

# 星点设计-响应面法优化石杉碱甲二元醇质体处方及其理化性质考察

冯连晶<sup>1</sup>, 陈筱瑜<sup>2</sup>, 黄庆德<sup>1\*</sup>, 陈丹<sup>1</sup>(1.福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2.福建卫生职业技术学院药学院, 福州 350101)

**摘要:** 目的 优化石杉碱甲二元醇质体的处方, 并对其理化性质进行考察。方法 采用注入法制备石杉碱甲二元醇质体。以卵磷脂含量( $X_1$ )、无水乙醇含量( $X_2$ )、混合醇含量( $X_3$ )为考察因素, 以包封率( $Y_1$ )与平均粒径( $Y_2$ )为评价指标, 通过星点设计-响应面法优化醇质体处方。并考察醇质体的粒径、电位等理化性质。结果 优选的处方为卵磷脂含量 3.60%, 无水乙醇含量 22.50%, 混合醇含量 45.00%, 在此条件下, 石杉碱甲二元醇质体的平均包封率为 $(94.05 \pm 0.22)\%$ , 平均粒径为 $(260.1 \pm 5.7)\text{nm}$ , Zeta 电位为 $(-20.9 \pm 0.3)\text{mV}$ , PDI 值为 $0.188 \pm 0.056$ 。结论 星点设计-响应面法建立的响应方程具有较好的预测性, 可用于石杉碱甲二元醇质体处方的优化, 所得二元醇质体性质稳定。

**关键词:** 石杉碱甲; 二元醇质体; 处方优化; 星点设计-响应面法

中图分类号: R283.6

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)02-0181-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.02.007

引用本文: 冯连晶, 陈筱瑜, 黄庆德, 等. 星点设计-响应面法优化石杉碱甲二元醇质体处方及其理化性质考察[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(2): 181-186.

## Optimization of the Formulation of Huperzine A Binary Ethosomes by Central Composite Design-response Surface Methodology and Its Physicochemical Properties

FENG Lianjing<sup>1</sup>, CHEN Xiaoyu<sup>2</sup>, HUANG Qingde<sup>1\*</sup>, CHEN Dan<sup>1</sup>(1.School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2.Department of Pharmacy, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To optimize the formulation of huperzine A binary ethosomes and investigate its physicochemical properties. **METHODS** The injection method was used to prepare huperzine A binary ethosomes. Taking lecithin content( $X_1$ ), absolute ethanol content( $X_2$ ) and mixed alcohol content( $X_3$ ) as the inspection factors, central composite design-response surface method and overall desirability were used to optimize the formulation with the encapsulation efficiency( $Y_1$ ) and average particle size( $Y_2$ ) as evaluation indicators. The physicochemical properties of ethosomes such as particle size and potential were investigated. **RESULTS** The optimum preparation of formulation were the lecithin content of 3.60%, the absolute ethanol content of 22.50% and the mixed alcohol content of 45.00%. Under these conditions, the average encapsulation efficiency was  $(94.05 \pm 0.22)\%$ , the average particle size was  $(260.1 \pm 5.7)\text{nm}$ , the Zeta potential was  $(-20.9 \pm 0.3)\text{mV}$  and the PDI was  $0.188 \pm 0.056$ . **CONCLUSION** The response equation established by central composite design-response surface method has good predictability, and can be used to optimize the formulation of huperzine A binary ethosomes. The obtained ethosomes have stable properties.

**KEYWORDS:** huperzine A; binary ethosomes; prescription optimization; central composite design-response surface method

石杉碱甲是民间草药千层塔[蛇足石杉, *Huperzia serrata*(Thunb. ex Murray) Trev.]中分离得到的一种石松类生物碱, 是一种有效的、竞争性的、可逆性的乙酰胆碱酯酶抑制剂<sup>[1]</sup>, 常用于防止内源性乙酰胆碱受到乙酰胆碱酯酶的降解, 从而增加乙酰胆碱的含量, 增强阿尔茨海默病患者的记忆功能<sup>[2-3]</sup>。目前上市的石杉碱甲制剂仅有片剂、胶囊剂和注射剂, 虽然石杉碱甲易透过血脑屏障, 但由于这些剂型缺乏脑选择性, 不良反应会随剂量增大而增加。醇质体由磷脂、乙醇和水组成,

