

Box-Behnken 效应面法优化穿心莲内酯-PLGA 微球处方研究

王芳, 翟文婷, 李艳丽, 许卉*

烟台大学药学院, 山东 烟台 264005

摘要:目的 采用 Box-Behnken 实验设计方法, 对穿心莲内酯微球处方进行优化。方法 以聚乳酸羟基乙酸 (PLGA) 为药物载体, 采用溶剂挥发法制备穿心莲内酯微球。分别以 PLGA 质量浓度、聚乙烯醇 (PVA) 质量浓度、油水相体积比为考察对象, 以载药量和包封率为评价指标, 采用 Box-Behnken 效应曲面法筛选穿心莲内酯微球的最佳处方。结果 穿心莲内酯微球的最优处方为 PLGA 为 0.20 g/mL, PVA 为 18 mg/mL, 油水相体积比为 1:90 (0.011), 所得微球的载药量为 $(47.21 \pm 2.36)\%$, 包封率为 $(90.15 \pm 3.48)\%$, 与模型预测值接近。结论 Box-Behnken 实验设计可用于穿心莲内酯微球的处方优化筛选。

关键词: 穿心莲内酯; 微球; 处方优化; Box-Behnken 实验设计; 效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1743-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.009

Formula optimization of andrographolide-loaded PLGA microsphere by Box-Behnken design and response surface method

WANG Fang, ZHAI Wen-ting, LI Yan-li, XU Hui

School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: **Objective** To optimize the formula of andrographolide-loaded PLGA microsphere. **Methods** The microspheres were prepared by the solvent evaporation method using PLGA as drug carriers. The effects of the concentration of PLGA and PVA, and the oil-water phase ratio were investigated. According to the drug loading amount and encapsulation efficiency, the formula was optimized by Box-Behnken design and response surface method. **Results** The optimal formula was as follows: PLGA concentration of 0.20 g/mL, PVA concentration of 18 mg/mL, and oil-water phase ratio of 1:90, respectively. The drug loading amount of the microsphere was $(47.21 \pm 2.36)\%$ and the encapsulation efficiency was $(90.15 \pm 3.48)\%$, which were very close to the predicted values. **Conclusion** It is effective and feasible to apply Box-Behnken design and response surface method for the formula optimization of the andrographolide-loaded PLGA microsphere.

Key words: andrographolide; microsphere; formula optimization; Box-Behnken design; response surface method

穿心莲内酯 (andrographolide) 为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 中提取得到的半日花烷型二萜内酯类化合物, 是中药穿心莲的主要有效成分之一^[1]。已有研究表明, 穿心莲内酯在抗炎、抗肿瘤、抗心血管疾病、免疫调节等方面有很好的药理活性, 尤其是广谱的抗癌活性, 可以抑制不同肿瘤细胞 (如乳腺癌、结肠癌、肝癌、子宫颈癌等) 的增殖^[2-3]。同时还具有毒性低、副作用小、药源广泛、价格低廉等特点, 有着广阔的临

床应用价值和发展前景^[4]。但由于穿心莲内酯的溶解性差, 口服生物利用度低, 且口感极苦, 口服时易致呕吐, 患者依从性差, 使其临床应用受到极大限制^[5-6]。

微球相比传统的常规剂型, 可以延长药物作用时间, 降低给药频率, 提高病人的顺应性, 应用于肿瘤治疗具有十分重要的临床意义^[7]。聚乳酸羟基乙酸 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 是一类重要的可生物降解的高分子材料, 由于其具有无毒安

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 烟台大学青年学术骨干培养项目资助 (2012)

作者简介: 王芳 (1987—), 女, 硕士, 研究方向为药物新剂型与药物代谢动力学。Tel: 13685351802 E-mail: wangfang732@163.com

*通信作者 许卉 Tel: (0535)6706030-8009 E-mail: ytu309a@163.com

网络出版时间: 2013-06-04 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130604.1802.003.html>

全、生物相容性好及降解性能可控等优点,是制备微球的理想材料,现已被美国FDA批准用作注射用微球的载体^[8]。

本研究首次以PLGA为载体材料,采用溶剂挥发法制备穿心莲内酯载药微球,以Box-Behnken效应面法优化处方,并进行验证。

1 仪器与材料

TFZRJ—30 真空乳化搅拌机(温州天富机械有限公司),JY92—II 探头超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),FD—10 冷冻干燥机(北京惠城佳仪科技有限公司),Agilent 1100 型高效液相色谱仪(Agilent 公司),0.45 μm 微孔滤膜(上海安普科学仪器有限公司),S—4800 扫描电镜(日立高新技术公司)。穿心莲内酯(四川什邡华康药物原料厂,批号20111108-A,HPLC测定质量分数>98.0%),PLGA[50:50,2A(代表黏度范围为0.15~0.25,封端为羧基),英国Lakeshore Biomaterials公司],聚乙烯醇(PVA, M_w 13 000~23 000, Sigma-Aldrich 公司),甲醇(色谱纯,SK Chemical 公司),其余试剂均为市售分析纯,实验用水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 穿心莲内酯微球的制备

