

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

董自亮^{1,2}, 傅超美^{1*}, 徐瑞超^{1,2}, 高飞¹, 秦郁文², 黄静², 秦少容²

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司, 重庆 408000)

[摘要] 目的: 优选白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺。方法: 采用四因素二次回归正交旋转组合设计方法, 以复合率为指标, 选取投料比、白芷香豆素质量浓度、反应温度、反应时间为考察因素, 优化白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺。结果: 最佳制备工艺为以四氢呋喃为反应溶剂, 白芷香豆素与磷脂投料比例 1:3, 药物质量浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 反应时间 101 min, 复合物结合率达 98.58%。结论: 该优选的制备工艺稳定可行, 为白芷香豆素新制剂的进一步研究提供参考。

[关键词] 白芷香豆素; 磷脂复合物; 二次回归正交旋转组合设计; 制备; 优化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0053-04

[收稿日期] 20121015(026)

[第一作者] 董自亮, 执业药师, 从事药物新剂型、新技术研究, Tel:18225129378, E-mail: dzlcutem@163.com

[通讯作者] * 傅超美, 博士, 教授, 从事中药新剂、新剂型与新技术研究, Tel:028-61800231, E-mail: chaomeifu@126.com

[参考文献]

- [1] 薛胜霞, 金丽琴, 叶发青, 等. 牛膝多糖硫酸酯和磷酸酯衍生物对 A549 细胞的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(6): 406.
- [2] David L Williams, Rose B McNamee, Ernest L Jones, et al. A method for the solubilization of a (1→3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Carbohydr Res, 1991(219): 203.
- [3] 张伟杰, 王鹏, 林茜, 等. 3 种中药多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 19.
- [4] 李雪华, 贾琦. 龙眼肉多糖分离及结构研究[J]. 解放军药学学报, 2009, 25(1): 46.
- [5] 魏学军, 林先燕, 李雪营, 等. 民族药金耳环总多糖的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 41.
- [6] 国家标准局信息分类编码研究所. GB/T22427.11-2008 淀粉及其衍生物磷总含量的测定[S]//全国文献工作标准化技术委员会, 文献工作国家标准汇编. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1.
- [7] Blennow A, Engelsens B, Nielsen H T, et al. Starch phosphorylation; a new front line in starch research[J]. Trends Plant Sci, 2005, 7(10): 445.
- [8] Yuan Huamao, Zhang Weiwei, Li Xuegang, et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives [J]. Carbohydr Res, 2005(340): 685.
- [9] Wang Jing, Zhang Quanbin, Zhang Quanbin, et al. Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro [J]. Int J Biol Macromol, 2009(44): 170.
- [10] Yin Xiulian, You Qinghong, Jiang Zhonghai. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology [J]. Carbohydr Polym, 2011(86): 1358.
- [11] 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.
- [12] 李瑾, 侯淑珍, 王景媛, 等. 响应面分析法优化牛蒡根多糖提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 21.
- [13] 陈晓明, 田庚元. 多糖磷酸酯化的研究进展[J]. 有机化学, 2002, 22(11): 835.

[责任编辑 仝燕]

Optimization of Preparation Technology for Coumarin from *Angelica dahurica* Phospholipid Complex by Quadratic Regression Rotation-orthogonal Combination Design

DONG Zi-liang^{1,2}, FU Chao-mei^{1*}, XU Rui-chao^{1,2},
GAO Fei¹, QIN Yu-wen², HUANG Jing², QIN Shao-rong²

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. Taiji Group Chongqing Fuling Pharmaceuticals Co. Ltd., Chongqing 408000, China)

[Abstract] Objective: To optimize preparation technology of coumarin from *Angelica dahurica* phospholipid complex. **Method:** With recombination rate as index, feeding ratio, the concentration of coumarin from *A. dahurica*, reaction time and temperature were selected as factors, preparation technology of coumarin from *A. dahurica* phospholipid complex was optimized by four factors quadratic regression orthogonal rotation combination design method. **Result:** Optimum preparation technology was as following: with tetrahydrofuran as reaction solvent, proportion of coumarin from *A. dahurica* to phospholipid 1:3, the concentration of coumarin $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, reaction temperature $50 \text{ }^\circ\text{C}$, reaction time 101 min. Recombination rate of the complex was up to 98.58%. **Conclusion:** This optimized preparation technology was stable and feasible, it could provide reference for further study on new preparations of coumarin from *A. dahurica*.

[Key words] coumarin from *Angelica dahurica*; phospholipid complex; quadratic regression rotation-orthogonal combination design; preparation; optimization

白芷始载于《神农本草经》，性温，味苦，归胃、大肠、肺经，具有散风除湿、通窍止痛、消肿排脓等功效，用于治疗感冒头痛、鼻渊、牙痛、疮疡肿痛，对阳明经头痛效果尤为显著^[1-2]，主要有效成分为白芷香豆素^[3-4]。白芷香豆素水溶性及稳定性较差，导致其体内生物利用度较低、吸收差，从而限制了其临床应用。近年研究表明，磷脂与难溶性药物结合而成的复合物可有效提高难溶性药物在体内的吸收，增强其生物利用度。二次回归正交旋转组合设计是一种具有正交、回归和较高饱和度的一种设计方法，可通过较少实验而提供大量信息^[5]。近年来，国内外关于该设计应用的研究报道^[6-7]日渐增多，且取得了良好成效。本实验选择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，为难溶性药物的进一步开发提供依据。

