

基于质量源于设计 (QbD) 理念的黄芪甲苷 PLGA 纳米粒制备工艺研究

李姿锐, 王一婷, 兰 帆, 周素华, 李 雅*

湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

摘 要: 目的 基于质量源于设计 (QbD) 理念优化黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的处方配比及制备工艺。方法 采用乳化溶剂挥发法制备黄芪甲苷纳米粒。以黄芪甲苷纳米粒的包封率、载药量、粒径大小以及 PDI 计算总评归一值 (OD 值) 为评价指标, 首先应用 Plackett-Burman 实验设计筛选出对黄芪甲苷纳米粒性质影响显著的工艺变量, 然后对筛选出的变量应用星点设计-效应面法进一步优化, 并对其进行表征评价, 考察纳米粒的体外释药行为。结果 基于 QbD 理念, 通过星点设计-效应面法对关键工艺参数 (CPPs) 进行优化, 得到的最优处方总投药量为 5.03 mg、泊洛沙姆浓度为 0.48%、W/O 体积比为 14.33:1。经验证黄芪甲苷纳米粒的包封率为 $(68.86 \pm 2.90)\%$, 载药量为 $(4.78 \pm 0.45)\%$, 粒径为 (112.87 ± 4.69) nm, PDI 为 0.134 ± 0.010 , ζ 电位 (-29.77 ± 1.40) mV, 且纳米粒呈圆球形, 粒子均匀分散, 未见粘连聚集, 通过体外释放实验得知, 纳米粒体外释药规律符合 Riger-Peppas 释药方程模型。结论 基于 QbD 理念, 得到了优化模型的产品, 符合预期的 QTPP 质量稳定、可控, 精度高, 预测效果较好, 制备工艺稳定可行。

关键词: 黄芪甲苷; 纳米粒; 质量源于设计理念; Plackett-Burman; 星点设计-效应面法; 体外释放

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4678-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.011

Study on preparation process of astragaloside IV PLGA nanoparticles based on quality by design (QbD)

LI Zi-rui, WANG Yi-ting, LAN Fan, ZHOU Su-hua, LI Ya

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To optimize the formulation ratio and preparation process of astragaloside IV PLGA nanoparticles based on quality by design (QbD). **Methods** Astragaloside IV nanoparticles were prepared by emulsification solvent evaporation method. Taking the encapsulation efficiency, drug loading, particle size and PDI calculated overall desirability (OD) of astragaloside IV nanoparticles as evaluation indicators. Plackett-Burman design was used to screen out the process variables that had a significant effect on the properties of astragaloside IV nanoparticles, and then the selected variables were further optimized by central composite design-response surface methodology, and were characterized and evaluated to investigate the *in vitro* drug release behavior of nanoparticles. **Results** Based on QbD, the critical process parameters (CPPs) were optimized by central composite design-response surface methodology, and the optimal prescription dosage was 5.03 mg, the poloxamer concentration was 0.48, and the W/O volume ratio was 14.33:1. It was verified that the encapsulation efficiency of astragaloside IV nanoparticles was $(68.86 \pm 2.90)\%$, the drug loading was $(4.78 \pm 0.45)\%$, the particle size was (112.87 ± 4.69) nm, the PDI was 0.134 ± 0.010 , the ζ was (-29.77 ± 1.40) mV, and the nanoparticles were spherical, the particles were uniformly dispersed, and there was no adhesion and aggregation. Release experiment *in vitro* showed that the drug release rule of the nanoparticles conformed to the Riger-Peppas model. **Conclusion** Based on QbD, the product of the optimized model is obtained, which meets the expected QTPP and has stable and controllable quality, high precision, good prediction effect, and stable and feasible preparation process.

Key words: astragaloside IV; nanoparticles; quality by design; Plackett-Burman; central composite design-response surface methodology; *in vitro* release

收稿日期: 2022-01-24

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2021JJ30495); 湖南省大学生创新创业训练计划项目 (2603); 湖南中医药大学中药学一流学科建设项目 (4901-0200002006)

作者简介: 李姿锐 (1998—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 309689146@qq.com

*通信作者: 李 雅 (1973—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药新药研究与开发。E-mail: liya112@163.com

缺血性心脏病是一种具有高发病率和高致死率的疾病,病理学定义为心肌细胞因供求灌注失衡长期缺血而死亡,目前尚无有效的临床治疗方法^[1-2]。从中草药中分离高效低毒活性成分,用于心肌梗死防治,是中药领域治疗心血管疾病的一个研究热点。其中黄芪甲苷是从豆科黄芪属植物黄芪中分离得到的一种生物活性最好的皂苷类化合物。药理学研究显示,黄芪甲苷对心血管系统主要有治疗心力衰竭、耐缺氧、保护缺血心肌损伤等药理作用^[3-4]。但黄芪甲苷存在水难溶性,相对分子质量相对较高,脂溶性低,渗透性较低,体内生物利用度低,心肌细胞对该活性成分摄取量也较低,使其使其在临床应用中受限。因此,亟需构建一种新型的载药系统,以提高黄芪甲苷的心肌细胞摄取量,并递送到心肌细胞线粒体,这很大程度可提高其治疗缺血性心脏病的疗效。

