

Box-Behnken 效应面法优化紫杉醇长循环脂质体处方及制备工艺

史亚军¹ 张小飞¹ 果秋婷²

(1. 陕西中医药大学药学院 陕西 咸阳 712046; 2. 咸阳职业技术学院 陕西 咸阳 712046)

摘要 目的: 通过优化脂质体处方和制备工艺 制备紫杉醇长循环脂质体。方法: 采用薄膜分散-挤出法制备长循环脂质体 在处方优化方面 分别以磷脂浓度(X_1 , mg/mL)、PEG₂₀₀₀-DSPE 浓度(X_2 , mg/mL) 和脂药比(X_3 , W/W) 为考察对象 包封率(Y_1 , %) 为评价指标; 在制备工艺参数优化方面 以均质温度(X_4 , °C)、挤出次数(X_5 , 次) 为考察对象 粒径分布(Y_2 , μm)、多分散系数(Y_3) 为评价指标 利用 Box-Behnken 效应面法优化紫杉醇长循环脂质体的处方和制备工艺; 并测定脂质体的粒径分布、多分散系数及 Zeta 电位; 透射电镜观察其形态 并考察长循环脂质体体外释放行为。结果: 紫杉醇长循环脂质体的包封率为 80.3%、粒径为(97.15 ± 14.9) nm, 多分散系数为 0.117 ± 0.019 Zeta 电位为(-30.3 ± 3.7) mV; 透射电镜显示脂质体粒径均一 呈单层膜球状分布; 体外释放试验结果显示在 24 h 累积释放了 37.4% 说明脂质体有一定的缓释作用。结论: 紫杉醇长循环脂质体采用 Box-Behnken 效应面法优化是可行的。

关键词 紫杉醇; 长循环脂质体; 薄膜分散-挤出; Box-Behnken 效应面法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2015)12-2606-05

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2015.12.037

Optimization of Formulation and Process of Paclitaxel PEGylated Liposomes by Box-Behnken Response Surface Methodology

SHI Ya-jun¹ ZHANG Xiao-fei¹ GUO Qiu-ting²

(1. College of Pharmacy Shaanxi University of Chinese Medicine Xianyang 712046 China; 2. Xianyang Vocational College Xianyang 712046 China)

Abstract Objective: To develop a procedure for preparing paclitaxel encapsulated PEGylated liposomes. Methods: The membrane hydration followed extraction method was used to prepare PEGylated liposomes. The process and formulation variables were optimized by "Box-Behnken Design (BBD)" of response surface methodology (RSM) with the amount of Soya phosphatidylcholine (SPC) and PEG₂₀₀₀-DSPE as well as the rate of SPC to drug as independent variables and entrapment efficiency as dependent variables for optimization of formulation variables while temperature pressure and cycle times as independent variables and particle size and polydispersion index as dependent variables for process variables. The optimized liposomal formulation was characterized for particle size Zeta potential morphology and *in vitro* drug release. Results: For entrapment efficiency particle size polydispersion index Zeta potential and *in vitro* drug release of PEGylated liposomes was found to be 80.3% (97.15 ± 14.9) nm 0.117 ± 0.019 (-30.3 ± 3.7) mV and 37.4% in 24 h respectively. The liposomes were found to be small unilamellar and spherical with smooth surface as seen in transmission electron microscopy. Conclusion: The Box-Behnken response surface methodology facilitates the formulation and optimization of paclitaxel PEGylated liposomes.

Key words Paclitaxel; PEGylated liposomes; Membrane hydration followed extraction method; Box-Behnken response surface methodology

紫杉醇(Paclitaxel)是 HQ SPCLT PHARMA 公司在 1992 年开发上市的一种抗癌药 商品名 Taxol[®] (泰素)。其作用机制是通过促进微管双聚体装配成微管 并且能够防止微管分解 进而阻滞细胞进入 G 和 M 期 破坏细胞在细胞分裂和分裂间期所需要的正常的微管动力学 从而破坏肿瘤细胞的有丝分裂⁽¹⁾。临床上用于治疗乳腺癌、卵巢癌、肺癌、头颈

