

星点设计-效应面法优化斑蝥素纳米结构脂质载体处方工艺

宁双成, 周莉莉, 王 敏, 朱 坤, 邹蔓姝, 夏新华*

湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 将斑蝥毒性成分斑蝥素 (CTD) 整合在新型纳米载体 (纳米结构脂质载体, NLC) 中, 并优化斑蝥素纳米结构脂质载体 (CTD-NLC) 处方工艺, 从而降低斑蝥素的毒性并增强其靶向性。方法 乳化超声分散法制备 CTD-NLC, 建立透析法测定其包封率, 以平均粒径、粒径分布 (多分散指数, PDI)、Zeta 电位、包封率与载药量为考察指标, 采用单因素考察与星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 优化 CTD-NLC 的处方工艺, 多元二次项拟合评价指标与因素间的模型方程, 对拟合方程进行方差分析, 效应面法预测最优处方。结果 优化后的 CTD-NLC 处方工艺: 脂质总量为 453.66 mg、固体脂质与液体脂质的比例为 1:2、总稳定剂质量浓度为 16.9 mg/mL、Pluronic F68 与蛋黄卵磷脂 (Lipoid E PC S) 的比例为 3.88:1、超声 30 min (工作 2 s、停 2 s); 所制得的 CTD-NLC 外观为澄清透明伴有淡蓝色乳光, 平均粒径为 (85.99 ± 0.49) nm, PDI 为 0.280 ± 0.002 , Zeta 电位为 (-8.21 ± 0.24) mV, 包封率为 $(98.57 \pm 0.05)\%$, 载药量为 $(0.65 \pm 0.01)\%$ 。结论 CCD-RSM 建立的拟合模型精准可靠, 优化后处方制备的 CTD-NLC 分布集中, 包封率高, 物理稳定性好, 为 CTD-NLC 的后续体内外研究奠定了制剂基础。

关键词: 斑蝥素; 纳米结构脂质载体; 星点设计-效应面法; 乳化超声分散法; 透析法; 包封率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4114-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.016

Optimization of prescription process of cantharidin nanostructured lipid carrier by central composite design-response surface methodology

NING Shuang-cheng, ZHOU Li-li, WANG Min, ZHU Kun, ZOU Man-shu, XIA Xin-hua

College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To integrate the toxic component of cantharidin (CTD) into a novel nanostructured lipid carrier (NLC) and optimize the cantharidin nanostructured lipid carrier (CTD-NLC) formulation process to reduce the toxicity of CTD and enhance its targeting. **Methods** CTD-NLC was prepared by emulsified ultrasonic dispersion method. The encapsulation efficiency was determined by dialysis method. The average particle size, particle size distribution (polydispersity index, PDI), Zeta potential, encapsulation efficiency, and drug loading were taken as indicators. Univariate investigation and central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) were used to optimize the prescription process of CTD-NLC. Multivariate quadratic fitting was used to evaluate the model equation between indicators and factors. The fitted equation was analyzed by the variance analysis and the optimal prescription was predicted by the response surface. **Results** The optimized CTD-NLC prescriptions were as follow: mass of total lipid was 453.66 mg, solid to liquid lipid ratio of 1:2, total stable dose of 16.9 mg/mL, ratio of Pluronic F68 to egg yolk lecithin (Lipoid E PC S) of 3.88:1, with ultrasound for 30 min (working 2 s, stopping 2 s). The prepared CTD-NLC was clear clarification in appearance with light blue opalescence, the average particle size was (85.99 ± 0.49) nm, PDI was 0.280 ± 0.002 , Zeta potential was (-8.21 ± 0.24) mV, encapsulation efficiency was $(98.57 \pm 0.05)\%$, and drug loading was $(0.65 \pm 0.01)\%$. **Conclusion** The fitting model established by CCD-RSM is accurate and reliable. The optimized CTD-NLC distribution is concentrated, with high encapsulation efficiency and good physical stability. It lays a foundation for the subsequent *in vitro* and *in vivo* studies of CTD-NLC. **Key words:** cantharidin; nanostructured lipid carrier; central composite design-response surface methodology; emulsified ultrasonic dispersion method; dialysis method; encapsulation efficiency

收稿日期: 2019-08-01

基金项目: 湖南省重点研发计划项目 (2017SK2122); 国家自然科学基金面上项目 (81573621); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20190574)

作者简介: 宁双成 (1995—), 男, 硕士研究生, 从事中药新制剂及制剂质量标准的研究。Tel: 15773110903 E-mail: 3041393049@qq.com

*通信作者: 夏新华 (1962—), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新制剂、新剂型、新技术及制剂质量标准的研究。

