

• 药剂与工艺 •

星点设计-效应面法优化姜黄素-胡椒碱聚合物复方胶束的处方工艺研究

梁宇飞, 张欣欣, 许洁, 赵丽艳, 李亚鑫, 张万明*, 张丹参

河北北方学院 药理学系, 河北省神经药理学重点实验室, 河北 张家口 075000

摘要:目的 通过星点设计-效应面法优化姜黄素-胡椒碱聚合物复方胶束 (Cur/Pip F127/P123-PM) 的处方工艺。方法 UPLC 法测定姜黄素和胡椒碱的含量。采用薄膜水化法制备 Cur/Pip F127/P123-PM, 在单因素实验的基础上, 以投药量、F127 所占质量比和水化体积为自变量, 以姜黄素载药量和包封率、胡椒碱包封率以及胶束粒径为因变量, 进行 3 因素 5 水平的星点-设计效应面法实验, 分析结果得出最优处方并对其进行验证。最后对胶束制剂的最佳冻干条件进行初步筛选。**结果** 优化得到的 Cur/Pip F127/P123-PM 最佳处方工艺: 姜黄素与胡椒碱的投药量分别为 12.96 mg 和 0.69 mg、F127 的质量比为 0.46、水化体积为 8.85 mL。采用最优处方制得的复方姜黄素胶束制剂对姜黄素的载药量为 5.63%、溶解度为 1.27 mg/mL、包封率为 86.86%; 对胡椒碱的包封率为 77.54%; 胶束制剂平均粒径为 66.79 nm; Zeta 电位接近于 0。以 8%甘露醇为保护剂制得的冻干制剂复溶效果较好。**结论** 星点设计-效应面法所建立的模型能较好地用于复方姜黄素胶束制剂的处方优化, 精度高, 预测性好。

关键词: 姜黄素; 胡椒碱; 普郎尼克; 胶束; UPLC; 薄膜水化法; 星点设计-效应面法; 聚合物

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)01-0043-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.008

Optimization of prescription process of curcumin-piperine polymeric micelles by central composite design-response surface method

LIANG Yu-fei, ZHANG Xin-xin, XU Jie, ZHAO Li-yan, LI Ya-xin, ZHANG Wan-ming, ZHANG Dan-shen

Hebei Key Laboratory of Neuropharmacology, College of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Objective To optimize the prescription process of curcumin-piperine polymeric compound micelles (Cur/Pip F127/P123-PM) by central composite design-response surface method. **Methods** The content of curcumin and piperine was determined by UPLC. The Cur/Pip F127/P123-PM was prepared by thin film hydration method. Based on the single factor test, the dosage, the mass ratio of F127 and the volume of water were used as independent variables, and the drug loading and entrapment efficiency of curcumin, entrapment efficiency of piperine and the micelle size were dependent variables, and next central composite design-response surface method of three factors and five levels was carried out. The analysis results showed and verified the optimal prescription. Finally, the optimal lyophilization conditions of the micelle preparation were initially screened. **Results** The optimal preparation process was as follow: the dosage of curcumin and piperine was 12.96 mg and 0.69 mg, respectively; The mass ratio of F127 was 0.46, and the volume of water was 8.85 mL. The compound curcumin micelles prepared by the optimum formulation had the loading capacity of 5.63%, solubility of 1.27 mg/mL and entrapment rate of curcumin was 86.86%. The entrapment rate of piperine was 77.54%; The micelle size was 66.79 nm and the Zeta potential was close to zero. The lyophilized products prepared by using 8% mannitol as a protective agent had a good redispersion. **Conclusion** The model established by central composite design-response surface method can be used to optimize the prescription of compound curcumin micelles, and the method had a high accuracy and good predictability advantage.

收稿日期: 2019-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81274005); 河北省研究生创新项目 (CXZZSS2019149); 河北省中医药管理局项目 (2017212)

作者简介: 梁宇飞, 在读硕士研究生, 从事药物分析、药剂学研究。Tel: 18812038121 E-mail: 652263260@qq.com

*通信作者 张万明, 教授, 硕士生导师, 从事药物分析、药剂学研究。Tel: 18931316077 E-mail: zwm19650228@163.com

Key words: curcumin; piperine; Pluronic; micelles; UPLC; thin film hydration; central composite design-response surface method; polymer

姜黄素 (curcumin, Cur) 为一种提取于天然植物的酚类物质, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗纤维化等药理作用^[1-10], 且因其资源丰富, 价格低廉, 毒副作用小, 而极具开发应用前景。但 Cur 溶解度低、稳定性差、体内代谢和排泄迅速^[11-13], 大大限制了其临床应用。胡椒碱 (piperine, Pip) 来源于天然植物胡椒, 具有良好的安全性, 可抑制多种药物代谢和转运酶的活性^[14-16], 从而提高一些治疗药物和植物化学物质的生物利用度。当其与 Cur 以一定比例联用时, 不仅可通过与 Cur 的烯醇质子形成分子间氢键来抑制 Cur 的堆叠倾向从而增加其溶解度, 而且其双键共轭网络和多电荷中心提供了与许多酶 (UDP-GDH、CYP3A4、UGT 等) 结合的最佳结合位点, 从而抑制引起 Cur 代谢、排泄的酶, 增加其生物利用度^[17], 增强疗效^[18-22]。姜黄素-胡椒碱固体分散体 (Cur-Pip SD) 有效地改善了 Cur 和 Pip 的体外溶出度以及生物利用度^[23]。