在此基础上,采用聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]为载体材料包载黄芪甲苷,PLGA 通常由来源广泛的乳酸和羟基乙酸开环缩聚得到,合成容易,性能稳定,且在体内自身的降解产物无刺激性、无毒害,因而该高分子材料表现出良好的生物可降解性和生物相容性。其还可通过增强药物的细胞摄取能力,提高纳米粒的抗心肌细胞缺血等作用。

质量源于设计(quality by design, QbD)是以预先设定的目标产品质量特性(quality target product profile, QTPP)为研发起点,如以缓控释制剂的体外释放度为质量控制指标,在了解关键物质属性和关键工艺参数基础上,建立质量风险管理,确立质量控制策略和药品质量体系^[5-8]。本实验将黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的处方工艺优化与 QbD 理念相结合,从设计层次保证药品质量,为抗心肌缺血的临床治疗思路提供新的选择。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱,美国安捷伦公司;Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),大连依利特分析仪器有限公司;ZNCL-G 智能数显磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;SCIENTZ-10N 普通型冷冻干燥机,新芝冻干设备有限公司;Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪,马尔文仪器有限公司;Tecna G2 Spirit TWIN 透射电子显微镜(TEM),FEI 公司;

Nicolet-iS5 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)仪,美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 材料

泊洛沙姆 188,批号 113H022, Solarbio 公司;PLGA, 济南岱罡生物工程有限公司;丙酮,湖南汇虹试剂有限公司,批号 20200917;原料药黄芪甲苷,批号 C15735034,质量分数 98%,上海麦克林生化科技有限公司;对照品黄芪甲苷,质量分数 98.5%,批号 AF20050252,成都埃法生物科技有限公司;HPLC 用试剂均为色谱纯。其余相应的试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 建立黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的 QTPP 与关键质量属性(critical quality attributes, CQA)

通过相关研究文献的调研^[9-10],结合前期药理实验,确定本制剂的剂型设计、规格、包装形式等,建立了黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的 QTPP,见表 1。根据表 1 中黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的 QTPP,结合前期预试验的经验,识别建立本制剂的 CQA,结果见表 2。

表 1 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒 QTPP

Table 1 QTPP of astragaloside IV PLGA nanoparticles

要素	目标理解	要素	目标理解
适应症	缺血性心脏病	给药途径	口服
剂型	聚合物纳米颗粒	分散性	高分散性
处方组成	黄芪甲苷、辅料	包装形式	西林瓶

2.2 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的制备

精密称取处方量的黄芪甲苷和处方量的 PLGA (75:25)于西林瓶中,加入 2 mL 有机溶剂(丙酮-无水乙醇 1:1),超声使 PLGA 完全溶解。制备 0.4% 泊洛沙姆 188 水溶液作为水相。将有机相和水相放入 70 °C 水浴,有机相澄清后在 1200 r/min、70 °C 下注入水相中,后调转速 600 r/min,待有机溶剂挥干,冷却至室温,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。同样方法制备不含药物的空白纳米粒样品。

2.3 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒中黄芪甲苷的测定

2.3.1 供试品溶液的配制 取按照“2.2”项下方法制备的黄芪甲苷纳米粒混悬液于 10 mL 量瓶中,用乙腈超声破乳后定容至刻度线,即得供试品溶液。

2.3.2 阴性对照溶液的配制 取按照“2.2”项下方法制备的空白纳米粒 1 mL 于 10 mL 量瓶中,用乙腈超声破乳后定容至刻度线,即得阴性溶液。

表 2 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒 CQA 识别

Table 2 CQA recognition of astragaloside IV PLGA nanoparticles

质量属性	目标	是否为 CQA	合理性说明
外观	颜色和形状	否	外观与有效性、安全性无关
气味	无难闻气味	否	纳米制剂无明显难闻气体
含量	100%标示量	是	有关物质含量是产品有效性与安全性的决定性因素，且受处方和工艺影响
多分散指数 (PDI)	0~0.4	是	颗粒大小的均匀分布对于治疗活性至关重要
ζ 电位	$\geq \pm 20$ mV	是	纳米粒混悬液稳定的重要关键因素
体外释放度	结合食物在人体内的转运	是	释放度不符合标准影响药品的生物利用度

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 10.0 mg 于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度线，即得质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.4 色谱条件 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)；以乙腈-水 (35:65) 为流动相，进样量 20 μ L；柱温 40 $^{\circ}$ C；蒸发光散射检测器检测；ELSD 参数：漂移管加热温度设为 65 $^{\circ}$ C，增益 60，气压 275.79 kPa (40 psi)，动力级别 60%。

2.3.5 专属性考察 分别取黄芪甲苷 PLGA 纳米粒供试品溶液、对照品溶液以及阴性溶液，过 0.22 μ m 微孔滤膜，在“2.3.4”项色谱条件下进行 HPLC 测量。由图 1 可知，黄芪甲苷混悬液与对照品溶液相比在相同的保留时间处出现色谱峰，空白纳米粒样品溶液未出现色谱峰，故认为空白纳米粒对实验无干扰作用。

2.3.6 线性关系考察 取“2.3.3”项下的黄芪甲苷对照品溶液，用甲醇配制成质量浓度分别为 5、10、

25、50、200、500 μ g/mL 的系列对照品溶液，以质量浓度的对数为横坐标 (X)，峰面积的对数 (Y) 为纵坐标作图，绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程 $Y=1.2658X+1.7129$ ， $r=0.9995$ ，结果表明黄芪甲苷在 5~500 μ g/mL 呈良好的线性关系。

