

## 中心组合设计-效应面法优化长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方

谭静净, 程 岚, 李学涛\*

辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

**摘要:** **目的** 采用中心组合设计-效应面法优化长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的最佳处方。**方法** 以主动载药-pH 梯度法制备亲水基修饰阳离子脂质体, 以包封率、Zeta 电位为指标, 考察长春碱与二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 质量比、DPPC 与 3 $\beta$ -[N-(N', N'-二甲基胺乙基)胺基甲酰胺基] 胆固醇 (DC-Chol) 物质的量之比、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 (DSPE-PEG 2000) 的质量分数 3 个因素对考察指标的影响, 并对各个因素进行二项式拟合, 通过响应面分析选取最佳处方。**结果** 优化出的长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方为长春碱与 DPPC 质量比为 0.06、DPPC 与 DC-Chol 物质的量之比为 1.00、DSPE-PEG 2000 的质量分数为 7%。**结论** 中心组合设计-效应面法应用简便、预测性好, 制备的长春碱亲水基修饰阳离子脂质体符合设计要求。

**关键词:** 中心组合设计; 效应面法; 长春碱; 阳离子脂质体; 主动载药-pH 梯度法

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)09-1742-04

## Prescription optimization of vinblastine hydrophilic group-modified cationic liposomes by central composite design-response surface method

TAN Jing-jing, CHENG Lan, LI Xue-tao

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

**Abstract:** **Objective** To optimize the prescription of vinblastine (VLB) hydrophilic group-modified cationic liposomes by using central composite design-response surface method. **Methods** The hydrophilic group-modified cationic liposomes were prepared by active loading-pH gradient method. Taking encapsulation efficiency (EE) and Zeta potential as indexes, the effects of weight ratio of VLB/DPPC, the mole ratio of DPPC/DC-Chol, and the concentration of DSPE-PEG 2000 on them were investigated. Binomial fitting of each factor was observed and response surface analysis was used to select the optimal prescription. **Results** The weight ratio of VLB/DPPC in optimized prescription of VLB hydrophilic group-modified cationic liposomes was 0.06, the mole ratio of DPPC/DC-Chol was 1.00, and the concentration of DSPE-PEG 2000 was 7%. **Conclusion** Central composite design-response surface method is convenient to use with good predictability. The prepared VLB hydrophilic group-modified cationic liposomes reach the design requirements.

**Key words:** central composite design; response surface method; vinblastine; cationic liposomes; active loading-pH gradient method

长春碱 (vinblastine) 是一种双吲哚型生物碱, 存在于夹竹桃科植物长春花 *Catharathus roseus* (L.) G. Don 中。长春碱能干扰增殖细胞纺锤体的形成, 使有丝分裂停止于中期; 并有免疫抑制作用; 对何杰金氏病、绒毛膜上皮癌疗效较好, 对急性白血病、乳腺癌、卵巢癌、睾丸癌、头颈部癌、口咽部癌、单核细胞白血病均有一定疗效<sup>[1]</sup>。但同其他细胞毒药物一样, 长春碱缺乏对肿瘤组织的选择性, 严重限制了其在临床中对肿瘤的治疗应用<sup>[2]</sup>。亲水基修

饰的脂质体可以提高药物在血液中保留时间, 增加药物的被动靶向功能, 并且可以降低毒性, 提高疗效<sup>[3]</sup>。阳离子脂质体可以与带负电荷的药物结合, 提高药物包封率, 是带负电荷药物的一种转运工具<sup>[4-5]</sup>。与药物结合之后, 其表面仍有富余的正电荷, 能被表面带负电荷的细胞膜吸附, 再通过细胞内吞或膜融合方式将药物导入细胞而发挥作用<sup>[6]</sup>。故本实验将长春碱制备成亲水基修饰的阳离子脂质体, 以解决其在临床应用面临的问题。

收稿日期: 2012-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (1110172)

作者简介: 谭静净 (1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: 15542591812 E-mail: jingjingchd@126.com