聚合物胶束 (polymeric micelles, PM) 是由两亲性聚合物在水性介质中自组装形成的纳米级壳核结构, 其疏水性内核装载药物, 具有增加药物的溶解度、缓释药物、降低药物被网状内皮系统识别和摄取的概率^[24-26]等优点。本研究选用三嵌段共聚物普朗尼克 (Pluronic) 为载体材料, 它由两端的亲水链聚氧化乙烯 (PEO) 和中间的疏水链聚氧化丙烯 (PPO) 构成, 具有毒性低、免疫原性弱及生物相容性好的优点。应用此类材料制备的载药胶束粒径通常小于 100 nm, 因此能增强被装载药物在病灶组织的滞留蓄积^[27]。此外, 普朗尼克还能通过抑制 P 糖蛋白等机制逆转肿瘤细胞的多药耐药性^[28]。因此选用普朗尼克为载体材料装载 Cur 与 Pip, 制备姜黄素-胡椒碱聚合物复方胶束 (Cur/Pip F127/P123-PM), 通过聚合物胶束与 Pip 的双重作用提高 Cur 的溶解度与生物利用度, 从而更好地发挥 Cur 的药理作用。本研究使用的星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 是一种集数学与统计为一体的实验设计和优化方法, 与正交设计、均匀设计相比, 其精度更高, 预测性更好, 可用于非线性模型的拟合, 近年来已被广泛用于处方筛选和工艺优化。本研究以 Cur 包封率和载药量、Pip 包封率以及胶束平均粒径为评价指标, 考察处方中主要因素对制剂的影响, 预测

最优处方。

1 材料

1.1 仪器

Acquity UPLC 色谱仪, 包括四元高压泵系统, 自动进样器, 在线脱气系统, PDA 检测器, Empower 3.0 化学工作站, 美国 Waters 公司; JPCQ1028 型数控超声波清洗机, 武汉嘉鹏电子科技有限公司; Standby Sartorius ME/SE 系列微量电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; Milli-Q 纯水系统, 美国 Millipore 公司; HJ-4D 数显恒温测速磁力加热搅拌器, 江苏省金坛市友联仪器研究所; GAOKE 旋转蒸发仪, 巩义市英峪高科仪器厂; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; DZF-6020 型真空干燥箱, 宁波江南仪器厂; SHA-B 水浴恒温振荡器, 常州市国旺仪器制造有限公司; Sigma4-15 低温冷冻离心机, Sigma 公司; Zetasizer Nano Series 纳米粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; Modul Yod-230 真空冷冻干燥仪, Thermo Fisher 公司; H-7650 透射电子显微镜, 日本日立公司。

1.2 试药

对照品 Cur (批号 110823-201706, 质量分数 98.7%)、Pip (批号 110775-201706, 质量分数 98.9%), 中国食品药品检定研究院; Cur, 批号 RS19B301, 质量分数 98.0%, 上海瑞永生物科技有限公司; Pip (批号 I1720085, 质量分数 97.0%), Aladdin 公司; P123 (批号 MKBQ0305V)、F127 (批号 SLBL1780V), Sigma 公司; 甘露醇, Amresco 公司; 乙腈, 色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂; 甲醇、二氯甲烷、丙酮、无水乙醇为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 Cur/Pip F127/P123-PM 与 F127/P123-PM 的制备

分别称取一定量 Cur、Pip、F127、P123 于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入适量有机溶剂, 搅拌溶解 (1 000 r/min, 5 min), 40 °C 旋转蒸发并真空干燥过夜以挥干有机溶剂并形成干燥药膜, 后加入适量超纯水, 恒温震荡 1 h (37 °C, 100 r/min), 4 500 r/min 离心 15 min 后取上清, 即为复方胶束制剂 Cur/Pip F127/P123-PM。

空白胶束 (F127/P123-PM) 为不加 Cur 与 Pip, 其余同 Cur/Pip F127/P123-PM 的制备过程。

2.2 色谱条件

采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 检测波长: 430 nm (Cur)、343 nm (Pip); 流动相为乙腈; 体积流量 0.15 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 1 μL。在该条件下理论塔板数大于 3 000, 分离度大于 1.5。

2.3 Cur 载药量、包封率以及 Pip 包封率的测定

精密量取 Cur/Pip F127/P123-PM 溶液 0.2 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 氮吹去除水分, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 Cur/Pip F127/P123-PM 供试品溶液。按“2.2”项下色谱条件进样分析, 色谱图见图 1, Cur 与 Pip 2 峰的分度度 (*R*) 大于 1.5, 空白胶束在 Cur 及 Pip 处无干扰, 专属性良好。将所得峰面积带入线性方程计算 Cur/Pip F127/P123-PM 中 Cur 与 Pip 的含量。

Cur 载药量 = 胶束中 Cur 含量 / (胶束中 Cur 含量 + 载体材料量)

