

• 药剂与工艺 •

包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究

管庆霞, 夏昭睿, 王艳宏, 张 雪, 李伟男, 杨志欣, 王 锐, 李秀岩, 冯宇飞*

黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 对包载马钱子碱 (brucine) 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] (B-PLGA) 纳米粒进行处方与工艺优化。方法 采用沉淀法制备 B-PLGA 纳米粒, 以平均粒径、多分散系数 (PDI)、Zeta 电位、包封率和载药量为评价指标, 采用单因素考察法结合星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 筛选 B-PLGA 纳米粒的最优处方, 并将最优处方进行表征及体外释放实验。结果 最优处方选择丙酮作为有机溶剂, 泊洛沙姆 188 (F68) 作为稳定剂, 超声时间为 1 min, 磁力搅拌速度为 900 r/min, 磁力搅拌时间为 30 min, F68 用量为 0.35%, 载体用量为 25 mg, 药物用量为 1.0 mg, 有机相与水相比为 0.54。所制得的 B-PLGA 纳米粒为淡蓝色乳光透明液体, 粒径为 (97.12 ± 4.23) nm, PDI 为 0.098 ± 0.035 , Zeta 电位为 (-27.30 ± 0.31) mV, 包封率为 $(69.24 \pm 1.42)\%$, 载药量为 $(2.65 \pm 0.03)\%$ 。通过表征, 纳米粒形态完整, 通过体外释放实验得知, 纳米粒体外释放拟合符合 Higuchi 方程。结论 星点设计-效应面法可用于包载马钱子碱 PLGA 纳米粒处方与工艺优化, 且优化后的纳米粒具有缓释作用。

关键词: 马钱子碱; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 纳米粒; 沉淀法; 单因素考察法; 星点设计-效应面法; 体外释放; Higuchi 方程; 缓释作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-0951-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.007

Optimization of formulation and characteristics of PLGA nanoparticles containing brucine

GUAN Qing-xia, XIA Zhao-rui, WANG Yan-hong, ZHANG Xue, LI Wei-nan, YANG Zhi-xin, WANG Rui, LI Xiu-yan, FENG Yu-fei

College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To optimize the formulation and process of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles containing brucine (B-PLGA). **Methods** The precipitation method was used to prepare B-PLGA nanoparticles, and the particle size, polydispersity coefficient (PDI), Zeta potential, encapsulation efficiency, and drug loading were used as evaluation indicators. The single factor investigation method combined with the central composite design-response surface method (CCD-RSM) were used to screen the optimal formulation of B-PLGA nanoparticles, and the characterization and *in vitro* release experiments on the optimal formulation were performed. **Results** Acetone and Poloxamer 188 (F68) were selected as the organic solvent and the stabilizer for the optimal prescription, the ultrasonic time was 1 min, the magnetic stirring speed was 900 r/min, the magnetic stirring time was 30 min, the F68 concentration was 0.35%, the carrier dosage was 25 mg, the drug dosage was 1.0 mg. The ratio of organic phase to water phase was 0.54. The prepared B-PLGA nanoparticles were light blue opalescent transparent liquid with a particle size of (97.12 ± 4.23) nm, a PDI of 0.098 ± 0.035 , a Zeta potential of (-27.30 ± 0.31) mV, and an encapsulation efficiency of $(69.24 \pm 1.42)\%$, and the drug loading was $(2.65 \pm 0.03)\%$. Through characterization, the morphology of the nanoparticles was complete, and the *in vitro* release experiment showed that the *in vitro* release fit of the nanoparticles conforms to the Higuchi equation. **Conclusion**

收稿日期: 2020-09-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81703944); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (YQ2019H031); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目 (2018 年)

作者简介: 管庆霞, 博士, 副教授, 从事中药纳米递药系统及中药新药开发研究。Tel: (0451)87266893 E-mail: 546105832@qq.com

*通信作者: 冯宇飞, 博士, 副教授, 从事中药新技术与新剂型、方剂药效物质基础研究。Tel: (0451)87266893 E-mail: fuf-002@163.com

The method is stable and feasible, which can be used for the formulation and process optimization of PLGA nanoparticles containing brucine, and the optimized nanoparticles have slow-release effect.

Key words: brucine; polylactic acid-glycolic acid copolymer; nanoparticles; precipitation method; single factor method; star point design-response surface method; *in vitro* release; Higuchi equation; sustained release

马钱子碱 (brucine) 是马钱科马钱属植物马钱子 *Strychnos nux-vomica* L. 种子的主要活性物质^[1], 具有显著性镇痛、抗炎作用^[2], 还具有抗肿瘤、中枢神经系统兴奋等作用^[3-4], 是一种高效的抗肿瘤单体, 可用于胃癌、肠癌、肺癌、肝癌、白血病等疾病的治疗, 但是由于马钱子碱毒性大、水溶性差、体内代谢迅速, 且马钱子碱的治疗剂量与中毒剂量较接近^[5], 故传统制剂不利于马钱子碱发挥药效, 从而使其在临床上的应用受到了极大限制。

纳米技术在医学方面的应用研究一直备受瞩目, 是近年正在发展的一种新型毫微粒类给药系统, 可以降低药物的不良反应、延缓体内释放及具有良好的靶向性, 纳米药物在改善药物活性及降低药物毒性方面具有独特优势, 具有推动药学发展的巨大潜力^[6-8]。

目前, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 载体作为制剂辅料已被美国食品药品监督管理局和欧盟药品局批准用于临床, 是制备纳米粒应用最广泛的生物可降解高分子材料, 其对脂溶性药物具有较强的包裹能力, 同时降解速率规律, 可以实现药物的可控释放, 在药物制剂领域中具有巨大的开发价值和市场^[9-11]。

星点设计-效应面法是近年来常用的一种设计方法, 可以很好地完成二次项拟合工作, 具有实验次数相对较少、精确度高、操作简单、优选条件预测性好等优点^[12-13]。因此, 本实验采用该方法结合单因素考察法进行包载马钱子碱 PLGA (B-PLGA) 纳米粒的处方与工艺优化, 为马钱子碱进一步临床研究奠定了基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695-2698 高效液相色谱仪系统, 美国 Waters 公司; FA1204B 分析电子天平, 济南鑫贝西生物技术有限公司; HJ-3 恒温磁力搅拌器, 常州仪器制造有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; KQ-250DE 型数控超声波清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; LVEM5 低电压台式透射电子显微镜 (TEM), QUANTUM 量子科学仪器贸易有限公司。