Tel: (0731)88458305 E-mail: xiaxinhua001@163.com

斑蝥素 (cantharidin, CTD) 是斑蝥的主要有效成分和毒性成分, 目前的研究肯定了其多种抗肿瘤作用, 如肝癌、卵巢癌、宫颈癌、结肠癌等^[1-5], 但 CTD 同时也作为一个毒性极强的成分, 具有较强的心脏与肝肾毒副作用^[6-7], 在应用其优良抗肿瘤作用的同时难免会因缺乏选择性从而产生对正常组织器官的毒性效应, 因此通过新型纳米载体包载药物而“增效减毒”成为近年来研究的热点。纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carriers, NLC) 是在固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLN) 的基础上发展的一类新型载药系统, NLC 不仅具有良好的生物相容性、缓释靶向等特点, 且因其加入液体脂质使得 SLN 所具有的规整固体晶格被打乱, 而增加的缝隙可以容纳更多的药物, 有效避免了传统 SLN 载药量低、贮存过程中药物易泄漏等缺陷, 近年来的研究报道中发现 NLC 在提高肿瘤靶向性方面具有较大的潜力^[8-13]。星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 设计试验优化方法, 具有次数少、精度高、预测值精准等优点, 常被用于优化制剂工艺^[14-16], 本实验采用单因素考察结合 CCD-RSM 优化斑蝥素纳米结构脂质载体 (cantharidin nanostructured lipid carriers, CTD-NLC) 处方, 为 CTD 应用于体内外研究奠定制剂基础。

1 仪器与材料

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪系统, 美国安捷伦公司; Precisa XB 220A 分析天平, 瑞士 Precisa 重量分析股份公司; 01A418 型超声细胞粉碎机、SCIENTZ-10N 冷冻干燥机、SCIENTZ SB-5200D 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; ZNCL-G 智能磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司。

CTD 对照品, 批号 110783-201105, 质量分数 98.6%, 中国食品药品检定研究院; CTD 原料药, 批号 TZ180408, 质量分数 99.4%, 西安通泽生物科技有限公司; 油酸, 国药集团化学试剂有限公司; 单硬脂酸甘油酯, 上海恒信化学试剂有限公司; 蛋黄卵磷脂 Lipoid E PC S, 德国 Lipoid 公司; 嵌段式聚醚 F-68 (Pluronic F-68)、大豆油, 上海源叶生物科技有限公司; D36 mm 透析袋 (截留相对分子质量 8 000~14 000), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 乙腈, 色谱纯, 霍尼韦尔贸易上海有限公司;

无水乙醇、甲醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 CTD-NLC 的制备

前期的预试验采用薄膜分散法与乳化超声分散法 2 种方法制备 CTD-NLC, 通过薄膜分散法制备的样品无法成型, 薄膜不能被乳化剂溶液洗脱, 而采用乳化超声分散法进行制备, 过程简单易行, 并能减少氯仿等有毒试剂的使用。故本实验采用乳化超声分散法制备 CTD-NLC, 具体步骤: 精密称取处方量的单硬脂酸甘油酯、油酸、大豆油、蛋黄卵磷脂和 CTD, 60 °C 水浴下溶于 5 mL 甲醇构成有机相, 取 2% Pluronic F-68 的水溶液 15 mL, 水浴加热至 60 °C 构成水相备用, 水相在磁力搅拌下 (1 000 r/min) 缓慢注入有机相中。60 °C 恒温搅拌 1 h 挥去甲醇, 趁热置于超声波细胞粉碎机, 探头超声 30 min (工作 2 s、停 2 s), 常温下冷却固化, 定容至 20 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜即得 CTD-NLC。同样方法制备空白 NLC 样品。

2.2 CTD-NLC 中 CTD 的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo ODS 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 233 nm; 流动相为乙腈-水 (40:60); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.2.2 CTD 对照品、CTD-NLC 供试品及阴性溶液的制备 精密称取 CTD 对照品 12.2 mg, 甲醇定容至 100 mL, 即得 120 μg/mL 的 CTD 对照品溶液; 精密移取 CTD-NLC 供试品 1.0 mL, 加入适量甲醇与乙腈 (1:1) 的混合溶剂破乳, 超声 1 h, 静置过夜, 混合溶剂定容至 10 mL, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 备用。同样方法处理空白 NLC 样品作为阴性溶液。

2.2.3 专属性考察 按照“2.2.1”项色谱条件分别进样 CTD 对照品溶液、CTD-NLC 供试品溶液、阴性溶液, 色谱图见图 1。可知, 供试品在对照品相同位置出峰, 而在阴性溶液中溶剂和辅料对 CTD 的测定未见干扰。

2.2.4 线性关系考察 精密移取 CTD 对照品溶液各 0.4、1.6、3.2、4.8、6.4、8.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 乙腈定容, 得到系列质量浓度为 4.8、19.2、38.4、57.6、76.8、96.0 μg/mL 的对照品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 进样, 记录各 CTD 质量浓度下对应的峰面积, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 质量浓度 (C)

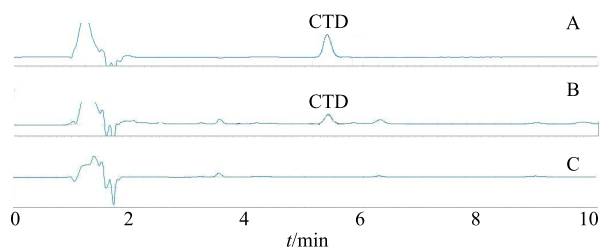


图 1 CTD 对照品 (A)、CTD-NLC (B) 与空白 NLC (C) 的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of CTD reference (A), CTD-NLC (B), and blank NLC (C)