是一种多层囊泡结构, 其双分子层流动性较高, 易于变形可穿透皮肤屏障。二元醇质体是用混合醇(乙醇、丙二醇)替换单一的乙醇制备醇质体, 与普通醇质体比较, 可以减少乙醇用量, 避免药物泄露, 防止醇质体间的聚集, 增加制剂的稳定性及降低对皮肤(黏膜)的刺激性, 并且可以发挥两者促进透皮吸收的协同作用, 在一定程度上也增加了药物的透皮(黏膜)吸收效果<sup>[4-6]</sup>, 研究表明, 栀子苷醇质体对猪鼻腔黏膜的单位面积渗透量是其普通脂质体的 2.17 倍、水溶液的 11.03 倍, 且基

基金项目: 福建省科技厅引导性项目(2018Y0050)

作者简介: 冯连晶, 女, 硕士 E-mail: 1011829497@qq.com

\*通信作者: 黄庆德, 男, 硕士, 教授 E-mail: hqduang@163.com

本无鼻黏膜纤毛毒性<sup>[7]</sup>。为提高石杉碱甲经鼻腔给药的靶向性和生物利用度,拟将石杉碱甲制成透膜性好的二元醇质体。本研究以包封率和平均粒径为评价指标,采用星点设计-响应面法优化石杉碱甲二元醇质体处方,为后期的制剂研究提供实验数据。

## 1 仪器与试药

LC-20A 高效液相色谱仪、SPD-M20A PDA 检测器(日本岛津公司);YU-1901 双光束紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);MPLR-702 恒温磁力搅拌器(常州市金坛大地自动化仪器厂);BT100-1F 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);STARTER3100 PH 酸度计(美国 OHAUS 公司);FA2004N 万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司);XS205 十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];NICOMP 380ZLS 纳米粒度及电位分析仪(美国 PSS 粒度仪公司);H7650 透射电子显微镜(HITACHI 有限公司);UFC5003BK 超滤离心管(美国 Merck Millipore 公司);Centrifuge 5418 高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

石杉碱甲对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:H29D8J51963;纯度 $\geq 98\%$ );石杉碱甲原料药(西安普莱特生物工程有限公司,批号:HA20191102;纯度:99%);大豆卵磷脂[艾伟拓(上海)医药科技有限公司,批号:SY-SI-190602];聚山梨酯-80(上海源叶生物科技有限公司,批号:Z17D9Y77731);磷酸二氢钾(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C10419856);磷酸、无水乙醇、丙二醇、甲醇、乙腈均购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水;甲醇、乙腈均为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 石杉碱甲二元醇质体的制备

准确称取处方量的石杉碱甲、大豆卵磷脂、聚山梨酯-80,量取一定比例的二元醇相(乙醇:丙二醇),置于锥形瓶中,密闭条件下搅拌 20 min 至完全溶解。在 $(30\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 、搅拌速度为  $700\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下,将处方量的超纯水以  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度缓慢加入到上述含药二元醇体系溶液中,结束后持续搅拌 90 min,冷却至室温,即得石杉碱甲二元醇质体,4 $^{\circ}\text{C}$  条件下保存。同法制备空白二元醇质体。

### 2.2 石杉碱甲含量测定

**2.2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为 0.02 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾缓冲溶液(pH 值 2.5)-乙腈(88:12);检测波长 311 nm;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ;流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称量 10.0 mg 石杉碱甲对照品,置于 100 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得石杉碱甲对照品母液,备用。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密量取 1 mL 石杉碱甲二元醇质体置于 50 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解后,定容至刻度,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

**2.2.4 阴性对照溶液的制备** 精密量取 1 mL 空白二元醇质体置于 50 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解后,定容至刻度,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得阴性对照溶液。

**2.2.5 专属性试验** 将供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液分别注入高效液相色谱仪,按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录结果,色谱图见图 1。由测定结果可知,在该色谱条件下,制备二元醇质体的各辅料对石杉碱甲的含量测定无干扰,专属性好。

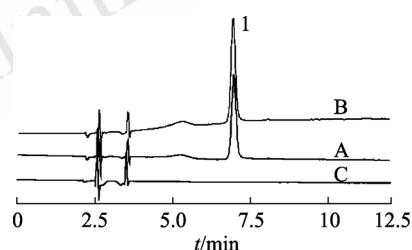


图 1 高效液相色谱图

A-供试品溶液;B-对照品溶液;C-阴性对照品溶液;1-石杉碱甲。

Fig. 1 HPLC chromatogram

A-sample solution; B-standard solution; C-negative control solution; 1-huperzine A.

