

星点设计-效应面法优化紫杉醇-白桦脂酸混合纳米混悬剂

蒋 爱^{1,2}, 李国源^{1,2}, 王 鑫^{1,2}, 崔小兵^{1,2}, 李俊松^{1,2*}, 狄留庆^{1,2}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 制备一种紫杉醇-白桦脂酸混合纳米混悬剂, 优化制备工艺。**方法** 采用高压均质法, 以泊洛沙姆 188、卵磷脂为稳定剂, 以稳定剂浓度、稳定剂比例、均质压力、循环次数为考察因素, 以粒径及 PDI 为评价指标, 采用星点设计-效应面法优化处方, 并对其进行体外评价。**结果** 最优工艺为稳定剂质量浓度 0.6 mg/mL, 泊洛沙姆 188-卵磷脂 (2:1), 均质压力 100 MPa, 循环次数 20 次。最优工艺制备的纳米混悬剂平均粒径为 (282.54±5.40) nm, PDI 为 0.242±0.020。紫杉醇-白桦脂酸混合纳米混悬剂中药物粒子呈棒状, 再分散性与短期稳定性均良好, 其中的紫杉醇和白桦脂酸均以无定形形式存在。制备成纳米冻干粉后, 紫杉醇水中溶解度提高约 90 倍, 白桦脂酸提高约 100 倍。在 2 h 内纳米冻干粉中 2 种药物累积溶出百分率显著提高, 均达到 95%。**结论** 采用星点设计-效应面法优化纳米混悬剂制备工艺是有效、可行的, 纳米混悬剂可改善紫杉醇和白桦脂酸溶出。

关键词: 紫杉醇; 白桦脂酸; 纳米混悬剂; 星点设计; 效应面法

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)04-0852-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.010

Optimization of compounded nanosuspension of paclitaxel and betulinic acid by Box-Behnken design-response surface method

JIANG Ai^{1,2}, LI Guo-yuan^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, CUI Xiao-bing^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To prepare compounded nanosuspensions of paclitaxel and betulinic acid nanosuspension and optimize the preparation process. **Methods** Nanosuspension was prepared by high pressure homogenization with poloxamer 188 and lecithin as stabilizer. Stabilizer concentration, stabilizer ratio, homogeneous pressure, and cycle times were selected as investigation factors and the particle size and PDI of nanosuspension were selected as evaluation index to optimize the prescription by Box-Behnken design-response surface method and the *in vitro* evaluation was determined. **Results** The optimal formulation was as follows: stabilizer concentration 0.6 mg/mL, poloxamer 188-lecithin (2:1), homogenous pressure 100 MPa, cycle times 20 times. The average particle size was (282.54 ± 5.40) nm, PDI was 0.242 ± 0.020. The nano-particles in the paclitaxel-betulinic acid compounded nanosuspension were rod-shaped. The nanosuspension had perfect redispersibility and satisfactory short-term stability. Paclitaxel and betulinic acid in nano lyophilized powders all existed in amorphous form. After being prepared into nanosuspension formulation, the solubility of paclitaxel in water was increased by about 90 times while that of betulinic acid was increased by about 100 times. In 2 h, the cumulative dissolution rate of paclitaxel and betulinic acid in nanosuspension of paclitaxel and betulinic acid were all up to 95%. **Conclusion** Optimizing the preparation process of nano-suspension with Box-Behnken design-response surface method is effective and feasible and nanosuspension formulation can improve the dissolution of paclitaxel and betulinic acid observably.

Key words: paclitaxel; betulinic acid; nanosuspension; Box-Behnken design; response surface method

近年来联合用药逐渐成为肿瘤治疗的研究热点, 联合用药可以通过发挥药物的协同抗肿瘤作用, 减小化疗药物毒性^[1]。紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 是从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 的树皮中分

收稿日期: 2018-11-19

作者简介: 蒋 爱 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: 18260095219@163.com

*通信作者 李俊松 (1964—), 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: Lijunsong1964@163.com

离提取出的一种具有抗肿瘤活性的紫杉烷二萜化合物^[2],已在卵巢癌、乳腺癌、肺癌、白血病及胃肠道肿瘤的治疗上显示了明显的疗效^[3-8],但存在水溶解度小,长期给药后会产生多药耐药现象^[9],采用混合有机溶剂助溶易导致临床出现严重不良反应等问题^[10-11]。白桦脂酸(betulinic acid, BA)是一种五环三萜酸,具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎等生物活性,能通过诱导肿瘤细胞凋亡、阻碍细胞周期、抑制肿瘤细胞入侵和迁移、逆转多药耐药等多种机制对 20 多种肿瘤细胞有抑制作用^[12-14]。另外文献报道,BA 可与 PTX 协同诱导肿瘤细胞凋亡,并逆转 PTX 多药耐药^[15]。

