

响应曲面法优化中空介孔羟基磷灰石负载姜黄素的处方工艺

于蒙蒙¹,王海媛²,张 坚¹,肖学风^{1*},晋兴华^{2*}

(1.天津中医药大学,天津 300193; 2.天津大学药物科学与技术学院,天津 300072)

摘要:以碳酸钙为模板,在 140℃、碱性水溶液中制备出球形度良好且粒度均匀的中空介孔羟基磷灰石微球,并采用溶剂浸渍法负载上模型药物姜黄素,利用扫描电子显微镜、透射电子显微镜、氮气吸附-解吸附、傅里叶变换红外光谱等仪器对微球及其载药体系进行表征。通过三因素三水平的 Box-Behnken 实验设计(BBD)对微球负载姜黄素的工艺处方进行优化。研究发现,当姜黄素/HMAPs 质量比为 19.95:1、载药时间为 5.8 h、超声时间为 1.48 h 时为最优处方工艺,此时载药量理论预测值为 73.43%。

关键词:中空介孔羟基磷灰石微球;姜黄素;Box-Behnken 实验设计

中图分类号:R944.9

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2018)07-0167-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2018.07.038

Optimization of formulation process for curcumin-loading hollow mesoporous hydroxyapatite by response surface methodology

YU Meng-meng¹, WANG Hai-yuan², ZHANG Jian¹, XIAO Xue-feng^{1*}, JIN Xing-hua^{2*}

(1.Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2.School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Using calcium carbonate as a template, hollow mesoporous hydroxyapatite microspheres (HMAPs) with good sphericity and uniform particle size are synthesized in an alkaline aqueous solution at 140℃, and are loaded with the model drug curcumin by solvent impregnation method. The synthesized HMAPs and its drug-loading system are characterized by scanning electron microscope, transmission electron microscopy, nitrogen adsorption-desorption analysis and Fourier transform infrared spectrometer. The experiments for encapsulation of curcumin by HMAPs are designed and optimized according to a three-level and three-variable Box-Behnken design (BBD), in which three variables include the mass ratio of curcumin/HMAPs, the loading time for drug and the serving time of ultrasonic. The optimal formulation parameters obtained are as follows: the mass ratio of curcumin/HMAPs, the loading time for drug and the serving time of ultrasonic are 19.95:1, 5.8 h and 1.48 h, respectively. Under optimal parameters, the theoretical prediction value of drug loading amount is 73.43%.

Key words: hollow mesoporous hydroxyapatite microspheres; curcumin; Box-Behnken experiment design

姜黄素(Curcumin)主要来源于姜科植物姜黄(*C.longa L.*)根茎、郁金(*Curcuma aromatica Salisb.*)块根、莪术(*C.zedoaria (Berg.) Rosc.*)根茎和天南星科植物菖蒲(*Acorus calamus L.*)根茎等,传统医学认为其具有通经止痛、行气活血等药效^[1]。现代研究表明,姜黄素是一种植物多酚^[2],作为姜黄的主要药理活性成分^[3],其具有良好的抗肿瘤、降血脂、抗炎、利胆、抗氧化等作用^[4]。但由于其水溶性极差导致其具有口服生物利用度低、代谢和排泄快等缺点,极大地限制其在临床上的应用^[5-6]。因此,研发姜黄素新剂型,寻找增加其溶解并提高生物利用度的包载材料,成为姜黄素广泛应用亟待解决的问题。

中空介孔羟基磷灰石微球(Hollow mesoporous hydroxyapatite microspheres, HMAPs)作为一种新型

载体,兼具空心 and 介孔 2 种优点。羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAP)是牙齿和骨骼的主要无机成分^[7-8],具有良好的生物活性、相容性、降解性^[9],且无毒无刺激,并具有良好的机械性能等优势^[10]。其自身不仅有抑菌作用^[11],是一种抗癌药物^[12],还是一种优异的基因和药物的载体^[13]。所以笔者采用中空介孔羟基磷灰石微球包载姜黄素,以增加其溶解并提高生物利用度,并利用 Box-Behnken 实验设计(Box-Behnken, BBD)对其负载的工艺处方进行优化^[14-15]。

