

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0200-07

# 响应面法优化苦参碱类生物碱传递体制备工艺

王 爽<sup>1</sup>, 张春磊<sup>1</sup>, 徐 馨<sup>2\*</sup><sup>1</sup> 黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319; <sup>2</sup> 黑龙江省兽医科学研究所, 齐齐哈尔 161005

**摘要:**以苦参碱类生物碱为模型药物进行处方筛选和工艺研究,研制出同时包载四元苦参碱类生物碱的传递体,其最佳处方为磷脂质量浓度2.75%,磷脂比为3:1,1,2-丙二醇质量浓度为0.5%,水合时间为34.4 min,经验证试验测得该传递体的包封率为81.15±1.63%,各指标实测值与预测值偏差较小,说明预测模型可靠性较高。响应面法用于该传递体制备工艺的优化可行可靠,制备工艺条件适宜便捷。

**关键词:**苦参碱类生物碱;逆相蒸发法;传递体;包封率;响应面法

中图分类号:R944.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.031

## Optimization of *Sophora flavescens Ait.* Alkaloids Transfersomes by Reverse Evaporation Method

WANG Shuang<sup>1</sup>, ZHANG Chun-lei<sup>1</sup>, XU Xin<sup>2\*</sup><sup>1</sup> Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China;<sup>2</sup> Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar 161005, China

**Abstract:** In order to prepare drug loading transfersomes (*Sophora flavescens Ait.* alkaloids nano-liposomes) with *Sophora flavescens Ait.* alkaloids, as model, and to optimize their preparation technology. The optimal technology conditions of the transfersomes are as follows: phospholipid concentration is 2.75%, the ratio of PC/CH is 3:1, 1,2-Propanediol concentration is 0.5%, and aquation time is 34.4min. The results show that the encapsulation efficiency of the transfersomes are (81.15±1.63)% (n=3) under the verification test. And there are small deviations between the measured values of index and model predicted values. It shows that the response surface analytical method is reliable and can be used in the process of prescription optimization, and the technique of preparing the *Sophora flavescens Ait.* Alkaloids transfersomes is feasible, convenient and reliable in quality.

**Key words:** *Sophora flavescens Ait.* Alkaloids; reverse evaporation method; transfersomes; embedding ratio; response surface methodology

苦参碱类生物碱是广泛存在于豆科植物苦参、苦豆子和广豆根中的一类喹诺里西啶类生物碱的总称。其中药理效果突出且含量较高的苦参碱(MAT)、氧化苦参碱(OMT)、槐果碱(SC)和氧化槐果碱(OSC)4种苦参碱类生物碱单体纯品<sup>[1-3]</sup>,经处方筛选和工艺优化制备成传递体剂型<sup>[4,5]</sup>。MAT和OMT具有广谱抗菌、抗炎、抗病毒作用<sup>[6-8]</sup>,辅以消炎镇痛作用的SC以抑制急性渗出性炎症,缓和疼痛<sup>[9-11]</sup>。添加抗皮肤真菌、升白、升免的OSC<sup>[12]</sup>,以杀灭真菌、提高白细胞含量,加强机体免疫力。4种苦参碱类生物碱单体联合应用,发挥抗菌、抗炎、抗

病毒、抗真菌、抑制急性渗出性炎症,缓和患牛疼痛,提高白细胞含量,加强机体免疫力的功能。

传递体将药物包裹于其双分子层结构中<sup>[13,14]</sup>,能够克服奶牛皮肤角质层的屏障作用<sup>[15]</sup>,将药物输送进真皮层,形成药物贮库,再进而进入血液、细胞内,并富集于乳腺网状内皮系统中,发挥局部靶向给药的有益效果。其膜优越的柔顺性和变形性,更小的粒径,易于通过皮肤上的微孔道而携带药物穿过皮肤。其对药物的包封率高于普通脂质体,稳定性也远优于普通脂质体与非离子型囊泡<sup>[16]</sup>。传递体已被多次证明可提高药物在靶位的累积浓度<sup>[17]</sup>,提高药物的治疗指数<sup>[18]</sup>。大幅改善奶牛生存质量,提升食品安全系数。奶中无抗,无药物残留。