为横坐标, 绘制标准曲线, 得到其回归方程为 $A = 0.4193C - 0.2484$, $r^2 = 0.9994$ 。结果表明, CTD 在 $4.8 \sim 96.0 \mu\text{g/mL}$ 与峰面积具有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取“2.2.4”项下低、中、高 3 个质量浓度 (分别为 19.2 、 57.6 、 $96.0 \mu\text{g/mL}$) CTD 对照品溶液, 同 1 d 内各质量浓度分别进样 6 次, 计算日内精密度; 各质量浓度连续进样 3 d, 计算日间精密度。日内与日间精密度 RSD 均小于 2.0% , 表明仪器的精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密移取 CTD-NLC 供试品溶液 1 mL , 按照“2.2.2”项供试品溶液处理方法, 于室温下放置 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 12 、 24 h , 进样, 测得峰面积的 RSD 值为 1.91% , 表明 CTD-NLC 破乳后的供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 重复制备 6 份 CTD-NLC 样品, 分别精密吸取上述样品各 1 mL , 按照“2.2.2”项供试品溶液处理方法, 进样测定, 结果 CTD-NLC 样品中 CTD 的平均质量浓度为 $91.16 \mu\text{g/mL}$, 其 RSD 值为 1.52% , 表明测定方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 按“2.2.7”项下方法制备 9 份样品, 分为 3 组, 每组平行 3 份, 分别在每组样品中外加相当于样品 CTD 质量浓度 50% 、 100% 、 150% 的 CTD 对照品作为高、中、低质量浓度加样回收率样品, 进样, 计算低、中、高质量浓度下的加样回收率, 低、中、高质量浓度下的加样回收率均在 $98\% \sim 102\%$, 且 RSD 值均小于 0.5% , 表明检测结果准确可靠。

2.3 CTD-NLC 包封率和载药量的测定

2.3.1 包封率的测定 经过文献研究和摸索实验发现, 透析法在测定 CTD-NLC 包封率时具有简单快捷、准确性高等优势, 具体步骤: 精密移取 5% 甲醇 50 mL 作为透析介质, 吸取 CTD-NLC 5 mL 放入

透析袋中, 在 25°C 、磁力搅拌 (300 r/min) 下透析, 分别于透析 15 、 30 、 45 、 60 、 90 、 105 、 120 、 210 min 时取透析介质 20 mL 浓缩至 2 mL , 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜进样测定。由图 2 可知, 随着透析时间延长, 透析介质中游离 CTD 的峰面积一直增加, 从 $45 \sim 60 \text{ min}$, 透析出的 CTD 呈现平衡趋势, 而后透析介质中游离 CTD 骤然增多, 说明外部的透析介质对透析袋内部纳米粒的形态开始破坏, 从而使得 NLC 封装好的 CTD 透析出来; 透析袋内样品 CTD 含量在 $45 \sim 60 \text{ min}$ 内亦呈现出稍平衡的趋势, 说明此段时间 CTD-NLC 破坏较轻, 因此最终确定透析时间为 60 min 。计算包封率。

$$\text{包封率} = (\text{总药量} - \text{游离药量}) / \text{总药量}$$

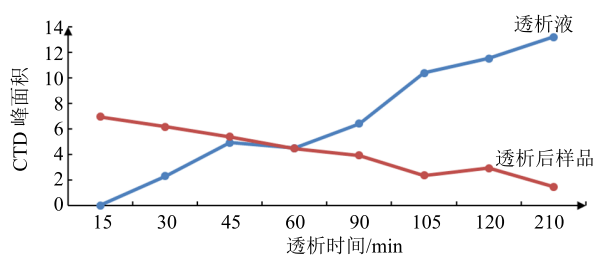


图 2 透析平衡图

Fig. 2 Diagram of dialysis balance

2.3.2 载药量的测定 精密移取 2 mL CTD-NLC 置于已干燥至恒定质量的称量瓶中, 不加入任何冻干保护剂, 冷冻干燥 48 h , 得冻干粉, 称质量, 计算供试品冻干粉净质量, 将冻干粉按照“2.2.2”项下供试品溶液处理方法处理后进样, 测定冻干粉中的总药量, 计算载药量。

$$\text{载药量} = \text{总药量} / \text{冻干粉净质量}$$

2.4 CTD-NLC 处方及制备工艺的单因素考察

按“2.3”项方法对 CTD-NLC 的包封率与载药量进行测定, 另取 CTD-NLC 供试品适量, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 水系微孔滤膜, 放入样品池中, 用 Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪测定 CTD-NLC 的平均粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位, 平行 3 次。以平均粒径、PDI、Zeta 电位、包封率和载药量为评价指标进行单因素考察。

2.4.1 脂质种类的确定 NLC 在传统 SLN 的基础上加入了液体脂质的成分, 以期能获得较后者更高的载药量, 故首先需对脂质种类进行确定。基于前期预试验, 固体脂质确定为单硬脂酸甘油酯, 液体脂质选择油酸、大豆油和 2 者的混合脂质, 固定其

