

# 星点设计-效应面法优化天山雪莲传递体制备处方

马晓莉<sup>1</sup>, 邢建国<sup>2\*</sup>, 王新春<sup>1,3</sup>, 樊鑫梅<sup>1</sup>, 连文元<sup>1</sup>, 谢敏<sup>1</sup>

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;  
3. 石河子大学医学院一附院 新疆 石河子 832008)

**[摘要]** 目的: 优化天山雪莲传递体的处方。方法: 注入-高剪切分散法制备天山雪莲传递体, 以绿原酸和芦丁包封率、载药量、传递体平均粒径及归一化值为评价指标, 以磷脂浓度、药脂比(质量比)、油水相体积比为考察因素, 星点设计-效应面法优化处方, 实验结果进行多元线性 and 二项式非线性方程拟合, 效应面法确定最佳处方配比。结果: 二项式是描述各指标与因素之间的最佳模型。以绿原酸为指标的包封率 83.44%, 载药量 4.65%; 以芦丁为指标的包封率 70.69%, 载药量 3.94%, 载药传递体平均粒径 154.6 nm, 理论预测值与实测值偏差较小, 模型具有良好的预测性。结论: 星点设计-效应面优化法筛选天山雪莲传递体是一种简便、可行的实验设计方法。

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)07-0005-04

## Optimization of Preparation Formulation of *Saussurea involucrata* Transfersomes by Central Composite Design/Response Surface Methodology

MA Xiao-li<sup>1</sup>, XING Jian-guo<sup>2\*</sup>, WANG Xin-chun<sup>1,3</sup>, FAN Xin-mei<sup>1</sup>, LIAN Wen-yuan<sup>1</sup>, XIE Min<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. Xinjiang Institute of Meteria Medica, Urumchi 830004, China;

3. First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize formulation of *Saussurea involucrata* transfersomes. **Method:** *S. involucrata* transfersomes was prepared by combining injection technique with high shear scattered method, effects of three independent variables including the concentration of phospholipid, ratio of drug-lipid and volume ratio of oil phase-water phase were investigated, with entrapment efficiency and drug loading of chlorogenic acid and rutin,

[收稿日期] 20111113(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960528)

[第一作者] 马晓莉, 硕士研究生, Tel: 0991-2300682

[通讯作者] \*邢建国, 研究员, 硕士生导师, 从事中药民族药新制剂与新剂型研究, Tel: 0991-2300682, E-mail: xjguodd@163.com

- [4] 吴彦, 孙建宁, 于绍坤. 黄连解毒汤有效部位对培养大鼠皮层神经元缺糖缺氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(8): 936.
- [5] 冯孝庭. 吸附分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 3.
- [6] 朱华旭, 李欢, 顾晓莹, 等. 基于药效学试验的黄连解毒汤大孔树脂精制工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 1.
- [7] 朱华旭, 潘林梅, 刘小辉, 等. 大孔树脂精制 6 种含黄连复方水提液体系的吸附动力学比较研究[J]. 离子交换与吸附, 2009, 25(6): 502.
- [8] 李欢, 朱华旭, 潘林梅, 等. 黄连解毒汤全方和不同极性部位的活性筛选研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 124.
- [9] 邱碧菡, 李欢, 潘林梅, 等. 不同大孔树脂组合精制黄连解毒汤复方水提液的吸附-解析动力学比较研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2056.
- [10] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 27.
- [11] J D Seader. 分离过程原理[M]. 朱开宏, 吴俊生译. 上海: 华东理工大学出版社, 2007: 556, 837.
- [12] 董洁, 朱华旭, 郭立玮. 黄连解毒汤模拟体系的超滤膜过程研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2458.
- [13] 刘兴堂, 梁炳成, 刘力, 等. 复杂系统建模理论、方法与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 120.

[责任编辑 全燕]

mean particle size and normalized value as evaluation indexes, central composite design/response surface method was used to optimized formulation, test results were fitted by multiple linear and binomial nonlinear equations, and optimum formulation was selected by response surface method. **Result:** Binomial was optimum model to describe between indexes and factors. According to optimal preparation conditions of *S. involucrate* transfersomes, entrapment efficiency of chlorogenic acid and rutin were 83.44%, 70.69 respectively, drug loading were 4.65%, 3.94% respectively, and average particle size with 154.6 nm, there was small deviations between theoretical value and measured value, this model had good predictability. **Conclusion:** Central composite design/response surface method was a feasible and convenient method to optimize prescription of *S. involucrate* transfersomes.