癌以及急性白血病。由于紫杉醇在水中的溶解度极低(约 1 mg/L) 因此临床上采用紫杉醇注射液(Taxol[®]) 加入聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor[®] EL) 与无水乙醇以 1:1(V/V) 的混合液来增加溶解度。然而聚氧乙烯蓖麻油能引起许多副作用 包括过敏反应、肾毒性和神经毒性⁽²⁾ 因此 开发一种不含聚氧乙烯蓖麻油的紫杉醇注射剂一直是研究的热点。本

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 陕西省重点科技创新团队资助项目(2013KCT-26); 陕西省中药制药重点建设学科资助(10080)

作者简介: 史亚军(1976-) 男 博士 副教授 主要从事中药新剂型研究; Tel: 029-38183689 E-mail: 328573751@qq.com。

研究将紫杉醇制备成循环脂质体,旨在增加药物溶解度,延长药物在体内的滞留时间,提高药效,降低毒副作用。

1 仪器与材料

脂质体挤出器(加拿大 ATS 工业系统有限公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); Mastersizer 2000 粒度分析仪(英国马尔文公司); Zetasizer Nano 电位分析仪(英国马尔文公司); JM21200EX 透射电镜(日本电子公司); GC2120GX 日立冷冻离心机(日本日立公司); PVDF 膜(规格:0.1 μm,密理博中国公司)。紫杉醇原料药(批号: P20130505) 购自浙江海正药业股份有限公司; 紫杉醇对照品(批号: 100925-201102) 购自中国食品药品检定研究院。大豆磷脂(上海太伟药业有限公司); 胆固醇(日本油脂公司); PEG₂₀₀₀-DSPE(日本油脂公司); 无水乙醇(国药集团)。

2 方法与结果

2.1 紫杉醇长循环脂质体的制备工艺 称取处方量的紫杉醇、大豆磷脂、胆固醇、PEG₂₀₀₀-DSPE,置 250 mL 茄形瓶中,加适量三氯甲烷溶解,在 50 °C 减压除去有机溶剂,得到透明均匀薄膜,继续抽真空 1 h 后,加入磷酸盐缓冲液(pH 值为 6.4),在 50 °C 条件下搅拌水化磷脂膜 30 min 后,即得到紫杉醇长循环脂质体混悬液初品。将紫杉醇长循环脂质体混悬液通过 0.1 μm 脂质体挤出器挤出数次,即得带乳光的紫杉醇长循环脂质体浓溶液混悬液,调整体积,采用 0.22 μm PVDF 膜过滤除菌,充氮、灌封,即得紫杉醇长循环脂质体。

2.2 包封率的测定 色谱柱: Kromasil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈(60:40); 检测波长: 227 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL。

称取 10 mg 紫杉醇对照品置于 100 mL 量瓶中,加适量乙腈,振摇使溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为紫杉醇对照品储备液(100 mg/L)。精密量取紫杉醇对照品储备液,加流动相稀释成浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L 的紫杉醇对照品溶液,以紫杉醇峰面积(A)对其浓度(C)进行线性回归,得标准曲线方程为: $A = 54167C + 3901$ ($r = 0.9998$),表明紫杉醇在 0.5 ~ 20.0 mg/L 浓度范围内与峰面积线性关系良好。高、中、低 3 个浓度的平均加样回收率为 100.1%,RSD 为 1.2% ($n = 9$); 日内精密密度 RSD 为 0.7% ($n = 6$); 日间精密密度 RSD 为 1.5% ($n = 6$)。

采用低温超速离心法测定包封率。取 2.0 mL

脂质体加到超速离心管中,在 50 000 r/min 的条件下离心 1 h,吸取上清液;同时精密移取紫杉醇长循环脂质体 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇破坏脂质体定容,采用 HPLC 测定脂质体中紫杉醇的含量,计算包封率。

2.3 Box-Behnken 效应面法优化脂质体处方和制备工艺 在处方筛选方面,通过单因素考察,选取对脂质体性质影响较显著的 3 个因素: 磷脂浓度(X_1)、PEG₂₀₀₀-DSPE 浓度(X_2)、脂药比(X_3)为考察对象,包封率(Y_1)为评价指标;在制备工艺参数方面,通过单因素考察,选取对脂质体性质影响较显著的 2 个因素: 均质温度(X_4)、挤出次数(X_5)为考察对象,粒径分布(Y_2)、多分散系数(Y_3)为评价指标,利用 Box-Behnken 效应面法优化紫杉醇长循环脂质体的处方和制备工艺。因素水平见表 1,处方优化试验安排及结果见表 2,制备工艺优化试验安排及结果见表 3。

