

星点设计-效应面法优化丹皮酚脂微球处方工艺及其体外释药机制研究

杨佳佳, 韦世权, 李婉蓉, 杨增秋, 吴林菁, 周雪, 肖婷, 沈祥春*, 陶玲*

贵州医科大学, 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心(贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室), 药学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 采用星点设计-效应面法优化丹皮酚脂微球(Pae-LM)的处方工艺并考察其体外释药行为。**方法** 以平均粒径和离心稳定性常数(K_e)为评价指标, 分别对油相以及复合油比例、磷脂(PC)和硬脂酸用量、乳化剂种类、稳定剂种类及用量、PC与CH(胆固醇)的质量比、高速剪切温度及时间、均质压力及时间进行处方工艺筛选。采用星点设计效应面法考察丹皮酚投药量、高压均质压力对Pae-LM制剂性质的影响, 用二项式模型及多元线性回归模型拟合建立指标与因素之间的数学关系, 根据评价指标的最佳数学模型描绘效应面, 经效应面法分析最佳处方。按照优化所得最佳处方制备Pae-LM, 并考察体外释药特性。**结果** 最优处方制得的Pae-LM外观基本圆整, 平均粒径为 (149.27 ± 0.57) nm, Zeta电位为 (-36.01 ± 3.09) mV, 包封率为 (98.24 ± 0.32) %, 载药量为 (11.94 ± 0.04) %。 K_e 与2个考察因素之间存在可信定量关系, 且二项式模型较多元线性模型置信度高。丹皮酚原料药12、24、36 h的累积释放量分别为71.84%、85.21%、95.07%, 而Pae-LM在12、24、36 h时累积释放量仅为57.21%、59.66%、63.91%, 药物释放符合Ritger-peppas模型。**结论** 星点设计-效应面法适用于Pae-LM的处方优化。优化的Pae-LM粒径适宜, 包封率高, 可为丹皮酚心血管递送系统的开发提供参考。

关键词: 丹皮酚; 脂微球; 星点设计-效应面法; 体外释放机制; 离心稳定性常数; Ritger-peppas模型; 心血管递送系统

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)15-3901-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.009

Optimization of formulation of paeonol lipid microspheres by central composite design-response surface method and its drug release mechanism *in vitro*

YANG Jia-jia, WEI Shi-quan, LI Wan-rong, YANG Zeng-qiu, WU Lin-jing, ZHOU Xue, XIAO Ting, SHEN Xiang-chun, TAO Ling

Guizhou Province Specialized Natural Medicine Resource Efficient Utilization Engineering Center (Key Laboratory of Pharmacology and Pharmacological Evaluation of Natural Medicines in Guizhou Higher Education Institutions, Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Laboratory, Key Laboratory of Utilization of Natural Medicine Resources), College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To optimize the formulation of paeonol lipid microspheres (Pae-LM) through central composite design-response surface method and determine its *in vitro* release characteristics. **Methods** Using the mean particle size and centrifugal stability constant (K_e) as evaluation indexes, the oil phase type and the ratio of composite oil, the amount of phospholipid and stearic acid, the type of emulsifier, the type and amount of stabilizer, the quality of PC and CH, the high-speed shear temperature and time, the homogenization pressure and time was screened in prescription process. Effects of dosage of paeonol and high pressure homogenizing pressure on the properties of Pae-LM preparation were investigated by central composite design-response surface method. The binomial model and multivariate linear regression model were used to establish the mathematical relationship between the indexes and the factors. According to the best mathematical model of evaluation index, the response surface was depicted and the best prescription was analyzed by the response surface method. According to the optimized formulation Pae-LM, the *in vitro* drug release characteristics

收稿日期: 2019-12-08

基金项目: 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2017]30-25号); 贵州省科技创新团队项目(黔科合人才团队[2015]4025号); 贵州省高层次创新型人才百层次人才项目(贵州省科技厅黔科合人才[2015]4029号); 贵州医科大学药学院国际科技合作基地(黔科合平台人才[2017]5802)

作者简介: 杨佳佳(1996—), 贵州安顺人, 在读硕士, 从事药物新剂型与新技术研究工作。Tel: 18886075017 E-mail: 1434412440@qq.com

*通信作者 沈祥春, 博士, 教授, 从事心血管药物药理、功能天然产物化学生物学研究。Tel: (0851)88416149 E-mail: shenxiangchun@126.com
陶玲, 硕士, 教授, 从事药物新剂型和新技术、中药民族药新药开发研究。Tel: (0851)88416160 E-mail: 649511230@qq.com

were investigated. **Results** The best prescription of Pae-LM was basically round, with mean particle size of (149.32 ± 0.57) nm, Zeta potential of (-36.01 ± 3.09) mV, encapsulation rate of $(98.24 \pm 0.32)\%$ and drug-loading rate of $(11.94 \pm 0.04)\%$. There was a credible quantitative relationship between K_e and the two factors, and the binomial model was more reliable than the multivariate linear model. The cumulative release of paeonol drug substance at 12, 24 and 36 h were 71.84%, 85.21% and 95.07%, while the cumulative release of Pae-LM was only 57.21%, 59.66%, and 63.91% at 12, 24 and 36 h, respectively. The drug release was in accordance with the Ritger-peppas model. **Conclusion** Central composite design-response surface method can be applied to optimize prescription of lipid emulsion microspheres. The optimized particle size of Pae-LM was suitable with a higher encapsulation rate, which can provide a reference for the development of paeonol cardiovascular delivery system.

