

星点设计效应面法优选穿琥宁固体脂质微粒处方

张志勇^{1*}, 王 鹏², 何文生³(1.四川大学华西医院药剂科, 成都 610041; 2.核工业四一六医院, 成都 610051; 3.重庆市大足区人民医院药剂科, 重庆 402360)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1011-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.18

摘要 目的:应用星点设计效应面法优选穿琥宁固体脂质微粒的处方。方法:以乳化-溶剂挥发法制备穿琥宁固体脂质微粒,以包封率、平均粒径为评价指标,考察内水相与油相体积比(W_1/O)、脂质比(SA/SPC, m/m)、外水相表面活性剂(即泊洛沙姆)质量分数对处方的影响,对结果分别进行多元线性与二项式方程拟合,采用效应面预测最佳处方。结果:最佳处方为 W_1/O 为0.2:0.2, SA/SPC为8:1(m/m),泊洛沙姆质量分数为1.0%。二项式拟合方程优于多元线性回归方程,但相关性较差。此条件下,包封率为54.90%、平均粒径为 $(6.27 \pm 0.08) \mu m$ 。结论:所选处方制备的穿琥宁固体脂质微粒质量合格、重现性好,可为该制剂的进一步研发提供参考。

关键词 穿琥宁; 固体脂质微粒; 星点设计; 效应面法

Optimization of the Prescription of Potassium Dehydroandrographolide Succinate Solid Lipid Microparticle by Central Composite Design-response Surface Methodology

ZHANG Zhi-yong¹, WANG Peng², HE Wen-sheng³(1.Dept. of Pharmacy, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2.No. 416 Hospital of Nuclear Industry, Chengdu 610051, China; 3.Dept of Pharmacy, Chongqing Dazu District People's Hospital, Chongqing 402360, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the prescription of Potassium dehydroandrographolide succinate (PDS) solid lipid microparticle by central composite design-response surface methodology. METHODS: Solid lipid microparticles were prepared by emulsification-evaporation method. The entrapment efficient and mean particle size were chosen as evaluation indexes to investigate the influence of W_1/O , SA/SPC(m/m), concentration of external water phase surfactant (poloxamer) on the prescriptions. Multiple linear regression and second-order quadratic models were carried out, and then the optimum prescription was calculated by response surface methodology. RESULTS: The optimum prescription was as follows: W_1/O was 0.2:0.2; SA/SPC was 8:1(m/m) and poloxamer was 1.0%, respectively. Regression coefficients of second quadratic model were higher than multiple linear regression, but there was poor correlation. However, according to the optimal conditions, the entrapment efficient and microparticle size were 54.90% and $(6.27 \pm 0.08) \mu m$. CONCLUSIONS: Prepared PDS solid lipid microparticles is qualified and reproducible, and can provide reference for further R&D of the preparation.

KEYWORDS Potassium dehydroandrographolide succinate; Solid lipid microparticle; Central composite design; Response surface methodology

星点设计效应面法(CCD-RSM)是近年来常用的工艺优选方法,比正交试验更简化,比均匀设计法更全面。其实验精度高,虽然实验次数稍多,但模型更符合实际,能更准确的反映出各因素对效应的影响^[1-2]。固体脂质可提高药物的生物利用度,具有较高的物理稳定性,药物泄漏慢,且毒性低。穿琥宁(PDS)是一种经穿心莲内酯酯化、脱水、成盐而来的抗病毒和抗炎药物^[3]。但是,目前PDS制剂种类单一,且口服肠溶制剂的生物利用度低^[4]。笔者采用CCD-RSM法优选PDS固体脂质微粒的处方,制备的PDS固体脂质微粒可采用吸入或其他适宜给药途径,可降低不良反应发生率,使临床选择多样化,也可为PDS制剂的进一步研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-10A Tvp 高效液相色谱(HPLC)仪,包括CLASS-vp 色谱数据处理系统(日本岛津公司);XP205型电子天平(瑞士梅

特勒-托利多公司);TG16-WS 台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司);AS3120型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,功率:120 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

PDS原料药(广汉市维康植化有限公司,纯度:98.0%,批号:070228);脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯对照品(中国食品药品检定研究院,纯度:99.8%,批号:111598-200807);药用硬脂酸(湖州展望药业有限公司,批号:20091108);泊洛沙姆(德国BASF公司,规格:Lutrol F68,批号:WPPE587E);卵磷脂(美国Sigma公司,批号:P5638);纯化水由四川大学华西医院制剂室提供,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 PDS 固体脂质微粒分散液的制备^[5-6]