本文以包封率为指标,采用Box-Behnken响应面法以较少的试验次数和较短的时耗,全面有效地

优化了苦参碱类生物碱传递体的处方工艺参数。其研究结果为苦参碱类生物碱经皮给药传输系统的研制提供借鉴,为传递体制剂开发提供依据。

## 1 仪器与材料

仪器:Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦)、UV-160A 型紫外分光光度仪(日本岛津);RE-2000A 旋转蒸发仪(巩义予华);高速台式离心机(长沙湘仪)。

试药:苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱(纯度≥95%,黑龙江省兽医科学研究所制);苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所,110805-200508);胆固醇(上海山浦化工有限公司);大豆卵磷脂(天津市科密欧化学试剂开发中心);丙二醇(南京化学试剂股份有限公司);乙腈(色谱纯),其它试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 苦参碱类生物碱四元传递体的制备

采用逆相蒸发法制备苦参碱类生物碱四元传递体。首先精密移取处方量的大豆卵磷脂和胆固醇置于茄形瓶中,以无水乙醇溶解。另精密称取处方量的苦参碱类生物碱(包括 MAT、OMT、SC、OSC)和 1,2-丙二醇,以适量的磷酸盐缓冲液溶解均匀,再与上述乙醇溶液混合,探头式超声处理 10 s 使之形成 W/O 型乳剂后,以旋转蒸发仪 40 °C 水浴条件下<sup>[19]</sup>减压旋蒸挥除有机溶剂,直至瓶壁内形成均匀的脂

质膜。再以适量磷酸盐缓冲液水合,于冰水浴中探头超声 30 s 后,连续通过 0.22 μm 微孔滤膜 2 次,即得苦参碱类生物碱四元传递体混悬液,置于 4 °C 冰箱保存。

### 2.2 包封率的测定方法

采用高速离心法分离游离药物,并以高效液相色谱法检测药物浓度,计算包封率。移取适量苦参碱类生物碱传递体混悬液置于 Amicon Ultra 离心超滤管的截留管中,以 5 000 rpm 的速度离心 15 min,取存在于外管中含游离药物的超滤液。以 HPLC 法测得游离药物浓度,并计算游离药物含量(T)。按照以下公式计算包封率:

$$\text{包封率 } E\% = (F-T)/F \times 100\%$$

其中 F 为实际投料量,T 为超滤液中游离药物含量。

### 2.3 二次回归正交旋转组合设计优化传递体制备工艺

为了综合考察处方因素对苦参碱类生物碱四元传递体包封率的影响,以磷脂浓度( $X_1$ )、磷脂 PC-胆固醇 CH 用量比( $X_2$ )、1,2-丙二醇浓度( $X_3$ )和水合时间( $X_4$ )为处方制备苦参碱类四元传递体。通过预实验结果分析确定各因素的水平,选择包封率为目标值,采用四因素五水平的二次回归正交旋转组合设计进行参数优化。其参试因子及其水平设置、编码见表 1。实验设计矩阵见表 2。采用统计软件 SAS 9.0 进行统计分析,从而确定得到高包封率的最佳工艺参数。

表 1 实验因素和水平

Table 1 Experimental factors and levels

水平 Levels	因素 Factors			
	$X_1$ 磷脂浓度 Phospholipid concentration(%)	$X_2$ PC-CH 用量比 Ratio of PC(CH)	$X_3$ 1,2-丙二醇浓度 1,2-Propanediol concentration(%)	$X_4$ 水合时间 Aquatation time(min)
-2	2.00	2:1	0.2	20
1	2.25	3:1	0.3	30
0	2.50	4:1	0.4	40
1	2.75	5:1	0.5	50
2	3.00	6:1	0.6	60

## 3 结果

### 3.1 数学模型

按照表 2 的设计进行实验,根据表 2 的结果,建立的四元五次回归方程描述了不同包封条件与包封

率之间的关系,得到如下回归方程:

$$Y = -108.67083 + 86.00000 \times X_1 + 4.14167 \times X_2 + 143.33333 \times X_3 + 1.26167 \times X_4 - 1.17500 \times X_1 \cdot X_2 - 11.75000 \times X_1 \cdot X_3 - 0.10250 \times X_1 \cdot X_4 + 1.68750 \times X_2 \cdot X_3 + 0.018125 \times X_2 \cdot X_4 - 0.24375 \times X_3 \cdot X_4 -$$

$12.38333 \times X_1^2 - 0.43646 \times X_2^2 - 99.89583 \times X_3^2 - 0.013240 \times X_4^2$ , 回归方差分析见表 3。