1 实验材料

1.1 试剂

姜黄素(麦克林),通拓色谱技术(天津)有限公

收稿日期:2017-12-04;修回日期:2018-05-14

作者简介:于蒙蒙(1992-),女,硕士研究生,研究方向为中药成分的载体材料,ymm3376@163.com;肖学风(1966-),女,博士,教授,研究方向为药理方向,通讯联系人,kai1219@163.com;晋兴华(1977-),男,博士,高级工程师,研究方向为载体材料,通讯联系人,15822534131@163.com。

司生产;氯化钙,天津市化学试剂供销公司生产;碳酸钠,天津市科密欧化学试剂有限公司生产;聚苯乙烯磺酸钠,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司生产;十二水合磷酸氢二钠,天津市鼎盛鑫化工有限公司生产;乙酸乙酯,天津市元立化工有限公司生产;柠檬酸,天津市北方天医化学试剂厂生产;各试剂均为分析纯,水为超纯水(Milli-Q Academic)。

1.2 仪器

Phenom Pro 扫描电子显微镜;JEOL-100CX-II 透射电子显微镜,日本电子株式会社生产;Tensor 27 傅里叶变换红外光谱;Agilent Cary 60 紫外分光光度计;KYC 100C 恒温振荡仪,上海福玛实验设备有限公司生产;QT2060 超声清洗机;SX-2-10 马弗炉;GB/T 11165 精密 pH 计,美国 Mettler 公司生产;Mettler toledo XS105 型电子天平,美国 Mettler 公司生产;Anke TGL-16G 高速台式离心机。

2 实验方法

2.1 中空介孔羟基磷灰石微球的合成

2.1.1 模板球的合成

在三口烧瓶中加入 200 mL 超纯水、一定量聚苯乙烯磺酸钠和氯化钙,另在烧杯中加入 200 mL 超纯水、一定量聚苯乙烯磺酸钠和碳酸钠 [$n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{CO}_3^{2-}) = 1 : 1$], 超声 10 min, 将碳酸钠溶液快速倒入中速搅拌的氯化钙溶液中, 室温下反应 1.5 h, 离心水洗 3 次, 60℃ 干燥 12 h, 得到模板球碳酸钙^[16-17]。

2.1.2 复合微球的合成

称取 1 000 mg 合成的碳酸钙于烧瓶中, 加入 12 mL 超纯水和适量氨水, 使其 pH 为 11.5。中速磁力搅拌下, 滴加 12 mL 十二水合磷酸氢二钠溶液(按照 Ca/P 物质的量比为 1.67:1), 滴完后, 保持 pH 为 10.5, 30℃ 中速搅拌反应 0.5 h。再将反应液倒入反应釜, 置于马弗炉中 140℃ 反应 3 h, 离心水洗 3 次, 60℃ 干燥 12 h, 得到复合微球 $\text{CaCO}_3 @ \text{HAP}$ ^[9]。

2.1.3 模板球的去除

称取 500 mg 复合微球于 50 mL、pH 6.00 的柠檬酸溶液中, 置于 30℃ 恒温振荡器中震荡浸泡 24 h, 离心水洗 3 次, 60℃ 干燥 12 h, 得到中空介孔羟基磷灰石微球^[18-19]。

2.2 姜黄素/HMAPs 载药体系的制备

采用溶剂浸渍法将姜黄素负载到 HMAPs 上: 称取 2.5 mg HMAPs, 加入到 5 mL、12 mg/mL(姜黄

素的溶解度)的姜黄素乙酸乙酯溶液中(姜黄素/HMAPs 质量比为 24:1), 超声分散 1 h, 避光密封^[20], 置于 30℃ 恒温振荡器中震荡 6 h 后, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 用紫外分光光度法于 430 nm 处测定其吸光度, 计算 HMAPs 的载药量 DL :

$$DL = [(M_{\text{总}} - M_{\text{游离}}) / (M_{\text{总}} - M_{\text{游离}} + M_{\text{HMAPs}})] \times 100\% \quad (1)$$

式中: DL 为姜黄素的载药量; $M_{\text{总}}$ 为加入的姜黄素的总质量; M 为游离离心后上清液中姜黄素的质量; M_{HMAPs} 为加入的载体材料 HMAPs 的质量。