采用乳化-溶剂挥发法制备微粒。分别称取处方量硬脂酸、卵磷脂,40℃水浴下溶于0.20 ml三氯甲烷-乙醇(3:1, V/V)混合液中,与60 mg/ml的PDS水溶液快速涡旋混匀,超声乳化

* 主任药师, 硕士。研究方向:医院药学。电话:028-85422667。E-mail: asg-yong@163.com

2 min后,直接将初乳分散到同温度的5 ml泊洛沙姆液中,超声2 min,形成复乳,再将复乳分散到15 ml冰浴中的泊洛沙姆液中,继续搅拌1 h,即得PDS固体脂质微粒分散液,备用。

2.2 包封率的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇:水(0.05% KH₂PO₄, pH2.51)=(65:35, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:251 nm;进样量:5 μl。在此色谱条件下,理论板数按脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯色谱峰计算应不低于3 000,分离度不低于1.5。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取干燥至恒质量的脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯单钾盐4.2 mg,置于25 ml量瓶中,添加空白固体脂质微粒分散液(取不含PDS的各处方量辅料,按“2.1”项下方法制备)10 ml,以50%甲醇稀释,定容,0.22 μm微孔滤膜滤过。分别进样2、4、8、16、32、48 μl,测定峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,以脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=1\ 052\ 060x-18\ 949.44(n=6, r=0.999\ 9)$ 。结果表明,脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯的进样量在0.336~8.064 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系良好。

2.2.3 样品测定 由文献可知,PDS于60 ℃乃至更高温度下放置24 h,含量降低<5%^[7]。故采用常温离心法测定PDS固体脂质微粒包封率。精密量取PDS固体脂质微粒分散液2 ml,置于2 ml离心管中,以离心半径为14 cm、8 000 r/min离心10 min,取上清液,0.22 μm微孔滤膜滤过,备用。在上述色谱条件下测定PDS含量,按下式计算包封率:包封率=(加入PDS总量-介质中游离PDS的量)/加入PDS总量×100%。

2.3 粒径测定^[8]

2.3.1 测定标准 按2010年版《中国药典》(二部)附录IX E项下粒度和粒度分度测定法中第一法,采用显微镜法测定PDS固体脂质微粒粒径及粒径分布,计算目镜测微尺每1小格的长度。不同目镜倍数下,目镜测微尺每小格的长度分别为:4×目镜下:10×30/9=33 μm;10×目镜下:10×68/50=13.6 μm;40×目镜下:10×1/3=3.3 μm;100×目镜下:10×3/22=1.36 μm。

2.3.2 样品测定 取PDS固体脂质微粒分散液适量,用力摇匀后取少量样品,滴到载玻片上,盖以盖玻片,防止气泡混入,再在400~1 000倍显微镜下检视规定视野内的总粒数,测定不少于500个粒径,求平均值(Dav)。

2.4 星点设计效应面法优选处方

2.4.1 试验设计 在单因素试验基础上,选择对方影响较大的3个因素,即脂质比(硬脂酸-卵磷脂, W₁/O, A)、油相与内水相体积比(SA/SPC, B)、外水相表面活性剂(即泊洛沙姆)质量分数(C)为考察因素,以包封率、平均粒径为评价指标,采用星点设计效应面法优选工艺。因素与水平见表1;星点设计效应面法试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A, m/m	B, V/V	C, %
-1.732	3:2	11:1	0.25
-1	2.5:2	9:1	0.5
0	2:2	7:1	1
1	2:2.5	5:1	2
1.732	2:3	3:1	4

表2 星点设计效应面法试验设计与结果

Tab 2 Design and results of Central composite design-response surface methodology

试验号	A	B	C	包封率, %	平均粒径, μm
1	0.00	0.00	0.00	49.23	6.76
2	0.00	0.00	0.00	51.07	6.67
3	1.00	1.00	-1.00	44.22	6.57
4	-1.00	1.00	1.00	54.26	12.28
5	0.00	0.00	0.00	50.76	6.35
6	-1.00	-1.00	1.00	19.55	8.51
7	-1.00	-1.00	-1.00	49.10	9.23
8	0.00	0.00	0.00	45.46	6.89
9	-1.73	0.00	0.00	49.44	30
10	0.00	1.73	0.00	51.44	6.14
11	1.00	-1.00	1.00	50.67	9.21
12	1.00	-1.00	-1.00	50.44	6.68
13	0.00	-1.73	0.00	47.53	5.9
14	0.00	0.00	0.00	48.12	6.54
15	0.00	0.00	1.73	50.12	8.46
16	0.00	0.00	0.00	52.33	6.83
17	0.00	0.00	-1.73	52.88	6.85
18	1.00	1.00	1.00	49.22	6.31
19	-1.00	1.00	-1.00	51.76	6.49
20	0.00	0.00	0.00	51.29	6.26

