

# 中心组合设计-效应面法优化香青兰 总黄酮磷脂复合物的制备工艺

胡宇飞<sup>1</sup>, 刘宣麟<sup>2</sup>, 何承辉<sup>2</sup>, 黄伟<sup>3</sup>, 邢建国<sup>2\*</sup>

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;  
3. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所药物制剂研究室, 北京 100050)

**[摘要]** 目的: 优选香青兰总黄酮磷脂复合物的制备工艺。方法: 采用溶剂挥发法制备香青兰总黄酮磷脂复合物, 通过单因素试验考察反应溶剂、反应时间、反应温度、香青兰总黄酮与大豆磷脂投料比、香青兰总黄酮质量浓度对复合率的影响。以香青兰总黄酮与大豆磷脂投料比、香青兰总黄酮质量浓度和反应时间为自变量, 复合率为因变量, 采用星点中心组合设计优选制备工艺, 通过数学方程拟合, 根据最佳数学模型描绘效应面, 确定最佳处方工艺并进行验证试验。结果: 最佳制备工艺条件为反应温度 40 ℃, 以甲醇-二氧六环 (7:3) 混合溶液为反应溶剂, 磷脂-香青兰总黄酮 (2:1), 香青兰总黄酮质量浓度 15 g·L<sup>-1</sup>, 反应时间 2 h; 复合率实际值 (96.42 ± 1.58)%, 与预测值 96.18% 的偏差 < 2%。结论: 优选的制备工艺稳定可行, 可用于工业生产制备。

**[关键词]** 香青兰总黄酮; 磷脂复合物; 中心组合设计; 效应面法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 10-0036-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100036

## Optimization on Preparation Process of Total Flavonoids from *Dracocephalum moldevica*-phospholipids Complex by Central Composite Design and Response Surface Methodology

HU Yu-fei<sup>1</sup>, LIU Xuan-lin<sup>2</sup>, HE Cheng-hui<sup>2</sup>, HUANG Wei<sup>3</sup>, XING Jian-guo<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. The Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China;

3. Department of Pharmaceutics, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of  
Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize preparation process of total flavonoids from *Dracocephalum moldevica*-phospholipids complex. **Method:** Solvent evaporation method was adopted to prepare total flavonoids from *D. moldevica*-phospholipids complex. Based on single factor tests, with recombination rate as dependent variable, central composite design was adopted to optimize preparation technology by taking reaction time, ratio of total flavonoids to phospholipids and the concentration of total flavonoids as independent variables, fitting of various mathematical equations were performed using a statistical software of Design-Expert 8.0.6. Preparation parameters were optimized through response surface plotted by optimum fitting equations, optimized procedure was validated through experimental preparation of total flavonoids-phospholipids complex. **Result:** Optimum preparation technology was as following: reaction temperature 40 ℃, with methanol-dioxane (7:3) as a reaction solvent,

**[收稿日期]** 20131219(019)

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区科技基础条件平台建设项目 (PT1304)

**[第一作者]** 胡宇飞, 在读硕士, 从事新药新制剂与新剂型研究, Tel: 18109939076, E-mail: huyufei0993@163.com

**[通讯作者]** \* 邢建国, 研究员, 硕士生导师, 从事中药民族药新制剂与新剂型研究, Tel: 0991-2300682, E-mail: xjguodd@163.com

ratio of phospholipids to total flavonoids of 2:1, total flavonoids concentration of  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and reaction time 2 h; Under these conditions, recombination rate was up to  $(96.42 \pm 1.58)\%$ , which had deviation of  $< 2.0\%$  between the observed value of recombination rate. **Conclusion:** Optimized preparation technology was feasible, reliable and suitable for industrial production of total flavonoids from *D. moldevica*-phospholipids complex.

[**Key words**] total flavonoids from *Dracocephalum moldevica*; phospholipids complex; central composite design; response surface methodology

香青兰 *Dracocephalum moldevica* L. 为新疆地产维吾尔药,民间药用历史悠久,始载于维吾尔医籍《阿里卡农》<sup>[1]</sup>。其主要有效成分为黄酮类化合物,具有明确的心肌保护作用<sup>[2]</sup>。但香青兰总黄酮水溶性差,肠道渗透性不好,口服吸收差,生物利用度低<sup>[3]</sup>。磷脂复合物是用于改善黄酮类化合物口服生物利用度的一种新型给药系统,通过改变黄酮类成分的晶体特征和油水分配系数以改善其溶解性能,同时利用磷脂对细胞膜的亲和性,改善口服吸收,提高口服生物利用度<sup>[4]</sup>。本实验在单因素试验基础上,结合中心组合设计非线性数学模型优选香青兰总黄酮磷脂复合物的制备工艺,为其制剂学研究和开发应用提供实验依据。

