

用统计学方法优化硝苯地平脂质体处方

杨雪薇¹, 杨爽¹, 董冰雪¹, 郭鲁强¹, 刘晖², 滕乐生¹

(1. 吉林大学 生命科学学院, 长春 130012; 2. 吉林大学第四医院, 药学部, 长春 130011)

摘要: 采用乙醚注入法制备硝苯地平脂质体, 在单因素实验基础上采用 Box-Behnken 设计实验, 并用统计学方法考察磷脂量、脂药比、胆固醇磷脂比对脂质体包封率的影响。结果表明, 多元二次回归模型最优处方制备得到的硝苯地平脂质体平均包封率为 86.54%; 人工神经网络模型结合遗传算法最优处方制备得到的硝苯地平脂质体平均包封率为 97.25%; 与二次回归模型相比, 人工神经网络模型更适用于优化硝苯地平脂质体的制备。优化后得到最佳处方为: 磷脂量 612.4mg, 脂药比为 60.02, 磷脂胆固醇比例为 6.401。

关键词: 硝苯地平; 脂质体; 乙醚注入法; Box-Behnken; 人工神经网络模型

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1671-5489(2015)03-0572-05

Optimize the Preparation Formulation of Nifedipine Liposome by Statistical Methods

YANG Xue-wei¹, YANG Shang¹, DONG Bing-xue¹, GUO Lu-qiang¹, LIU Hui², TENG Le-sheng¹

(1. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China;

2. Department of Pharmacy, Fourth Hospital of Jilin University, Changchun 130011, China)

Abstract: The nifedipine liposomes were prepared from an appropriate amount of lecithine, cholesterol and nifedipine by the ether injection method. On the basis of single factor experiment, we used statistical methods to investigate the effect of phospholipid amount, lipid drug ratio, cholesterol phospholipid ratio on the encapsulation efficiency of liposome. The results show that the encapsulation efficiency of the liposome prepared based on multivariate quadratic regression model was 86.54%, and the encapsulation efficiency of the liposome prepared based on artificial neural network model was 97.25%. Compared with the quadratic regression model, artificial neural network model combined with genetic algorithm is more suitable for optimizing the preparation technique of nifedipine liposome. After optimizing, the best preparation formulation is 612.4mg of phospholipid with a lipid drug ratio of 60.02 and a cholesterol phospholipid ratio of 6.401.

Key words: nifedipine; liposome; ether injection method; Box-Behnken; artificial neural network

硝苯地平 (nifedipine) 是钙离子拮抗剂类药物的典型代表, 为黄色结晶粉末或针状晶

作者简介: 杨雪薇 (1990-), 女, 汉族, 硕士研究生, 从事生物技术制药方向的研究, E-mail: yangxw1309@163.com。通讯作者: 滕乐生 (1983-)男, 汉族, 博士, 副教授, 从事生物技术制药方向的研究, E-mail: tenglesheng@jlu.edu.cn。

体，在临床上用于心绞痛、高血压的治疗^[1,2]。但硝苯地平存在着水中溶解度小、制剂生物利用度低、遇光分解产物有毒和稳定性差等缺点。研究表明，脂质体制剂可显著地提高药物的治疗指数，减少给药次数，从而降低药物的不良反应，是一种高效低毒的新型给药系统^[3,4]。由于脂质体处方的设计比较复杂，采用单因素设计等常规方法不易得到最优结果。人工神经网络（ANN）是基于生物神经网络的非线性计算模型，通过网络结构的相互关联的节点的数学模型模拟人脑的学习过程^[5]。在神经网络建立后，其内存空间被遗传算法（GA）充分利用，GA是非线性的最优化形式^[6]。本文采用统计学方法优化硝苯地平脂质体的处方，应用 Box-Behnken 设计实验，利用多元二次回归模型^[7,8]和 ANN 模型结合 GA 对硝苯地平脂质体处方进行筛选。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与amp;试药

LC-10AVP 型高压液相色谱仪（日本岛津公司）； BS224S 电子天平（德国赛多利斯公司）； D-3L 高压均质机（PhD Technology LLC, USA）； 5810R 冷冻离心机（德国 eppendorf 公司）；硝苯地平（陕西惠诚生物科技有限公司）；硝苯地平标准品（中国药品生物制品检定所）；蛋黄卵磷脂（广州汉方有限公司）；胆固醇（上海惠世生化试剂有限公司）；甲醇和乙腈为色谱纯，无水乙醚等其他试剂为分析纯。。