3 结果与讨论

3.1 中空介孔羟基磷灰石微球的表征

3.1.1 电镜分析

CaCO_3 、 $\text{CaCO}_3 @ \text{HAP}$ 、HMAPs 和姜黄素 @ HMAPs 扫描电镜图如图 1 所示。由图 1(a) 中可以看出, 模板球 CaCO_3 的球形度均匀、表面光滑。对图 1(a) 和图 1(b) 进行对比发现, 复合微球 $\text{CaCO}_3 @ \text{HAP}$ 表面不光滑, 说明羟基磷灰石包裹在了模板微球 CaCO_3 上; 由图 1(c) 可以看出, 微球 HMAPs 球形度良好且已中空, 壳层均匀, 尺寸约为 2~3 μm ,

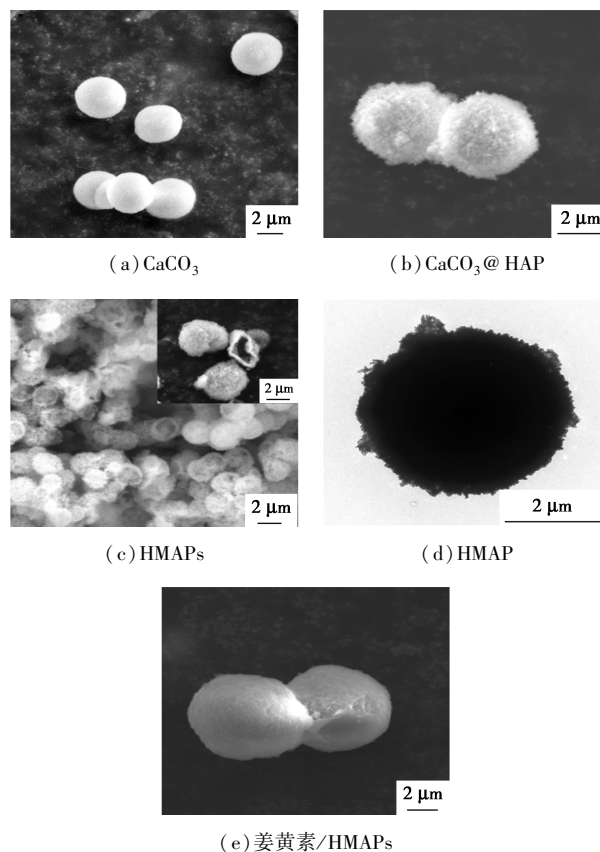


图 1 不同样品的电镜图

外壳厚度为 222 nm; 观察图 1(e) 可见, 姜黄素/HMAPs 载药微球球形度仍良好; 从图 1(d) 中可以看出, 微球球形度良好, 且其表面堆叠的羟基磷灰石颗粒样结构清晰可见。

3.1.2 氮气吸附-解吸附

利用 BET 测定 HMAPs 微球的表面积、孔容量和孔径分布, 结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出, HMAPs 微球的吸附-脱附等温线属于 IV 型等温线, 介孔材料典型的吸附等温线即是 IV 型等温线, 并且在脱附和吸附等温线之间存在 1 个明显的滞后环, 说明所制备的 HMAPs 微球具有介孔结构以及相对较窄的孔径分布。BET 结果表明, HMAPs 微球的比表面积为 56.007 m²/g, BJH 计算得到的孔体积为 0.409 cm³/g, 平均孔径为 4.891 nm。

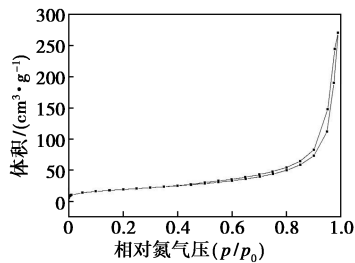
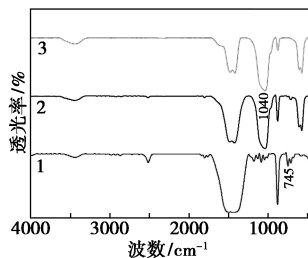


图2 氮气吸附-解吸附等温线

3.1.3 傅里叶变换红外光谱

利用傅里叶变换红外光谱对微球及载药体系进行表征, 结果如图 3 所示。由图 3 中谱线 1 可以看出, 745 cm⁻¹ 处有 CaCO₃ 的特征吸收峰, 表明合成的 CaCO₃ 为球霏石晶形。对比图 3 中谱线 1 和谱线 2 发现, 谱线 2 除了 745 cm⁻¹ 处 CaCO₃ 的吸收峰, 同时在 1 040 cm⁻¹ 处出现了羟基磷灰石介孔材料的特征吸收峰, 证明以 CaCO₃ 为模板合成了 CaCO₃@ HAP 复合微球。