表 2 实验设计矩阵及包封率

Table 2 The matrix of experimental design and the encapsulation efficiency

处理 Processing	$X_1$ 磷脂浓度 Phospholipid concentration (%)	$X_2$ PC-CH 用量比 Ratio of PC( CH)	$X_3$ 1,2-丙二醇浓度 1,2-Propanediol concentration (%)	$X_4$ 水合时间 Aquatation time (min)	包封率 Encapsulation efficiency (%)
1	-1	-1	-1	-1	67.8
2	-1	-1	-1	1	66.6
3	-1	-1	1	-1	75.7
4	-1	-1	1	1	73.0
5	-1	1	-1	-1	66.1
6	-1	1	-1	1	67.8
7	-1	1	1	-1	74.8
8	-1	1	1	1	73.1
9	1	-1	-1	-1	75.7
10	1	-1	-1	1	73.0
11	1	-1	1	-1	79.9
12	1	-1	1	1	79.1
13	1	1	-1	-1	73.0
14	1	1	-1	1	71.2
15	1	1	1	-1	80.1
16	1	1	1	1	77.4
17	-2	0	0	0	69.6
18	2	0	0	0	79.1
19	0	-2	0	0	79.2
20	0	2	0	0	72.2
21	0	0	-2	0	67.8
22	0	0	2	0	79.1
23	0	0	0	-2	73.9
24	0	0	0	2	70.4
25	0	0	0	0	76.6
26	0	0	0	0	78.3
27	0	0	0	0	76.5
28	0	0	0	0	77.4
29	0	0	0	0	76.7
30	0	0	0	0	76.5

### 3.2 模型显著性检验

实验设计方差分析表见表 3。经 SAS 软件分析,模型显著性检验  $F = 13.33, P < 0.05$ , 说明该模型具有统计学意义,决定系数  $R^2 = 0.9613$ ,调整后的  $Adj. R^2 = 0.9251$ ,均较高,说明回归方程拟合度

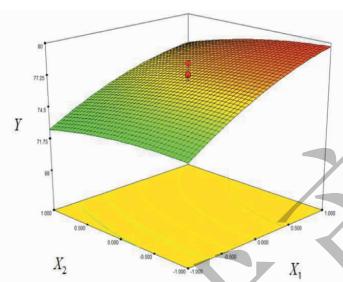
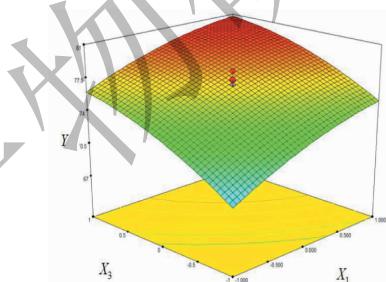
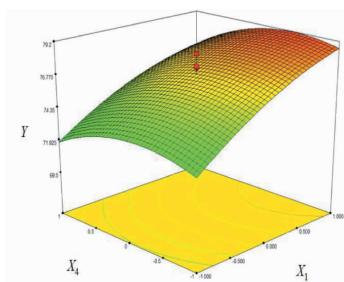
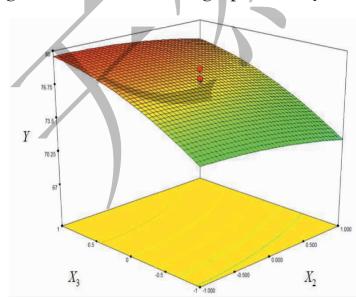
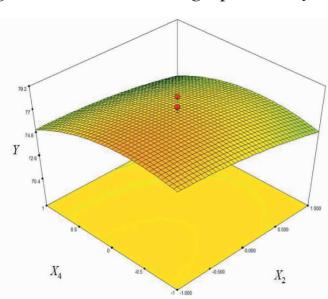
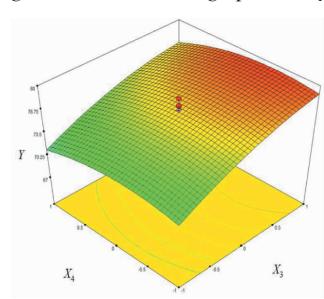
好。其中  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_1^2, X_3^2, X_4^2$  对方程影响显著。

