

响应面法优化氧化槐定碱脂质体的制备及表征

郭留城,杜利月,冯慧慧,高笑笑,崔凤灵

(河南师范大学 化学化工学院,河南 新乡 453007)

摘要:以包封率为评价指标,采用单因素实验和 Box-Behnken 响应面设计法优化氧化槐定碱脂质体的制备工艺.采用透射电镜、包封率、载药量、Zeta 电位、红外光谱、差示扫描量热分析等表征氧化槐定碱脂质体.氧化槐定碱脂质体的最佳制备工艺为:大豆卵磷脂与胆固醇的质量比为 10 : 3.09、大豆卵磷脂与药物的质量比为 10 : 1.54、水合时间为 1.46 h.氧化槐定碱脂质体的平均粒径为 154.1 nm,分散系数为 0.329,平均包封率为 58.02% (RSD 为 1.63%),平均载药量为 6.27% (RSD 为 1.52%),Zeta 电位为 -29.9 mV.经验证最佳制备工艺稳定可行,氧化槐定碱脂质体的外观成类球形、粒径分布较为均匀,混悬液稳定,不宜发生絮凝.

关键词:氧化槐定碱;脂质体;响应面法;表征

中图分类号:O657.7

文献标志码:A

氧化槐定碱(Oxysophoridine, OSR)是从豆科槐属植物苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)中提取得到的一种重要的生物碱,现在已经可以人工合成.现代药理学研究证明,OSR 具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化等多种药理活性^[1-4].然而,由于其半衰期短,体内没有靶向性,会导致人体产生呼吸减慢、昏迷、甚至死亡等不良反应^[4].

在贮存的过程中,氧化槐定碱易变质.张军帅等人^[5]采用冷冻干燥法将 OSR 制备成了粉针剂,延缓了制剂中 OSR 的变质,延长了 OSR 制剂的保质期,提高了 OSR 制剂的用药安全.然而将 OSR 制备成靶向制剂的研究,尚未见有报道.从提高临床疗效、降低副作用的角度入手,利用单因素实验和 Box-Behnken 响应面设计等实验技术,将 OSR 制备成具有靶向功能的脂质体制剂,可以在一定程度上提高 OSR 的疗效,降低毒副作用,方便临床用药,也可以丰富 OSR 的药物制剂,从而使 OSR 更好地服务于临床^[6].薄膜法制备的脂质体分散性好,载药量较高^[6-7],因此,本文采用改良薄膜法制备 OSR 脂质体.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

主要试剂:氧化槐定碱对照品(批号:190322,纯度 98.7%)和氧化槐定碱原料(批号:190409)购于南京道斯夫生物科技有限公司,大豆卵磷脂(批号:EXR1DRK4)和胆固醇(批号:R8ARE2KU)购于上海萨恩化学技术有限公司,乙腈(色谱级,批号:C11988756)购于上海麦克林生化科技有限公司,蒸馏水自制,其他试剂均为分析纯.

主要仪器:JEM-2100 型高分辨透射电子显微镜(日本电子公司)、Zetasizer Nano ZS 90(马尔文)激光粒度仪(德芮克国际股份有限公司)、1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)、Agilent Cary100 型紫外-可见分光光度计(美国安捷伦科技公司)、RE100-S 型旋转蒸发仪(北京大龙兴创实验仪器股份公司)、

收稿日期:2021-06-15;**修回日期:**2021-09-28.

基金项目:国家自然科学基金(U1704170);河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2017GGJS286);校级科研资助项目(2016-S-LMC-12).

作者简介:郭留城(1983-),男,河南商丘人,河南师范大学博士研究生,研究方向为食品药品制剂分析,E-mail:guoliucheng@163.com.

通信作者:崔凤灵(1963-),女,满族,山东郓城人,河南师范大学教授,博士生导师,研究方向为荧光纳米材料,E-mail:fenglingcui@hotmail.com.

DSC204F1型差示扫描量热仪(德国耐驰公司)、Spectrum 400F型中远红外光谱仪(美国珀金埃尔默仪器有限公司)、MS105DU/A型分析天平(梅特勒-托利多国际有限公司)。

1.2 溶液的配制及 OSR 脂质体的制备

OSR 储备液的制备:精密称取 OSR 对照品 13.2 mg,用双蒸水配制成 1 mmol/L 的溶液。

PBS 缓冲溶液的配制:称取 4.00 g NaCl,0.10 g KCl,0.72 g Na_2HPO_4 ,0.12 g KH_2PO_4 溶于 400 mL 蒸馏水中,用 HCl 调节 pH 值至 7.4,最后加蒸馏水定容至 500 mL,即得 PBS 缓冲液^[4]。

大豆卵磷脂(Lecithin High Potency, LHP)和胆固醇(Cholesterol, CHO)混合液的制备:称取 LHP 2.4 g 和 CHO 0.4 g,加入 100 mL 氯仿超声溶解后,制成 240 mL 溶液,作为 LHP 和 CHO 的混合液。

OSR 脂质体的制备:取处方量的 LHP 和 CHO 混合溶液,在室温下,旋干溶剂,加入处方量的 OSR(原料)溶液,37 °C 涡旋水合 1 h,再加入处方量的 PBS 缓冲溶液,涡旋水合至规定时间,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得 OSR 脂质体^[6,8-9]。

供试品溶液的制备^[8]:取 OSR 脂质体 5 mL,离心分离脂质体,精密量取上清液 2 mL,用 PBS 缓冲溶液稀释,使 OSR 的质量浓度约为 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$,摇匀,0.22 μm 滤膜过滤,即得。

