

Box-Behnken 响应面法优化疏水改性普鲁兰纳米粒的制备工艺

邹佳峰, 朱志红, 李范珠*, 诸佳珍* (浙江中医药大学药学院, 杭州 311402)

摘要:目的 通过 Box-Behnken 效应面法优化胆固醇基普鲁兰多糖多柔比星自组装纳米粒 (self-assembled doxorubicin-loaded cholesterol-modified pullulan nanoparticle, DOX-CHSP-SAN) 的制备工艺。方法 以多柔比星 (doxorubicin, DOX) 为模型药物, 胆固醇基-普鲁兰多糖 (cholesterol-modified pullulan, CHSP) 为两亲性载体材料, 采用透析法制备了 DOX-CHSP-SAN, 应用 Box-Behnken 效应面法对其制备工艺进行优化, 并对最优处方所制备的 DOX-CHSP-SAN 形态、粒径、Zeta 电位、包封率、载药量及体外释药等进行表征。结果 经优化制得的 DOX-CHSP-SAN 在电镜下呈圆整球形, 平均粒径为 (117.1 ± 3.4) nm, polymer dispersity index (PDI) 为 (0.205 ± 0.023) , Zeta 电位为 (-26.1 ± 0.135) mV, 包封率 (encapsulation efficiency, EE) 为 $(68.17 \pm 0.93)\%$, 载药量 (drug loading, DL) 为 $(6.84 \pm 0.47)\%$, 其体外释药行为符合 Weibull 释放动力学模型。结论 经响应面法优化后制备的 DOX-CHSP-SAN 形态圆整光滑, 粒径小而均匀, 包封率和载药量较高, 体外释药具有缓释特征。

关键词: 多柔比星; 普鲁兰纳米粒; Box-Behnken 响应面法; 单因素考察

doi:10.11669/cpj.2019.14.007 中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2019)14-1154-08

Formulation Optimization of Hydrophobically-Pullulan Nanoparticles by Box-Behnken Response Surface Methodology

ZOU Jia-feng, ZHU Zhi-hong, LI Fan-zhu*, ZHU Jia-zhen* (College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the preparation of self-assembled doxorubicin-loaded cholesterol-modified pullulan nanoparticles (DOX-CHSP-SAN) by response surface methodology. **METHODS** DOX-CHSP-SAN was prepared by dialysis method with the amphiphilic carrier of cholesterol-modified pullulan (CHSP) and the model drug of doxorubicin (DOX). Box-Behnken Design (BBD) response surface method was used to optimize the preparation process of DOX-CHSP-SAN. The morphology, average particle size, Zeta potentia, the encapsulation efficiency, drug loading of doxorubicin and the drug release characteristics *in vitro* were determined. **RESULTS** The optimized DOX-CHSP-SAN has a round spherical shape with an average particle size of (117.1 ± 3.4) nm, PDI of (0.205 ± 0.023) , Zeta potential of (-26.1 ± 0.135) mV, the encapsulation efficiency was $(68.17 \pm 0.93)\%$, and the drug loading was $(6.84 \pm 0.47)\%$. The *in vitro* release behavior in PBS of pH 7.4 was consistent with the Weibull equation. **CONCLUSION**

The DOX-CHSP-SAN prepared by the dialysis method and optimized by the response surface method is round and smooth, the particle size is small and uniform, the encapsulation efficiency and the drug loading amount are high, and the *in vitro* release has the sustained release characteristics.

KEY WORDS: doxorubicin; pullulan nanoparticle; Box-Behnken response surface; single factor study

多柔比星 (doxorubicin, DOX) 为广谱抗生素药物, 作为现阶段大量运用于临床治疗, 效果最为显著的一种抗肿瘤药物, 对常见肿瘤如脑胶质瘤^[1]、肺癌、肝癌、淋巴瘤等均有较好的治疗效果^[2]。目前, 已上市的 DOX 制剂为盐酸 DOX 注射液, 但因其较强的水溶性, 造成药物难以透过血脑屏障 (blood

brain barrier, BBB)^[3-5], 加之其严重的心脏毒性与脊髓抑制等不良反应, 使其在脑胶质瘤化疗应用中受到了极大限制^[6]。因此, 减小 DOX 的毒副作用, 拓宽其临床应用已成为近年来的研究热点之一。

自组装纳米粒 (self-assembled nanoparticle, SAN) 给药系统具有粒径小, 体内外稳定性好, 穿透

基金项目: 浙江省教育厅一般科研项目资助 (Y201431480); 浙江省中医药优秀青年人才基金项目资助 (2018ZQ013); 浙江省自然科学基金项目资助 (LQ19H280004); 浙江省新苗人才计划项目资助 (2018R410052); 浙江中医药大学 2018 年度校级科研基金资助 (2018ZJ09)

作者简介: 邹佳峰, 男, 硕士研究生 研究方向: 药物新剂型与新技术研究 * **通讯作者:** 李范珠, 男, 博士, 教授 研究方向: 药物新剂型与新技术研究 Tel: (0571)61768181 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn; 诸佳珍, 女, 博士, 助理研究员 研究方向: 药物新剂型与新技术研究 Tel: (0571)61768181 E-mail: zjz1987@zcmu.edu.cn