Key words: paeonol; lipid microspheres; central composite design-response surface method; *in vitro* release mechanism; centrifugal stability constant; Ritger-peppas model; cardiovascular delivery system

丹皮酚 (paeonol, Pae), 又称牡丹酚, 主要是从萝藦科鹅绒藤属植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitagawa 干燥根或全草以及毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.、芍药 *P. lactiflora* Pall. 的根皮中提取分离得到^[1-4]。现代药理研究表明, 其具有抑制血小板聚集、抗冠状动脉粥样硬化、抗炎、抗过敏、抗肿瘤、缺血再灌注损伤的保护作用等^[5-8]。但丹皮酚具有水溶性差、易挥发等特性, 目前市场上的丹皮酚片剂、注射剂等常规剂型存在给药半衰期短, 体内消除迅速, 患者顺应性较差等不足^[9-11], 极大程度限制了其临床应用。

脂微球 (lipid microsphere, LM) 是一种以脂肪油为软基质, 被磷脂膜包封且平均粒径在 200 nm 左右的微粒体分散系。也称为脂质乳剂、亚微米乳剂、纳米乳剂、细乳剂、细分散乳剂等, 其概念由日本研究人员在 1990 年代初首次提出, 并应用于前列地尔制剂, 在临床获得良好的效应^[12-14], 具有缓释性和易于跨越细胞膜等特性, 适合作为亲脂性^[15]和化学稳定性低^[16-17]或强烈刺激性^[18]的药物肠胃外给药系统^[19-20], 是目前被动靶向血管内皮损伤部位的典型递送系统。本研究采用星点设计-效应面法优化处方, 进行 Pae-LM 递药系统制备研究, 及药剂学性能表征, 以期回避其水溶性差, 高温易挥发等缺陷, 并为心血管递送系统研究开发和合理应用奠定一定的实验基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂

85-2B 型恒温加热磁力搅拌器, 金坛市科析仪器有限公司; ME104/02 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器系统有限公司; BS-223S 分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; KQ3200 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HPLC U3000, 美

国 Thermo 公司; 马尔文 Nano-ZA 型 Zeta 电位计粒径测定仪, 英国马尔文仪器有限公司; Hitachi HT7700 型日立透射电子显微镜, 日本株式会社。

丹皮酚原料药, 批号 D1619066, 陕西昂盛生物医药科技有限公司, 质量分数 $\geq 99\%$; 注射用大豆磷脂、大豆磷脂 (PC), 上海太伟药业有限公司; 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯 (Kolliphor[®] HS15), 德国巴斯夫公司; 注射用中链脂肪酸甘油三酯 (MCT)、注射用甘油, 浙江遂昌惠康药业有限公司; 注射用大豆油 (LCT), 浙江田雨山药用油有限公司; 胆固醇 (CH), 国药集团化学试剂有限公司; 泊洛沙姆 188 (F68), 西安悦来医药科技有限公司; 油酸, 西陇科学股份有限公司; 油酸钠, 天津市光复精细化工研究所; 乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国天地公司。

2 方法与结果

2.1 Pae-LM 的制备

称取处方量的 HS15、注射用甘油、油酸钠溶于超纯水中组成水相, 磁力搅拌器搅拌得水相。另称取处方量的 PC、MCT、LCT、硬脂酸、CH 组成油相, 加入处方量丹皮酚, 超声溶解, 得到澄清的含药油相; 用注射器将含药油相缓慢加入水相中, 高速剪切得初乳; 稀 HCl 调节初乳 pH 值, 转入高压均质机中均质一定时间, 即得 Pae-LM 脂微球制剂。同法制备不添加丹皮酚的空白脂微球 (BLM)。

2.2 Pae-LM 中丹皮酚含量测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Ultimate[®] LP-C₁₈ Column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (59 : 41); 检测波长为 274 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 进样量 10 μL。

2.2.2 溶液的配制

(1) 对照品溶液的配制: 精密称取 5.0 mg 的丹皮酚, 置于 25 mL 量瓶中, 无水乙醇溶解并定容,

得质量浓度为 200 μg/mL 的对照品储备液。

(2) 供试品溶液的配制: 精密吸取 Pae-LM 乳液 0.5 mL 至 10 mL 量瓶, 无水乙醇破乳并定容至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.3 mL 至 10 mL 量瓶中, 无水乙醇定容, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

BLM 对照品溶液、供试品溶液同法操作。

2.2.3 专属性考察 分别取适量空白溶剂、空白脂微球供试液、适当浓度的 Pae 对照品溶液及 Pae-LM 供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。结果见图 1。

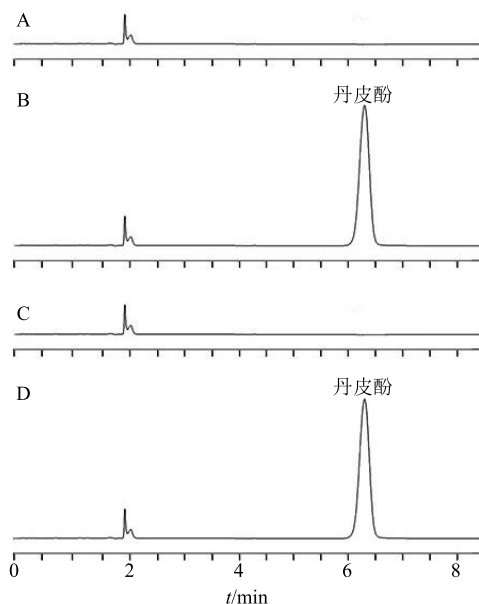


图 1 空白溶剂 (A)、丹皮酚对照品溶液 (B)、BLM 供试液 (C) 和 Pae-LM 供试品溶液 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chart of blank solvent (A), paeonol reference solution (B), BLM test solution (C) and Pae-LM test solution (D)

2.2.4 方法学考察 取“2.3.2”项下对照品溶液适量, 加无水乙醇稀释, 制得系列对照品工作溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性方程拟合, 得回归方程为 $Y=0.8698X-0.1383$, $r^2=1.000$, 表明丹皮酚在 4~32 μg/mL 线性关系良好。另经方法学验证, 精密度试验结果表明丹皮酚峰面积 RSD=0.38% (n=6), 重复性试验结果表明丹皮酚

