

星点设计-效应面法优化负载和厚朴酚的当归多糖-小檗碱聚合物胶束的处方工艺研究

王彬彬, 吕 白, 张 琦, 王玲钰, 张 旭, 于 超, 周建文, 韩翠艳*

齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要:目的 通过星点设计-效应面法优化负载和厚朴酚(honokiol, HNK)的当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP)-小檗碱(berberine, Ber)聚合物胶束(ASP-SS-Ber/HNK)的处方工艺并考察其制剂学性质。方法 HPLC 法测定 HNK 的含量;采用薄膜水化法制备 ASP-SS-Ber/HNK, 在单因素实验的基础上,以粒径、载药量以及包封率为评价指标,对载药比、水化温度和水化时间进行处方工艺筛选,采用星点设计-效应面法进行 3 因素 3 水平的实验,分析结果得出最优处方工艺并对其进行验证;使用透射电子显微镜(TEM)和粒径仪观察测定 ASP-SS-Ber/HNK 形态、平均粒径和 ζ 电位,通过体外释药对该载药系统进行评价并考察其稳定性。结果 优化得到的 ASP-SS-Ber/HNK 最佳处方工艺:当归多糖-小檗碱载体(ASP-SS-Ber)与 HNK 的投药量分别为 5.00 mg 和 0.71 mg、水化温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、水化时间为 100 min。采用最优处方制得的负载 HNK 的胶束制剂对 HNK 的载药量为 $(9.22 \pm 0.42)\%$,包封率为 $(71.77 \pm 1.20)\%$;胶束平均粒径为 (44.38 ± 2.95) nm; ζ 电位接近于 (-10.32 ± 1.26) mV。在含有谷胱甘肽(GSH 为 10 mmol/L)的体外释放介质中 72 h 累积释放率达到 80.2%;12 h 的吸光度维持在 0.29 ± 0.01 ,连续 7 d 内的粒径稳定在 (45.14 ± 0.67) nm, ζ 电位稳定在 (-10.46 ± 0.60) mV。结论 星点设计-效应面法所建立的模型精度高,可用于 ASP-SS-Ber/HNK 胶束制剂的处方优化。

关键词:和厚朴酚;当归多糖;小檗碱;胶束;薄膜水化法;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(2022)04-1021-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.008

Optimization of prescription process of *Angelica sinensis* polysaccharide-berberine micelle loaded with honokiol by central composite design-response surface method

WANG Bin-bin, LYU Bai, ZHANG Qi, WANG Ling-yu, ZHANG Xu, YU Chao, ZHOU Jian-wen, HAN Cui-yan
School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China

Abstract: Objective To optimize the prescription process of *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP)-berberine (Ber) micelle loaded with honokiol (HNK) (ASP-SS-Ber/HNK) by central composite design-response surface method and investigate its formulation properties. **Methods** The content of HNK was determined by HPLC; ASP-SS-Ber/HNK was prepared by thin film hydration method. On the basis of single factor experiment, particle size, drug loading and encapsulation rate were used as the evaluation index to screen the prescription process for drug loading ratio, hydration temperature and hydration time. Central composite design-response surface method was used to carry out three factors and three levels experiment, and the results were analyzed to get the optimal prescription process and verify it. The morphology, average particle size and ζ potential of ASP-SS-Ber/HNK were observed and determined by transmission electron microscope and particle size analyzer, and the drug delivery system was evaluated by *in vitro* drug release and its stability was examined. **Results** The optimal preparation process was as follow: the dosage of *A. sinensis* polysaccharide-berberine carrier (ASP-SS-Ber) and HNK was 5.00 mg and 0.71 mg, the hydration temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$, and the hydration time was 100 min. The compound loaded with HNK micelles prepared by the optimum formulation had the loading capacity of $(9.22 \pm 0.42)\%$ and entrapment rate of honokiol was $(71.77 \pm 1.20)\%$; the average particle size of the micellar preparation was (44.38 ± 2.95) nm and the ζ potential was close to (-10.32 ± 1.26) mV. The cumulative release amount in *in vitro* release medium containing glutathione

收稿日期: 2021-09-14

基金项目: 齐齐哈尔市科技攻关项目(LHYD-2021001); 国家自然科学基金项目(82174097)

作者简介: 王彬彬, 硕士研究生。Tel: 18249277702 E-mail: 2076963831@qq.com

*通信作者: 韩翠艳, 教授, 硕士生导师。Tel: (0452)2663822 E-mail: hcymuphar@qmu.edu.cn

(GSH was 10 mmol/L) reached 80.2% in 72 h; the absorbance for 12 h was maintained at $(0.29 \pm 0.01)\%$, the particle size was stabilized at $(45.14 \pm 0.67)\%$ for seven consecutive days, and the potential was stabilized at (-10.46 ± 0.60) mV. **Conclusion** The model established by central composite design-response surface method had high accuracy and could be used to optimize the formulation of ASP-SS-Ber/HNK micelle preparations.

Key words: honokiol; *Angelica sinensis* polysaccharide; berberine; micelle; film hydration method; central composite design-response surface method

靶向纳米颗粒的制备一般是在纳米颗粒表面修饰靶向配体,因而可以与细胞表面受体特异性地相互作用^[1]。与引入肝靶向基团的复杂性相比,具有内在肝靶向能力的多糖则使制备更为简单^[2]。当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP)是中药当归的主要活性成分之一,具有天然的肝脏靶向功能^[3]。所以构建以当归多糖为亲水链段的胶束而不进行任何靶向修饰是一种很好的策略^[4-5]。小檗碱(berberine, Ber)是一种亲脂性阳离子,本身具有抗肝癌作用及靶向线粒体的特性^[6],但是较差的膜通透性使其不易进入细胞,较低的生物利用度也限制了其应用^[7]。利用二硫键将当归多糖与小檗碱相连,将其作为胶束的疏水链段,提高了小檗碱的跨膜性^[8],小檗碱定位于线粒体处,在线粒体高浓度的谷胱甘肽(glutathione, GSH)下^[9],使具有氧化还原敏感的二硫键裂解,释放出所负载的药物^[10]。和厚朴酚(honokiol, HNK)是厚朴的主要活性成分^[11],具有线粒体依赖性的抗肿瘤作用^[12-13],在抗肝癌方面展现出较好的药理活性,但是较差的溶解性导致其具有较低的药效^[14-15]。因此,将其包载在当归多糖与小檗碱连接构建的载体(ASP-SS-Ber)中,可改善其溶解性,在靶向线粒体的同时提高药效。制备ASP-SS-Ber/HNK理论上可以利用当归多糖^[16]和小檗碱^[17]的特性,起到靶向抗肿瘤的作用。

