

星点设计-效应面法优化转铁蛋白修饰粉防己碱与硫酸长春新碱脂质体的处方[△]

姜 英*, 王晓敏, 王艳红, 程 岚, 李学涛[#](辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4399-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.26

摘要 目的:制备转铁蛋白(TF)修饰粉防己碱(TET)与硫酸长春新碱(VCR)的主动靶向脂质体,优化其处方。方法:以硫酸铵梯度法制备TF修饰TET与VCR脂质体,以TET包封率、VCR包封率的综合评分为指标,用星点设计-效应面法优化卵磷脂/胆固醇(EPC/Chol)摩尔比、卵磷脂/聚乙二醇2000-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(EPC/PEG2000-DSPE)摩尔比、TF质量分数,并进行验证试验。结果:最优处方为EPC/Chol摩尔比1.5:1,EPC/PEG2000-DSPE摩尔比20:1,TF质量分数0.10%;所得脂质体TET包封率为97.80%,VCR包封率为93.00%,综合评分为94.44($n=3$),与其预测值93.81接近。结论:优化所得处方稳定,可用于制备TF修饰TET与VCR脂质体。

关键词 星点设计;效应面法;转铁蛋白;粉防己碱;硫酸长春新碱;脂质体

Formulation Optimization of Transferrin Modified Tetrandrine and Vincristine Liposomes by Central Composite Design-response Surface Method

JIANG Ying, WANG Xiao-min, WANG Yan-hong, CHENG Lan, LI Xue-tao (School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare transferrin (TF) modified tetrandrine (TET) and vincristine (VCR) active targeting liposomes, and to optimize its formulation. METHODS: TF modified TET and VCR liposomes were prepared by ammonium sulfate gradient method. Using comprehensive score of encapsulation efficiency of TET and VCR as index, central composite design-response surface method was used to optimize and validate mole ratio of EPC/Chol, mole ratio of EPC/PEG2000-DSPE and TF mass fraction. RESULTS: The optimal formulation was that the mole ratios of EPC/Chol and EPC/PEG2000-DSPE were 1.5:1 and 20:1, TF mass fraction was 0.10%. The encapsulation efficiency of TET and VCR were 97.80% and 93.00%, respectively. The comprehensive score was 94.44 ($n=3$) which was close to the predicted value of 93.81. CONCLUSIONS: The optimal formulation is stable and can be used for the preparation of TF modified TET and VCR liposomes.

KEYWORDS Central composite design; Response surface method; Transferrin; Tetrandrine; Vincristine; Liposome

转铁蛋白(TF)是一种广泛存在于脊椎动物体液及细胞中的单体糖蛋白,可与抗癌药物、蛋白质等形成复合物,并将其运送至靶向肿瘤组织。TF作为靶向配体具有靶向性强、毒副作用小的特点^[1]。将TF修饰在脂质体表面作为靶向配体,可提高脂质体的靶向作用。粉防己碱(TET)又名汉防己甲素,是从防己科植物粉防己的块根中提取的双苄基异喹啉类生物碱^[2]。研究表明,TET可抑制肿瘤的多药耐药作用^[3-4]。硫酸长春新碱(VCR)是长春花生物碱类抗肿瘤药物,对白血病、淋巴瘤等具有显著的抗肿瘤活性^[5]。将TET包裹在脂质体双分子层中,可产生抑制肿瘤的多药耐药作用,以提高抗肿瘤药物的敏感度。将VCR作为抗肿瘤药物包封在脂质体水溶性空腔中,以诱导肿瘤细胞的凋亡。

星点设计-效应面法是国外常用的集数学和统计学方法于一体的试验设计方法^[6],该法可以解决均匀设计和正交试验设

计的不足,操作简单,既较好地保证了试验精度又可以分析各因素之间的相互作用,同时试验次数也较少^[7]。故本试验采用此方法优化TF修饰TET与VCR脂质体的处方,以提高脂质体靶向性及VCR的抗肿瘤效果。

1 材料

1.1 仪器

20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司);FA1004电子分析天平(上海悦平科学仪器有限公司);JY92-2D超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);LF-1脂质体挤出仪(加拿大奥维斯丁公司);MD34透析袋(上海百赛生物技术有限公司);PHS-25 pH计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂)。

1.2 药品与试剂

TF(北京索莱宝科技有限公司,批号:1015567,纯度:>90%);VCR、TET(大连美仑生物技术有限公司,批号:M0423AS、MB6635,纯度:均98.2%);卵磷脂(EPC,日本NOF公司,批号:120015);聚乙二醇2000-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG2000-DSPE)、PEG2000-DSPE-N-羟基琥珀酰亚胺(PEG2000-DSPE-NHS,日本精化株式会社,批号:B10206、B11011);胆固醇(Chol,上海普迈生物技术有限公司,批号:8280100)。