**2.2.6 线性关系考察** 分别精密吸取“2.2.2”项下的对照品母液 0.05, 0.08, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得不同浓度的石杉碱甲对照品溶液,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过,按“2.2.1”项下的色谱条件进样检测,记录峰面积。以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,得线性回归方程:  $Y=17\,773X-349.24$ ,  $R^2=0.999\,9$ 。结果表明,石杉碱甲在 0.51~25.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内与峰面积呈良好的线性关系。

**2.2.7 仪器精密度试验** 精密吸取对照品母液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD 值为 0.83%,表明仪器精密度良好。

**2.2.8 重复性试验** 取同一批样品 6 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件下测定石杉碱甲的峰面积,计算药物含量和 RSD 值, RSD 值为 2.18%,表明本方法重复性良好。

**2.2.9 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别在 0, 3, 8, 13, 24, 48 h 分别进样,测定石杉碱甲的峰面积, RSD 值为 1.12%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.2.10 回收率试验** 取已知浓度的石杉碱甲二元醇质体 0.5 mL,置于 50 mL 量瓶中,分别加入石杉碱甲对照品 0.48, 0.40, 0.32 mg,各 3 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下的色谱条件测定其峰面积,计算平均回收率和 RSD 值。结果见表 1。

表 1 回收率测定结果( $n=3$ )

Tab. 1 Results of average recovery( $n=3$ )

| 序号 | 加入量/<br>mg | 已知量/<br>mg | 测定量/<br>mg | 回收率/<br>% | 平均值/<br>% | RSD/<br>% |
|----|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1  | 0.48       | 0.49       | 0.95       | 95.83     | 97.22     | 2.47      |
| 2  |            |            | 0.95       | 95.83     |           |           |
| 3  |            |            | 0.97       | 100.00    |           |           |
| 4  | 0.40       | 0.49       | 0.89       | 100.00    | 99.17     | 1.46      |
| 5  |            |            | 0.88       | 97.50     |           |           |
| 6  |            |            | 0.89       | 100.00    |           |           |
| 7  | 0.32       | 0.49       | 0.81       | 100.00    | 101.04    | 1.79      |
| 8  |            |            | 0.81       | 100.00    |           |           |
| 9  |            |            | 0.82       | 103.13    |           |           |

## 2.3 包封率的测定

**2.3.1 超滤离心法测定包封率**<sup>[8-9]</sup> 精密量取 0.5 mL 石杉碱甲二元醇质体置于 25 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解并定容至刻度,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,测定石杉碱甲含量  $W_1$ 。精密量取 0.5 mL 石杉碱甲二元醇质体置于截留分子量为 10 kDa 超滤离心管中,以 6 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 60 min,取出全部滤液,置 5 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,精密吸取续滤液 10  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件测定,计算游离石杉碱甲含量  $W_2$ 。包封率计算公式:  
 $EE(\%)=(W_1-W_2)/W_1\times 100\%$ 。

**2.3.2 包封率加样回收率试验** 精密量取 0.25 mL 已知包封率的二元醇质体(计算其游离石杉碱甲含量为  $W_3$ ),共 6 份,分别加入浓度为  $C_1$  的对照品溶液 0.25 mL,混匀,置于截留分子量为 10 kDa 超滤离心管中,以 6 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 60 min,取出全部滤液,置 5 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,精密吸取续滤液 10  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件测定,计算游离药物含量  $W_4$ ,按公式:回收率= $(W_4-W_3)/(0.25\times C_1)\times 100\%$  计算。包封率加样回收率为 98.09%, RSD 值为 2.74%( $n=6$ )。