采用水包油包固(S/O/W)乳化溶剂挥发法^[9]制备载药微球。取PLGA 500 mg溶解于2.5 mL二氯甲烷中,加入穿心莲内酯微粉500 mg,冰浴条件下超声乳化30 s配制成有机相。将有机相逐滴加入水相(1% PVA水溶液)中,1 000 r/min搅拌3 min,100 r/min继续搅拌4 h,使二氯甲烷挥发完全,过筛,收集100~1 000目的筛间物质,蒸馏水洗涤,收集微球,冷冻干燥,得载药微球。同法制得空白微球(有机相中不加穿心莲内酯)。

2.2 穿心莲内酯的HPLC测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Diamonsil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(60:40),检测波长225 nm,体积流量1 mL/min,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,进样量20 μL 。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取穿心莲内酯对照品10 mg置10 mL量瓶中,甲醇溶解,定容至10 mL,即得1 mg/mL穿心莲内酯对照品溶液。

2.2.3 样品处理 精密称取穿心莲内酯微球10 mg,置10 mL量瓶中,加二氯甲烷超声(600 W, 25 kHz, 20 min)溶解并定容。进一步移取上述溶液1 mL置10 mL量瓶中,以流动相稀释定容,过0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得供测溶液,照“2.2.1”项下色谱条件进行HPLC测定。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取对照品溶液0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mL置10 mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,得系列对照品溶液。测定各溶液色谱峰面积(Y),并与其质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y=63.363 X-92.604$ ($r=0.999 5$),结果表明穿心莲内酯在1~100 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.5 专属性考察 取按“2.2.3”项下方法制备的穿心莲内酯微球溶液、空白微球溶液以及穿心莲内酯对照品溶液,分别照“2.2.1”项下色谱条件进行HPLC测定,所得色谱图见图1。结果表明,在实验选定的色谱条件下,空白辅料对穿心莲内酯测定无干扰。

2.2.6 精密度试验 取对照品溶液适量,分别用流动相稀释配制3个不同质量浓度(5.0、50.0、80.0 $\mu\text{g/mL}$)的质控样品,每个质量浓度样本平行5份,按“2.2.1”项下色谱条件分别在1 d内和连续5 d内进行平行测定。结果3个质量浓度样品的日内和

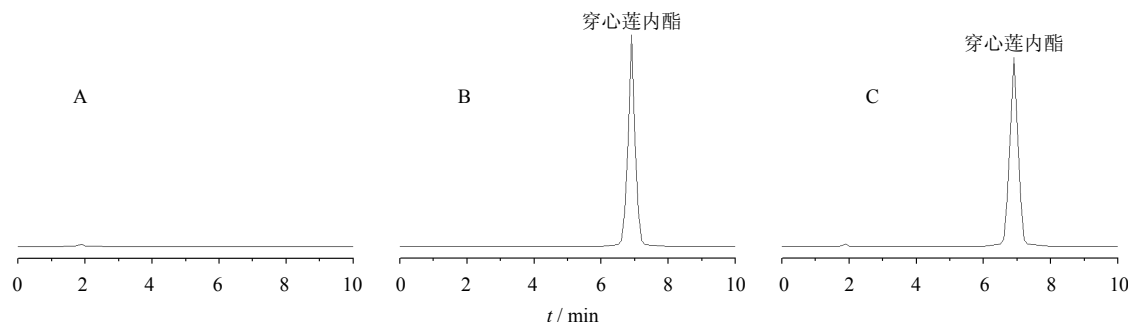


图1 空白微球(A)、穿心莲内酯对照品(B)、穿心莲内酯微球样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank microsphere (A), andrographolide reference substance (B), and andrographolide microsphere sample (C)

日间 RSD 分别为 0.56%、0.39%、0.67%和 1.21%、0.96%、1.12%，表明测定方法精密度高。

2.2.7 稳定性试验 取同一穿心莲内酯供试品溶液，分别于制备后 0、1、2、4、6、12、24 h 进样测定，记录峰面积。结果穿心莲内酯峰面积的 RSD 为 2.45%，表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一批次的穿心莲内酯-PLGA 微球 6 份，按“2.2.3”项下配制供试品溶液，以“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果 6 批穿心莲内酯-PLGA 微球中质量分数 RSD 为 1.57%。

