

# 响应面法优化 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒的制备工艺

陆瑾<sup>1,2</sup>, 于雪娥<sup>3</sup>, 付廷明<sup>3</sup>, 展冠军<sup>2\*</sup>, 郭立玮<sup>3\*</sup> (1.南京市大厂医院, 南京 210048; 2.东南大学附属中大医院, 南京 210009; 3.南京中医药大学, 南京 210023)

**摘要:** 目的 使用响应面法优化聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)- $\alpha$ -细辛脑纳米粒的工艺条件。方法 利用 Plackett-Burman 实验设计对纳米粒制备过程中的各种自变量进行预筛选。筛选出的自变量通过中心复合实验设计法进一步优化工艺, 以期得到具有理想粒径、载药量及包封率的纳米粒。结果 最佳工艺处方如下: PLA 浓度 14.76 mg·mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -细辛脑药物浓度 4.89 mg·mL<sup>-1</sup>, PVA 浓度 1%, 油水比 1:2。制备的 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒圆整、粒径均一, 平均粒径 265.4 nm, 多分散系数为 0.038, 载药量 12.40%, 包封率 55.86%, 与预测值相对误差较小。结论 响应面法能够有效地优化 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒的制备, 工艺稳定可行。

**关键词:**  $\alpha$ -细辛脑; 纳米粒; Plackett-Burman 实验设计; 中心复合实验设计; 工艺优化

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)02-0182-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.02.007

引用本文: 陆瑾, 于雪娥, 付廷明, 等. 响应面法优化 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒的制备工艺[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(2): 182-187.

## Response Surface Methods for Formulation Optimization of PLA- $\alpha$ -Asarone Nanoparticles

LU Jin<sup>1,2</sup>, YU Xue'e<sup>3</sup>, FU Tingming<sup>3</sup>, ZHAN Guanjun<sup>2\*</sup>, GUO Liwei<sup>3\*</sup> (1.Nanjing Dachang Hospital, Nanjing 210048, China; 2.Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China; 3.Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To optimize formulation of PLA- $\alpha$ -asarone nanoparticles(NP) by response surface methodology (RSM). **METHODS** Plackett-Burman design for independent variables was firstly conducted to prescreen various formulations and process variables during the development of NP. Selected primary variables were further optimized by central composite design. This process lead to an optimum formulation with desired particle size, drug loading and encapsulation efficiency. **RESULTS** Optimum formulation was as follows: PLA concentration 14.76 mg·mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -asarone concentration 4.89 mg·mL<sup>-1</sup>, PVA concentration 1% and volume ratio of oil-water 1:2. These prepared PLA- $\alpha$ -asarone nanoparticles had round surface and uniform size with average particle size of 265.4 nm, PDI index of 0.038, drug loading efficiency of 12.40% and encapsulation efficiency of 55.86%, relative errors of these parameters were small by comparing with the bias values. **CONCLUSION** The study demonstrates the feasibility that response surface methodology can be used to optimize the formulation and process variables to achieve favorable responses for PLA- $\alpha$ -asarone nanoparticles.

**KEY WORDS:**  $\alpha$ -asarone; nanoparticle; Plackett-Burman; central composite design; formulation optimization

$\alpha$ -细辛脑是天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的主要活性成分之一, 研究表明其具有多种药理活性, 包括神经保护<sup>[1]</sup>, 抗氧化<sup>[2]</sup>, 抗癫痫<sup>[3-4]</sup>, 解痉<sup>[5]</sup>以及呼吸系统疾病的治疗<sup>[6]</sup>等。目前,  $\alpha$ -细辛脑主要通过口服给药及静脉注射来治疗疾病。由于  $\alpha$ -细辛脑较强的疏水性, 临床使用的  $\alpha$ -细辛脑胶囊剂或片剂绝对生物利用度较低<sup>[7]</sup>, 严重影响其疗效。而注射剂制备时加入的吐温、丙二醇等助溶剂则是导致过敏性休克等严重不良反应的重要原因之一<sup>[8-9]</sup>。为了解决上述问题, 经皮给药制剂<sup>[10]</sup>、亚微乳<sup>[11]</sup>、脂质体<sup>[12]</sup>等新型给药