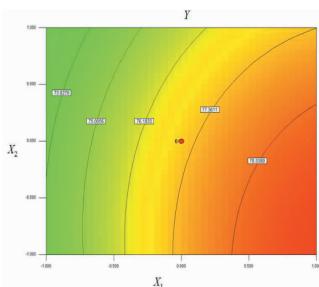
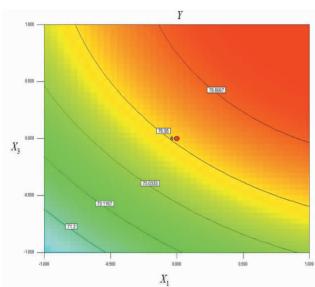
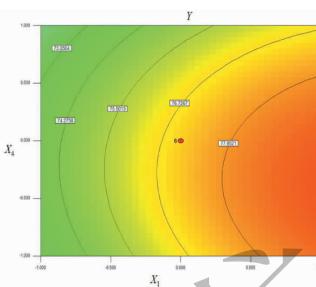
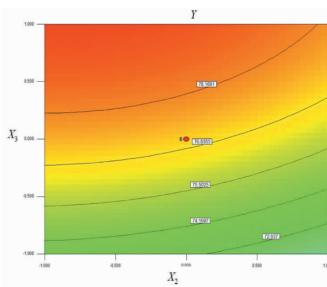
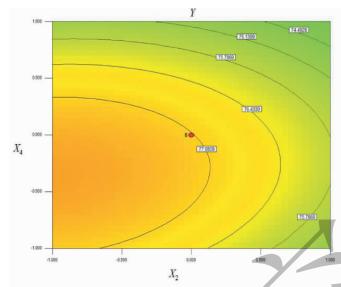
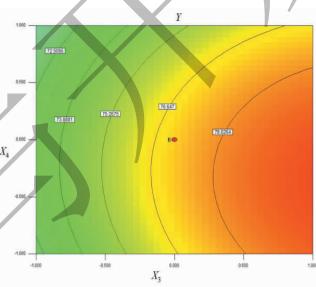
各因素与指标之间的响应面 3D 效果图为图 1-图 6,等高线图为图 7-图 12,可见 4 个因素对指标的影响。

表 3 二次回归正交旋转组合设计实验方差分析表

Table 3 The variance analysis table of quadratic regression rotation combination design

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F 值 F Value	P 值 P-value
Model	512.14	14	36.58	26.59	<0.0001
$X_1$	168.01	1	168.01	122.12	<0.0001
$X_2$	18.9	1	18.9	13.74	0.0021
$X_3$	231.26	1	231.26	168.09	<0.0001
$X_4$	14.88	1	14.88	10.82	0.005
$X_1 \cdot X_2$	1.38	1	1.38	1	0.3324
$X_1 \cdot X_3$	1.38	1	1.38	1	0.3324
$X_1 \cdot X_4$	1.05	1	1.05	0.76	0.396
$X_2 \cdot X_3$	0.46	1	0.46	0.33	0.5735
$X_2 \cdot X_4$	0.53	1	0.53	0.38	0.5458
$X_3 \cdot X_4$	0.95	1	0.95	0.69	0.4189
$X_{12}$	16.43	1	16.43	11.94	0.0035
$X_{22}$	5.23	1	5.23	3.8	0.0703
$X_{32}$	27.37	1	27.37	19.89	0.0005
$X_4^2$	48.08	1	48.08	34.95	<0.0001
Pure Error	2.58	5	0.52		
Cor Total	532.78	29			

图 1  $X_1$  与  $X_2$  的 3D 效果图图 2  $X_1$  与  $X_3$  的 3D 效果图图 3  $X_1$  与  $X_4$  的 3D 效果图Fig. 1 The 3D effect graphs of  $X_1$  and  $X_2$ Fig. 2 The 3D effect graphs of  $X_1$  and  $X_3$ Fig. 3 The 3D effect graphs of  $X_1$  and  $X_4$ 图 4  $X_2$  与  $X_3$  的 3D 效果图图 5  $X_2$  与  $X_4$  的 3D 效果图图 6  $X_3$  与  $X_4$  的 3D 效果图Fig. 4 The 3D effect graphs of  $X_1$  and  $X_2$ Fig. 5 The 3D effect graphs of  $X_1$  and  $X_2$ Fig. 6 The 3D effect graphs of  $X_1$  and  $X_2$