质量浓度 RSD=0.79% (n=6), 稳定性试验结果表明在 12 h 内丹皮酚峰面积的 RSD 值为 1.63%, 加样回收率结果表明平均加样回收率为 99.85%, RSD=0.80% (n=6)。均符合《中国药典》2015 年版 (四部) 要求^[21]。

2.3 Pae-LM 载药量和包封率测定

2.3.1 载药量测定 取 Pae-LM 供试品溶液、丹皮酚对照品溶液适量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.2.1”项下方法测定丹皮酚峰面积, 根据公式计算得 Pae-LM 的载药量为 (11.94±0.36)%。

载药量=脂微球中所含药物质量/脂微球总质量

2.3.2 包封率的测定 取 Pae-LM 乳液 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 无水乙醇溶解并定容, 按“2.2.1”项下方法测定, 根据峰面积计算丹皮酚总投药量 ($W_{总}$); 另取 Pae-LM 乳液 3 mL 于截留相对分子质量 50 000 超滤管中, 3 500 r/min 离心 30 min, 取滤液 0.3 mL 置于 10 mL 量瓶中, 无水乙醇稀释并定容, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按“2.2.1”项下方法测定, 记录峰面积, 根据峰面积计算游离丹皮酚量 ($W_{游}$)。按下式计算, 得丹皮酚包封率为 (98.24±0.32)% (n=3)。

包封率=($W_{总}-W_{游}$)/ $W_{总}$

2.4 单因素考察处方及工艺参数

以脂微球的中位径、粒径范围及离心稳定性参数 (K_c) 为评价指标, 进行处方工艺考察。

2.4.1 Pae-LM 制备处方考察

(1) 油相的考察: 本实验在预试验基础上, 参照预定处方, 固定油相总量为 10%, 考察不同的油相 (LCT 和 MCT) 对 Pae-LM 制备的影响。参照 ISO 13320 规定, 当中位粒径 < 10 μm 时, 中位径 (D_{50} , 一个样品的累积粒度分布百分数达到 50% 时所对应的粒径, 它的物理意义是粒径大于它的颗粒占 50%, 小于它的颗粒也占 50%, D_{50} 也叫中位径或中值粒径) 的 RSD 必须小于 6%, D_{10} 和 D_{90} [D_{10} 、 D_{90} 分别表示粒度分布数达到 10%、90% 时所对应的粒径。它的物理意义是粒径小于 (或大于) 它的颗粒占 10%、90%] 小于 10%^[22]。结果见表 1。

(2) 复合油比例的考察: 考虑到单独油相的使用其毒性较大且工艺不稳定, 故以粒径及 K_c 值为考

表 1 不同油相的影响 (n=3)

Table 1 Effects of different oil phases (n=3)

种类	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_c	RSD/%
LCT	3.85	1.21	1.41	22.07	12.23	6.07	87.13	3.02
MCT	3.81	1.56	1.66	7.99	7.85	9.01	76.37	1.24

察指标, 分别设置 LCT-MCT 为 1 : 1、1 : 3、3 : 1, 考察 LCT 与 MCT 不同质量比对 Pae-LM 制备的影响。结果表明 3 个比例对粒径及 K_e 值影响无显著差别。Li 等^[23]研究表明, 当 MCT-LCT 质量比为 3 : 1 时, 可有效防止药物析出。综合考虑制剂的安全性和稳定性, 选择 MCT-LCT (3 : 1) 的混合物作为油相。结果见表 2。

(3) PC 用量的考察: 根据油相筛选结果, 分别设置磷脂用量为 0.60%、0.76%、0.92%, 考察 PC 用量对 Pae-LM 制备的影响。结果表明 PC 用量对 K_e 值无显著影响, 但随着 PC 用量的增大, 粒径呈先下降后上升的趋势, 在用量为 0.76% 时, 粒径最小, 重复性较好。故选择 PC 用量为 0.76% 进行下一步实验。结果见表 3。

(4) 硬脂酸用量的考察: 以初乳的 K_e 值及粒径结果为指标, 分别设置硬脂酸用量为 0.02%、0.04%、0.06%, 考察硬脂酸用量对 Pae-LM 稳定性的影响。随着用量的增大, K_e 值在逐渐增加, 且当硬脂酸用

量增大时, 较难溶解, 考虑安全性及稳定性问题, 因此, 选择硬脂酸用量为 0.02% 进行下一步实验。结果见表 4。

(5) 乳化剂种类的考察: 以初乳的 K_e 值及粒径结果为指标, 考察乳化剂分别为 HS15、F68 对 Pae-LM 稳定性的影响。结果表明, 当以 HS15 作为乳化剂时, 所得脂微球粒径及 K_e 值明显小于 F68, 且以 F68 水相中的乳化剂时, 其乳化效果较差, 乳剂易分层, $RSD > 10%$, 工艺不稳定, 因此, 确定水相中的乳化剂为 HS15。结果见表 5。

(6) 稳定剂种类的考察: 以粒径范围和 K_e 值为主要指标, 固定稳定剂用量为 0.4%, 考察油酸、油酸钠不同稳定剂对 Pae-LM 的影响。结果表明, 油酸钠作为稳定剂时, 粒径及 K_e 值均最小, 因此, 选择油酸钠作为稳定剂。结果见表 6。

(7) 油酸钠用量的考察: 以初乳的 K_e 值及粒径结果为指标, 分别设置油酸钠用量为 0.2%、0.4%、0.6%, 考察油酸钠用量对 Pae-LM 稳定性及粒径的

表 2 LCT 与 MCT 不同质量比的影响 (n = 3)