PTX、BA 水溶性均较差,在水中溶解度分别为 0.081 $\mu\text{g/mL}$ ^[10]和 0.021 $\mu\text{g/mL}$ ^[16]。纳米混悬剂(nanosuspension, NP)是将药物颗粒制成纳米胶态分散体,属于非载体给药系统,与普通混悬剂相比具有许多优点:通过减小粒径,能增加药物的饱和溶解度和溶出速率^[17-18];固化后具有良好稳定性;制备工艺简单,便于工业化大生产;辅料用量少;纳米混悬剂可以作为中间剂型,用于其他剂型生产。纳米混悬剂适用于绝大部分难溶性药物,可广泛用于口服、注射、眼部、肺部等多种给药途径^[19]。此外将药物制备成纳米粒,可以通过增强渗透和滞留(EPR)效应将药物粒子被动靶向于肿瘤部位^[20],提高药物在肿瘤部位蓄积^[21-22],增强抗肿瘤疗效。因此,本实验采用高压均质机通过星点设计-效应面法优化纳米混悬剂制备工艺,将 PTX 和 BA 制成纳米混悬剂来改善药物的溶解度,提高溶出率,为研发抗肿瘤复方新药提供帮助。

1 仪器与试药

APV-2000 型高压均质机,德国 SPX Flow Technology 公司;Labconco 6L 型冻干机,美国 Labconco 公司;3000SH 型纳米粒度分析仪,英国 Malvern 公司;Synthesis 108 型超纯水仪,美国 Milli-Q 公司;HY-45 气浴恒温生物摇床,江苏金坛市金城国盛实验仪器厂;XP/XS 型微量分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;JEM-1200EX 型透射电镜,日本 JEM 公司;D/Max-2500PC 型 X-射线衍射仪,日本 Rigaku 公司;C-204 型差示扫描量热仪,德国 Netzsch 公司。PTX 原料药(质量分数 99%,批号 160608)、BA 原料药(质量分数 99%,批号 160703),南京清韵生物有限公司;PTX 对照品(质量分数 98%,批

号 Y03F6B1)、BA 对照品(质量分数 98%,批号 ZA08014SA13)、卵磷脂(批号 T28M8F32477),上海源叶生物科技有限公司;泊洛沙姆 188(批号 WPYI544B),德国 BASF 公司;聚山梨酯-80(批号 20170801)、甘露醇(批号 F-20101026),国药集团化学试剂有限公司;甲醇,色谱级,江苏汉邦科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 紫杉醇-白桦脂酸混合纳米混悬剂(PTX-BA-NP)的制备

称取质量浓度 0.6 mg/mL 的联合稳定剂(8 mg 泊洛沙姆 188 和 4 mg 卵磷脂),置去离子水 20 mL 中,搅拌使其充分溶解,得到稳定剂溶液。称取 PTX 粉末和 BA 粉末各 40 mg,溶于乙醇-醋酸乙酯(1:1)混合溶液 10 mL 中,超声使其充分溶解^[23]。将含有药物的溶液缓慢滴加到稳定剂溶液中,混合后继续 800 r/min 搅拌 30 min,减压挥去有机溶剂,得初混悬液。将上述初混悬液加入到高压均质机中,在 100 MPa 循环 20 次,即得 PTX-BA-NP。

2.2 单因素考察

本实验以纳米混悬剂的粒径和分散系数(polydispersity index, PDI)为评价指标,先对处方工艺进行单因素考察。

2.2.1 稳定剂种类考察 PTX-BA-NP 后续给药途径为 iv,依据美国 FDA 非活性成分指南,泊洛沙姆 188、卵磷脂、聚山梨酯-80 均可作为 iv 用辅料。因此,本实验选用泊洛沙姆 188、卵磷脂、聚山梨酯-80 为稳定剂,质量浓度 0.6 mg/mL,按照“2.1”项下方法制备 PTX-BA-NP,并测定粒径及 PDI,结果见表 1。单独以卵磷脂为稳定剂时,PTX-BA-NP 的 PDI 虽然小于 0.3,但粒径较大;单以泊洛沙姆 188 为稳定剂时,纳米混悬剂的粒径小,但 PDI 大于 0.3;聚山梨酯-80 作为 iv 用辅料存在安全隐患,因此选择将泊洛沙姆 188 和卵磷脂联用作为 PTX-BA-NP 的稳定剂。

表 1 稳定剂种类对 PTX-BA-NP 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of stabilizer type on particle size and PDI of PTX-BA-NP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂种类	粒径/nm	PDI
卵磷脂	551.80 $\pm$ 2.20	0.200 $\pm$ 0.033
聚山梨酯-80	276.30 $\pm$ 1.30	0.210 $\pm$ 0.033
泊洛沙姆 188	269.20 $\pm$ 1.40	0.318 $\pm$ 0.090

2.2.2 联合稳定剂质量浓度的考察 泊洛沙姆 188 和卵磷脂比例固定为 2:1, 稳定剂质量浓度分别为 0.3、0.6、0.9、1.2 mg/mL, 按照“2.1”项下方法制备 PTX-BA-NP, 并测定粒径及 PDI, 结果见表 2。随着稳定剂质量浓度的增加, 纳米混悬剂的粒径和 PDI 呈先下降后上升趋势, 当稳定剂质量浓度为 0.6 mg/mL 时, 粒径及 PDI 较佳。

