

包载丁香苦苷和羟基酪醇的 mPEG-PLGA 纳米粒处方与制备工艺的优化

管庆霞， 于 欣， 吕邵娃， 孙佳琳， 张 亮， 封文静， 温美欣， 李永吉*
(黑龙江中医药大学药学院，黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要：目的 优化包载丁香苦苷和羟基酪醇的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸（mPEG-PLGA）纳米粒处方与制备工艺。**方法** 沉淀法制备纳米粒后，以水相与有机相比例、药物用量、表面活性剂（Pluronic F-68）浓度为影响因素，总包封率和总载药量为评价指标，星点设计-效应面法优化处方与制备工艺。**结果** 所得纳米粒溶液呈淡蓝色乳光，最佳条件为水相与有机相比例 2.1：1，药物用量 14.1 mg，Pluronic F-68 浓度 0.1%，平均总包封率（32.38 ± 1.21）%，总载药量（12.01 ± 0.32）%，平均粒径（69.03 ± 1.89）nm，Zeta 电位（-25.2 ± 0.99）mV。**结论** 该方法稳定可靠，可用于优化包载丁香苦苷和羟基酪醇的 mPEG-PLGA 纳米粒处方与制备工艺。
关键词：丁香苦苷；羟基酪醇；mPEG-PLGA 纳米粒；制备；星点设计-效应面法
中图分类号：R944 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)12-2508-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.012

Formulation and preparation optimization for mPEG-PLGA nanoparticles encapsulated with syringopicroside and hydroxytyrosol

GUAN Qing-xia, YU Xin, LÜ Shao-wa, SUN Jia-lin, ZHANG Liang, FENG Wen-jing, WEN Mei-xin, LI Yong-ji*
(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

KEY WORDS: syringopicroside; hydroxytyrosol; mPEG-PLGA nanoparticles; preparation; central composite design-response surface method

丁香苦苷和羟基酪醇为丁香叶的活性成分，其中前者药理活性主要有保肝利胆、抗乙肝病毒、清除氧自由基等^[1-3]；后者是一种多酚类化合物，主要有抗乙肝病毒、抗癌、抗菌的活性^[4-5]，还具有视网膜色素上皮细胞的保护作用^[6-7]。但两者均有体内代谢迅速、稳定性不理想、常规制剂肝靶向性差的缺点，不利于发挥药效，使其应用受到限制，因此开发相关新型递药系统是亟需解决的问题。

纳米递药系统近年来在药学领域中广泛应用，已展现出巨大的潜力，其载药后可降低药物毒副作用，实现靶向性、缓控释性等优势。但普通纳米粒易被高

吞噬性的单核吞噬细胞系统识别和吞噬，使得药物在血液中的循环时间缩短^[8]。研究发现，纳米粒的表面用聚乙二醇（PEG）、聚氧化乙烯（PEO）、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸（mPEG-PLGA）等亲水性高分子材料修饰后，能形成水化保护层，并具备立体位阻效应，可达到长循环的目的^[9]。

星点设计是近年来常用的设计方法^[10-12]，能较好地保证试验精密度，可以分析各因素之间的相互作用；效应面优化法是集数学和统计学于一体的优化方法，可以回推出自变量取值范围（即最佳实验条件），两者采用非线性数学模型对实验结果

收稿日期：2017-01-23
基金项目：国家自然科学基金面上项目（81274091）；黑龙江省自然科学基金面上项目（H2016076）；黑龙江中医药中青年科技攻关项目（ZQG-039）；黑龙江省教育厅科学技术研究项目（12531624）；哈尔滨市应用技术与开发项目（2017RAQXJ090）
作者简介：管庆霞（1974—），女，博士，副教授，研究方向为中药纳米递药系统及中药新药开发。Tel：（0451）87266893，E-mail：546105832@qq.com
* 通信作者：李永吉（1957—），男，博士，教授，研究方向为中药纳米递药系统及中药新药开发。Tel：（0451）87267555，E-mail：Liyongji2009@163.com

进行拟合时，具有实验次数少、精密度高、优选条件预测性好的优点。因此，本实验采用该方法优化包载丁香苦苷和羟基酪醇的 mPEG-PLGA 纳米粒的处方及制备工艺，旨在构建将长效和靶向融为一体的纳米递药系统，以达到肝细胞内递药目的，并为同类中药多成分纳米递药系统的进一步探索提供科学依据，也为中药及其复方提取物纳米递药系统的研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 e2695-2698 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm，美国 Dikma 公司）；FA2004 电子分析天平（上海良平仪器仪表有限公司）；DF-101Z 集热式恒温加热磁力搅拌器（郑州长城科工贸有限公司）；Autotune 高强度超声波细胞破碎仪（美国 Sonics 公司）；H2050R 台式高速冷冻离心机（长沙湘仪离心机仪器有限公司）；Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪（马尔文仪器有限公司）；Tecnai G2 透射电子显微镜（荷兰飞利浦公司）。