图 7  $X_1$  与  $X_2$  的等高线图Fig. 7 The contour plot of  $X_1$  and  $X_2$ 图 8  $X_1$  与  $X_3$  的等高线图Fig. 8 The contour plot of  $X_1$  and  $X_3$ 图 9  $X_1$  与  $X_4$  的等高线图Fig. 9 The contour plot of  $X_1$  and  $X_4$ 图 10  $X_2$  与  $X_3$  的等高线图Fig. 10 The contour plot of  $X_2$  and  $X_3$ 图 11  $X_1$  与  $X_4$  的等高线图Fig. 11 The contour plot of  $X_1$  and  $X_4$ 图 12  $X_3$  与  $X_4$  的等高线图Fig. 12 The contour plot of  $X_3$  and  $X_4$ 

### 3.3 最优包封工艺

利用最速下降法进行最优值预测,得到的最优处方为:当  $X_1$  磷脂浓度(%)选择 2.75%,  $X_2$  磷脂-胆固醇用量比选择 3:1,  $X_3$  丙二醇浓度(%)选择 0.5% 时,  $X_4$  水合时间(min)选择 34.4 min 时,  $Y$ (包封率)预测最大值为 81.77%。

通过工艺验证,按照最优处方制备三批苦参碱类生物碱四元传递体,针对包封率进行测定和计算,并计算偏差,得出平均包封率为  $(81.15 \pm 1.63)\%$ ,较预测值略低,实验误差小于 5%,说明模型可靠。注:偏差/% = (预测值-实际值)/预测值 × 100%。

## 4 结论

亲脂性强的药物分布在传递体的油相易得到高的包封率,亲水性强的药物分布在水相易得高的包封率。而本制剂所用苦参碱类生物碱系两亲性药物,在本制剂制备物系的油相和水相都有一定的溶解度,而容易穿膜而发生泄漏,造成包封率不高。因而在制备本制剂过程中,首先将药物溶于水相,再包裹于磷脂双层膜中,有利于降低对包封效果的不利影响。也因为氧化苦参碱分子极性比苦参碱更高,且药物中以氧化苦参碱处方量最高,因而以水相溶解药物也更为适宜。

本文选择逆向蒸发法制备包裹水溶性药物的传递体更有利于得到包封率高、稳定性好的苦参碱类生物碱传递体混悬液<sup>[4]</sup>。

包封率测定的方法很多,透析法耗时且长时间透析过程药物极易渗漏;凝胶柱过滤和微柱过滤也存在耗时问题,且洗脱液的流速也难于控制;超滤法容易堵塞超滤膜,阻碍药物被离心下来。故采用操作简捷的高速离心法测定苦参碱类生物碱四元传递体的包封率。

本实验设计将四元苦参碱类生物碱载入传递体以提高经皮给药的生物利用度,并在单因素实验基础上,利用二次回归正交旋转组合设计试验对苦参碱类生物碱传递体的制备进行整体设计、综合比较、统计分析实现通过较少的试验次数研判出适宜于本物系最好的生产条件,得到了最优工艺参数,达到了最优生产工艺效果。

磷脂浓度对包封率影响较大。单因素试验中磷脂浓度在 2.5% 范围内,包封率与磷脂的用量成正比,而磷脂用量超过 2.5% 后,其包封率几乎不再增加。经响应面优化试验,最终确定适宜于本物系的最优磷脂浓度为 2.75%。

改变传递体中苦参碱和氧化苦参碱的组成比例,药物相互之间对包封率无显著影响( $P > 0.05$ ),

故本试验没有考察药脂比这一因素,而考察了对包封率的影响较大的磷脂与胆固醇比例,经单因素试验发现此比例过大过小都不利于包封效果,这是由于胆固醇这一两亲性物质嵌入到磷脂分子中会改变脂质双分子层膜的有序性和流动性,此比例过大时,则因胆固醇分布不均,增加了脂质双分子层的不对称性,导致包封率较低。而此比例过小时,则因胆固醇较强的聚合力致使膜不稳定,使药物的渗漏量增加、包封率降低。经响应面优化试验,最终确定适宜于本物系的最优磷脂与胆固醇比为3:1。