表 2 稳定剂质量浓度对 PTX-BA-NP 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of stabilizer concentration on particle size and PDI of PTX-BA-NP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂/(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI
0.3	292.10±2.75	0.230±0.026
0.6	277.10±2.52	0.220±0.028
0.9	267.60±5.25	0.230±0.023
1.2	271.30±7.60	0.270±0.040

2.2.3 联合稳定剂比例考察 联合稳定剂总质量浓度固定为 0.6 mg/mL, 泊洛沙姆 188-卵磷脂比例分别为 4:1、2:1、1:1、1:2, 按照“2.1”项下方法制备 PTX-BA-NP, 并测定粒径及 PDI, 结果见表 3。随着卵磷脂比例的增加, PTX-BA-NP 粒径降低。当两者比例达到 2:1 时, 粒径显著降低, 继续增加卵磷脂, PTX-BA-NP 的粒径和 PDI 无明显变化。

表 3 稳定剂比例对 PTX-BA-NP 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of ratio of poloxamer 188 to lecithin on particle size and PDI of PTX-BA-NP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

泊洛沙姆 188-卵磷脂比例	粒径/nm	PDI
4:1	328.90±7.76	0.250±0.011
2:1	267.60±5.25	0.230±0.023
1:1	263.50±4.30	0.250±0.014
1:2	252.20±3.20	0.180±0.016

2.2.4 均质压力考察 均质压力分别为 30、50、80、100 MPa, 按照“2.1”项下方法制备 PTX-BA-NP, 并测定剂粒径和 PDI, 结果见表 4。PTX-BA-NP 的粒径随均质压力增大而减小。

2.2.5 均质循环次数 按照“2.1”项下方法, 分别均质 5、10、15、20 个循环, 制备 PTX-BA-NP, 并测定剂粒径和 PDI, 结果见表 5。随着均质循环次数增加, PTX-BA-NP 的粒径逐渐减小。

表 4 均质压力对 PTX-BA-NP 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of pressure on particle size and PDI of PTX-BA-NP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均质压力/MPa	粒径/nm	PDI
30	586.70±37.70	0.227±0.100
50	463.40±13.40	0.220±0.035
80	385.40±5.25	0.230±0.023
100	307.60±6.00	0.270±0.031

表 5 均质循环次数对 PTX-BA-NP 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of cycle times on particle size and PDI of PTX-BA-NP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

循环次数	粒径/nm	PDI
5	444.10±5.37	0.230±0.022
10	354.60±9.54	0.200±0.011
15	307.60±5.25	0.230±0.023
20	273.90±1.94	0.220±0.030

2.3 星点设计-效应面法优化处方

2.3.1 星点设计方案 在单因素实验基础上, 选择对 PTX-BA-NP 制备工艺影响显著的 4 个因素, 即稳定剂质量浓度 (A)、泊洛沙姆 188 和卵磷脂的比例 (B)、均质压力 (C) 及均质循环次数 (D) 为自变量, 以粒径大小 (Y_1) 及 PDI (Y_2) 的综合评分 [归一 (OD) 值] 为评价指标^[24-26], 进行工艺优化。因 Y_1 及 Y_2 属于取值越小越好的因素, 采用 Hassan 法先分对 Y_1 、 Y_2 进行标准化^[27], 即计算 $d_{\min}$ 值 [$d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$], 再计算 OD 值 [$OD = d_{\min}(Y_1) \times \text{权重}(Y_1) + d_{\min}(Y_2) \times \text{权重}(Y_2)$], Y_1 权重、 Y_2 权重均为 0.5。根据 OD 值采用 Box-Behnken 中心组合设计优化, 各自变量的编码水平见表 6, 不同制备工艺条件下粒径、PDI、OD 值的相应变化见表 6。响应面图见图 1。

2.3.2 数学模型拟合及分析 采用 Design-Expert V8.0.6 软件进行数学模型拟合, 对所选的 4 个因素进行二次多项式方程拟合。OD = 0.67 + 0.14 A + 0.078 B + 0.17 C + 0.096 D + 0.085 AB - 0.038 AC + 0.11 AD - 0.051 BC + 0.084 BD + 2.608 × 10⁻³ CD - 0.20 A² - 0.030 B² - 1.389 × 10⁻³ C² + 0.018 D², $r^2 = 0.821$ 0, $P = 0.003$ 7, 具有良好相关性。由表 7 方差分析数据可知, 拟合的 2 项多项式方程中 A、C、D 的一次项 P 值及 A 的 2 次项 P 值均小于 0.05, 表明稳定剂质量浓度、均质压力、循环次数这 3 个因