本研究以胶束平均粒径以及和厚朴酚包封率和载药量为评价指标,考察负载和厚朴酚的当归多糖-小檗碱聚合物胶束(ASP-SS-Ber/HNK)处方中主要因素对制剂的影响,确定了最优处方^[18-19],为制剂的进一步研究奠定了基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪,山东鲁南瑞虹有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 纳米粒度仪,英国 Malvern 仪器有限公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司; UV-2550 紫外可见分光光度计,北京浦西通用仪器有限公司; 5417R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司; AL 204 电子天

平,梅特勒-托利多上海有限公司; 一次性无菌注射器,辽宁众源医疗器械有限公司; Genex Beta 移液器,北京普析通用仪器有限公司; HT7700 透射电子显微镜,日立高新技术公司; S-250D 超声细胞破碎仪,美国 Branson 公司; EYELA 旋转蒸发仪,郑州科泰实验设备有限公司; QT-2 涡旋混合器,上海琪特分析仪器有限公司; ZHWY-200D 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器有限公司。

1.2 试药

和厚朴酚,批号 MB5989,质量分数 98%,大连美仑生物技术有限公司; 当归多糖,批号 B25568,质量分数 90%,相对分子质量 40 000 左右,上海源叶生物科技有限公司; 盐酸小檗碱(批号 B802465,质量分数 98%)、苕(批号 P817273,质量分数 99%)、还原型谷胱甘肽(批号 G6268,质量分数 99%,生物技术级)、聚乙二醇(PEG)2000(批号 D875844,质量分数 98%),上海麦克林生化科技有限公司; ASP-SS-Ber,课题组自制; 甲醇、乙腈,色谱纯,天津市科密欧有限公司; 泊洛沙姆-188(批号 WPWL549B,质量分数 98%)、二甲基亚砜(分析纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Kolliphor ELP(批号 Batch Weight,纯化级),北京凤礼精求医药股份有限公司; 透析袋,截留相对分子质量 14 000,上海易佰聚经贸有限公司; 丙酮,分析纯,哈尔滨化工化学试剂厂; 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.5),上海盛思生化科技有限公司; 2%磷酸负染液,北京酷来搏科技有限公司; 聚山梨酯 80,质量分数 97%,国药集团化学试剂有限公司; 胎牛血清,美国 Hyclone 公司。

2 方法与结果

2.1 ASP-SS-Ber/HNK 的制备

分别称取一定量的和厚朴酚与 ASP-SS-Ber 置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 10 mL 甲醇,超声使其充分溶解,加入表面活性剂后采用旋转蒸发仪去除有机溶剂,缓慢加入 5 mL 去离子水,使其薄膜水化,10 000 r/min 离心(离心半径 13.5 cm)10 min 后 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,即得 ASP-SS-Ber/HNK

胶束。空白胶束 (ASP-SS-Ber) 为不加和厚朴酚, 其余同 ASP-SS-Ber/HNK 的制备过程。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (70:30); 检测波长 292 nm; 进样量 20 μL; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C。在该条件下和厚朴酚对照品溶液峰理论塔板数大于 3000, 分离度大于 1.5。

2.3 和厚朴酚载药量、包封率的测定

采用滤膜过滤法进行聚合物胶束药物包封率的测定。取 500 μL 和厚朴酚聚合物胶束溶液, 过 0.22 μm 滤膜后加入 500 μL 甲醇超声破乳, 即得 ASP-SS-Ber/HNK 供试品溶液。按“2.2”项下色谱条件进样分析, 色谱图见图 1, ASP-SS-Ber/HNK 与和厚朴酚峰的分度 (*R*) 大于 1.5, 空白胶束在和厚朴酚处无干扰, 专属性良好。将所得峰面积带入线性方程计算 ASP-SS-Ber/HNK 中和厚朴酚的含量。

包封率=胶束中包封的药物的质量/加入药物的质量

载药量=胶束中包封的药物的质量/(加入药物的质量+加入的载体材料的质量)

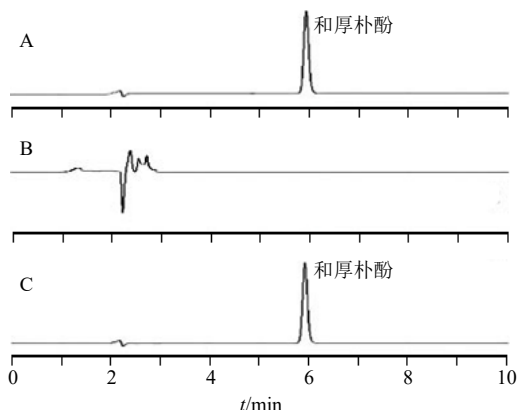


图 1 和厚朴酚对照品溶液 (A)、ASP-SS-Ber 溶液 (B)、ASP-SS-Ber/HNK 溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of honokiol reference solution (A), ASP-SS-Ber solution (B) and ASP-SS-Ber/HNK solution (C)

2.4 单因素考察

2.4.1 溶剂用量的考察 在其他条件固定时, 即表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油, 用量为 200 μL, 载药比为 1, 水化温度为 20 °C, 水化时间为 40 min, 加入一定量的 ASP-SS-Ber 和和厚朴酚分别溶解于 3、5、10、15 mL 甲醇中, 考察不同溶剂用量对粒径、包封率和载药量的影响。结果 (表 1) 显示, 当加入甲醇的量为 10 mL 时和厚朴酚的载药量与包封率最高, 因此选择 10 mL 作为溶剂用量。