表面活性剂可以起到边缘活性剂的作用软化磷脂膜,增加脂质体的变形性。其中以丙二醇为柔软剂的柔性脂质体具有更优越的稳定性和包封率,故本研究选择以丙二醇为柔软剂制备苦参碱类生物碱传递体。且1,2-丙二醇用量过高,会使得传递体结构被破坏而转变为混合胶束,导致传递体变形性降低,从而致使透皮能力和包封率均下降而用量过低则起不到柔软剂的作用,在本物系中,1,2-丙二醇取浓度为0.5%,可使得本制剂有最高的包封率。

对于影响包封率的制备工艺因素:制备方法、水合温度和水合时间,本文首先从常用制备方法(薄膜分散法、薄膜超声法、逆相薄膜蒸发法、逆向挤出冻干法)中优选了对本药物包封率高、仪器简单,制备方法简易,所用溶剂相对对环境和操作人员污染小,且可回收利用,缩减成本的逆相薄膜蒸发法<sup>[4]</sup>,且经单因素试验本文固化了取得高包封率的适宜水合温度40℃,然后将水合时间作为考察因素经试验得出最适水合时间为34.4 min。

此外还有超临界溶液快速膨胀法(RESS)、超临界反溶剂法(SAS)和超临界流体逆向蒸发法(SCRPE)、双不对称离心技术、膜接触器技术等高新技术已在传递体制备领域有初试成功的案例,制备的传递体或脂质体粒径均匀、粒径小,操作简单,甚至无需有机溶剂,药物包封率更高。这些新技术有待进一步开发应用。

## 参考文献

- Ji XW(季晓雯), Zhang GW(张国伟). Pharmacological effects and clinical applications of sophora alkaloids[J]. *Med Res Edu*(医学研究与教育), 2014, 31(6):85-88 +99.
- Zhan BY(战渤玉), Li DX(李东霞), Gao M(高明). Modern research progress of Sophora flavescens[J]. *Infor Tradit Chin Med*(中医药信息), 2009, 26(1):23-24.
- Zhang JQ, Li YM, Liu T, et al. Antitumor effect of matrine in human hepatoma G2 cells by inducing apoptosis and autophagy[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16:4281-4290.
- Xu X(徐馨), Zhou QM(周庆民), Feng WY(冯万宇), et al. Comparative study on preparation of matrine alkaloid transporter by thin film dispersion and reverse evaporation [J]. *Mod Agri*(现代化农业), 2016, 12:46-47.
- Xu X(徐馨), Zhou QM(周庆民), Feng WY(冯万宇), et al. Preparation and stability evaluation of matrine alkaloid transporter gel[J]. *Mod Agri*(现代化农业), 2017, 12:46-47.
- Li Q(李屹), Zhang LN(张丽楠), Yang L(杨磊). Advances in pharmacological effects of Matrine[J]. *J Prac Chin Med*(实用中医药杂志), 2012, 28:423-424.
- Xue AH(薛爱华), Song WJ(宋文静). Survey of pharmacological action of Matrine[J]. *Tianjin Pharm*(天津药学), 2010, 22(5):62.
- Yang YP(杨钰萍), Shen XC(沈祥春). Research progress on pharmacological effects of oxymatrine[J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2009, 29:405-407.
- Feng CL(冯春玲), She CB(余桂柏), Liu DM(刘冬敏), et al. Pharmacokinetics of Sophora and Sophora alkaloids[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2009, 18:759-762.
- Wang Y(王永). Anti-inflammatory and anti-parasitic effects of Sophora alkaloids[D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University(内蒙古农业大学), 2004.
- Li CM(李春梅), Li GS(李桂生), Li M(李敏), et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of Sophora alkaloids[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2008, 19: 947-948.
- Yang QE(杨清娥), Zhang HL(张宏利), Han CX(韩崇选), et al. Study on extraction and separation technology of oxysophacine and its toxicity[J]. *J Northwest Forestry College*(西北林学院学报), 2006, 21:111-113.
- Zhao N(赵宁), Li WZ(李伟泽). Preparation of matrine nano flexible liposomes and determination of entrapment efficiency[J]. *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2016, 38: 444-446.
- Barichello J M, Handa H, Kisayku M, et al. Inducing effect of liposomalization on the transdermal delivery of hydrocortisone; Creation of a drug supersaturated state[J]. *J Controlled Release*, 2006, 115:94-102.
- Verma DD, Verma S, Blume G, et al. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin:a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 55:271-277.

(下转第113页)