1.2 试药 15%、10%、5% mPEG-PLGA（75/25，济南代罡生物科技有限公司）；羟基酪醇对照品（苏州皓翔化学科技有限公司，批号 20130301，含量 >98%）；丁香苦苷对照品（自制，含量 >98%）；Sephadex G-50（分离范围 1 000 ~ 3 000，上海浩然生物技术有限公司）。甲醇为色谱纯（美国 Dikma 公司）。

2 方法与结果

2.1 纳米粒制备 采用沉淀法^[13]，将 20 mg mPEG-PLGA 及 10 mg 药物分散于 10 mL 丙酮中，超声溶解，形成有机相。在磁力搅拌下将有机相滴加到含 0.05% Pluronic F-68 的 20 mL 水相中，滴完后用细胞破碎仪超声，磁力搅拌 20 min，旋转蒸发（40 ℃）除去有机溶剂，定容，即得。

2.2 HPLC 分析

2.2.1 色谱条件 检测波长 221 nm；体积流量 1.0 mL/min；流动相甲醇-水，梯度洗脱（程序见表 1）；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	甲醇/%	水/%
0 ~ 6	30	70
6 ~ 9	48	52
9 ~ 20	48	52

2.2.2 线性关系考察 精密量取对照品贮备液

5 mL，置于 10 mL 量瓶中，定容，逐级稀释，即得 826.00、413.00、206.50、103.25、51.75、25.88 μg/mL 丁香苦苷对照品溶液，以及 96.80、48.40、24.20、12.10、6.05、3.03 μg/mL 羟基酪醇对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定。以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，得回归方程分别为丁香苦苷 $Y = 13\,600X + 187\,000$ （ $r = 0.999\,8$ ）、羟基酪醇 $Y = 17\,100X - 14\,500$ （ $r = 0.999\,9$ ），分别在 25.88 ~ 826.00、3.03 ~ 96.80 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.2.3 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL，在同 1 d 内进样测定 6 次，连续 6 d，测得丁香苦苷和羟基酪醇的日内精密度 RSD 分别为 0.30% 和 0.70%，日间精密度 RSD 分别为 0.60% 和 0.70%，表明该方法精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL，于 0、2、4、8、10、12 h 进样测定，测得丁香苦苷和羟基酪醇峰面积 RSD 分别为 0.40% 和 0.90%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批样品 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，测得丁香苦苷和羟基酪醇峰面积 RSD 分别为 0.50% 和 0.40%，表明该方法重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 取对照品溶液适量，加入含量已知的供试品溶液（丁香苦苷、羟基酪醇质量浓度分别为 207.13、25.11 μg/mL）9 份，在“2.2.1”项色谱条件下测定，计算回收率。结果，丁香苦苷平均加样回收率为 99.96%，RSD 2.36%；羟基酪醇平均加样回收率为 99.84%，RSD 1.75%。

2.2.7 包封率和载药量测定 精密吸取纳米粒溶液适量，置于 Sephadex G-50 凝胶柱的顶部，蒸馏水洗脱，体积流量 1.0 mL/min，收集洗脱液，取 6 ~ 22 mL 加入甲醇，破乳超声后定容，0.22 μm 微孔滤膜过滤，在“2.2.1”项色谱条件下测定；或将 30 ~ 52 mL 洗脱液置于 50 mL 量瓶中，定容，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，测定游离药物浓度。再计算包封率及载药量，计算公式为包封率 = $[(总药量 - 游离药物量)/总药量] \times 100\%$ 、载药量 = $[(总药量 - 游离药物量)/纳米粒质量] \times 100\%$ 。

2.2.8 粒径与 Zeta 电位测定 取纳米粒溶液超声数分钟，0.45 μm 微孔滤膜过滤，测定粒径与 Zeta 电位，平行 3 次。

2.3 星点设计-效应面法优化

2.3.1 试验设计 通过单因素试验可知,水相与有机相比比例 (X_1)、药物用量 (X_2)、表面活性剂 (Pluronic F-68) 浓度 (X_3) 对纳米粒制备有显著的影响。然后,采用星点设计-效应面法作进一步优化,以总包封率 (Y_1)、总载药量 (Y_2) 为评价指标,因素水平见表 2,试验设计及结果见表 3。