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81102822;81541081);辽宁省科学技术计划项目(No.2014020046)

* 硕士研究生。研究方向:新剂型给药系统。电话:0411-85890170。E-mail:jiangying1989abc@163.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:新剂型给药系统。电话:0411-85890145。E-mail:lixuetao1979@163.com

2 方法与结果

2.1 TF修饰TET与VCR脂质体的制备

采用硫酸铵梯度法,按处方比例分别精密称取EPC、Chol、PEG2000-DSPE、PEG2000-DSPE-NHS和TET,溶解于10 ml氯仿中,然后在40℃水浴中旋转蒸发除去氯仿,加入250 mmol/L硫酸铵水溶液5 ml,使之水化。水化液在冰浴中超声10 min,然后置超声波细胞粉碎机中超声(超声10 s后间歇10 s,功率200 W)10 min,超声后的脂质体溶液依次挤压通过孔径为400、200 nm的聚碳酸酯膜各2次。将过膜后的脂质体密封于透析袋中(截留分子量10 000~12 000 D),透析袋置磷酸盐缓冲液(PBS)中透析24 h,每8 h更换1次透析液。透析后的脂质体加入TF 5 mg,室温磁力搅拌反应10 h,即得空白脂质体。将上述空白脂质体与适量的VCR混合,在40℃水浴振摇30 min,即得。

2.2 脂质体包封率的测定

2.2.1 色谱条件^[8] (1)VCR的色谱条件。色谱柱:Diamonsil C₁₈柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:1.5%三乙胺水溶液(pH 7.5)-甲醇(30:70, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:297 nm;柱温:30℃;进样量:20 μl。理论板数以VCR计不低于3 000。(2)TET的色谱条件。色谱柱:Diamonsil C₁₈柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.02%三乙胺水溶液-乙腈与甲醇(25:55)混合溶液(10:90, V/V);柱温:30℃,检测波长:283 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl。理论板数以TET计不低于3 000。

2.2.2 标准曲线的绘制 以质量浓度(x)为横坐标、所测样品的峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线。得VCR的线性方程为 $y=1\ 005.9x-9\ 388.4$ ($r=0.999\ 8, n=6$),表明VCR在160~1 600 μg/ml范围内线性良好;得TET的线性方程为 $y=443\ 729x-5\ 804.9$ ($r=0.999\ 9, n=6$),表明TET在0.12~1.2 mg/ml范围内线性良好。

2.2.3 精密度、回收率及重复性试验 VCR的日内精密度RSD为0.3%($n=5$),重复性试验RSD为0.25%($n=5$),24 h稳定性试验RSD为0.17%($n=5$),方法回收率为98.36%(RSD=2.87%, $n=6$);TET的日内精密度RSD为0.1%($n=5$),重复性试验RSD为0.1%($n=5$),24 h稳定性试验RSD为0.1%($n=5$),方法回收率为97.68%(RSD=0.16%, $n=6$)。

2.2.4 脂质体药物总量的测定和包封率的计算 精密量取脂质体1 ml,加至Sephadex G50凝胶柱(12 cm×1.0 cm)上方,以PBS进行洗脱,洗脱流速为1.0 ml/min。收集含有乳光的脂质体部分,加适量甲醇,超声并定容至10 ml,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液20 μl,进样测定,计算过柱后脂质体中药物总量。另取1 ml脂质体不过Sephadex G50凝胶柱,以甲醇定容至10 ml,超声破乳,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液20 μl,进样测定,计算过柱前脂质体药物总量。按以下公式计算TET和VCR的包封率:包封率(%)=过柱后脂质体药物的总量/过柱前脂质体药物的总量×100%

2.3 试验设计及结果

在单因素预试验的基础上,选择对TF修饰TET与VCR脂质体的制备影响较显著的EPC/Chol摩尔比(X_1)、EPC/PEG2000-DSPE摩尔比(X_2)、TF质量分数(X_3)作为考察因素,采用星点设计-效应面法以较少的试验次数和较短的时间对所选的试验参数进行全面考察。根据星点设计试验原理^[9],以TET包封率(Y_1)、VCR包封率(Y_2)的综合评分(Z)为测定指标

进行考察, $Z=Y_1\times 30+Y_2\times 70$ 。因素与水平见表1,试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 (EPC/Chol摩尔比)	1.0:1	1.5:1	2.0:1
X_2 (EPC/PEG2000-DSPE摩尔比)	15:1	20:1	25:1
X_3 (TF质量分数,%)	0.05	0.10	0.15