系统研究颇多, 虽有所成效, 但这些方法由于制备工艺复杂而不利于产业化。

纳米粒作为药物控释传递的载体具有特殊的重要性<sup>[13]</sup>, 如实现靶向性给药、缓释药物、提高难溶性药物与多肽药物的生物利用度、降低药物的不良反应等。目前响应面法是最常见的优化工艺的研究方法之一<sup>[14-16]</sup>。本实验在利用 Plackett-Burman 筛选试验的基础上使用中心复合实验设计(central composite design, CCD)法优化自变量, 以聚合物分散性指数(polymer dispersity index, PDI)、粒径、载药量(DL)及包封率(EE)为

作者简介: 陆瑾, 女, 博士, 中药师 Tel: 13914789051 E-mail: subwoofer365@sina.com \*通信作者: 展冠军, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (025)57069037 E-mail: 13776653295@163.com 郭立玮, 男, 硕士, 研究员 Tel: 13952091198 E-mail: guoliwei815@126.com

因变量,通过考察聚乳酸(PLA)、药物浓度、有机相与水相体积比、聚乙烯醇(PVA)浓度等自变量对方工艺的影响,旨在得到具有理想粒径、载药量及包封率的 $\alpha$ -细辛脑纳米粒,以期改善药物的生物利用度,延长药效,减少给药剂量,降低药物毒性。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

SM-1000D 超声波细胞破碎仪(南京舜玛仪器设备有限公司); HJ-6A 六联数显控温磁力搅拌器(江苏金运市金城国胜实验仪器厂); Allegra 64R 高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特有限公司); I-6 冷冻干燥机(德国 Ehrisa 公司); Zetasizer Nano-ZS90 粒度分析仪(英国马尔文有限公司); S-4800 型场发射扫描电镜(日本日立公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司)。

### 1.2 试剂

$\alpha$ -细辛脑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100298-201203,纯度100%); 细辛脑原料药(湖北艺康源化工有限公司提供,批号:130104,纯度>98%); PLA(山东医疗器械研究所,  $M_n$ : 10 000 Da, 批号:14011105); PVA 1788(上海阿拉丁试剂有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,丙酮、二氯甲烷为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 纳米粒的制备

PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒由乳化溶剂挥发法制得。精密称取一定量 $\alpha$ -细辛脑原料药和 PLA 溶于一定体积的有机溶剂(二氯甲烷:丙酮=9:1)中作为有机相(内相),适量 PVA 溶于水作为水相(外相),将有机相用注射器缓缓注入不断搅拌的水相中,滴毕,继续搅拌 2 min 后于超声波细胞破碎仪在一定功率下超声一定时间,磁力搅拌器搅拌 6 h 以上挥去有机溶剂后,5 000 r·min<sup>-1</sup> 预离心 5 min 除去沉淀,离心液再以 21 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 45 min 得纳米粒沉淀,该沉淀用重蒸水洗涤 3 次以除去 PVA,适量水分散,冷冻干燥 48 h 得粉末状样品。

### 2.2 实验设计

**2.2.1 因素筛选实验设计** 通过预实验确定了影响 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒形成的各自变量范围。通过 Plackett-Burman 试验初步确定多个自变量中主要因素,本实验选取 PLA 浓度( $X_A$ , mg·mL<sup>-1</sup>)、药

物浓度( $X_B$ , mg·mL<sup>-1</sup>)、水相体积( $X_C$ , mL)、PVA 浓度( $X_D$ , %, 有机相体积为 1 mL)、超声功率( $X_E$ , W)及超声时间( $X_F$ , min)为自变量, PDI、粒径、DL 和 EE 为因变量。因素编码水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验因素水平及编码

Tab. 1 The factor level and coding in design Plackett-Burman.