## 2.4 星点效应-响应面优化二元醇质体处方

**2.4.1 星点试验设计** 根据前期单因素考察的结果,以卵磷脂含量( $X_1$ , w/v)、无水乙醇含量( $X_2$ , v/v)、混合醇含量( $X_3$ , v/v)为考察因素进行星点设计,因素与水平见表 2。以包封率( $Y_1$ )与平均粒径( $Y_2$ )为指标,并将二者线性归一化<sup>[10]</sup>,归一值( $d_i$ )范围分别为  $Y_1(Y_{\min}=79.68\%, Y_{\max}=96.28\%)$ 、 $Y_2(Y_{\min}=193.4, Y_{\max}=440.8)$ 。通过总评归一值  $OD[OD=(d_1d_2d_3\dots d_n)^{1/n}, d_{\max}=(Y_i-Y_{\min})/(Y_{\max}-Y_{\min}), d_{\min}=(Y_{\max}-Y_i)/(Y_{\max}-Y_{\min})]$  评价石杉碱甲二元醇质体的质量,  $Y_1$  对 OD 值的贡献根据公式  $d_{\max}$  计算其  $d$  值,  $Y_2$  对 OD 值的贡献根据公式  $d_{\min}$  计算其  $d$  值。在响应面上直观地读出各因素的最优区间,进而确定最优处方。试验安排以及结果见表 3。

表 2 因素水平

Tab. 2 Factors and levels

| 水平     | 因素/%  |       |       |
|--------|-------|-------|-------|
|        | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ |
| -1.732 | 2.0   | 15.0  | 30.0  |
| -1     | 2.6   | 18.2  | 36.3  |
| 0      | 3.6   | 22.5  | 45.0  |
| 1      | 4.5   | 26.8  | 53.7  |
| 1.732  | 5.2   | 30.0  | 60.0  |

**2.4.2 模型拟合** 运用 Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行多元非线性拟合,得到 OD 值( $Y$ )对卵磷脂含量( $X_1$ )、无水乙醇含量( $X_2$ )、混合醇含量( $X_3$ )的回归方程:  
 $Y=-9.299\ 48-0.645\ 69X_1+0.306\ 75X_2+0.207\ 56X_3+0.0192\ 88X_1X_2-5.543\ 86\times 10^{-3}X_1X_3-1.848\ 24\times 10^{-3}X_2X_3-0.106\ 75X_1^2-6.242\ 40\times 10^{-3}X_2^2-1.314\ 07\times 10^{-3}X_3^2(R^2=0.833\ 1)$ 。

对回归方程进行方差分析,结果见表 4。由结果可知,该回归方程的  $P$  值为  $0.006\ 6<0.01$ ,表明该模型方程极显著;在回归模型中的一次项无

表 3 试验安排及结果

Tab. 3 Experimental design and results

| 序号    | $X_1/\%$ | $X_2/\%$ | $X_3/\%$ | $Y_1/\%$         | $Y_2/\text{nm}$    | OD              |
|-------|----------|----------|----------|------------------|--------------------|-----------------|
| 1     | 2.68     | 18.17    | 36.34    | 87.28            | 417.30             | 0.21            |
| 2     | 4.52     | 18.17    | 36.34    | 91.79            | 440.80             | 0               |
| 3     | 2.68     | 18.17    | 53.66    | 90.64            | 202.30             | 0.80            |
| 4     | 4.52     | 18.17    | 53.66    | 94.09            | 215.80             | 0.89            |
| 5     | 2.68     | 26.83    | 36.34    | 79.68            | 216.40             | 0               |
| 6     | 4.52     | 26.83    | 36.34    | 88.51            | 286.10             | 0.58            |
| 7     | 2.68     | 26.83    | 53.66    | 91.73            | 228.80             | 0.79            |
| 8     | 4.52     | 26.83    | 53.66    | 88.03            | 193.40             | 0.71            |
| 9     | 2.00     | 22.50    | 45.00    | 86.83            | 278.60             | 0.53            |
| 10    | 5.20     | 22.50    | 45.00    | 92.19            | 245.60             | 0.77            |
| 11    | 3.60     | 22.50    | 30.00    | 85.51            | 354.10             | 0.35            |
| 12    | 3.60     | 22.50    | 60.00    | 94.43            | 211.80             | 0.91            |
| 13    | 3.60     | 15.00    | 45.00    | 91.09            | 379.10             | 0.41            |
| 14    | 3.60     | 30.00    | 45.00    | 92.79            | 272.60             | 0.73            |
| 15~20 | 3.60     | 22.50    | 45.00    | 95.41 $\pm$ 0.49 | 248.93 $\pm$ 30.45 | 0.86 $\pm$ 0.08 |