他因素不变,考察不同脂质种类对各项评价指标的影响。结果表明,单独加入大豆油时,粒度分布更集中,载药量增加,但包封率降低;单独加入油酸时,粒径明显减小,但纳米粒分布较宽,同时载药量稍稍降低;当大豆油与油酸(1:1)同时加入,粒径减小,分布较为集中,包封率与载药量都较单纯的 SLN 增高,故确定脂质种类的组合为单硬脂酸甘油酯、大豆油与油酸(1:1),结果见表 1。

2.4.2 脂质总量的考察 固定固体脂质与液体脂质的比例为 1:2,设置总脂质质量为 300、375、450、525、600 mg。结果表明,随着脂质总量的增加,粒径总体呈现增加的趋势,PDI 先降低后升高,Zeta 电位先升高后降低,包封率与载药量呈现增大的趋势,故选取脂质总量 300~600 mg 进一步进行优化,结果见表 2。

2.4.3 固体脂质与液体脂质比例(固液比)的考察 暂定脂质总量为 450 mg,其他因素保持不变,改变

固液比,设置 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3 进行考察。结果表明,随着固体脂质的比例降低,液体脂质的比例升高,粒径先减小后增大,粒度分布也越来越集中,包封率先升高后降低,载药量先降低后升高,故固液比应进一步优化,结果见表 3。

2.4.4 总稳定剂质量浓度的考察 经过文献调研与预试验研究,确定 Pluronic F68 与 Lipoid E PC S(注射级蛋黄卵磷脂)联合应用可使制剂成型,且 2 者均能满足后期注射剂安全性评价的要求。固定 Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 比例为 6:1,设置总稳定剂质量浓度分别为 7.5、12.5、17.5、22.5、27.5 mg/mL 进行考察,结果表明,随着总稳定剂质量浓度的升高,粒径先增加后降低,PDI 值先降低后升高,包封率无明显变化,但载药量逐步降低,结果见表 4。因此,总稳定剂质量浓度是影响制剂成型的重要因素,在后续的处方优化中需进一步考察。

表 1 脂质种类单因素考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of lipid species ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质种类	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
单硬脂酸甘油酯	104.73±0.64	0.408±0.012	-7.93±1.60	91.56±3.14	0.47±0.03
单硬脂酸甘油酯+大豆油	102.73±1.03	0.352±0.055	-9.03±1.06	95.59±2.34	0.51±0.01
单硬脂酸甘油酯+油酸	84.94±1.97	0.465±0.022	-9.59±0.20	95.22±3.25	0.50±0.02
单硬脂酸甘油酯+大豆油+油酸	85.79±1.83	0.380±0.060	-10.84±1.45	97.98±2.45	0.52±0.02

表 2 脂质总量单因素考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Results of total lipids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质总量/mg	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
300	70.63±1.46	0.391±0.008	-7.58±1.10	90.50±3.44	0.45±0.03
375	67.43±1.71	0.298±0.033	-9.83±1.23	94.02±4.32	0.49±0.02
450	78.58±1.37	0.285±0.006	-10.59±1.05	96.46±3.42	0.50±0.03
525	91.82±1.28	0.297±0.006	-7.44±1.43	97.35±3.24	0.55±0.02
600	101.79±2.23	0.334±0.029	-7.42±0.39	98.00±4.34	0.68±0.04

表 3 固体脂质与液体脂质比例单因素考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Results of ratio of solid lipid to liquid lipid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

固液比	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
3:1	99.08±2.56	0.419±0.007	-10.08±1.49	96.37±0.46	0.56±0.01
2:1	81.98±2.42	0.393±0.003	-10.25±1.08	97.05±0.58	0.46±0.02
1:1	72.54±1.96	0.356±0.003	-7.32±0.31	96.87±0.74	0.49±0.03
1:2	73.36±1.25	0.289±0.005	-9.70±1.04	100.00±0.37	0.54±0.02
1:3	97.98±2.65	0.295±0.006	-6.93±0.48	97.53±0.56	0.55±0.01

表 4 总稳定剂质量浓度单因素考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Results of total stabilizer concentration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

总稳定剂质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
7.5	80.44±0.78	0.511±0.004	-9.53±0.38	96.84±1.44	0.57±0.02
12.5	94.65±1.77	0.268±0.009	-8.63±0.44	98.25±2.34	0.55±0.05
17.5	75.33±0.62	0.299±0.030	-9.08±0.53	99.19±3.24	0.52±0.02
22.5	76.54±2.44	0.330±0.038	-8.17±1.22	96.00±1.28	0.47±0.03
27.5	72.21±1.70	0.367±0.012	-8.67±0.71	98.24±2.92	0.44±0.01

2.4.5 Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 比例的考察 暂定总稳定剂的质量浓度为 17.5 mg/mL, 固定其他因素条件, 改变 Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 的比例, 设置 6:1、4:1、2:1、1:1、1:2 进行考察。结果表明, 随着蛋黄卵磷脂的比例增加, 粒径先缓慢增大而后骤减, PDI 值大致呈现先增加后减小的趋势, 包封率未出现显著性差异, 载药量逐步降低, 但 Zeta 电位绝对值在两者比例为 1:2 时出现极低值, 意味着蛋黄卵磷脂的比例不宜过大, 否则会影响制剂的稳