水平	因素					
	$X_A$	$X_B$	$X_C$	$X_D$	$X_E$	$X_F$
-1	10	3	2	1	400	2
1	30	9	10	2	800	4

**2.2.2 工艺优化实验设计** 在 Plackett-Burman 筛选实验基础上,选择 4 个最重要的影响因素,利用 CCD 法设计实验,预测最佳制备工艺,得到理想的响应值(包括 PDI、粒径、DL 和 EE)。优化实验设计由 4 因素 3 水平的 27 个实验方案组成,因素编码水平见表 2(该表根据 Plackett-Burman 实验结果设计)。

表 2 CCD 中主要因素水平及编码

Tab. 2 The factor level and coding in central composite design

主要因素	水平		
	-1	0	1
$X_A$ /PLA 浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	10	20	30
$X_B$ /药物浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	3	6	9
$X_C$ /PVA 浓度/%	1	1.5	2
$X_D$ /水相体积/mL	2	6	10

### 2.3 纳米粒的理化性质

**2.3.1 粒径和 PDI 的测定** 取冻干纳米粒适量,均匀分散于重蒸水中,采用粒度分析仪 25 °C 测定平均粒径及 PDI。其中 PDI 表示纳米粒的多分散系数, PDI 越小说明粒径越均一,一般情况下认为 PDI<0.3,表示纳米粒粒径较均一。

**2.3.2 DL 与 EE 的测定** 精密称取样品 10 mg 至 10 mL 量瓶中,加 2 mL 乙腈溶解,超声 2 min 以使纳米粒降解释放出药物,甲醇定容,使用 HPLC 色谱仪检测样品中药物浓度<sup>[17]</sup>。以下列公式计算 DL 和 EE: DL/%=纳米粒中药物质量/纳米粒质量×100%; EE/%=纳米粒中药物质量/投入总药量×100%。

**2.3.3 纳米粒的表面形貌** 取最优工艺下制得的 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒样品粉末少许,用导电胶将其固定在样品台上,使用日立离子溅射装置喷金

数十秒后,用扫描电子显微镜(SEM)观察形态。

## 2.4 工艺优化结果

**2.4.1 筛选试验** 根据 Plackett-Burman 设计的 12 组实验,可以预筛选 6 个自变量在最高和最低水平时对因变量的影响大小。12 组预筛选实验的输入变量和实验响应值见表 3。实验响应值包括 PDI、粒径、DL、EE,由以下公式确定相关相应系数: $Y=k_0+k_1X_A+k_2X_B+k_3X_C+k_4X_D+k_5X_E+k_6X_F$ 。其中, $X_A$  为 PLA 浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); $X_B$  为药物浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); $X_C$  为水相体积( $\text{mL}$ ); $X_D$  为 PVA 浓度(%); $X_E$  为超声功率( $\text{W}$ ); $X_F$  为超声时间( $\text{min}$ ),均为编码值。每个响应值  $Y$  都可用一个独立的多项式表示。

表 3 Plackett-Burman 设计方案及其响应值

Tab. 3 The initial input factor levels and experimental responses in screening design Plackett-Burman.

序 号	输入变量						实验响应值			
	$X_A$	$X_B$	$X_C$	$X_D$	$X_E$	$X_F$	PDI	粒径/nm	DL/%	EE/%
1	10	9	10	2	400	2	0.172	378.3	12.84	27.05
2	30	9	10	1	400	2	0.080	302.3	9.22	40.28
3	10	9	2	2	800	2	0.098	318.4	13.09	27.83
4	30	9	2	1	400	4	0.014	275.8	14.10	61.08
5	10	9	10	1	800	4	0.090	278.6	12.79	26.93
6	10	3	2	1	400	2	0.033	279.3	10.90	47.19
7	30	3	10	2	800	2	0.273	400.6	4.77	52.24
8	30	9	2	2	800	4	0.038	309.4	13.85	60.28
9	10	3	10	1	800	4	0.034	299.9	8.04	35.07
10	30	3	2	1	800	2	0.100	301.4	6.58	71.52
11	30	3	10	2	400	4	0.168	376.4	5.30	58.02
12	10	3	2	2	400	4	0.006	306.0	11.59	50.36