1.2 试剂

马钱子碱对照品, 批号 110706-200505, 质量分数 98%, 中国食品药品检定研究院; 泊洛沙姆 188 (F68), 德国 BASF 公司; 司盘 40, 江苏四新界面剂科技有限公司; 甲醇, 色谱纯, 北京 Dikma 公司; 无水乙醇, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司。

2 方法与结果

2.1 B-PLGA 纳米粒中马钱子碱含量测定

2.1.1 检测波长的确定 称取适量的马钱子碱对照品, 将其溶解到色谱甲醇溶液中, 定容到合适的浓度, 二级阵列管检测器上设置检测波长 190~400 nm, 进行检测。马钱子碱在 223.3、265.7、301.2 nm 处有最大吸收峰, 结合相关文献报道^[4,14]的波长范围, 确定 265 nm 为马钱子碱的检测波长。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为 Dikma C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇- [水-乙酸-三乙胺 (230:2.4:0.3)] (30:70); 检测波长为 265 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 30 ℃。

2.1.3 供试品溶液的制备 从已经准备好的 B-PLGA 混悬液中精确量取 10 mL 溶液, 将其加入 15 mL 色谱甲醇中, 在 40 kHz、200 W 的环境下超声, 时间为 20 min, 使纳米粒破乳, 将处理后的溶液用孔径为 0.22 μm 的过滤膜滤过后得到 B-PLGA 纳米粒供试品溶液。用同样的方法制取 PLGA 空白纳米粒溶液。

2.1.4 对照品溶液的制备 先精确称量 3.1 mg 的马钱子碱, 加入甲醇溶液使其定容至 25 mL, 作为对照品储备液, 质量浓度为 124.00 μg/mL。

2.1.5 专属性考察 分别取 PLGA 空白纳米粒溶液、马钱子碱对照品溶液和 B-PLGA 供试品溶液在“2.1.2”项色谱条件下进行检测, 对其专属性进行考察, 结果见图 1。可以看到, 在该色谱检测条件下辅料对主药马钱子碱的含量测定没有干扰, 方法专属性良好, 因此符合测定要求。

2.1.6 线性关系考察 精密量取马钱子碱对照品溶液 10.00、5.00、2.50、1.25、0.63、0.31 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 配制出 6 种质量浓度的对照品溶液, 分别为 124.00、62.00、31.00、15.50、7.75、3.88 μg/mL。按“2.1.2”项色谱条件下进行检测, 并记

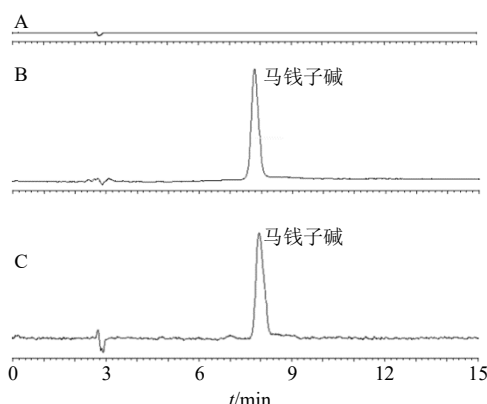


图1 PLGA空白纳米粒(A)、马钱子碱对照品溶液(B)和B-PLGA纳米粒(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of PLGA blank nanoparticles (A), brucine reference solution (B) and B-PLGA nanoparticles (C)

录峰面积,以马钱子碱质量浓度为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y),对其进行线性回归,得到线性回归方程为 $Y=15\,539X+39\,436$, $r=0.999\,7$,结果表明马钱子碱在 $3.88\sim 124.00\,\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 取 $124.00\,\mu\text{g/mL}$ 的马钱子碱对照品溶液,在“2.1.2”项色谱条件下1 d内测定6次,连续测定6 d(每天1次),日内精密度和日间精密度RSD分别为0.87%和0.90%,说明日内、日间精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取同一份B-PLGA纳米粒供试品溶液,分别在制备后0、2、4、8、10、12 h时,按“2.1.2”项色谱条件进样测定。结果发现12 h内马钱子碱峰面积RSD为1.12%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 分别取同一B-PLGA纳米粒样品6份,按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.2”项色谱条件下测定峰面积,计算得到马钱子碱质量浓度的RSD值为1.04%,表明该方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密吸取 $0.3\,\text{mL}$ 的空白纳米粒,共9份,分为3组,各组分别精密加入 $0.3\,\text{mL}$ 的低、中、高质量浓度(10 、 40 、 $70\,\mu\text{g/mL}$)的马钱子碱对照品溶液,各3份,混匀。将处理后的溶液用孔径为 $0.22\,\mu\text{m}$ 滤膜滤过,并在“2.1.2”项色谱条件下进样检测并记录,计算加样回收率,结果3种质量浓度溶液的平均加样回收率在98%~101%,且其RSD值均小于2%,结果表明该方法符合检测要求。

2.2 包封率与载药量的测定方法

选取几种常见包封率和载药量的测定方法,并对其优缺点等进行分析,选择出适宜的测定方法,不同测定方法实验结果见表1。

表1 不同测定方法的实验结果

Table 1 Different measurement methods test results

测定方法	包封率/%	RSD/%	载药量/%	RSD/%
低温超速离心法	65.54 ± 0.98	1.50	2.73 ± 0.04	1.47
葡聚糖凝胶色谱法	50.98 ± 1.91	3.75	2.46 ± 0.22	8.94
透析法	43.18 ± 1.19	2.76	2.44 ± 0.10	4.10

2.2.1 低温超速离心法 取出 $2\,\text{mL}$ 的B-PLGA纳米粒混悬液,并将其放置在离心机中,在离心半径 $40\,\text{cm}$, $15\,000\,\text{r/min}$ 转速下离心 $30\,\text{min}$,将沉淀的纳米粒收集,再用蒸馏水超声使其分散,继续离心,重复3次,然后用孔径为 $0.22\,\mu\text{m}$ 的过滤膜滤过,计算其包封率和载药量。

2.2.2 葡聚糖凝胶色谱法 取出 $2\,\text{mL}$ B-PLGA纳米粒混悬液,将其添加到已经经过处理的Sephadex G-50凝胶柱上,用蒸馏水洗脱 $2\,\text{min}$,收集纳米粒,然后用孔径为 $0.22\,\mu\text{m}$ 的过滤膜滤过,计算其包封率和载药量。