定性, 故在后续处方工艺的优化中需将 Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 的比例纳入考察因素, 结果见表 5。

2.4.6 投药量的考察 固定其他因素不变, 设计 CTD 投入量分别为 2、4、6、8 mg 进行考察。结果表明, 随着投药量加大, 各项指标均无明显改变, 但在实验过程中发现, 投药量越大会使制剂稳定性越来越低, 出现药物渗漏的现象也越来越明显, 当投药量为 2 mg 时, 制剂的稳定性最高, 故选取最终的投药量为 2 mg, 结果见表 6。

表 5 Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 比例单因素考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Results of ratio of Pluronic F68 and Lipoid E PC S ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 比例	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
6:1	78.47±1.97	0.280±0.018	-7.25±0.42	97.83±1.45	0.52±0.03
4:1	81.77±0.37	0.272±0.004	-7.59±0.22	100.00±2.75	0.51±0.03
2:1	93.69±1.88	0.279±0.008	-7.16±0.55	96.21±2.36	0.48±0.01
1:1	96.88±2.60	0.557±0.010	-7.96±0.11	96.77±2.35	0.46±0.02
1:2	9.71±0.61	0.244±0.003	-2.19±0.55	97.94±1.74	0.42±0.03

表 6 投药量单因素考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Results of drug addition ($\bar{x} \pm s, n=3$)

投药量/mg	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
2	80.59±1.41	0.275±0.004	-8.55±0.57	98.69±1.47	0.53±0.02
4	80.49±1.04	0.282±0.012	-7.07±0.24	95.28±2.34	0.52±0.01
6	76.38±1.12	0.262±0.016	-7.37±0.80	97.72±1.78	0.52±0.02
8	81.11±1.68	0.269±0.015	-7.73±1.08	95.08±1.42	0.51±0.02

2.4.7 超声时间的考察 固定超声频率为工作 2 s、停 2 s, 设置超声时间分别为 10、20、30、40、50 min 进行考察。结果表明, 随着超声时间的增加, 粒径呈现降低的趋势, 粒度分布也越来越集中, 对包封率无明显影响, 但载药量表现出降低趋势, 因为超声时间一旦延长, 不仅会加重药物渗漏, 还会使蛋黄卵磷脂的氧化程度加重, 故超声时间应适当, 结果见表 7。

2.5 CCD-RSM 优化 CTD-NLC 处方

2.5.1 试验设计 结合上述单因素考察实验结果, 发现脂质总量 (A)、固液比 (B)、总稳定剂质量浓

度 (C) 以及 Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 比例 (D) 对方剂成型的影响较大, 故选择其作为考察因素进一步进行处方优化。设计 5 水平 (-2、-1、0、+1、+2), 以 PDI、Zeta 电位、包封率和载药量 4 个分指标的综合评分 (Y) 为总评价指标。通过 MetaDecision EvaGear 软件采用熵权法对 4 个分指标进行赋权, 得到 PDI、Zeta 电位、包封率和载药量的权重系数分别为 0.32、0.15、0.44 和 0.09。具体因素水平及试验结果见表 8。

2.5.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert V8.0.6 软件, 以 Y 对 A、B、C、D 进行二次多项式回

表 7 超声时间单因素考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Results of ultrasound time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
10	132.87±1.94	0.423±0.030	-9.28±0.22	94.46±1.42	0.55±0.02
20	90.84±1.11	0.277±0.012	-6.12±0.45	96.46±2.31	0.53±0.01
30	78.25±1.14	0.271±0.003	-6.92±1.46	95.06±1.87	0.50±0.01
40	79.58±1.12	0.284±0.013	-7.01±0.21	94.87±3.21	0.44±0.01
50	77.92±1.82	0.273±0.011	-6.44±0.06	95.61±2.34	0.40±0.02