2.3.7 精密度试验 取低、中、高 (5、50、500 μ g/mL) 3 个质量浓度的黄芪甲苷对照品溶液，在“2.3.4”项色谱条件下进样测定，每一质量浓度测定 6 次，记录其峰面积，计算精密度。结果表明黄芪甲苷峰面积 RSD 值为 1.32%，说明该方法的精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 取“2.3.1”项下供试品溶液，按照“2.3.4”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 进样分析，计算得黄芪甲苷的峰面积 RSD 值为 0.85%，说明所制备的纳米粒稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 按“2.3.1”项方法制备供试品溶液 6 份，按“2.3.4”项下色谱条件进行，计算得黄芪甲苷质量分数的 RSD 值为 1.57%，结果表明该方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 精密量取 1 mL “2.3.1”项下供试品溶液 9 份，分为 3 组，分别加入黄芪甲苷对照品溶液，得到加样质量浓度分别为低、中、高 (5、50、500 μ g/mL) 的溶液，按“2.3.4”项下色谱条件进行，计算回收率和 RSD，测得加样回收率分别为 98.78%、98.82%、102.64%，RSD 均小于 2.0%，结果表明该方法符合测定要求。

2.4 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的包封率和载药量的测定

2.4.1 包封率的测定 量取 5 mL 体积的黄芪甲苷纳米粒混悬液装入透析袋中，将其浸入到 80 mL 40%乙醇溶液的释放介质中，在 25 $^{\circ}$ C，300 r/min 恒温搅拌。分别于透析 15、30、45、60、75、90、120、150、180、240、300、360、420 min 取透析介质 60

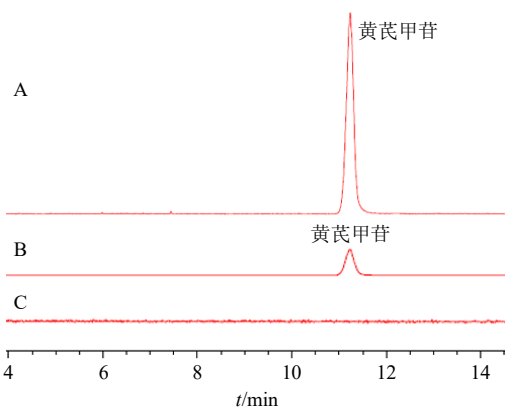


图 1 黄芪甲苷对照品 (A)、黄芪甲苷 PLGA 纳米混悬液 (B)、空白纳米粒 (C) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of astragaloside IV reference substance (A), astragaloside IV PLGA nanoparticles (B), blank nanoparticles (C)

mL, 浓缩至 5 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 进样分析。由图 2 可知, 随着透析时间延长, 透析介质中游离黄芪甲苷的含量一直增加, 60~90 min, 透析出的黄芪甲苷呈现平衡趋势, 而后透析介质中游离黄芪甲苷骤然增多, 说明外部的透析介质对透析袋内部纳米粒的形态开始破坏, 从而使得纳米粒包封好的黄芪甲苷透析出来, 因此最终确定透析时间为 90 min。在“2.3.4”项色谱条件下进样测定, 计算游离药量 ($W_{\text{游}}$), 并精密移取黄芪甲苷 PLGA 纳米粒供试品 3.0 mL, 加入乙腈破乳, 超声, 静置过夜, 计算总药量 ($W_{\text{总}}$)。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}}$$

2.4.2 载药量的测定 精密移取 3 mL 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒置于已干燥至恒定质量的称量瓶中, 冷冻干燥 [温度 -50°C , 压强 133.3 mPa (1 mTorr)]

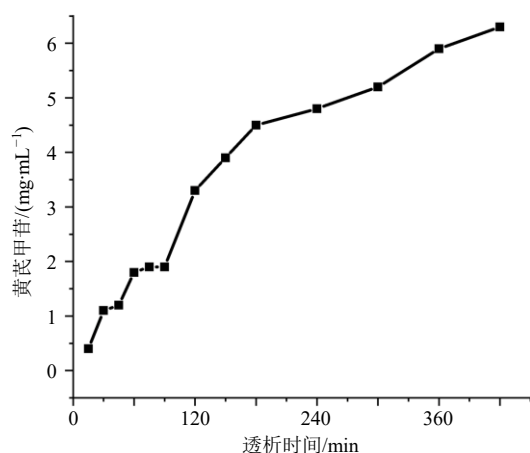


图 2 透析平衡图

Fig. 2 Diagram of dialysis balance

48 h, 得到冻干粉净质量 ($W_{\text{冻干粉净质量}}$), 将冻干粉按照“2.3.1”项下供试品溶液处理方法处理后进样, 测定冻干粉中的总药量 ($W_{\text{冻干粉总药量}}$), 计算载药量。