表 6 Box-Behnken 试验设计方案及响应值

Table 6 Design and response values of Box-Behnken test

试验号	A/(mg·mL ⁻¹)	B	C/MPa	D/次	Y ₁ /nm	Y ₂	OD 值	试验号	A/(mg·mL ⁻¹)	B	C/MPa	D/次	Y ₁ /nm	Y ₂	OD 值
1	0.6 (0)	2 (+1)	75 (0)	10 (-1)	572.20	0.314	0.298	16	0.6	1	50	10	522.60	0.354	0.401
2	0.9 (+1)	2	75	15 (0)	325.40	0.295	0.537	17	0.9	1	100 (+1)	15	366.60	0.282	0.342
3	0.6	1 (0)	75	15	426.60	0.301	0.895	18	0.3	1	100	15	406.50	0.355	0.451
4	0.9	0.5 (-1)	75	15	563.20	0.334	0.652	19	0.6	2	50	15	433.50	0.254	0.653
5	0.9	1	50 (-1)	15	541.30	0.322	0.345	20	0.3	0.5	75	15	496.30	0.421	0.495
6	0.3 (-1)	1	75	20 (+1)	564.30	0.351	0.607	21	0.6	0.5	75	20	437.70	0.224	0.212
7	0.6	2	75	20	326.20	0.237	0.603	22	0.6	2	100	15	276.70	0.258	0.788
8	0.3	2	75	15	608.40	0.331	0.493	23	0.6	1	100	20	295.20	0.255	0.890
9	0.6	1	50	20	508.60	0.302	0.732	24	0.9	1	75	20	396.50	0.297	0.426
10	0.6	0.5	50	15	537.40	0.314	0.594	25	0.6	1	100	10	328.60	0.301	0.380
11	0.6	1	75	15	412.60	0.289	0.729	26	0.3	1	75	10	325.40	0.342	0.781
12	0.6	1	75	15	348.30	0.287	0.015	27	0.6	0.5	100	15	438.50	0.221	0.290
13	0.3	1	50	15	658.70	0.415	0.751	28	0.6	1	75	15	331.80	0.264	0.712
14	0.6	0.5	75	10	523.60	0.311	0.741	29	0.9	1	75	10	433.70	0.324	0.907
15	0.6	1	75	15	439.30	0.298	0.633								

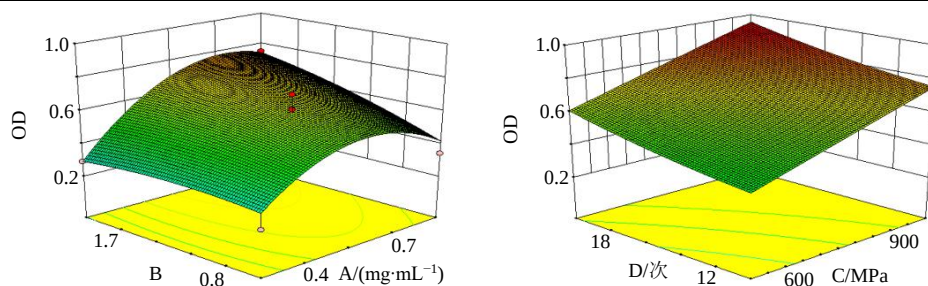


图 1 各因素对 OD 影响的响应面图

Fig. 1 Response surface plots for various factors

表 7 方差分析

Table 7 Analysis of variance

因素	平方和	自由度	平方均值	F 值	P 值	因素	平方和	自由度	平方均值	F 值	P 值
模型	1.120	14	0.080	4.59	0.003 7	BC	0.011	1	0.011	0.64	0.436 8
A	0.210	1	0.210	12.01	0.003 8	BD	0.031	1	0.031	1.74	0.207 8
B	0.073	1	0.073	4.16	0.060 8	CD	2.72×10^{-5}	1	2.72×10^{-5}	1.55×10^{-3}	0.969 1
C	0.300	1	0.300	16.94	0.001 0	A ²	0.260	1	0.260	14.59	0.001 9
D	0.098	1	0.098	5.60	0.032 9	B ²	4.44×10^{-3}	1	4.44×10^{-3}	0.25	0.622 3
AB	0.031	1	0.031	1.76	0.205 9	C ²	1.25×10^{-5}	1	1.25×10^{-5}	7.14×10^{-4}	0.979 1
AC	5.72×10^{-3}	1	5.72×10^{-3}	0.33	0.576 7	D ²	2.15×10^{-3}	1	2.15×10^{-3}	0.12	0.731 6
AD	0.051	1	0.051	2.91	0.110 3						

素对粒径及 PDI 影响较大, 尤其是均质压力。

2.3.3 响应面优化 采用 Design-Expert V8.0.6 软件对方剂进行优化, 软件给出的理论最佳处方工艺条件为稳定剂质量浓度 0.8 mg/mL, 泊洛沙姆 188-卵磷脂比 2 : 1, 均质压力 100 MPa, 均质循环次数

20 次。因稳定剂质量浓度为 0.6、0.8 mg/mL 时, 混合纳米混悬剂粒径及 PDI 差不多, 依据辅料最少原则, 将最佳处方工艺修正为稳定剂质量浓度 0.6 mg/mL, 泊洛沙姆 188-卵磷脂比 2 : 1, 均质压力 100 MPa, 均质循环次数 20 次。

2.3.4 工艺验证 根据优化后的处方工艺制备3批纳米混悬剂,平均粒径为 (282.54 ± 5.40) nm, PDI为 0.242 ± 0.020 ,平均OD值为0.940,与预测值1.03接近,表明该模型预测性良好,可信度高,可用于处方优化。

