

星点设计-效应面法优化柚皮素包合物的制备工艺

王章姐¹, 李晶晶¹, 胡容峰^{*2,3}

(1. 安徽新华学院 药学院, 安徽 合肥 230088; 2. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230031; 3. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230038)

摘要: 研究星点设计-效应面法优化柚皮素- β -环糊精(NAR- β -CD)包合物的制备工艺。采用搅拌法制备 NAR- β -CD 包合物, 以 β -CD 与 NAR 的投料质量比、包合时间、包合温度为自变量, 以包封率、包合物得率为因变量, 采用星点设计-效应面优化法, 对结果进行多元线性回归和二项式拟合, 经效应面法预测最佳工艺条件, 并作验证试验。并比较 NAR- β -CD 包合物和 NAR 的累积溶出率。NAR- β -CD 包合物的最佳工艺: β -CD 与 NAR 投料质量比为 5:1, 包合时间为 1.412 h, 包合温度为 48.11 $^{\circ}\text{C}$ 。包合率和包合物得率预测值与理论值的偏差分别为 1.43%、1.99%。NAR 和 NAR- β -CD 包合物的累积溶出率分别为 37.15%, 为 83.24%。

关键词: NAR; β -环糊精; 包合率; 包合物得率; 星点设计; 效应面

中图分类号: TS 23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)04—0438—05

Application of the Central Composite Design and Response Surface Methodology to the Preparation Optimization of Naringenin- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes

WANG Zhangjie¹, LI Jingjing¹, HU Rongfeng^{*2,3}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Xinhua College, Hefei 230088, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 3. Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine in Anhui Province, Hefei 230038, China)

Abstract: The central composite design and response surface methodology were applied to optimize the preparation technology of naringenin- β -cyclodextrin inclusion complexes. The inclusion ratio and the yield of inclusion complexes were studied as independent variables, using several dependent variables such as stirring, the mass ratio of NAR- β -CD, inclusion time, and inclusion temperature. The results were fitted by linear equations and second-order polynomial equation based on the central composite design and response surface method. The optimal inclusion process was predicted according to formulation and further verified by experiments. The cumulative dissolution rates of the NAR- β -CD inclusion complexes and the NAR were comparatively studied. The optimal condition

收稿日期: 2014-11-19

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(KJ2016A312); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201312216024); 安徽新华学院校级科研项目(2013zr008); 安徽新华学院校级质量工程项目(2013jgkcx02)。

作者简介: 王章姐(1982—), 女, 安徽安庆人, 理学硕士, 讲师, 主要从事药物新剂型研究。E-mail: 40462634@qq.com

* 通信作者: 胡容峰(1965—), 女, 理学博士, 教授, 主要从事缓控释制剂技术研究。E-mail: hurongfeng@163.com

for the preparation of NAR- β -CD inclusion complexes was achieved with a ratio of 5:1 (β -CD:NAR), inclusion time of 1.412 h, and inclusion temperature at 48.11 °C, where the bias for the prediction value and theoretical value of the inclusion ratio and the yield of inclusion complexes were 1.43% and 1.99%, while the cumulative dissolution rate of NAR and NAR- β -CD inclusion complexes were 37.15% and 83.24%, respectively.

Keywords: Naringenin, β -cyclodextrin, inclusion ratio, yield of the inclusion complexes, central composite design, response surface

柚皮素(naringenin, NAR)是一种二氢黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗炎、镇咳、抗氧化等多方面生物活性^[1-3],但 NAR 水溶性和脂溶性均较差、口服生物利用度较低,故其口服制剂在临床上应用受到了限制。目前包合物的制备多采用正交设计或均匀设计法进行优化,虽然实验设计相对简单,实验次数较少,但精密度低。星点设计-效应面法是国内近年来常用的集统计学和数学方法于一体的实验设计和优化方法,通过线性回归和二项式拟合获得最佳工艺参数^[4-5]。作者采用星点设计-效应面法优化 NAR- β -CD 包合物的制备工艺,并考察了 NAR 和 NAR- β -CD 包合物的累积溶出率。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