## 1 材料

UV-2501PC 型紫外分光光度仪(日本岛津制造所),DZF 型真空干燥箱(北京市永光明医疗仪器厂),DK-20 型水浴恒温磁力搅拌器(金坛市文华仪器有限公司),BS110S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。香青兰总黄酮(新疆加斯特药业),田蓟苷对照品(新疆药物研究所,纯度 98%,批号 20070308),SPC-50 大豆卵磷脂(江苏曼氏生物科技有限公司),水为去离子水,试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果<sup>[5]</sup>

**2.1 香青兰总黄酮磷脂复合物的制备** 精密称取适量大豆卵磷脂溶于 30 mL 溶剂中,按一定比例加入香青兰总黄酮,水浴恒温搅拌,减压蒸馏除去溶剂,加入二氯甲烷使溶解,经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,滤液减压回收二氯甲烷,低温真空干燥 24 h,即得。

### 2.2 制备工艺考察指标<sup>[6]</sup>

**2.2.1 质量评价** 利用香青兰总黄酮几乎不溶于二氯甲烷,而磷脂和香青兰总黄酮磷脂复合物均易溶于二氯甲烷的理化特性,分离未复合香青兰总黄酮和香青兰总黄酮磷脂复合物。精密量二氯甲烷连续滤液取 5 mL 于  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  减压旋干,加适量甲醇-二氧六环(1:1)溶解并转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇-二氧六环(1:1)稀释至刻度,采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,计算复合率。

$$\text{复合率} = m_1 / m_2 \times 100\%$$

式中: $m_1$  为初始投药的总黄酮质量, $m_2$  为磷脂复合物中总黄酮质量。

**2.2.2 香青兰总黄酮的含量测定** 精密称取干燥至恒重的田蓟苷对照品适量,加甲醇-二氧六环(1:1)配制  $244 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液,备用。另精密称取香青兰总黄酮磷脂复合物和磷脂适量,分别配制成适宜质量浓度的溶液,采用紫外分光光度法于 200 ~ 400 nm 扫描。结果表明香青兰总黄酮磷脂复合物溶液和田蓟苷对照品溶液在 324 nm 处有最大吸收,而磷脂溶液在此波长处则无紫外吸收,说明测定无干扰。精密量取田蓟苷对照品溶液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中,加甲醇-二氧六环(1:1)稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液,以相应试剂为空白,于 324 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程  $A = 0.0479C + 0.016$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 2.44 ~  $19.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.3 单因素试验考察<sup>[7-8]</sup>

**2.3.1 反应溶剂比例** 参照 2.1 项下复合物制备方法,设定香青兰总黄酮与大豆磷脂的投料比 1:2,反应物质量浓度  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,反应温度  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,反应时间 2 h,考察甲醇-二氧六环(3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2)不同比例混合溶剂对复合率的影响,计算复合率分别为 83.32%, 86.17%, 90.04%, 90.44%, 95.54%, 77.20%。

**2.3.2 反应时间** 参照 2.1 项下复合物制备方法,固定其余影响因素,考察不同反应时间(0.5, 1, 2, 3, 4 h)对复合率的影响,计算复合率分别为 89.55%, 91.53%, 95.90%, 96.36%, 95.97%, 结果表明反应时间对复合率的影响较大,2 h 后药物复合率达平衡,过长反应时间不利于复合率的提高。

**2.3.3 反应温度** 参照 2.1 项下复合物制备方法,固定其余影响因素,考察不同反应温度(25, 30, 40, 50,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ )对复合率的影响,计算复合率分别为 90.74%, 92.55%, 96.17%, 95.81%, 95.70%, 结果表明  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  时复合率最高,考虑到过高反应温度可能

会加速磷脂的氧化,故选择反应温度 40 ℃。

**2.3.4 磷脂与香青兰总黄酮的投料比** 参照 2.1 项下复合物制备方法,固定其余影响因素,考察磷脂与香青兰总黄酮不同投料比(1:3,1:2,1:1,2:1,3:1,4:1)对复合率的影响,计算复合率分别为 61.52%, 74.58%, 80.14%, 95.63%, 96.14%, 96.37%。结果表明复合率受投料比的影响较大,当投料比为 2:1 时达较高值,之后再增加磷脂用量时,复合率升高不显著;当磷脂加入量 > 3:1 时,复合物会出现黏结。

**2.3.5 反应物质量浓度** 参照 2.1 项下复合物制备方法,固定其余影响因素,考察不同反应物质量浓度(10,15,20,25,30 g·L<sup>-1</sup>)对复合率的影响,计算复合率分别为 96.47%, 95.95%, 93.35%, 92.14%, 87.73%,表明复合率随反应物质量浓度的升高呈下降趋势。