水乙醇含量( $X_2$ )的  $P$  值 $<0.001$ ,表明其对石杉碱甲二元醇质体制备工艺影响极显著,综合分析得出 3 个因素对石杉碱甲二元醇质体制备工艺的影响程度为:无水乙醇含量( $X_2$ )>磷脂含量( $X_1$ )>混合醇含量( $X_3$ );二次项  $X_2^2$  和  $X_3^2$  对响应值的影响显著( $P<0.05$ );交互项对响应值的影响不显著;该方程失拟项的  $P$  值为  $0.2419>0.05$ ,失拟项差异不显著,表明实验设计可靠,可用于处方的优化。

**2.4.3 响应面分析** 分别将卵磷脂含量( $X_1$ )、无水乙醇含量( $X_2$ )、混合醇含量( $X_3$ )固定为中心值,将剩余 2 个因素带入 OD 值的拟合方程中,绘制三维

表 4 方差分析结果

Tab. 4 Analysis result of variance

| 误差来源     | 离均差平方和 | 自由度 | 均方    | $F$   | $P$     |
|----------|--------|-----|-------|-------|---------|
| 模型       | 1.400  | 9   | 0.160 | 5.55  | 0.006 6 |
| $X_1$    | 0.045  | 1   | 0.045 | 1.62  | 0.231 6 |
| $X_2$    | 0.810  | 1   | 0.810 | 28.92 | 0.000 3 |
| $X_3$    | 0.038  | 1   | 0.038 | 1.38  | 0.267 9 |
| $X_1X_2$ | 0.016  | 1   | 0.016 | 0.56  | 0.470 4 |
| $X_1X_3$ | 0.048  | 1   | 0.048 | 1.70  | 0.221 1 |
| $X_2X_3$ | 0.038  | 1   | 0.038 | 1.37  | 0.268 2 |
| $X_1^2$  | 0.130  | 1   | 0.130 | 4.67  | 0.055 9 |
| $X_2^2$  | 0.150  | 1   | 0.150 | 5.47  | 0.041 4 |
| $X_3^2$  | 0.220  | 1   | 0.220 | 7.72  | 0.019 5 |
| 残差       | 0.280  | 10  | 0.028 |       |         |
| 失拟项      | 0.250  | 5   | 0.050 | 8.14  | 0.241 9 |
| 误差       | 0.031  | 5   |       |       |         |
| 总离差      | 1.680  | 19  |       |       |         |

响应面图和二维等高线图,见图 2。

**2.4.4 响应面优化和预测** 在满足石杉碱甲二元醇质体 OD 值最大化条件下,利用 Design-Expert 8.0.6 软件优化处方,得到最优处方为卵磷脂含量为 3.60%,无水乙醇含量为 22.50%,混合醇含量为 45.00%,在此最优条件下的粒径为 271.8 nm,包封率为 95.41%。