[ **Key words** ] *Saussurea involucrate*; transfersomes; central composite design

天山雪莲是维吾尔医常用的民族药,具有消炎镇痛、消肿、活血化瘀等作用。绿原酸及芦丁是天山雪莲提取物中主要活性成分<sup>[1-3]</sup>。

传递体(transfersomes)亦称柔性纳米脂质体,是在脂质体基础上,通过磷脂成分中加入表面活性物质如胆酸钠等制备而成的一种自聚集泡囊,具有高度变形性、高度亲水性及高效渗透性等特点,是一种透皮效果更优于脂质体的新型药物经皮渗透载体<sup>[4]</sup>。

因此,将天山雪莲提取物用传递体为载体进行包裹,可以使药物集中于皮肤角质层,形成药物贮库,缓缓向关节部位释药,从而达到降低药物毒副作用,提高其生物利用度的目的。本文采用注入-高剪切分散法制备天山雪莲传递体,在文献研究及预实验研究基础上,采用星点设计-效应面法优化天山雪莲传递体的处方,为天山雪莲新型透皮给药体系探索研究奠定基础。

## 1 材料

AE-200 型 1/万分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),FA25 型高剪切分散乳化匀质机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司),HJ-7 型六联恒温搅拌器(金坛市华峰仪器有限公司),透析袋(截留相对分子质量 14 000,上海 kayon 生物科技发展有限公司),LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),ZEN3690 型激光纳米粒度电位分析仪(英国马尔文),JEM1230 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司),SHA-C 型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂)。

芦丁(批号 100080-200707)、绿原酸(批号 110753-200413)对照品均购于中国药品生物制品检定所,天山雪莲提取物(新疆自治区药物研究所自制,含绿原酸和芦丁分别为 4.415%,11.532%,批号 20090516),注射用大豆卵磷脂(上海东尚实业公司中国总代理,批号 1031778),胆酸钠(上海蓝季科

技发展有限公司,批号 080628),磷酸二氢钠及磷酸氢二钠(天津市光复科技发展有限公司),无水乙醇、甲醇等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 天山雪莲传递体的制备** 采用注入-高剪切分散法制备天山雪莲传递体。分别精密称取大豆卵磷脂 172 mg,胆酸钠 28 mg,天山雪莲提取物 20 mg,加无水乙醇 4 mL 溶解;另取磷酸盐缓冲液(pH 7.4)20 mL 置烧杯中,开启恒温搅拌仪(37 ℃),在不断搅拌下匀速注入无水乙醇溶液,继续搅拌 30 min 至乙醇挥尽。高剪切处理(10 000 r·min<sup>-1</sup>)1 min,即得天山雪莲传递体混悬液,冰箱 4 ℃ 保存。

**2.2 载药量和包封率的测定** 天山雪莲传递体中绿原酸和芦丁的含量用高效液相色谱法测定。Kromasil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~12 min 12% A,13~40 min 15% A),检测波长 353 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 ℃,进样量 10 μL。载药传递体和游离药物采用反相透析法分离。含药传递体 0.5% 曲拉通乙醇溶液超声处理 10 min 进行消解。高效液相色谱法检测,每批样品测定 3 次,计算药物包封率和载药量。

**2.3 纳米粒形态观察与粒径测定** 待测样品的形态采用透射电镜(TEM)观察,平均粒径及粒度分布用 90 plus 激光粒度分析仪测定。

**2.4 实验设计<sup>[5-8]</sup>** 依据文献及单因素实验研究结果,选择对天山雪莲传递体评价指标影响较显著的 3 个因素作为考察对象,即磷脂质量浓度( $X_1$ ),药脂比( $X_2$ ),油水相体积比( $X_3$ ),见表 1。以绿原酸包封率 EE( $Y_1$ )、芦丁包封率 EE( $Y_2$ )、绿原酸载药量 DL( $Y_3$ )、芦丁载药量 DL( $Y_4$ )、平均粒径( $Y_5$ )及总评归一值 OD( $Y_6$ )为评价指标进行实验,各因素的取值范围分别是 4.3~12.9 g·L<sup>-1</sup> $X_1$ ;1:10~1:20 $X_2$ ;1:4~1:6 $X_3$ ,结果见表 2。

表1 天山雪莲传递体制备工艺星点设计因素水平

水平	$X_1$	$X_2$	$X_3$
-1.732	4.3	10	4
-1	6.12	12.11	4.42
0	8.6	15	5
1	11.08	17.89	5.58
1.732	12.9	20	6

以各效应值为因变量,采用 Design-expert 8.0.3 软件分别将各因素(自变量)对效应值进行多元线性回归和二项式拟合。模型如下:

