo [J]. International Journal of Nanomedicine, 2011, 6(6):241-247.

(收稿日期:2015-12-22)

(本文编辑:董历华)