$$\text{载药量} = W_{\text{冻干粉总药量}} / W_{\text{冻干粉净质量}}$$

2.5 Plackett-Burman 实验设计筛选变量

通过对黄芪甲苷 PLGA 纳米粒处方及制备工艺的分析, 以总投药量 (X_1)、PLGA 与药物质量浓度比 (X_2)、泊洛沙姆质量分数 (X_3)、制备温度 (X_4)、W/O 体积比 (X_5)、磁力搅拌速度 (X_6) 为考察对象, 以包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2)、粒径 (Y_3) 以及 PDI (Y_4) 为评价指标, 利用 Plackett-Burman 实验设计筛选出对黄芪甲苷纳米粒性质影响较显著的因素。因素水平、筛选试验安排及结果见表 3。由 Pareto 图 (图 3) 可知, 泊洛沙姆质量分数以及 W/O 体积比对黄芪甲苷 PLGA 纳米粒粒径有显著影响 ($P < 0.05$); 总投药量对黄芪甲苷纳米粒的 PDI 有显著影响 ($P < 0.05$); 泊洛沙姆质量分数对黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的载药量有显著影响 ($P < 0.05$); 而黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的包封率模型 P 值大于 0.05, 说明模型无显著性差异, 故不进行分析。因此固定 PLGA 与药物质量浓度比、制备温度以及磁力搅拌速度不变, 采用总投药量为 3~7 mg, 泊洛沙姆质量分数 0.3%~0.7%, 以及 W/O 体积比 8:1~18:1, 应用星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 进一步优化。

2.6 CCD-RSM 优化黄芪甲苷 PLGA 纳米粒处方

2.6.1 试验设计 结合上述 Plackett-Burman 实验结果, 发现总投药量 (X_1), 泊洛沙姆质量浓度 (X_3),

表 3 Plackett-Burman 实验设计与效应值

Table 3 Plackett-Burman experimental design and results

序号	X_1/mg	X_2	$X_3/\%$	$X_4/^{\circ}\text{C}$	X_5	$X_6/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	Y_4
1	3 (-1)	7 (+1)	0.7 (+1)	65 (-1)	18 (+1)	1100 (-1)	50.93	2.65	119.43	0.248
2	3 (-1)	3 (-1)	0.7 (+1)	85 (+1)	18 (+1)	1100 (-1)	62.12	2.33	142.83	0.578
3	7 (+1)	7 (+1)	0.7 (+1)	65 (-1)	18 (+1)	1500 (+1)	61.86	1.98	130.97	0.131
4	3 (-1)	7 (+1)	0.7 (+1)	85 (+1)	8 (-1)	1500 (+1)	54.95	2.86	79.78	0.217
5	7 (+1)	3 (-1)	0.3 (-1)	65 (-1)	18 (+1)	1500 (+1)	50.91	3.72	123.40	0.104
6	7 (+1)	7 (+1)	0.3 (-1)	85 (+1)	18 (+1)	1100 (-1)	61.22	2.68	162.87	0.177
7	3 (-1)	3 (-1)	0.3 (-1)	65 (-1)	8 (-1)	1100 (-1)	60.02	6.57	136.60	0.587
8	3 (-1)	7 (+1)	0.3 (-1)	65 (-1)	8 (-1)	1500 (+1)	70.10	5.44	110.33	0.469
9	3 (-1)	3 (-1)	0.3 (-1)	85 (+1)	18 (+1)	1500 (+1)	76.07	6.51	134.03	0.528
10	7 (+1)	7 (+1)	0.3 (-1)	85 (+1)	8 (-1)	1100 (-1)	59.08	5.80	147.03	0.162
11	7 (+1)	3 (-1)	0.7 (+1)	65 (-1)	8 (-1)	1100 (-1)	65.07	2.79	81.26	0.194
12	7 (+1)	3 (-1)	0.7 (+1)	85 (+1)	8 (-1)	1500 (+1)	55.66	3.30	85.87	0.227

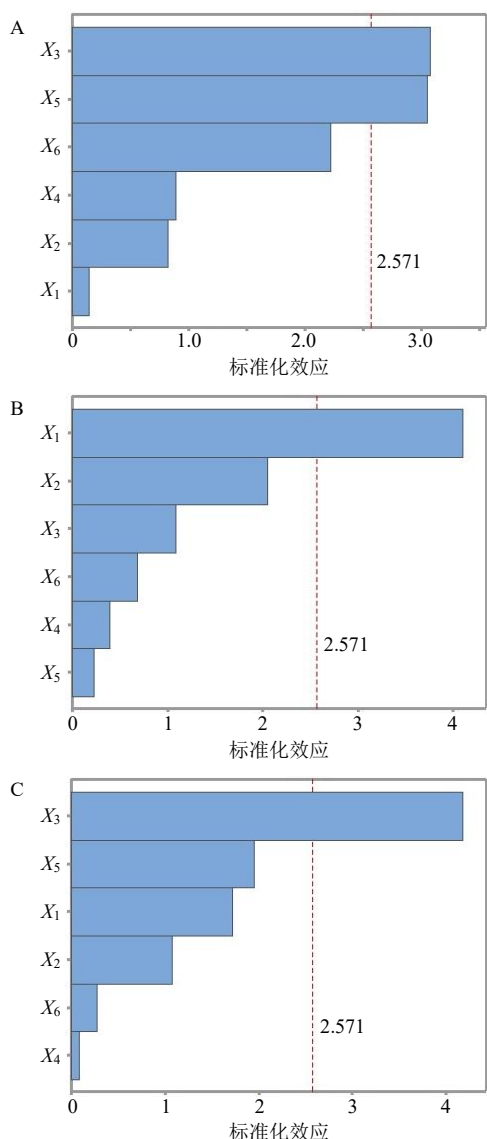


图 3 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒径 (A)、PDI (B) 和载药量 (C) 的 Pareto 图 ($\alpha=0.05$)

