

β -榄香烯聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备工艺研究

王 博, 袁子民*, 程 岚

辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

摘要:目的 优化 β -榄香烯聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备工艺。方法 以聚氰基丙烯酸正丁酯(polybutylcyanoacrylate, PBCA)为载药材料, 采用界面缩聚法, 以包封率为考察指标, 通过单因素试验及正交试验设计优化制备工艺。结果 该工艺条件下制得的纳米粒, 形态规整, 无黏连, 大小较为均匀, 平均粒径 254 nm, 平均包封率 90.17%。结论 本实验优化的制备工艺稳定可行。

关键词: β -榄香烯; 聚氰基丙烯酸正丁酯; 纳米粒; 界面缩聚法; 包封率

中图分类号: R283.6; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0474-04

Preparation of β -elemene-polybutylcyanoacrylate nanoparticles

WANG Bo, YUAN Zi-min, CHENG Lan

School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective Optimizing the formula and preparation of β -elemene-polybutylcyanoacrylate nanoparticles (β -ELE-PBCA-NP). **Methods** With polybutylcyanoacrylate (PBCA) as the drug-loaded material, β -ELE-PBCA-NP was prepared by interfacial polycondensation. The preparation conditions were optimized by single factor design and the formula was optimized by orthogonal design with entrapment efficiency (EE) as index. EE of β -ELE-PBCA-NP was determined by RP-HPLC. **Results** Under the optimal conditions, the prepared NPs were round and regular in shape without adhesions with average particle size of 254 nm and EE of 90.17%. **Conclusion** The optimized technology in this experiment is stable and feasible.

Key words: β -elemene (β -ELE); polybutylcyanoacrylate (PBCA); nanoparticle (NP); interfacial polymerization; entrapment efficiency

β -榄香烯(β -elemene, β -ELE)由抗癌中药榄香烯挥发油进一步精馏纯化, 去除 γ 、 δ -榄香烯等成分得到的抗癌单体, 具有高选择性、免疫增强作用、无肝肾毒及骨髓抑制等优点, 但也存在一定的不良反应^[1-3]。为降低其不良反应, 提高治疗肝癌的效果, 本实验以聚氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)为载体材料, 采用界面缩聚法研制肝靶向 β -榄香烯聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(β -ELE-PBCA-NP)制剂^[4-8], 并以包封率为指标对其制备工艺进行优化, 为 β -ELE-PBCA-NP的制备及其他中药挥发油纳米粒制剂的研制提供参考。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪; JEOL JEM-1200EX 透射电镜(日本电子公司); Nicomp 380ZLS

激光粒度仪(美国 PSS 粒度分析仪公司); TGL-20M 台式高速冷冻离心机; 85-1 型集热式恒温加热磁力搅拌器。

β -榄香烯原料药(大连远大制药有限公司提供, 质量分数>98%); β -榄香烯对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100268-200401, 质量分数>99%); α -氰基丙烯酸正丁酯(BCA, 北京瞬康医用胶有限公司); Poloxamer 188(德国 BASF); Dextran-70(西安罗森伯科技有限公司); 乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 单因素试验

2.1.1 制备温度的考察 固定投药量 15 mg、BCA 75 μ L、油水比 1:2、搅拌时间 4 h、pH 3.0、Poloxamer

收稿日期: 2010-05-30

基金项目: 辽宁省教育厅 2009 年度高等学校科研项目(2009A499); 辽宁中医药大学优秀青年药学人才基金

作者简介: 王 博, 女, 2004 级本硕研究生。Tel: (0411)87586105 E-mail: burble85@163.com

*通讯作者 袁子民 E-mail: yuanzmin@163.com

188 (40 mg) 与 Dextran-70 (40 mg), 考察制备温度分别为 20、30、40 °C 对 β -ELE-PBCA-NP 包封率的影响, 结果包封率分别为 89.6%、91.4%、88.1%。可见制备温度对包封率并无明显影响, 因此选择制备温度为室温。