NAR 原料药(批号 HK20131222,质量分数 98%,陕西慧科植物开发有限公司产品);NAR 对照品(批号 110722-201018,中国药品生物制品检定所产品); β -环糊精(上海源叶生物科技有限公司产品);乙醇等其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

DF-101S 型智能集热式恒温加热磁力搅拌器:河南省予华仪器有限公司产品;SHZ-DI-II 型循环水式真空泵:浙江黄岩求精真空泵厂产品;UV-2550 紫外-可见分光光度计:日本岛津公司产品;Autoscience AS3120 超声波清洗机:奥特赛恩斯仪器有限公司产品;BT125D 电子分析天平:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产品;DZF1.0 型真空干燥箱:上海长源仪器设备厂产品;CP2115D 电子天平:Satorius 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 NAR- β -CD 包合物的制备

称取适量 β -

CD 溶于水中,加热溶解制成 β -CD 饱和水溶液,备用。称取一定量 NAR 原料药,加入适量体积分数 70%乙醇,置恒温磁力搅拌中,加入 β -CD 饱和水溶液,磁力加热搅拌一定时间,静置,放入冰箱中冷藏 24 h,真空抽滤,用无水乙醇多次洗涤滤饼,干燥,得到橙黄色固体即为 NAR- β -CD 包合物^[6]。

1.3.2 对照品储备液的制备 取在 105 °C 干燥至恒重的 NAR 对照品 20 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加体积分数 70%乙醇适量,摇匀使溶解,再加体积分数 70%乙醇至刻度,精密量取 5 mL 置 50 mL 量瓶中,加体积分数 70%乙醇稀释至刻度,即得 20 mg/L 对照品溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 取 NAR- β -CD 包合物适量,加体积分数 70%乙醇溶解配成一定质量浓度的供试品溶液。

1.3.4 紫外检测波长的扫描 精密量取 NAR 对照品溶液适量,在 200~600 nm 波长范围内进行全波长扫描,选取最大吸收波长作为 NAR 含量测定时的检测波长。

1.3.5 评价指标 以 NAR- β -CD 包合物包合率(Y_1)和包合物得率(Y_2)评价指标。 Y_1 =包合物中 NAR 的质量/投入 NAR 的质量; Y_2 =干燥包合物的质量/(β -CD 的质量+NAR 的质量)

1.3.6 星点设计-效应面法优化工艺 通过前期预实验选择出对包合率、包合物得率有影响的 3 个因素为自变量: β -CD 与 NAR 的投料质量比(X_1)、包合时间(X_2)、包合温度(X_3),并分别进行单因素实验,从而确定 3 个自变量水平范围分别为 X_1 :1:1~6:1; X_2 :0.5~5 h; X_3 :40~80 °C。根据星点设计原理,每个因素设置 5 个水平,分别用 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α 表示,本实验中 $\alpha=1.682$ 。星点设计因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2^[7]。

表 1 星点设计因素水平表

Table 1 Independent variables and levels

水平	因素		
	投料质量比(X_1)	包合时间(X_2)	包合温度(X_3)
-1.682	1	0.5	40
-1	2	1.412	48.11
0	3.5	2.75	60
1	5	4.088	71.89
1.682	6	5	80

表 2 星点设计表与结果

Table 2 Experiment design and results

序号	投料质量比(X_1)	包合时间(X_2)	包合温度(X_3)	包合率(Y_1)	包合物得率(Y_2)
1	-1.00	-1.00	-1.00	74.68	51.04
2	1.00	-1.00	-1.00	76.41	57.35
3	-1.00	1.00	-1.00	82.04	60.42
4	1.00	1.00	-1.00	89.42	65.29
5	-1.00	-1.00	1.00	77.54	57.85
6	1.00	-1.00	1.00	83.15	61.54
7	-1.00	1.00	1.00	88.39	62.57
8	1.00	1.00	1.00	93.24	63.52
9	-1.682	0.00	0.00	69.26	51.47
10	1.682	0.00	0.00	94.76	62.48
11	0.00	-1.682	0.00	74.18	53.24
12	0.00	1.682	0.00	95.93	69.97
13	0.00	0.00	-1.682	84.63	58.71
14	0.00	0.00	1.682	92.25	66.08
15	0.00	0.00	0.00	95.73	70.17
16	0.00	0.00	0.00	94.73	68.47
17	0.00	0.00	0.00	95.15	68.92
18	0.00	0.00	0.00	96.29	69.72
19	0.00	0.00	0.00	96.02	69.19
20	0.00	0.00	0.00	94.67	67.28