2.4 冷冻干燥

本实验采用冷冻干燥法固化优化的纳米混悬液,并考察不同冻干保护剂及其用量对于PTX-BA-NP冻干前后粒径和PDI的影响,见表8。结果表明,当以5%甘露醇作为冻干保护剂时,PTX-BA-NP冻干粉的再分散性(redispersibility index, RDI)最小,为103.3%,冻干保护效果最好。故冷冻干燥工艺为向优化的纳米混悬液中加入5%甘露醇,置 -80°C 冰箱中预冻24 h后放入冷冻干燥机中, -30°C 维持36 h, -10°C 维持24 h, 0°C 维持2 h, 25°C 维持2 h,即得冻干粉。

表8 PTX-BA-NP冻干前、后粒径和PDI ($n=3$)

Table 8 Particle size and PDI of PTX-BA-NP before and after freezing ($n=3$)

冻干保护剂	粒径/nm	RDI/%	PDI
冻干前	282.54 ± 5.40	—	0.242 ± 0.020
未加保护剂	344.60 ± 5.03	121.9	0.205 ± 0.027
1%甘露醇	307.00 ± 7.87	108.6	0.155 ± 0.014
5%甘露醇	291.60 ± 3.40	103.3	0.182 ± 0.030
1%海藻糖	340.10 ± 3.44	120.4	0.196 ± 0.017
5%海藻糖	321.30 ± 3.20	113.7	0.153 ± 0.021

2.5 PTX-BA-NP的表征

2.5.1 RDI评价 RDI即冻干后与冻干前纳米粒的粒径之比,是用来评价冻干粉分散程度的指标^[21]。取“2.4”项下制得的冻干粉适量,加纯水超声1 min左右,复溶至同原纳米混悬液相同浓度,平行3份,测定粒径及PDI。结果表明,冻干粉复溶后粒径为 (291.6 ± 3.4) nm, PDI为 0.182 ± 0.030 ,与“2.4”项下冻干前粒径比较, RDI值为103.3%,表明再分散后仍能保持原有的混悬状态。再分散前后粒径分布图见图2。

2.5.2 外观形态 采用透射电镜(TEM)观察PTX-BA-NP的形态。将1滴纳米混悬液滴在铜网上,用2%磷钨酸染色5 min。室温下将铜网晾干,放置透射电镜下观察,结果见图3。由图3可知,PTX-BA-NP粒径为260~300 nm,粒子呈现棒状,大小分布均匀,粒子之间的黏连和聚集现象较少。

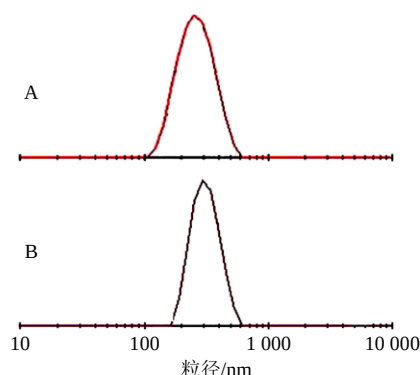


图2 PTX-BA-NP冻干前(A)和冻干后(B)粒度分布
Fig. 2 Particle size distribution of PTX-BA-NP before lyophilization (A) and after lyophilization (B)

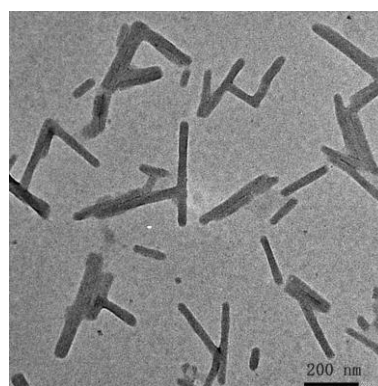


图3 透射电镜照片($\times 50\,000$)
Fig. 3 TEM image ($\times 50\,000$)

2.5.3 稳定性考察 将冷冻干燥后的药物存储至恒温恒湿箱中,在 40°C 和75%的相对湿度下储存1个月,分别于第1、10、20、30天复溶测定粒径及PDI,观察粒径及PDI变化。见表9。

2.5.4 差示扫描量热分析 将PTX原料药、BA原料药、泊洛沙姆188、卵磷脂、甘露醇、PTX-BA-辅料-物理混合物(PTX、BA、泊洛沙姆188、卵磷脂及甘露醇的比例同PTX-BA-NP冻干粉)及PTX-BA-NP冻干粉进行差示扫描量热分析。测定参数:升温速率为 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升温范围为 $35\sim 280^{\circ}\text{C}$,空铝盘作为空白对照,测定载气为氮气,见图4。由图4可知,PTX原料药在 225°C 存在熔融峰,在

表9 稳定性实验结果 ($n=3$)

Table 9 Short time stability study ($n=3$)

t/d	粒径/nm	PDI
1	289.10 ± 2.60	0.205 ± 0.023
10	291.30 ± 2.40	0.214 ± 0.033
20	296.70 ± 3.70	0.227 ± 0.012
30	301.10 ± 2.60	0.225 ± 0.028