Table 2 Effects of different mass ratios of LCT and MCT (n = 3)

LCT-MCT	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
1 : 1	3.12	1.79	1.35	7.50	6.27	1.11	85.40	6.13
1 : 3	3.08	0.49	1.54	6.43	5.89	3.17	79.67	1.99
3 : 1	3.67	6.90	1.27	0.02	9.38	1.35	81.67	4.61

表 3 磷脂用量的影响 (n = 3)

Table 3 Effects of phospholipid dosages (n = 3)

用量/%	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
0.60	3.26	3.91	1.63	2.09	6.43	5.78	84.90	0.99
0.76	3.05	1.65	1.54	4.42	5.92	2.32	81.30	0.63
0.92	3.14	0.96	1.59	1.03	6.07	1.31	82.00	2.81

表 4 硬脂酸用量的影响 (n = 3)

Table 4 Effects of stearic acid dosages (n = 3)

用量/%	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
0.02	3.04	3.21	1.34	8.67	6.30	9.62	79.93	1.81
0.04	3.28	2.99	1.65	1.07	6.13	4.45	84.27	1.42
0.06	3.15	5.24	1.49	12.29	6.10	2.85	86.77	0.58

表 5 乳化剂种类的影响 (n = 3)

Table 5 Effects of emulsifier types (n = 3)

种类	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
F68	7.42	5.95	1.59	1.59	48.38	10.44	94.27	1.12
HS15	3.04	3.21	1.34	8.67	6.30	9.62	79.93	1.81

表 6 稳定剂种类的影响 (n = 3)
Table 6 Effects of stabilizer types (n = 3)

种类	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
油酸	3.19	2.46	1.62	1.95	6.13	2.37	77.53	3.23
油酸钠	0.41	3.09	0.19	0.31	0.86	0.24	70.69	2.50

影响。结果表明,随着油酸钠用量的增加,粒径和稳定性都在改善,但根据临床用药安全可知,油酸钠 ip 对小鼠的半数致死量 (LD₅₀) 为 152 mg/kg,参考油酸钠常规用量范围,不宜继续增大油酸钠含量,本研究选择油酸钠用量为 0.6%进行下一步实验。结果见表 7。

(8) 甘油用量的考察:以初乳的 K_e 值及粒径结果为指标,分别设置甘油用量为 2.3%、2.5%、2.7%,考察甘油用量对 Pae-LM 稳定性及粒径的影响。当甘油用量为 2.3%时,其对 Pae-LM 的影响最小。结果见表 8。

(9) PC 与 CH 质量比的考察:根据上述实验结果,分别设置 PC-CH 质量比为 1:0、2:1、3:1、5:1,考察 PC 与 CH 不同质量比对 Pae-LM 稳定性及粒径的影响。CH 主要与 PC 相结合,阻止 PC 凝集晶体结构,可调节膜结构流动性。结果显示,

随着 CH 用量的减少, K_e 值呈先减小后增大的趋势,当 PC-CH 为 2:1 时,其 K_e 值最小。结果见表 9。

2.4.2 Pae-LM 制备工艺考察

(1) 剪切温度的考察:由于丹皮酚遇热易挥发的特殊性质,本研究对剪切时的温度 (4 °C、室温) 进行了考察。结果表明,当在 4 °C 条件下剪切时其 K_e 值较小,且高速剪切时会产生大量热能。温度太高,PC 易氧化和水解,从而影响脂微球的稳定性,故最终选择剪切时温度为 4 °C 进行下一步实验。结果见表 10。

(2) 剪切时间的考察:以终乳的稳定性常数、粒径及粒径分布为考察指标,分别设置剪切时间为 5、7、9 min,考察不同的剪切时间对脂微球的影响。Pae-LM 的粒径及 K_e 值随着剪切时间的增大呈先减小后增大的趋势,故本实验选择剪切时间 7 min 进行下一步实验。结果见表 11。

表 7 油酸钠用量的影响 (n = 3)
Table 7 Effects of sodium oleate dosages (n = 3)

用量/%	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
0.2	1.59	32.99	0.51	18.9	3.61	7.27	80.77	2.91
0.4	0.56	3.82	0.17	0.99	1.90	3.23	70.63	1.36
0.6	0.43	3.38	0.16	1.65	1.15	4.92	69.33	5.06

表 8 甘油用量的影响 (n = 3)
Table 8 Effects of glycerol dosages (n = 3)

用量/%	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
2.1	0.36	11.09	0.16	3.52	0.95	23.67	67.83	1.36
2.3	0.42	2.41	0.16	1.09	1.07	5.19	64.33	3.99
2.5	0.40	5.02	0.16	0.94	1.22	6.92	69.70	4.12
2.7	0.41	2.69	0.16	0.72	1.14	5.60	69.57	4.27

表 9 磷脂与胆固醇质量比的影响 (n = 3)
Table 9 Effects of phospholipid to cholesterol mass ratio (n = 3)

PC-CH	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
1:0	0.44	2.45	0.17	1.05	1.36	7.17	66.40	3.07
2:1	0.39	2.06	0.16	1.08	1.14	8.06	64.93	2.59
3:1	0.42	0.71	0.16	0.36	1.13	2.71	69.00	2.19
5:1	0.40	1.60	0.16	0.62	1.18	3.31	67.65	1.98

表 10 剪切温度的影响 ($n = 3$)Table 10 Effects of shear temperatures ($n = 3$)

温度	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
4℃	0.39	1.82	0.16	0.62	1.19	1.92	61.30	1.88
室温	0.34	0.61	0.15	0.65	0.83	1.23	65.07	2.23

表 11 剪切时间的影响 ($n = 3$)Table 11 Effect of shear time ($n = 3$)