2 结果与分析

2.1 NAR 的含量测定

2.1.1 紫外检测波长的确定 经全波长扫描,结果显示 NAR 在 288 nm 和 322 nm 处有最大吸收波长,由于 β -CD 在 288 nm 处也有吸收,为避免处方中 β -CD 的干扰,故选用 322 nm 处作为 NAR 含量测定时的检测波长。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密量取 NAR 对照品储备液 3、4、5、6、7、8 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入体积分数 70% 乙醇至刻度,得到 6、8、10、12、14、16 mg/L 的对照品溶液。以 70% 乙醇为空白对照溶液,

照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版一部附录 VA)试验,在 322 nm 波长处测定吸光度。以对照品浓度 C 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制 NAR 的标准曲线,得回归方程 $A=0.0521C+0.0350$, $r=0.9927$,表明 NAR 在 6~16 mg/L 范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度试验 配制高、中、低 3 个质量浓度(14、10、6 mg/L)的 NAR 对照品溶液,对 NAR 进行日间和日内差别的测定。日内精密度 RSD 分别为 1.68%、2.31%、1.96%($n=5$); 日间精密度 RSD 分别为 1.25%、2.42%、2.37%($n=5$),结果显示本方法精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取供试品溶液,每隔 5 min 测定一次,记录吸光度,连续测定 6 次,计算 NAR 吸光度的 RSD 为 1.06%,表明供试品溶液在 30 min 内稳定。

2.1.5 重复性试验 取 NAR- β -CD 包合物 6 份,平行配制成供试品溶液进行测定,连续测定,记录吸光度,计算 NAR 的 RSD 为 0.92%,表明该方法重复性较好。

2.1.6 回收率试验 按处方量的 80%、100%、120% 加入 NAR 对照品,平行制备 3 份,测定样品中 NAR 的量,计算回收率。结果平均回收率分别为 98.42%、98.85%、99.14%,RSD 分别为 1.83%、2.36%、2.49%。

2.2 星点设计-效应面法优化工艺

2.2.1 模型拟合 采用 Design Expert 8.05 软件,分别对各因素水平进行多元线性回归和非线性回归(二项式公式拟合),多元线性回归方程:包合率 $C=87.42+4.57A+5.70B+2.39C$, $r=0.729$; 包合物得率 $Y_2=62.76+2.51A+3.82B+1.74C$, $r=0.665$; 多元线性回归方程相关系数均较低,表示自变量与因变量之间线性相关性较差,多元线性回归拟合度不佳,预测性较差,故采用二项式拟合。二项式拟合模型为包合率 $Y_1=95.48+4.57A+5.70B+2.39C+0.61AB+0.17AC+0.071BC-5.05A^2-3.97B^2-2.78C^2$, $r=0.964$; 包合物得率 $Y_2=68.95+2.51A+3.82B+1.74C-0.52AB-0.82AC-1.33BC-4.21A^2-2.57B^2-2.29C^2$, $r=0.982$ 。两个二项式拟合方程的相关系数分别是 0.964 和 0.982,表明此设计模型拟合程度良好,可以用此模型对 NAR 包合物工艺进行预测和分析。

2.2.2 效应面优化 由 Design Expert 8.05 软件绘制不同影响因素对于响应值的三维曲线,分别固定

投料质量比、包合时间和包合温度 3 个影响因素其中之一,考察其他 2 个因素对包合率、包合物得率的效应曲面图,结果见图 1。根据方程和响应面图确

定 NAR 包合物的最优工艺参数: β -CD 与 NAR 投料质量比为 5:1,包合时间为 1.412 h,包合温度为 48.11 $^{\circ}\text{C}$ 。