表 8 CCD-RSM 试验设计方案及响应值

Table 8 Design and response values of CCD-RSM test

试验号	A/mg	B	C/(mg·mL ⁻¹)	D	PDI	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%	Y
1	525 (+1)	0.38 (-1)	12.5 (-1)	5 (+1)	0.299	-7.52	0.37	96.51	47.69
2	450 (0)	0.50 (0)	17.5 (0)	2 (-2)	0.390	-8.39	0.56	100.00	60.22
3	525	0.63 (+1)	12.5	5	0.285	-7.05	0.43	100.00	61.26
4	600 (+2)	0.50	17.5	4 (0)	0.283	-6.44	0.46	99.28	62.25
5	375 (-1)	0.63	22.5 (+1)	5	0.380	-9.13	0.44	100.00	50.75
6	375	0.63	22.5	3 (-1)	0.418	-8.16	0.42	98.94	38.17
7	525	0.63	22.5	3	0.293	-6.47	0.27	99.12	40.01
8	450	0.50	17.5	4	0.284	-7.30	0.64	98.53	82.01
9	450	0.50	17.5	4	0.285	-7.55	0.66	100.00	86.99
10	450	0.50	17.5	4	0.286	-8.59	0.65	99.05	86.49
11	375	0.38	22.5	5	0.454	-8.90	0.45	100.00	38.65
12	450	0.25 (-2)	17.5	4	0.289	-4.36	0.29	100.00	39.57
13	450	0.50	27.5 (+2)	4	0.449	-8.05	0.38	100.00	30.12
14	450	0.50	17.5	4	0.280	-8.83	0.68	99.57	92.13
15	525	0.63	22.5	5	0.290	-5.92	0.35	100.00	49.32
16	450	0.50	17.5	6 (+2)	0.282	-6.01	0.38	100.00	54.10
17	450	0.50	17.5	4	0.278	-6.47	0.68	98.14	84.80
18	450	0.50	7.5 (-2)	4	0.440	-10.21	0.42	100.00	40.77
19	525	0.38	12.5	3	0.282	-7.64	0.37	100.00	56.68
20	525	0.38	22.5	5	0.438	-7.46	0.58	100.00	52.07
21	450	0.75 (+2)	17.5	4	0.296	-6.89	0.39	100.00	54.74
22	375	0.63	12.5	5	0.267	-8.06	0.33	100.00	55.90
23	375	0.38	12.5	3	0.276	-9.45	0.27	97.52	46.93
24	375	0.38	12.5	5	0.269	-7.43	0.33	98.48	51.62
25	300 (-2)	0.50	17.5	4	0.440	-11.03	0.48	100.00	49.03
26	450	0.50	17.5	4	0.282	-6.35	0.67	98.93	84.10
27	525	0.38	22.5	3	0.288	-7.09	0.32	98.59	46.72
28	375	0.38	22.5	3	0.457	-7.97	0.45	94.77	27.34
29	375	0.63	12.5	3	0.281	-8.88	0.35	99.03	55.87
30	525	0.63	12.5	3	0.286	-7.43	0.37	100.00	55.52

归方程拟合。二次多项式回归方程为 $Y=86.09+2.94A+2.89B-4.57C+1.16D-2.07AB+1.40AC-1.08AD-0.76BC+0.96BD+2.32CD-7.69A^2-9.81B^2-12.73C^2-7.31D^2$ 。方差分析结果表明, 回归模型 $P<0.0001$, 失拟项水平不显著 ($P>0.05$), 说明模型拟合良好; 回归方程拟合决定系数 (r^2) 为 0.964 5, 预测决定系数 (R^2_{pred}) 为 0.824 5, 校正决定系数 (R^2_{adj}) 为 0.931 3, 说明该模型可以解释

93.13%的响应值的变异, 且方程拟合程度较好; 模型变异系数为 $8.16\%<10\%$, 表明模型准确度高, 精密度值是有效信号与噪音的比值, 为 $18.564>4$, 说明模型合理, 表明该模型可用于设计分析^[17]。另外, 脂质总量、固液比与总稳定剂质量浓度对 Y 均具有极显著影响 ($P<0.01$), 各因素之间不存在交互作用, 且各因素均不是单纯的一次关系, 而是二次关系 (表 9)。以 Y 为评价指标对交互因素的响应面 3D 效果图见图 3。

表 9 以 Y 为响应值的方差分析结果Table 9 Variance analysis with comprehensive score Y as response value

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	8 527.04	14	609.07	29.07	<0.000 1	极显著
A	206.87	1	206.87	9.87	0.006 7	极显著
B	200.97	1	200.97	9.59	0.007 4	极显著
C	501.88	1	501.88	23.95	0.000 2	极显著
D	32.10	1	32.10	1.53	0.234 8	
A^2	1 620.31	1	1 620.31	77.34	<0.000 1	极显著
B^2	2 637.25	1	2 637.25	125.88	<0.000 1	极显著
C^2	4 447.90	1	4 447.90	212.30	<0.000 1	极显著
D^2	1 464.05	1	1 464.05	69.88	<0.000 1	极显著
残差	314.27	15	20.95			
失拟项	254.52	10	25.45	2.13	0.209 1	不显著
净误差	59.75	5	11.95			
总离差	8 841.31	29				