\*通讯作者 李学涛 E-mail: lixuetao1979@yahoo.cn

网络出版时间: 2012-08-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120816.1041.004.html>

在工艺优化和处方筛选过程中,常需同时考察多个因素对结果的影响,并对结果进行优化。中心组合设计-效应面法是国外常用的集数学和统计学方法于一体的试验设计方法,比较成熟且特点鲜明,建立的效应与因素之间的数学关系式,通过统计学检验确保模型的可信度较高。所以本实验采用中心组合设计-效应面法优化长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方。

## 1 仪器与材料

Horiba LB-550 动态光散射粒度分布分析仪(1~6 000 nm,日本 Horiba 公司),Zeta 电位分析仪(SZP-06,德国 BTG),安捷伦 LC-1100 液相色谱仪(G21771AA-UV 检测器,安捷伦色谱工作站),KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AY220 电子分析天平(日本岛津公司),DF2101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义市予华仪器厂),RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

长春碱(批号 GPC-JNHG20110921,质量分数 98.2%,武汉金诺化工有限公司); $3\beta$ -[N-(N',N'-二甲基胺乙基)胺基甲酰胺基]胆固醇(DC-Chol,相对分子质量 495.18,Avanti Polar Lipids, Inc.);二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,相对分子质量 734.04,日本精化株式会社 NFC),二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG 2000,相对分子质量 280.5,日本精化株式会社 NFC);Sephadex G-50(上海华蓝化学科技有限公司),Triton X-100(北京赛百盛生物工程公司),甲醇、乙腈(色谱纯),其他试剂均为分析纯,实验用水为三蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的制备

按处方比例,精密称取 DC-Chol、DPPC、DSPE-PEG 2000,加氯仿 10 mL 溶解,于旋转薄膜蒸发器上除去氯仿,制备磷脂膜。加入柠檬酸缓冲液(pH 3.0)水化磷脂膜,振摇,搅拌,超声处理,制备空白脂质体。将所得空白脂质体依次通过 0.45、0.22  $\mu$ m 微孔滤膜,加入 0.2 mol/L 长春碱溶液,并用 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液将 pH 值调至 7.5,于 55  $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 10 min,冷却至室温,即得长春碱亲水基修饰阳离子脂质体<sup>[7]</sup>。

### 2.2 脂质体包封率的测定

**2.2.1 色谱条件**<sup>[8]</sup> 色谱柱为迪马公司  $\text{C}_{18}$  柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m),流动相为二乙胺溶液(取二

乙胺 14 mL,加水 986 mL,混匀,用磷酸调 pH 值 7.5)-乙腈 200 mL 与甲醇 800 mL 的混合液(32:68),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 264 nm,体积流量 1.0 mL/min,进样量 10  $\mu$ L,理论塔板数按长春碱峰计算不低于 3 000。

**2.2.2 线性关系考察** 精密称取长春碱 20.0 mg,置 50 mL 量瓶中加入甲醇 40 mL 超声 10 min,甲醇定容至 50 mL,得质量浓度为 0.400 mg/mL 长春碱储备液。精密量取上述储备液用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.025、0.050、0.100、0.200、0.300、0.400 mg/mL 的系列溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件进行操作,测定色谱峰峰面积。以进样量为横坐标(X),色谱峰峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得回归方程  $Y=5\,188.9X-30.775$ , $r=0.999\,6$ ,表明长春碱在 0.025~0.400 mg/mL 线性关系良好。

**2.2.3 药物总量的测定** 精密量取脂质体样品 0.1 mL 于 5 mL 量瓶中,加入 0.2 mL 20% Triton X-100 乙醇溶液,超声使其溶解,流动相定容至刻度,0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液 10  $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,测定,计算长春碱总量。

**2.2.4 游离药物量的测定和包封率的计算** 精密量取长春碱脂质体 0.5 mL,加至 Sephadex G-50 凝胶柱(12 cm $\times$ 1.0 cm)上方,以水进行洗脱,体积流量为 1.0 mL/min,收集游离药物部分,混合,蒸干,残渣用流动相溶解,滤过,滤液定容至 5 mL,0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取滤液 10  $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,测定,计算游离长春碱的量,并计算脂质体的包封率。