2.2.3 透析法 将装有 $2\,\text{mL}$ B-PLGA纳米粒透析袋置于透析外液为含20%乙醇pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,用转速为 $1000\,\text{r/min}$ 的磁力搅拌器搅拌 $4\,\text{h}$,取透析内液,用孔径为 $0.22\,\mu\text{m}$ 的过滤膜滤过,计算其包封率和载药量。

包封率及载药量计算公式为包封率 $= (W_2 - W_1)/W_2$,载药量 $= (W_2 - W_1)/W_3$,其中 W_1 为测得的游离马钱子碱含量, W_2 为马钱子碱总投料量, W_3 为B-PLGA纳米粒总量。

由表1可知,通过低温超速离心法得到的药物包封率与载药量最高,最低的是透析法;而且,透析法耗费的时间较长,所以不排除存在纳米粒中药物释放的可能;葡聚糖凝胶色谱法的RSD值较大,可能因为某批次样品稀释过程中导致药物泄露,使得包封率和载药量的数值不稳定;低温超速离心法测得包封率和载药量较高且偏差值较小;因此,本课题最终确定使用低温超速离心法对纳米粒的包封率进行检测。

2.3 B-PLGA纳米粒处方工艺优化

2.3.1 制备方法的选择 选取几种常见的制备方法,并对其制备过程及优缺点进行分析,选择出

B-PLGA 纳米粒适宜的制备方法, 不同制备方法实验结果见表 2。

复乳法: 用质量为 1.2 mg 药物和 1 mL 蒸馏水混合成溶液并将其作为内水相, 用 W_1 表示; 然后

表 2 不同制备方法实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Test results of different preparation methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制备方法	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
沉淀法	86.64±3.26	0.145±0.010	-28.94±0.78	57.39±2.21	2.23±0.03
复乳法	172.47±2.75	0.334±0.011	-13.29±0.72	45.67±1.84	1.81±0.05
盐析法	163.11±1.69	0.187±0.008	-10.66±0.86	42.08±1.97	1.62±0.04

用 25 mg 共聚物和 10 mL 丙酮混合并经过超声处理后作为油相, 用 O 表示; 用蒸馏水将聚山梨酯 80 制备成浓度为 0.2% 的水溶液作为外水相, 用 W_2 表示。操作方法: 首先取出 O 溶液并向其中加入 W_1 , 然后将 O 与 W_1 的混匀溶液放入细胞破碎仪中, 超声 30 s; 然后将其加入到 17.6 mL W_2 溶液中并放入磁力搅拌器中, 再次超声 30 min 后得到并 $W_1/O/W_2$ 复乳; 然后将溶液放入蒸发仪中除去有机溶剂, 获得纳米粒溶液。

沉淀法: 称取出 25 mg 共聚物, 将其放入到 10 mL 丙酮中, 超声使其溶解, 该溶液作为有机相。向里面添加 1.2 mg 药物, 再次超声使其充分溶解。配制 20 mL 含 0.05% F68 的水溶液, 将其作为水相, 将有机相加入到水相中并将其放在转速为 1000 r/min 的磁力搅拌 30 min, 将溶液放入旋转蒸发仪中除去有机溶剂, 获得纳米粒溶液。

盐析法: 取 0.5 mL PLGA 共聚物材料的丙酮溶液, 加入到 1.5 mL 含 28% $MgCl_2$ 的 F68 溶液中, 混合后的溶液超声 3 次, 每次时间为 10 s。再加入到 1.5 mL 的溶有 10 mg 药物的水中, 使丙酮扩散, 于室温条件下磁力搅拌, 直到丙酮全部挥干, 即得。

由表 2 可知, 不同的制备方法对制备 B-PLGA

纳米粒有着不同的影响。3 种方法比较后可知, 沉淀法制备纳米粒时药品包封率和载药量均高于其他 2 种方法, 粒径最小, 分散较好, 且沉淀法实验操作过程较其他 2 种方法简便。因此, 本课题选择使用沉淀法作为 B-PLGA 纳米粒的制备方法。

2.3.2 有机溶剂种类的考察 在保持其他条件不变的情况下, 以乙腈、丙酮、甲醇有机溶剂作为有机相制备纳米粒, 判断有机溶剂种类对 B-PLGA 纳米粒制备的影响, 结果见表 3。由实验数据可知, 丙酮作有机溶剂时的纳米粒的平均粒径最小, 但是其包封率和载药量都最大, 粒径分布均匀, 体系稳定, 所以本实验最后确定有机溶剂为丙酮。

2.3.3 稳定剂种类的考察 在保持其他条件不变的情况下, 分别以 F68、聚山梨酯 80、司盘 40 3 种表面活性剂为稳定剂制备纳米粒, 考察不同种类稳定性对 B-PLGA 纳米粒制备的影响, 结果见表 4。随着稳定剂的改变, 平均粒径和 Zeta 电位逐渐变大, 而 PDI 均较好, 包封率和载药量都在逐渐变小, 由此可见, F68 较聚山梨酯 80 和司盘 40 更加稳定, 所以应用 F68 作为本实验的稳定剂。

2.3.4 超声时间的考察 保持其他条件不变, 考察超声时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 min 时,

表 3 不同种类有机溶剂实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Test results of different organic solvents ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有机溶剂	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
乙腈	97.36±2.49	0.128±0.013	-10.92±0.92	51.41±3.41	1.96±0.04
丙酮	71.99±1.54	0.291±0.009	-18.36±0.47	65.24±5.93	2.50±0.11
甲醇	146.30±3.57	0.306±0.024	-9.63±0.58	39.10±1.69	1.50±0.09

表 4 不同种类稳定剂实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Test results of different stabilizers ($\bar{x} \pm s, n=3$)

稳定剂	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
F68	82.67±1.60	0.274±0.029	-17.8±0.59	64.46±3.79	2.50±0.09
聚山梨酯 80	86.89±3.74	0.131±0.018	-16.8±0.91	55.73±2.56	2.12±0.01
司盘 40	160.37±3.69	0.193±0.012	-11.2±0.83	54.19±1.09	2.08±0.14