1—CaCO₃; 2—CaCO₃@ HAP; 3—HMAPs

图3 傅里叶变换红外光谱图

对比图 3 中谱线 2 和谱线 3 发现, 去除模板球后的谱线 3 中, 745 cm⁻¹ 处 CaCO₃ 的特征吸收峰消失不见, 表明去除了 CaCO₃@ HAP 复合微球中球霏

石晶形的 CaCO₃ 模板球, 得到了中空介孔的 HMAPs 微球。

3.2 HMAPs 载药实验及 BBD 设计

选择姜黄素/HMAPs 质量比、载药时间、超声时间进行单因素实验, 得到最优实验条件为姜黄素/HMAPs 质量比为 16:1, 载药时间为 6 h, 超声时间为 1.0 h, 再利用 Box-Behnken 实验设计方案对微球包载姜黄素的工艺处方进行优化。

3.2.1 实验设计

利用 Design-Experts 8.0.6 软件中的 Box-Behnken 模型进行实验设计与数据分析。首先进行单因素实验考察, 在此基础上, 以姜黄素载药量为响应值(Y), 3 个自变量参数设置为: 姜黄素/HMAPs 质量比(A)、载药时间(B)、超声时间(C)。以前期的单因素考察实验最优值为中心值进行 3 因素 3 水

表 1 Box-Behnken 实验设计结果

因素	水平		
	低值	中心值	高值
姜黄素/HMAPs 质量比(A)	12	16	20
载药时间(B)	3	6	9
超声时间(C)	0.5	1	1.5

表 2 Box-Behnken 实验设计结果

序号	自变量			载药量/%
	A	B	C	
1	16	6	1	67.40
2	16	6	1	66.15
3	16	6	1	65.60
4	20	3	1	63.21
5	16	3	0.5	56.93
6	20	6	0.5	71.49
7	16	3	1.5	58.35
8	12	6	1.5	60.88
9	16	9	0.5	64.59
10	20	9	1	66.52
11	20	6	1.5	73.29
12	16	9	1.5	62.71
13	16	6	1	68.88
14	12	6	0.5	60.27
15	16	6	1	66.58
16	12	3	1	47.37
17	12	9	1	52.37

平实验设计,结果如表 1 所示,其中析因部分实验次数为 12 次,中心点重复实验次数为 5 次,结果如表 2 所示。

利用 Design - Experts 8.0.6 软件中 Box - Behnken 模型对 17 个设计实验的结果进行分析,在原有方程基础上,去除不显著项,得到二次拟合方程为: $Y = 66.92 + 6.70A + 2.54B + 0.24C - 0.42AB + 0.30AC - 0.83BC - 1.86A^2 - 7.70B^2 + 1.42C^2$,包含常数项、一次项以及二次项(含交互作用项)。

回归方程各项的方差分析结果如表 3 所示。二次回归模型的总 F 值为 37.45, $P < 0.0001$,表明该方程显著性为极显著。并且失拟项 $F = 1.59$,明显小于 $F_{0.05}[F_{0.05(3,2)} = 19.2]$,说明模型拟合度优异;失拟项 P 值为 0.3242 (> 0.01),即拟合模型失拟度不显著,表明使用该方程进行的拟合效果很好,因此,该 BBD 模型适用于 HMAPs 负载姜黄素工艺处方的研究优化。

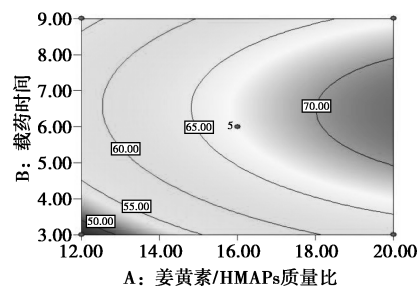
表 3 回归方程各项的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
总回归	689.71	9	76.63	37.45	<0.0001	***
A-A	359.39	1	359.39	175.65	<0.0001	***
B-B	51.62	1	51.62	25.23	0.0015	**
C-C	0.48	1	0.48	0.23	0.6445	
AB	0.72	1	0.72	0.35	0.5711	
AC	0.36	1	0.36	0.17	0.6887	
BC	2.73	1	2.73	1.33	0.2863	
A ²	14.54	1	14.54	7.11	0.0322	*
B ²	249.46	1	249.46	121.92	<0.0001	***
C ²	8.45	1	8.45	4.13	0.0816	*
残差	14.32	7	2.05			
失拟项	7.79	3	2.60	1.59	0.3242	不显著
误差项	6.53	4	1.63			
总误差	704.03	16				