2.4.2 表面活性剂种类选择 在其他条件固定时, 即溶剂用量为 10 mL, 表面活性剂用量为 200 μL, 载药比为 1, 水化温度为 20 °C, 水化时间为 40 min, 分别加入注射剂常用的表面活性剂^[20]泊洛沙姆-188、PEG 2000 和聚氧乙烯蓖麻油, 考察不同表面活性剂种类对粒径、包封率和载药量的影响。结果 (表 2) 显示, 当选择聚氧乙烯蓖麻油时, 和厚朴酚的载药量与包封率最高, 因此选择聚氧乙烯蓖麻油作为表面活性剂来制备 ASP-SS-Ber 胶束。

表 1 ASP-SS-Ber/HNK 溶剂用量的选择 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Selection of ASP-SS-Ber/HNK solvent volume ($\bar{x} \pm s, n=3$)

甲醇用量/mL	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
3	89.39±2.05	0.216±0.146	2.62±0.15	0.44±0.53
5	50.05±0.16	0.175±0.062	10.65±0.13	1.77±0.24
10	46.34±1.74	0.145±0.823	26.11±1.24	8.71±0.15
15	45.77±1.23	0.201±0.452	24.15±0.68	6.32±0.21

表 2 ASP-SS-Ber/HNK 表面活性剂种类选择 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Selection of ASP-SS-Ber/HNK surfactant types ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表面活性剂种类	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
泊洛沙姆	63.35±1.25	0.383±0.253	12.13±0.08	2.17±0.03
PEG 2000	42.67±0.24	0.585±0.051	12.62±0.33	2.37±0.05
聚氧乙烯蓖麻油	67.88±1.03	0.249±0.552	37.63±0.78	6.47±0.21

2.4.3 表面活性剂聚氧乙烯蓖麻油用量的选择 在其他条件固定时, 即溶剂用量为 10 mL, 表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油, 载药比为 1, 水化温度为 20 °C, 水化时间为 40 min, 分别加入 200、300、400、500 μL 的聚氧乙烯蓖麻油, 考察表面活性剂用量对粒径、包封率和载药量的影响。结果 (表 3) 显示, 当聚氧乙烯蓖麻油用量为 400 μL 时和厚朴酚

表 3 ASP-SS-Ber/HNK 聚氧乙烯蓖麻油量的选择 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Selection of amount of ASP-SS-Ber/HNK polyoxyethylene castor oil ($\bar{x} \pm s, n=3$)

聚氧乙烯蓖麻油用量/μL	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
200	60.24±1.65	0.412±0.126	40.05±0.47	6.56±0.33
300	56.14±0.23	0.256±0.289	63.30±1.35	10.35±2.53
400	44.14±1.20	0.120±0.223	68.52±0.28	11.54±0.56
500	45.50±1.73	0.301±0.112	64.40±0.68	10.27±0.20

的载药量与包封率最高, 因此聚氧乙烯蓖麻油用量选择为 400 μL 。

2.4.4 载药比 (载体与药物质量比) 的选择 在其他条件固定时, 即溶剂用量为 10 mL, 表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油, 用量为 400 μL , 水化温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 水化时间为 40 min, 精密称取载体 5.00 mg, 加入不同质量的药物, 即载药比分别为 1、3、5、7、9 时, 考察不同载药比对粒径、包封率和载药量的影响。结果 (表 4) 显示, 随着载体量的增加, 和厚朴酚的载药量与包封率先升高后降低, 因此将范围 5、7、9 的载药比设为待优化项进行星点设计-效应面法实验。

表 4 ASP-SS-Ber/HNK 载药比选择 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 ASP-SS-Ber/HNK drug loading ratio selection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

载药比	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
1	70.93 $\pm$ 1.45	0.262 $\pm$ 0.071	4.91 $\pm$ 0.10	2.49 $\pm$ 0.06
3	64.52 $\pm$ 1.27	0.242 $\pm$ 0.095	63.13 $\pm$ 1.36	15.60 $\pm$ 0.22
5	44.46 $\pm$ 1.56	0.574 $\pm$ 0.122	64.57 $\pm$ 1.62	11.45 $\pm$ 0.20
7	44.49 $\pm$ 1.23	0.512 $\pm$ 0.104	70.23 $\pm$ 1.06	8.69 $\pm$ 0.18
9	38.25 $\pm$ 1.65	0.562 $\pm$ 0.082	69.09 $\pm$ 0.50	6.35 $\pm$ 0.08

2.4.5 水化温度的考察 在其他条件固定时, 即载体与药物的比例为 7, 制剂质量浓度为 0.7 mg/mL, 溶剂用量为 10 mL, 表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油, 用量为 400 μL , 水化时间为 40 min, 考察水化温度在 20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 不同水化温度对粒径、包封率和载药量的影响。结果 (表 5) 显示, 随着水化温度的增加, 和厚朴酚的载药量与包封率均先增加后降低。因此将 20~40 $^{\circ}\text{C}$ 的水化温度作为待优化项进行星点设计-效应面法实验。

2.4.6 水化时间的考察 在其他条件固定时, 载体与药物的比例为 7, 制剂质量浓度为 0.7 mg/mL 时, 溶剂用量为 10 mL, 表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油,

表 5 ASP-SS-Ber/HNK 水化温度选择 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 ASP-SS-Ber/HNK hydration temperature selection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化温度/ $^{\circ}\text{C}$	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
20	70.93 $\pm$ 1.69	0.262 $\pm$ 0.091	10.80 $\pm$ 0.29	1.46 $\pm$ 0.15
30	44.52 $\pm$ 1.52	0.242 $\pm$ 0.065	71.59 $\pm$ 1.08	9.68 $\pm$ 0.17
40	44.46 $\pm$ 1.26	0.574 $\pm$ 0.057	63.12 $\pm$ 0.42	7.68 $\pm$ 0.05
50	44.49 $\pm$ 1.34	0.512 $\pm$ 0.076	58.76 $\pm$ 1.94	9.68 $\pm$ 0.17
60	38.25 $\pm$ 1.26	0.562 $\pm$ 0.045	53.04 $\pm$ 1.30	6.96 $\pm$ 0.17