多元线性方程: $D = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3$

二次多项式: $D = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1x_2 + b_5x_1x_3 + b_6x_1^2 + b_7x_2x_3 + b_8x_2^2 + b_9x_3^2$

表2 天山雪莲传递体制备工艺星点设计

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$ EE <sub>绿</sub> /%	$Y_2$ EE <sub>产</sub> /%	$Y_3$ DL <sub>绿</sub> /%	$Y_4$ DL <sub>产</sub> /%	$Y_5$ 粒径/nm	$Y_6$ OD
1	6.12	12.11	4.42	76.70	65.95	4.38	3.77	143.1 ± 2.75	0.295 6
2	11.08	12.11	4.42	76.68	68.95	4.32	3.88	236.2 ± 2.70	0.228 5
3	6.12	17.89	4.42	76.46	63.85	2.91	2.43	123.4 ± 2.85	0
4	11.08	17.89	4.42	76.47	66.75	2.83	2.47	217.5 ± 6.82	0
5	6.12	12.11	5.58	81.47	72.67	4.84	4.32	140.2 ± 2.48	0.697 4
6	11.08	12.11	5.58	78.84	71.94	4.62	4.21	257.3 ± 5.41	0.273 1
7	6.12	17.89	5.58	81.59	69.56	3.23	2.75	132.0 ± 2.93	0.375 8
8	11.08	17.89	5.58	80.98	69.35	3.11	2.67	260.2 ± 11.21	0
9	4.3	15	5	80.66	58.96	3.73	2.73	117.0 ± 3.09	0
10	12.9	15	5	80.83	64.25	3.74	2.98	247.6 ± 7.88	0.250 9
11	8.6	10	5	81.06	65.40	5.63	4.54	178.1 ± 5.90	0.595 3
12	8.6	20	5	82.65	62.49	2.87	2.17	178.6 ± 6.33	0
13	8.6	15	4	81.14	61.14	3.61	2.72	144.3 ± 5.11	0.298 0
14	8.6	15	6	82.48	66.07	3.93	3.15	201.9 ± 5.57	0.416 0
15	8.6	15	5	88.30	77.14	4.09	3.57	173.3 ± 4.20	0.686 8
16	8.6	15	5	88.26	76.69	4.09	3.55	182.2 ± 3.91	0.666 4
17	8.6	15	5	88.47	77.24	4.10	3.58	189.3 ± 5.15	0.664 0
18	8.6	15	5	88.17	77.10	4.08	3.57	172.8 ± 6.28	0.684 7
19	8.6	15	5	88.72	76.59	4.11	3.55	197.2 ± 6.18	0.644 7
20	8.6	15	5	88.89	77.16	4.12	3.57	184.3 ± 5.08	0.678 3

6个指标的多元线性回归方程结果显示,尽管模型可以通过检验,但模型拟合的相关度不佳,因此应采用多元高次的数学模型。6个指标二次多项式回归方程的拟合结果是各项系数在删除  $P > 0.3$  的项后,进行  $t$  检验,6个指标的方程均通过  $P < 0.005$  的检验,模型拟合优度好。

$Y_1 = -242.313 13 + 8.599 13X_1 + 9.983 50X_2 + 85.041 91X_3 - 0.504 89X_1^2 - 0.329 02X_2^2 - 8.270 48X_3^2 (r = 0.944 0)$ 。

$Y_2 = -329.722 73 + 11.750 96X_1 + 11.454 42X_2 + 105.240 59X_3 - 0.659 57X_1^2 - 0.394 22X_2^2 - 10.195 48X_3^2 (r = 0.909 9)$ 。

$Y_3 = -5.136 53 + 0.406 65X_1 - 0.268 73X_2 + 4.401 41X_3 - 0.024 416X_1^2 - 0.416 46X_3^2 (r = 0.993 3)$ 。

$Y_4 = -8.176 01 + 0.524 49X_1 - 0.246 57X_2 + 4.982$

$01X_3 - 0.029 836X_1^2 - 0.47167X_3^2 (r = 0.981 5)$ 。

$Y_5 = 134.006 31 - 6.382 28X_1 - 22.633 75X_3 + 5.066 86X_1X_3 (r = 0.965 0)$ 。

$Y_6 = -15.763 00 + 0.828 44X_1 + 0.412 59X_2 + 3.964 83X_3 - 0.063 924X_1X_3 - 0.030 306X_1^2 - 0.0155 26X_2^2 - 0.328 81X_3^2 (r = 0.951 1)$ 。