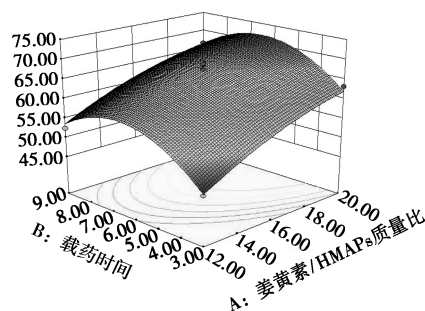
3.2.2 响应曲面分析与优化

通过 BBD 模型的实验设计和拟合优化,得到该实验模型的等高线和响应曲面图,结果如图 4~图 6 所示。由图 4 可以看出,姜黄素/HMAPs 质量比与载药时间交互作用显著,对载药量变化影响显著;由图 5 可以看出,姜黄素/HMAPs 质量比与超声时间交互作用不明显,但对载药量变化影响显著;由图 6 可以看出,载药时间与超声时间交互作用非常显著,

但对载药量变化影响不大。经分析可以看出,该实验载药量存在最大值,进一步通过软件计算分析可知,中空介孔羟基磷灰石负载姜黄素的最优工艺处方为:姜黄素/HMAPs 质量比为 19.95:1,载药时间为 5.8 h,超声时间为 1.48 h。

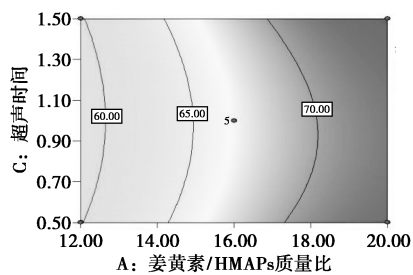


(a) 等高线

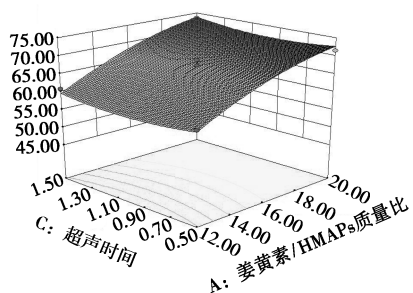


(b) 响应曲面

图 4 姜黄素/HMAPs 质量比与载药时间对载药量影响的等高线和响应曲面图



(a) 等高线



(b) 响应曲面

图 5 姜黄素/HMAPs 质量比与超声时间对载药量影响的等高线和响应曲面图

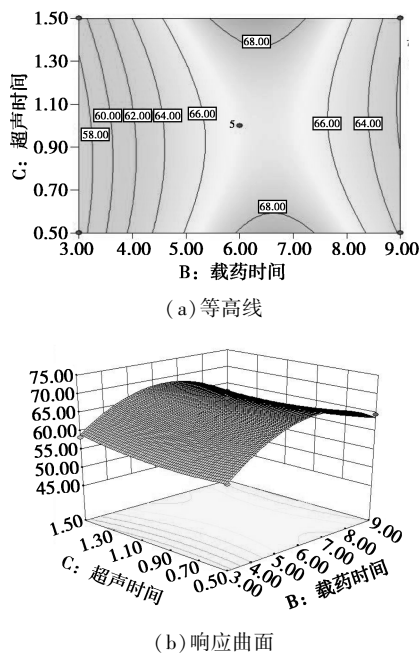


图6 载药时间与超声时间对载药量影响的等高线和响应曲面图

3.3 验证实验

以 BBD 模型得到的最优处方工艺为实验条件,进行 3 次验证实验,结果如表 4 所示。由表 4 可以看出,计算得到的平均载药量为 69.94%,与 Box-Behnken 模型预测值 73.43% 的吻合度高达 95.25%,证实了该模型准确可靠。因此,采用响应曲面法优化得到的中空介孔羟基磷灰石微球负载姜黄素的实验参数是可行的,具有一定的实用价值。