运用程序 Design-Expert 8.0.5 软件对响应值与各因素进行一次回归拟合并对实验结果进行方差分析(ANOVA),相应的回归系数见表 4。由表 4 可知,水相体积、PVA 浓度、超声时间对 PDI 和粒径有显著影响( $P<0.05$ )。PDI 和粒径都随着水相体积和 PVA 浓度的增大而增大,随着超声时间的延长而减小,但是可以发现,本实验中 PDI 均 $<0.3$ ,表明:虽然自变量对 PDI 有影响,但不同条件制得的纳米粒粒径均较均一。DL 随着 PLA 浓度和水相体积的增加而减小,而药物量的增加使 DL 增大。由表 4 可知,PLA 浓度、药物浓度和水相体积对 EE 影响显著。随着 PLA 量的增加,EE 增大,而药物和水相体积的增加都会使 EE 减小。显然,水相体积对 PDI、粒径、DL、EE 都有显著影响;PLA 和药物浓度对 DL 和 EE 有显著影响;PVA 浓

度和超声时间虽然都对 PDI 和粒径有影响,但是 PVA 浓度对粒径影响更大。此外,虽然超声时间对粒径和 PDI 的影响均具有显著性,但是超声过程中随着超声时间的延长,溶液起泡越来越严重,严重影响了超声效率,5 min 的超声时间已达到最大限度,所以,后期的实验设计中将超声时间设为 5 min,而不将其定为自变量。因此,由 Plackett-Burman 筛选实验选出的最重要的 4 个自变量包括水相体积、PLA 浓度、药物浓度以及 PVA 浓度。

表 4 Plackett-Burman 筛选实验, PDI, 粒径, DL 和 EE 的回归系数

Tab. 4 The Regression Coefficients in Screening Design Plackett-Burman for PDI, Particle size, DL, and EE.

系数	实验响应值			
	PDI	粒径/nm	DL/%	EE/%
$k_0$	0.092 <sup>1)</sup>	318.87 <sup>1)</sup>	10.26 <sup>1)</sup>	46.49 <sup>1)</sup>
$k_1$	0.020	8.78	-1.29 <sup>1)</sup>	10.75 <sup>1)</sup>
$k_2$	-0.010	-8.40	2.39 <sup>1)</sup>	-5.91 <sup>1)</sup>
$k_3$	0.044 <sup>1)</sup>	20.48 <sup>1)</sup>	-1.43 <sup>1)</sup>	-6.56 <sup>1)</sup>
$k_4$	0.034 <sup>1)</sup>	29.32 <sup>1)</sup>	-0.016	-0.52
$k_5$	0.013	-0.82	-0.40	-0.84
$k_6$	-0.034 <sup>1)</sup>	-11.18 <sup>1)</sup>	0.69	2.14

注: <sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

Note: <sup>1)</sup> $P<0.05$

**2.4.2 CCD 优化试验** 通过上述 Plackett-Burman 实验筛选出的 4 个实验因素, CCD 实验设计能够进一步以最少的实验次数评价实验因素及其之间的相互影响对响应值的贡献。实验中,通过调节自变量范围, CCD 能提供获得高 DL、高 EE 及小粒径及 PDI 纳米粒的模型。CCD 详细实验设计方案及其实验结果见表 5。

运用程序 Design-Expert 8.0.5 软件对实验结果进行分析,每个响应值相应的回归系数分别见表 6。回归方程如下  $Y=\alpha_0+\alpha_A X_A+\alpha_B X_B+\alpha_C X_C+\alpha_D X_D+\alpha_{AB} X_{AB}+\alpha_{AC} X_{AC}+\alpha_{AD} X_{AD}+\alpha_{BC} X_{BC}+\alpha_{BD} X_{BD}+\alpha_{CD} X_{CD}+\alpha_A^2 X_A^2+\alpha_B^2 X_B^2+\alpha_C^2 X_C^2+\alpha_D^2 X_D^2$ 。 $X_A$  为 PLA 浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); $X_B$  为药物浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); $X_C$  为水相体积( $\text{mL}$ ); $X_D$  为 PVA 浓度(%),均为编码值。每个响应值  $Y$  都可用一个独立的多项式表示。

**2.4.3 自变量对粒径的影响** 由自变量对粒径影响的模型系数表明,此回归方程拟合程度高。完整模型的  $R^2$  值为 0.898 4,说明该模型能够解释 89.84% 响应值的变化,结果表明:粒径与 PLA 浓度、水相体积和 PVA 浓度高度相关,且均为正相关。