1.2 实验方法

1.2.1 乙醚注入法制备硝苯地平脂质体制备 取适量卵磷脂、胆固醇、硝苯地平，加入一定量乙醚搅拌，溶解。将乙醚溶液用注射器快速注入已恒温至 30℃的 45mL 去离子水中，30℃ 搅拌 2h，使乙醚挥发尽，制成脂质体。用高压均质法进行整粒，均质压力为 8000psi，共均质 8 次^[9]。

1.2.2 硝苯地平含量测定 HPLC 条件：色谱柱为 460×150mm 的 C18 柱，检测波长为 205nm，流速 1.0mL/min，柱温为 30℃。流动相为 V(乙腈)：V(水)=1，进样量 20μL^[10]。先将 10mg 硝苯地平标准品配置成 200μg/mL 的硝苯地平乙醇母液。再用逐级稀释的方法配置各溶液，用 0.2μm 有机滤膜过滤后，依次进样。

1.2.3 包封率的测定 取制备所得硝苯地平脂质体 100μL，甲醇破乳，过 0.22μm 滤膜后注入高效液相色谱仪测定。取 5ml 硝苯地平脂质体 8000r/min 离心 30min 后，取上清 100μL，甲醇破乳，过 0.22μm 滤膜后注入高效液相色谱仪测定，计算包封率。

1.2.4 单因素试验优化脂质体制备处方

1) 磷脂量的考察: 称取硝苯地平 10mg、胆固醇 100mg, 分别称取蛋黄卵磷脂 200, 300, 400, 500, 600, 700mg, 按 1.2.1 方法进行操作, 得到脂质体。

2) 脂药比的考察: 称取蛋黄卵磷脂 600mg、胆固醇 100mg, 分别称取 m (蛋黄卵磷脂): m (原料药) = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 按 1.2.1 方法进行操作, 得到脂质体。

3) 胆固醇磷脂比的考察: 称取蛋黄卵磷脂 600mg, 硝苯地平 7.5mg, 胆固醇适量, 分别使 m (胆固醇): m (蛋黄卵磷脂) = 0, 1:24, 1:12, 1:8, 1:6, 1:4, 按 1.2.1 方法进行操作, 得到脂质体。

1.2.5 Box-behnken 效应面优化处方设计 在单因素基础上, 进行 3 因素 3 水平的中心组合设计实验, 按表 1 的因素水平表进行 15 组实验。测定脂质体包封率, 以包封率为指标进行优化。实验结果采用多元二次回归模型分析。

表 1 Box - Behnken 因素水平表

Table 1 Variables in Box - behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1:m$ (磷脂)/mg	500	600	700
$X_2:m$ (脂): m (药)	60: 1	80: 1	100:1
$X_3:m$ (胆固醇): m (磷脂) X_3	1:5	1:6	1:7

1.2.6 人工神经网络模型优化处方 从 Box-behnken 设计试验中随机抽取一个数据作为预测集和测试集, 其他数据作为校正集。3 层反馈给人工神经网络模型, 由于一些隐藏节点对人工神经网络模型影响较大, 因此采用接近标准程度 (D_a) 选择合适的隐藏节点:

$$D_a = \frac{c}{\frac{n_c}{n} \times MSE_c + \frac{n_t}{n} \times MSE_t + |MSE_c - MSE_t|} \quad (1)$$

其中: MSE_c 和 MSE_t 为校准设置和验证设置的均方误差 (MSE), n_c 和 n_t 为校准设置和验证设置的数量, n 为校准设置和验证设置的总数, c 为调整 D_a 以获得较好的一个连续数字 (本文 $c=1000$)。所得结果用 MATLAB7.6.0.324 (R2008a, 美国 MathWorks 公司) 软件分析。

人工神经网络模型确立后, 用 GA 在测试区域内搜寻最优值。GA 参数为: 群体类型为双重向量, 群体容量为 20, 初始群体随机给出, 作为随机的统一的选择功能, 精确算法为 2, 交叉率为 0.8, 交叉作用是离散的, 迁移率为 0.2, 罚因子为 100, 用 GA 得到的世代数目为 100。拟合度定义为

$$F=-NT_{ANN\ model} (2)$$

其中 $NT_{ANN\ model}$ 为通过神经网络模型计算得到的 NT 值。

1.2.7 验证试验 为检验多元二次回归模型和人工神经网络模型预测的处方的准确性与可行性，分别用各自得到的最佳处方配比制备硝苯地平脂质体，进行 3 次平行验证试验。

2. 结果与讨论

2.1 硝苯地平标准曲线的绘制 以色谱峰面积为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标绘制标准曲线，得回归方程 $Y=77476.02398x-21820.59156$ ， $R^2=0.99973$ ，表明硝苯地平在 $5\sim 40\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2 单因素试验结果

