

# 星点设计-效应面法优选白藜芦醇固体脂质纳米粒处方

梁健钦<sup>1</sup>, 刘华钢<sup>2</sup>, 黄秋洁<sup>1</sup>, 黄慧学<sup>1</sup>, 欧阳小光<sup>3</sup>, 林国彪<sup>1</sup>

(1. 广西中医学院, 广西南宁 530001; 2. 广西医科大学, 广西南宁 530021; 3. 玉林制药有限责任公司, 广西玉林 537001)

**摘要:**目的:采用星点设计-效应面法优选白藜芦醇固体脂质纳米粒的处方。方法:采用星点设计-效应面优化法筛选处方,以白藜芦醇包封率及载药量作为评价指标,考察脂质用量、表面活性剂用量、药物量对评价的影响。采用热高压均质法制备白藜芦醇固体脂质纳米粒。结果:热高压均质工艺能有效制备固体脂质纳米粒,优选的最佳处方为单硬脂酸甘油酯用量为 4.5%、泊洛沙姆用量为 6%、白藜芦醇投药量为 0.45%, OD 值与理论值偏差 -4.12%。结论:星点设计-效应面法能有效优选 RES-SLN 处方。

**关键词:**白藜芦醇; 固体脂质纳米粒; 高压均质法; 星点设计

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1000-1719(2010)02-0322-02

## Optimization of Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Formula by Central Composite Design-Response Surface Methodology

LANG Jian-qin<sup>1</sup>, LIU Hua-gang<sup>2</sup>, HUANG Qiu-jie<sup>1</sup>, HUANG Hui-xue<sup>1</sup>, OUYANG Xiao-guang<sup>3</sup>, LIN Guo-biao<sup>1</sup>

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, Guangxi, China; 2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 3. Yulin Pharmaceutical Co. Ltd., Yulin 537001, Guangxi, China)

**Abstract Objective:** To optimize the formula of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles (RES-SLN). **Methods:** RES-SLN was prepared by high pressure homogenization technique. Central composite design/response surface methodology was applied to screen RES-SLN prescription. Independent variables were lipid content Poloxamer 188 (F68) content and RES content. **Results:** The optimum prescription was the follow: Glycerol monostearate (GMS) 4.5%, F68 6%, RES 0.45%. The particle size of RES-SLN was about 100nm. The bias was -4.12%. **Conclusion:** Central composite design-response surface methodology is successfully used to optimize the formulation of RES-SLN.

**Key words:** solid lipid nanoparticles; resveratrol; high pressure homogenization; central composite design

白藜芦醇 (Resveratrol, RES) 具有广泛的生物学活性, 有广泛抗癌和防癌作用, 在致癌作用的 3 个主要阶段均具有化学防癌活性, 认为是目前除紫杉醇外最有希望的抗癌剂之一<sup>[1]</sup>。国内常用均匀设计和正交设计进行优化, 该方法虽然实验次数较少, 但实验精度不够, 多用线性数学模型, 预测性较差。国外常用集数学和统计学方法于一体的效应面优化法 (Response surface methodology, RSM) 进行优化, 实验设计采用星点设计 (Central composite design, CCD), 其特点是各实验点距中心点的距离相等, 自变量的极端水平为实验所允许的极大极小值, 一次设计即可获得较佳条件, 用非线性数学模型拟合复相关系数较高, 预测性好<sup>[2-3]</sup>。

### 1 实验材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (DAD 检测器、Agilent 10.02 色谱工作站)、BP211D 电子天平 (德国)、超声波清洗仪 (上海必能信)、NanoGenizer 型高压均质机 (苏州微流纳米生物技术有限公司)、Millipore 超滤离心管 (Millipore YM-10, MWCO 为 10kDa, USA)。白藜芦醇原料药 (纯度 97.1%, 桂林莱茵生物药

业有限公司)、白藜芦醇对照品 (批号 111535-200502 含量测定用, 中检所提供)、泊洛沙姆 188 (注射用, 南京威尔)、单硬脂酸甘油酯 (CP, 广东汕头西陇化工厂)、乙腈 (色谱纯, Fisher)、甲醇 (色谱纯, 天津四友)。

### 2 实验方法

#### 2.1 RES-SLN 的制备

**热高压均质法:** 称取处方量的泊洛沙姆 188 (F68)、单硬脂酸甘油酯 (GMS) 及 RES。GMS 置烧杯中, 水浴加热熔融。RES 置烧杯中, 加无水乙醇适量, 使溶解。将 GMS 加入到药物中, 搅拌, 水浴保温, 制得油相。F68 置烧杯中, 加约 80mL 水, 水浴加热, 搅拌使溶解, 制得水相。将油相缓慢加入到水相中, 超声分散形成乳浊液, 加水至 100mL, 过高压均质机, 140MPa 压力下循环至透明, 冷却至室温, 用 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 即得。