表 5 CCD 设计方案及其响应值

Tab. 5 Central Composite Design for Four Factors at Different Levels

序号	输入变量				实验设计	实验响应值			
	$X_A$	$X_B$	$X_C$	$X_D$		PDI	粒径/nm	DL/%	EE/%
1	10	3	2	1	2 <sup>4</sup> factorial design	0.013	256.2	11.96	51.66
2	30	3	2	1		0.106	264.6	6.24	69.36
3	10	9	2	1		0.049	263.8	14.40	30.20
4	30	9	2	1		0.071	275.2	13.49	58.56
5	10	3	10	1		0.078	283.5	7.55	32.31
6	30	3	10	1		0.067	320.9	4.42	47.57
7	10	9	10	1		0.022	302.5	12.30	25.80
8	30	9	10	1		0.032	292.1	9.29	40.30
9	10	3	2	2		0.040	276.7	13.54	58.53
10	30	3	2	2		0.066	302.5	7.58	81.86
11	10	9	2	2	0.066	299.1	12.40	26.17	
12	30	9	2	2	0.129	316.0	14.30	61.93	
13	10	3	10	2	0.003	329.2	6.19	26.47	
14	30	3	10	2	0.197	376.7	4.79	51.50	
15	10	9	10	2	0.112	328.6	12.44	26.09	
16	30	9	10	2	0.053	321.7	9.85	42.71	
17	10	6	6	1.5	Star design	0.062	301.3	12.66	33.29
18	30	6	6	1.5		0.116	340.0	7.18	42.28
19	20	3	6	1.5		0.071	326.6	5.52	43.23
20	20	9	6	1.5		0.093	310.2	11.61	37.60
21	20	6	2	1.5		0.027	292.0	11.14	48.45
22	20	6	10	1.5		0.174	314.2	8.25	35.82
23	20	6	6	1		0.096	293.3	9.70	41.94
24	20	6	6	2	0.046	314.4	9.08	39.25	
25	20	6	6	1.5	center points (n=3)	0.069	303.8	9.32	40.63
26	20	6	6	1.5		0.049	299.3	9.38	40.87
27	20	6	6	1.5		0.058	300.4	9.30	40.99

**2.4.4 自变量对 DL 的影响** 由自变量对 DL 影响的模型系数可以看到,完整模型的  $F$  值是 8.58,  $P$  值 < 0.000 3, 表明拟合程度较高。结果表明: PLA 浓度、药物浓度、水相体积和 PVA 浓度对 DL 均具有显著影响, DL 与 PLA 浓度、水相体积及 PVA 浓度呈负相关, 与药物浓度呈正相关。从药物浓度与水相体积和 PVA 浓度的相互作用来看, 改变药物浓度, DL 的相应变化非常显著, 说明药物与水相体积和 PVA 浓度的相互作用有利于获得高的 DL, 而药物和 PLA 的相互作用可能会减小 DL。

**2.4.5 自变量对 EE 的影响** 由自变量对 EE 影响的模型系数可以看到,完整模型的  $F$  值是 15.84,  $P$  值 < 0.000 1, 具有非常高的拟合程度。结果表明: PLA 浓度、药物浓度、水相体积和 PVA 浓度均是

对 EE 有显著影响的主要因素, EE 与 PLA 浓度呈正相关, 而与药物浓度、水相体积和 PVA 浓度呈负相关。通过改变 PLA 和药物浓度, EE 相应的变化显著。PLA 浓度增加能够显著增加 EE, 而药物浓度的增加则会减小 EE。此外, 由表 5 可以发现, 所有实验结果的 PDI 均 < 0.3, 表明制得的纳米粒较均一, 参考文献[18], 忽略自变量对纳米粒 PDI 的影响, 不再对其进行考查。