表 2 因素水平
Tab. 2 Factors and levels

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X_1 水相与有机相比比例	1.16 : 1	1.5 : 1	2 : 1	2.5 : 1	2.84 : 1
X_2 药物/mg	9.95	12	15	18	20.05
X_3 表面活性剂/%	0.05	0.07	0.1	0.13	0.15

表 3 试验设计与结果
Tab. 3 Design and results of tests

编号	X_1	X_2	X_3	Y_1 总包封率/%	Y_2 总载药量/%
1	0	0	0	32.23	11.56
2	-1	1	-1	23.14	8.90
3	0	0	-1.682	24.41	7.48
4	-1	-1	-1	24.69	9.20
5	0	1.682	0	16.08	6.35
6	0	0	0	32.06	11.57
7	1	-1	1	30.60	9.02
8	0	0	0	32.07	11.52
9	1	1	1	27.88	6.88
10	0	-1.682	0	26.50	7.81
11	-1.682	0	0	20.89	9.11
12	1.682	0	0	23.23	10.54
13	0	0	0	32.52	11.60
14	0	0	0	32.34	11.51
15	0	0	0	31.57	11.03
16	1	1	-1	23.32	10.42
17	1	-1	-1	17.32	8.41
18	-1	1	1	9.09	4.91
19	-1	-1	1	19.30	7.38
20	0	0	1.682	11.01	5.12

2.3.2 模型拟合 采用 Design-Expert. V8.0.6 软件,进行多元线性和二次多项式回归拟合,但由于前者拟合度、置信度均偏低,故最终采用后者,方程分别为 $Y_1 = -82.59 + 1.56X_1 + 10.08X_2 + 813.20X_3 + 1.25X_1X_2 + 310.60X_1X_3 - 24.13X_2X_3 - 11.87X_1^2 - 0.36X_2^2 - 5594.95X_3^2$, $R^2 = 0.8423$, 调整 $R^2 = 0.9170$, $P < 0.05$; $Y_2 = -48.64 + 2.44X_1 + 5.03X_2 + 428.80X_3 + 0.22X_1X_2 +$

$24.00X_1X_3 - 8.78X_2X_3 - 1.79X_1^2 - 0.16X_2^2 - 1880.91X_3^2$, $R^2 = 0.9461$, 调整 $R^2 = 0.9717$, $P < 0.05$ 。方差分析见表 4~5。

表 4 Y_1 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance for Y_1

因素	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	915.54	9	101.73	12.28	0.0003
A	52.71	1	52.71	6.36	0.0303
B	49.48	1	49.48	5.97	0.0346
C	26.68	1	26.68	3.22	0.1030
AB	28.24	1	28.24	3.41	0.0946
AC	173.65	1	173.65	20.96	0.0010
BC	37.74	1	37.74	4.56	0.0586
A^2	126.91	1	126.91	15.32	0.0029
B^2	151.34	1	151.34	18.27	0.0016
C^2	365.41	1	365.41	44.11	<0.001
残差	82.85	10	8.85	-	-

表 5 Y_2 方差分析

Tab. 5 Analysis of variance for Y_2

因素	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	88.56	9	9.84	38.08	<0.001
A	3.33	1	3.33	12.89	0.0049
B	2.09	1	2.09	8.09	0.0174
C	11.83	1	11.83	45.78	<0.001
AB	0.87	1	0.87	3.37	0.0965
AC	1.04	1	1.04	4.01	0.0730
BC	4.99	1	4.99	19.32	0.0013
A^2	2.88	1	2.88	11.15	0.0075
B^2	28.94	1	28.94	112.02	<0.001
C^2	41.30	1	41.30	159.84	<0.001
残差	2.58	10	0.26	-	-

2.3.3 响应面优化 见图 1~2,确定最优工艺为 $X_1 = 2.1 : 1$, $X_2 = 14.1$ mg, $X_3 = 0.1\%$,即水相与有机相比比例 2.1 : 1,药物用量 14.1 mg, Pluronic F-68 浓度 0.1%。

2.4 验证试验 按“2.3.3”项下最优工艺制备 3 批纳米粒,计算总包封率和总载药量,结果见表 6~7,粒径、Zeta 电位及外观见图 3。由此可知,该方法预测效果良好,所得纳米粒溶液呈淡蓝色乳光,粒径、Zeta 电位稳定。

表 6 验证试验结果 (I , $n = 3$)

Tab. 6 Results of verification tests (I , $n = 3$)

指标	预测值/%	实测值/%
总包封率	32.52	32.38
总载药量	11.59	12.01

表 7 验证试验结果 (II , $n = 3$)

Tab. 7 Results of verification tests (II , $n = 3$)

