

# 阿霉素纳米粒的制备及其载药性能的响应面分析

吕凤娇<sup>1</sup> 戴聪杰<sup>1</sup> 许小平<sup>2</sup>

(1. 泉州师范学院化学与生命科学学院 福建 泉州 362000; 2. 福州大学化学化工学院 福建 福州 350002)

**摘要:** 目的 制备阿霉素纳米粒,并对其载药性能进行响应面优化。方法 采用溶剂去除法制备阿霉素纳米粒,用 HPLC - 荧光检测法测定阿霉素含量,表征纳米粒,通过响应面法优化影响阿霉素纳米粒载药性能的不同因素。结果 制备的阿霉素纳米粒粒径小,圆整度好,分布较均匀;采用 Box - Behnken 试验设计法,研究各因素及其交互作用对纳米粒载药性能的影响,利用 Design - Expert 8.0 软件对实验数据进行回归分析,得到二次数学模型方程,确定最佳条件为乳化剂 2.50%、阿霉素 6.50 mg、聚乙烯吡咯烷酮 10%。结论 在最佳条件下,纳米粒的包封率为 85.11% ± 2.17%,载药量为 2.89% ± 0.09%。

**关键词:** 阿霉素; 纳米粒; 载药性能; 响应面分析

中图分类号: R94

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2013)05 - 0450 - 03

## Preparation of Doxorubicin - loaded nanoparticles and optimization of the loading performance with response surface methodology

LV Feng - Jiao<sup>1</sup>, DAI Cong - jie<sup>1</sup>, XU Xiao - ping<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry and Life Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian, 362000 P. R. China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To prepare Doxorubicin - loaded nanoparticles(DNL) and optimize the loading performance with response surface methodology. **METHODS** DNL were prepared by solvent removal method. DNL were characterized by HPLC - scanning electron microscopy (SEM) for morphological properties and laser light scattering (LLS) for size and size distribution. And response surface methodology (RSM) was used to optimize the loading performance of DNL. **RESULTS** Nanoparticles exhibited a spherical shape and a narrow distribution. The Box - Behnken design was applied and the interactions of each factor on loading performance were also investigated by Design - Expert 8.0. The optimum conditions were emulsifier concentration of 2.50%, Doxorubicin inputs of 6.5 mg and polyvinylpyrrolidone concentration of 10%. **CONCLUSION** The encapsulation efficiency of DNL was 85.11% ± 2.17% and drug loading was 2.89% ± 0.09% under the optimum conditions.

**Key words:** Doxorubicin; Nanoparticles; Loading performance; Response surface methodology

**CLC number:** R94

**Document code:** A

**Article ID:** 1006 - 0103(2013)05 - 0450 - 03

制备纳米药物需考察纳米粒的载药量(DL)和药物的包封率(EE)<sup>[1-2]</sup>。包封率越高,体系中游离的药物就越少,药物在制备过程中的利用率也就越好。阿霉素(ADM)是一种蒽环类的高效广谱抗肿瘤药物。纳米药物中药物含量的测定有多种方法,一般可分为放射性标记法、消解粒子后测定法和分离出药物测定法等。可通过消解粒子后测定粒子中阿霉素的含量,进而研究阿霉素纳米粒的载药性能。现采用溶剂去除法制备 ADM 纳米粒,用 HPLC - 荧光检测法测定 ADM 的含量,表征纳米粒。在乳化剂浓度、ADM 的投入量和聚乙烯吡咯烷酮浓度 3 个单因素考察的基础上,通过响应面法优化了影响纳米粒载药性能的不同因素,为 ADM 纳米粒的制备提供了依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Varian); J EOL JSM - 6700F 扫描电镜(日本电子) Nicomp380 Z3000 激光粒度仪(苏州微流纳米生物技术有限公司)。阿霉素(浙江海正药业股份有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮(德国 Basf); 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其余试剂为分析纯。