阴性溶液的制备^[9]:制备不含 OSR 的空白脂质体,操作方法同“供试品溶液的制备”,即得。

1.3 OSR 含量(质量分数)测定方法

1.3.1 色谱条件

采用 Waters Symmetry[®] C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为 0.05%(质量分数)的三乙胺水溶液(磷酸调 pH 为 3.5)与乙腈混合液(体积比为 95:5);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL 。

1.3.2 专属性实验

按照 1.3.1 中色谱条件设定仪器参数,进样量 10 μL ,取 1.2 中的对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液,进样测定,记录色谱图谱^[10-11]。

1.3.3 线性关系的考察

按照 1.3.1 中色谱条件设定仪器参数,取 OSR 储备液适量,制成 240.840、187.320、133.800、80.280、26.760、24.084、18.732、13.380、8.028、2.676 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,分别进样测定,记录色谱图谱和峰面积^[5,11],计算出回归方程。

1.3.4 方法学考察

按照文献报道^[5,11-12]的方法进行精密度实验、重复性实验和加样回收率实验。

精密度实验:取对照品溶液,进样 6 次,记录色谱图谱和峰面积。

重复性实验:平行制备 OSR 脂质体 6 批,按照 1.2 中供试品溶液的制备方法,制备供试品溶液,按照 1.3.1 中色谱条件做重复性实验,记录色谱图谱和峰面积。

加样回收率实验:取 1 g LHP 和 300 mg CHO 溶于 10 mL 氯仿中,在室温下,旋干溶剂,平行制备 3 批,分别加入 OSR 120 mg、150 mg、180 mg,按照 1.2 中 OSR 脂质体的制备方法,制备 3 种不同质量浓度的 OSR 脂质体。按 1.3.1 中色谱条件,测定脂质体中 OSR 的质量分数,计算平均回收率。

1.4 包封率和载药量的测定

取制备好的 OSR 脂质体 5 mL,在转速为 50 000 r/min 条件下,离心 30 min^[13],取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,按 1.3.1 中色谱条件,测定 OSR 的峰面积,计算 OSR 的质量,作为未包封 OSR 质量 W_1 ;制备脂质体时加入的 OSR 质量为 W_2 ,制备脂质体时加入的辅料质量为 W_3 ,分别计算包封率(encapsulation efficiency, EE%) 和载药量(drug loading capacity, DL%)^[6,8-9]:

$$\text{包封率}(EE\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_2} \times 100\%, \text{载药量}(DL\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_3 + (W_2 - W_1)} \times 100\%.$$

1.5 单因素实验方法

改变 LHP 和 CHO 的质量比:固定 LHP 的用量为 1 g,OSR 的用量为 150 mg,改变 CHO 的用量,使 LHP 和 CHO 的质量比为 10:0.5,10:1.0,10:3.0,10:5.0,10:7.0,10:9.0 和 10:10.0。按上述质量比,

称取 LHP 和 CHO,加入氯仿溶解后,按照 1.2 中操作,制备 OSR 脂质体.按 1.2 中供试品溶液的制备方法,将 OSR 脂质体制成供试品溶液,按照 1.3.1 中色谱条件,采用 HPLC 法测定未包封的 OSR,计算包封率^[8-9].

改变 LHP 和 OSR 的质量比:固定 LHP 的用量为 1 g,CHO 的用量为 300 mg,改变 OSR 的用量,使 LHP 和 OSR 的质量比为 10 : 0.5,10 : 1.0,10 : 1.5,10 : 2.0,10 : 3.0,10 : 5.0 和 10 : 7.0.按照 1.2 中操作,制备 OSR 脂质体.按 1.2 中供试品溶液的制备方法,将 OSR 脂质体制成供试品溶液,按照 1.3.1 中色谱条件,采用 HPLC 法测定未包封的 OSR,计算包封率^[8-9].

水合时间的优化:量取 LHP 和 CHO 的混合液 2 mL 和 1 mmol/L OSR 缓冲溶液 1 mL,分别采用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h 的水合时间制备 OSR 脂质体,按照 1.2 中操作,制备 OSR 脂质体.按 1.2 中供试品溶液的制备方法,将 OSR 脂质体制成供试品溶液,按照 1.3.1 中色谱条件,采用 HPLC 法测定未包封的 OSR,计算包封率^[6,8-9].

1.6 响应面优化实验

单因素实验无法评估实验过程中不同因素之间的相互作用,因此,采用 Design-Expert V8.0.6.1 软件进行响应面设计,优化 OSR 脂质体的制备过程,以揭示这些不同单因素之间的相互作用,并优化 OSR 脂质体的制备过程^[8-9,14-15].选择对包封率有显著影响的 3 个参数(LHP 与 CHO 的质量比:A;LHP 与 OSR 的质量比:B;水合时间:C,h)作为考察对象,以包封率作为测定指标.结合 1.5 中实验结果,每个因素选择 3 个级别.这 3 个因素的 3 个级别(-1,0,1)分别如下:LHP 与 CHO 的质量比(10 : 1.0,10 : 3.0,10 : 5.0),LHP 与 OSR 的质量比(10 : 1.0,10 : 1.5 和 10 : 2.0)和水合时间(1.0、1.5 和 2.0 h).构建了包含 17 个实验运行的设计矩阵,进行响应面优化实验.

1.7 验证实验

采用响应面实验优化后的最佳制备工艺,制备 3 批 OSR 脂质体,按 1.2 中供试品溶液的制备方法,分别将 OSR 脂质体制成供试品溶液,按照 1.3.1 中色谱条件,采用 HPLC 法测定未包封的 OSR,计算包封率.