表 1 因素与水平

因素	水平		
	低(-1)	中(0)	高(1)
X_1 磷脂浓度/(mg/mL)	5	10	15
X_2 PEG ₂₀₀₀ -DSPE 溶液/(mg/mL)	0.1	0.25	0.4
X_3 脂药比/(W/W)	10	25	40
X_4 均质温度/°C	40	50	60
X_5 挤出次数/次	4	6	8

表 2 优化处方的试验设计表与效应值

实验号	X_1	X_2	X_3	包封率 Y_1 /%
1	10	0.25	40	85.3
2	15	0.1	10	64.5
3	5	0.1	40	75.6
4	10	0.1	25	73.6
5	10	0.25	10	73.5
6	5	0.4	40	79.6
7	15	0.25	25	82.2
8	10	0.25	25	79.4
9	15	0.4	10	75.8
10	10	0.25	25	84.2
11	15	0.4	40	83.4
12	5	0.1	10	61.9
13	5	0.4	10	73.9
14	10	0.25	25	81.9
15	10	0.4	25	76.4
16	15	0.1	40	80.2
17	5	0.25	25	73.6

2.4 数据处理及模型拟合

2.4.1 处方数据处理: 采用“Design Expert”试验设

表 3 优化制备工艺的试验设计与效应值

实验号	X_4	X_5	粒径分布 Y_2/nm	多分散系数 Y_3
1	60	6	106.5	0.215
2	50	6	102.6	0.105
3	50	8	113.4	0.154
4	50	6	98.3	0.126
5	60	4	141.2	0.235
6	50	6	99.4	0.118
7	40	8	136.4	0.208
8	50	4	143.6	0.215
9	60	8	129.8	0.223
10	40	6	179.7	0.238
11	40	4	179.6	0.314

计软件,对脂质体处方所得数据进行处理,以评价指标分别对各因素进行多元线性回归和二项式方程拟合。包封率 $Y_1 = 37.13429 + 1.66915X_1 + 148.7043X_2 + 0.5606X_3 - 0.25X_1X_2 + 0.0065X_1X_3 - 0.89444X_2X_3 - 0.066958X_1^2 - 203.28638X_2^2 - 0.000773X_3^2$ 。对二项式方程中的各项系数进行 F 检验,结果见表 4。

表 4 包封率的多元二项式方程中的各项系数

方差来源	平方和	自由度	均差	F 值	P 值
X_1	46.23	1	46.23	7.35	0.0301
X_2	110.89	1	110.89	17.64	0.0040
X_3	297.02	1	297.02	47.26	0.0002
X_1X_2	0.28	1	0.28	0.045	0.8385
X_1X_3	1.90	1	1.90	0.30	0.5994
X_2X_3	32.40	1	32.40	5.15	0.0574
X_1^2	7.51	1	7.51	1.19	0.3106
X_2^2	56.05	1	56.05	8.92	0.0203
X_3^2	0.081	1	0.081	0.013	0.9128
残差	44.00	7	6.29		
失拟项	32.47	5	6.49	1.13	0.5321
纯误差	11.53	2	5.76		
总离差	667.56	16			

由表 4 可知,方程中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_2^2 对包封率影响较显著 ($P < 0.05$)。结合磷脂浓度、PEG₂₀₀₀-DSPE 浓度和脂药比对包封率影响的曲面图(图 1),表明包封率随着磷脂浓度的增加而增大,随着 PEG₂₀₀₀-DSPE 浓度的增加,包封率先增加后降低,随着脂药比的增加,包封率随之增加。