Cur 包封率 = 胶束中 Cur 含量 / 投入 Cur 的量

Pip 包封率 = 胶束中 Pip 含量 / 投入 Pip 的量

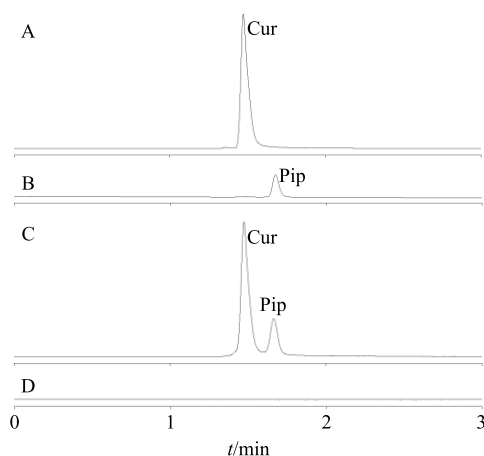


图 1 Cur 对照品 (A)、Pip 对照品 (B)、Cur/Pip F127/P123-PM (C) 样品和空白胶束 (D) 的典型 UPLC 图

Fig. 1 Typical UPLC of Cur reference substance (A), Pip reference substance (B), Cur/Pip F127/P123-PM sample (C), and blank micelles (D)

2.4 单因素考察

2.4.1 F127 与 P123 的比例 固定载体材料的应用总量为 200 mg; Cur 与 Pip 的投药量分别为 15.00、0.75 mg; 有机溶剂种类为二氯甲烷, 有机溶剂与水化体积均为 5 mL, 其他条件同“2.1”项下, 考察 F127 占载体材料的质量比分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、

0.9 时对 Cur 包封率和载药量的影响。结果显示, 随着 F127 比例的增大, Cur 的载药量和包封率均呈现先缓慢增加后降低趋势。将 0.1~0.9 的 F127 质量比作为待优化项进行星点设计-效应面法实验。

2.4.2 投药量 固定载体材料 F127 与 P123 均为 100 mg; 有机溶剂种类为二氯甲烷; 有机溶剂与水化体积均为 5 mL, 其他条件同“2.1”项下, 考察 Cur 与 Pip 的投药量分别为 5.00、0.25 mg, 10.00、0.50 mg, 15.00、0.75 mg, 20.00、1.00 mg, 25.00、1.25 mg 时对 Cur 包封率和载药量的影响。结果显示, 随着投药量增加, Cur 包封率逐渐降低, 载药量先升高后降低, 将该范围的投药量设为待优化项进行星点设计-效应面法实验。

2.4.3 有机溶剂种类 固定载体材料 F127 与 P123 均为 100 mg; Cur 和 Pip 投药量分别为 15.00、0.75 mg; 有机溶剂与水化体积均为 5 mL, 其他条件同“2.1”项下, 考察有机溶剂分别为甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、丙酮时对 Cur 包封率和载药量影响。结果显示, 使用丙酮为有机溶剂时, Cur 的包封率与载药量最高, 因此选用丙酮进行后续星点设计-效应面法实验。

2.4.4 有机溶剂用量 固定载体材料 F127 与 P123 均为 100 mg; Cur 和 Pip 投药量分别为 15.00、0.75 mg; 有机溶剂种类为丙酮; 水化体积为 5 mL, 其他条件同“2.1”项下, 考察有机溶剂体积分别为 5、10、15、20、25 mL 时对 Cur 包封率和载药量的影响。结果显示, 有机溶剂用量对 Cur 的包封率和载药量的影响均不明显。因此固定有机溶剂用量为 5 mL 进行星点设计-效应面法实验。

2.4.5 水化体积 固定载体材料 F127 与 P123 均为 100 mg; Cur 和 Pip 投药量分别为 15.00、0.75 mg; 有机溶剂种类为丙酮; 有机溶剂用量为 5 mL, 其他条件同“2.1”项下, 考察水化体积分别为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mL 时对 Cur 包封率和载药量的影响。结果显示, 随着水化体积增大, Cur 的载药量和包封率均先增加后降低。将 2.5~12.5 mL 的水化体积作为待优化项进行星点设计-效应面法实验。

2.5 星点设计-效应面法优化处方

以单因素实验结果为依据, 进一步采用星点设计-效应面法优化制剂工艺。选取投药量 (*X*₁)、F127 所占质量比 (*X*₂)、水化体积 (*X*₃) 3 个因素, 每因素设 5 个水平 (代码值分别为 -1.732、-1、0、+1、+1.732)。以 Cur 载药量 (*Y*₁)、Cur 包封率 (*Y*₂)、

Pip 包封率 (Y_3) 以及胶束粒径 (Y_4) 为考察指标进行 3 因素, 5 水平的星点设计-效应面法实验, 代码值所代表的实际物理量及实验安排和结果见表 1。

利用 Design-Expert 10.0.3 统计软件对表 1 数据进行统计处理, 并获得 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 值对自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的多元线性回归方程、2 项式拟合方程以及 3 项式拟合方程。通过比较 3 种拟合方程的 P 值与相关系数 (R^2) 发现各考察指标与因素之间均为 2 项式方程的拟合效果最好, 各考察指标的 2 项式拟合方程如下: $Y_1=6.01+1.58 X_1-1.56 X_2+0.20$