包封率=1-游离长春碱的量/长春碱总量

### 2.3 脂质体 Zeta 电位及粒径分布的测定

取长春碱亲水基修饰阳离子脂质体混悬液以水为分散介质稀释至适宜质量浓度,采用 Zeta 电位分析仪和动态光散射粒度分布分析仪测定脂质体的 Zeta 电位和粒径分布。

### 2.4 试验设计<sup>[9-10]</sup>

在预试验的基础上,选择对长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的制备影响较显著的 3 个因素作为考察对象,即长春碱与 DPPC 质量比( $X_1$ )、DPPC 与 DC-Chol 物质的量之比( $X_2$ )、DSPE-PEG 2000 的质量分数( $X_3$ ),并确定其范围: $X_1$  0.01~0.09,  $X_2$  0.5~1.5,  $X_3$  2%~12%。采用 3 因素中心组合设计,以脂质体包封率( $Y_1$ )和 Zeta 电位( $Y_2$ )为指标进行考察,试验设计及结果见表 1。

表 1 中心组合试验设计与结果  
Table 1 Central composite test design and results

| 试验号 | $X_1$         | $X_2$         | $X_3$       | $Y_1 / \%$ | $Y_2 / \text{mV}$ |
|-----|---------------|---------------|-------------|------------|-------------------|
| 1   | 0.03 (-1)     | 0.71 (-1)     | 4% (-1)     | 75.6       | 44.56             |
| 2   | 0.07 (1)      | 0.71 (-1)     | 4% (-1)     | 82.9       | 58.64             |
| 3   | 0.03 (-1)     | 1.29 (1)      | 4% (-1)     | 71.6       | 40.92             |
| 4   | 0.07 (1)      | 1.29 (1)      | 4% (-1)     | 78.8       | 55.38             |
| 5   | 0.03 (-1)     | 0.71 (-1)     | 10% (1)     | 70.1       | 26.09             |
| 6   | 0.07 (1)      | 0.71 (-1)     | 10% (1)     | 77.7       | 45.94             |
| 7   | 0.03 (-1)     | 1.29 (1)      | 10% (1)     | 68.6       | 18.63             |
| 8   | 0.07 (1)      | 1.29 (1)      | 10% (1)     | 75.4       | 50.52             |
| 9   | 0.01 (-1.732) | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 72.1       | 14.97             |
| 10  | 0.09 (1.732)  | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 78.5       | 64.24             |
| 11  | 0.05 (0)      | 0.50 (-1.732) | 7% (0)      | 89.2       | 22.92             |
| 12  | 0.05 (0)      | 1.50 (1.732)  | 2% (0)      | 81.0       | 38.48             |
| 13  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 2% (-1.732) | 77.9       | 64.52             |
| 14  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 12% (1.732) | 63.9       | 30.28             |
| 15  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 85.5       | 35.45             |
| 16  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 85.4       | 35.44             |
| 17  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 85.6       | 35.43             |
| 18  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 85.3       | 35.46             |
| 19  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 85.5       | 35.45             |
| 20  | 0.05 (0)      | 1.00 (0)      | 7% (0)      | 85.7       | 35.45             |

## 2.5 数据处理

采用 Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.) 统计软件以  $Y_1$ 、 $Y_2$  为因变量, 分别对各因素进行二次多项式拟合, 得拟合方程。

$$Y_1 = 40.56 + 861.42 X_1 - 7102.52 X_1^2 - 5.90 X_2 + 4.78 X_2^2 + 803.17 X_3 - 5911.74 X_3^2 - 19.40 X_1 X_2 - 20.83 X_1 X_3 - 88.87 X_2 X_3 \quad (r=0.9411, P<0.01)$$

$$Y_2 = 70.87 - 456.10 X_1 + 4089.09 X_1^2 + 55.03 X_2 - 45.34 X_2^2 - 1514.27 X_3 + 5385.18 X_3^2 + 267.67 X_1 X_2 + 4833.33 X_1 X_3 + 254.47 X_2 X_3 \quad (r=0.9624, P<0.01)$$