### 1.2 方法与结果

**1.2.1 ADM 纳米粒的制备** 取适量 ADM,加入到一定浓度的 PVP 水溶液中形成水相,水 - 油比为 2 : 3,将水相滴加到含一定量 Span80 的环己烷溶液中,搅拌一定时间后形成初乳;取一定量 Tween80 溶解在 36 mL 二次蒸馏水中作为外水相;于  $1 \times 10^3$  r ·

基金项目:福建省教育厅 A 类科技项目(编号:JA11223);泉州师范学院重点学科建设项目资助(编号:MDSch - 2009A)

作者简介:吕凤娇(1982—),女,福建泉州,讲师,从事新型药物材料与剂型的研究工作。Email:540827050@qq.com

$\text{min}^{-1}$ 磁力搅拌下将初乳滴入外水相,得到纳米混悬液。室温下,挥发有机溶剂, $1 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离,用水洗2次后,置真空干燥箱中干燥至恒重,即得ADM纳米粒。将制得的纳米粒用水稀释一定倍数,用激光粒度仪检测其粒径、粒径分布及Zeta电位,并用扫描电镜观察其形态。

**1.2.2 色谱条件** 采用LiChrospher® 100 RP-18e色谱柱(250 mm × 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相为甲醇-0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢铵溶液-冰醋酸(70:30:0.4),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,激发波长497 nm,发射波长587 nm,温度25 °C,进样量20  $\mu\text{L}$ 。

**1.2.3 标准曲线的制备** 精密称取ADM 0.5 mg于25 mL量瓶中,加水溶解并定容,配成20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的ADM贮备液。分别量取ADM贮备液0.04、0.1、0.2、0.4、0.6、1、2、3、4 mL至10 mL量瓶中,加水定容,用“1.2.2”项检测方法测定峰面积。以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程为: $Y = 833.16X + 30.358$  ( $r = 0.9999$ )  $0.08 \sim 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ADM与峰面积的线性关系良好。

**1.2.4 纳米粒载药量和包封率的测定** 参照《中国药典》及文献<sup>[3]</sup>,取一定量载ADM纳米粒( $W_p$ ),置锥形瓶中,加入一定体积的水,搅拌使其充分溶解,过滤,取续滤液,用“1.2.2”项检测方法测定所含ADM的量,并计算载药量(DL)和包封率(EE)。

**1.2.5 ADM纳米粒的表征** 图1A为ADM纳米粒的扫描电镜图。结果表明:所制备的纳米粒的粒径小,圆整度好,粒径为40~70 nm,分布较均匀,与激光粒度仪测得的纳米粒的粒径分布图(图1B)基本吻合。激光粒度仪所测ADM纳米粒的Zeta电位为 $-7 \pm 0.34 \text{ mV}$ 。

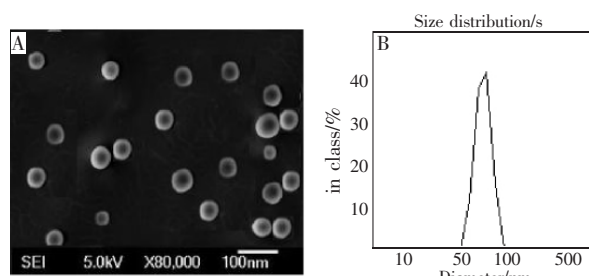


图1 纳米粒的扫描电镜照片( $\times 8 \times 10^4$ ) (A)和粒径分布图(B)

Fig 1 A SEM photo (A) and size distribution (B) of DNL

**1.2.6 乳化剂浓度的影响** 复合乳化剂Span80-Tween80(4:1)具有亲水端和亲脂端,对ADM具有增溶作用,可增加ADM的包封率,在其他条件不变时,载药量也随着增大。当乳化剂浓度由1.5%增加为2%时,纳米粒载药量及包封率均显著增加;但继续增大乳化剂浓度,ADM纳米粒的包封率变化不