组织的能力较好等优良特性,可以借助提升透过率以及滞留的作用^[7-8](enhanced permeability and retention effect, EPR)在肿瘤组织富集,降低毒副作用^[9]。本实验前期研究亦表明^[10],自组装纳米粒能有效促进药物鼻黏膜给药后快速入脑,但其材料主要是共聚物材料,难以满足生物相容性和生物可降解性等要求。普鲁兰多糖是一种天然多糖,具有无毒、可降解等优点^[11],通过疏水改性接枝胆固醇可得到两亲性的纳米粒载体材料^[12-14],即胆固醇基-普鲁兰多糖(cholesterol-modified pullulan, CHSP),结构见图1,这种两亲性材料具有良好的自组装性和生物降解性^[11,15],是一种理想的药物载体。

响应面法是目前常见的优化工艺的研究方法^[16-17],故本实验以抗肿瘤药物 DOX 为模型药物, CHSP 为载体材料,采用透析法制备 DOX-CHSP-SAN,通过 Box-Behnken 效应面法优化其制备工艺,并对最优处方所制备的 DOX-CHSP-SAN 形态、粒径、Zeta 电位、包封率、载药量及体外释药等特性进行考察。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Zetasizer Nano-ZS 粒度测定仪(英国马尔文仪器公司);UV-1700 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Hitachi H-7650 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Mill-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司);KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);S-212 型恒速搅拌器(上海申胜生物技术有限公司);透析袋(MWCO=8 000~14 000,杭州汇普化工仪器有限公司)。

1.2 试剂

盐酸 DOX(浙江海正制药有限公司,纯度>98%,批号 100210);盐酸 DOX 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 130509-200301);CHSP

(中国医学科学院生物医学工程研究所提供);二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司,批号 B1512021);三乙胺(triethylamine, TEA)(天津市永大化学试剂有限公司,批号 TM12359);其余相应的试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 纳米粒的制备

2.1.1 CHSP-SAN 的制备 称取适量 CHSP 溶解在适量的 DMSO 溶液中,避光搅拌 3 h 后,将其转入透析袋中,在 37 °C 周围避光环境下,借助蒸馏水透析 24 h。在冰浴环境中,将透析袋中溶液间歇式超声 2 min,借助 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得 CHSP-SAN 混悬液,冻干后,于 4 °C 中保存^[15]。

2.1.2 DOX-CHSP-SAN 的制备 称取适量盐酸 DOX 溶于含有 TEA 的 DMSO 溶液中(TEA-DOX = 3:1, mmol:mmol)混合并搅拌过夜。避光条件下,将 1 mg·mL⁻¹ DOX 溶液滴加到 CHSP-SAN 溶液中并搅拌 12 h,即得橘红色 DOX-CHSP-SAN 溶液,冻干后,于 4 °C 中保存^[18]。

2.2 紫外-分光光度法含量测定

本实验以 482 nm 为检测波长,采用紫外-分光光度法进行含量测定,DOX 在 10.10~50.50 μg·mL⁻¹ 内,线性回归方程: $A=0.0172\rho+0.0025$ ($r=0.9998$), $n=5$,吸光度与浓度呈良好线性关系。

2.3 纳米粒的性能表征

2.3.1 粒径和 PDI 的检测 取适量的纳米粒,均匀地在蒸馏水中分散开来,借助粒度测定仪在 25 °C 环境中对平均粒径及 PDI 进行相应的检测。

2.3.2 DL 与 EE 的检测 借助有机溶剂破坏法^[13]进行 DOX-CHSP-SAN 的包封率与载药量检测。量取 1 mL DOX-CHSP-SAN 混悬液于 9 mL 的 DMSO 中,于 482 nm 处测定吸光度,且以相同溶剂的 CHSP-SAN 为参照溶剂,计算包封率和载药量。

2.3.3 外观形态 取样品溶液拍照并取适量 DOX-CHSP-SAN 混悬液滴于喷碳铜网上,2.0% 磷钨酸溶液负染 3 min,挥干,借助透射电子显微镜观察其外观形态并拍摄照片。

2.4 单因素考察试验设计及结果

以粒径、PDI、电位、包封率为指标,考察 CHSP 相对分子量、CHSP 取代度、CHSP 用量、DMSO 用量、超声功率、超声时间对制剂的影响,根据单因素实验设计(表 1)进行实验,为后续响应面实验因素水平的选择提供依据^[19]。