时间/min	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
5	0.45	4.82	0.17	1.81	1.47	3.77	70.17	3.76
7	0.40	1.13	0.16	0.35	1.19	1.87	60.93	4.71
9	0.40	3.17	0.16	0.00	1.19	3.53	64.57	1.25

(3) 均质压力的考察: 以终乳的 K_e 值、粒径及粒径分布为考察指标, 分别设置均质压力为 60.0、70.0、80.0、90.0 MPa, 考察不同的均质压力对 Pae-LM 制备的影响。结果表明, 均质压力对脂微球的粒径无显著影响, 但当压力为 70.0 MPa 时, 其 K_e 值最小, 故本实验选择压力为 70.0 MPa 进行下一步实验。结果见表 12。

(4) 均质时间的考察: 以终乳的 K_e 值、粒径及粒径分布为考察指标, 分别设置均质压力为 9、11、13 min, 考察不同的均质时间对 Pae-LM 制备的影响。结果表明, 均质 11 min 时其粒径及 K_e 值均较小, 因此, 选择均质时间为 11 min。结果见表 13。

(5) 丹皮酚用量的考察: 以终乳的 K_e 值、粒径及粒径分布为考察指标, 分别设置丹皮酚投药量为 0.9、1.0、1.1 g, 考察不同的投药量对脂微球的影响。结果表明, 当丹皮酚的投药量大于 1.0 g 时, 丹皮酚易析出, 考虑载药量尽可能大, 故选择丹皮酚的最佳投药量为 1.0 g。结果见表 14。

2.5 星点设计-效应面法优化处方工艺参数

2.5.1 考察因素范围的确定 以 D_{50} (nm)、粒径范围 (nm) 和 K_e 指数为评价指标, 对 Pae-LM 油相的种类及比例、PC 用量、硬脂酸用量、PC 与 CH 质量比、水相中乳化剂种类、稳定剂种类及用量、注射用甘油用量, 丹皮酚投药量, 初乳剪切温度、初

表 12 均质压力的影响 ($n = 3$)Table 12 Effects of homogeneous pressure ($n = 3$)

压力/MPa	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
60.0	0.21	9.29	0.125	4.29	0.45	5.74	55.47	5.87
70.0	0.26	0.22	0.150	0.00	0.55	0.36	41.43	4.88
80.0	0.26	2.02	0.160	3.75	0.46	0.25	50.90	4.25

表 13 均质时间的影响 ($n = 3$)Table 13 Effect of homogenization time ($n = 3$)

时间/min	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
9	0.30	1.93	0.15	0.99	0.65	3.24	42.97	3.27
11	0.23	4.08	0.13	4.75	0.48	7.28	26.44	2.67
13	0.27	3.50	0.16	9.43	0.49	0.20	39.77	1.38

表 14 丹皮酚投药量的影响 ($n = 3$)Table 14 Effects of paeonol dosages ($n = 3$)

丹皮酚/g	$D_{50}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{10}/\mu\text{m}$	RSD/%	$D_{90}/\mu\text{m}$	RSD/%	K_e	RSD/%
0.9	0.26	0.38	0.15	0.00	0.55	3.15	16.40	7.97
1.0	0.24	4.88	0.15	7.17	0.54	3.34	21.60	2.43
1.1	0.26	0.22	0.15	0.37	0.57	0.56	17.70	13.29

乳剪切时间、高压均质次数和时间等因素进行初步单因素考察。根据单因素实验结果，确定油酸钠用量为 0.6%，PC 与 CH 质量比为 2：1，甘油用量为 2.3%，初乳剪切温度为 4 ℃，初乳剪切时间为 7 min，均质时间为 11 min。

根据星点设计原理，以影响制剂稳定性最大的因素 K_e 为评价指标，取对评价指标影响较大的丹皮酚投药量 (A)、高压均质压力 (B) 进行星点设计，取值范围分别确定为 A 0.7~1.3 g；B 50.0~90.0 MPa，采用 2 因素 5 水平进行试验筛选最优处方。

2.5.2 实验设计：因素和水平、实验安排和结果见表 15。

表 15 因素和水平及星点设计实验安排与结果
Table 15 Central composite design and results

试验号	A/g	B/MPa	K_e
1	1.00 (0)	70.00 (0)	23.80
2	1.30 (+1)	50.00 (-1)	27.70
3	0.70 (-1)	90.00 (+1)	29.30
4	1.00 (0)	98.28 (+1.414)	20.70
5	1.00 (0)	70.00 (0)	20.10
6	0.70 (-1)	50.00 (-1)	47.40
7	1.00 (0)	41.72 (-1)	41.30
8	1.42 (+1.414)	70.00 (0)	12.90
9	1.30 (+1)	90.00 (+1)	9.40
10	0.58 (-1.414)	70.00 (0)	43.80
11	1.00 (0)	70.00 (0)	20.50
12	1.00 (0)	70.00 (0)	17.10
13	1.00 (0)	70.00 (0)	21.30

2.5.3 模型拟合 采用 Design-Expert 8.0 Trial 软件中的中心复合设计 (central composite design, CCD) 对表 15 所得实验数据进行处理，以评价指标为因变量，对各因素即自变量进行回归模型拟合及方差分析，所得多元 2 次回归模型为 $K_e = +20.56 - 10.41 A - 8.19 B - 0.050 AB + 3.59 A^2 + 4.91 B^2$ ， $r^2 = 0.979 1$ ， $P < 0.05$ ，式中 A、B 分别表示丹皮酚投药量和高压均质压力。采用 Design expert 8.0 Trial 软件拟合的 2 次模型效应面方差分析和 2 次回归方程拟合，和统计学处理，结果表明，模型的 F 值为 65.47， $P < 0.000 1$ ，说明该回归方程达到极显著；多元相关系数 $r^2 = 0.979 1$ ， r^2 越接近 1，表示模型越接近真实值，说明该模型对实际情况拟合较好，可用来进行响应值预测。见表 16。