2.2.9 加样回收率试验 精密吸取对照品储备液适量至 10 mL 量瓶中，分别加入 10 mg 空白微球，二氯甲烷溶解后流动相定容制得低、中、高 3 个质量浓度供试品溶液（5.0、50.0、80.0 μg/mL）各 3 份，以“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算回收率。结果 3 种质量浓度供试品溶液的平均回收率分别为 99.36%、98.92%、99.73%，RSD 分别为 0.86%、0.97%、1.02%。

2.3 载药量及包封率的测定

按照“2.2.3”项下方法处理样品，经 HPLC 法测定得微球内穿心莲内酯质量，分别计算包封率及载药量。

载药量=微球内穿心莲内酯质量 / 微球质量

包封率=微球内穿心莲内酯质量 / 穿心莲内酯投料量

2.4 处方优化实验

2.4.1 试验设计 采用 Box-Behnken 效应面法优化处方。综合相关文献报道以及前期预试结果，选取对穿心莲内酯微球载药量和包封率影响较为显著的 3 个因素，即有机相中 PLGA 的质量浓度（ X_1 ）、水中相 PVA 的质量浓度（ X_2 ）和油水相比比例（ X_3 ），在 3 个水平上进行了优化研究，以穿心莲内酯微球的载药量（ Y_1 ）和包封率（ Y_2 ）为响应值，建立数学模型优化处方。因素水平见表 1。

2.4.2 数据处理 针对设计的 17 个处方分别测定 Y_1 和 Y_2 2 个指标，结果见表 1。进一步利用 Design Expert 8.0 实验设计软件分别对指标 Y_1 和 Y_2 与影响因素间的关系进行多元回归分析，综合考虑模型的检验结果、拟合优度以及模型的简洁性，选择采用二次多项式进行拟合，得到拟合方程： $Y_1=42.41+5.07 X_1+1.32 X_2+0.60 X_3-0.19 X_1 X_2-0.21 X_1 X_3+0.10 X_2 X_3+0.39 X_1^2-0.62 X_2^2+0.01 X_3^2$ （ $r=0.992 2$ ， $P<0.01$ ；失拟度 $F=0.247 1>0.05$ ）； $Y_2=73.61+15.40 X_1+3.88 X_2+1.78 X_3-0.15 X_1 X_2-0.26 X_1 X_3+$

表 1 Box-Behnken 实验设计及响应值
Table 1 Box-Behnken experimental design and response values

试验号	$X_1 /$ (g·mL ⁻¹)	$X_2 /$ (mg·mL ⁻¹)	X_3	$Y_1 /$ %	$Y_2 /$ %
1	0.15	10	0.013	35.35	54.69
2	0.20	10	0.020	46.72	87.68
3	0.15	5	0.010	37.58	60.20
4	0.20	5	0.013	47.85	91.77
5	0.20	10	0.010	36.63	57.80
6	0.15	20	0.020	46.63	87.38
7	0.15	10	0.013	38.14	61.65
8	0.15	10	0.013	47.76	91.43
9	0.15	10	0.013	39.45	65.16
10	0.20	20	0.013	43.13	75.83
11	0.10	5	0.013	40.62	68.41
12	0.15	20	0.010	43.96	78.43
13	0.15	5	0.020	40.93	69.28
14	0.10	10	0.020	41.51	70.98
15	0.10	10	0.010	42.41	73.65
16	0.10	20	0.013	41.23	70.16
17	0.15	10	0.013	42.01	72.43

$0.38 X_2 X_3+2.48 X_1^2-1.60 X_2^2-0.05 X_3^2$ （ $r=0.992 6$ ， $P<0.01$ ；失拟度 $F=0.249 9>0.05$ ）。

结果表明，对于 Y_1 和 Y_2 这 2 个指标，模型预测值与实测值间均呈高度相关，且所拟合的模型方程具有显著的统计学意义（ $P<0.01$ ），拟合优度良好，可充分反映实际情况^[10]。针对上述方程各项系数的显著性进一步进行了统计检验（表 2），结果在 Y_1 模型方程中仅 X_1 、 X_2 的系数项显著（ $P<0.01$ ）， Y_2 模型方程中仅 X_1 、 X_2 和 X_1^2 的系数项显著（ $P<0.05$ ）。因此，为了简化模型，在删除不显著项后分别对 Y_1 、 Y_2 进行进一步的拟合，所得模型： $Y_1=42.09+5.16 X_1+1.21 X_2$ （ $r=0.963 6$ ， $P<0.01$ ；失拟度 $F=0.258 1>0.05$ ）； $Y_2=72.25+15.49 X_1+3.56 X_2+2.42 X_1^2$ （ $r=0.968 8$ ； $P<0.01$ ，失拟度 $F=0.271 1>0.05$ ）。2 个简化模型均有显著的统计学意义，且拟合优度良好。