1.8 OSR 脂质体的表征

载药量的测定:取 1.7 中制备的 OSR 脂质体混悬液,按 1.2 中供试品溶液的制备方法,分别将 OSR 脂质体制成供试品溶液,按照 1.3.1 中色谱条件,采用 HPLC 法测定未包封的 OSR,按 1.4 中载药量计算公式,计算载药量.

脂质体形态:取 1.7 中制备的 OSR 脂质体混悬液,以超纯水适当稀释后,在专用铜网上制样,在防尘装置中静置并自然挥干,使 OSR 样品沉积在铜网上,放大 5 万倍,加速电压 200 kV,观察并摄像^[8-9].

粒径分布与 Zeta 电位:取 1.7 中制备的 OSR 脂质体混悬液,以超纯水适当稀释后,采用动态光散射仪测定 Zeta 电位、粒径及粒径分布^[8,14].

红外光谱表征:取 1.7 中制备的 OSR 脂质体混悬液,真空干燥得 OSR 脂质体粉末.分别取 CHO,LHP,OSR,物理混合物和 OSR 脂质体粉末,加入溴化钾固体,充分研细,压片,在 400~4 000 cm^{-1} 范围内进行红外分光扫描,记录图谱^[8].

差示扫描量热分析:取 CHO,LHP,OSR,物理混合物与 1.7 中制备的 OSR 混悬液真空干燥后的脂质体粉末,进行差示扫描量热(differential scanning calorimetry,DSC)分析.工作条件:以空铝坩埚为空白参考池,另一铝坩埚为样品池,在样品池中放入样品约 10 mg,置于机器中进行图谱扫描; N_2 作为吹扫气,扫描速度 10 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,扫描范围 30~300 $^\circ\text{C}$,记录图谱^[8].

2 实验结果与讨论

2.1 测定方法的可靠性

2.1.1 专属性实验结果

OSR 含量测定方法的专属性实验结果见图 1.结果显示 OSR 的分离度较好,专属性强,阴性无干扰.

2.1.2 线性关系考察结果

测得的 OSR 峰面积,用 Origin Pro 8.5 软件进行线性回归分析,得回归方程为 $Y = 5.48727X - 1.53523$,相关系数 $R^2 = 0.9995$,线性范围为: $2.676 \sim 240.840 \mu\text{g/mL}$.结果显示 OSR 的质量分数与峰面积呈良好的线性关系.

2.1.3 方法学考察结果

精密度实验测得的 OSR 峰面积,用 Origin Pro 8.5 软件进行线性回归分析,峰面积的 RSD 值为 0.58% ($n=6$).重复性实验测得的 OSR 峰面积,用 Excel 2016 软件进行相对标准偏差(RSD 值)分析,峰面积的 RSD 值为 0.91% ($n=6$).回收率实验测得的 OSR 峰面积,用 Excel 2016 软件进行均值和相对标准偏差(RSD 值)分析,3 种不同质量浓度的 OSR 溶液,平均回收率分别为 98.53% , 99.22% , 98.79% , RSD 值分别为 0.83% , 0.93% , 0.86% ($n=3$).结果表明,精密度、重复性和回收率均符合《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 9101 项下规定.

2.2 单因素实验结果

LHP 与 CHO 不同质量比的单因素实验结果见图 2.由图 2 可知,随着 CHO 质量的增加包封率先升高,随后下降,在 LHP 和 CHO 的质量比为 $10:3.0$ 时包封率达到最佳.LHP 与 OSR 不同质量比的单因素实验结果见图 3.由图 3 可知,随着 OSR 质量的增加包封率先升高,随后下降,在质量比为 $10:1.5$ 时包封率达到最佳.