对 B-PLGA 纳米粒制备的影响, 结果见表 5。随着超声时间的增加, 平均粒径和 Zeta 电位均是先减小后增大, 而其包封率和载药量都是先增大之后减小。根据推测可能是因为超声时间的增加会使得纳米粒重新聚结, 导致药物泄漏, 粒径增大, 包封率和载药量变小, 所以本实验最后确定超声时间为 1.0 min。

表 5 不同超声时间实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Test results of different ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
0.5	110.24 $\pm$ 3.09	0.107 $\pm$ 0.019	-6.01 $\pm$ 0.31	40.92 $\pm$ 2.98	1.58 $\pm$ 0.09
1.0	74.53 $\pm$ 2.08	0.251 $\pm$ 0.007	-23.09 $\pm$ 0.13	61.62 $\pm$ 1.05	2.38 $\pm$ 0.03
1.5	90.61 $\pm$ 2.63	0.172 $\pm$ 0.021	-6.75 $\pm$ 0.61	53.44 $\pm$ 2.60	2.04 $\pm$ 0.20
2.0	96.53 $\pm$ 2.78	0.224 $\pm$ 0.013	-6.32 $\pm$ 0.34	48.72 $\pm$ 2.04	1.88 $\pm$ 0.10
2.5	112.47 $\pm$ 3.12	0.131 $\pm$ 0.009	-5.89 $\pm$ 0.18	45.46 $\pm$ 1.35	1.45 $\pm$ 0.32

表 6 不同磁力搅拌速率对 B-PLGA 纳米粒的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of different stirring rate on B-PLGA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌速率/(r·min ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
300	92.86 $\pm$ 3.60	0.214 $\pm$ 0.019	-15.39 $\pm$ 0.62	59.08 $\pm$ 5.31	2.30 $\pm$ 0.05
600	102.62 $\pm$ 1.99	0.185 $\pm$ 0.032	-17.02 $\pm$ 0.13	61.71 $\pm$ 3.18	2.38 $\pm$ 0.23
900	69.72 $\pm$ 2.71	0.237 $\pm$ 0.005	-25.57 $\pm$ 0.19	66.20 $\pm$ 4.35	2.54 $\pm$ 0.37
1200	98.51 $\pm$ 2.45	0.152 $\pm$ 0.009	-12.44 $\pm$ 0.87	54.91 $\pm$ 5.72	2.01 $\pm$ 0.09
1500	103.29 $\pm$ 4.51	0.112 $\pm$ 0.053	-9.60 $\pm$ 0.71	49.92 $\pm$ 4.09	1.92 $\pm$ 0.11

2.3.6 磁力搅拌时间的考察 保持其他条件不变, 考察 10、20、30、40、50 min 5 个磁力搅拌时间对 B-PLGA 纳米粒制备的影响, 结果见表 7。当磁力搅拌时间为 30 min 时, 纳米粒的分布相对均匀, 粒径的大小变化不大, 包封率和载药量都最大, 所以本实验最后确定的磁力搅拌时间为 30 min。

2.3.7 稳定剂 F68 用量的考察 保持其他条件不变的前提下, 将 F68 用量设置成 0、0.05%、0.10%、0.50%、1.00% 系列不同的用量制备纳米粒。考察 F68 用量对 B-PLGA 纳米粒制备的影响, 结果见表 8。随 F68 用量的逐渐增加, 平均粒径逐渐变大, 但包

2.3.5 磁力搅拌速率的考察 保持其他条件不变, 考察 300、600、900、1200、1500 r/min 5 个搅拌速率对 B-PLGA 纳米粒制备的影响, 结果见表 6。当磁力搅拌速率在 900 r/min 时平均粒径最小, 纳米粒的分布相对均匀, 体系稳定, 包封率和载药量均处于最大值。所以, 本实验磁力搅拌的速度确定为 900 r/min。

封率和载药量均呈先变大后又变小的趋势, 由此可知, F68 用量对 B-PLGA 纳米粒制备的影响较大, 而在 F68 用量为 0.5% 左右包封率载药量较大, 所以本实验最后确定 F68 用量为 0.50% 左右, 需进一步优化。

2.3.8 载体 PLGA 用量的考察 保持其他条件不变, 选择 10、20、30、40、50 mg 5 个 PLGA 用量对制备 B-PLGA 纳米粒的影响, 结果见表 9。平均粒径和 Zeta 电位先变小后变大, 包封率先变大后变小, 载药量逐渐变小, 可见载体 PLGA 用量对 B-PLGA 纳米粒的制备影响较大, 载体用量在 20 mg

表 7 不同磁力搅拌时间实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Test results of different magnetic stirring time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/min	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
10	65.14 $\pm$ 2.91	0.183 $\pm$ 0.012	-15.73 $\pm$ 0.26	48.28 $\pm$ 1.22	1.83 $\pm$ 0.02
20	70.94 $\pm$ 3.01	0.191 $\pm$ 0.009	-19.64 $\pm$ 0.52	56.71 $\pm$ 3.07	2.19 $\pm$ 0.13
30	89.01 $\pm$ 2.92	0.136 $\pm$ 0.010	-10.37 $\pm$ 0.90	63.60 $\pm$ 2.94	2.46 $\pm$ 0.07
40	93.29 $\pm$ 2.84	0.109 $\pm$ 0.005	-5.47 $\pm$ 0.73	50.77 $\pm$ 3.74	1.96 $\pm$ 0.15
50	92.89 $\pm$ 2.03	0.103 $\pm$ 0.003	-7.82 $\pm$ 0.92	49.04 $\pm$ 2.68	1.88 $\pm$ 0.06

表 8 稳定剂 F68 不同用量实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Test results of different stabilizer concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

F68 用量/%	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
0	69.20±0.99	0.132±0.009	-15.62±0.17	53.07±1.14	2.04±0.15
0.05	72.09±1.96	0.224±0.020	-18.63±0.21	54.16±2.01	2.08±0.01
0.10	70.61±2.19	0.177±0.016	-21.14±0.10	61.60±1.91	2.35±0.04
0.50	79.62±1.97	0.174±0.008	-19.90±0.26	62.71±1.63	2.42±0.11
1.00	84.91±3.60	0.087±0.004	-10.43±0.14	53.95±2.31	2.08±0.06