2.4.2 模型拟合 采用SAS 9.2统计软件对各因素、水平进行多元线性与二项式拟合。多元线性方程为 $Y_{\text{包封率}}=35.92+12.74X_1+0.07X_2-63.34X_3(R^2=0.133\ 6, P>0.05)$ 、 $Y_{\text{平均粒径}}=1.43-1.38X_1+1.28X_2-0.26X_3(R^2=0.203\ 1, P=0.106\ 2>0.10)$ 。根据t检验,删除 $P>0.05$ 的项,简化模型,所得二项式方程为 $Y_{\text{包封率}}=137.43X_1-67.49X_1^2+0.26X_2^2(R^2=0.463\ 3, P>0.05)$ 、 $Y_{\text{平均粒径}}=17.96X_1-11.23X_2+28.27X_3+3.99X_1X_2-16.5X_1X_3-1.17X_2X_3-8.86X_1^2+0.76X_2^2(R^2=0.851\ 3, P<0.05)$ 。根据拟合结果,二次项拟合线性相关系数均高于多元线性拟合,说明各因素与包封率和粒径大小的关系更趋向于二次项关系,而非线性。平均粒径的拟合二次项相关系数P值稍佳,但二者拟合多元线性相关性均较差,拟合方程不具有指导意义。故3个因素对包封率均具有一定影响,其中因素A、C对包封率影响最明显。

2.4.3 效应面优化与预测 根据二项式方程,应用Origin 8.0软件分别绘制包封率、平均粒径与各因素的三维效应面和二维等高线图,见图1。

由图1可知,在包封率方面,因素B的影响较大,且比例在1:1时出现极值,之后包封率出现一个平台区;而因素A比例在3~5、10~11时,包封率出现极值;因素C在0.02%时包封率出现极值;因素A、C对包封率具有交互影响。在平均粒径方面,本课题组要求粒子粒径范围为1~7.5 μm^[9]。因素A、B、C对粒径的影响都较明显,因素B>1.2时,对粒径的影响差异有统计学意义($P<0.05$)。因素A、C对平均粒径存在一定的影响,且二者对平均粒径有交互影响。

根据三维效应面和二维等高线,得到各因素的预测范围。综合考虑成本等因素,选取预测范围内各因素的最佳参数为A=1.0、B=8、C=1.0,即油相与内水相体积为0.2:0.2,脂质比为8:1(m/m),泊洛沙姆质量分数为1.0%。各因素最佳预测范围见表3。

2.5 工艺验证试验

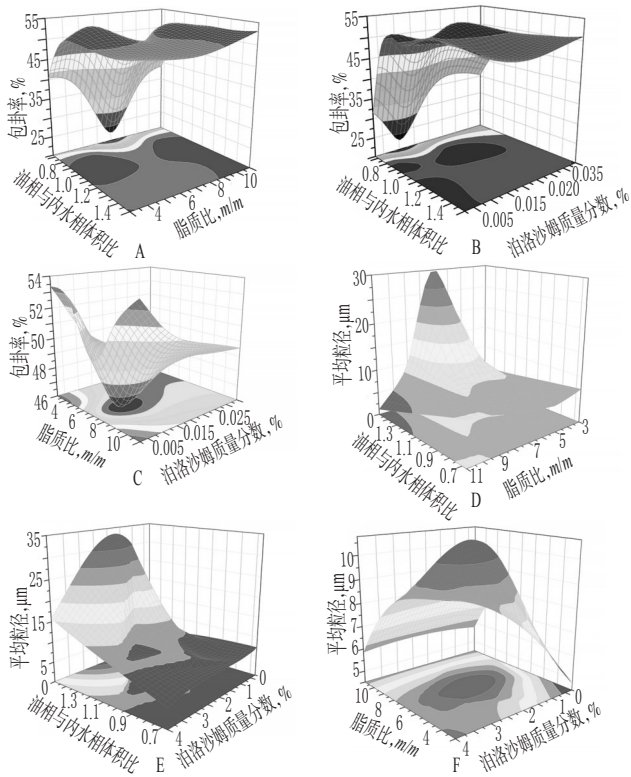


图1 三维效应面与二维等高线图

A. 脂质比和油相与内水相体积比对包封率的影响; B. 泊洛沙姆质量分数和油相与内水相体积比对包封率的影响; C. 泊洛沙姆质量分数和脂质比对包封率的影响; D. 脂质比和油相与内水相体积比对粒径的影响; E. 泊洛沙姆质量分数和油相与内水相体积比对粒径的影响; F. 泊洛沙姆质量分数和脂质比对粒径的影响