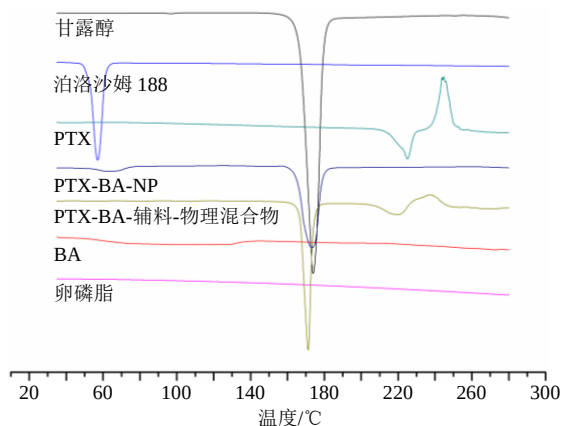


图 4 差示扫描量热图

Fig. 4 Differential scanning calorimetry

245 °C 存在重结晶峰, 表明 PTX 原料药以晶体形式存在; BA 原料药在 35~280 °C 不存在熔融峰; 甘露醇及泊洛沙姆 188 分别在 175 °C 和 57.1 °C 存在熔融峰, 表明其以晶体形式存在; 卵磷脂不存在熔融峰; PTX-BA-辅料-物理混合物中 PTX 在 220 °C 附近存在较小的熔融峰, 在 240 °C 附近存在较小重结晶峰, 表明 PTX-BA-辅料-物理混合物中 PTX 是以晶体形式存在; PTX-BA-NP 冻干粉在 173.5 °C 存在较大吸收峰, 在 63.3 °C 存在微弱吸收峰, 分别为甘露醇及泊洛沙姆 188 的熔融峰, 不存在 PTX 的熔融峰与重结晶峰, 分析原因可能为 PTX 与 BA 制备成纳米混悬剂后, PTX 由晶体形式变为无定形态。DSC 分析初步显示 PTX-BA NP 中的 PTX、BA 以无定形形式存在, 但 DSC 对晶型判断提供的信息有限, 因此还需依据 X 射线衍射数据进行进一步分析。

2.5.5 X-射线衍射分析 将“2.5.4”项下的各样品分别填塞在样品皿中, 使用 Ni-滤波器、Cu 靶 K_{α} 射线、电压 40 kV 和电流 100 mA 的条件, 在 5°~50° 以内以每步 0.02° 进行扫描, 见图 5。PTX 在 5.51°、8.87°、10.01°、12.22° 有衍射峰, 说明其是晶体结构; BA 在 5.55°、9.07°、13.00°、13.33°、14.24°、15.11°、18.77° 有衍射峰, 说明其是晶体结构; 在物理混合物中, BA 及 PTX 晶体特征仍存在, 但在纳米混悬剂中, PTX 及 BA 晶体衍射峰消失, 均以无定形态存在, 分析原因为 PTX 与 BA 在制备成纳米混悬剂后, 均由晶体形态变为无定形态。X-衍射分析结果进一步验证了 DSC 结果。

2.6 溶解度及体外溶出

2.6.1 对照品溶液制备 精密称取 PTX 对照品 2

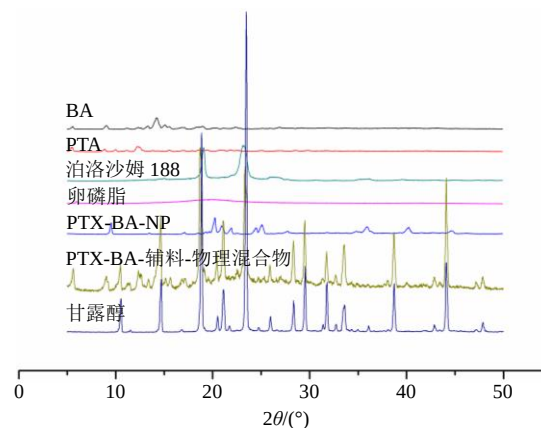


图 5 X-射线衍射

Fig. 5 X-ray diffraction patterns

mg, BA 对照品 1.34 mg, 加甲醇溶解, 并定容至 10 mL 量瓶中, 混匀, 即得 PTX 与 BA 的混合对照品储备液。

2.6.2 色谱条件及系统适应性条件 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液 (75 : 25); 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 227 nm (PTX), 201 nm (BA); 柱温 35 °C; 进样量 10 μL; 理论塔板数以 PTX 峰计算不低于 4 000。

2.6.3 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液适量, 按比例将其稀释成一定的倍数, 精密吸取上述浓度梯度溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录 PTX 及 BA 峰面积积分值, 分别以质量浓度为横坐标 (X), 其峰面积积分值为纵坐标 (Y), 绘制 PTX 与 BA 的标准曲线。结果显示, PTX 在 3.273~209.5 μg/mL 线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=20\,494X-762$, $r^2=0.999\,9$; BA 在 2.122~135.8 μg/mL 线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=5\,125.8X+1\,274$, $r^2=0.998\,1$ 。