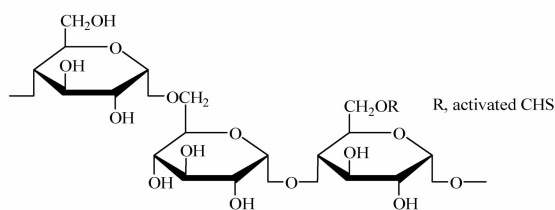


图1 CHSP 结构示意图

Fig. 1 The structure of CHSP

表 1 DOX-CHSP-SAN 单因素实验的因素及水平表

Tab. 1 Factors and level table of DOX-CHSP-SAN single factor test

Investigation factor	Fixed factor
Molecular weight of CHSP 200,100 000	Degree of substitution of CHSP 5.5% , CHSP 15 mg, DMSO 1.0 mL, ultrasonic power 50 W, ultrasonic time 2 min, drug loading ratio 1/15
Degree of substitution of CHSP 3.0% , 4.0% , 5.0% , 6.0% , 6.5%	Molecular weight of CHSP 200 000, CHSP 15 mg, DMSO 1.0 mL, ultrasonic power 50 W, ultrasonic time 2 min, drug loading ratio 1/15
CHSP 5, 8, 10, 12, 15 mg	Molecular weight of CHSP 200 000, degree of substitution of CHSP 5.5% , DMSO 1.0 mL, ultrasonic power 50 W, ultrasonic time 2 min, drug loading ratio 1/15
DMSO 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mL	Molecular weight of CHSP 200 000, degree of substitution of CHSP 5.5% , CHSP 15 mg, ultrasonic power 50 W, ultrasonic time 2 min, drug loading ratio 1/15
Ultrasonic power 30, 50, 80, 100, 120 W	Molecular weight of CHSP 200 000, degree of substitution of CHSP 5.5% , CHSP 15 mg, DMSO 1.0 mL, ultrasonic time 2 min, drug loading ratio 1/15
Ultrasonic time 1, 2, 3, 4, 5 min	Molecular weight of CHSP 200 000, degree of substitution of CHSP 5.5% , CHSP 15 mg, DMSO 1.0 mL, ultrasonic power 50 W, drug loading ratio 1/15
Drug loading ratio 1:15, 1:10, 1:5	Molecular weight of 200 000, degree of substitution of CHSP 5.5% , CHSP 15 mg, DMSO 1.0 mL, ultrasonic power 50 W

表 2 DOX-CHSP-SAN 单因素实验结果

Tab. 2 Results of DOX-CHSP-SAN single factor test

Factor	Level	Particle size/nm	PDI	Zeta potential/mV	EE/%
CHSP/ × 10 ³	200	109.3 ± 1.68	0.112 ± 0.036	-23.7 ± 0.114	41.22 ± 6.27
	100	124.2 ± 2.14	0.207 ± 0.077	-16.3 ± 0.152	39.58 ± 9.66
Degree of substitution of CHSP/%	3	158.0 ± 5.25	0.343 ± 0.086	-26.4 ± 0.135	48.38 ± 3.82
	4	131.2 ± 3.31	0.207 ± 0.052	-21.1 ± 0.034	44.68 ± 3.71
	5	110.3 ± 3.31	0.132 ± 0.028	-20.7 ± 0.212	46.89 ± 13.97
	6		Can't form nanoparticles		
	6.5		Can't form nanoparticles		
CHSP/mg	5	82.2 ± 1.88	0.331 ± 0.075	-17.3 ± 0.152	45.57 ± 15.2
	8	96.6 ± 2.47	0.185 ± 0.024	-23.1 ± 0.101	46.29 ± 6.60
	10	108.8 ± 2.11	0.206 ± 0.022	-22.4 ± 0.201	51.42 ± 1.29
	12	138.1 ± 2.32	0.268 ± 0.026	-21.8 ± 0.034	54.83 ± 8.03
	15	153.2 ± 2.55	0.343 ± 0.084	-19.7 ± 0.212	57.09 ± 2.96
DMSO/mL	0.5	124.3 ± 5.23	0.414 ± 0.088	-28.2 ± 0.205	54.07 ± 1.51
	0.8	113.1 ± 3.66	0.243 ± 0.035	-21.8 ± 0.034	53.65 ± 3.52
	1	108.7 ± 2.43	0.156 ± 0.014	-20.1 ± 0.142	53.88 ± 4.73
	1.2	119.2 ± 2.46	0.231 ± 0.021	-22.4 ± 0.314	51.42 ± 4.55
	1.5	140.5 ± 6.83	0.437 ± 0.085	-15.8 ± 0.002	58.87 ± 2.09
Ultrasonic power/W	30	120.3 ± 3.23	0.321 ± 0.065	-18.9 ± 0.322	53.04 ± 13.57
	50	107.9 ± 1.22	0.169 ± 0.025	-26.5 ± 0.214	51.73 ± 4.98
	80	122.2 ± 1.52	0.207 ± 0.032	-23.9 ± 0.141	50.96 ± 1.94
	100	131.1 ± 3.45	0.314 ± 0.054	-20.9 ± 0.245	52.22 ± 2.09
	120	143.8 ± 4.76	0.452 ± 0.081	-15.3 ± 0.152	53.18 ± 3.16
Ultrasonic time/min	1	125.3 ± 2.64	0.301 ± 0.078	-16.5 ± 0.112	56.23 ± 7.72
	2	112.5 ± 1.07	0.172 ± 0.046	-25.2 ± 0.251	53.32 ± 6.50
	3	119.0 ± 2.43	0.208 ± 0.038	-22.7 ± 0.236	55.82 ± 9.00
	4	127.6 ± 1.38	0.327 ± 0.081	-21.1 ± 0.342	57.13 ± 1.29
	5	139.2 ± 3.68	0.461 ± 0.093	-16.3 ± 0.176	58.02 ± 4.81
Drug loading ratio	1:15	119.2 ± 3.28	0.254 ± 0.012	-21.7 ± 0.206	65.08 ± 9.02
	1:10	132.6 ± 4.61	0.241 ± 0.035	-20.7 ± 0.136	59.71 ± 5.87
	1:5	164.2 ± 6.02	0.241 ± 0.035	-13.3 ± 0.102	53.11 ± 5.27

依照工艺参数进行制备实验,各纳米粒的指标检测结果见表 2。结果表明,相对分子质量为 200 000 的 CHSP 所制得的纳米粒粒径较小,分散比较均匀。随着 CHSP 中胆固醇取代度的增加,纳米粒的粒径和 PDI 均逐渐变小,CHSP 在水中较好完成了自组装过程,稳定性较好。但随着胆固醇取代度增大至 6.0% 以上,发现 CHSP 较难自组装形成纳米粒,原因可能是随着取代度的增大,材料在水中形