因素 X_1 ， X_2 ， X_3 对硝苯地平脂质体包封率的影响如图 1 所示。由图 1 可见， X_1 ， X_2 ， X_3 的最佳值分别为 600mg，80:1，1:6，因此确定以最佳条件为中心组合实验的中心点进行优化。

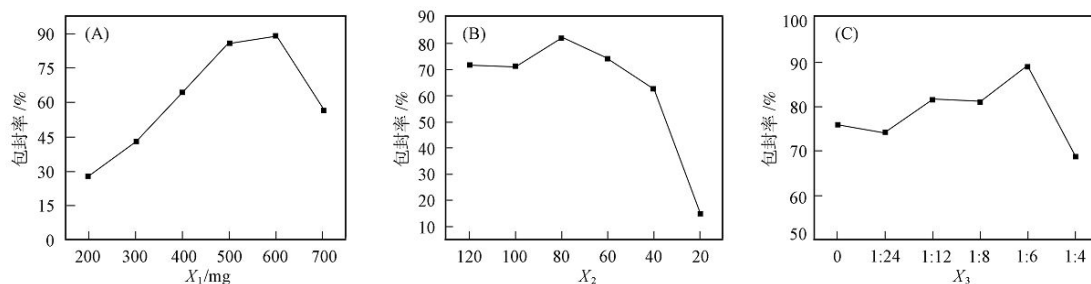


图1 X_1 (A), X_2 (B)和 X_3 (C)对包封率的影响

Fig.1 Effects of X_1 (A), X_2 (B) and X_3 (C) on the encapsulation efficiency of liposome

2.3 Box-behnken 中心组合实验优化处方设计结果

中心组合实验结果列于表 2，多元二次回归分析结果列于表 3。

表2 Box-Behnken中心组合设计方案及试验结果

Table 2 The matrix of box-behnken design and the corresponding experimental results

组别	X_1	X_2	X_3	包封率(%) Y	组别	X_1	X_2	X_3	包封率(%) Y
1	-1	-1	0	90.01	9	-1	0	-1	85.95
2	-1	1	0	89.64	10	1	0	-1	80.08
3	1	-1	0	90.41	11	-1	0	1	80.89
4	1	1	0	83.55	12	1	0	1	84.08

5	0	-1	-1	87.06	13	0	0	0	91.71
6	0	-1	1	84.55	14	0	0	0	92.36
7	0	1	-1	84.56	15	0	0	0	93.19
8	0	1	1	78.48					

拟合得到回归方程为：

$$Y_1=92.42-1.04625X_1-1.975X_2-1.20625X_3-2.465X_1X_1-1.6225X_1X_2+2.265X_1X_3 - 1.5525X_2X_2 - 0.8925X_2X_3-7.205X_3X_3 \quad (3)$$

该模型 $P=0.003021$ ，相关系数 $R^2=96.85\%$ ，表明 96.85% 的实验数据均符合该模型拟合，即该方程的拟合充分，回归方程高度显著，模型准确可行。

表3 多元二次回归分析结果

Tab. 3 Statistical results of multivariate quadratic regression analysis

方差来源	自由度	平方和 SS	均方 MS	F 值	Pr> F
X_1	1	8.1757	8.7571	4.5872	0.08513
X_2	1	31.205	31.205	16.356	0.00989
X_3	1	11.6403	11.6403	6.0975	0.05658
X_1X_1	1	22.4353	22.4353	11.7522	0.01867
X_1X_2	1	10.5300	10.5300	5.5159	0.06568
X_1X_3	1	20.5209	20.5209	10.7494	0.02199
X_2X_2	1	8.8994	8.8994	4.6617	0.08328
X_2X_3	1	3.1862	3.1862	1.6690	0.2579
X_3X_3	1	191.6752	191.6752	100.4042	0.000169
回归	9	293.8484	32.6498	17.1028	0.003021
线性	3	51.60243	17.2008	9.0102	0.018484
平方	3	208.009	69.3363	36.3201	0.00081
交互	3	34.2372	11.4124	5.9781	0.04153
参差	5	9.5452	1.9090		
失拟项	3	8.4446	2.8149	5.1151	0.1679
纯误差	2	1.1006	0.5503		
总离差	14	303.3936			