表2 试验设计与结果

Tab 2 Experiment design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	$Y_1, \%$	$Y_2, \%$	Z
1	0	1	1	85.36	81.03	82.33
2	1	0	-1	77.42	72.88	74.24
3	0	-1	-1	80.92	76.83	78.06
4	1	0	1	78.02	75.05	75.94
5	1	1	0	82.96	77.75	79.31
6	-1	0	-1	63.17	59.06	60.29
7	0	-1	1	79.54	75.75	76.89
8	0	1	-1	83.27	79.37	80.54
9	1	-1	0	79.06	74.10	75.59
10	-1	0	1	64.18	60.29	61.46
11	-1	-1	0	72.21	68.94	69.92
12	-1	1	0	76.19	70.46	72.18
13	0	0	0	97.29	92.03	93.61
14	0	0	0	98.51	93.82	95.23
15	0	0	0	96.93	91.97	93.46
16	0	0	0	96.87	91.92	93.41
17	0	0	0	96.93	92.79	93.33

采用Design-Expert 8.0.6统计软件以 Z 为因变量,分别对各因素进行二次多项式拟合,得拟合方程式: $Z=-163.943\ 00+193.040\ 50X_1+6.300\ 90X_2+766.395\ 00X_3+0.146\ 00X_1X_2+5.300\ 00X_1X_3+2.960\ 00X_2X_3-62.061\ 00X_1^2-0.161\ 71X_2^2-4\ 124.100\ 00X_3^2$ 。二项式拟合复相关系数 $R^2=0.982\ 4$,方差分析结果见表3。

表3 二次回归模型的方差分析结果

Tab 3 The variance analysis of quadratic regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
X_1	212.49	1	212.49	43.48	0.000 3	极显著
X_2	24.15	1	24.15	4.94	0.061 6	不显著
X_3	1.52	1	1.52	0.31	0.594 1	不显著
X_1X_2	0.53	1	0.53	0.11	0.750 9	不显著
X_1X_3	0.07	1	0.07	0.014	0.908 0	不显著
X_2X_3	2.19	1	2.19	0.45	0.524 7	不显著
X_1^2	1 013.57	1	1 013.57	207.40	<0.000 1	极显著
X_2^2	68.82	1	68.82	14.08	0.007 1	极显著
X_3^2	447.58	1	447.58	91.58	<0.000 1	极显著
模型	1 904.34	9	211.59	43.30	<0.000 1	极显著
残差	34.21	7	4.89			
失拟项	31.64	3	10.55	16.42	0.010 3	显著
误差	2.57	4	0.64			
总离差	1 938.55	16		-0.042 9		
R^2	0.982 4		预平均	0.736 8		
R^2_{adj}	0.959 7		精密度值	18.450		

由表3可见,总模型方程显著($P<0.000\ 1$);回归方差显著性检验表明,一次项 X_1 、二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对包封率综合评分的曲面效应极显著($P<0.01$);一次项 X_2 、 X_3 ,交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 、

X_1X_3 对综合评分的线性效应不显著($P>0.05$),说明各因素间的交互作用不显著。由此可知, X_2 、 X_3 对综合评分的影响无显著性差异,考虑到提取成本及实际操作,确定 X_2 为20:1、 X_3 为0.10%。

依据回归方程,在保持1个因素编码为0时,借助Design-Expert 8.0.6统计软件绘制其他2个因素与综合评分关系的三维效应面图,结果见图1。

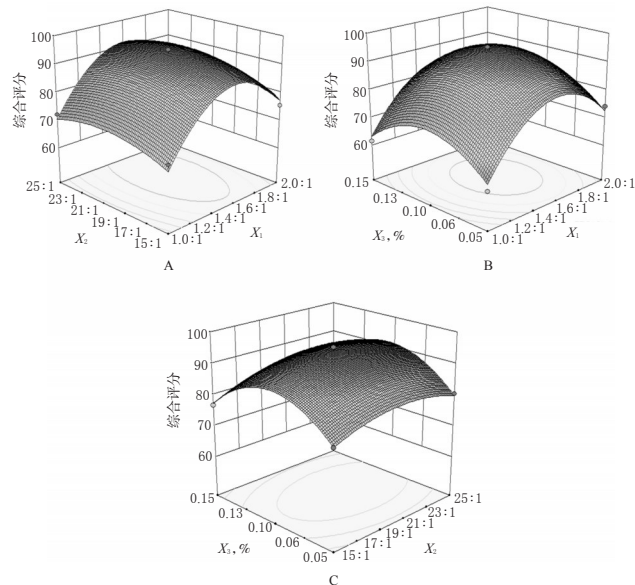


图1 各因素对综合评分影响的效应面图

A. EPC/PEG2000-DSPE 摩尔比和 EPC/Chol 摩尔比; B. TF 质量分数和 EPC/Chol 摩尔比; C. TF 质量分数和 EPC/PEG2000-DSPE 摩尔比

Fig 1 Response surface of each factor on comprehensive score

A. mole ratio of EPC/PEG2000-DSPE and mole ratio of EPC/Chol; B. mass fraction of TF and mole ratio of EPC/Chol; C. mass fraction of TF and mole ratio of EPC/PEG2000-DSPE