成较强的疏水性,反而不利于纳米粒的形成。故本实验选择胆固醇取代度为 5.5% 的 CHSP 作为载体材料,且随着 CHSP 用量的增大,纳米粒的粒径和 PDI 均呈增大趋势。随着 DMSO 体积的增加,粒径呈减小趋势,但当 DMSO 体积增加至 1.5 mL 时,粒径、PDI 和包封率均呈增加趋势。为了防止纳米粒混悬液在超声过程中变热而破坏其稳定性,本实验采用间歇脉冲的超声方式,脉冲和间歇时间均为

2.0 s,且整个超声过程均在冰浴中进行^[20]。在一定范围内,提高超声功率,可以增强纳米粒的分散性,从而制备出更小的纳米粒,超声时间从1 min增加至2 min时,纳米粒的粒径和PDI均呈减小趋势;而当超声功率达到50 W后,纳米粒的粒径和PDI反而逐渐增大,时间从2 min增加至5 min时,纳米粒的粒径和PDI反而呈现增大趋势。随着药载比的减小,粒径呈减小趋势,PDI差异不大,而包封率呈现上升趋势。其中,CHSP用量(X_A)、DOX-CHSP(X_B)、DMSO用量(X_C)和超声时间(X_D)4个实验因素对DOX-CHSP-SAN理化性质具有显著影响,故需进一步优化该4个因素。

2.5 工艺优化设计及结果

2.5.1 BBD 优化实验

在单因素考察的基础上,采用BBD响应面设计^[21],选择上述单因素实验筛

选出的4个实验因素为考察因素,以粒径(Y_1)、包封率(Y_2)为指标,按“2.1.2”项下方法制备纳米粒,旨在获得体系稳定、粒径均一、包封率较高的纳米递药系统^[22]。BBD各因素水平见表3,实验设计方案及其实验结果见表4。

表3 BBD设计因素及水平表

Tab.3 Factors and level table of BBD design

Code	Input variable			
	X_A	X_B	X_C	X_D
1	15	1/5	1.2	4
0	10	2/15	1	3
-1	5	1/15	0.8	2

注:CHSP用量(X_A);DOX-CHSP(X_B);DMSO用量(X_C)和超声时间(X_D)

Note:CHSP dosage (X_A), DOX-CHSP (X_B), DMSO dosage (X_C), ultrasound time (X_D)

表4 BBD设计方案及结果

Tab.4 BBD Design scheme and results

Number	Input variable				Experimental response	
	X_A	X_B	X_C	X_D	Particle size/nm	EE/%
1	10	2/15	0.8	2	109.5	56.66
2	10	2/15	1	3	115.4	53.87
3	10	1/5	1.2	3	108.6	31.26
4	15	1/15	1	3	116.2	66.65
5	10	2/15	1	3	128.4	54.87
6	15	2/15	0.8	3	100.5	53.34
7	10	0.2	1	2	113.2	46.82
8	10	1/15	1	4	124.9	55.84
9	10	2/15	1.2	2	95.5	54.14
10	10	1/5	0.8	3	137.2	22.92
11	10	2/15	1	3	116.4	54.87
12	15	2/15	1	4	122.7	58.42
13	10	1/15	1	2	79.9	69.15
14	5	2/15	1	4	123.9	54.87
15	15	1/5	1	3	116.4	64.06
16	5	2/15	1	2	90.9	56.49
17	10	1/15	1.2	3	104	27.84
18	15	2/15	1.2	3	113.1	56.26
19	15	2/15	1	2	134.8	56.65
20	10	2/15	1	3	116.4	53.87
21	5	2/15	0.8	3	98.7	45.84
22	5	2/15	1.2	3	112.9	46.87
23	10	2/15	0.8	4	102.7	50.13
24	5	1/5	1	3	136.4	30.37
25	10	2/15	1	3	115.4	62.31
26	10	1/15	0.8	3	97.9	51.84
27	10	1/5	1	4	140.2	29.92
28	5	1/15	1	3	77.4	58.34
29	10	2/15	1.2	4	158.4	34.95

2.5.2 模型拟合 采用 Design-Expert 8.0.5b 软件对各因素水平进行多元线性回归和二项式拟合^[23]。选择有较大相关系数(r)的拟合方程,同时借助方程的 $P < 0.05$ 作为显著标准进行优化。二项式拟合结果优良,相关系数均高于0.8,失拟项均高于0.05,这说明模型拟合较好,由于误差导致模型拟合程度不佳的可能性较小。 X_A 为CHSP用量($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); X_B 为载药量; X_C 为DMSO用量(mL); X_D 为超声时间(min),均是编码值。每个响应值 Y 都可用一个独立的多项式表示,拟合方程如下。

$$Y_1 = 114.07 + 5.29X_A + 12.64X_B + 3.83X_C + 12.42X_D - 14.70X_A X_B - 0.40X_A X_C - 11.28X_A X_D - 8.67X_B X_C - 4.50X_B X_D + 17.73X_C X_D \quad (r = 0.8065, P < 0.05)$$

$$Y_2 = 55.96 + 5.22X_A - 8.69X_B - 2.45X_C - 4.65X_D + 6.34X_A X_B + 0.47X_A X_C + 0.85X_A X_D + 8.09X_B X_C - 0.90X_B X_D - 3.17X_C X_D + 3.89X_A^2 - 7.75X_B^2 - 10.62X_C^2 + 0.87X_D^2 \quad (r = 0.8220, P < 0.05)$$