#### 2.2 包封率及载药量测定

**游离 RES 含量 ( $W_f$ ) 测定:** 精密吸取 RES-SLN 混悬液, 置超滤离心管中 (MWCO 为 10kDa Millipore), 离心 (12000 rpm) 10min, 精密吸取滤液 1.0mL, 置 25mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 即得。注入色谱仪, 测定。RES-SLN 总药量 ( $W_T$ ) 测定: 精密吸取 RES-SLN 混悬液 1.0mL, 置 100mL 棕色容量瓶中, 加甲醇适量, 水浴加热至溶液澄清, 放冷至室温, 用甲醇稀释至刻度, 吸取适量混悬液, 离心 (12000 rpm) 10min, 取

收稿日期: 2009-04-29

基金项目: 广西高校人才小高地建设创新团队资助计划

作者简介: 梁健钦 (1977-), 男, 广西桂平人, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 主要从事新剂型新技术研究。

滤液, 即得。注入色谱仪, 测定。

$$\text{包封率} = \frac{(W_T - W_F)}{W_T} \times 100\%;$$

$$\text{载药量} = \frac{(W_T - W_F)}{W_s} \times 100\%$$

$W_T$  为 RES-SLN 中总药量,  $W_F$  为游离药物量,  $W_s$  为制备时药物与载体材料的总量。

### 2.3 实验设计

在预试验基础上考察选择 F68 的用量、GMS 用量、RES 投料量做为考察因素。根据星点设计的原理, 每因素设五水平, 用代码值  $-\alpha$ 、 $-1$ 、 $0$ 、 $1$ 、 $\alpha$  来表示 (三因素星点设计的  $\alpha = 1.732$ )。代码值所代表的实际操作物理量见下表。

表 1 因素代码水平及对应物理量

因素	水平及代码值				
	-1.732	-1	0	+1	+1.732
$X_1$ (GMS%, W/N)	3.00	3.85	5.00	6.15	7.00
$X_2$ (F68%, W/N)	4.00	4.85	6.00	7.15	8.00
$X_3$ (RES%, W/N)	0.20	0.26	0.35	0.44	0.5

本实验是以纳米粒的包封率和载药量为指标。数据处理方法为“归一值”, 各指标均标准化为 0~1 间的“归一值”, 各指标的“归一值”求算几何平均数, 得总评“归一值”, 即  $OD = (d_1 d_2 \dots d_n)^{1/n}$  ( $n$  为指标数), 对于取值越小越好的因素和取值越大越好的因素采用 Hassan 方法进行数学转换求“归一值”。

$$d_i = \frac{y_i - y_{\min}}{y_{\max} - y_{\min}}; OD_i = (d_1^i \times d_2^i)^{1/2}$$

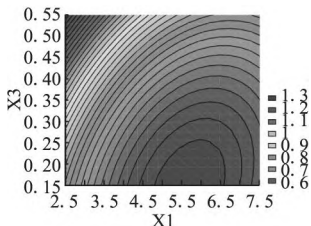


图 1 总评归一值 (OD) 对 GMS 用量 ( $X_1$ ) 和 RES 用量 ( $X_3$ ) 的预测效应面

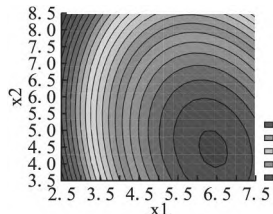


图 2 总评归一值 (OD) 对 GMS 用量 ( $X_1$ ) 和 F68 用量 ( $X_2$ ) 的预测效应面

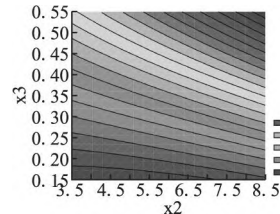


图 3 总评归一值 (OD) 对 F68 用量 ( $X_2$ ) 和 RES 用量 ( $X_3$ ) 的预测效应面

2.5.3 拟合结果 二元非线性方程拟合度较高, 最终选择二元非线性方程拟合, 并绘制效应面图。效应面影响值较高的公共区域即为优选区域, 在图上选取较佳处方范围: GMS 用量 2.5%~4.0%; F68 用量 5.5%~8.5%; RES 用量 0.45~0.55%。