该图可直观地表现各因素之间的交互情况,极值条件出现在等高线的圆心处。由图1可知, X_1 与 X_3 的等高线图最圆,说明它们之间相互作用对综合评分的影响最大;而等高线图越扁平,表示因素之间的相互影响越小,故 X_1 、 X_2 两因素间的交互作用影响最小。越接近圆心,综合评分就越大,就越符合要求。考虑到实际操作的可行性,将优化条件修正为EPC/Chol摩尔比为1.5:1、EPC/PEG2000-DSPE摩尔比为20:1、TF质量分数为0.10%,此时TF修饰的脂质体中综合评分的最大预测值为93.81。

2.4 验证试验

根据上述优化处方制备3批TF修饰的TET和VCR脂质体,按“2.2”项下方法测定其包封率,并计算综合评分,具体结果见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of validation tests

试验号	$Y_1, \%$	$Y_2, \%$	Z
1	97.50	93.49	94.69
2	98.65	92.53	94.37
3	97.24	92.98	94.26

由表4可见,验证试验测定计算所得的TET包封率平均值为97.80%,VCR包封率平均值为93.00%,综合评分平均值为94.44($n=3$),与模型预测值93.81接近,表明该模型可靠、该方法可行性良好。

3 讨论

本处方优选试验中加入少量TF,TF作为脂质体的靶头,可与配体结合以增加脂质体的靶向性。同时,TF可增加脂质体的空间位阻,避免了网状内皮系统的快速消除;延长药物在体内的循环时间,提高了生物利用度。VCR作为抗肿瘤药物,修饰在脂质体水溶性空腔中,当脂质体靶向作用于肿瘤细胞后,VCR被释放,可起到杀死肿瘤细胞的作用。TET作为药物外排抑制剂,可抑制抗肿瘤药物的外排,以提高抗肿瘤药物的疗效。所以在综合评分中VCR包封率所占比例较大,而TET包封率所占比例较小。

制备脂质体的方法有很多,包括被动载药法和主动载药法。常用的被动载药法有薄膜法、反相蒸发法、溶剂注入法和复乳法等,主要适用于脂溶性强的药物;常用的主动载药法有pH梯度法、硫酸铵梯度法,主要适用于两性性药物,该法是利用其电中性的形式能跨越脂质双层,但电离形式却不能跨越的原理来实现药物的包封^[10]。故笔者根据本试验的要求及包封药物的性质选择比较稳定的硫酸铵梯度法制备TF修饰TET与VCR脂质体。

参考文献

- [1] 张豪,沈明山,方宏清,等.转铁蛋白/转铁蛋白受体介导的药物运输[J].中国生物工程杂志,2004,24(6):1.
- [2] 胡春梅,朱莉,赵俊义,等.粉防己碱脂质体的制备及其稳定性研究[J].中国药房,2008,19(13):995.
- [3] 李学涛,谭静净,喻荣平,等.中药逆转抗肿瘤药物多药耐药性研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(1):155.
- [4] 刘锦裕,李永生,黄玉清.粉防己碱抗肿瘤的作用及机制研究进展[J].中国现代应用药学,2011,28(3):205.
- [5] 赵妍,于斌,邓意辉,等.主动载药法制备硫酸长春新碱脂质体及其包封率的测定[J].中国药学杂志,2005,40(20):1559.
- [6] 谭静净,程岚,李学涛.中心组合设计-效应面法优化长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方[J].中草药,2012,43(9):1742.
- [7] 贾连群,杨关林,陈阳,等.中心组合设计-效应面法优化痰祛痰颗粒的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):22.
- [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,2010:963-964.
- [9] 沈成英,王治,徐和,等.Box-Behnken设计-效应面法优化波棱甲素新型纳米混悬速溶膜[J].中草药,2014,45(1):37.
- [10] 穆筱梅,梁世强.脂质体的制备方法及其研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(7):1784.

(收稿日期:2015-01-30 修回日期:2015-03-17)

(编辑:邹丽娟)