用量为 400 μL , 水化温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 考察水化时间在 40、60、80、100、120 min 时, 不同水化时间对粒径、包封率和载药量的影响。结果 (表 6) 显示, 随着水化时间的增加, 和厚朴酚的载药量与包封率均先增加后降低。因此将 80~120 min 的水化时间作为待优化项进行星点设计-效应面法实验。

表 6 ASP-SS-Ber/HNK 水化时间选择 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 ASP-SS-Ber/HNK hydration time selection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化时间/min	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
60	38.91 $\pm$ 0.13	0.583 $\pm$ 0.078	52.59 $\pm$ 0.70	6.84 $\pm$ 0.09
80	22.87 $\pm$ 1.22	0.476 $\pm$ 0.034	64.68 $\pm$ 2.18	8.04 $\pm$ 0.36
100	40.84 $\pm$ 1.57	0.416 $\pm$ 0.023	69.54 $\pm$ 0.44	8.27 $\pm$ 0.17
120	29.94 $\pm$ 1.63	0.736 $\pm$ 0.043	58.95 $\pm$ 1.31	7.62 $\pm$ 0.18
140	27.12 $\pm$ 1.59	0.934 $\pm$ 0.022	56.60 $\pm$ 0.28	7.10 $\pm$ 0.04

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。选取载药比 (X_1)、水化温度 (X_2) 和水化时间 (X_3) 3 个因素, 每因素设 3 个水平 (代码值分别为 -1、0、+1)。以和厚朴酚包封率 (Y_1)、和厚朴酚载药量 (Y_2) 和胶束粒径 (Y_3) 为考察指标进行 3 因素 3 水平的星点设计-效应面法实验, 结果见表 7。利用 Design-Expert 10.0.3 统计软件对表 7 数据进行统计处理, 并获得 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 值对自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的多元线性回归方程, 各考察指标的 2 项式拟合方程如下 $Y_1=70.07+7.55 X_1+3.24 X_2+4.04 X_3-1.27 X_1 X_2-1.06 X_1 X_3+0.56 X_2 X_3-12.03 X_1^2-11.13 X_2^2-11.55 X_3^2$, $P<0.01$, $r^2=0.9134$; $Y_2=8.63-0.65 X_1+0.71 X_2+0.38 X_3-0.36 X_1 X_2-0.12 X_1 X_3+0.62 X_2 X_3-1.05 X_1^2-1.43 X_2^2-1.68 X_3^2$, $P=0.0071$, $r^2=0.9067$; $Y_3=45.73+1.83 X_1-0.13 X_2+0.68 X_3-0.66 X_1 X_2+0.26 X_1 X_3-1.21 X_2 X_3-6.43 X_1^2-2.90 X_2^2-5.73 X_3^2$, $P=0.0001$, $r^2=0.9722$ 。各方程的方差分析结果见表 8, 3 个模型均具有显著性差异 ($P<0.05$), 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_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y_1 有显著性影响; X_1 、 X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y_2 有显著性影响; X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y_3 有显著性影响。

利用 Design-Expert 10.0.3 软件的 Analysis 模块绘制自变量对因变量的三维效应面和二维等高线图: 即 X_1 、 X_2 对 Y_1 ; X_1 、 X_2 对 Y_2 ; X_1 、 X_2 对 Y_3 的

表 7 ASP-SS-Ber/HNK 制备工艺星点设计安排及结果
Table 7 Central composite design and results of preparation technology of ASP-SS-Ber/HNK

试验号	X_1	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm
1	7 (0)	30 (0)	100 (0)	75.11	9.11	45.85
2	7 (0)	30 (0)	100 (0)	72.76	9.00	45.83
3	9 (+1)	30 (0)	80 (-1)	55.05	5.37	34.95
4	9 (+1)	30 (0)	120 (+1)	59.25	6.11	35.43
5	7 (0)	30 (0)	100 (0)	61.57	7.43	46.04
6	5 (-1)	30 (0)	80 (-1)	31.61	5.44	32.23
7	5 (-1)	30 (0)	120 (+1)	40.03	6.67	31.68
8	7 (0)	30 (0)	100 (0)	74.36	8.97	45.94
9	5 (-1)	40 (+1)	100 (0)	48.73	8.34	35.85
10	9 (+1)	40 (+1)	100 (0)	55.05	5.33	38.60
11	9 (+1)	20 (-1)	100 (0)	47.61	4.67	38.28
12	7 (0)	20 (-1)	120 (+1)	50.25	4.42	40.76
13	7 (0)	30 (0)	100 (0)	66.54	8.65	45.00
14	7 (0)	40 (+1)	120 (+1)	54.38	7.14	36.19
15	7 (0)	20 (-1)	80 (-1)	41.52	5.13	35.59
16	5 (-1)	20 (-1)	100 (0)	36.22	6.25	32.89
17	7 (0)	40 (+1)	80 (-1)	43.39	5.37	35.89

表 8 响应面拟合模型对包封率、载药量、粒径的方差分析

Table 8 Response surface fitting model on variance analysis of encapsulation rate, load capacity and particle size