$X_3-2.59 X_1X_2+0.28 X_1X_3+0.22 X_2X_3-3.45 X_1^2-1.88 X_2^2-0.99 X_3^2$, $P<0.000 1$, $r^2=0.969 5$; $Y_2=83.45-14.07 X_1-20.49 X_2+7.08 X_3-37.08 X_1X_2-0.48 X_1X_3-0.48 X_2X_3-15.78 X_1^2-24.23 X_2^2-8.41 X_3^2$, $P<0.000 1$, $r^2=0.935 5$; $Y_3=80.16-5.51 X_1-0.33 X_2+1.49 X_3-3.37 X_1X_2+1.69 X_1X_3+4.16 X_2X_3-21.63 X_1^2-27.92 X_2^2-21.16 X_3^2$, $P=0.011 2$, $r^2=0.811 6$; $Y_4=65.22+13.41 X_1-13.17 X_2+3.82 X_3-25.26 X_1X_2+11.64 X_1X_3+15.10 X_2X_3+1.12 X_1^2-6.38 X_2^2-14.64 X_3^2$, $P=0.001 1$, $r^2=0.886 4$ 。

表 1 Cur/Pip F127/P123-PM 制备工艺星点设计安排及结果

Table 1 Central composite design and results of preparation technology of Cur/Pip F127/P123-PM

试验号	X_1/mg	X_2	X_3/mL	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	Y_4/nm
1	9.23 (-1)	0.27 (-1)	4.61 (-1)	2.98	71.25	54.58	56.50
2	20.77 (+1)	0.27 (-1)	4.61 (-1)	6.61	77.23	51.14	78.37
3	9.23 (-1)	0.73 (+1)	4.61 (-1)	2.41	72.93	57.15	50.50
4	20.77 (+1)	0.73 (+1)	4.61 (-1)	2.74	32.22	44.55	43.94
5	9.23 (-1)	0.27 (-1)	10.39 (+1)	2.84	75.88	53.27	41.31
6	20.77 (+1)	0.27 (-1)	10.39 (+1)	6.99	83.73	47.40	83.80
7	9.23 (-1)	0.73 (+1)	10.39 (+1)	2.70	76.50	56.69	60.48
8	20.77 (+1)	0.73 (+1)	10.39 (+1)	3.26	32.62	51.02	64.34
9	5.00 (-1.732)	0.50 (0)	7.50 (0)	1.51	82.84	69.65	51.10
10	25.00 (+1.732)	0.50 (0)	7.50 (0)	3.89	58.04	59.88	78.06
11	15.00 (0)	0.10 (-1.732)	7.50 (0)	5.50	82.58	60.06	75.97
12	15.00 (0)	0.90 (+1.732)	7.50 (0)	3.03	41.35	56.80	38.23
13	15.00 (0)	0.50 (0)	2.50 (-1.732)	5.00	65.64	62.06	45.86
14	15.00 (0)	0.50 (0)	12.50 (+1.732)	5.31	90.00	68.45	51.78
15	15.00 (0)	0.50 (0)	7.50 (0)	5.37	74.60	71.48	56.00
16	15.00 (0)	0.50 (0)	7.50 (0)	5.97	89.90	78.54	66.18
17	15.00 (0)	0.50 (0)	7.50 (0)	6.35	91.35	81.02	58.67
18	15.00 (0)	0.50 (0)	7.50 (0)	5.77	84.31	87.10	70.06
19	15.00 (0)	0.50 (0)	7.50 (0)	6.20	81.53	85.23	73.69
20	15.00 (0)	0.50 (0)	7.50 (0)	6.43	79.05	77.69	66.68

各方程的方差分析结果见表 2、3。以 $P<0.05$ 为有显著性差异, 则 4 个模型均具有显著性差异, 能较好反映因素对响应值的影响。进一步分析各方程中的各项, X_1 、 X_2 、 X_1X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y_1 有显著性影响; X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 对 Y_2 有显著性影响; X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y_3 有显著性影响; X_1 、 X_2 、 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_3^2 对 Y_4 有显著性影响。

利用 Design-Expert 10.0.3 软件的 Analysis 模块绘制因素间交互作用有显著性差异的因素对考察指标: 即 X_1 、 X_2 对 Y_1 ; X_1 、 X_2 对 Y_2 ; X_1 、 X_2 对 Y_4 ;

X_2 、 X_3 对 Y_4 的三维效应面图和等高线图 (另 1 因素设为中心值), 结果见图 2。

综合考虑胶束制剂的考察因素和图 2 给出的最优区域, 限制考察指标 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 为尽量大, Y_4 为尽量小, 继续应用 Design-Expert 10.0.3 软件的 Optimization 模块叠加各模型所得的最佳条件范围得到最终的最优处方: Cur 与 Pip 的投药量分别为 12.96 mg 和 0.69 mg、F127 的质量比为 0.46、水化体积为 8.85 mL。预测在此条件下制备的 Cur/Pip F127/P123-PM 的 Cur 载药量与包封率分别为

表 2 Cur 载药量和包封率回归模型方差分析

Table 2 Variance analysis for regression model on loading capacity and entrapment rate of Cur