Fig. 3 Pareto plots of particle size (A), PDI (B) and drug loading (C) of astragaloside IV PLGA nanoparticles ($\alpha = 0.05$)

以及 W/O 体积比 (X_5) 对方剂成型的影响较大, 故选择其作为考察因素进一步进行处方优化。设计 5 水平 (-2、-1、0、+1、+2), 以包封率、载药量、PDI 以及粒径 4 个分指标的总评归一值 (overall desirability, OD) 为总评价指标。计算公式为 $OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$, k 为指标数。对取值越大越好的因素 (包封率、载药量) 和取值越小越好的因素 (粒径、PDI) 采用 Hassan 方法分别进行数字转换求归一值 $d_{\max}$ 和 $d_{\min}$ [11-12]。具体因素水平及试验结果见表 4。

$$d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

表 4 CCD-RSM 试验设计方案及响应值

Table 4 Design and results of CCD-RSM experiment

序号	X_1/mg	$X_3/\%$	X_5	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	Y_4	OD 值
1	6 (+1)	0.4 (-1)	15.5 (+1)	45.21	1.96	120.90	0.114 3	0.376 6
2	5 (0)	0.7 (+2)	13 (0)	72.55	4.28	145.20	0.162 0	0
3	4 (-1)	0.6 (+1)	10.5 (-1)	74.21	2.20	132.20	0.197 3	0.448 2
4	7 (+2)	0.5 (0)	13	65.30	3.97	145.60	0.126 0	0.323 4
5	5	0.5	13	62.10	2.09	123.93	0.409 3	0.590 5
6	5	0.5	8 (-2)	82.86	3.38	95.74	0.231 7	0.232 6
7	3 (-2)	0.5	13	69.47	2.28	94.69	0.107 0	0.717 0
8	5	0.5	13	64.51	1.77	108.77	0.183 3	0.515 5
9	6	0.6	15.5	55.29	3.43	154.63	0.140 7	0.371 5
10	6	0.4	10.5	63.99	2.02	124.80	0.132 3	0
11	4	0.4	15.5	58.05	3.56	150.80	0.230 3	0.313 9
12	4	0.6	15.5	78.39	2.02	103.00	0.119 3	0.752 3
13	5	0.5	13	54.96	1.71	103.10	0.199 7	0.423 0
14	5	0.5	13	57.56	2.06	125.30	0.396 0	0.537 2
15	4	0.4	10.5	61.60	5.09	123.60	0.301 3	0.390 3
16	5	0.5	13	60.65	1.87	145.40	0.248 0	0.562 2
17	5	0.5	18 (+2)	65.94	3.70	126.53	0.481 7	0.349 3
18	5	0.3 (-2)	13	57.75	3.21	126.80	0.189 0	0
19	5	0.5	13	70.93	2.15	154.03	0.489 7	0.556 2
20	6	0.6	10.5	71.65	1.84	143.50	0.230 7	0

2.6.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert 软件, 以 OD 值对 X_1 、 X_3 、 X_5 进行二次多项式回归方程拟合。二次多项式回归方程为 $OD \text{ 值} = -3.10 - 0.12 X_1 + 14.31 X_3 + 0.06 X_5 - 0.63 X_1 X_3 + 0.03 X_1 X_5 + 0.19 X_3 X_5 - 2.99 X_1^2 - 13.30 X_3^2 - 9.65 X_5^2$ 。方差分析结果 (表 5) 表明, 回归模型 $P < 0.05$, 失拟项水平不显著 ($P > 0.05$), 说明模型拟合良好; 回归方程拟合决定系数 (R^2) 为 0.907 8, 校正决定系数 (R^2_{adj}) 为 0.824 8, 说明该模型可以解释 82.48% 的响应值的变异, 且方程拟合程度较好。另外, 总投药量 (X_1) 和 W/O 体积比 (X_5) 对 OD 值均具有显著影响 ($P < 0.05$), 各因素之间不存在交互作用。以 OD 值对交互因素的响应面 3D 效果图见图 4。

2.6.3 响应面优化 利用 Design-Expert 软件对上述所建立的数学模型进行综合分析, 最终确定了各因素的最佳取值: 总投药量为 5.03 mg、泊洛沙姆质量分数为 0.48%、W/O 体积比为 14.33:1。对优化后的制剂处方进行验证试验, 实测值和预测值较为吻合, 相对偏差低于 2.0%, 说明预测结果准确可靠, 见表 6。黄芪甲苷粒径分布与 ζ 电位图见图 5, 其 ζ

表 5 CCD-RSM 试验设计回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance (ANOVA) for CCD-RSM experimental results

误差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	误差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.920	9	10.94	0.000 4	X_3^2	0.450	1	47.45	<0.000 1
X_1	0.240	1	25.18	0.000 5	X_5^2	0.091	1	9.73	0.010 8
X_3	0.015	1	1.61	0.233 5	残差	0.094	10		
X_5	0.091	1	9.74	0.010 8	失拟项	0.077	5	4.49	0.062 5
X_1X_3	0.031	1	3.35	0.097 1	纯误差	0.017	5		
X_1X_5	0.034	1	3.61	0.086 7	总离差	1.020	19		
X_3X_5	0.018	1	1.88	0.200 5	R^2	0.907 8			
X_1^2	2.254	1	0.02	0.877 9	变异系数/%	25.970 0			