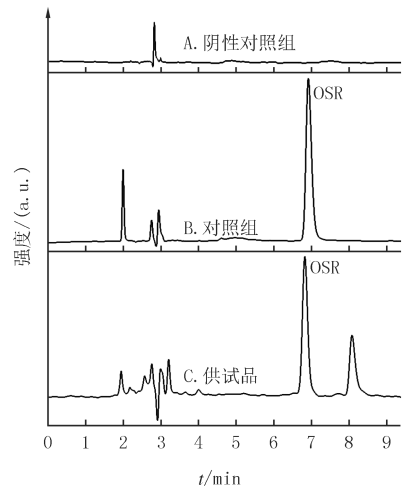


图1 系统适用性色谱图

Fig.1 Chromatograms of system suitability

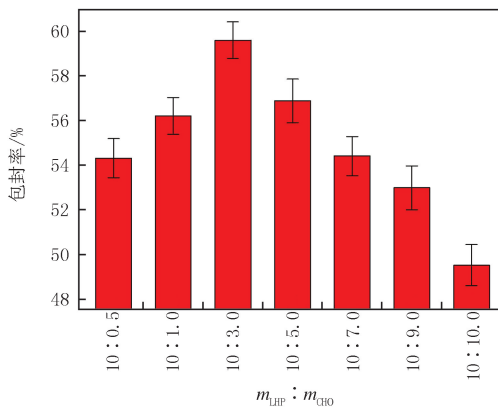


图2 LHP与CHO不同质量比的实验结果

Fig.2 Test results of different mass ratios of LHP and CHO

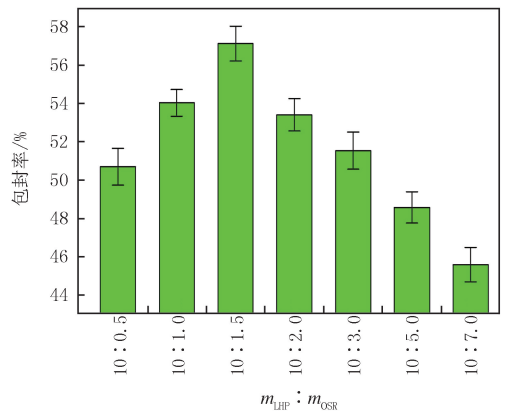


图3 LHP与OSR不同质量比的实验结果

Fig.3 Test results of different mass ratios of LHP to OSR

不同水合时间对 OSR 脂质体影响的单因素实验结果见图 4.由图 4 可知,随着水合时间的增加包封率逐渐升高,在水合时间大于 1.5 h 时包封率基本不再增加.因此,选择 LHP 与 CHO 的质量比为 $10:1.0$, $10:3.0$, $10:5.0$, LHP 与 OSR 的质量比为 $10:1.0$, $10:1.5$ 和 $10:2.0$ 和水合时间为 1.0 , 1.5 和 2.0 h ,作为响应面优化实验的因素水平.

2.3 响应面优化实验结果

应用 Design-Expert V8.0.6.1 对实验数据进行分析,响应面优化实验设计与

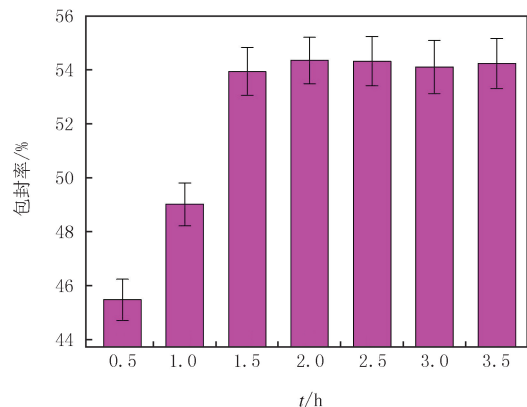


图4 不同水合时间的实验结果

Fig.4 Test results of different hydmass ration time

结果见表 1,响应面模型的方差分析结果见表 2,3 个因素对包封率的等高线和三维响应面见图 5、图 6 和图 7.以包封率对各因素自变量进行模型拟合,通过拟合得到的二次回归方程为 $OSR \text{ 包封率}(\%) = 59.27 + 0.79A + 1.89B - 1.15C - 0.62AB - 3.96AC - 1.72BC - 11.58A^2 - 12.48B^2 - 9.66C^2$ ($R^2 = 0.9386$,失拟度检验 F 值为 5.65, $P = 0.0638 > 0.05$),由拟合方程结果可知拟合模型 F 值为 11.90 ($P = 0.0018 < 0.05$),信噪比值为 8.425,相对较高,表明该拟合模型拟合结果良好,实测值与预测值之间的相关性较高,能够高度准确地预测实验结果的实际情况.

表 1 Box-Behnken 实验设计与结果

Tab. 1 Design and results of Box-Behnken experiment

序号	A	B	C/h	包封率/%
1	1	1	0	34.73
2	-1	0	-1	33.67
3	0	0	0	56.18
4	-1	0	1	42.11
5	-1	-1	0	34.46
6	1	-1	0	38.61
7	0	1	1	37.95
8	1	0	-1	41.87
9	1	0	1	34.48
10	0	-1	1	31.20
11	0	-1	-1	32.87
12	0	0	0	60.96
13	-1	1	0	33.08
14	0	0	0	61.40
15	0	1	-1	46.51
16	0	0	0	57.08
17	0	0	0	60.76

表 2 Box-Behnken 响应面模型的方差分析

Tab. 2 ANOVA for response surface model of Box-Behnken

来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1 920.26	9	213.36	11.90	0.001 8	*
A	5.05	1	5.05	0.28	0.612 0	
B	28.67	1	28.67	1.60	0.246 6	
C	10.52	1	10.52	0.59	0.468 7	
AB	1.55	1	1.55	0.09	0.777 0	
AC	62.67	1	62.67	3.49	0.103 8	
BC	11.87	1	11.87	0.66	0.442 7	
A ²	564.47	1	564.47	31.47	0.000 8	**
B ²	655.34	1	655.34	36.54	0.000 5	**
C ²	393.25	1	393.25	21.92	0.002 3	*
残差	125.56	7	17.94			
失拟项	101.60	3	33.87	5.65	0.063 8	
纯误差	23.96	4	5.99			
总离差	2 045.81	16				

注: * 为显著相关; ** 为极显著相关.

根据二次回归方程拟合结果,固定一个因素水平^[14-15],进行 OSR 包封率对其他两个因素的拟合,得到实验结果的三维效应曲面图,并对 OSR 的提取工艺参数进行优选.图 5、图 6 和图 7 中 OSR 的包封率随着各变量的增加而增加,到达最大值后逐渐下降.最佳制备工艺处方为:LHP 与 CHO 的质量比为 10 : 3.09、LHP 与 OSR 的质量比为 10 : 1.54、水合时间为 1.46 h,与单因素实验结果基本吻合.