方差来源	自由度	包封率				载药量				粒径			
		离均差平方和	均方	F 值	P 值	离均差平方和	均方	F 值	P 值	离均差平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	2 574.74	286.08	8.20	0.005 6	38.80	4.31	7.56	0.007 1	422.01	46.89	27.19	0.000 1
X_1	1	455.57	455.57	13.06	0.008 6	3.41	3.41	5.97	0.044 5	26.68	26.68	15.47	0.005 7
X_2	1	84.18	84.18	2.41	0.164 3	4.08	4.08	7.15	0.031 9	0.13	0.13	0.07	0.793 5
X_3	1	130.73	130.73	3.75	0.094 1	1.15	1.15	2.01	0.199 0	3.67	3.67	2.13	0.187 9
X_1X_2	1	6.43	6.43	0.18	0.680 7	0.51	0.51	0.90	0.375 3	1.74	1.74	1.01	0.348 3
X_1X_3	1	4.45	4.45	0.13	0.731 4	0.06	0.06	0.11	0.755 1	0.27	0.27	0.15	0.706 6
X_2X_3	1	1.28	1.28	0.037	0.853 7	1.54	1.54	2.70	0.144 6	5.88	5.88	3.41	0.107 3
X_1^2	1	609.63	609.63	17.48	0.004 1	4.65	4.65	8.15	0.024 5	174.00	174.00	100.88	<0.000 1
X_2^2	1	521.84	521.84	14.96	0.006 1	8.65	8.65	15.17	0.005 9	35.37	35.37	20.51	0.002 7
X_3^2	1	561.72	561.72	16.10	0.005 1	11.93	11.93	20.92	0.002 6	138.29	138.29	80.18	<0.000 1
残差	7	244.19	34.88			3.99	0.57			12.07	1.72		
失拟项	3	108.44	36.15	1.07	0.457 3	2.07	0.69	1.43	0.357 3	11.38	3.79	21.75	0.006 1
纯误差	4	135.75	33.94			1.92	0.48			0.70	0.17		
总离差	16	2 818.93				42.79				434.08			

(44.38 ± 2.95) nm, 多分散指数 (polydispersed index, PDI) 0.473 ± 0.33 , 粒径分布较为均匀, ζ 电位为 (-10.32 ± 1.26) mV。

三维效应面图和等高线图, 结果见图 2。结果表明, 在考察范围内, 愈接近较佳区, 面的弯曲度就越大, 限制考察指标 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 为尽量大, 继续应用 Design-Expert 10.0.3 软件 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: ASP-SS-Ber 与和厚朴酚的投药量分别为 5.00 mg 和 0.71 mg、水化温度为 30 $^\circ\text{C}$ 、水化时间 100 min。预测在此条件下制备 ASP-SS-Ber/HNK 的和厚朴酚载药量与包封率分别为 8.63%、70.07%。

2.6 最优处方的验证试验

以上述最优处方条件制备 5 批 ASP-SS-Ber/HNK, 测定和厚朴酚载药量、包封率, 以及胶束粒径, 结果见表 9。和厚朴酚平均载药量为 (9.22 ± 0.42) %、平均包封率为 (71.77 ± 1.20) %、胶束平均粒径为 (44.38 ± 2.95) nm, 实测值与预测值的误差均小于 3%, 实验预测性较好, 且 3 个考察指标的 RSD 值均较小, 工艺重现性较好。

2.7 粒径、电位测量

取制备好的 ASP-SS-Ber/HNK 溶液, 用 Zetasizer Nano-ZS90 纳米粒度仪测定其粒径、粒度分布及电位。结果如图 3 所示, ASP-SS-Ber/HNK 的粒径为

2.8 胶束形态学

取制备好的 ASP-SS-Ber/HNK 溶液, 纯化水稀释 10 倍后, 滴加至 TEM 专用铜网上, 晾至半干后,

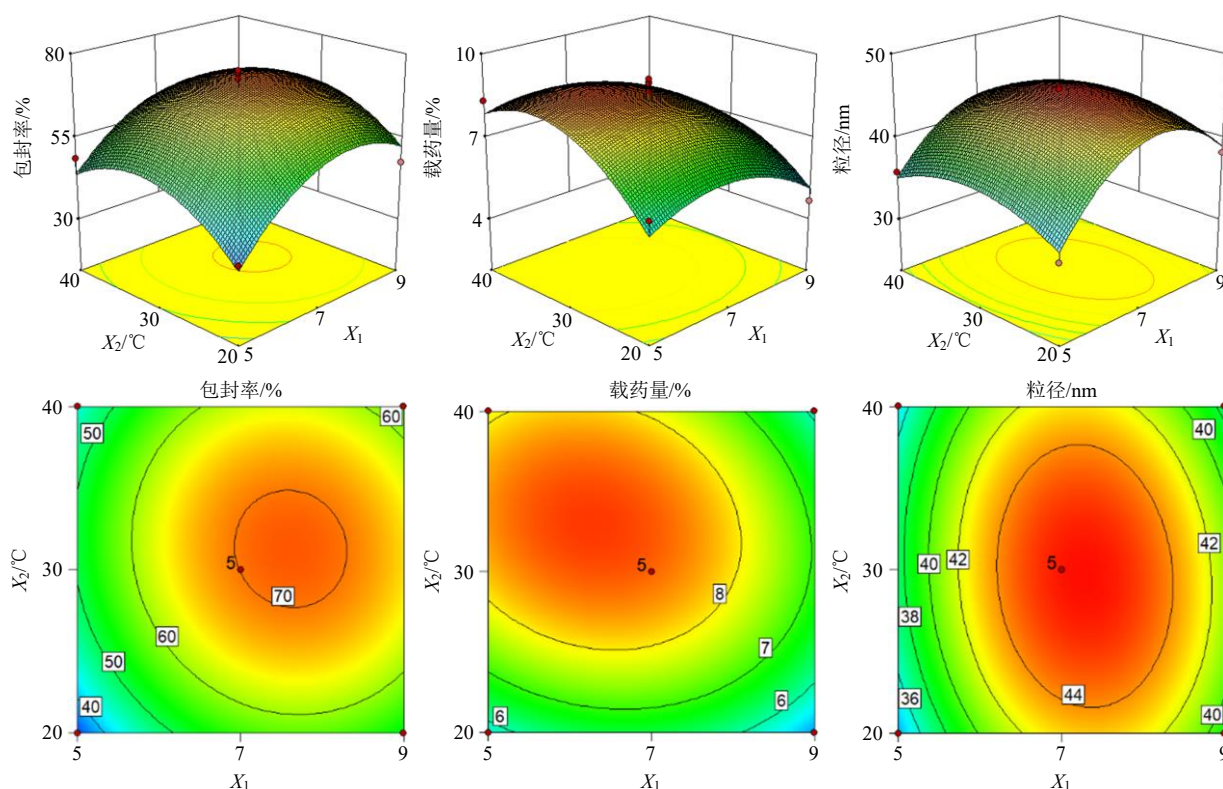
图 2 X_1 、 X_2 对 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 的效应面图和等高线图Fig. 2 Response surface and contour plots of X_1 , X_2 on Y_1 , Y_2 , Y_3