## 2.5 验证试验

本实验制备的 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒在后续的研究中主要用于鼻腔给药治疗脑部疾病。对于鼻腔给药而言, 由于给药量较低, 因此纳米粒的粒径与纳米粒的载药量是更重要的指标。运用 Design-Expert 8.0.5 软件, 参照文献[18], 采取不同权重的方式(粒径的权重为 0.4, DL 的权重为 0.4, EE 的权重为 0.2), 优选出综合最佳工艺。所预测出的最佳处方工艺为 PLA 浓度 14.76 mg·mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -细辛脑药物浓度 4.89 mg·mL<sup>-1</sup>, PVA 浓度 1%, 油水比 1:2。按照最佳工艺条件重复 3 次试验, 将预测值与实测值进行比较并计算偏差, 结果见表 7。偏差=(预测值-实测值)/预测值×100%。

表 6 CCD 优化实验、粒径、DL、EE 及综合指标的回归系数  
Tab. 6 The regression coefficients in central composite-design,  $P$  values,  $R^2$ , and adjusted  $R^2$  for full model of particle size, DL, EE and comprehensive indicators

相关系数	实验响应值			
	粒径/nm	DL/%	EE/%	综合指标
$\alpha_0$	309.45 <sup>1)</sup>	9.24 <sup>1)</sup>	39.40 <sup>1)</sup>	6.78
$\alpha_A$	9.38 <sup>1)</sup>	-1.46 <sup>1)</sup>	10.31 <sup>1)</sup>	-0.28
$\alpha_B$	-1.54	2.35 <sup>1)</sup>	-6.29 <sup>1)</sup>	0.54
$\alpha_C$	17.08 <sup>1)</sup>	0.046	0.93 <sup>1)</sup>	-0.034
$\alpha_D$	17.96 <sup>1)</sup>	-1.67 <sup>1)</sup>	-8.79 <sup>1)</sup>	-0.91
$\alpha_{AB}$	-6.76 <sup>1)</sup>	0.72	0.87 <sup>1)</sup>	0.30
$\alpha_{AC}$	2.28	0.30 <sup>1)</sup>	-1.56 <sup>1)</sup>	0.11
$\alpha_{AD}$	0.32	0.035	2.11 <sup>1)</sup>	-0.031
$\alpha_{BC}$	-1.76	-0.15 <sup>1)</sup>	-0.96 <sup>1)</sup>	-0.054
$\alpha_{BD}$	-7.47 <sup>1)</sup>	0.35 <sup>1)</sup>	3.86 <sup>1)</sup>	0.28
$\alpha_{CD}$	1.42	-0.13 <sup>1)</sup>	-1.12 <sup>1)</sup>	-0.054
$\alpha_A^2$	7.06 <sup>1)</sup>	0.73	<sup>1)</sup> 0.90	0.47
$\alpha_B^2$	4.81	-0.63 <sup>1)</sup>	1.73 <sup>1)</sup>	0.15
$\alpha_C^2$	-9.74 <sup>1)</sup>	0.20 <sup>1)</sup>	1.91 <sup>1)</sup>	-0.58
$\alpha_D^2$	-10.49 <sup>1)</sup>	0.50	3.45 <sup>1)</sup>	0.69
$R^2$	0.898 4	0.909 2	0.948 7	0.838 2
Adjusted $R^2$	0.779 8	0.803 2	0.888 8	0.649 5
CV	3.98	13.37	10.48	9.38

注: <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; CV-变异系数。

Note: <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; CV-coefficient of variation.

制备所得 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒外观圆整，粒径均一，PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒粒径分布图见图 1，PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒 SEM 图见图 2。其平均粒径为 265.4 nm，PDI 指数 0.038。最佳工艺实测 DL 12.40%，EE 55.86%，粒径、DL 和 EE 三者响应值的偏差分别为-0.84%、-1.47%和-1.45%，表明这三者的实验值与预测值吻合良好，所建立的模型合理有效，验证试验结果见表 7。PDI 指数为 0.038<0.3，证明该工艺制备的纳米粒粒径均一。

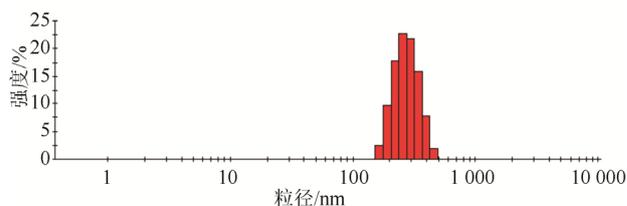


图 1 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒粒径分布图  
Fig. 1 Particle size distribution of PLA- $\alpha$ -asarone nanoparticles.