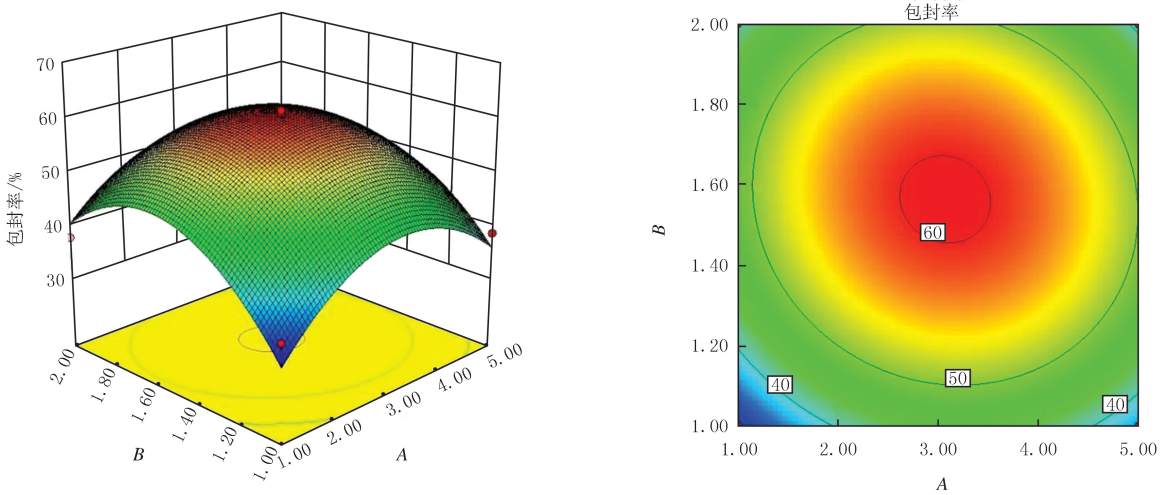


图5 因素A和因素B对包封率的等高线和三维响应面

Fig.5 Contour lines and 3D response surface of factor A and factor B to EE

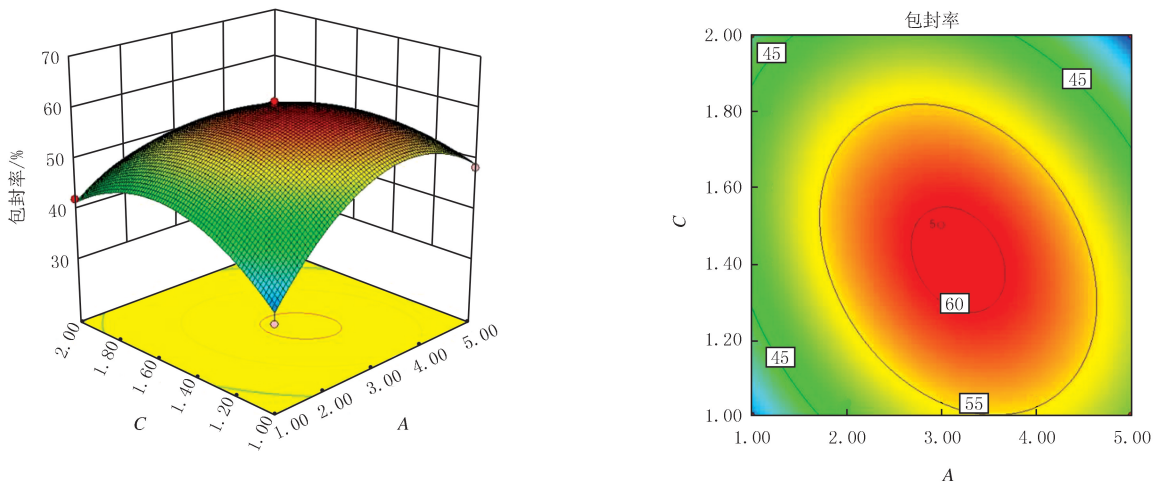


图6 因素A和因素C对包封率的等高线和三维响应面

Fig.6 Contour lines and 3D response surface of factor A and factor C to EE

2.4 工艺验证实验结果

按最优工艺制备的 3 批 OSR 脂质体的包封率分别为 57.68%, 57.30%, 59.09%, 平均包封率为 58.02%, RSD 值为 1.63%. OSR 脂质体包封率的实测平均值为 58.02% 与预测值为 59.41% 非常接近, 偏差较小, 预测性良好, 说明 OSR 的最佳制备工艺稳定、可行.

2.5 OSR 脂质体的表征

2.5.1 载药量的测定

按最优工艺制备的 3 批 OSR 脂质体的载药量分别为 6.24%, 6.20%, 6.38%, 平均载药量为 6.27%, RSD 值为 1.52%, 平行 3 批 OSR 脂质体的载药量误差较小, 说明 OSR 的最佳制备工艺稳定.

2.5.2 脂质体形态

透射电镜拍摄的 OSR 脂质体的形状, 见图 8. 由图 8 可知, OSR 的外观成类球形均匀分散, 多数为单室脂质体.

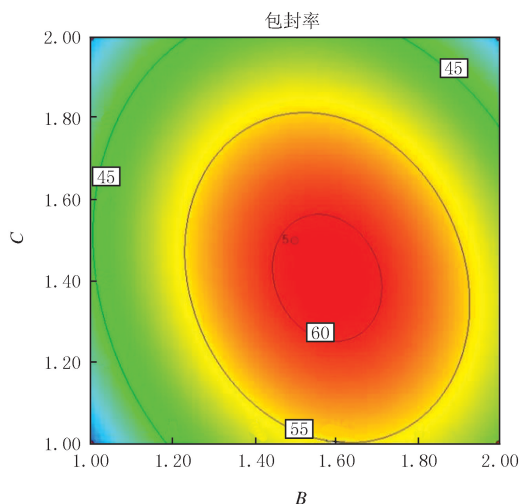
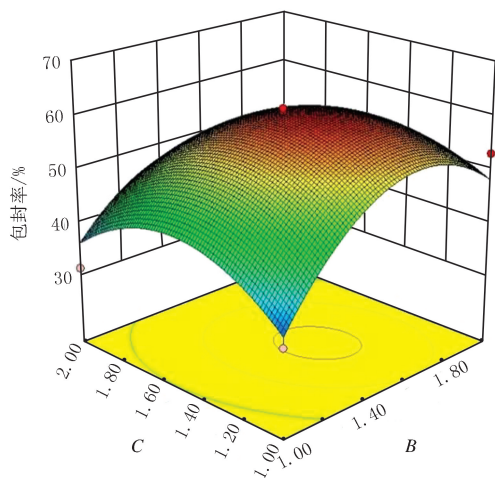