大,可能是因为液滴表面的分布已达极限(表1)。

表1 乳化剂浓度对纳米粒载药量与包封率的影响

Table 1 Effects of emulsifier concentration on DL and EE

No.	C/%	DL/%	EE/%
1	1.5	1.89	64.16
2	1.8	2.23	75.32
3	2	2.53	84.39
4	2.2	2.58	86.95
5	2.5	2.61	87.37

**1.2.7 ADM投入量的影响** 由表2可见:随着ADM投入量的增加,纳米粒载药量逐渐增加,而包封率逐渐减小。当ADM投入量为5 mg时,纳米粒的载药量为2.18%,包封率为87.37%;投入量增加到7 mg时,纳米粒载的药量为2.80%,包封率为80.01%;投入量继续增加到8 mg时,纳米粒载药量变化不大,包封率减小到71.66%。当PVP浓度一定时,形成纳米粒载体的量基本不变,而随着ADM投入量的增多,结合进入纳米粒的ADM量增加,所以,纳米粒的载药量提高;随着ADM用量的增加,载药逐渐趋于饱和,增加的投药量大部分只能留在水溶液中或扩散在油相中,故包封率下降。

表2 阿霉素投入量对纳米粒载药量与包封率的影响

Table 2 Effects of ADM inputs on DL and EE

No.	ADM/mg	DL/%	EE/%
1	5	2.18	87.37
2	6	2.53	84.39
3	7	2.80	80.01
4	8	2.87	71.66

**1.2.8 PVP浓度的影响** 考察了不同PVP浓度下制得的纳米粒载药量和包封率。由表3可看出:随着PVP浓度的增加,纳米粒的载药量逐渐减小,包封率则逐渐增大。当ADM投入量一定时,PVP浓度增加,使得形成的纳米粒载体的量增加,对药物小分子的包裹作用也增强。

表3 聚乙烯吡咯烷酮浓度对纳米粒载药量和包封率的影响

Table 3 Effects of PVP concentration on DL and EE

No.	PVP/%	DL/%	EE/%
1	8	2.66	70.96
2	9	2.63	78.97
3	10	2.51	83.65
4	11	2.30	84.21
5	12	2.21	88.43

**1.2.9 响应面法优化分析ADM纳米粒的载药性** 单因素考察纳米粒载药量和包封率的结果表明:不同因素的改变,并未使ADM纳米粒的载药量和包封率相应改变,各因素之间又相互影响,因此,不能片面追求高载药量,应适当兼顾载药量与包封率。在单因素试验的基础上,按Box-Behnken设计表进

行多因素试验<sup>[4]</sup>,以综合指标  $S^{[5]}$  为评价指标,对乳化剂浓度(A)、ADM 浓度(B)、PVP 浓度(C)进行筛选。由表 4 可知:实验序号 6 是最佳条件:乳化剂浓度 2.50%、ADM 投入量 6.50 mg、PVP 浓度 10%。在该处方下,纳米粒的包封率为  $85.11\% \pm 2.17\%$ ,载药量为  $2.89\% \pm 0.09\%$ ,满足《中国药典》的要求。采用 Design Expert 8.0 统计软件分析,得到以下模型方程:  $S = 0.64 + 0.16A + 0.011B + 0.022C - 0.14AB - 0.11AC + 0.19BC + 0.43A^2 + 0.13B^2 + 0.53C^2$  模型方差分析见表 5。结果表明:整体模型的  $P < 0.001$ ,该二次方程模型达到极显著水平,说明该方程对试验的拟合较好。BC 交互项偏回归系数达显著,A、C 的二次项曲面效应均达极显著,表明各因素对载药性能的影响不是简单的线性关系。