回归分析结果的响应曲面如图 2 所示。由图 2 所示，在检测范围内，3 个响应曲面均为开口向下的凸形曲面，说明响应值（提取率）存在极高值，其等高线中心均位于-1~1，表明提取的最优条件存在于所设计的因素水平范围内。图 2(C)中的等高线呈椭圆形，且坐标轴与椭圆形的轴线之间存在较大的夹角，表明 X_1 和 X_3 间存在显著的交互作用。计算得到最优提取条件的编码值为： $X_1=-0.03866$ ， $X_2=-0.60075$ ， $X_3=-0.05258$ ，代入变换公式可得 $Z_1=596.134\text{mg}$ ， $Z_2=67.985:1$ ， $Z_3=5.947:1$ ，即最佳处方为：磷脂质量 596.134mg， $m(\text{脂})$ ：

$m(\text{药})=67.985$, $m(\text{胆固醇}):m(\text{磷脂})=1:5.947$, 由回归方程得到包封率的预测值为 93.065%。

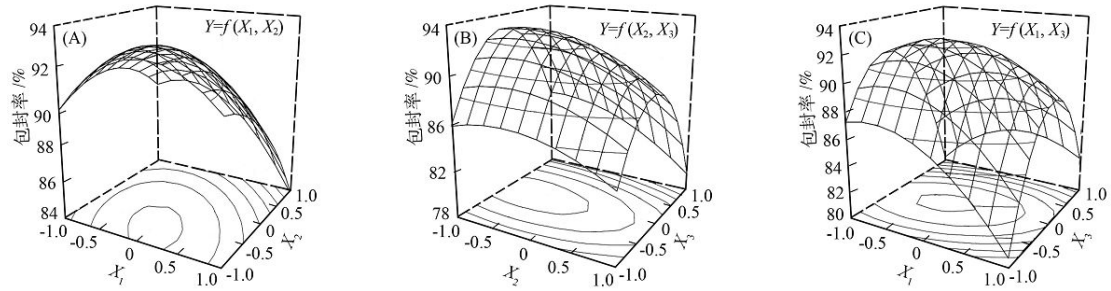


图 2 响应面和等高线图

Fig.2 Responsive surfaces and contours

2.4 人工神经网络模型结果

人工神经网络模型结果如图 3 所示。由图 3 可见，第 11 个节点 D_a 值最大。当隐藏的节点数目设定为 11 时，优化后的神经网络模型的决定系数 (R^2) 为 0.9516，表明了人工神经网络模型可靠。世代数对拟合度的影响如图 4 所示。由图 4 可见：当世代数为 31 时，拟合度最低；世代数继续增长时，拟合度基本保持不变。通过 GA 获得优化后培养条件的编码值为： $U_1=0.124$ ； $U_2=-0.999$ ， $U_3=0.401$ ；对应的实验值为： $W_1=612.4\text{mg}$ ， $W_2=60.02$ ， $W_3=6.401$ 。在优化后处方条件下的预期包封率为 98.4578%。

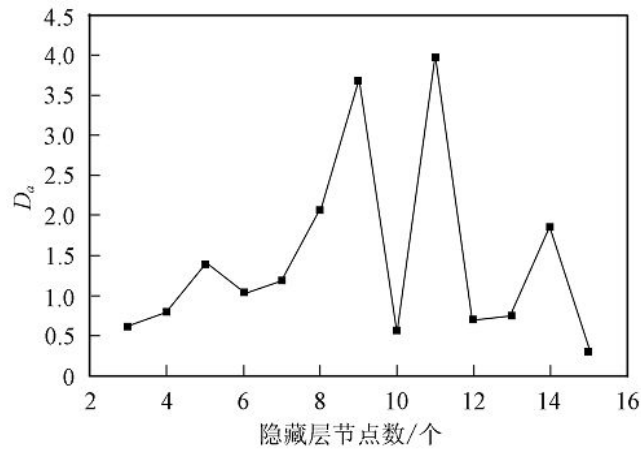


图 3 隐藏层节点数对 D_a 的影响

Fig.3. The effect of the number of hidden nodes on D_a

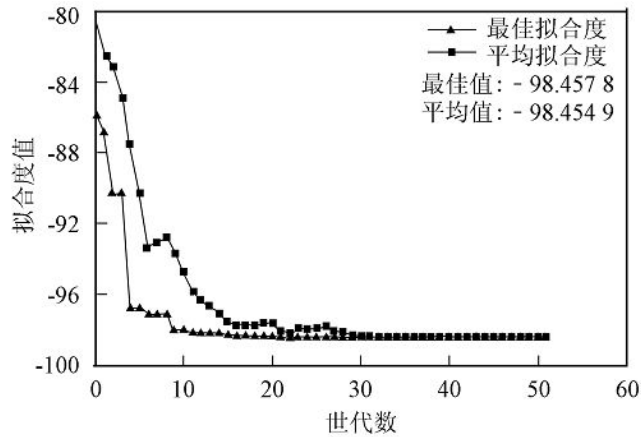


图 4 世代数对拟合度的影响

Figure 4. The effect of the number of generation on fitness

2.5 验证试验结果

多元二次回归模型最优处方制备得到的硝苯地平脂质体平均包封率为 86.54%，与预测值的相对误差为 4.62%。人工神经网络模型最优处方制备得到的硝苯地平脂质体平均包封率为 97.25%，与预测值的相对误差为 0.86%。两组验证试验结果表明，人工神经网络模型更适于制备硝苯地平脂质体。