图7 因素B和因素C对包封率的等高线和三维响应面

Fig.7 Contour lines and 3D response surface of factor B and factor C to EE

2.5.3 粒径分布与 Zeta 电位测定结果

动态光散射仪测定的粒径及粒径分布结果见图 9, Zeta 电位测定结果见图 10.由图 9 可知, OSR 的粒径为 154.1 nm,分散系数(PDI)为 0.329,说明 OSR 脂质体粒径分布较为均匀;由图 10 可知, OSR 脂质体的 Zeta 电位为 -29.9 mV,其绝对值 $\gg 15$ mV,结合 DLVO 理论可知,制备的 OSR 脂质体混悬液稳定,不易发生絮凝^[8,15].

2.5.4 红外光谱表征结果

OSR 脂质体的红外测定结果见图 11.图 11 a 线显示, $1\ 670\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰为 CHO 的 C=C 伸缩振动峰, $3\ 431\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 CHO 的 $-\text{OH}$ 伸缩振动峰, $2\ 934\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{CH}_3$ 的伸缩振动峰, $1\ 360 \sim 1\ 470\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{CH}_3$ 的不对称伸缩振动.图 11b 线显示, $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ 和 $3\ 010\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰分别为 LHP 的 C=C 伸缩振动峰和碳碳双键上氢的伸缩振动峰, $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 236\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰分别为 LHP 分子中酯键的 C=O 和 C-O-C 伸缩振动峰, $3\ 323\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 LHP 的 $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}$ 的伸缩振动峰, $2\ 925\ \text{cm}^{-1}$ 、 $2\ 853\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 466\ \text{cm}^{-1}$ 依次为 $-\text{CH}_2-$ 的不对称伸缩振动、对称伸缩振动和面内弯曲振动峰, $1\ 090\ \text{cm}^{-1}$ 和 $722\ \text{cm}^{-1}$ 分别为醇羟基的 C-O 伸缩振动峰和 O-H 面外弯曲振动峰; $1\ 066\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 657\ \text{cm}^{-1}$ 和 $827\ \text{cm}^{-1}$ 分别为氨基的 C-N 伸缩振动峰、N-H 面内弯曲振动峰和 N-H 面外弯曲振动峰, $1\ 378\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{CH}_3$ 的面内对称弯曲振动峰, $-\text{CH}_3$ 的面内不对称弯曲振动峰和伸缩振动峰被 $-\text{CH}_2-$ 相应位置的峰所掩盖.图 11c 线是 CHO 和 LHP 物理混合物的红外图谱,对比图 11a, b, c 3 线可知,图 11c 线是图 11a 线和 b 线简单地叠加,明显区别于 OSR 脂质体的红外图 11e 线.图 11d 线显示, $1\ 620\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 249\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰分别为 OSR 分子中酰胺键的 C=O 和 C-N 伸缩振动峰, $1\ 020\ \text{cm}^{-1} \sim 1\ 220\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰为 OSR 分子中的叔胺中 C-N 伸缩振动峰, $1\ 349\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 304\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰为 OSR 分子中叔碳氢的振动吸收峰,其余的吸收峰为 OSR 的不同化学环境中 $-\text{CH}_2-$ 的振动峰.图 11e 线显示, OSR 分子中酰胺键的 C=O 和 C-N 伸缩振动峰、叔胺中 C-N 伸缩振动峰和叔碳氢的振动吸收峰得以保留,红外吸收峰位几乎没有变化,说明 OSR 进入脂质体囊泡中.此外,图 11e 线与 c 线和 d 线对比,在 $2\ 000 \sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 范围内 OSR 脂质体的红外吸收峰的位置和峰形发生了明显的变化,进一步说明 OSR 进入脂质体囊泡中.

2.5.5 差示扫描量热分析结果

OSR 脂质体的差示扫描量热分析测定结果见图 12.图 12 结果表明, CHO(a 线)在 $151.1\ ^\circ\text{C}$ 时出现一个熔点峰; LHP 是由卵磷脂、脑磷脂、肌醇磷脂、神经鞘磷脂、磷脂酸和其他磷脂组成的复杂混合物,所以 LHP

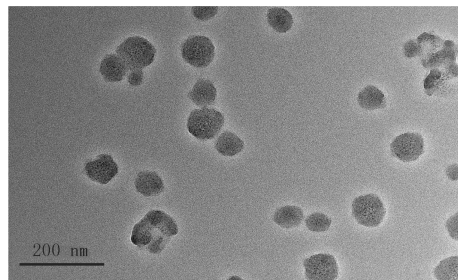


图8 OSR脂质体透射电镜图

Fig.8 Transmission electron micrograph of OSR liposome

的 DSC 图(b 线)出现多个吸热峰;OSR(c 线)在 96.5 °C 时出现一个熔点峰,在 225.5 °C 时出现一个放热峰;对比 CHO, LHP 和 OSR 的 DSC 图可以发现,药物与两者的物理混合物的 DSC 图(d 线)是三者的简单叠加,说明药物与 CHO 和 LHP 的物理混合物不能形成脂质体;OSR 脂质体(e 线)在 204.8 °C 附近出现新的放热峰,在 228.2 °C 附近出现新的吸热峰,说明形成新物质,不是简单的物料叠加,证明生成了 OSR 脂质体^[8].