变异来源	自由度	Cur 载药量				Cur 包封率			
		平方和	均方	F 值	P 值	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	53.966	5.996	31.455	<0.000 1	5 665.532	629.504	16.117	<0.000 1
X_1	1	11.683	11.683	61.291	<0.000 1	923.866	923.866	23.653	0.000 7
X_2	1	11.315	11.315	59.360	<0.000 1	1 950.418	1 950.418	49.934	<0.000 1
X_3	1	0.179	0.179	0.941	0.355 0	234.215	234.215	5.996	0.034 3
X_1X_2	1	5.930	5.930	31.110	0.000 2	1 210.744	1 210.744	30.997	0.000 2
X_1X_3	1	0.071	0.071	0.372	0.555 8	0.208	0.208	5.316×10^{-3}	0.943 3
X_2X_3	1	0.041	0.041	0.215	0.652 7	6.390	6.390	0.164	0.694 4
X_1^2	1	20.763	20.763	108.921	<0.000 1	435.379	435.379	11.147	0.007 5
X_2^2	1	6.165	6.165	32.340	0.000 2	1 024.692	1 024.692	26.234	0.000 4
X_3^2	1	1.720	1.720	9.021	0.013 3	123.776	123.776	3.169	0.105 4
残差	10	1.906	0.191			390.596	39.060		
失拟项	5	1.110	0.222	1.393	0.362 6	184.475	36.895	0.895	0.547 0
纯误差	5	0.798	0.159			206.121	41.224		
总和	19	55.872				6 056.128			

表 3 Pip 包封率和胶束粒径回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis for regression model on entrapment rate of Pip and size of micelles

变异来源	自由度	Pip 包封率				胶束粒径			
		平方和	均方	F 值	P 值	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	2 563.440	284.827	4.786	0.011 2	3 028.886	336.543	8.668	0.001 1
X_1	1	141.494	141.494	2.377	0.154 1	838.610	838.610	21.600	0.000 9
X_2	1	0.503	0.503	8.448×10^{-3}	0.928 6	805.247	805.247	20.741	0.001 1
X_3	1	10.308	10.308	0.173	0.686 1	68.064	68.064	1.753	0.214 9
X_1X_2	1	10.027	10.027	0.168	0.690 1	562.097	562.097	14.478	0.003 5
X_1X_3	1	2.537	2.537	0.043	0.840 6	120.517	120.517	3.104	0.108 6
X_2X_3	1	15.313	15.313	0.257	0.623 0	201.482	201.482	5.190	0.045 9
X_1^2	1	818.421	818.421	13.751	0.004 1	2.175	2.175	0.056	0.817 7
X_2^2	1	1 360.401	1 360.401	22.857	0.000 7	70.949	70.949	1.827	0.206 2
X_3^2	1	784.134	784.134	13.175	0.004 6	375.167	375.167	9.663	0.011 1
残差	10	595.171	59.517			388.240	38.824		
失拟项	5	436.497	87.299	2.751	0.145 5	162.109	32.422	0.717	0.638 1
纯误差	5	158.674	31.735			226.130	45.226		
总和	19	3 158.612				3 417.126			