根据二项式拟合方程绘制出因素对各指标影响趋势的三维效应面与等高线图见图2。

2.5.3 自变量对粒径的作用 借助自变量对粒径影响的模型系数可以发现,完整模型的 F 值是4.61, $P < 0.005$,表明拟合程度较高。以粒径为考察指标的4个影响因素影响顺序为:DOX-CHSP(X_B) > 超声时间(X_D) > CHSP用量(X_A) > DMSO用量(X_C)(表5)。结果表明,影响因素B和D对粒径均具有显著性影响($P < 0.05$),因素A对粒径具有影响($P < 0.10$)。

2.5.4 自变量对EE的作用 借助自变量对EE影响的模型系数可以发现,完整模型的 F 值是4.62, $P < 0.005$,表明拟合程度较高。以EE为考察指标的4个影响因素影响顺序为:DOX-CHSP(X_B) > CHSP用量(X_A) > 超声时间(X_D) > DMSO用量(X_C)(表6)。结果表明,影响因素A、B和D对包封率均具有显著性影响($P < 0.05$)。

2.6 验证实验

本实验制备的纳米粒在后续的研究中主要用于鼻腔给药治疗脑部疾病。针对鼻腔给药而言,由于给药量相对较低,因此纳米粒的粒径与纳米粒的载药量是极为关键的指标。借助 Design-Expert 8.0.5b 软件,并根据相关文献,优选出综合最佳工艺。所预测出的最佳处方工艺为将经预处理的DOX混合液逐滴加入含15 mg CHSP的1.0 mL

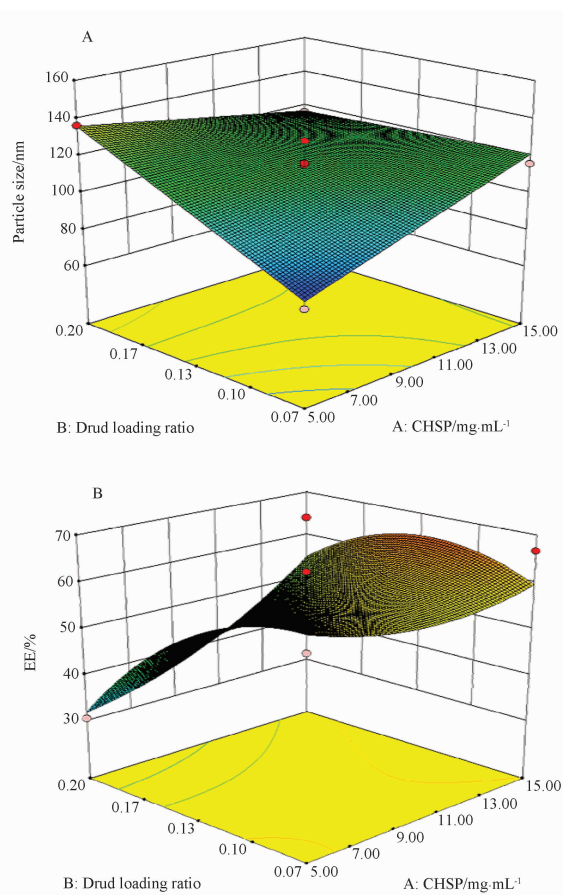


图2 因素与指标之间的响应面和等高线图

A - 各因素与粒径之间等高线图; B - 各因素与包封率之间等高线图

Fig. 2 Response surfaces and contour plots between indexes and two factors

A - contour plot between each factor and particle size; B - contour plot between each factor and the encapsulation ratio

表5 BBD 粒径方差分析表

Tab. 5 BBD variance analysis table of particle size

Source of variance	Square of deviance	Degree of freedom	F	P	Variance
X_A	336.02	1	3.48	0.078 6	$P < 0.10$
X_B	1 917.74	1	19.84	0.000 3	$P < 0.05$
X_C (Error)	176.33	1	1.82	0.193 5	
X_D	1 850.08	1	19.14	0.000 4	$P < 0.05$

表6 BBD 包封率方差分析表

Tab. 6 BBD variance analysis table of encapsulation

Source of variance	Square of deviance	Degree of freedom	F	P	Variance
X_A	326.56	1	6.27	0.025 2	$P < 0.05$
X_B	906.71	1	17.42	0.000 9	$P < 0.05$
X_C (Error)	72.08	1	1.38	0.258 9	
X_D	259.28	1	4.98	0.042 5	$P < 0.05$

DMSO 溶液中,在避光环境下搅拌 3 h 后,将混合溶液转移至透析袋中,借助适量蒸馏水在避光环境下透析,每间隔 1 h 更换新的透析介质,连续透析 6 h。之后,每间隔 2 h 更换透析介质,透析 12 h 后,每间隔 4 h 更换透析介质,连续透析 24 h。将所得溶液间歇式超声 2 min 后,定容于 10 mL 量瓶,并依据最佳工艺条件重复 3 次实验,根据公式 3 分析预测值与实测值同时计算偏差,结果见表 7。

$$\text{偏差}\% = (\text{预测值} - \text{实测值}) / \text{预测值} \times 100\% \quad (\text{公式 3})$$

按优化工艺制备的 DOX-CHSP-SAN 为橘红色乳光混悬液。通过透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察 DOX-CHSP-SAN, 结果表明,纳米粒粒径均一,其平均粒径为 117.1 nm, PDI 指数为 0.205 (图 3)。

最佳工艺实测粒径 (117.1 ± 3.4) nm, PDI 为 (0.205 ± 0.023), 包封率为 (68.17 ± 0.93)%, 粒径和 EE 响应值的偏差分别为 0.51% 和 2.3%, 表明这两者的实验值与预测值吻合程度优良,所建立的模型可信度高,合理有效,验证实验结果见表 7。PDI 为 $0.224 < 0.3$, 结果表明,由该工艺制备的纳米粒粒径均一。