表 9 不同载体用量实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 9 Test results of different carrier dosages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PLGA 用量/mg	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
10	78.60±3.09	0.124±0.014	-16.69±0.41	54.12±3.61	5.40±0.10
20	74.29±4.01	0.223±0.020	-21.94±0.72	65.59±2.11	2.54±0.04
30	79.20±0.89	0.219±0.008	-20.24±0.11	62.97±1.49	2.21±0.12
40	80.01±2.13	0.174±0.027	-17.95±0.23	57.33±3.90	1.39±0.09
50	98.83±3.47	0.186±0.018	-15.38±0.56	50.36±2.81	0.98±0.03

时, 包封率最大, 所以需对载体用量进一步优化。

2.3.9 药物用量的考察 保持其他条件不变, 通过改变药物用量, 判断药物用量对 B-PLGA 纳米粒制备的影响。分别制备 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg 5 个药物用量的纳米粒, 结果见表 10。随着药物用量的增加, 平均粒径逐渐变大, Zeta 电位先变小后变大, 包封率和载药量先变大后变小, 药物用量在 1.0 mg 时, 包封率和载药量均最大, 所以本实验最后确定的药物用量为 1.0 mg。

2.3.10 有机相与水相体积比的考察 保持其他条

件不变, 将有机溶剂与水的体积比作为变量, 分别设置 5 个比例 1:1.5、1:2、1:3、1:4、1:5 考察对制备的 B-PLGA 纳米粒的影响, 结果见表 11。有机相与水相比比例的逐渐减小, 使得平均粒径和 Zeta 电位值先变小后又逐渐变大, 分布均匀, 体系稳定, 包封率和载药量均逐渐增大后减小。因此, 当有机溶剂和水的比例在 1:2 时, 纳米粒的状态最好, 可进一步优化。

2.4 星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 优化处方

2.4.1 实验设计 在前期对于影响 B-PLGA 纳米粒

表 10 不同药物用量实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 10 Test results of different dosage of drugs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物用量/mg	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
0.5	68.90±1.33	0.239±0.009	-8.93±0.67	44.22±1.66	1.69±0.03
1.0	70.13±2.19	0.162±0.021	-18.92±0.14	60.11±0.91	2.31±0.11
1.5	75.88±1.35	0.082±0.005	-13.61±0.03	46.08±1.63	1.77±0.02
2.0	98.45±2.77	0.121±0.011	-12.13±0.23	42.72±1.37	1.72±0.14
2.5	106.32±1.79	0.078±0.023	-12.01±0.48	31.28±2.16	1.61±0.08

表 11 不同有机相水相比比例实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 11 Test results of water ratio of different organic phases ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

有机相与水相体积比	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1:1.5	77.63±3.83	0.114±0.004	-13.26±0.33	51.71±0.99	2.00±0.04
1:2	72.31±1.09	0.217±0.013	-20.04±1.02	65.12±1.28	2.50±0.02
1:3	74.76±2.00	0.191±0.017	-15.77±0.04	50.94±1.71	1.92±0.11
1:4	88.12±1.77	0.248±0.006	-13.89±1.33	47.31±0.18	1.81±0.02
1:5	103.57±3.67	0.138±0.010	-12.09±0.58	40.22±1.13	1.58±0.16

各种指标的单因素考察基础之上,发现载体 PLGA 用量、有机相与水相体积比、稳定剂 F68 用量对方考察指标影响较大,所以本实验需要针对这 3 个因素进行更加深入的 CCD 实验设计。本实验共从 5 个角度对其进行衡量,其中包括中心点、析因设计点、极值点。当 $r=1.682$, 各个变量范围的实际大小和标准大小见表 12。本实验将包封率和载药量作为响应参数,分别用 Y_1 和 Y_2 表示,然后进行 CCD 实验,实验结果见表 13。

2.4.2 模型拟合及方差分析 分析软件为 Design-Expert V8.0.6,以包封率(Y_1)、载药量(Y_2)分别对 A、B、C 实验数据进行二次多项式回归方程拟合。二次多项式拟合方程: $Y_1=71.42-0.042 A+6.41 B+0.72 C-1.14 AB+1.34 AC+4.27 BC-3.60 A^2-5.61 B^2-0.93 C^2$ ($r^2=0.9158$, $P=0.0001$); $Y_2=1.86-9.153 \times 10^{-3} A+0.061 B+0.011 C-0.016 AB+0.026 AC+0.091 BC-0.071 A^2-0.120 B^2-0.018 C^2$ ($r^2=0.8851$, $P=0.0001$)。从 r^2 和 P

表 12 各变量范围实际值标准化值

Table 12 Real value and code of each variable scope

水平	载体 PLGA 用量(A)/mg	稳定剂 F68 用量(B)/%	有机相与水相 体积比(C)
-1.682	10.00	0.05	0.33
-1	16.08	0.14	0.40
0	25.00	0.28	0.50
+1	33.92	0.41	0.60
+1.682	40.00	0.50	0.67

表 13 CCD 的实验设计及结果

Table 13 Design and result of central composite design

试验号	影响因素			响应值	
	A/mg	B/%	C	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	33.92	0.14	0.60	51.42	1.96
2	16.08	0.41	0.60	63.17	2.42
3	16.08	0.14	0.60	48.69	1.88
4	33.92	0.41	0.60	60.01	2.31
5	16.08	0.14	0.40	61.87	2.35
6	25.00	0.28	0.50	69.21	2.69
7	10.00	0.28	0.50	60.18	2.31
8	33.92	0.41	0.60	69.27	2.65
9	25.00	0.28	0.33	67.40	2.58
10	16.08	0.41	0.40	67.19	2.57
11	33.92	0.14	0.40	57.17	2.19
12	40.00	0.28	0.50	67.60	2.62
13	25.00	0.28	0.50	63.64	2.46
14	25.00	0.28	0.50	64.02	2.47
15	25.00	0.28	0.67	65.48	2.50
16	25.00	0.28	0.50	62.80	2.38
17	25.00	0.28	0.50	62.97	2.42
18	25.00	0.28	0.50	61.29	2.35
19	25.00	0.50	0.50	69.23	2.65
20	25.00	0.05	0.50	47.20	1.81