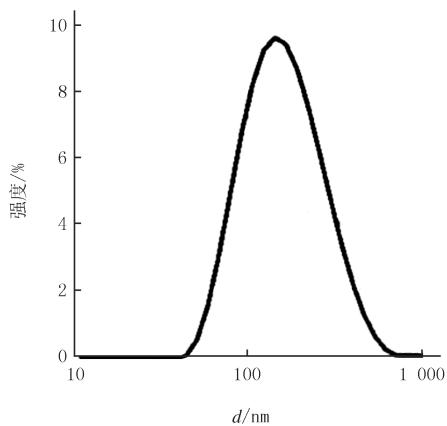


图9 OSR脂质体粒径分布

Fig.9 Particle size distribution of OSR liposomes

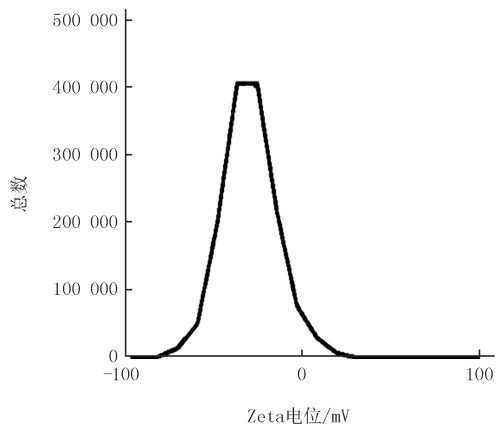


图10 OSR脂质体Zeta电位

Fig.10 Zeta potential of OSR liposomes

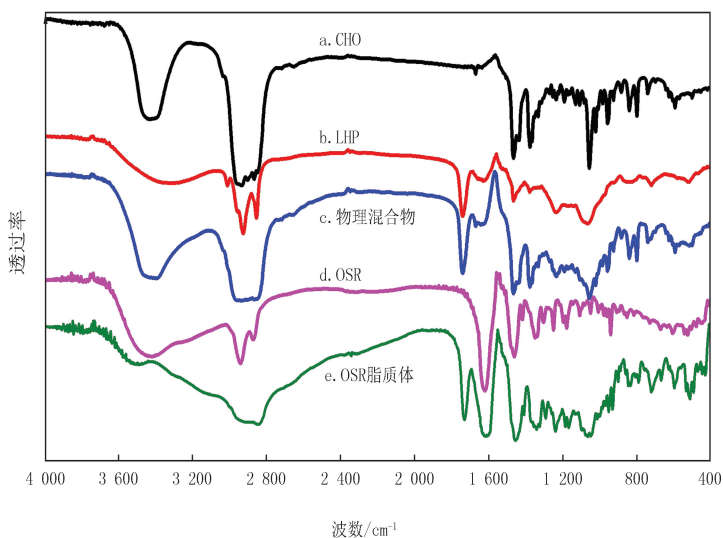


图11 红外光谱分析图

Fig.11 The analysis of infrared spectra

3 结 论

采用单因素实验法,剖析 OSR 脂质体制备过程中辅料用量的影响,采用 Box-Behnken 响应面设计实验,剖析多个因素对 OSR 脂质体的共同的影响,优化了 OSR 脂质体的制备工艺.单因素实验与响应面实验设计相结合,具有预测性好的优点,优于只能分析离散型数据的正交实验设计.单因素实验结合 Box-Behnken 响应面实验,采用线性模型,求得回归方程,通过合理预测得出最佳工艺条件.OSR 的最佳制备工艺为:大豆卵磷脂与胆固醇的质量比为 10 : 3.09、大豆卵磷脂与药物的质量比为 10 : 1.54、水合时间为 1.46 h.制备的 OSR 脂质体的外观成类球形,平均粒径为 154.1 nm,分散系数为 0.329,平均包封率为 58.02% (RSD 为 1.63%),平均载药量为 6.27% (RSD 为 1.52%),Zeta 电位为 -29.9 mV,采用红外光谱法、差示扫描量热分析等表征法证明了 OSR 脂质体的形成.采用预测的最佳工艺制备的 OSR 脂质体,粒径较小, PDI 值较低,脂质体分散性好, Zeta 电位绝对