5.59%、88.03%，Pip 包封率为 78.78%，平均粒径为 62.17 nm。

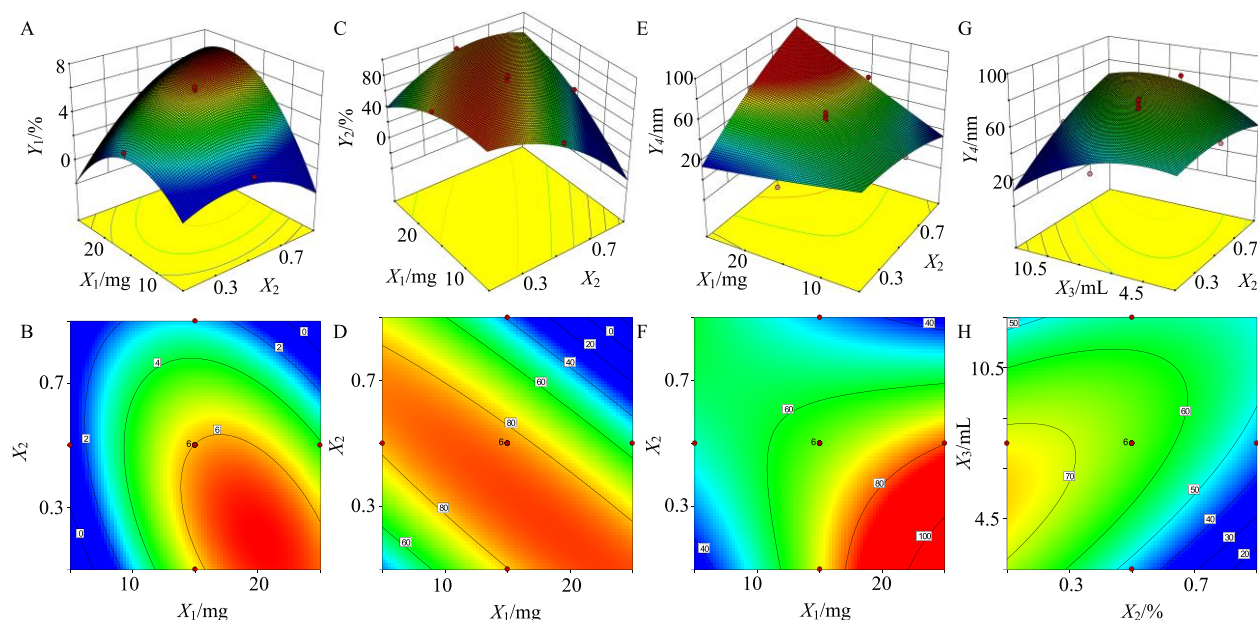
2.6 最优处方的验证试验

以上述最优处方条件制备 3 批 Cur/Pip F127/P123-PM，测定 Cur 载药量、包封率，Pip 包封率以及胶束粒径，结果见表 4。Cur 平均载药量为 5.63%、平均包封率为 86.86%、Pip 平均包封率为 77.54%、

胶束平均粒径为 66.79 nm，实测值与预测值的误差均小于 5%，实验预测性较好，且 5 个考察指标的 RSD 值均较小，工艺重现性较好。

2.7 冻干制剂的制备

按最优处方制备胶束制剂，分装于 5 mL 西林瓶中，每瓶 1 mL，分别向胶束制剂中加入 1%、2%、4%、8%、16%甘露醇，空白组不加保护剂。通过冷



A- X_1 、 X_2 对 Y_1 的效应面图 B- X_1 、 X_2 对 Y_1 的等高线图 C- X_1 、 X_2 对 Y_2 的效应面图 D- X_1 、 X_2 对 Y_2 的等高线图 E- X_1 、 X_2 对 Y_4 的效应面图 F- X_1 、 X_2 对 Y_4 的等高线图 G- X_2 、 X_3 对 Y_4 的效应面图 H- X_2 、 X_3 对 Y_4 的等高线图
A-response surface of X_1 and X_2 on Y_1 B-contour plots of X_1 and X_2 on Y_1 C-response surface of X_1 and X_2 on Y_2 D-contour plots of X_1 and X_2 on Y_2
E-response surface of X_1 and X_2 on Y_4 F-contour plots of X_1 and X_2 on Y_4 G-response surface of X_2 and X_3 on Y_4 H-contour plots of X_2 and X_3 on Y_4

图 2 因素对考察指标的效应面和等高线图

Fig. 2 Effects of factors on response surface and contour plots of each evaluation index

表 4 最优处方的验证试验

Table 4 Three batches samples for verification of optimized formulation

试验号	Cur 载药量/%	Cur 包封率/%	Cur 质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	Pip 包封率/%	粒径/nm
1	5.39	83.17	1.22	79.59	65.01
2	5.81	89.65	1.31	77.43	64.73
3	5.69	87.76	1.29	75.59	70.64
平均	5.63±0.22	86.86±3.33	1.27±0.05	77.54±2.00	66.79±3.33
RSD/%	1.28	1.28	1.24	0.86	1.66

冻干燥法制备冻干制剂,观察各组制剂的冻干效果,将所得冻干制剂保存于 4℃,30 d 后加入 1 mL 去离子水复溶,纯化水稀释 50 倍后,采用马尔文纳米粒度仪测其平均粒径,多分散指数(PDI)及平均 Zeta 电位,考察不同用量甘露醇对胶束制剂的保护作用。结果表明,当保护剂的加入量大于 8%时,冻干粉外观无皱缩塌陷现象,呈现色泽均一的明黄色,加入去离子水后能在 1 min 内迅速溶解为透明溶液,24 h 内无沉淀析出。将各组冻干制剂复溶后观察粒径及 Zeta 电位变化发现,随保护剂的用量增加,胶束平均粒径增加,而 PDI 与 Zeta 电位绝对值几乎无变化。冻干制剂平均粒径、PDI 及 Zeta 电位变化结果见表 5。综合考虑,选用 8%甘露醇为冻干保护剂。

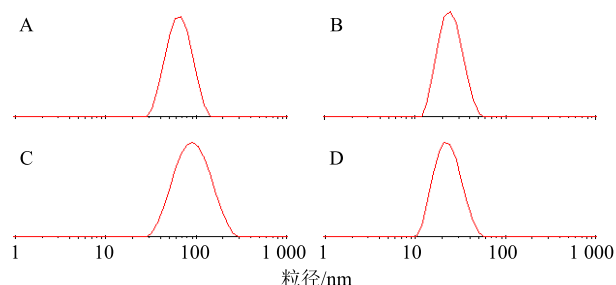
表 5 不同用量甘露醇对 Cur/Pip F127/P123-PM 冻干产品平均粒径及 Zeta 电位的影响

Table 5 Influence of mannitol concentration on mean particle size and Zeta potential of Cur/Pip F127/p123-PM lyophilized products

甘露醇/%	粒径/nm	PDI	电位/mV
0	64.520±2.973	0.277±0.046	14.570±0.503
1	77.800±3.285	0.202±0.022	12.970±1.137
2	88.640±1.540	0.189±0.004	12.530±1.620
4	88.300±2.925	0.201±0.015	12.000±1.153
8	94.860±2.088	0.222±0.002	10.900±0.400
16	100.700±2.265	0.220±0.004	11.000±1.505