的计算结果可以看出,二次多项式的拟合相对较好,因此可用此模型对 B-PLGA 纳米粒的处方进行分析和预测,其分析实验结果分别见表 14。由表 14 可

表 14 Y_1 和 Y_2 方差分析实验结果

Table 14 Y_1 and Y_2 analysis of variance test results

因素	自由度	Y_1					Y_2				
		平方和	均方	F 值	P 值	显著性	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	1 327.400	147.490	12.090	0.000 3	极显著	0.380	0.042	8.560	0.001 2	极显著
A	1	0.024	0.024	1.958×10^{-3}	0.965 6		1.144×10^{-3}	1.144×10^{-3}	0.230	0.638 5	
B	1	561.130	561.130	46.000	<0.000 1	极显著	0.051	0.051	10.520	0.008 8	极显著
C	1	7.180	7.180	0.590	0.460 8						
AB	1	10.370	10.370	0.850	0.378 1		2.112×10^{-3}	2.112×10^{-3}	0.430	0.525 2	
AC	1	14.340	14.340	1.180	0.303 7		5.513×10^{-3}	5.513×10^{-3}	1.130	0.312 6	
BC	1	145.950	145.950	11.970	0.006 1	极显著	0.067	0.067	13.670	0.004 1	极显著
A^2	1	186.980	186.980	15.330	0.002 9	极显著	0.072	0.072	14.790	0.003 2	极显著
B^2	1	453.300	453.300	37.160	0.000 1	极显著	0.200	0.200	40.250	<0.000 1	极显著
C^2	1	12.540	12.540	1.030	0.334 6		4.509×10^{-3}	4.509×10^{-3}	0.930	0.358 8	
残差	10	121.980	12.200				0.049	4.874×10^{-3}			

知, Y_1 、 Y_2 模型项 $P < 0.001$, 说明回归方程的关系是极显著的。对于 Y_1 模型方程 B、BC、 A^2 、 B^2 都是显著项, 是 Y_1 的显著影响因素, 交互影响因素

3D 效果图与等高线图见图 2。对于 Y_2 模型方程 B、BC、 A^2 、 B^2 都是显著项, 是 Y_2 的显著影响因素, 交互影响因素 3D 效果图与等高线图见图 3。

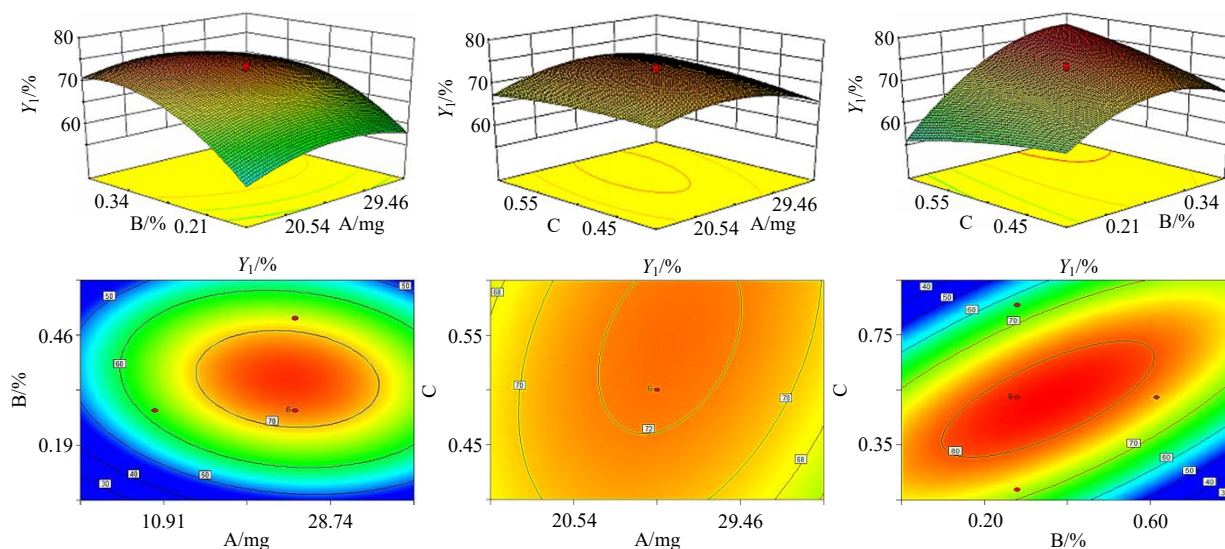


图 2 Y_1 响应面图与等高线

Fig. 2 Contour and response surface diagram of Y_1

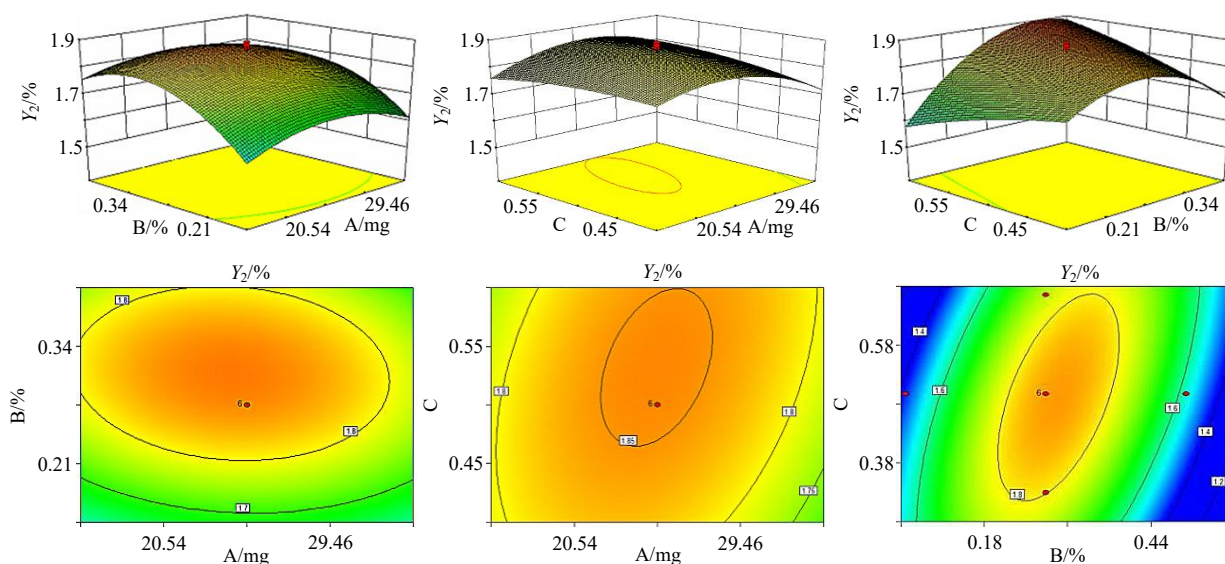


图 3 Y_2 响应面图与等高线

Fig. 3 Contour and response surface diagram of Y_2

2.4.3 响应面优化与预测 根据上述实验结果可以看到, 公共区域中效应面响应值较高部分为最佳的区域, 由 Design-Expert V8.0.6 软件设计优化各因素, 最终确定包封率、载药量最高的处方条件是 $A = 25$ mg, $B = 0.35\%$, $C = 0.54$, $Y_1 = 72.42\%$, $Y_2 = 2.77\%$ 。