2.7 体外释放实验

不同药载比情况下纳米粒的释放情况:药载比为 1:5、1:10、1:15 的 DOX-CHSP-SAN 在 pH 7.4 的 PBS 溶液中的释药曲线见图 4A,采用经典的零级动力学模型、一级动力学模型、Ritger-Peppas 动力学模型、Weibull 动力学模型对体外释药特性进行方程拟合,结果见表 8。结果显示,不同药载比的 DOX-CHSP-SAN 体外释药行为均符合 Weibull 模型。游离 DOX 在 PBS 溶液中迅速释放,4 h 时药物已释放完全。不同药载比 DOX-CHSP-SAN 的初始阶段,均能快速释药,随后释药曲线渐趋平稳,缓慢释药。DOX-CHSP-SAN 在体外释药受药载比影响,随着药载比的降低,DOX 的累积释放百分率逐渐增大。8 h 时,

表 7 优选处方验证实验结果

Tab. 7 The results of authentic test of preferred prescription

Number	Particle size/nm	EE/%
1	112.3	67.17
2	120.5	68.32
3	118.5	69.02
$\bar{x} \pm s (n=3)$	117.1 ± 3.4	68.17 ± 0.93
Predictive value	117.7	69.8
Bias/%	0.51	2.3

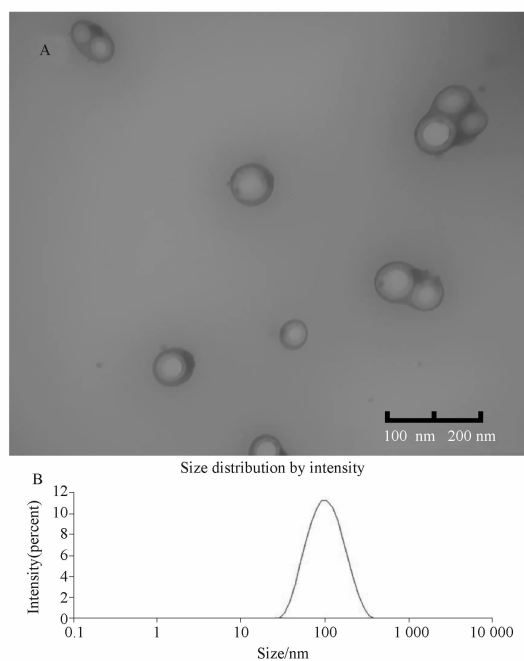


图 3 DOX-CHSP-SAN 透射电镜照片及粒径分布

A - DOX-CHSP-SAN 透射电镜照片 ($\times 70\ 000$); B - DOX-CHSP-SAN 的粒径分布

Fig. 3 TEM Photograph and particle size distribution of DOX-CHSP-SAN

A - the TEM photograph of DOX-CHSP-SAN ($\times 70\ 000$); B - the particle size distribution of DOX-CHSP-SAN

药载比为 1:5、1:10、1:15 的 DOX-CHSP-SAN 的累积释放百分率分别为 (47.36 ± 2.06)%、(42.38 ± 1.67)% 和 (39.38 ± 1.73)%; 24 h 时,分别为 (57.58 ± 1.31)%、(59.24 ± 0.67)% 和 (65.25 ± 1.33)%。另外,不同药载比 DOX-CHSP-SAN 与血浆以 1:1 混合后的释药曲线见图 4B。结果表明,血浆环境中的 DOX-CHSP-SAN 释药也受药载比的影响,随着药载比的降低,DOX 的释放增加速率逐渐减小,8 h 时,药载比为 1:5、1:10、1:15 的 DOX-CHSP-SAN 累积释放百分率分别为 (50.99 ± 1.41)%、(46.67 ± 3.34)% 和 (42.98 ± 2.01)%; 24 h 时,药物释放度分别为 (55.73 ± 2.48)%、(57.43 ± 1.20)% 和 (56.25 ± 1.67)%。

3 讨论

常见的自组装纳米粒制备方法主要有化学结合法、乳化法、透析法等。化学结合法所制得的自组装纳米粒性质比较稳定,但需先在聚合物分子上连接易反应的活性基团^[24],故其在应用上受到限制。本实验前期研究发现乳化法所制得的纳米粒虽然粒径分布较均一,但载药量和包封率偏低,原因可能是