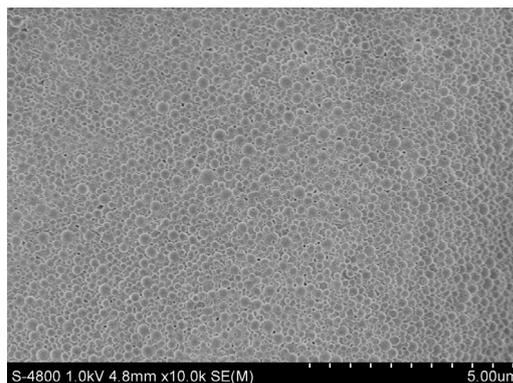
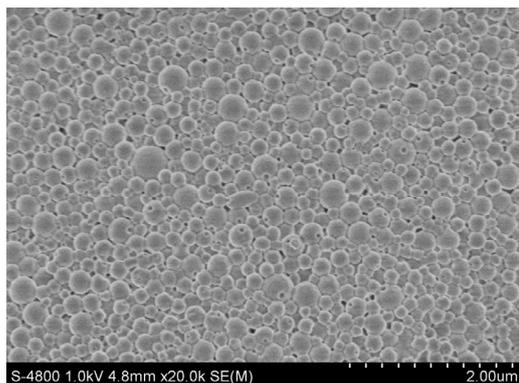


图 2 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒 SEM 图  
Fig. 2 TEM images of PLA- $\alpha$ -asarone nanoparticles.

表 7 验证试验结果

Tab. 7 The results of verification test

序号	粒径/nm	DL/%	EE/%
1	263.8	12.68	57.17
2	265.4	12.22	55.23
3	267.0	12.30	55.18
STDEVP	1.3	0.20	0.93
平均值	265.4	12.40	55.86
预测值	263.2	12.22	55.06
偏差/%	-0.84	-1.47	-1.45

### 3 讨论

本实验通过实验设计考察了纳米粒制备过程中的多种因素对响应值(粒径、DL 和 EE)的影响。与 Box-Behnken 效应面法<sup>[19]</sup>及星点设计-效应面法<sup>[20]</sup>优化  $\alpha$ -细辛脑纳米粒一样，均可以生成一种特殊的数学模型来说明自变量是如何影响因变量的，同时预测出影响产物生成的最佳自变量。但本实验中选取的评价指标比 Box-Behnken 效应面法及星点设计-效应面法优化  $\alpha$ -细辛脑纳米粒的评价指标更多，根据指标的重要性，采用不同权重的方式优选出综合最佳工艺为本实验的特点之一。但是由于载体 mPEG-PLGA 的亲水性更强，

制备方法的不一样，Box-Behnken 效应面法最佳工艺制备的  $\alpha$ -细辛脑长循环纳米粒具有更小的粒径和更高的包封率。

采用多项式回归方程对结果进行分析显示，PLA 浓度、水相体积和 PVA 浓度是粒径的关键影响因素，而 PLA、药物浓度、水相体积和 PVA 浓度对 DL 和 EE 都有重要影响。根据优选出的最佳工艺条件，PLA 浓度为 14.76 mg·mL<sup>-1</sup>，药物浓度为 4.89 mg·mL<sup>-1</sup>，PVA 浓度为 1%，油水比为 1：2，制备所得 PLA- $\alpha$ -细辛脑纳米粒平均粒径为 265.4 nm，PDI 指数为 0.038，载药量为 12.40%，包封率为 55.86%，与预测值误差较小。本实验中优化的纳米粒的包封率较低，仅为 55.86%，原因之一与其最优工艺的选择权重的设置有关；另一方面，与其载体 PLA 的关系密不可分，预实验载体的选择中发现，载体 PLGA(聚乳酸-羟基乙酸)具有较高的包封率，而其载药量较低(<5%)，考虑到鼻腔给药的剂量较低，最终选择了载药量相对较高，包封率较低的 PLA 作为纳米粒的载体。