将各因素对脂质体的  $Y_1$  和  $Y_2$  进行相关性分析, 相关系数 ( $r$ ) 见表 2。

由于效应面法得出的是三维图谱, 故固定对实验结果影响较小的一个影响因素。由各项  $r$  可知,  $X_2$  对  $Y_1$  和  $Y_2$  影响最小, 因此, 确定  $X_2$  用量为中心点值, 将  $X_2=1.00$  带入上述二次多项式回归方程得下列简化方程。

$$Y_1 = 39.44 + 842.02 X_1 - 7102.52 X_1^2 + 714.3 X_3 - 5911.74 X_3^2 - 20.83 X_1 X_3$$

$$Y_2 = 80.56 - 188.43 X_1 + 4089.09 X_1^2 - 1259.83 X_3 +$$

表 2 各项的相关系数

Table 2 Correlation coefficients of each vector

| 因素      | $r$   |       | 因素        | $r$   |       |
|---------|-------|-------|-----------|-------|-------|
|         | $Y_1$ | $Y_2$ |           | $Y_1$ | $Y_2$ |
| $X_1$   | 0.34  | 0.73  | $X_3^2$   | -0.49 | -0.41 |
| $X_1^2$ | 0.24  | 0.73  | $X_1 X_2$ | 0.15  | 0.65  |
| $X_2$   | -0.23 | 0.07  | $X_1 X_3$ | -0.03 | 0.18  |
| $X_2^2$ | -0.22 | 0.06  | $X_2 X_3$ | -0.45 | -0.36 |
| $X_3$   | -0.36 | -0.46 |           |       |       |

$$5385.18 X_3^2 + 4833.33 X_1 X_3$$

根据上述方程, 绘制  $X_1$  与  $X_3$  对  $Y_1$  和  $Y_2$  影响的效应面图, 见图 1。

结合上述数学模型和效应面图, 确定  $X_1$  优化范围为 0.01~0.09,  $X_3$  优化范围为 2%~12%, 寻求此取值范围内最佳值。  $X_1=0.06$ ,  $X_3=7\%$  为 1 组最佳值, 代入方程得  $Y_1=85.49\%$ ,  $Y_2=42.47 \text{ mV}$ 。

结合上述实验处方筛选结果和本课题组前期研究经验确定长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的制备方法: 精密称取 DC-Chol 0.250 g (0.505 mmol)、DPPC 0.370 g (0.504 mmol)、DSPE-PEG 2000 0.010 g

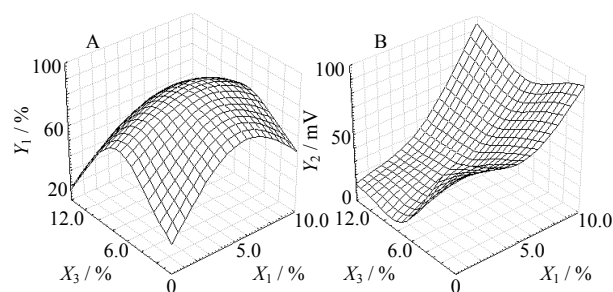


图1  $X_1$ 与 $X_3$ 对 $Y_1$ (A)和 $Y_2$ (B)影响的效应面图  
Fig. 1 Response surface of  $X_1$  and  $X_3$  on  $Y_1$  (A) and  $Y_2$  (B)

(0.036 mmol)加氯仿 10 mL 溶解,于旋转薄膜蒸发器上除去氯仿,制备磷脂膜;加入柠檬酸缓冲液(pH 3.0)水化磷脂膜,振摇,搅拌,超声处理,制备空白脂质体。将所得脂质体依次通过 0.45、0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,加入 0.2 mol/L 长春碱溶液 4.44 mL,并用 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  将 pH 值调至 7.5,于 55  $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 10 min,冷却至室温,即得。