2.4.4 优化后处方验证 综上所述, B-PLGA 纳米粒最优处方是丙酮作为有机溶剂, F68 作为稳定剂, 超声时间为 1 min, 磁力搅拌速率为 900 r/min, 磁

力搅拌时间为 30 min, F68 用量为 0.35%, 载体用量为 25 mg, 药物用量为 1.0 mg, 有机相与水相体积比为 0.54。优化后处方验证结果见表 15, 可以看

表 15 验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 15 Results of process validation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

指标	预测值/%	实际值/%	相对偏差/%
包封率	72.42	69.24 ± 1.42	4.39
载药量	2.77	2.65 ± 0.03	4.33

出, 预测值和实测值之间的相对偏差 [相对偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值] 在 5% 以下, 表明优化后的处方验证试验的预测值与实测值基本相吻合, 经过 CCD-RSM 进行预测, 结果显示其效果较好, 因此, 可以描述效应面和影响因素之间的关系。按优化后的工艺及处方制备 3 批 B-PLGA 纳米粒样品, PDI、平均粒径、Zeta 电位、包封率及载药量测定结果见表 16, 外观见图 4。由表 16 可知, 3 批

样品批间的各项指标变化差异小, 重现性良好; 由图 4 可知, B-PLGA 纳米粒为淡蓝色乳光透明液体。

2.5 B-PLGA 纳米粒的表征

取适量最优工艺条件下制得的 B-PLGA 纳米粒溶液在其中取出 40 μL 溶液滴在铜网上 (用支持膜覆盖), 将多余的液体用滤纸吸净, 放置在自然环境中待其风干。向其中加入浓度为 2% 磷钨酸染色约 30 s, 将其放在电镜下观察, 结果见图 5。该纳

表 16 验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 16 Result of process validation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1	92.98 $\pm$ 0.62	0.056 $\pm$ 0.016	-26.92 $\pm$ 0.27	71.24 $\pm$ 0.38	2.69 $\pm$ 0.03
2	102.93 $\pm$ 0.48	0.097 $\pm$ 0.068	-27.69 $\pm$ 0.46	68.13 $\pm$ 0.47	2.62 $\pm$ 0.07
3	95.45 $\pm$ 0.35	0.141 $\pm$ 0.022	-27.29 $\pm$ 0.52	68.35 $\pm$ 0.64	2.64 $\pm$ 0.04



图 4 B-PLGA 纳米粒样品外观

Fig. 4 Appearance of B-PLGA nanoparticles

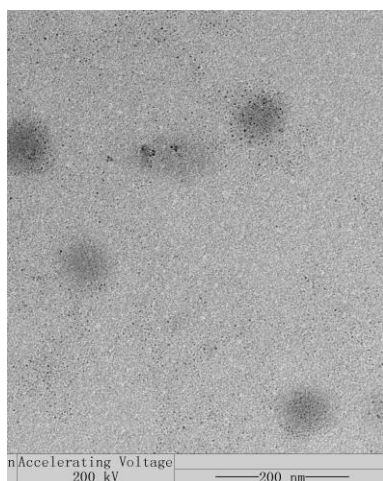


图 5 B-PLGA 纳米粒透射电镜图 ($\times 25\ 000$)

Fig. 5 Picture of B-PLGA nanoparticles by TEM ($\times 25\ 000$)

米粒的形态为类球形, 各个粒子之间的分布相对均匀且没有明显的粘连现象。用激光粒度分析仪测定平均粒径及 Zeta 电位, 结果见图 6、7。

2.6 B-PLGA 纳米粒体外释药实验

体外试药研究采用动态透析法。首先精密称取

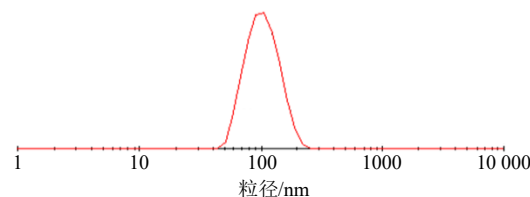


图 6 B-PLGA 纳米粒的粒径图

Fig. 6 Particle size distribution of B-PLGA nanoparticles

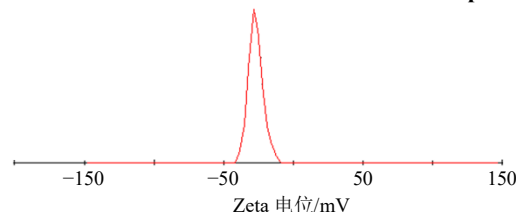


图 7 B-PLGA 纳米粒的 Zeta 电位图

Fig. 7 Zeta potential distribution of B-PLGA nanoparticles

B-PLGA 纳米粒冻干品 (相当于马钱子碱为 5 mg), 用 5 mL 生理盐水稀释, 当二者完全处于混合状态后将溶液置于处理过的透析袋中, 将透析袋的两头扎紧后放入具塞锥形瓶中; 将 50 mL 的释放介质放入瓶中, 此时应保证透析袋完全浸没在释放介质中; 将锥形瓶放入恒温水浴振荡器中, 温度设置在 36.8~37.2 $^{\circ}\text{C}$, 振摇速率设置为 100 r/min; 释放开始后, 分别于 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、10、12、18、24、36、48、60、72 h 时, 用移液枪量取 1 mL 透析含药外液, 同时补充相同体积的透析空白外液, 用孔径为 0.22 μm 的滤膜对其进行滤过, 用相同的方法测定 3 次, 计算 B-PLGA 纳米粒的药物累积释放率。另精密称取相同质量的马钱子碱原料药, 按上述方法操作进行体外释药研