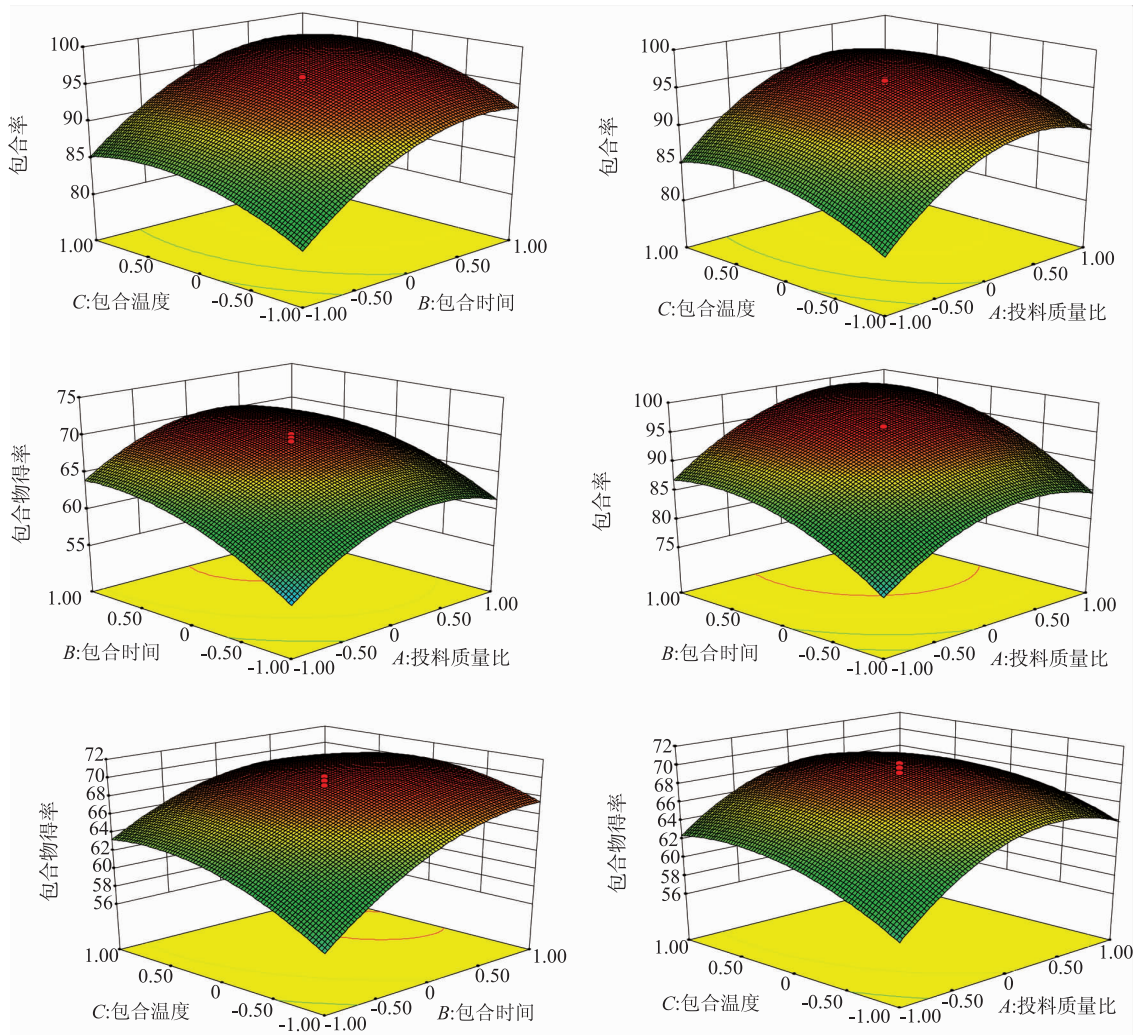


图 1 包合率,包合物得率的效应面的三维图

Fig. 1 Response surface plot (3D) of the bias for the inclusion ratio and inclusion complexes yield

2.3 验证试验

根据优化的最佳工艺条件,平行进行 3 组 NAR 包合物验证试验,并对包合率和包合物得率进行测定,结果见表 3。其中偏差=(预测值-实测值)/预测值。通过验证实验可知,星点设计-效应面法所建立的模型预测性良好,方法可行,可较好地应用于 NAR 包合物的工艺优化。