表 16 响应面二次模型的方差分析结果

Table 16 Analysis of variance of response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 633.63	5	326.73	65.47	<0.000 1
A	867.34	1	867.34	173.79	<0.000 1
B	536.82	1	536.82	107.56	<0.000 1
AB	0.01	1	0.01	2.004×10^{-3}	0.965 5
A^2	89.59	1	89.59	17.95	0.003 9
B^2	167.96	1	167.96	33.66	0.000 7
残差	34.94	7	4.99		
失拟项	11.70	3	3.90	0.67	0.612 7
纯误差	23.23	4	5.81		
总和	1 668.57	12			

2.5.4 效应面优化与预测 采用 Design-Expert 8.0 Trial 软件绘制自变量对因变量的三维效应面和二维等高线图，直观地分析各个自变量及其相互作用对因变量的影响。结果表明，在考察范围内，距离较佳区域较远的地方接近线性，愈接近较佳区，面的弯曲度就越大，非线性关系居多。结果还表明，当丹皮酚投药量低于 0.7 g 时，随着高压均质压力的增加， K_e 值出现先升高后趋于平稳；当丹皮酚投药量高于 1.3 g 时，随着高压均质压力的增加， K_e 值呈上升趋势，丹皮酚投药量和高压均质压力交互影响 K_e 值。见图 2。

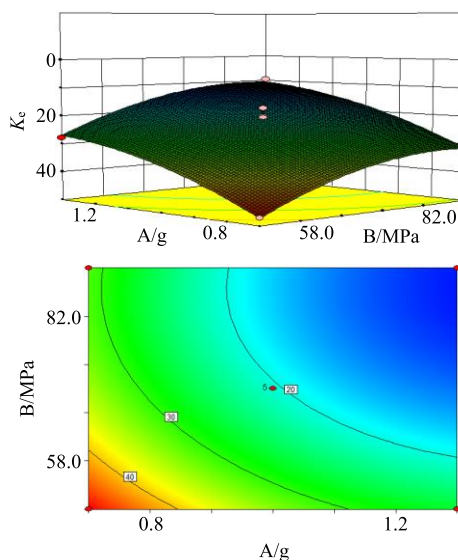


图 2 自变量 A、B 对因变量 K_e 值交互影响的 3D 效应面和等高线图

Fig. 2 3D effect surface and contour plots of interactive effects of independent variables A and B on K_e value of dependent variable

2.5.5 最佳处方的验证 根据 Design-Expert 8.06 软件处理结果, Pae-LM 的最佳处方为丹皮酚投药量为 1.0 g, LCT-MCT (1:3), 磷脂用量为 0.76%, 硬脂酸用量为 0.02%, PC 与 CH 的质量比为 2:1, HS15 作为水相中的乳化剂且用量为 0.2%, 油酸钠作为稳定剂且用量为 0.6%, 甘油用量为 2.3%, 4 °C

冰浴条件下剪切 7 min, 在制备初乳后用浓 HCl 调节 pH 至 7.0, 高压均质 11 min (压力 86.7 MPa)。按上述处方和工艺平行制备 3 份 Pae-LM, 测定粒径和 K_e , 所测得的实测值与模型预测值比较, 偏差 [偏差=(预测值-实测值)/预测值] 均 < 5.0%, 表明建立的模型预测性较好。结果见表 17。

表 17 最佳处方验证性实验 (n = 3)

Table 17 Best prescription validation experiments (n = 3)

编号	平均粒径/nm	平均粒径 RSD/%	PDI	RSD/%	ζ 电位/mV	RSD/%	实测 K_e 值	预测 K_e 值	K_e 偏差/%
20191031-1	148.290	0.57	0.120	2.65	-36.03	3.09	18.000	17.150	-4.900
20191031-2	149.740		0.119		-37.11		17.900		-4.400
20191031-3	149.780		0.125		-34.88		17.800		-3.800

2.6 药剂学性能评价

2.6.1 外观形态的考察 取 Pae-LM 适量, 置于完全润湿的铜网上, 滤纸吸去多余的液体, 用 2% 磷钨酸溶液负染, 晾干后置于透射电镜 (TEM) 下观察其形态。结果表明, Pae-LM 外观基本圆整。结果见图 3。

2.6.2 粒径及 Zeta 电位测定 取 Pae-LM 乳液适量, 适量水稀释后加入样品池中, 采用 Delsa Nano Zeta 电位及纳米粒度分析仪测定其粒度及 Zeta 电位。结果表明, Pae-LM 平均粒径为 (149.27 ± 0.57) nm, Zeta 电位为 (-36.01 ± 3.09) mV。见图 4。

2.7 体外释放度考察

采用最佳处方制备所得 Pae-LM, 以 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 为释放介质, 动态透析法考察 Pae-LM 的体外累积释药行为。分别取 20 mg 丹皮酚和含 20 mg 丹皮酚的 Pae-LM, 置于预处理过的透析袋中, 加入 1 mL 释放介质, 两端扎紧后置于 150 mL 的磨口烧瓶中, 透析袋外加入 100 mL 释放介质, 放入 (37.0 ± 0.5) °C, 转速为 100 r/min 的水浴恒温振荡器中, 于相应时间点取样 1.0 mL,