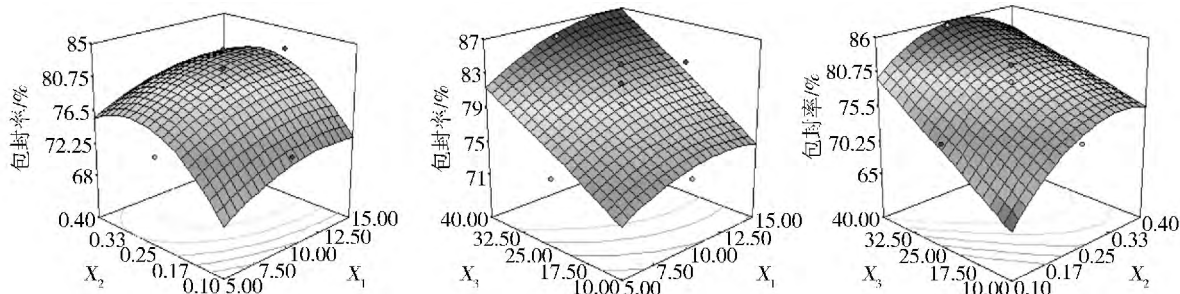


图 1 磷脂浓度(X_1)、PEG₂₀₀₀-DSPE 浓度(X_2)与脂药比(X_3)对包封率(Y_1)影响的效应面图

2.4.2 制备工艺数据处理:同样,采用“Design Expert”试验设计软件,对脂质体制备工艺所得数据进行处理,以评价指标分别对各因素进行多元线性回归和二项式方程拟合。粒径分布 $Y_2 = 1253.16579 - 34.32868X_4 - 73.06272X_5 + 0.3975X_4X_5 + 0.29974X_4^2 + 3.84342X_5^2$;多分散系数 $Y_3 = 3.12018 - 0.092526X_4 - 0.19975X_5 + 0.001175X_4X_5 + 0.000840263X_4^2 + 0.010507X_5^2$ 。对二项式方程中的各项系数进行 F 检验,结果见表 5、6。

由表 5 可知,方程中 X_4 、 X_5 、 X_4^2 、 X_5^2 对脂质体粒径影响显著 ($P < 0.05$)。结合均质温度和挤出次数对粒径分布影响的曲面图(图 2),表明粒径随着均质温度的增加而降低,随着挤出次数的增加而降低。

由表 6 可知,方程中 X_4 、 X_5 、 X_4^2 、 X_5^2 对多分散系数影响显著 ($P < 0.05$)。结合均质温度和挤出次数对多分散系数影响的曲面图(图 3),表明多分散系

表 5 粒径分布的多元二项式方程中的各项系数

方差来源	平方和	自由度	均差	F 值	P 值
X_4	2328.52	1	2328.52	9.27	0.0286
X_5	1198.51	1	1198.51	4.77	0.0307
X_4X_5	252.81	1	252.81	1.01	0.3619
X_4^2	2276.00	1	2276.00	9.06	0.0379
X_5^2	598.75	1	598.75	2.38	0.0453
残差	1256.49	5	251.30		
失拟项	1246.51	3	415.50	83.27	0.0719
纯误差	9.98	2	4.99		
总离差	8801.45	10			

数随着均质温度增加先降低后升高,随着挤出次数的增加而降低。

2.4.3 效应面优化与验证:根据“Design Expert”试验设计软件得最佳处方为:磷脂浓度为 12.4 mg/mL、PEG₂₀₀₀-DSPE 浓度为 0.30 mg/mL、脂药比为 35;最佳制备工艺参数为:均质温度 53 ℃,挤出次数

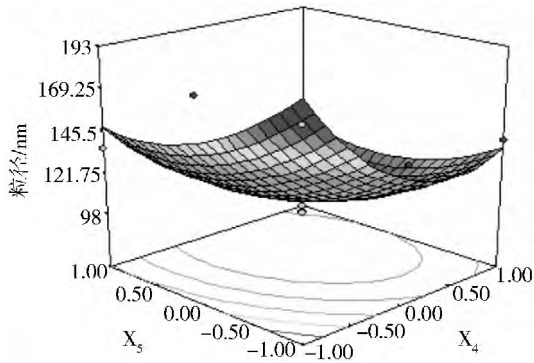


图 2 均质温度(X_4)、挤出次数(X_5)对粒径分布(Y_2)影响的效应面图

表 6 多分散系数的多元二项式方程中的各项系数

方差来源	平方和	自由度	均差	F 值	P 值
X_4	1.262×10^{-3}	1	1.262×10^{-3}	3.48	0.0210
X_5	5.340×10^{-3}	1	5.340×10^{-3}	14.74	0.0121
X_4X_5	2.209×10^{-3}	1	2.209×10^{-3}	6.10	0.0566
X_4^2	0.018	1	0.018	49.38	0.0489
X_5^2	4.474×10^{-3}	1	4.474×10^{-3}	12.35	0.0270
残差	1.811×10^{-3}	5	3.622×10^{-3}		
失拟项	1.586×10^{-3}	3	5.288×10^{-3}	4.71	0.1802
纯误差	2.247×10^{-3}	2	1.123×10^{-3}		
总离差	0.040	10			