**2.4 制备工艺的优化**<sup>[9-12]</sup>

**2.4.1 试验设计** 在单因素试验基础上,选取磷脂-香青兰总黄酮、香青兰总黄酮质量浓度及反应时间为考察因素,以香青兰总黄酮与磷脂的复合率为评价指标,因素水平表见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 香青兰总黄酮磷脂复合物制备工艺中心组合设计因素水平

编码水平	X <sub>1</sub> 磷脂-香青兰总黄酮	X <sub>2</sub> 香青兰总黄酮质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	X <sub>3</sub> 反应时间/h
-1.732	0.5	10	1
-1	1.03	13.17	1.03
0	1.75	17.50	2
1	2.47	21.83	2.47
1.732	3	25	3

**2.4.2 模型拟合** 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行分析,结果显示线性拟合与二次多项式拟合 P 均 < 0.000 1, r 分别为 0.853 4, 0.994 1, 两因素相互作用拟合 P = 0.876 9, 更高次项拟合 P = 0.253 3, 故采用二次多项式模型进行拟合。以评价指标对各因素进行二次多项式拟合,得回归方程  $Y = 61.76 + 20.04X_1 - 0.45X_2 + 15.39X_3 + 0.29X_1X_2 + 0.73X_1X_3 - 0.10X_2X_3 - 5.53X_1^2 - 0.00708X_2^2 - 3.65X_3^2$  (r = 0.994 1, P < 0.000 1)。该方程经 F 检验显示二次多项式拟合的模型具有显著性,失拟性检验 (P = 0.194 3 > 0.05) 不显著,表明回归模型的拟合情况良好,代表性强,能准确的预测实际情况,校正决定系数 (R<sub>adj</sub>) = 0.988 8,表明此模型能解释 98.88% 效应值变化,从表 3 可以看出因

表 2 香青兰总黄酮磷脂复合物制备工艺中心组合设计试验安排

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	复合率/%
1	-1	-1	-1	86.35
2	1	-1	-1	94.25
3	-1	1	-1	82.47
4	1	1	-1	93.74
5	-1	-1	1	87.36
6	1	-1	1	96.21
7	-1	1	1	82.25
8	1	1	1	95.02
9	-1.732	0	0	76.40
10	1.732	0	0	95.31
11	0	-1.732	0	97.67
12	0	1.732	0	90.51
13	0	0	-1.732	91.07
14	0	0	1.732	90.60
15	0	0	0	93.15
16	0	0	0	94.68
17	0	0	0	93.82
18	0	0	0	94.71
19	0	0	0	94.74
20	0	0	0	93.93

表 3 二项式回归模型系数显著性检验

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	576.89	9	64.10	93.40	<0.000 1
X <sub>1</sub>	386.33	1	386.33	562.91	<0.000 1
X <sub>2</sub>	38.09	1	38.09	55.50	<0.000 1
X <sub>3</sub>	0.74	1	0.74	1.08	0.323 9
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	6.64	1	6.64	9.68	0.011 0
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.75	1	0.75	1.09	0.320 4
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.46	1	0.46	0.66	0.434 0
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	130.43	1	130.43	190.04	<0.000 1
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.28	1	0.28	0.40	0.539 3
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	23.35	1	23.35	34.03	0.000 2

素 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> 对复合率的影响存在显著性差异,而因素 X<sub>3</sub> 对复合率的影响较小,不具有显著性差异,因素 X<sub>1</sub> 与 X<sub>2</sub> 交互作用对复合率的影响显著,而因素 X<sub>3</sub> 与另 2 个因素交互作用对复合率的影响较小。

**2.4.3 效应面优化与估测** 以其中 1 个因素为中心值,代入方程,以拟合的目标函数为数学模型,绘制因变量的响应图,见图 1。结果表明在一定范围内,因素 X<sub>1</sub>, X<sub>3</sub> 与香青兰总黄酮与磷脂的复合率呈