Fig 1 Three-dimensional response surface and two-dimensional contour map

A. effects of W_1/O and SA/SPC on entrapment efficiency; B. effects of concentration of poloxamer and W_1/O on entrapment efficiency; C. effects of concentration of poloxamer and SA/SPC on entrapment efficiency; D. effects of W_1/O and SA/SPC on particle size; E. effects of concentration of poloxamer and W_1/O on particle size; F. effects of concentration of poloxamer and W_1/O on particle size

表3 各因素最佳预测范围

Tab 3 The best estimation range of factors

指标	A, m/m	B, V/V	C, %
包封率	0.8~1.2	8~11	0.5~1.5
平均粒径	1.0~1.5	7~11	0.25~3
最佳值	1.0~1.2	8~11	0.5~1.5

按“2.4”项下优选的处方称取主辅料各适量,照“2.1”项下方法制备3批PDS固体脂质微粒分散液,测定包封率和平均粒径,并在显微镜下观察其粒径分布。工艺验证试验结果见表4;粒径分布图见图2;光学显微镜图见图3。

表4 工艺验证试验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Results of validation test($\bar{x} \pm s$)

批次	包封率, %	平均粒径, μm
1	53.79 \pm 2.33	6.19 \pm 2.45
2	55.12 \pm 1.78	6.27 \pm 2.00
3	55.78 \pm 1.01	6.35 \pm 1.90
平均值	54.90 \pm 1.01	6.27 \pm 0.08

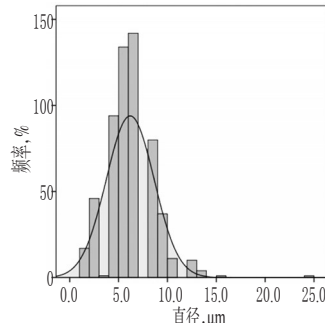


图2 粒径分布图

Fig 2 Distribution of particle size

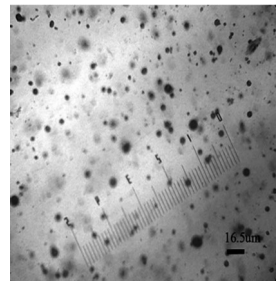


图3 光学显微镜图

Fig 3 Light microscopy

由表4、图2、图3可知,验证试验中,平均包封率、平均粒径与星点设计效应面试验的最高值、平均值相当;制备的微粒粒子形态良好,呈球形或近球形,粒径较小,多数分布于10 μm 以下,且基本呈正态分布,表明所选处方合理、可行,可用于制备PDS固体脂质微粒。

3 讨论

在进行CCD-RSM试验时,各组粒子形态较好,多呈球形或近球形,分散情况良好。个别组出现粒径较大者(第9组),但其包封率稍高。同时,其他粒径稍大者,多数包封率较高。这可能是由于粒径大者,复乳化过程较短,刚性囊壁迅速形成,药物向外水相扩散时间较短,致使包封率稍高。

PDS作为一种水溶性药物,脂溶性很差,以复乳法制备固体脂质微粒,药物易向外水相扩散而使包封率降低,油相中表面活性剂的浓度与外水相中表面活性剂的浓度是维持复乳稳定的重要因素。快速形成一定刚性的囊壁,也是减少药物向外水相扩散的方法之一。同时,外水相中表面活性剂能显著降低油相的表面张力,形成小粒径微粒,表面活性剂浓度越小,复乳越不稳定,易破乳致包封率降低。油相与内水相的体积比对包封率与粒径也有较大的影响。后续研究需对油相溶剂等因素进行有针对性的筛选与改进。

参考文献

- [1] 吴伟,崔光华.星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J].国外医学药学分册,2000,27(5):292.
- [2] 邱颖,朱玲,孙晓英.星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用[J].海峡药学,2011,23(2):18.
- [3] 罗爱庭.中药穿琥宁的晶体结构研究[D].成都:四川大学,2006.
- [4] 王鹏,江云鸥,张志勇.穿琥宁体外稳定性研究[J].中国药房,2010,21(39):3664.
- [5] Jaspert S, Bertholet P, Piel G, et al. Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 65(1):47.
- [6] 李姜晖,王柏.乳化蒸发法制备固体脂质纳米粒[J].药学进展,2008,32(3):127.
- [7] 罗巍伟.穿琥宁稳定性与新制剂[D].成都:四川大学,2005.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录73.
- [9] 梁文权.生物药剂学与药物动力学[M].北京:人民卫生出版社,2007:87-89.

(收稿日期:2013-06-04 修回日期:2013-09-30)