2.4 NAR- β -CD 包合物溶出度测定

按中国药典 2010 年版(第二部)溶出度测定法第三法测定 NAR- β -CD 的体外溶出度。以 100 mL 人工胃液(含质量分数 2%PEG400)作为溶出介质,并设定溶出介质温度恒定在在 $(37\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,再将

表 3 星点设计-效应面优化法验证

Table 3 Verification of the Central composite design - response surface methodology

指标	包合率/%	包合物得率/%
预测值	79.46	56.86
真实值	78.32	55.73

NAR- β -CD 包合物及 NAR 分别置于相同的溶出介质中,设置转速为 100 r/min,于 5,10,15,30,45,60,70,90 min 吸取溶出液 10 mL,并补充等体积含质量分数 2%PEG400 的溶出介质,用微孔滤膜过滤,取续滤液按 2.2 项下含量测定方法进行测定,计算出不同时间 NAR 的累积释药率,

结果见图 2。

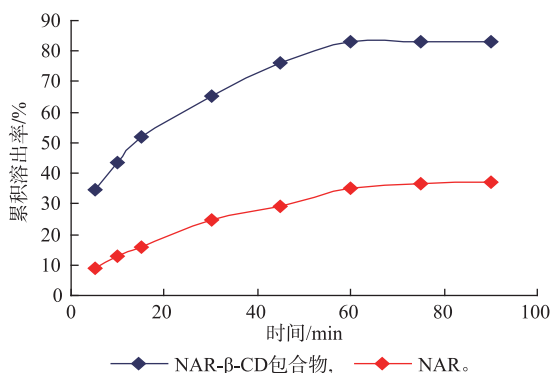


图 2 NAR 及 NAR- β -CD 包合物的累积溶出曲线

Fig. 2 In vitro release curve of NAR and NAR- β -CD

3 结 语

将药物分子与 β -CD包合材料通过范德华力形成包合物后,可使溶解度增大,稳定性提高,毒副作用降低等作用,还可调节药物在体内的释放速率,有效提高药物生物利用度,可用于制备缓控释制剂和靶向制剂。

参考文献:

- [1] Fa Yun Zhang, Gang Jun Du, Ling Zhang, et al. Naringenin enhances the anti-tumor effect of doxorubicin through selectively inhibiting the activity of multidrug resistance-associated proteins but not P-glycoprotein [J]. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26(4): 914-925.
- [2] Feng-Lin Yen, Tzu-Hui Wu, Liang-Tzung Lin, et al. Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-Induced acute liver failure [J]. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26(4): 893-902.
- [3] 杨宏亮, 田珩, 李沛波, 等. 柚皮苷及柚皮素的生物活性研究[J]. *中药材*, 2007, 30(6): 752-754.
YANG Hongliang, TIAN Heng, LI Peibo, et al. Investigate on the biological activities of Naringin and Naringenin[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30(6): 752-754. (in Chinese)
- [4] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计-效应面法在药学试验中的应用[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2007, 24(6): 455-457.
LIU Yanjie, XIANG Rongwu. Application of central composite design/response surface methodology in pharmacy experiment design[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2007, 24(6): 455-457. (in Chinese)
- [5] 李颖, 曾茂贵, 郑笈, 等. 星点设计-效应面法优化鱼腥草挥发油- β -环糊精包合物的制备工艺[J]. *中草药*, 2014, 45(13): 1855-1862.
LI Ying, ZENG Maogui, ZHEN Ji, et al. Optimization of preparation of volatile oil from Houttuynia Herba- β -cyclodextrin inclusion complex by central composite design-response surface method [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(13): 1855-1862. (in Chinese)
- [6] 徐新荣, 于海涛, 杭丽, 等. 柚皮素 β -环糊精包合物的制备及对模型大鼠脉络膜新生血管形成的抑制作用[J]. *中国药房*, 2014, 25(11): 981-984.
XU Xinrong, YU Haitao, HANG Li, et al. Preparation of inclusion complex of naringenin and β -cyclodextrin and inhibitory effects of it on choroidal neovascularization in model rats[J]. *China Pharmacy*, 2014, 25(11): 981-984. (in Chinese)
- [7] Wu W, Cui G H. Central composite design and response surface method and its application in pharmacy [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Pharmacy*, 2000, 27(5): 292-298.