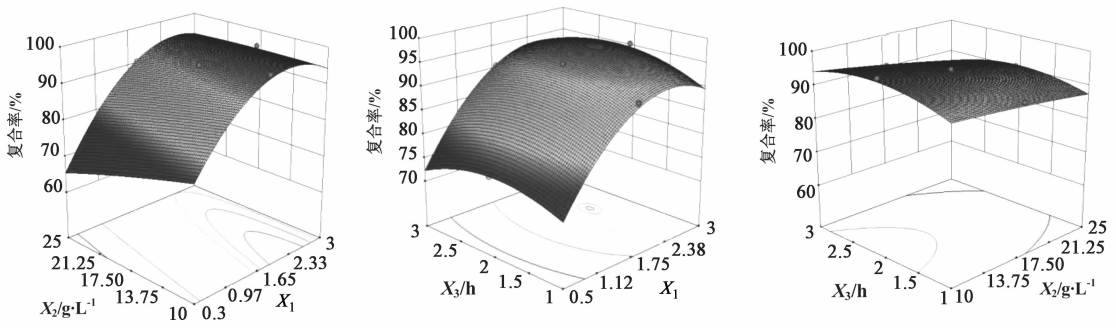


图1 香青兰总黄酮磷脂复合物制备工艺中各因素交互作用的响应曲面及等高线

正相关, $X_2$  则呈负相关,将各效应面的较优区域进行重叠,得香青兰总黄酮磷脂复合物的较优工艺范围为  $X_1$  2:1 ~ 2.5:1,  $X_2$  10 ~ 15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $X_3$  1.8 ~ 2.4 h,综合工业可行性及投入产出比考虑,确定最佳制备工艺为磷脂-香青兰总黄酮(2:1),主药质量浓度 15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,反应时间 2 h。

**2.4.4 验证试验** 称取香青兰总黄酮 450 mg,按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,取均值与二项式方程预测值相比较,结果磷脂复合物的复合率实际值( $96.42 \pm 1.58$ )%,与预测值 96.18% 的偏差 < 2%,说明二项式模型拟合效果良好,可信度高。

### 3 讨论

文献调研发现复合物中总黄酮的定量分析常采用质量法或紫外法测定,质量法虽能准确评价总黄酮整体的复合情况,但不能对复合物中总黄酮含量进行评价,为有效控制香青兰总黄酮磷脂复合物的质量,本文采用紫外分光光度法测定总黄酮含量。

以复合率为评价指标时,反应溶剂性质对评价指标的影响与香青兰总黄酮在溶剂中溶解度有关。以常用的丙酮、二氯甲烷、无水乙醇、四氢呋喃等单一溶剂为反应溶剂时,香青兰总黄酮磷脂复合物复合率较低(均 < 60%),原因可能为溶剂中香青兰总黄酮浓度较低,与磷脂发生相互作用的机率相对较小。近似溶解度试验结果表明香青兰总黄酮极微溶于甲醇和二氧六环,而略溶于甲醇和二氧六环的混合溶剂中,表明甲醇和二氧六环的混合溶剂是香青兰总黄酮的潜溶剂,香青兰总黄酮在混合溶剂中溶解呈峰形曲线,溶解度在甲醇-二氧六环(7:3)混合溶剂中达最大值,说明反应溶剂比例对复合率的影响与香青兰总黄酮在溶剂中溶解度差异相关,推测复合率的差异主要是香青兰总黄酮在溶剂中溶解度差异造成的。

投料比对复合率的影响最显著,随磷脂与香青兰总黄酮的投料比例增大,复合率呈上升趋势。推测原因可能是由于磷脂浓度增大对总黄酮有一定增

溶作用,有利于药物与磷脂间充分反应,生成磷脂复合物,但磷脂含量越大,生成的复合物越黏滞,不利于反应溶剂的蒸发,同时也影响磷脂复合物的干燥。

### [参考文献]

- [1] 刘勇民,沙吾提·伊克木.维吾尔药志.上册[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1985:329.
- [2] 田友清,尚靖,何婷,等.基于中药血清化学及血清药理学方法探讨香青兰保护心肌细胞缺氧/复氧损伤物质基础[J].中国中药杂志,2012,37(5):620.
- [3] 黄志巧.香青兰总黄酮在 Caco-2 细胞吸收特性及大鼠体内药动学研究[D].石河子:石河子大学,2012.
- [4] Singh A, Saharan V A, Singh M, et al. Phytosome: drug delivery system for polyphenolic phytoconstituents [J]. Iran J Pharm Sci, 2011, 7(4): 209.
- [5] 马祖文.香青兰总黄酮口腔崩解片制备工艺及释药机理的研究[D].石河子:石河子大学,2011.
- [6] 杨鸿波,邱国福,梁淑彩,等.银杏磷脂复合物复合率的测定[J].分析测试学报,2005,24(1):106.
- [7] 董自亮,傅超美,徐瑞超,等.二次回归正交旋转组合设计优化白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):53.
- [8] 王英姿,段飞鹏,李彩霞,等.柿叶黄酮磷脂复合物的制备工艺研究[J].中草药,2013,44(22):3136.
- [9] 刘艳杰,项荣武.星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学,2007,24(6):455.
- [10] 冉建明,张发森.响应面法优化淫羊藿黄酮磷脂复合物制备工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):69.
- [11] 丛龙波,王琪,吴素体,等.星点设计-效应面法优化苦参素磷脂复合物制备工艺[J].中药新药与临床药理,2007,18(5):399.
- [12] Tan Q Y, Liu S, Chen X L, et al. Design and evaluation of a novel evodiamine-phospholipid complex for improved oral bioavailability [J]. Pharm Sci Tech, 2012, 13(2):534.

[责任编辑 刘德文]