值较高,不易发生沉淀,说明优化的 OSR 脂质体制备方法稳定可靠。

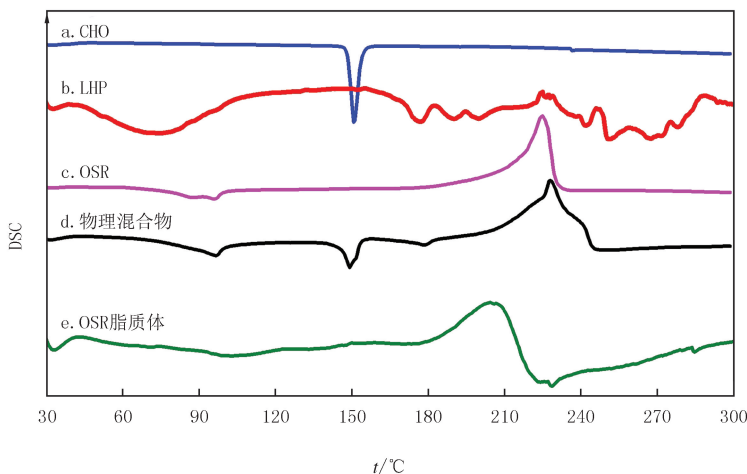


图12 差示扫描量热分析图

Fig.12 The analysis of differential scanning calorimetry

参 考 文 献

- [1] JIN S J, YANG Y, MA L, et al. In vivo and in vitro induction of the apoptotic effects of oxysophoridine on colorectal cancer cells via the Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling pathway[J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(6): 8000-8006.
- [2] 马建军, 程绚丽. 槐定碱、氧化槐定碱的药理作用研究进展[J]. *养生保健指南*, 2019(5): 225.
MA J J, CHENG X L. Research progress on the pharmacological effects of sophoridine and oxysophoridine[J]. *Health Guide*, 2019(5): 225.
- [3] ZHANG Y N, ZHANG Q Y, LI X D, et al. Gemcitabine, lycorine and oxysophoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 1170-1173.
- [4] 余建强. 槐定碱、氧化槐定碱中枢药理作用及机制的研究[D]. 银川: 宁夏医学院, 2005.
YU J Q. The effect and mechanism of sophoridine and oxysophoridine on central nervous system[D]. Yinchuan: Ningxia Medical College, 2005.
- [5] 张军帅, 赵斌, 龙伟, 等. 氧化槐定碱冻干粉针剂的制备及质量控制[J]. *中国药师*, 2011, 14(9): 1308-1310.
ZHANG J S, ZHAO B, LONG W, et al. Preparation and quality control of oxysophoridine freeze-dried powder injection[J]. *China Pharmacist*, 2011, 14(9): 1308-1310.
- [6] HAN B, YANG Y, CHEN J L, et al. Preparation, characterization, and pharmacokinetic study of a novel long-acting targeted paclitaxel liposome with antitumor activity[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 553-571.
- [7] AL-AMIN M D, BELLATO F, MASTROTTO F, et al. Dexamethasone loaded liposomes by thin-film hydration and microfluidic procedures: formulation challenges[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): 1611.
- [8] 张小雯, 孙敬蒙, 汪卓明, 等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 响应面法优化马来酸桂哌齐特脂质体的制备及表征[J]. *医药导报*, 2021, 40(2): 240-247.
ZHANG X W, SUN J M, WANG Z M, et al. Optimization of preparation and characterization of cinepazide maleate liposomes by plackett-burman combined with Box-Behnken response surface method[J]. *Herald of Medicine*, 2021, 40(2): 240-247.
- [9] 马瑞丽, 杨东亮, 赵宇郁, 等. 布地奈德脂质体制备工艺优选及质量评价[J]. *中南药学*, 2021, 19(4): 593-598.
MA R L, YANG D L, ZHAO Y Y, et al. Preparation optimization and quality evaluation of budesonide liposomes[J]. *Central South Pharmacy*, 2021, 19(4): 593-598.
- [10] 文友民, 纪红燕, 邓宁, 等. HPLC-UV 测定大鼠血浆中氧化槐定碱含量及其药代动力学研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(9): 1449-1453.
WEN Y M, JI H Y, DENG N, et al. Determination of oxysophoridine in rats plasma by HPLC-UV and investigation its pharmacokinetics [J]. *Natural Product Research and Development*, 2016, 28(9): 1449-1453.
- [11] 王虹. 槐定碱缓释微球的制备与评价[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2015.
WANG H. Preparation and evaluation of sophoridine sustained-release microspheres[D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2015.
- [12] 马玲, 王俊卿, 田杰, 等. HPLC 同时测定苦苣草中 7 种生物碱的含量[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(11): 1483-1486.
MA L, WANG J Q, TIAN J, et al. Simultaneous determination of 7 alkaloid in Herba Sophorae Alopecuroidis by HPLC[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(11): 1483-1486.

- [13] 王立英,刘雨萌,吴丽艳,等.藤黄酸长循环脂质体制备及药动学研究[J].中草药,2016,47(8):1309-1314.
WANG L Y,LIU Y M,WU L Y,et al.Preparation and pharmacokinetics of gambogic acid long-circulating liposomes[J].Chinese Traditional and Herbal Drugs,2016,47(8):1309-1314.
- [14] KHATIB I,CHOW M Y T,RUAN J F,et al.Modeling of a spray drying method to produce ciprofloxacin nanocrystals inside the liposomes utilizing a response surface methodology:Box-Behnken experimental design[J].International Journal of Pharmaceutics,2021,597:120277.
- [15] JAIN A,HURKAT P,JAIN S K.Development of liposomes using formulation by design:Basics to recent advances[J].Chemistry and Physics of Lipids,2019,224:104764.

Optimization of preparation and characterization of oxysophoridine liposomes by response surface methodology

Guo Liucheng, Du Liyue, Feng Huihui, Gao Xiaoxiao, Cui Fengling

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Taking the encapsulation rate as an evaluation index, single factor experiment and Box-Behnken response surface design method were used to optimize the preparation process of oxysophoridine liposomes. The oxysophoridine liposomes was characterized by transmission electron microscopy, particle size, encapsulation efficiency, drug loading, Zeta potential, infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry and so on. The best preparation process of the oxysophoridine liposomes were that the mass ratio of soybean lecithin to cholesterol was 10 : 3.09, the mass ratio of soybean lecithin to drug was 10 : 1.54, and the hydration time was 1.46 h. The characterization results of oxysophoridine liposomes was that the average particle size was 154.1 nm, the dispersion coefficient was 0.329, the average encapsulation efficiency was 58.02% (*RSD* 1.63%), the average drug loading was 6.27% (*RSD* 1.52%), and Zeta potential was -29.9 mV. It has been verified that the optimal preparation process of the oxysophoridine liposomes was stable and feasible. And the characterization of oxysophoridine liposomes shows that the appearance was spherical, the particle size distribution was relatively uniform, the liposomes suspension was stable, and should not be flocculated.

Keywords: oxysophoridine; liposomes; response surface methodology; characterization

[责任编辑 赵晓华 陈留院]