究,以累积释药率对释药时间作图,绘制释放曲线,马钱子碱、B-PLGA 纳米粒的释药曲线如图 8 所示,进行体外释药动力学拟合,结果见表 17。各时间点的药物累积释放率(Q)计算公式如下。

$$Q=(V_0C_t+V\sum_{n=1}^{t-1}C_i)/W$$

V_0 为释放介质的总体积, C_t 为各时间点测得的药物质量浓度, V 为每次取样体积, W 为投入药物总质量

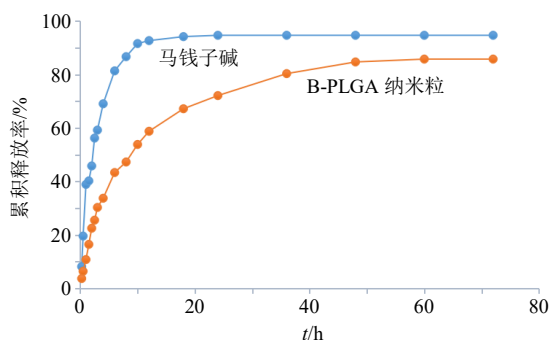


图 8 B-PLGA 纳米粒与马钱子碱的累积释药率曲线

Fig. 8 *In vitro* release curve of B-PLGA nanoparticles and brucine

表 17 B-PLGA 纳米粒组体外释放拟合结果

Table 17 Models for drug release fitting of B-PLGA nanoparticles

模型	回归方程	R^2
零级动力学	$Q=1.007t+27.007$	0.730
一级动力学模型	$Q=83.706\{1-\exp[-0.099(t+0.710)]\}$	0.601
Higuchi 方程	$Q=9.268+10.951t^{1/2}$	0.948

由上述结果可知,在释放介质中,马钱子碱溶液组释药相对较快,24 h 时马钱子碱已基本全部释放,累积释放率为 94.65%,而 B-PLGA 纳米粒组前 4 h 时释药较快,累积释放率为 33.69%,之后释药曲线渐趋平稳,药物缓慢释放,48 h 药物基本释放完全,72 h 累积释放率为 85.74%。可见,将马钱子碱制成 B-PLGA 纳米粒后,具有一定的缓释效果,拟合结果表明最符合 Higuchi 方程 ($R^2=0.948$),属于典型的缓释模型。

3 讨论

本实验在进行处方优化时,F68 具有极强的表面活性,其用量对样品的乳化程度影响很大,进一步影响装载药物的能力,故非离子型表面活性剂 F68 用量对样品的包封率影响较大。有机相与水相的比例对纳米粒包封率的影响可能是影响其形成纳米粒的过程,有机相与水相间溶剂的交换及界面

作用也在一定程度上决定了样品成型的优劣。有限的载体装载药物的能力也有限,故载体用量对样品的包封率及载药量影响极大。载体用量较大时,样品极易聚集使粒径增加;载体用量过少,包封药物量过低,故合适的载体用量是马钱子碱纳米粒制备的关键影响因素。

B-PLGA 纳米粒的制备工艺由诸多因素影响,且单因素或正交设计不能准确预测多因素的交互作用。星点设计-效应面法具有实验次数相对较少,精密度高、优选条件预测性好与实际大生产相吻合等特点^[15-16],故在制备工艺的单因素基础上采用星点设计-效应面法,考察载体用量、有机相与水相的比例、稳定剂浓度 3 个因素对 B-PLGA 纳米粒制备的影响并进一步优化处方。通过模型拟合及方差分析可知此模型可用于 B-PLGA 纳米粒的处方的分析和预测。通过优化后的处方验证表明,实测值与预测值之间的相对偏差较小,并且对优化后的 B-PLGA 纳米粒进行微观形态观察和体外释放试验,显示纳米粒形态完整且具有一定缓释效果,表明优化后的纳米粒模型良好。本实验成功制备并优化了 B-PLGA 纳米粒,为马钱子碱进一步临床研究提供参考,为纳米给药系统研究提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tang M, Zhu W J, Yang Z C, *et al.* Brucine inhibits TNF- α -induced HFLS-RA cell proliferation by activating the JNK signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 735-740.
- [2] Yu G, Qian L, Yu J, *et al.* Brucine alleviates neuropathic pain in mice via reducing the current of the sodium channel [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 233: 56-63.
- [3] 金晨, 陈家乐, 徐玲霞, 等. 马钱子总碱脂质液晶纳米粒的制备和体外评价研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5305-5312.
- [4] 邓向涛, 阮晓东, 郝海军. 马钱子碱固体脂质纳米粒凝胶骨架缓释片的研制 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5298-5304.
- [5] 胡亚, 刘运锋, 朱卫丰, 等. 马钱子生物碱类成分在 MDCK-MDR1 单层细胞模型中的转运机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2876-2883.
- [6] 陈坚平, 方玉婵, 申楼. 熊果酸-PLGA 纳米粒的工艺研究及其表征 [J]. *中药材*, 2016, 39(10): 2315-2317.
- [7] 柯文冬. 克服药物递送障碍的智能型纳米药物载体 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2020.
- [8] 高珩. 纳米技术在生物医药方面的应用研究 [J]. *创新*

- 创业理论与实践, 2020, 3(5): 168-169.
- [9] 阙晓, 高明, 郭朋程, 等. 红细胞膜包载粉防己碱 PLGA 纳米粒的制备与体外评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(5): 401-407.
- [10] 封焯, 周朝阳, 刘芊芊, 等. 星点设计-效应面法优化长春新碱长循环纳米粒的制备工艺 [J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2020, 34(4): 296-301.
- [11] 徐晓川. IR780-VPN 靶向纳米粒的制备及体外抗肾母细胞瘤增殖试验 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
- [12] 王博, 李洪起, 连潇嫣, 等. 星点设计-效应面法优化阿德福韦- β -环糊精包合物制备工艺的研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1227-1230.
- [13] 王婴, 李木生, 吴瑞婵, 等. 星点设计-效应面法优化青藤碱聚乳酸-羟基乙酸纳米粒的制备工艺 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(2): 232-237.
- [14] 刘丽丽, 史畑女, 方蕾, 等. 马钱子总碱-白芍总苷脂质立方液晶纳米粒制备及体外评价 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4076-4083.
- [15] 严春临, 张季, 刘敏, 等. 星点设计-效应面法优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒处方 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1307-1313.
- [16] 郝吉福, 房信胜, 王建筑, 等. 应用 Box-Behnken 实验设计优化水飞蓟素固体脂质纳米粒处方研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2221-2225.

[责任编辑 郑礼胜]