表 9 最优处方的验证试验

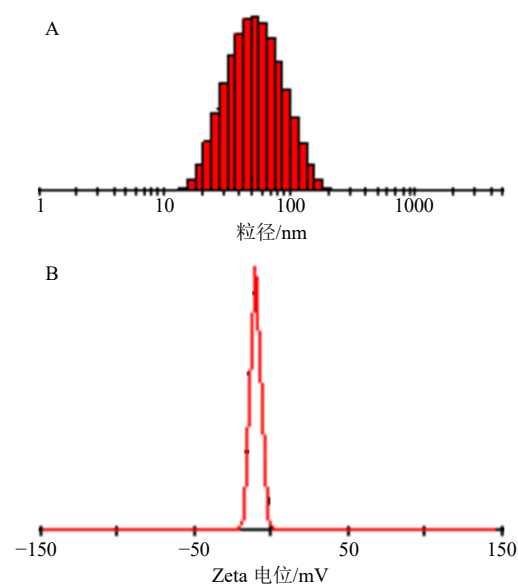
Table 9 Three batches samples for verification of optimized formulation

试验号	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm
1	73.95	9.06	46.90
2	73.34	8.98	42.47
3	70.72	8.66	43.06
4	71.87	9.09	41.11
5	68.99	10.30	48.36
平均值	71.77	9.22	44.38
预测值	70.07	8.63	45.73
相对误差/%	1.20	0.42	2.95

滴加 2% 的磷钨酸负染液, 静置晾干后, 转移至透射电镜下观察, 如图 4 所示, ASP-SS-Ber/HNK 在透射电镜下观察, 呈类圆形, 表面较光滑, 且分散均匀, 无黏连现象。

2.9 体外药物释放研究

将 1 mL ASP-SS-Ber/HNK 放入透析袋 (截留相对分子质量 14 000) 中。透析袋两端夹紧, 分别浸没在不同浓度的 GSH (0、0.1、1.0、10.0 mmol/L) 的 PBS (含 0.5% 聚山梨酯 80、pH 7.4) 中, 同时设

图 3 ASP-SS-Ber/HNK 的粒径分布 (A) 和电位分布 (B)
Fig. 3 Particle size distribution (A) and potential distribution (B) of ASP-SS-Ber/HNK

置对照组 (游离的和厚朴酚)。于 37 °C 恒温摇床中以 100 r/min 速率水平震荡 72 h。在预定的时间点 (0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 h) 采集 1 mL 样品, 然后补充相同体积的新鲜释放介质。样品过

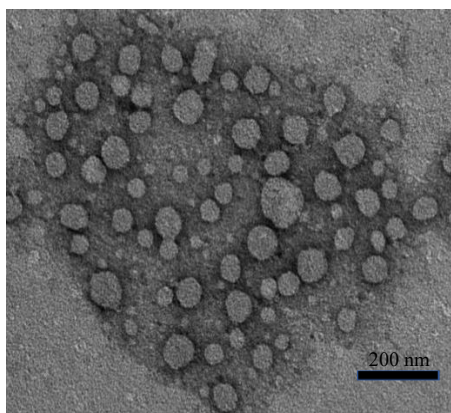


图 4 ASP-SS-Ber/HNK 的透射电镜照片

Fig. 4 TEM of ASP-SS-Ber/HNK

0.45 μm 滤膜后注入 HPLC, 根据下式计算体外累积释放率。

$$Q_n = C_n V_0 + \sum C_i V_i / m_0$$

Q_n 为第 n 个时间点的累积释放百分率, C_n 为第 n 个时间点的药物浓度, V_0 为释放介质的体积, C_i 为第 i 个时间点的药物浓度, V_i 为所取样品体积, m_0 为载药胶束中药物的质量

不同 GSH 浓度下的 ASP-SS-Ber/HNK 和厚朴酚释放曲线如图 5 所示。在最初的 12 h 内, 和厚朴酚快速释放, 累积释放率为 $(79.75 \pm 2.13) \%$; 24 h 累积释放率为 $(89.10 \pm 3.32) \%$; 72 h 累积释放率为 $(92.57 \pm 2.20) \%$; 随着释放介质中 GSH 浓度的增加, ASP-SS-Ber/HNK 中和厚朴酚的累计释放率也逐渐增加。释放介质中 GSH 的浓度为 0、0.10、1.00、10.00 mmol/L 时, ASP-SS-Ber/HNK 中和厚朴

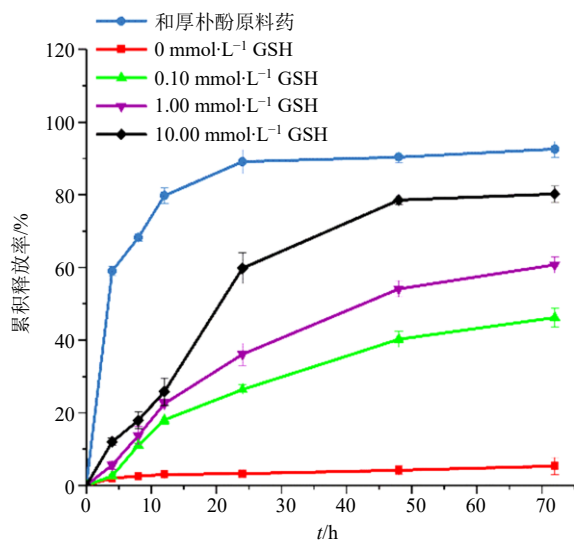


图 5 ASP-SS-Ber/HNK 在不同溶液中的累积释放率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Cumulative release rate of ASP-SS-Ber/HNK in different solutions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