表 4 Box - Behnken 设计方案及结果

Table 4 Box - Behnken design and result

No.	A/%	B/mg	C/%	DL/%	EE/%	$S_1$	$S_2$	$S_3$
1	2.20	6.00	10.50	2.02	84.82	0	0.80	0.80
2	2.50	6.00	10.50	2.36	85.77	0.39	1.00	1.39
3	2.20	7.00	10.50	2.78	83.01	0.87	0.42	1.29
4	2.50	7.00	10.50	2.80	83.12	0.90	0.44	1.34
5	2.20	6.50	10.00	2.54	84.39	0.60	0.71	1.31
6	2.50	6.50	10.00	2.89	85.11	1.00	0.86	1.86
7	2.20	6.50	11.00	2.64	85.11	0.71	0.86	1.57
8	2.50	6.50	11.00	2.69	85.31	0.77	0.90	1.67
9	2.35	6.00	10.00	2.77	84.37	0.86	0.71	1.57
10	2.35	7.00	10.00	2.89	81.01	1.00	0	1.00
11	2.35	6.00	11.00	2.34	85.11	0.37	0.86	1.23
12	2.35	7.00	11.00	2.68	84.25	0.76	0.68	1.44
13	2.35	6.50	10.50	2.20	83.31	0.21	0.48	0.69
14	2.35	6.50	10.50	2.21	83.23	0.22	0.47	0.69
15	2.35	6.50	10.50	2.26	83.22	0.28	0.46	0.74
16	2.35	6.50	10.50	2.21	83.00	0.22	0.42	0.64
17	2.35	6.50	10.50	2.02	83.19	0	0.46	0.46

$$S_3 = S_1 + S_2; S_1 = (DL_i - DL_{min}) / (DL_{max} - DL_{min}); S_2 = (EE_i - EE_{min}) / (EE_{max} - EE_{min})$$

## 2 讨论

采用溶剂去除法制备得到阿霉素(ADM)纳米粒,通过扫描电镜观察,纳米粒的粒径小,圆整度较好,分布较为均匀,与激光粒度仪得到的纳米粒的粒径分布图基本吻合。随着乳化剂浓度的增加,ADM

表 5 模型方程的方差分析

Table 5 Analysis of variance of model equation

来源	平方和	df	均方	F	Prob > F
Model(回归)	2.72	9	0.30	16.63	0.0006
A - 乳化剂	0.21	1	0.21	11.45	0.0117
B - ADM	0.001	1	0.001	0.05	0.8308
C - PVP	0.004	1	0.004	0.22	0.6531
AB	0.074	1	0.074	4.08	0.0831
AC	0.052	1	0.052	2.84	0.1358
BC	0.150	1	0.150	8.34	0.0234
A <sup>2</sup>	0.780	1	0.780	42.79	0.0003
B <sup>2</sup>	0.076	1	0.076	4.19	0.0798
C <sup>2</sup>	1.190	1	1.198	65.75	<0.0001
Residual	0.130	7	0.018	-	-
Lack of fit	0.080	3	0.027	2.28	0.2217
Pure error	0.047	4	0.012	-	-
Cor total	2.840	16	-	-	-

载药量和包封率逐渐增加;随着 ADM 投入量的增加,纳米粒载药量先是增加而后变化不大,而包封率则随着 ADM 投入量的增加逐渐下降;纳米粒载药量随着 PVP 浓度的增加逐渐下降,而包封率则不断增加。文中确定的最佳制备条件为乳化剂 2.50%、ADM 6.50 mg、PVP 浓度 10%。在该处方下,纳米粒的包封率为  $85.11\% \pm 2.17\%$ ,载药量为  $2.89\% \pm 0.09\%$ ,满足药典要求。二次方程模型达到极显著水平,说明该方程对试验的拟合较好,各因素对载药性能的影响不是简单的线性关系,其相互关系有待进一步实验探讨。

## 参考文献:

- [1] Lübke AS, Alexion C, Bergemann C. Clinical application of magnetic drug targeting[J]. Surg Res 2001, 95(2): 200 - 206.
- [2] 林箐,王梦馨,吴佳奕,等.壳聚糖纳米粒 Zeta 电位与载药量关系初探[J]. 华西药学期刊 2012 27(3): 301 - 303.
- [3] Coppi C, Iannuccelli V, Leo E, et al. Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles[J]. J Microencapsul 2002, 19(1): 37 - 44.
- [4] 高飞虎,张玲,曾志红,等.响应面法优化超微粉碎辅助提取辣椒红素工艺研究[J]. 西南农业学报 2011 24(5): 1928 - 1933.
- [5] 肖卫华,韩鲁佳,杨增玲.响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报 2007, 12(5): 52 - 56.

收稿日期:2012 - 08 - 14