指标	粒径/nm	Zeta 电位/mV	PDI	羟基酯醇包封率/%	丁香苦苷包封率/%	羟基酯醇载药量/%	丁香苦苷载药量/%
平均值	69.03	-25.2	0.19	36.35	31.49	2.21	9.85
RSD/%	2.74	3.93	4.21	3.68	3.27	4.52	1.73

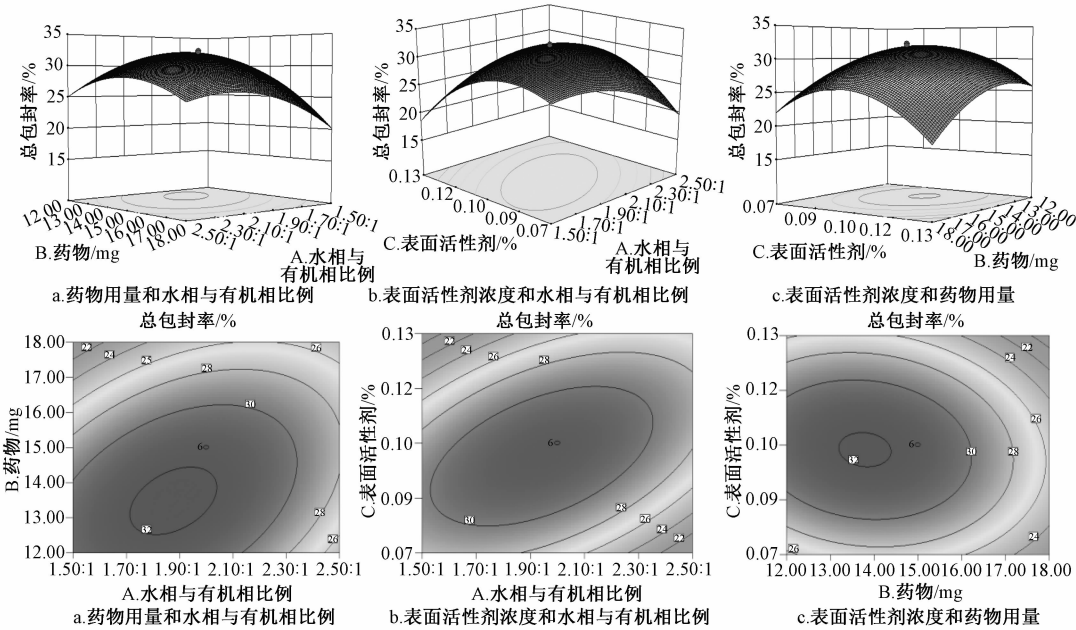


图 1 各因素响应面图 (Y₁)

Fig. 1 Response surface plots for various factors (Y₁)

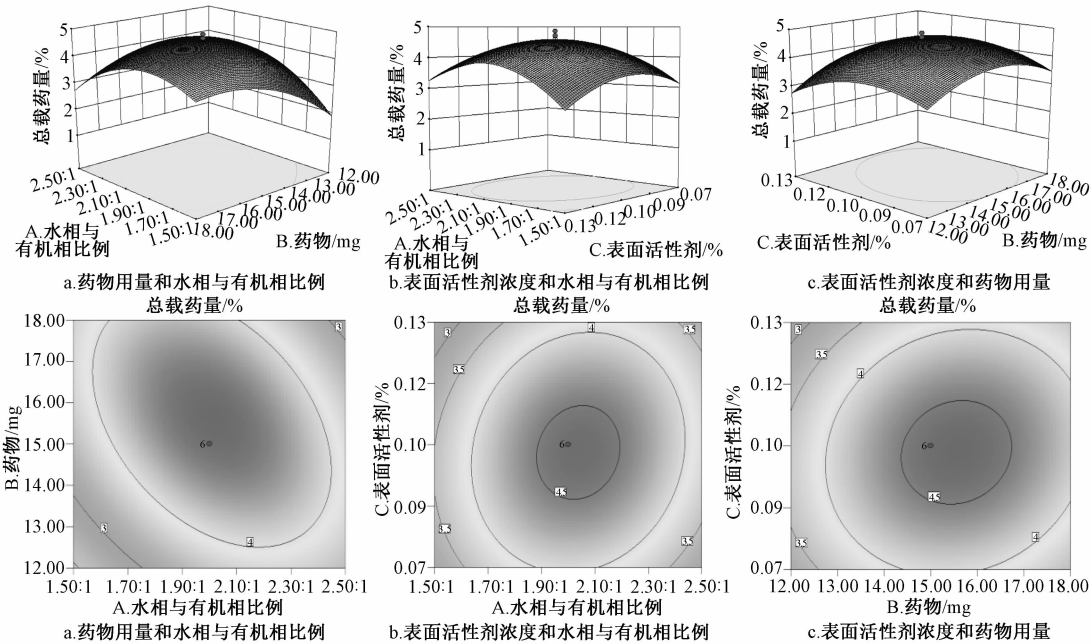


图 2 各因素响应面图 (Y₂)