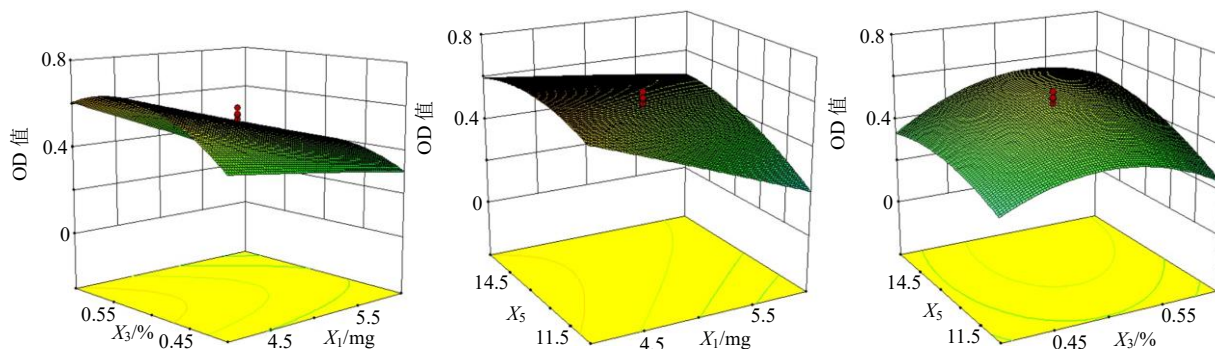


图 4 各因素间交互作用的响应面图

Fig. 4 Response surface diagram of interaction between various factors

表 6 验证结果 ($n = 3$)

Table 6 Validation results ($n = 3$)

批次	平均粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%	ζ 电位/mV	OD 值		相对偏差/%
						实测值	预测值	
1	124.9	0.117	70.24	4.16	-31.6	0.551 5	0.539	1.22
2	132.7	0.134	63.52	5.21	-29.5	0.548 0		
3	136.1	0.152	68.86	4.97	-28.2	0.537 4		

电位分布在-35~-15 mV, 属于纳米给药系统的稳定体系。

2.7 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的表征

2.7.1 纳米粒稳定性考察 将制备的黄芪甲苷纳米粒混悬液分别保存于 4℃ 冰箱与室温 (温度为 20~25℃) 条件下, 分别在 0~9 d 定时取样测定其平均粒径及 PDI 大小变化, 考察其稳定性。结果见表 7。4℃ 时, 平均粒径和 PDI 变化不大; 室温时, 平均粒径和 PDI 有上升趋势。因此, 黄芪甲苷纳米粒 4℃ 储存时质量稳定。

2.7.2 纳米粒形态学观察 称取适量黄芪甲苷纳米粒混悬液, 滴至载玻片上, 以 2% 磷钨酸负染后转移至专用铜网上, 挥干, 透射电镜下观察粒径形态和大小并拍照, 所得结果见图 6。结果可见纳米粒呈

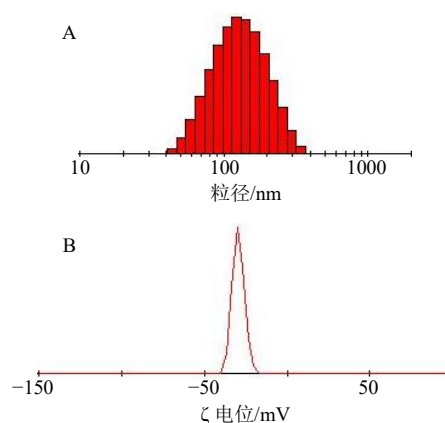


图 5 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的粒径分布 (A) 以及 ζ 电位 (B) 图

Fig. 5 Particle size distribution (A) and ζ potential distribution (B) of astragaloside IV PLGA nanoparticles

表 7 4 ℃ 和室温下黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的稳定性 ($n=3$)Table 7 Stability of astragaloside IV PLGA nanoparticles at 4 ℃ and room temperature ($n=3$)

t/d	平均粒径/nm		PDI	
	4 ℃	室温	4 ℃	室温
1	133.5	140.8	0.119	0.175
2	132.8	140.4	0.131	0.210
3	131.7	143.2	0.126	0.244
4	138.6	135.0	0.140	0.295
5	136.1	144.5	0.132	133.8
6	131.9	155.8	0.150	0.396
7	132.7	156.4	0.149	0.339
8	132.0	147.2	0.137	0.438
9	135.6	159.3	0.145	0.507