酚 48 h 累积释放率分别为 $(4.15 \pm 1.27) \%$ 、 $(40.2 \pm 2.25) \%$ 、 $(54.10 \pm 2.27) \%$ 、 $(78.50 \pm 1.25) \%$; 72 h 的累积释放率分别为 $(5.32 \pm 2.36) \%$ 、 $(46.20 \pm 2.65) \%$ 、 $(60.70 \pm 2.26) \%$ 、 $(80.20 \pm 2.21) \%$ 。结果表明, ASP-SS-Ber/HNK 具有良好的 GSH 敏感药物释放能力, 且 ASP-SS-Ber/HNK 作为载体具有良好的药物缓释功能。

2.10 体外、血清及包封率稳定性考察

2.10.1 储存稳定性 取 ASP-SS-Ber/HNK 溶液, 通过 Zetasizer ZS 90 纳米粒度仪连续测定其粒径和电位的数值变化, 测定时间为 1 周, 结果见表 10。

2.10.2 包封率稳定性 按照“2.3”项下包封率的测定方法, 通过 HPLC 连续测定并计算其包封率的变化, 测定时间为 1 周, 考察样品的包封率稳定性, 结果见表 10。

2.10.3 血清稳定性 取适量载药胶束 ASP-SS-Ber/HNK 溶液, 将其置于加有血清的 96 孔板中, 培养 12 h, 其中以每小时测定的频率置于酶标仪下 (490 nm) 记录吸光度 (A) 值, 通过 A 值的改变, 考察样品的血清稳定性, 结果见表 11。

ASP-SS-Ber/HNK 胶束溶液在 12 h 的吸光度维持在 0.29 ± 0.01 , 7 d 内的粒径稳定在 $(45.14 \pm 0.67) \text{ nm}$, 电位稳定在 $(-10.46 \pm 0.60) \text{ mV}$, 包封率稳定

表 10 ASP-SS-Ber/HNK 的粒径、 ζ 电位、包封率稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Investigation of particle size, ζ potential and encapsulation efficiency stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
1	43.70 ± 0.38	-12.03 ± 0.63	70.07 ± 0.48
2	45.75 ± 0.83	-9.81 ± 0.56	68.59 ± 0.63
3	45.46 ± 0.93	-9.11 ± 0.73	70.25 ± 0.83
4	43.92 ± 0.70	-10.90 ± 0.49	71.63 ± 0.80
5	45.57 ± 0.52	-11.90 ± 0.51	69.45 ± 0.62
6	46.49 ± 0.41	-8.67 ± 0.44	70.52 ± 0.71
7	45.07 ± 0.94	-10.77 ± 0.84	72.43 ± 0.34

表 11 血清稳定性

Table 11 Serum stability

t/h	A 值	t/h	A 值	t/h	A 值
1	0.29 ± 0.02	5	0.27 ± 0.02	9	0.30 ± 0.01
2	0.30 ± 0.01	6	0.29 ± 0.01	10	0.30 ± 0.01
3	0.29 ± 0.01	7	0.26 ± 0.02	11	0.29 ± 0.01
4	0.32 ± 0.01	8	0.28 ± 0.02	12	0.31 ± 0.01

在 $(70.42 \pm 0.63)\%$ 。结果表明, 该胶束储存、血清及包封率稳定性良好。

3 讨论

采用薄膜水化法^[21]制备胶束时, 初始阶段和厚朴酚的载药量和包封率均偏低, 因此尝试加入表面活性剂来增加载体在溶剂中的溶解量, 和厚朴酚的包封率和载药量均得到了较好的改善。随后对注射剂中 3 种常用的表面活性剂进行筛选, 其中聚氧乙烯蓖麻油的增溶效果最好并且可溶于水、乙醇、丙二醇等溶剂^[22], 特别适合含有疏水性物质的水溶液产品的制备, 并且在动物体中的毒性试验表明, 聚氧乙烯蓖麻油基本无毒、无刺激性^[23]。因此经比较最终确定为不易诱导红细胞溶血且增溶效果好的聚氧乙烯蓖麻油。

研究表明, 肿瘤细胞内的 GSH ($2 \sim 10 \text{ mmol/L}$) 浓度是细胞外 GSH 浓度 ($2 \sim 10 \mu\text{mol/L}$) 1000 倍以上, 比正常细胞内浓度高 4 倍, 尤其在一些耐药肿瘤细胞中, GSH 甚至要高出 10 倍^[24]。值得注意的是, 肿瘤细胞内线粒体处的 GSH 浓度则更高^[25]。聚合物载体 ASP-SS-Ber 的亲水端当归多糖和疏水端小檗碱是通过二硫键相连, 而二硫键具有谷胱甘肽敏感性, 添加谷胱甘肽, 使得二硫键裂解, 释放出和厚朴酚^[1]。

在释放实验中, 释放介质未加入 GSH 时, HPLC 下检测到极低的和厚朴酚峰面积, 72 h 和厚朴酚的释放仅为 $(5.32 \pm 2.36)\%$ 。和厚朴酚在 0.1 mmol/L GSH 释放介质中 72 h 的累计释放率为 $(46.2 \pm 2.65)\%$, 而在 1.0 、 10.0 mmol/L GSH 释放介质中和厚朴酚的累计释放率达到 $(60.7 \pm 2.26)\%$ 和 $(80.2 \pm 2.21)\%$, 分别是 0.1 mmol/L GSH 的 1.3 倍和 1.7 倍, 当 GSH 浓度增加 ASP-SS-Ber/HNK 二硫键裂解, 释放出更多的和厚朴酚, 和厚朴酚的释放具有 GSH 浓度相关性。而在 4 种释放介质中 GSH 浓度下 48 h 与 72 h 的累计释放率变化很小, 可能的原因是, 在 GSH 的作用下, 48 h 时, ASP-SS-Ber/HNK 中二硫键裂解的化学反应达到了化学平衡点, 和厚朴酚的释放基本达到平衡, ASP-SS-Ber/HNK 48 h 可基本发挥药效^[2]。