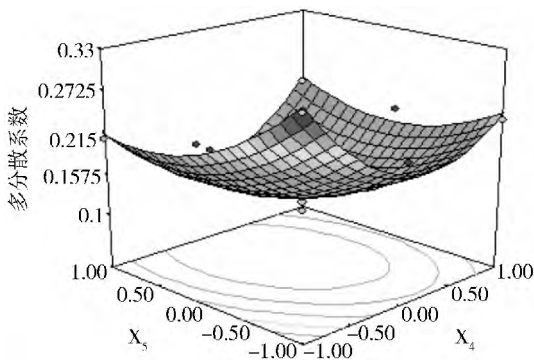


图 3 均质温度(X_4)、挤出次数(X_5)对多分散系数(Y_3)影响的效应面图

7 次。按优化后的最佳处方和最佳制备工艺参数制备 3 批紫杉醇长循环脂质体,并测定脂质体的包封率、粒径分布及多分散系数。实验观测值与模型预测值见表 7,由表 7 可知,实验观察值和模型预测值比较接近,说明模型预测性良好。

表 7 优化实验各指标预测值和观察值

优化指标	包封率/%	粒径分布/nm	多分散系数
预测值	87.7	105.2	0.124
观测值	80.3	97.2	0.117
偏差/1%	8.4	7.6	5.6

2.5 脂质体粒径及 Zeta 电位的测定 取紫杉醇长循环脂质体溶液适量,用蒸馏水稀释 50 倍,采用

Malvern 粒度测定仪测定脂质体的粒径分布、多分散系数及 Zeta 电位。结果测得脂质体平均粒径为 (97.15 ± 14.9) nm,多分散系数为 0.117 ± 0.019 , Zeta 电位为 (-30.3 ± 3.7) mV,表明紫杉醇长循环脂质体比较稳定。

2.6 透射电镜观察 采用磷钨酸负染法制备透射电镜样品。将样品稀释适当倍数后,取适量滴于火棉胶作为支持膜的铜网上,浸泡于 2% 磷钨酸溶液中染色 2~5 min。铜网待干后用透射电镜观察脂质体的形态结构。结果脂质体大小均匀,呈圆整、规则球形,未见紫杉醇结晶出现,见图 4。大部分粒子的粒径在 100 nm 以下,未见到过大的粒子,透射电镜观察进一步确证了粒度测定的结果。

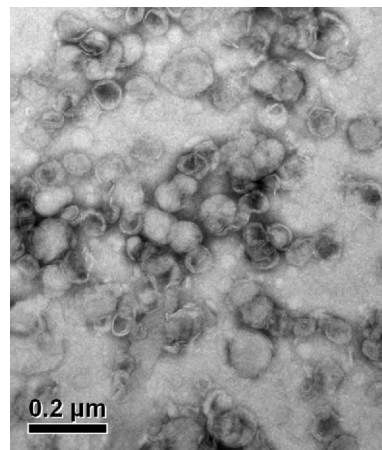


图 4 紫杉醇长循环脂质体透射电镜图

2.7 紫杉醇长循环脂质体体外释放行为考察 采用透析法考察紫杉醇长循环脂质体在 PBS 中的释放行为。由于紫杉醇为难溶性药物,故在释放介质中加入 0.2% Tween 80 的 PBS (pH 7.4) 可以保证药物释放在漏槽状态下进行。精密吸取脂质体 2 mL 置于处理好的透析袋内,平行 3 份,扎紧后置于溶出仪的浆叶底部,移取 48 mL 释放介质于溶出仪的小杯中,于 (37 ± 0.5) °C 水浴中以 50 r/min 恒速旋转,分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h 吸取 1 mL 释放介质(同时补加等量、同温的释放介质),测定紫杉醇的含量,并计算游离药物的累积释放百分率。体外释放曲线见图 5。