2.1.2 搅拌时间的考察 在纳米粒制备工艺中, 有机相加入到水相后需继续搅拌一定时间, 以提高包封率, 并除去有机溶剂。固定投药量 15 mg、BCA 75 μ L、油水比 1:2、制备温度为室温、pH 3.0、Poloxamer 188 (40 mg) 与 Dextran-70 (40 mg), 考察搅拌时间分别为 3、4、5 h 对 β -ELE-PBCA-NP 包封率的影响, 结果包封率分别为 90.3%、89.2%、88.6%。可见搅拌时间对包封率并无明显影响, 且有机溶剂都能除尽, 故选择搅拌时间为 3 h。

2.1.3 pH 值的考察 水相 pH 值的大小将影响界面聚合速度及包封率。固定投药量 15 mg、BCA 75 μ L、油水比 1:2、制备温度为室温、搅拌时间为 3 h、Poloxamer 188 (40 mg) 与 Dextran-70 (40 mg), 考察将水相 pH 值用 0.01 mol/L 盐酸分别调至 2.0、3.0、4.0 对 β -ELE-PBCA-NP 包封率的影响, 结果包封率分别为 82.7%、89.6%、73.4%。pH 4.0 时包封率较低, 说明此时聚合速度过快而使包封率下降。pH 3.0 时, 包封率较高且聚合速度适中, 故选择将水相 pH 值调至 3.0。

2.1.4 表面活性剂用量考察 表面活性剂 Poloxamer 188 与 Dextran-70 二者联用效果优于单用, 且二者 1:1 时效果较好。固定投药量 15 mg、BCA 75 μ L、油水比 1:2、制备温度为室温、搅拌时间为 3 h、pH 3.0, 考察 Poloxamer 188 与 Dextran-70 用量分别为 30、40、50 mg 对 β -ELE-PBCA-NP 包封率的影响, 结果包封率分别为 71.4%、78.0%、89.2%, 表明包封率随表面活性剂用量加大而增大。表面活性剂用量加大, 乳化和包封的效果较好, 由此选择两种表面活性剂用量均为 50 mg。

2.2 β -ELE-PBCA-NP 制备工艺的优化

根据上述单因素试验考察结果, 本实验选择 β -榄香烯投药量 (A)、BCA 用量 (B)、油水比 (C)、转速 (D) 4 个影响纳米粒制备的关键因素, 选择 3 个水平进行试验考察, 采用正交试验设计 $L_9(3^4)$ 表进行试验, 因素水平见表 1。

2.3 试验方法

取 β -榄香烯及 BCA 适量用丙酮溶解作为有机相, Poloxamer 188 及 Dextran-70 适量用蒸馏水溶解

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/mg	B/ μ L	C/(mL : mL)	D/(r·min ⁻¹)
1	10	50	1 : 1	400
2	15	75	1 : 2	600
3	20	100	1 : 3	800

作为水相, 并用 0.01 mol/L 盐酸调 pH 值至 3.0。在室温一定转速磁力搅拌下, 将有机相按一定比例缓缓加入水相中, 搅拌 3 h 至有机溶剂挥尽, 用 0.01 mol/L NaOH 调 pH 值为 7.0, 继续搅拌 0.5 h, 过 G3 漏斗, 低温静置, 即得乳白色泛蓝色乳光的 β -ELE-PBCA-NP 胶体溶液。根据上述纳米粒制备方法结合正交试验表 2 安排试验, 以包封率为考察指标进行试验。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果 ($n=3$)

Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test ($n=3$)

试验号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	82.9
2	1	2	2	2	89.3
3	1	3	3	3	76.6
4	2	1	2	3	64.1
5	2	2	3	1	83.5
6	2	3	1	2	91.8
7	3	1	3	2	70.3
8	3	2	1	3	83.0
9	3	3	2	1	95.7
$\bar{K}_1$	82.93	72.43	85.90	87.37	
$\bar{K}_2$	79.80	85.27	83.03	83.80	
$\bar{K}_3$	83.00	88.03	76.80	74.57	
R	3.20	15.60	9.10	12.80	

2.4 包封率测定方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil TM C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-水 (90:10), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为室温, 检测波长 210 nm。

2.4.2 线性关系考察 分别精密量取 0.896 mg/mL β -ELE 对照品储备液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐