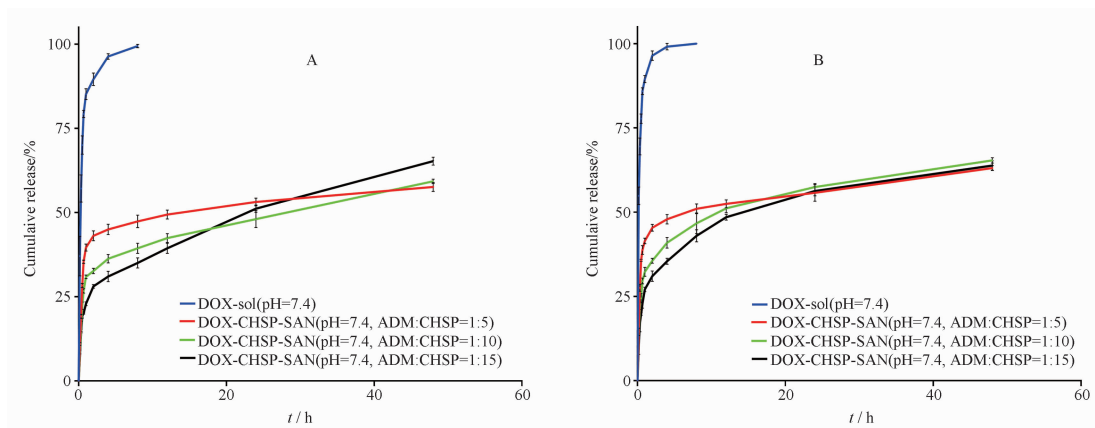


图4 不同药载比 DOX-CHSP-SAN 体外释放曲线

A - DOX-CHSP-SAN 在 PBS (pH 7.4) 中的体外释放曲线; B - DOX-CHSP-SAN 在血浆环境中的体外释放曲线

Fig. 4 *In vitro* release curve of different drug loading ratio DOX-CHSP-SAN

A - *in vitro* release profile of DOX-CHSP-SAN in PBS (pH 7.4); B - *in vitro* release profile of DOX-CHSP-SAN in plasma environment

表8 DOX-CHSP-SAN 体外释药动力学模型

Tab. 8 *In vitro* release kinetics model of DOX-CHSP-SAN

Group	Model	Equation fitting	r^2
DOX - CHSP - SAN (pH 7.4, DOX-CHSP = 1:5)	Zero-order	$Q = 0.0066t + 0.3298$	0.4530
	First order	$\ln(100 - Q) = -0.0001t + 4.6026$	0.4536
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.2308 \ln t - 1.2374$	0.7323
	Weibull	$\ln \ln(1/1 - Q) = 0.2852 \ln t - 0.6395$	0.7753
DOX-CHSP-SAN (pH 7.4, DOX-CHSP = 1:10)	Zero-order	$Q = 0.0081t + 0.2552$	0.7323
	First order	$\ln(100 - Q) = -0.0001t + 4.6026$	0.6919
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.2678 \ln t + 3.1457$	0.8333
	Weibull	$\ln \ln(1/1 - Q) = 0.3227 \ln t - 1.3061$	0.8699
DOX-CHSP-SAN (pH 7.4, DOX-CHSP = 1:15)	Zero-order	$Q = 0.0104t + 0.2082$	0.8475
	First order	$\ln(100 - Q) = -0.0001t + 4.603$	0.8482
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.3144 \ln t - 1.621$	0.9160
	Weibull	$\ln \ln(1/1 - Q) = 0.3791 - 1.4904 \ln t$	0.9374

纳米粒自组装过程中形成了疏水内核^[25],导致药物难以大量进入纳米粒内核,仅靠内部少量的包载和外部的吸附作用载药。而透析法中,CHSP在DMSO中溶解为均一高分子溶液,转入透析袋在蒸馏水或生理盐水中透析,DMSO溶剂缓慢与透析介质进行交换后,经短时小功率超声处理,即可形成粒径较小、分散相对均一的纳米粒混悬液,制备过程简单^[26],具有良好的体外稳定性和应用潜力^[27],因此本实验以两亲性接枝共聚物CHSP为载体材料,采用透析法制备DOX-CHSP-SAN。同时,借助单因素实验设计考察了纳米粒制备过程中的不同因素对响应值(粒径、PDI和EE)的影响,初步确定CHSP用量(X_A)、DOX-CHSP(X_B)、DMSO用量(X_C)和超声时间(X_D)对DOX-CHSP-SAN理化性质具有显著影响,需进一步优化。借助Box-Behnken效应面法,对上述因素水平进行回归和拟合,生成一种特殊的数学模型来说明自变量与因变量之间的关系,其中,以

粒径为考察指标,确定了 X_B 与 X_D 对其具有显著性影响。又以EE为考察指标,确定了 X_A 、 X_D 对其具有显著性影响。同时预测出影响产物生成的最佳自变量,为CHSP用量15mg、DOX-CHSP = 1:15、DMSO用量1.0mL、超声2min,结合单因素考察结果与Box-Behnken效应面法结果优化DOX-CHSP-SAN的制备工艺,通过验证实验和体外释放实验证明其可操作性。

按优化工艺制得的DOX-CHSP-SAN平均粒径为(117.1 ± 3.4)nm, PDI为(0.205 ± 0.023), Zeta电位(-26.1 ± 0.135)mV,包封率为(68.17 ± 0.93)%,载药量为(6.84 ± 0.47)%,粒径和EE响应值的偏差分别为0.51%和2.3%,实验值与预测值吻合度良好,处方工艺重现性良好,并采用TEM观察DOX-CHSP-SAN的形态,结果表明,载药自组装纳米粒呈圆形或类圆形,大小均一,分散均匀。

体外释放研究表明,在PBS(pH 7.4)中,

纳米粒释药行为符合 Weibull 方程,且在一定范围内,药载比越低,其缓释效果越明显,同时,血浆环境中,不同药载比纳米粒释放行为也遵循上述规律,推测原因为 CHSP 的紧密内核限制了 DOX 向释放介质中扩散,本实验处方选择了 DOX-CHSP = 1:15,与体外释放结果一致,进一步说明了该处方工艺的可行性。该优化工艺制备的 DOX-CHSP-SAN 经表征表明其符合脑内递药需求,为下一步脑内脑药动力学研究的开展提供了理论依据和实验基础。