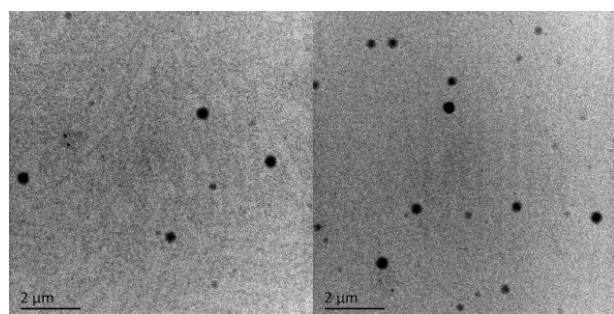


图 6 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的 TEM 图

Fig. 6 TEM of astragaloside IV PLGA nanoparticles

完整圆球形，且均匀分散，未见粘连聚集现象。

2.7.3 黄芪甲苷的 FT-IR 分析 本实验采用红外光谱仪对各样品的表面化学结构进行检测。在室温下，采用 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围扫描，测定样品的红外吸收峰。FT-IR 结果显示（图 7），PLGA（50：50）的 $\text{C}=\text{O}$ 酯键的伸缩振动峰出现在 1757.94 cm^{-1} 处， 2887.91 cm^{-1} 为 PLGA 的 $\text{C}-\text{H}$ 键的伸缩振动峰；在黄芪甲苷原料药的红外谱图中， 3383.65 cm^{-1} 处为 $-\text{OH}$ 的伸缩振动峰，结合 1112.93 、 1069.41 、 1048.17 cm^{-1} ，为多糖类羟基特征峰；而黄芪甲苷的红外光谱，与空白纳米粒的红外谱图相比较没有发生较大的变化，没有红外特征峰的出现，表明药物被成功包裹到材料中。因此，黄芪甲苷对纳米粒的微观结构并不构成影响。

2.8 黄芪甲苷 PLGA 纳米粒的体外释放

约 10 cm 的透析袋，置于蒸馏水中，煮沸 20 min，浸泡 24 h，再用蒸馏水润洗，备用。精密量取制得的黄芪甲苷纳米粒适量放于透析袋中，将口封紧，再将其置于磁力搅拌器上，另取黄芪甲苷原料

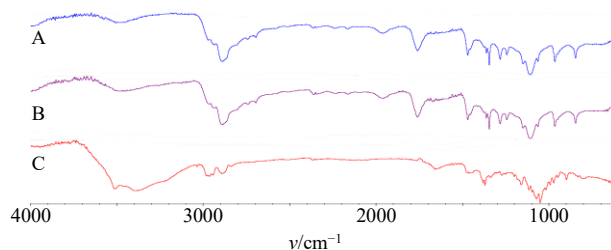


图 7 空白纳米粒 (A)、黄芪甲苷 PLGA 纳米粒 (B)、黄芪甲苷原料药 (C) 的 FT-IR 检测图谱

Fig. 7 FT-IR detection spectrum of blank nanoparticles (A), astragaloside IV nanoparticles (B) and astragaloside IV (C)

药溶液放于透析袋中，设定转速为 100 r/min，温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，溶出介质为 40%乙醇溶液 80 mL，分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、48 h 时间点取样，将不同时间取得的溶出液采用“2.3.2”项下色谱条件进行 HPLC 法测定黄芪甲苷的量，并计算各时间点黄芪甲苷的累积溶出量，结果见图 8 和表 8。结果表明，黄芪甲苷 12 h 时累积溶出为 83.21%，而黄芪甲苷 PLGA 纳米粒释药较慢，12 h 时累积溶出 57.59%，因此黄芪甲苷 PLGA 纳米粒具有一定的缓释效应。

从表 8 拟合模型来看， R^2 越接近 1，表明拟合效果越好，结果表明黄芪甲苷 PLGA 纳米粒在 40%乙醇溶液中 72 h 内的累积释放符合 Ritger-Peppas 模型， $R^2=0.9596$ ，说明纳米粒释放机制为骨架溶蚀；黄芪甲苷原料药累积释放符合一级模型， $R^2=0.9813$ ，说明原料药的释放为等比扩散为主。

3 讨论

载体包封药物的常规制备方法主要有纳米粒沉淀法、乳化溶剂挥发法、高压均质法、微乳法等。

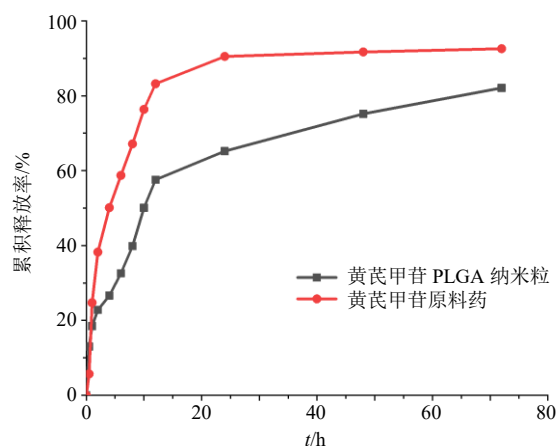


图 8 体外释放曲线

Fig. 8 In vitro release curve

表 8 黄芪甲苷纳米粒的释药动力学拟合方程及相关系数^[13-14]

Table 8 Release kinetic fitting equation and correlation coefficient of astragaloside IV nanoparticles^[13-14]

释放模型	黄芪甲苷原料药		黄芪甲苷纳米粒	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
零级方程	$Q=1.015\ 92\ t+40.722\ 96$	0.848 5	$Q=0.984\ 62t+24.916\ 12$	0.694 7
一级方程	$Q=90.654\ 73\ [1-\exp(-0.198\ 87\ t)]$	0.981 3	$Q=76.837\ 11\ [1-\exp(-0.105\ 67\ t)]$	0.946 4
Higuchi	$Q=11.191\ 24\ t^{1/2}+21.775\ 05$	0.713 3	$Q=9.762\ 22\ t^{1/2}+9.925\ 64$	0.913 1
Riger-Peppas	$Q=34.967\ 77\ t^{0.262\ 3}$	0.865 5	$Q=20.160\ 44\ t^{0.342\ 5}$	0.959 6