标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=194\ 263\ X+516.5$, $r=0.999\ 6$ 。结果 β -ELE 在 $22.4\sim 179.2\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.3 空白干扰试验 按 β -榄香烯纳米粒制备方法, 制备过程中不加入 β -榄香烯, 制成空白纳米粒, 按纳米粒体系的供试品制备方法制成空白对照液。精密吸取纳米粒对照品溶液、纳米粒沉淀供试品溶液、空白对照液各 $10\ \mu\text{L}$, 按上述色谱条件测定, 结果空白对照液在与 β -榄香烯相同保留时间处无色谱峰出现, 对测定无干扰。

2.4.4 精密度试验 分别取高、中、低 3 种对照品溶液, 分别于 1 d 内重复进样 5 次, 计算日内精密度, 结果 RSD 分别为 0.92%、0.78%、0.65%; 并连续 5 d 重复进样 5 次, 计算日间精密度, 结果 RSD 分别为 1.81%、0.92%、0.81%。表明日内、日间精密度均良好。

2.4.5 重现性试验 取同一样品 5 份, 分别按纳米粒体系的供试品溶液制备方法操作, 精密吸取各供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 分别注入液相色谱仪, 测定。结果 β -ELE 平均质量浓度为 $1.22\ \text{mg/mL}$, RSD 为 1.42%。

2.4.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样, 测定色谱峰面积, 结果 RSD 为 1.28%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.4.7 回收率试验 精密量取已测定的 β -ELE-PBCA-NP 胶体溶液 $0.5\ \text{mL}$, 共 6 份, 分别置 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 各精密加入 $1.0\ \text{mL}$ β -ELE 对照品溶液适量, 其余按纳米粒体系的供试品溶液制备方法及上述色谱条件分别进样, 测定, 计算回收率。结果 β -ELE 的平均回收率为 96.9%, RSD 为 1.7%。

2.4.8 包封率的测定 采用低温超速离心法, 精密量取 β -ELE-PBCA-NP 胶体溶液 $1\ \text{mL}$, 置于离心管中, 以 $18\ 000\ \text{r/min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 $1.5\ \text{h}$, 除去上清液, 纳米粒沉淀用适量流动相溶解, 转移至 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 按上述色谱条件, 计算纳米粒中 β -ELE 药物量 (W_1)。另精密量取 β -ELE-PBCA-NP 胶体溶液 $1\ \text{mL}$, 置 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 同纳米粒中 β -ELE 测定方法, 测定总药物量 (W_0), 按包封率 $=W_1/W_0$ 计算各试验的包封率, 结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

从试验结果的方差分析可知, B 因素为最显著的影响因素。从直观分析中可看出, 影响本试验的

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均值	F 值	显著性
B	415.71	2	207.85	20.7	$P<0.05$
C	129.88	2	64.94	6.5	
D	261.82	2	130.91	13.1	
A(误差)	20.06	2	10.03	1	

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$

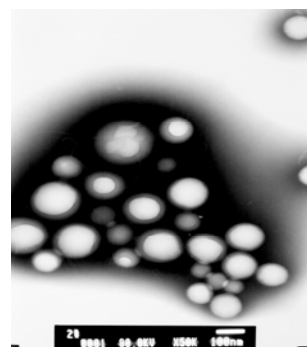
主要因素依次为 BCA 用量 (B) > 转速 (D) > 油水比 (C) > β -榄香烯投药量 (A), 最佳条件为 $A_3B_3C_1D_1$, 即 β -榄香烯投药量为 $20\ \text{mg}$, BCA 用量为 $100\ \mu\text{L}$, 油相与水相的体积比为 1:1, 转速为 $400\ \text{r/min}$, 所制得的包封率最高。

2.5 工艺验证

为确证该工艺的优劣和稳定性, 按正交试验优化的最佳工艺条件, 制备 3 批 β -ELE-PBCA-NP 并测定包封率, 结果包封率分别为 90.8%、89.5%、90.2%, 平均包封率为 90.17%, 表明该工艺基本稳定可行。