2.4.3 效应面评估和优化 根据实际生产及临床应用情况，微球的载药量及包封率值越大越好，应用 Design Expert 8.0 实验设计软件绘制各因变量对响应值的三维曲面图（图 2）。按照上述条件结合模拟方程进行优化，得优化后处方为 PLGA 0.19 g/mL、

表2 回归方程系数显著性检验

Table 2 Significance of regression equation coefficient

误差来源	系数估计	Y_1		系数估计	Y_2	
		SE	P 值		SE	P 值
常数项	42.410	0.45	0.000 1	73.610	1.320	0.000 1
X_1	5.070	0.28	0.000 1	15.400	0.810	0.000 1
X_2	1.320	0.27	0.001 7	3.880	0.380	0.001 7
X_3	0.600	0.26	0.059 9	1.780	0.260	0.052 3
X_1X_2	-0.190	0.35	0.596 6	-0.150	0.130	0.887 4
X_1X_3	-0.210	0.34	0.555 3	-0.260	0.190	0.805 1
X_2X_3	0.099	0.33	0.774 5	0.380	0.370	0.709 2
X_1^2	0.390	0.35	0.306 7	2.480	0.130	0.047 3
X_2^2	-0.620	0.41	0.168 8	-1.600	0.129	0.220 3
X_3^2	0.003	0.50	0.994 2	-0.054	0.460	0.971 4

SE-系数标准误差; P-P 概率

SE-standard error of coefficient; P-P probability

PVA 18 mg/mL、油水相体积比 1:89 (0.011), 预测载药量为 48.00%, 包封率为 91.93%。

2.5 工艺验证

为进一步验证筛选所得的优化制剂处方的合理性和制备工艺的重现性, 并考虑实际操作的简便性, 将上述各处方因素取整, 即 PLGA 质量浓度 0.20 g/mL、PVA 质量浓度 0.018 g/mL、油水相体积比 1:90 (0.011)。依此最优处方平行制备 3 批穿心莲内酯微球样品, 并分析其主要指标。实验测得载药量分别为 48.49%、47.06%、46.08%, 包封率分别为 92.67%、89.76%、88.03%, 结果与模型预测值非常接近, 表明该模型比较可靠, 为最佳微球制剂处方。

进一步利用电子扫描显微镜观察了所制备微球的形状和表面形态 (图 3), 结果表明, 在最优处方下制得的穿心莲内酯-PLGA 微球为大小均匀的球形, 且表面光滑。

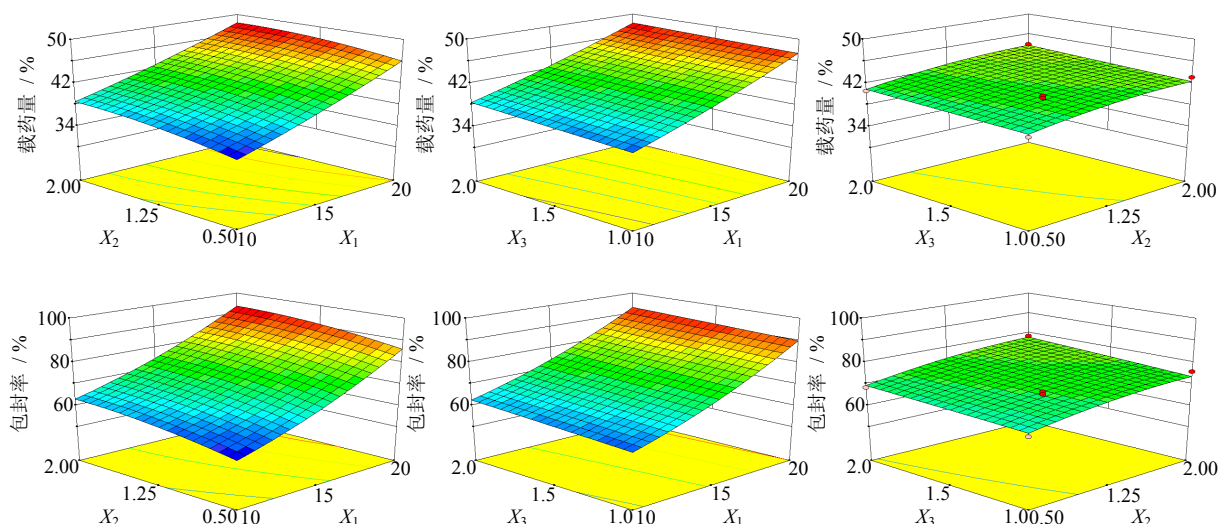


图2 各因素与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors and response values