综上, 本研究采用薄膜水化法制备了 ASP-SS-Ber/HNK 胶束, 并通过加入聚氧乙烯蓖麻油作为表面活性剂提高了 ASP-SS-Ber/HNK 的包封率和载药量, 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 ASP-SS-Ber/HNK 的最优处方工艺。该

胶束制剂在电镜下形貌呈圆形, 粒径 $(44.38 \pm 2.95) \text{ nm}$, ASP-SS-Ber/HNK 的血清稳定性是根据粒子均匀分散在血清中的紫外吸光度值进行考察的, 如粒子不稳定, 就会在血清中发生聚集, 吸光度就会增大。结果显示的 ASP-SS-Ber/HNK 血清溶液在 12 h 内吸光度未见明显增大, 表明粒子未发生聚集, 比较稳定。ASP-SS-Ber/HNK 具有 GSH 浓度依赖性的释放, 为该制剂的有效开发奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fang L, Lin H, Wu Z F, *et al.* In vitro /vivo evaluation of novel mitochondrial targeting charge-reversal polysaccharide-based antitumor nanoparticle [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 234: 115930.
- [2] Fang L, Fan H Y, Guo C J, *et al.* Novel mitochondrial targeting multifunctional surface charge-reversal polymeric nanoparticles for cancer treatment [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, 15(11): 2151-2163.
- [3] Guo C J, Hou X Y, Liu Y H, *et al.* Novel Chinese *Angelica* polysaccharide biomimetic nanomedicine to curcumin delivery for hepatocellular carcinoma treatment and immunomodulatory effect [J]. *Phytomedicine*, 2021, 80: 153356.
- [4] Wang K P, Xu J Y, Liu Y, *et al.* Self-assembled *Angelica sinensis* polysaccharide nanoparticles with an instinctive liver-targeting ability as a drug carrier for acute alcoholic liver damage protection [J]. *Int J Pharm*, 2020, 577: 118996.
- [5] Zhang Y, Cui Z, Mei H, *et al.* *Angelica sinensis* polysaccharide nanoparticles as a targeted drug delivery system for enhanced therapy of liver cancer [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 219: 143-154.
- [6] Tuo J, Xie Y Q, Song J, *et al.* Development of a novel berberine-mediated mitochondria-targeting nano-platform for drug-resistant cancer therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(42): 6856-6864.
- [7] Yin J T, Hou Y T, Yin Y Y, *et al.* Selenium-coated nanostructured lipid carriers used for oral delivery of berberine to accomplish a synergic hypoglycemic effect [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 8671-8680.
- [8] Song J, Lin C C, Yang X, *et al.* Mitochondrial targeting nanodrugs self-assembled from 9-*O*-octadecyl substituted berberine derivative for cancer treatment by inducing mitochondrial apoptosis pathways [J]. *J Control Release*, 2019, 294: 27-42.
- [9] Cheng Y, Ji Y H. Mitochondria-targeting nanomedicine

- self-assembled from GSH-responsive paclitaxel-ss-berberine conjugate for synergetic cancer treatment with enhanced cytotoxicity [J]. *J Control Release*, 2020, 318: 38-49.
- [10] Yang G L, Chen C, Zhu Y C, *et al.* GSH-activatable NIR nanoplatfrom with mitochondria targeting for enhancing tumor-specific therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(48): 44961-44969.
- [11] Tan L H, Wang Y F, Ai G X, *et al.* Dihydroberberine, a hydrogenated derivative of berberine firstly identified in *Phellodendri Chinese Cortex*, exerts anti-inflammatory effect via dual modulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105802.
- [12] 史晓佳. 和厚朴酚线粒体靶向衍生物的合成与抗肿瘤活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [13] 黄家喜, 李晶, 鲍翠玉. 和厚朴酚对高脂所致心肌细胞氧化应激损伤的保护作用及其与内质网应激-线粒体凋亡通路的相关性 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(6): 809-814.
- [14] Ong C P, Lee W L, Tang Y Q, *et al.* Honokiol: A review of its anticancer potential and mechanisms [J]. *Cancers*, 2019, 12(1): 48.
- [15] 陈一桢, 张文娟, 唐兰如, 等. 和厚朴酚长循环脂质体的制备及药动学研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3720-3727.
- [16] 孙强, 何曼, 张梦, 等. 小檗碱抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(2): 603-612.
- [17] Zhu D W, Tao W, Zhang H L, *et al.* Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer [J]. *Acta Biomater*, 2016, 30: 144-154.
- [18] 梁宇飞, 张欣欣, 许洁, 等. 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 [J]. *中草药*, 2020, 51(1): 43-50.
- [19] 张喜武, 李秋晗, 刘美欣, 等. 星点设计-效应面法优化丁香苦甘聚乳酸-羟基乙酸纳米粒的制备工艺 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4108-4113.
- [20] Kumar S, Jiang D W, Sun B Y, *et al.* Labeling of erythrocytes by porphyrin-phospholipid [J]. *Adv Nanobiomed Res*, 2021, 1(1): 2000013.
- [21] 宁双成, 周莉莉, 王敏, 等. 星点设计-效应面法优化斑蝥素纳米结构脂质载体处方工艺 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4114-4122.
- [22] 易红, 高进, 杨华, 等. 几种注射用表面活性剂的质量标准及安全性概述 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(1): 115-119.
- [23] 刁兆玉, 成朋, 王仲妮. 表面活性剂溶血作用的研究进展 [J]. *食品与药品*, 2010, 12(3): 125-129.
- [24] 万冬, 习钰晶, 李孙帆, 等. 基于肿瘤微环境的响应性纳米药物载体的研究进展 [J]. *化学工业与工程*, 2021, 38(5): 80-87.
- [25] Fang L, Zhang W, Wang Z, *et al.* Novel mitochondrial targeting charge-reversal polysaccharide hybrid shell/core nanoparticles for prolonged systemic circulation and antitumor drug delivery [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 1125-1139.

[责任编辑 郑礼胜]