2.6 β -ELE-PBCA-NP 的形态观察及粒径测定

将按最佳工艺制备的 β -ELE-PBCA-NP 胶体溶液适当稀释后, 一部分采用 1.5% 磷钨酸染色后以透射电镜观察其形态, 结果见图 1, 纳米粒形态规整, 无黏连, 大小较为均匀。另一部分经激光粒度分析仪分析, 结果所制得的 β -ELE-PBCA-NP 的平均粒径为 $254\ \text{nm}$, 粒径分布见图 2。

图 1 β -ELE-PBCA-NP 透射电镜照片Fig. 1 TEM photograph of β -ELE-PBCA-NP

3 讨论

纳米粒的制备方法主要有乳化聚合法^[9]和界面缩聚法^[6], 本实验原料药 β -榄香烯为脂溶性的挥发油, 易采用界面缩聚法制备。将 β -榄香烯和 BCA 溶解于有机溶剂中作为油相缓慢滴加至水相中, 由

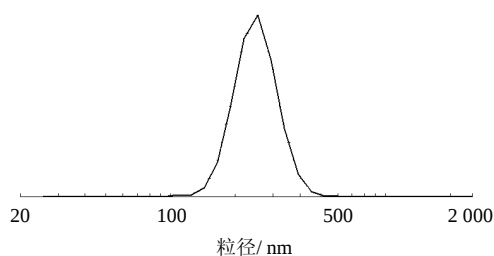


图2 β -ELE-PBCA-NP 粒径分布

Fig. 2 Particle diameter distribution of β -ELE-PBCA-NP

于 α -BCA 具有 βC^+ , 遇水中 OH^- 发生聚合反应, 使 β -榄香烯包裹形成纳米粒。该聚合反应速度对纳米粒的包封率影响较大, 与水相的 pH 值及油水比例有关, 过快将造成包封率下降。水相 pH 值高, OH^- 浓度高, 反应速度快, 反之较慢。油水比例不同, 相当于 OH^- 浓度不同, 油相比比例大, 反应速度慢。因此适当调节 pH 值、控制油水相比比例, 可以提高包封率。

β -榄香烯及 BCA 曾用无水乙醇溶解, 但 BCA 易出现浑浊, 后经筛选二者均采用丙酮溶解作为有机相, 且丙酮沸点较低, 易于挥发、去除。

参考文献

[1] 花文峰, 蔡绍晖. β -榄香烯抗肿瘤作用的基础与临床研

究 [J]. 中药材, 2006, 29(1): 93-95.

[2] 王宏虹, 刘华钢, 刘丽敏. β -榄香烯抗肿瘤作用机制研究概况 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 140-143.

[3] 李传刚, 李墨林, 周 琴, 等. β -榄香烯对人膀胱癌 BIU-87 细胞磷脂膜功能及 Bcl-2 表达的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 886-889.

[4] 孟庆刚, 倪京满, 许有瑞. 氢溴酸高乌甲素聚氰基丙烯酸异丁酯纳米囊的制备工艺研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(7): 557-558.

[5] 刘福和, 赵燕敏, 冯 健, 等. 聚山梨酯-80 包裹神经毒素-I 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒脑内药动学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1760-1763.

[6] 肖 菁, 李新中, 刘 韶, 等. 界面聚合法制备齐墩果酸聚氰基丙烯酸正丁酯纳米囊及其质量考察 [J]. 中国药房, 2006, 17(20): 1551-1554.

[7] 胡霓霓, 谭群友, 魏农农, 等. 水飞蓟宾纳米粒的制备及其理化性质研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1384-1387.

[8] 黄红娜, 张丹参, 郑晓霞, 等. 大黄酚聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊的制备工艺及质量研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 547-550.

[9] 张学农, 张 强, 温 浩, 等. 乳化聚合法制备阿苯达唑聚氰基丙烯酸酯纳米球的方法比较及稳定性考察 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(5): 357-359.

郑重声明

天津中草药杂志社 (出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊) 未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议, 凡是以天津中草药杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动, 均严重侵害了天津中草药杂志社的合法权益, 天津中草药杂志社将保留对其采取法律行动的权利, 特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津中草药杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com”, 切勿上当受骗; 若发现假冒天津中草药杂志社及所属期刊的情况, 请检举揭发。

电话: (022)27474913 E-mail: zcy@tiprpress.com

天津中草药杂志社