空白及载药胶束制剂冻干前后粒径及 Zeta 电位图分别见图 3、4。由图可初步判断,以 8%甘露

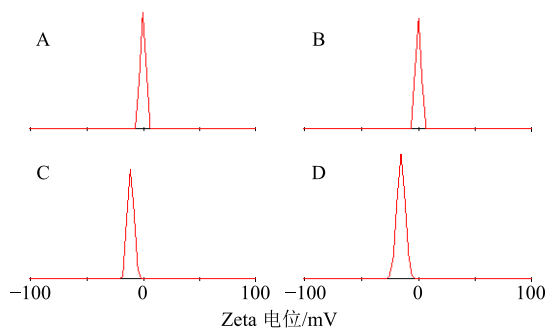
醇为保护剂时,冻干操作对胶束制剂的质量影响较小。采用透射电镜观察载药胶束及其冻干制剂的微观形态见图 5,由图可知胶束制剂成球形,表面较光滑,且分散均匀,无粘连现象。冻干操作对胶束制剂的影响较小。



A-Cur/Pip F127/P123-PM B-F127/P123-PM C-Cur/Pip F127/P123-PM 的冻干制剂 D-F127/P123-PM 的冻干制剂
A-Cur/Pip F127/P123-PM B-F127/P123-PM C-freeze-dried products of Cur/Pip F127/P123-PM D-freeze-dried products of F127/P123-PM

图 3 胶束制剂粒径分布

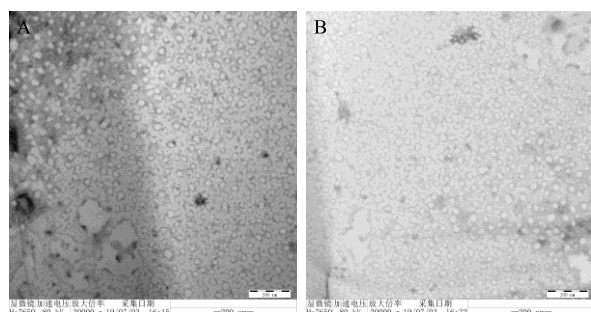
Fig. 3 Particle sizes distribution of micelle preparation



A-Cur/Pip F127/P123-PM B-F127/P123-PM C-Cur/Pip F127/P123-PM 的冻干制剂 D-F127/P123-PM 的冻干制剂
A-Cur/Pip F127/P123-PM B-F127/P123-PM C-freeze-dried products of Cur/Pip F127/P123-PM D-freeze-dried products of F127/P123-PM

图 4 胶束制剂的 Zeta 电位

Fig. 4 Zeta potential of micelle preparation



A-Cur/Pip F127/P123-PM B-Cur/Pip F127/P123-PM 的冻干制剂
A-Cur/Pip F127/P123-PM B-freeze-dried products of Cur/Pip F127/P123-PM

图 5 胶束制剂透射电镜图

Fig. 5 Particle sizes distribution of micelle preparation

3 讨论

目前, Cur 与 Pip 混合制剂中 Cur 与 Pip 含量的共分析方法常见 HPLC 法^[29-30], 流动相中往往含有较大比例的水。但本实验使用的普郎尼克载体材料在水中会自组装成具有疏水核的壳核结构, 若 Cur 与 Pip 包裹在输水核内将影响两者在色谱柱中的保留, 因此本实验选用纯乙腈为流动相。为了达到良好分离的效果, 采用分离效果更好的 UPLC 法, 并通过降低体积流量的方法增加 Cur 与 Pip 色谱峰的分离, 最终使 2 峰的分度度大于 1.5, 可用于两者的含量测定。

本研究以 Cur 载药量和包封率为评价指标, 通过单因素实验筛选出影响较大的 3 个因素, 并进一步以 Cur 载药量及包封率、Pip 包封率以及胶束粒径为指标, 通过 3 因素 5 水平的星点设计-效应面法优化得到最终处方。处方验证试验证实, 该最优处方对 Cur 与 Pip 的包封率均较高, 胶束制剂中 Cur 质量浓度可达 1.27 mg/mL, 与原料药相比, 溶解度显著提高。以 8%甘露醇为保护剂得到的冻干产品在 4 °C 条件下储存 30 d 后仍具有较好复溶效果, 解决了普郎尼克胶束制剂储存稳定性差的问题。

综上, 本研究在建立同一色谱条件下同时检测复方 Cur 胶束中 Cur 与 Pip 含量的 UPLC 法的基础上, 进一步通过单因素实验与星点设计-效应面法实验优化得到 Cur/Pip F127/P123-PM 的最优处方。该胶束制剂成功包载了 Cur 和 Pip 2 种药物, 且包封率较高, 粒径在 100 nm 左右, 其冻干制剂稳定性增加, 复溶效果良好, 为相关 Cur 复方制剂的研究提供了基础。