REFERENCES

- [1] ALIREZA M, AMELOT A, CHAUVET D, *et al.* Poor prognosis and challenging in treatment of optic nerve malignant gliomas: a literature review and case report series [J]. *World Neurosurg*, 2017, 97(16):751-771.
- [2] XINGYUN L, YANG W, JIANGUO S, *et al.* IR-780 enhances cytotoxicity of adriamycin against cancer stem-like cells from hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Third Mil Med Univ*(第三军医大学学报), 2017, 39(12):1206-1213.
- [3] SINGH B, LEE C B, SOHNG J K. Precursor for biosynthesis of sugar moiety of doxorubicin depends on rhamnose biosynthetic pathway in *Streptomyces peucetius* ATCC 27952[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2010, 85(5):1565-1574.
- [4] HEFNAWY A, KHALIL I A, ELSHERBINY I M. Facile development of nanocomp articles for enhanced loading and selective delivery of doxorubicin to brain[J]. *Nanomedicine*, 2017, 12(24):2737-2761.
- [5] RAMU A, MEHTA M M, LEASEBURG T, *et al.* The enhancement of riboflavin-mediated photo-oxidation of doxorubicin by histidine and urocanic acid[J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2001, 47(4):338-346.
- [6] LUO P, ZHU Y, CHEN M, *et al.* HMGB1 contributes to adriamycin-induced cardiotoxicity via up-regulating autophagy [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 292:115-122.
- [7] SON Y J, JANG J S, YONG W C, *et al.* Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect[J]. *J Controlled Release*, 2003, 91(1):135-145.
- [8] YHEE J Y, JEON S, YOON H Y, *et al.* Effects of tumor micro-environments on targeted delivery of glycol chitosan nanop articles [J]. *J Controlled Release*, 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.015.
- [9] MITCHELL M J, KING M R. Leukocytes as carriers for targeted cancer drug delivery[J]. *Expert Opin Drug Del*, 2015, 12(3):375.
- [10] LIU L, XU L Z, HE X W, *et al.* Preparation and *in vitro* release of self-assembled neurotoxin-loaded nanoparticles of core-shell type[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2009, 44(14):1084-1088.
- [11] LI H, XUE Y, JIA B, *et al.* The preparation of hyaluronic acid grafted pullulan polymers and their use in the formation of novel biocompatible wound healing film[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 188(18):92-100.
- [12] GRENHA A, RODRIGUES S. Pullulan-based nanoparticles: future therapeutic applications in transmucosal protein delivery [J]. *Ther Deliv*, 2013, 4(11):1339-1341.
- [13] WANG Y S, JIANG Q, LIU L R, *et al.* Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified pullulan conjugate as a novel carrier of mitoxantrone[J]. *Curr Nanosci*, 2010, 6(3):298-306.
- [14] SHEN S, LI H, YANG W. The preliminary evaluation on cholesterol-modified pullulan as a drug nanocarrier[J]. *Drug Deliv*, 2014, 21(7):501-508.
- [15] YANG W Z, LI X M I, CHEN H L, *et al.* Preparation of self-assembled cholesterol modified pullulan nanoparticles [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2009, 18(1):73-77.
- [16] ZHUANG H, YUE X, LUSHAN Y U. Optimization of hydrochloric acid hydrolysis extracting mollugin from *Rubiae Radix et Rhizoma* by response surface methodology[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学杂志), 2017, 34(5):686-691.
- [17] LEATHERS T D. Biotechnological production and applications of pullulan[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2003, 62(5-6):468-473.
- [18] CREMERS H F M, VERRIJK R, NOTEBORN H P J M, *et al.* Adriamycin loading and release characteristics of albumin-heparin conjugate microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2017, 29(1-2):143-155.
- [19] ZANG Q Z, TANG T, LONG K W, *et al.* Optimization of formulation of α -asarone nanoparticles *in situ* gel and investigation of its release properties[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(13):7-10.
- [20] YUE M A, LAI H, LIANG H, *et al.* The preparation of paclitaxel-loaded micelle based on pullulan-grafted-poly(*D, L*-lactide) and preliminary *in vivo* toxicity evaluation [J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2017, 34(4):275-284.
- [21] SU-MIN M A, LI-CHAO H E, CHENG-LIANG L I, *et al.* The response surface optimization on ultrasonic extraction process of porcine hemoglobin and effect of ultrasonic process on its structure[J]. *Sci Tec Food Ind*(食品工业科技杂志), 2018, 39(6):184-190.
- [22] XIAO Y, ZHAO Q, KAKU I, *et al.* Development of a fuel consumption optimization model for the capacitated vehicle routing problem[J]. *Comput Oper Res*, 2012, 39(7):1419-1431.
- [23] FANG L I, YANG P M, CAO G S, *et al.* Optimization of extraction process of total flavonoids from *Oldenlandia diffusa* by Box-Behnken designresponse surface methodology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(8):21-24.
- [24] LI Y, ZHANG C, ZHOU Y, *et al.* Multiresponsive aggregates based on a sensitive Si-O-C structure: when the chemical bond nature meets self-assembly[J]. *Chem Lett*, 2016, 45(8):904-906.
- [25] LI B T, SHAO W, WANG Y Z, *et al.* Synthesis and morphological control of biocompatible fluorescent/magnetic janus nanoparticles based on the self-assembly of fluorescent polyurethane and Fe₃O₄ nanoparticles[J]. *Polymers*, 2019, 11(2):17.
- [26] KOU C H, HAN J, HAN X L, *et al.* Preparation and characterization of the adriamycin-loaded amphiphilic chitosan nanoparticles and their application in the treatment of liver cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6):7833-7841.
- [27] WANG Y, YANG X, YANG J, *et al.* Self-assembled nanoparticles of methotrexate conjugated O-carboxymethyl chitosan: preparation, characterization and drug release behavior *in vitro* [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(4):1665-1670.

(收稿日期:2018-12-06)