综上所述，本文采用乙醚注入法制备硝苯地平脂质体，高压均质法进行整粒，在单因素实验基础上，采用 Box-Behnken 设计实验，通过多元二次回归模型和人工神经网络模型结合 GA 算法，考察了 $m(\text{磷脂})$ 、 $m(\text{脂}):m(\text{药})$ 、 $m(\text{胆固醇}):m(\text{磷脂})$ 对脂质体包封率的影响。结果表明，与多元二次回归模型相比，人工神经网络模型更适于制备硝苯地平脂质体，优化后最优处方为 $m(\text{磷脂})=612.4\text{mg}$ ， $m(\text{脂}):m(\text{药})=60.02$ ， $m(\text{胆固醇}):m(\text{磷脂})=1:6.401$ ，其包封率为 97.25%。

参考文献

- [1] 姜斯博, 石晓东, 周新腾. 硝苯地平控释片临床应用与优势[J]. 首都医药, 2010,(10):25-26. JIANG Si-bo, SHI Xiao-dong, ZHOU Xin-teng. The Clinical Application and Advantages of Nifedipine Controlled Release Tablets[J]. Capital Medicine. 2010,(10):25-26.
- [2] Morel O, O M, Morel O, et al. Effects of Nifedipine-induced Pulmonary Vasodilatation on Cardiac Receptors and Protein Kinase C Isoforms in the Chronically Hypoxic Rat[J]. Pflügers Archiv, 2003, 446(3):356-364.
- [3] 杨鹏波, 张华. 脂质体的研究新进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(7):936-939. (YANG Peng-bo, ZHANG Hua. New Progress of Research of Liposome[J]. Journal of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, 2013, 37(7):936-939.)
- [4] Chang H I, Yeh M K. Clinical Development of Liposome-based Drugs: Formulation, Characterization, and Therapeutic Efficacy[J]. International Journal of Nanomedicine, 2012, 7: 49.

- [5] Husseini GA, Mjalli FS, Pitt WG, et al. Using Artificial Neural Networks and Model Predictive Control to Optimize Acoustically Assisted Doxorubicin Release from Polymeric Micelles[J]. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2009, 8(6):479-488.
- [6] MATLAB 遗传算法工具箱及应用[M]. 西安电子科技大学出版社, 2005. (MATLAB Genetic Algorithm Toolbox and Application[M]. Xidian University Press, 2005.)
- [7] 姚新武, 刘长霞, 张鹏. 响应面法优化龙胆苦苷脂质体的复乳法制备工艺[J]. *北京化工大学学报: 自然科学版*, 2012, 39(2): 68-73. (YAO Xin-wu, LIU Chang-xia, ZHANG Peng. Response Surface Methodology to Optimize the Double-emulsion Method for Gentiopicroside Liposomes Preparation[J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology(Natural Science Edition)* 2012, 39(2): 68-73.)
- [8] 钟志容, 刘中兵, 张志荣, 等. 中心组合设计法优化前阳离子脂质体的制备工艺[J]. *中国药科大学学报*, 2007, 38(2): 115-119. (ZHONG Zhi-rong, LIU Zhong-bing, ZHANG Zhi-rong, et al. Optimization of the Preparation of Procationic Liposomes by Central Composite Design[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2007, 38(2): 115-119.)
- [9] 穆筱梅, 梁世强. 脂质体的制备方法及其研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(7): 1784-1786. (MU Xiao-mei, LIANG Shi-qiang. Preparation of Liposomes and Progress[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2008, 19(7): 1784-1786.)
- [10] 文君, 崔生法, 肖亚宝等. 高效液相色谱法测定24h型硝苯地平缓释片释放度[J]. *中国现代应用药学杂志*. 2003, 20(1):36-37. (WEN Jun, CUI Sheng-fa, XIAO Ya-bao, et al. Determination of Release Rate of 24h Nifedipine Sustained-release Tablets by HPLC[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*. 2003, 20(1):36-37.)