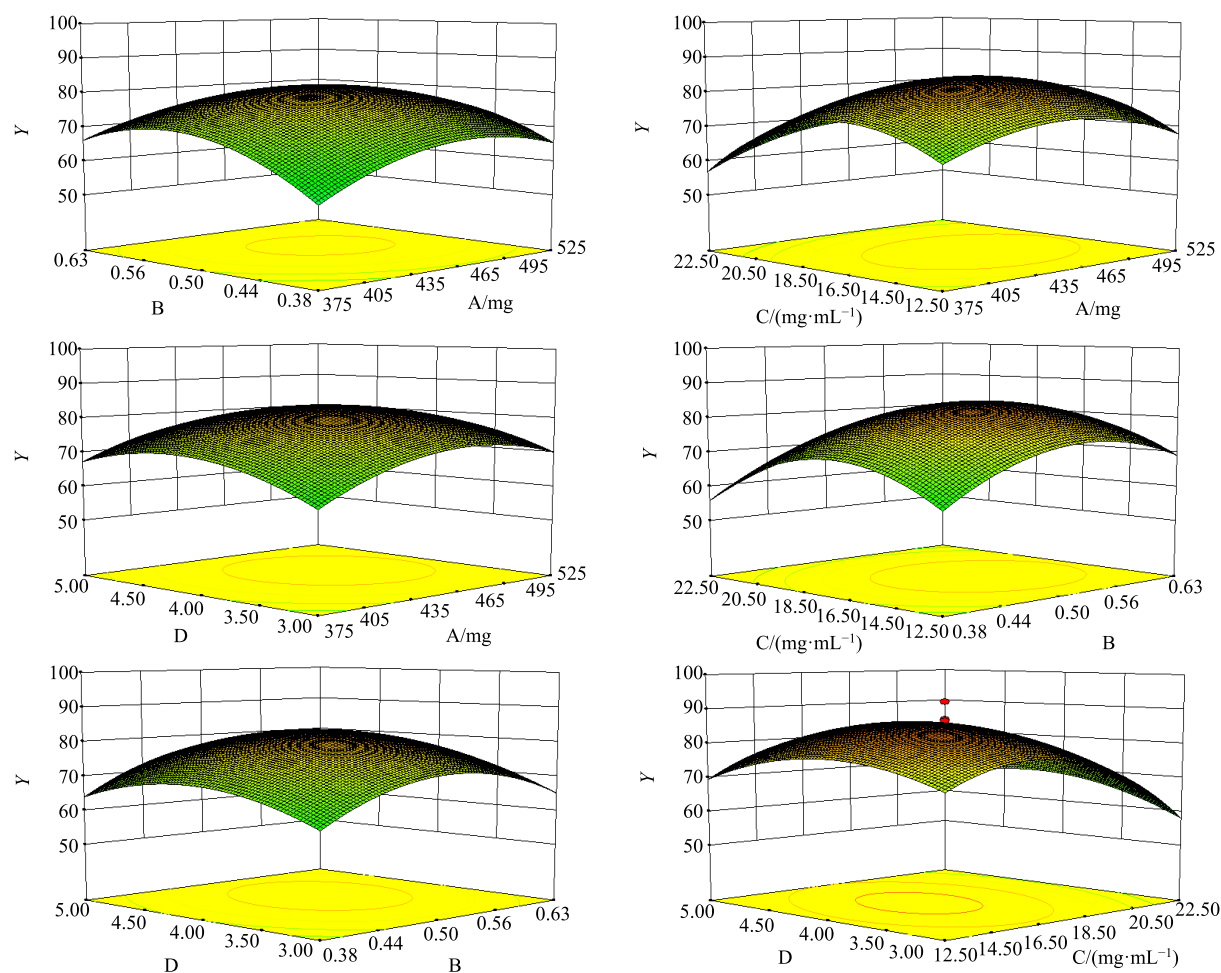


图 3 各因素间交互作用的响应面图

Fig. 3 Response surface diagram of interaction between various factors

2.5.3 响应面优化 利用 Design-Expert V8.0.6 软件对上述所建立的数学模型进行综合分析, 保证 Y 与拟合度均最高的前提下, 最终确定了各因素的最佳取值: 脂质总量为 453.66 mg、固液比为 1:2、总稳定剂质量浓度为 16.9 mg/mL、Pluronic F68 与

Lipoid E PC S 的比例为 3.88:1。对优化后的制剂处方进行验证试验, 实测值和预测值较为吻合, 相对偏差低于 3.0%, 说明 CCD-RSM 法的预测结果准确可靠 (表 10)。CTD-NLC 的外观、粒径分布与 Zeta 电位图见图 4。

表 10 验证结果 ($n=3$)
Table 10 Verification results ($n=3$)

批次	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%	Y		相对偏差/%
						实际值	预测值	
1	86.49	0.282	-8.51	98.5	0.63	86.72	84	2.81
2	85.33	0.277	-7.93	98.6	0.66	87.01		
3	86.15	0.281	-8.20	98.6	0.65	85.34		

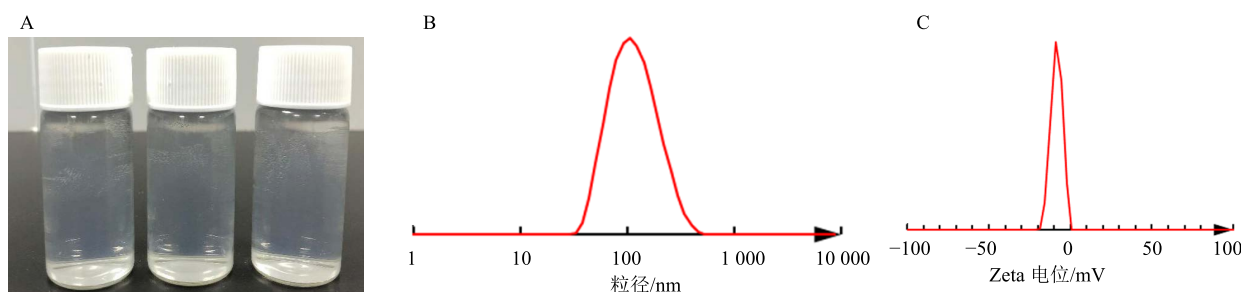


图 4 CTD-NLC 外观 (A)、粒径分布 (B) 及 Zeta 电位分布 (C) 图

Fig. 4 Appearance (A), particle size distribution (B), and Zeta potential distribution (C) of CTD-NLC