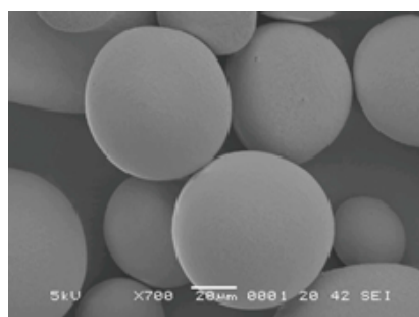


图3 载药穿心莲内酯-PLGA 微球扫描电镜图

Fig. 3 SEM photograph of andrographolide-loaded PLGA microspheres

3 讨论

Box-Behnken 效应面法适用于多因素多水平试验设计, 可以考察各因素的交互作用, 相比于中心复合设计法试验次数少, 节约成本, 并且解决了正交设计、均匀设计试验精度不够, 无法精确得到最佳点的问题^[11-12]。《中国药典》2010 年版对微球的包封率做了明确规定, 要求包封率不得低于 80%。本实验采用 S/O/W 溶剂蒸发法制备穿心莲内酯微球, 以包封率和载药量为指标对其制备工艺进行优选。由效应曲面及模型方程可以看出 PLGA 的质量浓度及 PVA 的质量浓度对包封率及载药量的影响

显著。当 PLGA 质量浓度升高时,包封率及载药量增加,这可能是因为随着 PLGA 质量浓度增加,有机相黏度的增加,微球的内部结构更加致密因此减少了药物在微球固化阶段向外水相的流失^[13]。PVA 在整个成球过程中不仅起到降低表面张力、乳化成乳和提高乳剂稳定性的作用,还能够增加水相的黏度,对于形成之中和形成之后的微球都有助悬稳定的作用,能使微球在固化过程中充分混悬,防止发生黏连与沉积。当 PVA 质量浓度升高时,包封率及载药量减小,这可能是因为外水相中高质量浓度的 PVA 增加了药物的溶解度,在微球固化阶段引起了更多的药物流失,因此包封率及载药量降低^[14]。

参考文献

- [1] Mishra K, Dash A P, Dey N. Andrographolide: A novel antimalarial diterpene lactone compound from *Andrographis paniculata* and its interaction with curcumin and artesunate [J]. *J Trop Med*, 2011, 2011: 579518, doi: 10.1155/2011/579518.
- [2] Varma A, Padh H, Shrivastava N. Andrographolide: A new plant-derived antineoplastic entity on horizon [J]. *Evid Based Compliment Altermat Med*, 2011, 2011: 815390, doi: 10.1093/ecam/nep135. Epub 2011 Feb 10.
- [3] 杨 静. 穿心莲内酯的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1168-1170.
- [4] Aromdee C. Modifications of andrographolide to increase some biological activities: A patent review (2006-2011) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2012, 22(2): 169-180.
- [5] Ye L, Wang T, Tang L, et al. Poor oral bioavailability of a promising anticancer agent andrographolide is due to extensive metabolism and efflux by P-glycoprotein [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(11): 5007-5017.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [7] Li G Y, Zhong M, Zhou Z D, et al. Formulation optimization of chelerythrine loaded O-carboxymethyl-chitosan microspheres using response surface methodology [J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49(1): 970-978.
- [8] Tsai Y M, Jan W C, Chien C F, et al. Optimised nano-formulation on the bioavailability of hydrophobic poly-phenol, curcumin, in freely-moving rats [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 918-925.
- [9] 刘丽波, 张亚琼, 郭胜荣. S/O/W 法制备氟尿嘧啶缓释微球及体外释药行为考察 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(3): 205-208.
- [10] 苏柘僮, 刘 英, 徐佳丽, 等. 应用 Box-Behnken 设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 501-504.
- [11] Hao J F, Fang X S, Zhou Y F, et al. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6: 683-692.
- [12] 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.
- [13] Rahman Z, Zidan A S, Habib M J, et al. Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett-Burman design [J]. *Int J Pharm*, 2010, 389(1/2): 186-194.
- [14] 王彦君, 毛世瑞, 孙 伟, 等. 白藜芦醇 PLGA 长效注射微球的制备及工艺考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(4): 265-272.