**2.4.5 验证试验** 根据最优处方,平行制备 3 份石杉碱甲二元醇质体,分别测定其包封率和粒径。结果见表 5。结果表明,实验值与预测值相符,说明响应方程有较好的预测性,可用于石杉碱甲二元醇质体处方的优化。

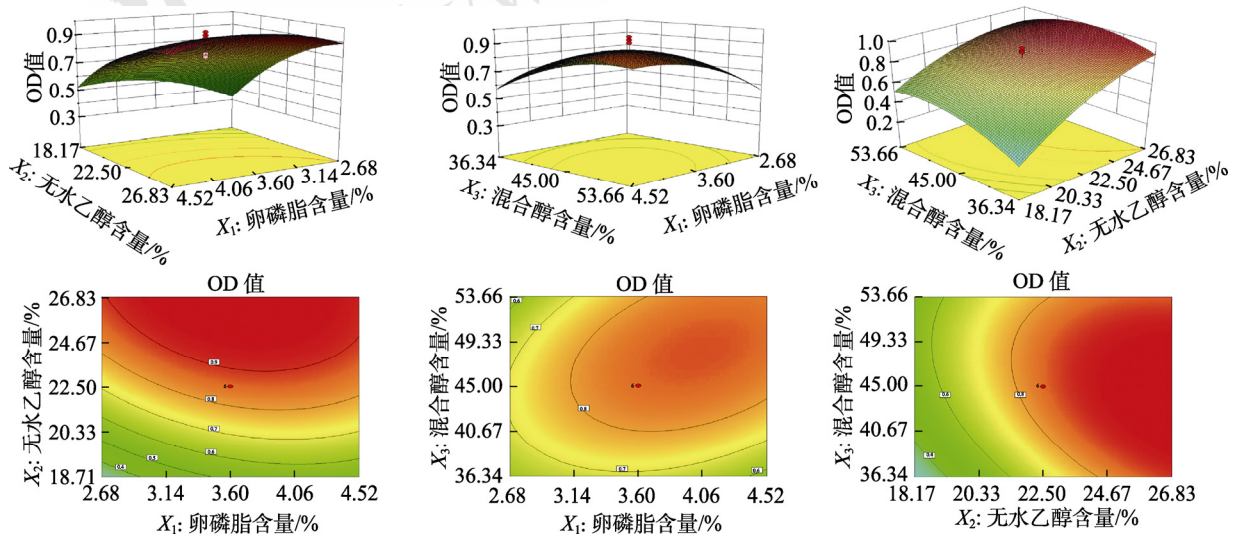


图 2 两因素交互作用对 OD 值影响的响应面及等高线图

Fig. 2 Response surface and contour map of the influence of two factors on the OD value



表 5 预测值与实验值比较( $n=3$ )

Tab. 5 Comparison of predicted value and experimental value( $n=3$ )

| 指标    | 预测值   | 实验值              | 偏差/%  |
|-------|-------|------------------|-------|
| 包封率/% | 95.41 | 94.05 $\pm$ 0.22 | -4.30 |
| 粒径/nm | 271.8 | 260.1 $\pm$ 5.7  | -1.45 |

## 2.5 石杉碱甲二元醇质体理化特性

**2.5.1 石杉碱甲二元醇质体的形态** 取适量石杉碱甲二元醇质体用少量 2% 磷钨酸负染, 滴加到专用铜网上, 自然挥干后, 在透射电子显微镜下观察形态, 结果见图 3, 可见本品形态规整, 呈球形或类球形。

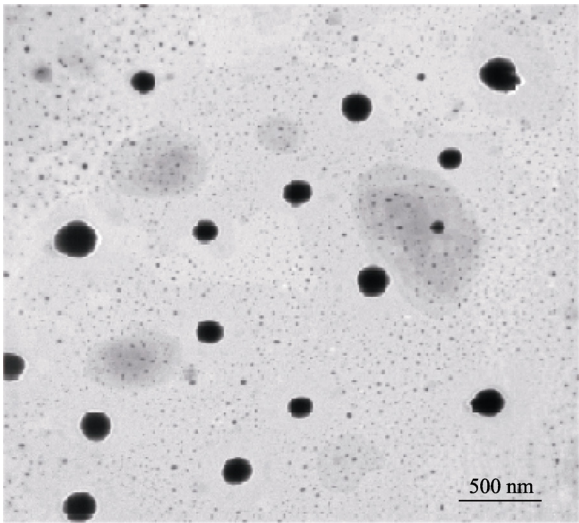


图 3 透射电镜图(10 000 $\times$ )

Fig. 3 TEM photography(10 000 $\times$ )

**2.5.2 粒径和 Zeta 电位** 取适量石杉碱甲二元醇质体, 用纯化水稀释后测定其粒径和 Zeta 电位。粒径图见图 4, 结果表明石杉碱甲二元醇质体的平均粒径为(260.1 $\pm$ 5.7)nm, PDI 值为 0.188 $\pm$ 0.056, 说明本品粒径较小且分布均匀; 电位值为(-20.9 $\pm$ 0.3)mV, 说明本品比较稳定, 不易聚集。

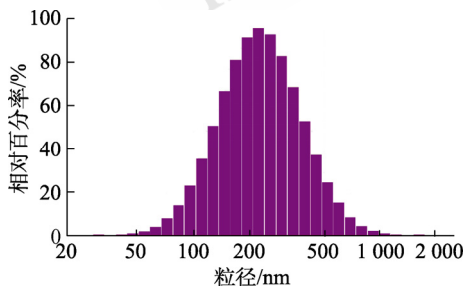


图 4 粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution

**2.5.3 石杉碱甲二元醇质体的稳定性评价** 按“2.4”项下优化的处方制备 3 批石杉碱甲二元醇质

体, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下贮存, 分别于第 0, 15, 30, 60, 90 天按“2.3.1”“2.5.2”项下方法测定其包封率、平均粒径、Zeta 电位, 结果见表 6。结果表明, 石杉碱甲二元醇质体在 4 $^{\circ}$ C 条件下稳定性较好。