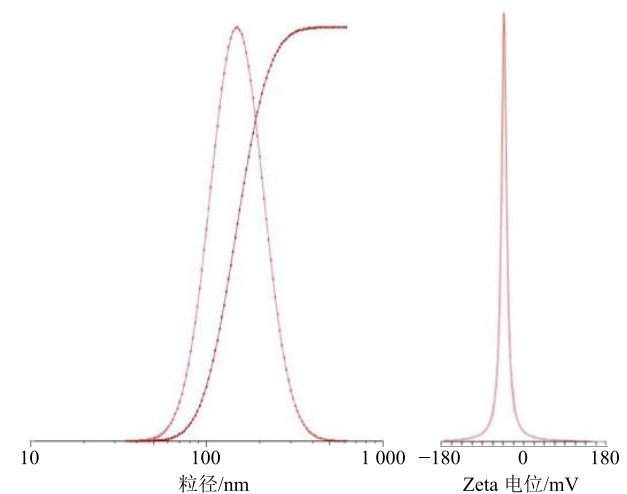


图 4 Pae-LM 的粒径分布及 Zeta 电位

Fig. 4 Particle size distribution and Zeta potential of Pae-LM

补充 (37.0 ± 0.5) °C 等量的释放介质, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按 “2.2.1” 项方法测定, 按下述公式计算累计释放率 (Q_n , n 为接收室中溶液的体积, C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度, 1.0 为取样 1.0 mL, W 为总药量), 以时间 t 为横坐标, Q_n 为纵坐标绘制 Q_n-t 曲线图, 用 Excel 拟合释放曲线, 结果见图 5。

$$Q_n = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1.0) / W$$

结果表明, 在 4、8、12、24、36 h, 丹皮酚原料药累积释放率分别达到 35.92%、59.01%、71.66%、84.99%、94.82%, 而 Pae-LM 分别为 41.68%、53.67%、57.12%、59.52%、63.76%, 其中 4~12 h 具有较好的缓释效果, 12~36 h 的释放没有增加, 可能与油相黏附堵塞透析袋壁有关。

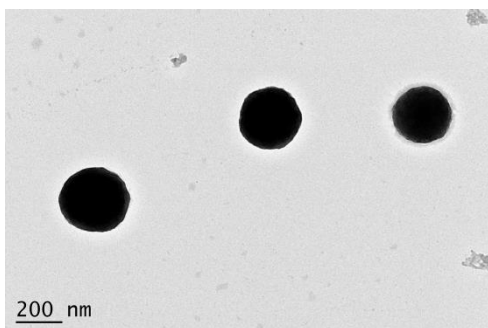


图 3 Pae-LM 的 TEM 图

Fig. 3 TEM image of Pae-LM

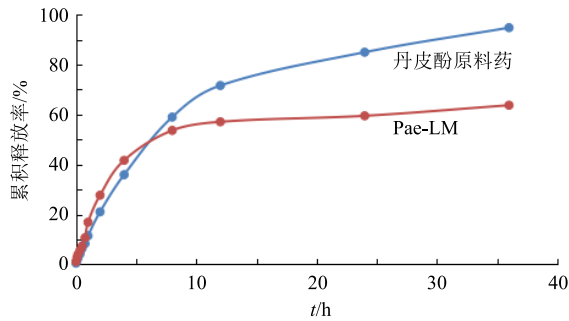


图 5 丹皮酚原料药和 Pae-LM 的体外释放曲线

Fig. 5 *In vitro* release profiles of Pae and Pae-LM

2.8 Pae-LM 体外释放机制的初步研究

根据体外 Q_n ，进行相关方程拟合，通过各方程的相关系数比较，初步研究 Pae-LM 的体外释放规律。拟合结果表明，Pae-LM 体外释药方程拟合接近程度为 Ritger-peppas 模型 > Weibull 模型 > Higuchi 模型 > 零级释放模型 > 一级释放模型。Ritger-peppas 模型方程中 $\ln t$ 前面的幂指数项释放指数 $n=0.5825$ ，在 $0.45 < n < 0.89$ ，初步判断其释药机制属于药物扩散和骨架溶胀或溶蚀的协同作用^[22]。结果见表 18。

表 18 最佳处方的体外释放模型拟合结果 ($n = 3$)

Table 18 Fitting results of *in vitro* release model of best prescription ($n = 3$)

拟合方程	Pae-LM	丹皮酚
零级释放方程 $Q_n=kt$	$Y=0.03 X+14.781, r=0.6672$	$Y=0.0473 X+11.585, r=0.8383$
一级释放方程 $\ln(1-Q_n)=-kt$	$Y=0.0016 X+1.7656, r=0.3403$	$Y=0.0019 X+1.5656, r=0.4914$
Higuchi 方程 $Q_n=k \times t^{1/2}$	$Y=1.5717 X+4.1666, r=0.8766$	$Y=2.333 X-2.9604, r=0.9682$
Weibull 方程 $\ln \ln [1/(1-Q_n)]=k \ln t$	$Y=-0.7512 X+0.8389, r=0.9187$	$Y=-0.7808 X+1.0298, r=0.9726$
Riger-Pappas 方程 $\ln Q_n=k \ln t$	$Y=0.5751 X+0.1886, r=0.9626$	$Y=0.721 X-0.6054, r=0.9884$

k 为释放度系数， Q_n 为各时间点累积释放率， t 为取样时间点 (min)

k is the release coefficient, Q_n is the cumulative release rate at each time point, and t is the sampling time point (min)

3 讨论

尽管以 MCT 为油相时，其 K_e 值较小，但是与 MCT 相关的神经毒性和白色念珠菌不可小觑。几十年来，LCT 类的长链甘油三酯作为脂质微球的油相特别有吸引力，然而 LCT 存在着肺动脉压升高，胃肠功能受抑制等副作用。研究表明，混合油的乳液可以降低与纯 LCT 或基于 MCT 的脂质乳液的相关风险，因此，选择复合油作为油相进行 Pae-LM 的制备研究^[23]。