### REFERENCES

[1] CHO J, KIM Y H, KONG J Y, et al. Protection of cultured rat

- cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus* [J]. *Life Sci*, 2002, 71(5): 591-599.
- [2] MANIKANDAN S, DEVI R S. Antioxidant property of  $\alpha$ -asarone against noise stress-induced changes in different regions of rat brain [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(6): 467-474.
- [3] LIAO W P, CHEN L, YI Y H, et al. Study of antiepileptic effect of extracts from *Acorus tatarinowii* Schott [J]. *Epilepsia*, 2005, 46(Suppl 1): 21-24.
- [4] PAGES N, MAUROIS P, DELPLANQUE B, et al. Activities of  $\alpha$ -asarone in various animal seizure models and in biochemical assays might be essentially accounted for by antioxidant properties [J]. *Neurosci Res*, 2010, 68(4): 337-344.
- [5] GILANI A U, SHAH A J, AHMAD M, et al. Antispasmodic effect of *Acorus calamus* Linn. is mediated through calcium channel blockade [J]. *Phytother Res*, 2006, 20(12): 1080-1084.
- [6] REN X, GUAN J, ZHANG Z H, et al. Meta analysis of curative effect of asarone injection on the treatment of chronic obstructive pulmonary disease with acute exacerbation [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*(中国云南中药杂志), 2016, 37(9): 22-26.
- [7] YANG Z H, WU C. Absolute bioavailability of synthetic asarone in healthy volunteers [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1997, 17(4): 165-167.
- [8] WU X Y, ZHANG Y M, LI X D, et al. Analysis on anaphylactic shock induced by asarone injection [J]. *Chin J Drug Appl Monitor*(中国药物应用与监测), 2011, 8(6): 364-368.
- [9] QIU Z H, ZHAO H Z, HE L E, et al. Meta-analysis on the adverse events of asarone injection [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2015, 21(6): 78-82.
- [10] WU Y Y, XIA X J, WU Z, et al. Development of drug-inadhesive transdermal patch for alpha-asarone and *in vivo* pharmacokinetics and efficacy evaluation [J]. *Drug Deliv*, 2011, 18(1): 84-89.
- [11] LI H J, LAI X J, LI W, et al. Quality evaluation and stability investigation of asarone submicro emulsion injection [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 34(7), 982-987.
- [12] MA W C, ZHANG Q, LI H, et al. Development of intravenous lipid emulsion of  $\alpha$ -asarone with significantly improved safety and enhanced efficacy [J]. *Int J Pharm*, 2013, 450(1/2): 21-30.
- [13] WANG W L, CHEN S, ZHANG L, et al. Poly(lactic acid)/chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015(46): 514-520.
- [14] ZHUANG H S, YUE X K, YU L S. 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), 2017, 34(7): 982-987.
- [15] ZHAO X Y. Optimization of extraction of total flavonoids from *Salvia miltiorrhiza* Bge. by response surface analysis and evaluation of its antioxidant activity *in vitro* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(5): 686-691.
- [16] LU J, FU T M, QIAN Y Y, et al. Distribution of  $\alpha$ -asarone in brain following three different routes of administration in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014(63): 63-70.
- [17] LIU P, CHENG X X, ZHANG X H, et al. Optimization of enzymatic extraction technology for polysaccharides from *Longan (Dimocarpus Longan) Seeds* by response surface analysis [J]. *Pharm Today*(今日药学), 2016, 26(5): 331-334.
- [18] YANG XY, PATEL S, SHENG Y, et al. Statistical design for formulation optimization of hydrocortisone butyrate-Loaded PLGA nanoparticles [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2014, 15(3): 569-587.
- [19] 臧巧真, 唐涛, 龙凯花, 等. Box-Behnken 效应面法优化  $\alpha$ -细辛脑长循环纳米粒制备工艺[J]. *中成药*, 2016, 38(2): 456-460.
- [20] ZANG Q Z, TANG T, LONG KH, et al. Optimization of formulation of  $\alpha$ -asarone nanoparticle *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.

收稿日期: 2017-06-05  
(本文责编: 曹粤锋)