表 6 石杉碱甲二元醇质体稳定性试验结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab. 6 Experimental results on stability of huperzine A binary ethosomes( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| t/d | 包封率/%            | 粒径/nm             | Zeta 电位/mV        |
|-----|------------------|-------------------|-------------------|
| 0   | 95.01 $\pm$ 0.01 | 253.00 $\pm$ 3.97 | -22.19 $\pm$ 0.56 |
| 15  | 94.20 $\pm$ 0.25 | 252.37 $\pm$ 1.11 | -21.95 $\pm$ 0.94 |
| 30  | 94.73 $\pm$ 0.19 | 279.40 $\pm$ 1.88 | -23.96 $\pm$ 0.77 |
| 60  | 94.73 $\pm$ 0.16 | 283.13 $\pm$ 8.29 | -22.98 $\pm$ 3.81 |
| 90  | 94.64 $\pm$ 0.21 | 283.13 $\pm$ 3.07 | -21.53 $\pm$ 0.32 |

## 3 讨论

### 3.1 制备方法的选择

脂质体的制备方法是影响脂质体包封率和粒径的重要因素, 其传统的制备方法主要有薄膜分散法、逆向蒸发法、注入法、注入超声法以及冻融法等, 但对于醇质体, 因为体系中要保留一定比例的醇相, 所以制备方法与脂质体有所差异。注入法是实验室制备醇质体最常用的方法, 其操作简单, 仪器易得, 制备的醇质体包封率较高, 稳定性较好<sup>[11-13]</sup>。

### 3.2 包封率测定方法的选择

包封率是指包载于醇质体中药物的药量占总投药量的比例, 它是评价醇质体质量优劣的重要指标<sup>[14]</sup>。本实验分别采用高速离心法、反向透析法和超滤离心法测定石杉碱甲二元醇质体的包封率。采用高速离心法将石杉碱甲二元醇质体以 14 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心不同时间, 但醇质体均未见明显分层现象, 由此可见, 高速离心法不能有效地分离载药醇质体和游离药物。采用反向透析法样品用量较多, 且耗时长。超滤离心法属于膜分离技术, 是在离心力作用下, 以压差作为驱动力, 根据筛分原理, 选用不同孔径的不对称性微孔膜, 将大分子(醇质体)和小分子(游离药物)物质进行分离。此法操作简单, 样品无需稀释, 用时短且重复性好, 在预试验的基础上, 选择截留分子量为 10 kDa 的超滤离心管, 可有效截留包载药物的醇质体, 并分离游离药物, 加样回收率为 98.09%。因此, 本实验选择超滤离心法测定石杉碱甲二元醇质体的包封率。

### 3.3 星点效应-响应面法影响因素的选择

预试验对搅拌时间、搅拌速度、温度、恒流泵流速、聚山梨酯-80 用量、药物含量、卵磷脂含量、无水乙醇含量、混合醇含量等因素进行考察,结果表明,聚山梨酯-80 的加入可以降低二元醇质体的粒径,但聚山梨酯-80 用量>0.3%后,对粒径的影响作用减弱。药物含量增加至 0.12%后,二元醇质体包封率不再增加,但粒径明显变大。卵磷脂含量、无水乙醇含量和混合醇含量对石杉碱甲二元醇质体的包封率和粒径影响较大,其他因素对评价指标影响不显著。所以,本实验对卵磷脂含量、无水乙醇含量和混合醇含量 3 个因素进行优化。卵磷脂含量增大,包封率随之增高,可能是卵磷脂含量越多,形成的醇质体囊泡越多,包封的药物越多,但当卵磷脂含量达到一定值时,包封率几乎不再增长;改变醇质体中丙二醇和无水乙醇的比例,随着无水乙醇含量的增加,粒径呈减小的趋势;改变混合醇和水相的比例,当混合醇的比例远大于体系中的水相时,醇质体包封率显著下降,推测可能是由于体系中混合醇比例较高,溶解了处方中的卵磷脂,使醇质体失去囊泡结构。因石杉碱甲临床剂量较小,二元醇质体中的药物含量低(0.1%),而醇质体中卵磷脂含量一般在 2%~5%,脂药比较大(36:1),可能是二元醇质体中包封率较高的原因。