硬脂酸是一种机体脂肪的主要成分和能量的主要来源，体内有良好的降解途径，生物相容性好^[24-25]；而且硬脂酸作为阴离子表面活性剂，可以使脂微球体系的 Zeta 电位绝对值变大，即体系稳定性增加^[26]。本实验添加硬脂酸的目的旨在增加脂微球黏度，进一步增强递送系统的缓释效果，为靶向血管内皮损伤部位的缓释递送系统研究提供一定的参考。

本研究采用高压均质法，利用空穴效应、撞击效应、剪切效应等可使初乳进一步完成分散、乳化、均质等工艺过程，从而促进脂微球的成球效果。脂微球如有绝对值大于 20 mV 的 ζ 电势，可使得乳滴间有较大的斥力，有利于乳剂的稳定。优化后的 Pae-LM 的 ζ 电位为 -36.01 mV，具有较好的稳定性。

动态透析法考察 Pae-LM 体外释放结果表明，Pae-LM 1 h 内存在一定的突释效应，随着浅层及表面吸附的药物释放完全，Pae 制剂以较为恒定的速度缓慢释放药物，12 h 后 Pae-LM 累积释放率保持在 60% 左右，无显著上升，与文献报道一致^[27]，但作者认为可能是由于 Pae-LM 中油相黏附于透析袋上，堵塞透析袋膜孔，导致药物无法有效扩散至透析袋外的释放介质中。

参考文献

- 刘本臣. 丹皮酚的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1760-1762.
- 武继彪. 丹皮酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及对 NMDA 受体的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- 武雪宾, 虞慧华. 丹皮酚凝胶剂的制备和体外透皮特性研究 [J]. 药学服务与研究, 2009, 9(5): 390-392.
- 吴桂莹, 亓玉玲, 郝宝燕, 等. 丹皮酚衍生物及其药理学活性研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 1001-1006.
- 曹丽丽, 王剑奇, 朱艳琴. 丹皮酚体外抗肿瘤作用研究进展 [J]. 光明中医, 2017, 32(10): 1526-1528.
- Peng Y, Zheng X, Fan Z Y, et al. Paeonol alleviates primary dysmenorrhea in mice via activating CB2R in the uterus [J]. *Phytomedicine*, 2019, doi: 10.1016/j.phymed.2019.153151.

- [7] Wang D P, Du Y L, Xu H Y, *et al.* Paeonol protects mitochondrial injury and prevents pulmonary vascular remodeling in hypoxia [J]. *Resp Physiol Neurobi*, 2019, doi: 10.1016/j.resp.2019.103252.
- [8] 张桂娥, 刘海清. 丹皮酚的质量标准研究 [J]. 黑龙江科技信息, 2014(17): 25.
- [9] 文宗河, 李 萍, 王建华, 等. 丹皮酚- β -环糊精包合物的制备研究 [J]. 中国药业, 2005, 14(4): 51-52.
- [10] 韩 盈, 刘继勇, 王 玫, 等. 丹皮酚微乳的制备及经皮吸收研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(9): 671-675.
- [11] Manfredi R, Chiodo F. Case-control study of amphotericin B in a triglyceride fat emulsion versus conventional amphotericin B in patients with AIDS [J]. *Pharmacotherapy*, 2012, 18(5): 1087-1092.
- [12] 傅军霞, 姚 芳, 胡爱珍, 等. 前列地尔冻干脂微球的制备及其体外评价 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(19): 1704-1708.
- [13] 周如君, 武 英. 前列地尔的剂型及临床研究进展 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(11): 1883-1887.
- [14] Hörmann K, Zimmer A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions-A review [J]. *J Control Release*, 2015, 223(10): 85-98.
- [15] Shao Y J, Zhang C G, Yao Q, *et al.* Improving cabazitaxel chemical stability in parenteral lipid emulsions using cholesterol [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 52(14): 1-11.
- [16] Luo L F, Wang X Z, Chen Q Y, *et al.* A parenteral docetaxel-loaded lipid microsphere with decreased 7-epidocetaxel conversion *in vitro* and *in vivo* [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 109(15): 638-649.
- [17] Chen X, Zhang L, Hu X, *et al.* Formulation and preparation of a stable intravenous disulfiram-loaded lipid emulsion [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2015, 117(6): 869-878.
- [18] Gong H Y, Geng S C, Zheng Q, *et al.* An intravenous clarithromycin lipid emulsion with a high drug loading, H-bonding and a hydrogen-bonded ion pair complex exhibiting excellent antibacterial activity [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11(5): 618-630.
- [19] Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2011, 21(1): 55-76.
- [20] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [21] ISO 13320-1. International Standard. Particle size analysis—Laser diffraction methods—Part 1: General principles [S]. 1999.
- [22] 赵 科, 刘 源, 赖 可, 等. Box-Behnken 响应面法优化去氧氟尿苷缓释片处方及其体外释放机制研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(1): 64-68.
- [23] Li Y, He H B, Wang Q, *et al.* Preparation, stability and pharmacokinetics evaluation of lipid microspheres loading a promising antitumor candidate, Timataxel [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11(6): 771-779.
- [24] 李志花, 陈汝福, 王 捷, 等. 硬脂酸聚乙二醇阿霉素纳米粒的制备及其对人肝癌细胞的杀伤作用 [J]. 岭南现代临床外科, 2004, 4(3): 171-174.
- [25] 王 杰, 陈大兵. 硬脂酸钠纳米粒混悬液表面性质的测定与体外细胞摄取 [J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(2): 102-106.
- [26] 赵晓伟, 何瑾馨. 应用 Zeta 电位分析荧光增白剂分散体系的稳定性 [J]. 纺织学报, 2007, 28(12): 69-80.
- [27] 龙凯花, 黄昕玥, 王春柳, 等. Box-Behnken 效应面法优化丹皮酚纳米结构脂质载体温敏型原位凝胶处方及其体外释放性能考察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(6): 73-76.