### 2.6 工艺参数优化和预测

考虑到工业生产中的实际情况, 故把实验选取 RES-SLN 最优处方为: GMS 用量 3.5%、F68 用量 6%、RES 用量 0.45%。验证实验结果: 表面积平均粒径为 125nm; 平均包封率为 91% (RSD 为 2.13%,  $n=3$ ), 平均载药量为 10.0% (RSD 为 1.74%,  $n=3$ ); OD 预测值为 0.97, 平均真实 OD 值为 0.93; 偏差 (%) =  $(0.93 - 0.97) / 0.97 \times 100\% = -4.12\%$ 。

结果表明, 所建立的数学模型具有良好的预测性, 所选工艺条件重现性好。

### 3 讨论

测定包封率常用透析法, 膜分离技术 (膜滤、超滤)、低温超速离心、凝胶柱色谱法。凝胶层析法操作繁琐, 但

### 2.4 星点设计实验结果

见表 2。

表 2 实验设计及效应值

实验号	GM S% ( $X_1$ )	F68% ( $X_2$ )	RES% ( $X_3$ )	包封率 (%)	载药量 (%)	$d_1^*$ 值	$d_2^{**}$ 值	OD 值
1	3.85	4.85	0.26	81.53	5.16	0.82	0.49	0.63
2	6.15	4.85	0.26	80.49	3.26	0.80	0.31	0.50
3	3.85	7.15	0.26	87.77	5.55	0.88	0.53	0.68
4	6.15	7.15	0.26	89.42	3.63	0.89	0.35	0.56
5	3.85	4.85	0.44	84.75	8.69	0.85	0.83	0.84
6	6.15	4.85	0.44	75.28	5.03	0.75	0.48	0.60
7	3.85	7.15	0.44	90.05	9.24	0.90	0.88	0.89
8	6.15	7.15	0.44	92.62	6.18	0.98	0.59	0.74
9	3.00	6.00	0.35	87.05	9.09	0.87	0.87	0.87
10	7.00	6.00	0.35	87.05	4.15	0.87	0.40	0.59
11	5.00	4.00	0.35	77.55	5.07	0.78	0.49	0.61
12	5.00	8.00	0.35	90.04	5.89	0.90	0.56	0.71
13	5.00	6.00	0.2	86.89	3.34	0.87	0.32	0.53
14	5.00	6.00	0.5	84.29	7.66	0.84	0.73	0.79
15-20	5.00	6.00	0.35	66.00	4.32	0.66	0.41	0.52

注: \*  $d_1$  为包封率的归一值 ( $y_{\min}$  为 0,  $y_{\max}$  为 100); \*\*  $d_2$  为载药量的归一值 ( $y_{\min}$  为 0,  $y_{\max}$  为 10.45)。

### 2.5 模型拟合

应用 statistica 6.0 软件以 OD 值为因变量对各因素进行多元线性回归和二项式拟合分析。

2.5.1 多元线性拟合 多元线性回归方程为  $Y = 0.6260 - 0.07057X_1 + 0.02892X_2 + 0.9261X_3$ ; 拟合度 (R) 为 0.9062。

2.5.2 多元二次方程拟合 多元二次拟合方程如下:  $Y = 3.8252 - 0.6714X_1 - 0.3692X_2 - 2.2167X_3 + 0.0510X_1^2 + 0.0345X_2^2 + 5.8464X_3^2 + 0.0088X_1X_2 - 0.1583X_1X_3$ , 拟合度 (R) 为 0.9951。

结果准确; 低温超速离心时纳米粒有可能因凝聚而破坏; 透析法测定费时, 游离药物的分离明显受到透析膜的影响, 导致包封率测定结果比实际值偏高<sup>[4-8]</sup>。RES 含量测定方法学研究实验中, 采用超滤离心法测定包封率, 结果显示超滤膜对游离 RES 的测定无显著影响。

### 参考文献

- [1] 杜海方, 李宁. 白藜芦醇抗癌机制的研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2006, 33(2): 84-90.
- [2] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(8): 530-533.
- [3] 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): 292-298.
- [4] 吴伟, 阙俐, 陈健, 等. 星点设计-效应面法优化苯甲酸利扎普坦片的处方 [J]. 复旦学报 (医学版), 2003, 30(4): 381-387.
- [5] 程骥, 戴林东, 朱家壁. 星点设计-效应面法优化双嘧达莫肺靶向脂质体 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(10): 762-765.
- [6] 吴清, 倪宁, 王玉蓉, 等. 星点设计-效应面法优选人参叶酶法提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 5-8.
- [7] 孙磊, 王玉蓉. 星点设计-效应面法优选远志的提取工艺 [J]. 中成药, 2006, 28(3): 328-331.
- [8] 吴云娟, 沙先宜, 李君婵, 等. 星点设计/A 效应面优化法优化三七总皂苷鼻腔用粉雾剂 [J]. 中成药, 2005, 27(1): 10-15.