上述结果显示,包封率、载药量、平均粒径和归一化值的二项式拟合均比线性模型相关系数高。

## 2.5 优化工艺

2.5.1 确定自变量范围的优化 固定3个自变量中影响较弱者,设为中值,代入原方程,应用 Origin 6.0 软件分别绘制各指标与影响较显著的2个自变量的三维效应面和二维等高图。从三维效应面图和

等高图中,选取包封率和载药量较高及综合指标较理想的区域,求其相应的自变量范围,得较优处方为  $X_1 = 6.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $X_2 = 1:12.5$ ,  $X_3 = 1:5$ 。见表 3。

表 3 各因素最佳预测取值

指标	$X_1$	$X_2$	$X_3$
EE <sub>绿原酸</sub> /%	6.5 ~ 10.8	12.6 ~ 17.8	4.6 ~ 5.71
EE <sub>芦丁</sub> /%	6.8 ~ 11.3	11.8 ~ 17.2	4.61 ~ 5.72
DL <sub>绿原酸</sub> /%	6 ~ 10.9	10 ~ 12.9	4.69 ~ 5.91
DL <sub>芦丁</sub> /%	6.6 ~ 11.4	10 ~ 13	4.69 ~ 5.9
平均粒径/nm	4.3 ~ 9.9	10 ~ 20	4 ~ 6
OD 值	6.2 ~ 10.8	10.2 ~ 16.6	4.6 ~ 5.9

2.5.2 验证工艺 根据优化处方平行制备 3 份样品,所得传递体各指标实测值与理论预测值接近,表明建立的回归方程预测性良好。实验结果见表 4。

表 4 优化工艺验证

指标	预测值	实测值	偏差
EE <sub>绿原酸</sub> /%	84.65	83.44	1.43
EE <sub>芦丁</sub> /%	72.58	70.69	2.60
DL <sub>绿原酸</sub> /%	4.74	4.65	1.90
DL <sub>芦丁</sub> /%	4.05	3.94	2.72
平均粒径/nm	149.7	154.6	-3.27

### 3 讨论

药物敷贴疗法的难点之一是如何使更多的药物透过皮肤,进入血液循环,从而提高药物的功效。中药传递体由于小的粒径和大的选择吸附能力,可能有更强的穿透能力,使更多的重要成分可以穿透皮肤屏障,进入血液循环。因此,依据课题组已有天山雪莲新制剂研究基础<sup>[9-10]</sup>,开展维药天山雪莲传递体的研究具有较强的可行性和探索性。

目前,以一个药效成分为指标建立中药纳米制剂药物包封率测定方法的研究报道较多,但以中药提取物中多个药效成分为指标进行中药纳米制剂药物包封率测定方法的研究却鲜有报道。因此,本文以药效成分绿原酸和芦丁为指标,进行天山雪莲传

递体处方的优化研究具有较强的科学性。

实验中采用基于非线性模型的星点设计,用多元线性回归和二项式分别对数据进行拟合,选取最佳的拟合方程作为模型,从效应面图直接读取最佳工艺参数,以此参数制备的传递体各项指标实测值与预测值相差较小,说明模型预测性良好。

### [参考文献]

[1] 李君山,蔡少青.雪莲花类药材的化学和药理研究进展[J].中国药学杂志,1998,33(8):449.

[2] 薛秀峰,陈华山,熊志立,等.RP-HPLC法同时测定雪莲注射液中3种成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2005,22(5):363.

[3] Mustafa M A Elsayed, Ossama Y Abdallah, Viviane F Nagggar, et al. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery [J]. Inter J Pharm, 2006, 322: 60.

[4] 谢悦良,张毕奎.柔性纳米脂质体的研究进展[J].中国药房,2008,19(25):1983.

[5] 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].中国药学杂志,2000,35(8):530.

[6] 宋玉玲,周欣颖,王晓青,等.星点设计-效应面优化去甲斑蝥素壳聚糖肝动脉栓塞微球的制备[J].中国药学杂志,2010,45(14):1073.

[7] 王新春,侯世祥,李文,等.均匀设计联用星点设计优化白藜芦醇固体脂质纳米粒制备处方[J].中成药,2007,29(8):1399.

[8] 谷丽艳,李学涛,唐凌星.星点设计优化长春瑞滨静脉注射乳剂的处方[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(13):21.

[9] 刘桂花,邢建国,薛桂蓬,等.正交实验优化天山雪莲骨架缓释片处方[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):17.

[10] 黄贤惠,邢建国,王新春,等.正交设计法优选天山雪莲凝胶剂基质处方[J].中国中药杂志,2010,35(14):1803.

[责任编辑 仝燕]