Fig. 2 Response surface plots for various factors (Y₂)

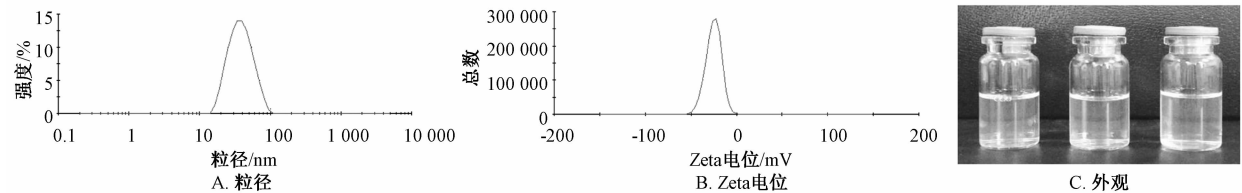


图 3 纳米粒径、Zeta 电位和外观

Fig. 3 Particle size, Zeta potential and appearance of nanoparticles

3 讨论

本实验分别用乙腈-水、甲醇-水作为流动相，再加 0.1% 冰醋酸，发现所得谱图与不加冰醋酸相比，除了药物保留时间有所差异外，峰形基本无区别，同时考虑到甲醇更为廉价，故选择不加冰醋酸的甲醇-水作为流动相。另外，为了达到同时测定丁香苦苷和羟基酪醇的目的，流动相采用梯度洗脱。

本实验为了提高水溶性药物的包封率及载药量，曾尝试使用复乳法，虽然所得纳米粒粒径较小，包封率相对较高，符合本实验要求，但每批样品波动较大，影响因素较复杂；沉淀法所得纳米粒溶液外观呈淡蓝色乳光，粒径小于 100 nm，分布较窄，Zeta 电位绝对值较大，包封率和载药量较高，TEM 观察发现其大小均匀，呈圆球形，而且操作简单，前期也有相关报道，故本实验应用该方法制备纳米粒。

参考文献：

[1] 方 鉴，张喜武，李永吉，等. 丁香苦苷抗鸭乙肝病毒的实验研究[J]. 中医药信息，2011，28(3)：133-134.

[2] 卢 丹，李平亚. 丁香属植物的化学成分和药理作用研究进展[J]. 长春中医学院学报，2001，17(4)：58-59.

[3] Oh H, Ko E K, Kim D H, *et al.* Secoiridoid glucosides with free radical scavenging activity from the leaves of *Syringa dilatata*[J]. *Phytother Res*, 2003, 17(4)：417-419.

[4] Hashim Z H, Rowland I R, McGlynn H, *et al.* Inhibitory effects

of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro*[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(3)：495-500.

[5] Zhang X, Cao J, Jiang L, *et al.* Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells[J]. *Mutat Res*, 2009, 664(1-2)：64-68.

[6] Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(19)：8798-8804.

[7] Liu Z, Sun L, Zhu L, *et al.* Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. *J Neurochem*, 2007, 103：2690-2700.

[8] 杨 凯，温玉明，王昌美，等. 葫芦素 BE 乳酸纳米微粒对口腔癌颈淋巴结转移灶靶向治疗的应用研究[J]. 华西口腔医学杂志，2003，21(6)：447-450.

[9] 孙红武，欧阳五庆. 盐酸小檗碱纳米乳的制备及其理化性质研究[J]. 中草药，2007，38(10)：1476-1480.

[10] Zhang Y, Wang X, Wang J, *et al.* Octreotide-modified polymeric micelles as potential carriers for targeted docetaxel delivery to somatostatin receptor overexpressing tumor cells[J]. *Pharm Res*, 2011, 28(5)：1167-1178.

[11] Zhang X Y, Liu J P, Qiao H, *et al.* Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology[J]. *Powder Technol*, 2010, 197(1-2)：120-128.

[12] 施 斌，方 超，游美羨，等. 聚乙二醇修饰对羟喜树碱隐形纳米囊泡的肿瘤靶向和抑瘤作用的影响[J]. 中国临床药理学杂志，2006，15(1)：46-49.

[13] 罗杰英，杨 勇. 注射用蟾酥固体脂质纳米粒给药系统的研究[D]. 成都：成都中医药大学，2006.