参考文献

- [1] 陈小雨, 高飞, 钱永常. 姜黄素在肿瘤治疗中的应用机制 [J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(9): 175-176.
- [2] 杨雪梅, 邱红梅, 田蜜, 等. 姜黄素对人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ_1 激活作用的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3122-3126.
- [3] 韩伟, 雷勇胜. 姜黄素治疗泌尿生殖系统癌症的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(2): 260-264.
- [4] 胡晨, 汪玉馨, 孟长虹. 姜黄素下调 NF- κ B 信号通路抑制化学缺氧诱导的 U87 细胞炎症反应 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 1989-1993.
- [5] Dos Santos P D F, Francisco C R L, Coqueiro A, et al. The nanoencapsulation of curcuminoids extracted from *Curcuma longa* L. and an evaluation of their cytotoxic,

- enzymatic, antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. *Food Funct*, 2019, 10(2): 573-582.
- [6] Ouyang S, Yao Y H, Zhang Z M, *et al*. Curcumin inhibits hypoxia inducible factor-1 α -induced inflammation and apoptosis in macrophages through an ERK dependent pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1816-1825.
- [7] Hongtao C, Youling F, Fang H, *et al*. Curcumin alleviates ischemia reperfusion-induced late kidney fibrosis through the APPL1/Akt signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11): 8588-8596.
- [8] 郝东明, 张 丽. 姜黄素联合伊立替康对结肠癌 SW620 细胞的体外抑制作用 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(6): 731-735.
- [9] 魏青丽, 孙润彬, 阿基业, 等. 姜黄素对非酒精性脂肪肝小鼠代谢组学的调控研究 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(3): 402-411.
- [10] 孙林林, 乔 利, 田振华, 等. 姜黄化学成分及药理作用研究进展 [J]. *山东中医药大学学报*, 2019, 43(2): 207-212.
- [11] 刘肖莹, 杨婷惠, 尚广亮, 等. 姜黄素纳米递药系统的构建及性能表征 [J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3802-3807.
- [12] Anchi P, Khurana A, Swain D, *et al*. Dramatic improvement in pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of sustain release curcumin microparticles demonstrated in experimental type 1 diabetes model [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 15(130): 200-214.
- [13] 郭庆发, 魏英荣, 曹 慧, 等. pH 敏感电荷反转型姜黄素纳米粒子的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 598-603.
- [14] 任金妹, 李 曼, 谢 宁, 等. 提高姜黄素口服生物利用度方法的研究进展 [J]. *中国药房*, 2018, 29(23): 3303-3308.
- [15] 严红梅, 汪 晶, 贾晓斌, 等. 灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物的制备及其体外释放度评价 [J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2082-2086.
- [16] 余丹妮, 伍 薇, 祁玮玮, 等. 女贞子三萜-胡椒碱共无定型复合物的表征和体外溶出度评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(3): 561-568.
- [17] Patil V M, Das S, Balasubramanian K. Quantum chemical and docking insights into bioavailability enhancement of curcumin by piperine in pepper [J]. *Phys Chem A*, 2016, 120(20): 3643-3653.
- [18] Singh S, Kumar P. Neuroprotective potential of curcumin in combination with piperine against 6-hydroxy dopamine induced motor deficit and neurochemical alterations in rats [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 25(1): 69-79.
- [19] Panahi Y, Khalili N, Sahebi E, *et al*. Effects of curcuminoids plus piperine on glycemic, hepatic and inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized double-blind placebo-controlled trial [J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2018, 68(7): 403-409.
- [20] Panahi Y, Khalili N, Sahebi E, *et al*. Curcuminoids plus piperine modulate adipokines in type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2017, 12(4): 253-258.
- [21] Chakraborty M, Bhattacharjee A, Kamath J V. Cardioprotective effect of curcumin and piperine combination against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity [J]. *Indian J Pharmacol*, 2017, 49(1): 65-70.
- [22] 刘祖浩, 陈仕红, 何晓玲, 等. 姜黄素与胡椒碱联合用药的研究进展 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2019, 21(4): 121-125.
- [23] 黄 容, 陆昕怡, 韩加伟, 等. 姜黄素-胡椒碱固体分散体的制备与生物利用度研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4528-4534.
- [24] Wang Y, Liang X, Tong R, *et al*. Gambogic acid-loaded polymeric micelles for improved therapeutic effect in breast cancer [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(10): 1695-1704.
- [25] Chen G, Wang Y, Xie R, *et al*. A review on core-shell structured unimolecular nanoparticles for biomedical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 130: 58-72.
- [26] 陈田娥, 王 鸽, 陈敏婷, 等. TPGS-壳聚糖载紫杉醇胶束的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5780-5786.
- [27] Perry J L, Reuter K G, Luft J C, *et al*. Mediating passive tumor accumulation through particle size, tumor type, and location [J]. *Nano Lett*, 2017, 17(5): 2879-2886.
- [28] 李伟男, 孙佳琳, 管庆霞, 等. 逆转肿瘤多药耐药性的普朗尼克靶向药物传递系统 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(15): 1270-1273.
- [29] 李秋萍, 郝砚彬, 翟文文, 等. HPLC 同时检测姜黄素-胡椒碱复方自微乳中姜黄素和胡椒碱的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(11): 1964-1968.
- [30] 毕晓黎, 孙冬梅, 罗文汇, 等. HPLC 法同时测定复方姜黄微囊中姜黄素和胡椒碱的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(2): 20-22.