### 3.4 星点效应-响应面法响应值的选择

总评归一法是将各个指标均标准化为 0~1 间的“归一值”,由各指标“归一值”求算几何平均数,得 OD 值<sup>[10]</sup>。总评归一法比较直观地反映了各指标的综合效应,实现对各指标综合效应的客观量化。醇质体的评价指标一般为包封率、粒径、PDI 和 Zeta 电位,本研究尝试采用包封率、粒径、PDI 和 Zeta 电位的 OD 值,对 OD 值进行多元非线性拟合,结果显示方程拟合情况不好。考虑到试验各水平条件下醇质体的 Zeta 电位和 PDI 值变化不大,其中 Zeta 电位一直处于-20 mV 左右, PDI 值始终<0.3,所以数据分析时只选择包封率和平均粒径的 OD 值作为星点效应-响应面法的响应值,结果表明,模型拟合情况良好,回归方程的 *P* 值为 0.006 6,模型方程极显著,失拟项的 *P* 值为 0.241 9,失拟项差异不显著,表明实验设计可靠。经验证,优化处方各评价指标的预测值与试验值吻合情况良好。

本实验通过星点设计-响应面法优化石杉碱甲二元醇质体的处方,建立的响应方程具有较好的预测性,优选的处方为卵磷脂含量 3.60%,无水乙醇含量 22.50%,混合醇含量 45.00%,制得二元醇质体性质稳定。

## REFERENCES

- [1] VIDEIRA M A, GANO L, SANTOS C, et al. Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration[J]. *J Microencapsul*, 2006, 23(8): 855-862.
- [2] 陈娟, 夏燕, 孟祥武, 等. 石杉碱甲治疗阿尔茨海默病认知功能的疗效观察[J]. *神经损伤与功能重建*, 2016, 11(1): 80-81.
- [3] LI J, LONG Z X, LI Q. Effect of huperzine A on cognitive function of Alzheimer's Disease[J]. *Contemp Med*, 2018, 24(27): 93-95.
- [4] ZHANG J P, WEI Y H, ZHOU Y, et al. Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: A comparative study[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(1): 109-117.
- [5] TOUITOU E, DAYAN N, BERGELSON L, et al. Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties[J]. *J Control Release*, 2000, 65(3): 403-418.
- [6] XING W S, LU F, XU Y. Progress in the study of novel liposome-binary ethosomes for percutaneous administration[J]. *Chin J Med Guide(中国医药导刊)*, 2018, 20(04): 221-224.
- [7] SONG Y L, HANG T F, LI S S, et al. Preparation of nasal ethosome spray of geniposide and its nasal mucosa permeability *in vitro*[J]. *Chin Tradit Herbal Drugs(中草药)*, 2013, 44(9): 1105-1109.
- [8] ZHU W Q, XU W K, HOU X L, et al. Determination of entrapment efficiency of forsythiaside compound liposome by HPLC-ultrafiltration[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2013, 30(9): 1001-1004.
- [9] XING Y, LI X, YU Y. Study on formulation and preparation process of ginkgolide B liposome[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2021, 38(6): 6971-703.
- [10] WU W, CUI G H, LU B. Optimization of multiple evariables: application of central composite design and overall desirability[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2000, 35(8): 26-29.
- [11] YANG K W, DELANEY J T, SCHUBERT U S, et al. Fast high-throughput screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method[J]. *J Liposome Res*, 2012, 22(1): 31-41.
- [12] SARFRAZ M, AFZAL A, YANG T, et al. Development of dual drug loaded nanosized liposomal formulation by A reengineered ethanolic injection method and its pre-clinical pharmacokinetic studies[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(3): E151.
- [13] ZHANG X L, WU P C, LIU Y, et al. Preparation technology of curcumin liposome by ethanol injection method[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2012, 18(4): 10-12.
- [14] 孙佳琳, 侯晓亮, 朱丽波. 中药脂质体包封率的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(1): 95-97.

收稿日期: 2021-03-30

(本文责编: 沈倩)