2.6.4 精密度实验 取一定质量浓度的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录 PTX 和 BA 峰面积, 计算精密度, RSD 分别为 0.39% 和 1.04%。

2.6.5 重复性实验 取同一批冻干粉, 用适量甲醇溶解, 平行制备 6 份供试品溶液, 进样 10 μL, 记录 PTX 和 BA 的峰面积, 计算二者质量分数, 其 RSD 分别为 0.26% 和 1.51%。

2.6.6 稳定性实验 取制备所得的供试品溶液分别于 0、2、4、8、12 h 进样, 记录 PTX 和 BA 峰面积, 计算含量, 其 RSD 为 0.65% 和 1.43%。

2.6.7 溶解度 将过量 PTX 原料药、BA 原料药、PTX-BA-NP 分别加至纯水中, 室温 (25 °C) 下以

100 r/min 的频率连续振摇。为避免稳定剂对 PTX 和 BA 增溶作用的影响,另设配以与纳米冻干粉相同种类及稳定剂比例的 PTX-BA 原料组,PTX 和 BA 质量比为 1:1。同法操作。平衡 72 h 后,取各饱和溶液 3 mL,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,吸取续滤液,按照“2.6.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算饱和溶解度。

由表 10 中数据可知,PTX 和 BA 原料药饱和溶解度均较低,加入一定的辅料后,PTX 溶解度增加约 5 倍,BA 溶解度增加约 7 倍,辅料的增溶作用有限。PTX 和 BA 制备成纳米冻干粉后,水中溶解度显著提高,纳米制剂中 PTX 溶解度提高约 90 倍,BA 溶解度提高约 100 倍。

表 10 溶解度测试结果 ($n=3$)
Table 10 Results of solubility test ($n=3$)

类型	PTX 溶解度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	BA 溶解度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
PTX 原料药	0.107 ± 0.025	—
BA 原料药	—	0.040 ± 0.017
PTX-BA 原料药+辅料	0.502 ± 0.059	0.289 ± 0.031
PTX-BA-NP	11.256 ± 0.718	3.645 ± 0.285

2.6.8 体外溶出 精密称取 PTX 原料药、BA 原料药、PTX-BA-NP 冻干粉 (相当于 PTX 15 mg),按《中国药典》2015 年版附录四部通则 0931 第二法有关规定进行测定。溶出介质为含 0.1% 聚山梨酯-80 的 pH 7.4 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, 200 mL),温度为 $(37.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$,转速为 75 r/min。分别于 5、10、15、30、60、120 min 时取样 1 mL (随即补足同温等量的溶出介质),14 000 r/min 离心 10 min,取上清液照“2.6.2”项下色谱条件进行测定,分别计算不同时间的累积溶出率,绘制溶出曲线,结果见图 6。与 PTX 及 BA 原料对比,PTX-BA 纳米混悬剂累积溶出率明显提高。在 2 h 内,PTX-BA 纳米混悬剂中 PTX 和 BA 累积溶出率大于 95%,而 PTX 及 BA 原料药累积溶出率均小于 20%。

3 讨论

为了制备稳定的纳米混悬剂,克服纳米粒子间的相互吸引及减少粒子之间相互碰撞机会,通常使用适量的稳定剂来抑制纳米粒子的成长^[28-29],因此筛选合适的稳定剂至关重要。稳定剂分为非离子型表面活性剂 (如聚山梨酯-80、泊洛沙姆 P188、泊洛沙姆 P407) 和两亲性表面活性剂 (如卵磷脂)。

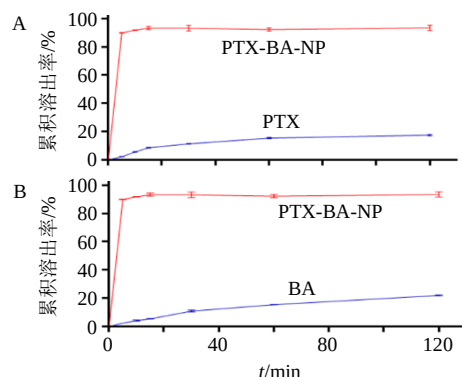


图 6 PTX (A) 和 BA (B) 的体外溶出曲线 ($n=3$)

Fig. 6 Dissolution curves of PTX (A) and BA (B) *in vitro* ($n=3$)

非离子型表面活性剂主要通过空间位阻效应防止纳米粒聚集沉降,离子型表面活性剂主要以静电斥力阻碍纳米粒子聚集沉降^[30]。实验中将泊洛沙姆 P188 与卵磷脂联用,卵磷脂可吸附于纳米混悬剂表面,为纳米粒子提供电荷,使纳米粒子之间由于电荷斥力而维持稳定;泊洛沙姆 P188 在纳米粒子表面吸附,其高分子链具有一定的舒展性,可在空间上阻碍纳米粒子间彼此靠近,两种稳定剂共同维持纳米混悬剂的稳定。