表 4 验证实验结果

实验编号	1	2	3	平均值	预测值
姜黄素载药量/%	68.16	71.93	69.73	69.94	73.43

4 结论

采用中空介孔羟基磷灰石微球包载姜黄素,并利用响应曲面法对 HMAPs 负载姜黄素的工艺处方进行优化。通过实验和 BBD 模型计算分析得最优工艺处方:姜黄素/HMAPs 质量比为 19.95:1,载药时间为 5.8 h,超声时间为 1.48 h,模型预测载药量可达 73.43%。在最优处方工艺实验条件下进行验证实验,得到载药量为 69.94%,与 BBD 模型预测的吻合度高达 95.25%,说明该模型合理有效,为载体负载药物的研究及姜黄素在中药制剂中的广泛应用开拓了新思路。

参考文献

- [1] 李伟锋,蒋建兰.姜黄素药理作用的研究现状[J].中国临床药理学杂志,2017,33(10):957-960.
- [2] 黄炜平,王洪琦,郭婷婷,等.姜黄素对恶性肿瘤放射增敏作用研究进展[J].中华中医药学刊,2017,(11):2855-2857.
- [3] 王颖,郭兰萍,黄璐琦,等.姜黄、莪术、郁金的化学成分与药理作用研究进展[J].中国药房,2013,24(35):3338-3341.
- [4] 刘红艳,王海燕,叶松,等.姜黄素药理作用及其机制研究进展[J].中国现代医学杂志,2012,22(6):48-51.
- [5] 张英,李冬梅,邢颖.姜黄素的药理作用与载体研究进展[J].中国药房,2015,26(13):1850-1853.
- [6] 杨汝磊,王征.姜黄素的水溶性药物递送系统的研究进展[J].国际药学研究杂志,2012,39(04):303-306.
- [7] 崔青青,吴官正,孔令涛,等.羟基磷灰石的制备及表征[J].福建师范大学学报(自然科学版),2017,33(01):35-39.
- [8] 史振,夏丹丹,曾光,等.纳米羟基磷灰石的制备及对阿霉素载药性能的考察[J].沈阳药科大学学报,2017,34(01):1-6+22.
- [9] Wu Q, Shi J, Wei J. In situ functionalization of hollow mesoporous hydroxyapatite with thermal-responsive on-off gates in supercritical CO₂ [J]. RSC Advances, 2015, 5(86):70101-70108.
- [10] 付志强,肖欢欢,陈柯伶,等.羟基磷灰石晶须/聚左旋乳酸复合材料的制备及性能[J].化工新型材料,2017,45(6):140-143.
- [11] 林英光,杨卓如,程江.纳米掺铈羟基磷灰石的制备及其抗菌性能研究[J].化工新型材料,2007,35(3):20-24.
- [12] Bauer I, Li S, Han Y, et al. Internalization of hydroxy apatite nanoparticles in liver cancer cells [J]. J Mater Sci: Mater Med, 2008, 19: 1091-1095.
- [13] Wang G H, Zhao Y Z, Tan J, et al. Arginine functionalized hydroxyapatite nanoparticles and its bioactivity for gene delivery [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2015, 25(2):490-496.
- [14] Ba-abbad M M, Chai P V, Takriff M S, et al. Optimization of nickel oxide nanoparticle synthesis through the sol-gel method using Box-Behnken design [J]. Materials & Design, 2015, 86:948-956.
- [15] 王海媛,孙明辉,任智慧,等.响应面法优化中空介孔二氧化硅球包载咪喹莫辛的工艺研究[J].化工进展,2016,35(7):2145-2150.
- [16] Wang Y S, Moo, Ying X, et al. Fast precipitation of uniform CaCO₃ nanospheres and their transformation to hollow hydroxyapatite nanospheres [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 352(2):393-400.
- [17] 钟奇伟,蔡玉荣.球形碳酸钙/羟基磷灰石的制备及药物控释[J].浙江理工大学学报(自然科学版),2016,35(05):685-690.
- [18] Guo Y J, Wang Y Y, Chen T, et al. Hollow carbonated hydroxyapatite microspheres with mesoporous structure: Hydrothermal fabrication and drug delivery property [J]. Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(6):3166-3172.
- [19] 杨辉,李欢.多孔羟基磷灰石中空微球制备及缓释性能[J].人工晶体学报,2013,42(11):2412-2417.
- [20] 赵欣,王爱里,袁园,等.姜黄中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的光稳定性分析[J].中草药,2013,44(10):1338-1341. ■