3 讨论

在前期开展的预试验中, 尝试采用经典的葡聚糖凝胶柱对含药纳米粒与游离 CTD 进行分离, 虽建立的洗脱曲线能实现 2 者的成功分离, 但发现葡聚糖凝胶对纳米粒的吸附极其严重, 致使 HPLC 检测不到破乳后纳米粒中的药物。故采用透析法测定 CTD-NLC 的包封率, 方法简便, 结果可靠。

本实验通过单因素考察结合 CCD-RSM 法对 CTD-NLC 的处方工艺进行了优选, 确定最优处方工艺条件: 脂质总量为 453.66 mg、固液比为 1:2、总稳定剂质量浓度为 16.9 mg/mL、Pluronic F68 与 Lipoid E PC S 的比例为 3.88:1、超声 30 min (工作 2 s、停 2 s)。

CTD 的水溶性与脂溶性均不佳, 与固体脂质等高脂溶性辅料的相容性较差, 实验中制备 CTD-NLC 时发现投药量不宜超过 4 mg, 否则其药物渗漏极其明显。考虑 CTD 本身的高毒性 [其小鼠 ip 的半数致死量 (LD_{50}) 为 1.71 mg/kg^[6]] 及溶解性, 适当减少 CTD 在 NLC 中的载药量既有助于降低其毒副作用又有利于 CTD-NLC 的制备, 故在 CTD-NLC

的制备中将 CTD 的投药量设定在 2 mg。在后续 CTD-NLC 的体内外抗肝肿瘤及靶向评价研究中, NLC 的引入能否降低 CTD 的毒性并靶向肝肿瘤将得到进一步的证实。

参考文献

- [1] 虞如芬, 蔡丽梅, 吴雪清. 斑蝥素通过抑制 MAPK 信号通路调控宫颈癌细胞凋亡、迁移及侵袭行为的机制 [J]. 中华全科医学, 2019, 17(5): 768-772.
- [2] 张鑫, 赵慧, 魏洁, 等. 斑蝥素诱导 HCT116 细胞形态改变及脱黏附机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 20-25.
- [3] 黄渝茜, 晏旭航, 晏容, 等. 斑蝥素酸镁诱导 BEL-7402 人肝癌细胞凋亡的机制 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1419-1423.
- [4] 万玉莹, 王艳丽. 斑蝥素对卵巢癌细胞中 Smad3、TGF- β 1、c-JUN 表达的影响 [J]. 中医学报, 2018, 33(7): 1149-1154.
- [5] Li H C, Xia Z H, Chen Y F, et al. Cantharidin inhibits the growth of triple-negative breast cancer cells by suppressing autophagy and inducing apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(5): 1149-1154.

- 1829-1840.
- [6] 方莲花, 杜冠华. 中药斑蝥毒的历史认识与评价 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5): 150-152.
- [7] 邵好珍, 马齐襄, 胡晓炜, 等. 斑蝥素引起小鼠急性中毒的器官损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 55-60.
- [8] Belouqui A, Solinís M Á, Rodríguez-Gascón A, *et al.* Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics [J]. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2016, 12(1): 143-161.
- [9] 侯文书, 张丹参, 张 力, 等. PEG 修饰姜黄素固体脂质纳米粒的制备、表征及溶出特征 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1927-1934.
- [10] Pandya N T, Jani P, Vanza J, *et al.* Solid lipid nanoparticles as an efficient drug delivery system of olmesartan medoxomil for the treatment of hypertension [J]. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.02.011.
- [11] Zewail M, Nafee N, Helmy M W, *et al.* Coated nanostructured lipid carriers targeting the joints-An effective and safe approach for the oral management of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Pharm*, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118447.
- [12] 杨宁辉, 曹伶俐, 付国辉, 等. 蛇床子素纳米结构脂质载体的制备及其体内药动学行为 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1205-1209.
- [13] Neelam P, Jasjeet K N, Viney L, *et al.* Resveratrol loaded functionalized nanostructured lipid carriers for breast cancer targeting: Systematic development, characterization and pharmacokinetic evaluation [J]. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.004.
- [14] 冯松浩, 金云隆, 白明学, 等. 基于星点设计-效应面法优化元胡止痛口腔崩解片处方的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5568-5572.
- [15] 陈静怡, 郭贤源, 任 翔, 等. 星点设计-效应面法优化积雪草苷脂质体囊的制备工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 569-574.
- [16] 杨红艳, 许建丽. 星点设计-效应面法优化酶法提取黄连中盐酸小檗碱工艺 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(7): 89-93.
- [17] 钱俊青, 麦 波. 鸦胆子油的两相体系酶解工艺的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(S1): 170-173.