实验数据说明,紫杉醇长循环脂质体释放缓慢,可能是由于脂质双分子层中的胆固醇对磷脂膜起到了稳定的作用⁽³⁾,可减缓药物从膜内向膜外释放。

2.8 稳定性研究 取紫杉醇长循环脂质体,分别于 5 °C 和 25 °C 保存,进行稳定性研究,并分别在 1、2、3 个月取样,测定脂质体的包封率、粒径分布和多分散系数。结果见表 8。

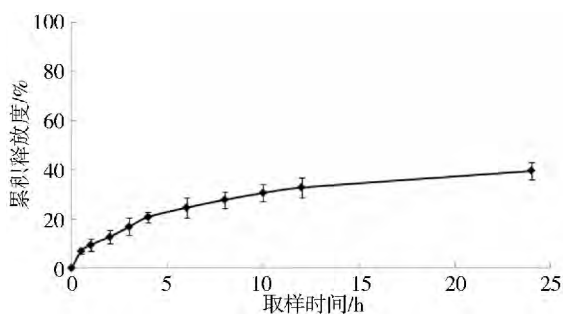


图 5 紫杉醇长循环脂质体体外释放曲线

表 8 紫杉醇长循环脂质体稳定性研究结果 (n = 3)

检测指标	初始	5 °C			25 °C		
		1 个月	2 个月	3 个月	1 个月	2 个月	3 个月
包封率 / %	86.2 ± 2.4	84.7 ± 3.5	82.0 ± 4.3	83.1 ± 3.3	81.9 ± 4.1	71.7 ± 5.3	55.6 ± 7.2
粒径分布 / nm	102.3 ± 15.2	109.3 ± 25.2	104.5 ± 17.1	112.1 ± 13.8	382.6 ± 65.7	732.9 ± 93.6	-
多分散系数	0.121 ± 0.018	0.117 ± 0.012	0.126 ± 0.020	0.123 ± 0.027	0.214 ± 0.047	0.436 ± 0.105	-

注 “-”表示样品在西林瓶底部形成絮状沉淀，未进行测定

难溶性药物发生自我聚集。脂质体平均粒径的增加通常会导致其被网状内皮系统摄取量的增加，从而引起脂质体的快速消除，产生较短的体内半衰期。因而，控制并维持小而均匀的粒径对于脂质体产品的临床应用非常重要。

长循环脂质体是一种表面经天然或合成聚合物 (PEG 最常用) 修饰的类脂衍生物的一类新型脂质体，其可持久地延长药物在血液中的停留时间而延长半衰期⁽⁴⁾。经 PEG 修饰的脂质体通过避开网状内皮系统的摄取而具有长循环的特性。PEG 链的长度和分子质量与脂质体的稳定性关系密切，一般而言，PEG 链越长 (分子质量达 5 000)，脂质体在体内的循环时间越长；但对于胶态脂质体，分子质量在 1 000 ~ 2 000 之间的 PEG 长循环效果最好。因此，

由表 8 可知脂质体各项考察指标无显著变化，表明本品在长期条件下较为稳定；长循环脂质在加速试验条件下放置 1 个月后，粒径明显变大，当放置 3 个月后，在西林瓶底部形成絮状沉淀，说明长循环脂质体在加速试验条件下不稳定。

3 讨论

脂质体的不稳定主要表现为粒径的增加，这主要是因为脂质体在制备和储存过程中不稳定的脂质体发生融合或者聚集，或者从脂质体中渗漏出来的

本文选用 PEG₂₀₀₀-DSPE 作为长循环材料制备紫杉醇长循环脂质体。

参 考 文 献

[1] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by Taxol® [J]. *Nature*, 1979, 277(5698) : 665-667.

[2] 刘朝晖, 曾聪彦. 79 例紫杉醇注射液致过敏反应文献分析 [J]. *中国药物应用与监测*, 2010, 7(2) : 100-102.

[3] Gu XQ, Ma Z, Li HQ, *et al.* Study on the polyphase liposome: A new dosage form for anti-tumor drugs. Antitumor activity screening of polyphase liposome 139 and others [J]. *Chin Herb Med*, 1982, 13(1) : 13-19.

[4] 颜仁梁, 刘志刚. 黄芩素长循环脂质体处方优化研究 [J]. *中药材*, 2010, 33(1) : 122-125.