依据 Ostwald-Freundlich 方程,粒径减小至微米甚至纳米级时,由于粒径小、比表面积大,药物的饱和溶解度与溶出速率均会显著增大^[17]。本研究得到的 PTX-BA-NP,粒径较小,均一稳定,冷冻干燥后再复溶性良好。PTX 和 BA 制备成纳米混悬剂后,其饱和溶解度明显增大,从而体外溶出速率提高,在 2 h 内,PTX 和 BA 累积溶出率分别为 PTX 原料药和 BA 原料药中的 6.13 和 4.18 倍,表明纳米混悬剂可以显著改善 PTX 及 BA 体外溶出速率。

参考文献

- [1] 唐宝强,余荧蓝,涂家生,等.联合用药进行抗肿瘤治疗的研究进展 [J]. 药学研究, 2017, 36(10): 592-595.
- [2] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *et al.* The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [3] Pei B X, Sun Y S, Dong S H, *et al.* Curative effect of Abrax-ane in patients with Non-small-cell lung cancer and breast cancer [J]. *Chin Pharm J*, 2011, 46(23): 1851-1854.
- [4] 高 仑,孙秀娥.克唑替尼联合紫杉醇和顺铂治疗 ALK 阳性非小细胞肺癌的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(12): 1994-1998.

- [5] 桑秀丽, 刘国燕. 西黄丸联合紫杉醇和铂类新辅助化疗对晚期宫颈癌患者术后疗效的影响 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(8): 1112-1116.
- [6] 王 宏, 郭晓远, 吴国建, 等. 汉防己甲素联合紫杉醇逆转脑胶质瘤 C6/MDR 细胞耐药及其机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2584-2590.
- [7] 赵明月, 张艳华. 2014—2016 年北京大学肿瘤医院紫杉醇治疗乳腺癌的不良反应分析 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(3): 536-539.
- [8] 杨爱峰. 替吉奥、顺铂联合紫杉醇对进展期胃癌的疗效和安全性研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(4): 549-552.
- [9] 喻经纬, 鲁智豪, 高 静, 等. 紫杉醇耐药机制研究进展及研究方向 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(14): 1147-1150.
- [10] 陈 娜, 张祎捷, 韩纪昌, 等. ZS1 肽修饰共载紫杉醇和姜黄素脂质体的构建及其体外靶向性和毒性 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(8): 754-757.
- [11] 高 鹏, 涂家生. 聚氧乙烯蓖麻油及其安全性研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2010, 18(1): 59-63.
- [12] 陈 子, 吴秋玲, 陈 燕, 等. 白桦脂酸对人 Raji 淋巴瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 556-559.
- [13] Fulda S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention [J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9(6): 1096-1107.
- [14] Zuco V, Supino R, Righetti S C, *et al*. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 175(1): 17-25.
- [15] Fulda S, Debatin K M. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid [J]. *Neoplasia*, 2005, 7: 162-170.
- [16] Jäger S, Winkler K, Pfüller U, *et al*. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. [J]. *Planta Med*, 2007, 73(2): 157-162.
- [17] Rabinow B E. Nanosuspensions in drug delivery [J]. *Nat Rev*, 2004, 3(9): 785-796.
- [18] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [19] Sudhakar B, NagaJyothi K, Murthy K V. Nanosuspensions as a versatile carrier based drug delivery system—An overview [J]. *Curr Drug Deliv*, 2014, 11(3): 299-305.
- [20] Kreuter J, Petrov V, Kharkevich D, *et al*. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant coated nanoparticles [J]. *Control Release*, 1997, 49(1): 81-87.
- [21] Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, *et al*. Selective delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle carrier system [J]. *J Drug Target*, 1999, 7(3): 171-186.
- [22] Maeda H, Maeda J, Sawa T, *et al*. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review [J]. *J Control Release*, 2000, 65(1/2): 271-284.
- [23] Wang Y, Li X, Wang L, *et al*. Formulation and pharmacokinetic evaluation of a paclitaxel nanosuspension for intravenous delivery [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6: 1497-1507.
- [24] 罗开沛, 李小芳, 杨 露, 等. 水飞蓟素纳米混悬剂的制备及体外溶出 [J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(9): 1165-1170.
- [25] 吴超群, 李小芳, 严敏嘉, 等. 甘草黄酮纳米混悬剂的制备及其体外溶出率 [J]. 中成药, 2017, 39(11): 2279-2284.
- [26] 张文君, 吴 凡, 王 鑫, 等. 星点设计-效应面法优化藤黄酸纳米混悬剂处方 [J]. 中国药剂学杂志, 2014, 12(2): 43-52.
- [27] 吴 伟, 崔光华, 陆 彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(8): 26-29.
- [28] Csuk R. Betulinic acid and its derivatives: A patent review (2008—2013) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2014, 24(8): 913-923.
- [29] 陈 莉, 汤 恣, 陆伟根. 纳米混悬剂粒径稳定性及其控制策略 [J]. 世界临床药物, 2010, 31(4): 245-249.
- [30] Wang Y C, Zheng Y, Zhang L, *et al*. Stability of nanosuspensions in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2013, 172(3): 1126-1141.