## 2.6 优化处方的验证试验

根据上述优化处方得到的结果制备 3 批长春碱亲水基修饰阳离子脂质体,按“2.2”、“2.3”项下方法测其包封率、Zeta 电位及粒径分布,结果包封率分别为 87.43%、85.44%、86.09%,Zeta 电位分别为 43.29、43.02、42.28 mV,平均粒径分别为 133、128、130 nm。

## 3 讨论

阳离子脂质体与其他脂质体最大的不同就在于表面带正电荷,Zeta 电位是表征粒子表面电荷情况的一个重要指标,且 Zeta 电位的大小对脂质体混悬液的稳定性也有影响,故 Zeta 电位的测定是阳离子脂质体的一个重要指标。荷电的脂质体能够减少相互间的聚集和融合,增加稳定性。Zeta 电位绝对值大于 60 mV 时,荷电粒子相当稳定;Zeta 电位绝对值在 30~60 mV 时,荷电粒子比较稳定;在 Zeta 电位绝对值小于 30 mV 时,荷电粒子不稳定,容易聚集<sup>[11]</sup>。本实验制备的脂质体的 Zeta 电位在 43 mV 左右,因此比较稳定。

本实验处方中加入了少量的 DSPE-PEG 2000,该亲水基团的引入不但能够使脂质体逃避网状内皮系统的捕获,增加脂质体的血液循环时间,同时还能提高脂质体的被动靶向性。亲水基修饰脂质体表面由于 PEG 2000 层的引入,其体内外稳定性将发生很大改变<sup>[12]</sup>。由于 PEG 化的磷脂的空间位阻的原

因,长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的 Zeta 电位会降低,从而影响脂质体的整体稳定性,故处方中对 DSPE-PEG 2000 的加入量需要严格控制。

脂质体的制备技术包括被动载药技术和主动载药技术。被动载药技术通常只适用于和脂类物质(尤其是磷脂)有强烈相互作用的脂溶性或亲脂性药物,否则药物的包封率和载药量不能满足临床要求;主动载药法适用于药物具有合适的油水分配系数,为弱酸或弱碱,能与脂质体的内相缓冲液形成稳定的复合物或沉淀物。所以本实验采用主动载药-pH 梯度法制备长春碱亲水基修饰阳离子脂质体。

## 参考文献

- [1] 习利平,宋新波,张丽娟.长春碱类抗肿瘤药的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(1):59-62.
- [2] 高正航,李卫东.长春花生物碱类药物研究概述[J].贵州农业科学,2005,33(6):94-96.
- [3] Meyer O, Kirpotin D, Hong K, *et al.* Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(25): 15621-15627.
- [4] 郭波红,程怡,林绿萍.甘草次酸脂质体的制备及其药剂学性质的研究[J].中草药,2010,41(3):380-383.
- [5] Sorgi F L, Huang L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization [J]. *Int J Pharm*, 1996, 144(2): 131-139.
- [6] 张昌明,吴永寿,余宏.阳离子脂质体基因载体的研究进展[J].医学综述,2009,15(12):1768-1770.
- [7] 赵妍,于彬,邓意辉,等.主动载药法制备硫酸长春新碱脂质体及其包封率的测定[J].中国药理学杂志,2005,40(20):1559-1562.
- [8] 中国药典[S].二部.2010.
- [9] 严文伟,费然,王文浩,等.大豆甾醇糖苷及两亲性聚乙二醇对阳离子脂质体细胞转染与膜各向异性的影响[J].北京大学学报:医学版,2003,35(3):324-328.
- [10] 钟志容,刘中兵,张志荣,等.中心组合设计法优化前阳离子脂质体的制备工艺[J].中国药科大学学报,2007,38(2):115-119.
- [11] 闫颖,齐宪荣.以叶酸受体为靶向的阳离子脂质体的制备与性质考察[J].药学学报,2008,43(11):1134-1139.
- [12] Abu Lila A S, Kizuki S, Doi Y, *et al.* Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model [J]. *J Controlled Release*, 2009, 137(1): 8-14.