本实验曾采用纳米粒沉淀法和高压均质法制备纳米粒，结果大量的药物以白色沉淀析出，纳米粒粒径较大，PDI 较高。采用改良的乳化溶剂挥发法时，所制备的纳米粒混悬液带有淡蓝色乳光，粒径分布均匀，稳定性较好，而且纳米粒的包封率和载药量得到了提高，同时，该法操作简单，重复性较好。

本实验采用 QbD 理念，以治疗缺血性心脏病的口服聚合物纳米颗粒为预先设定的目标产品，设计其质量特性作为研究的基础，在系统了解关键物料属性和关键工艺参数的基础上^[15-17]，结合 Plackett-Burman 及星点设计-效应面法进行实验设计，系统研究了纳米粒处方及生产工艺中的各参数，确定了黄芪甲苷纳米制剂最优处方组成及制备工艺。

星点设计-效应面优化法是当前常用的实验优化方法，通过非线性数学模型绘制效应面并优选最佳条件，能够保证试验精度，分析各因素之间的相互作用，具有显著减少实验次数、精度高、预测性较好等特点，避免了从实验室研究到工业生产过渡过程中生产工艺的单一性和不一致性^[13,18-20]。星点设计时，当采用多指标优化实验，各指标的优选条件可能会相互矛盾，即对某一指标有利的条件可能对其他指标不利，这时可采用综合指标 OD 值来考察指标的综合效果。本实验采用星点设计 3 因素 5 水平制备黄芪甲苷纳米粒，以 OD 值作为综合指标优化黄芪甲苷纳米粒的最佳配比，优化后的纳米粒粒径小、包封率载药量高和稳定性均较好，为后期治疗缺血性心脏病的制剂开发奠定了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 李泽华, 关贤颂, 蒋路平. 黄芪甲苷通过 NRF2/HO-1 信号通路减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(12): 2147-2153.

[2] 李翔, 赵琴琴, 郑鸣之, 等. 黄芪甲苷和丹参素对大鼠心肌缺血后心功能的保护作用研究 [J]. 中国现代应用

药, 2021, 38(18): 2208-2214.

[3] 叶慧芳, 张杰, 刘华, 等. 黄芪甲苷 PEG-PE 纳米胶束的制备、细胞内分布及抗心肌细胞凋亡的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(10): 815-821.

[4] 李艳玲, 丁煌, 傅馨莹, 等. 黄芪甲苷配伍三七总皂苷对脑缺血大鼠 BMSCs 移植后神经修复的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6537-6544.

[5] 张小飞, 邢传峰, 果秋婷. 基于质量源于设计(QbD)理念优化穿心莲内酯固体脂质纳米粒 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 194-200.

[6] Mishra V, Thakur S, Patil A, *et al.* Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15(8): 737-758.

[7] 肖传学, 高展, 苏娟, 等. 基于质量源于设计(QbD)理念的穿心莲内酯结肠靶向微丸研究 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5462-5469.

[8] Yu Y D, Xiu Y P, Li Y F, *et al.* To explore the mechanism and equivalent molecular group of *Radix Astragali* and *Semen Lepidii* in treating heart failure based on network pharmacology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5518192.

[9] Ghose D, Patra C N, Ravi Kumar B V V, *et al.* QbD-based formulation optimization and characterization of polymeric nanoparticles of cinacalcet hydrochloride with improved biopharmaceutical attributes [J]. *Turk J Pharm Sci*, 2021, 18(4): 452-464.

[10] Soni G, Kale K, Shetty S, *et al.* Quality by design (QbD) approach in processing polymeric nanoparticles loading anticancer drugs by high pressure homogenizer [J]. *Heliyon*, 2020, 6(4): e03846.

[11] 谢青璇, 李小芳, 谢龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1614-1622.

[12] 徐玲霞, 刘水婷, 刘骏, 等. Box-Behnken 效应面法优化吴茱萸次碱脂质液晶纳米粒的处方研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5076-5081.

[13] 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.
- [14] 邹佳峰, 朱志红, 李范珠, 等. Box-Behnken 响应面法优化疏水改性普鲁兰纳米粒的制备工艺 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54(14): 1154-1161.
- [15] 王逸飞, 朱振宇, 吴志生, 等. QbD 理念的中药缓控释制剂的设计与研发研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4317-4321.
- [16] Gurumukhi V C, Bari S B. Quality by design (QbD)- based fabrication of atazanavir-loaded nanostructured lipid carriers for lymph targeting: Bioavailability enhancement using chylomicron flow block model and toxicity studies [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(5): 1230-1252.
- [17] 颜洁, 关志宇, 朱卫丰, 等. Box-Behnken 效应面法优化自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的处方与工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5706-5713.
- [18] 张海燕, 陈晓燕, 万娜, 等. 星点设计-效应面法优化栀子苷表面修饰纳米粒的制备工艺 [J]. 中成药, 2011, 33(2): 245-249.
- [19] 李木生, 王婴, 蒋梦玥, 等. 星点设计-效应面法优化羟基喜树碱长循环纳米粒的制备工艺 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(1): 85-90.
- [20] 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.

[责任编辑 郑礼胜]