1 材料

TU-1810 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), ZDF 型低温真空干燥箱(南京天利制药设备有限公司), SHJ-A2 型水浴恒温磁力搅拌器(常州华奥仪器制造有限公司), BP-211D 型电子天平(德国 Sartorius)。

欧前胡素对照品(批号 110826-200712, 中国食

品药品检定所), 白芷香豆素(自制, 纯度 > 80%), 大豆卵磷脂(中国医药集团上海化学试剂公司), 试剂均为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 总香豆素的含量测定 采用紫外分光光度法测定。分别取不同质量浓度(5.05, 7.575, 10.1, 12.625, 15.15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的欧前胡素对照品甲醇溶液, 于 300 nm 处测定样品吸光度(A), 以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 0.048X - 0.0112$ ($r = 0.9997$), 线性范围 5.05 ~ 15.15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 该方法回收率(99.8 ± 0.5)%。

2.2 白芷香豆素磷脂复合物的制备及评价 利用白芷香豆素难溶于三氯甲烷, 而白芷香豆素磷脂复合物和磷脂易溶于三氯甲烷的特性, 将一定量白芷香豆素与磷脂在一定条件下(水浴恒温磁力搅拌)反应后, 减压挥干溶剂, 加入适量三氯甲烷, 将其中的磷脂及磷脂复合物充分溶解后, 布氏漏斗过滤, 再用少量三氯甲烷洗涤, 收集沉淀, 减压干燥, 即得复合物。计算白芷香豆素与磷脂的结合率, 即复合率。

2.3 二次回归正交旋转组合设计优化工艺参数

2.3.1 试验设计^[8-10] 在预试验及查阅文献基础上, 发现反应溶剂的类型、白芷香豆素与磷脂投料比

例、药物质量浓度、反应温度、反应时间等因素对制备工艺影响较大,而搅拌速度(暂定为 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)对复合率的影响较小。通过单因素试验考察了三氯甲烷、乙酸乙酯、无水乙醇、四氢呋喃 4 种反应溶剂对复合物结合的影响,发现采用四氢呋喃作为反应溶剂制得的复合物结合率最高 ($>90\%$)。以复合率为指标,根据旋转组合设计的基本原理,设置投料比、白芷香豆素质量浓度、反应温度、反应时间为考察因素,各因素设置 5 个水平,二次回归正交旋转组合设计及结果见表 1。

表 1 白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺二次回归正交旋转组合试验安排

No.	X_1 投料比	X_2 白芷香豆素 质量浓度 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	X_3 反应温度 $/\text{ }^\circ\text{C}$	X_4 反应时间 $/\text{h}$	复合率 $\%$
1	1(1:3)	1(2.0)	1(55)	1(2.5)	78.42
2	1(1:3)	1(2.0)	-1(45)	1(2.5)	82.70
3	1(1:3)	-1(1.0)	1(55)	-1(1.5)	82.04
4	-2(2:1)	0(1.5)	0(50)	0(2.0)	59.99
5	-1(1:1)	1(2.0)	1(55)	1(2.5)	67.43
6	-1(1:1)	-1(1.0)	-1(45)	1(2.5)	56.43
7	0(1:2)	0(1.5)	-2(40)	0(2.0)	73.67
8	0(1:2)	-2(0.5)	0(50)	0(2.0)	72.50
9	1(1:3)	1(2.0)	1(55)	-1(1.5)	92.89
10	1(1:3)	-1(1.0)	-1(45)	1(2.5)	72.45
11	0(1:2)	0(1.5)	0(50)	0(2.0)	87.87
12	-1(1:1)	-1(1.0)	1(55)	-1(1.5)	65.25
13	2(1:4)	0(1.5)	0(50)	0(2.0)	93.86
14	-1(1:1)	-1(1.0)	1(55)	1(2.5)	61.35
15	0(1:2)	0(1.5)	0(50)	0(2.0)	86.42
16	1(1:3)	-1(1.0)	-1(45)	-1(1.5)	81.48
17	-1(1:1)	-1(1.0)	-1(45)	-1(1.5)	60.13
18	0(1:2)	0(1.5)	0(50)	-2(1.0)	80.89
19	1(1:3)	1(2.0)	-1(45)	-1(1.5)	95.32
20	-1(1:1)	1(2.0)	-1(45)	1(2.5)	63.54
21	0(1:2)	0(1.5)	0(50)	2(3.0)	51.72
22	1(1:3)	-1(1.0)	1(55)	1(2.5)	72.36
23	0(1:2)	0(1.5)	2(60)	0(2.0)	87.58
24	-1(1:1)	1(2.0)	-1(45)	-1(1.5)	67.94
25	-1(1:1)	1(2.0)	1(55)	-1(1.5)	71.29
26	0(1:2)	2(2.5)	0(50)	0(2.0)	88.61

2.3.2 回归模型拟合 采用 Design Expert 7.1 软件,对表 1 中试验数据进行回归分析,得各回归模型及各因素之间的相互关系,结果见表 2。在此模型中,一次项 X_1, X_2, X_3, X_4 ,交互项 X_1X_4 ,二次项 $X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2$ 均为显著性影响因子,说明单因素作用对复合率大小的影响较为显著;交互项 $X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_2X_4, X_3X_4$ 的 P 均 >0.05 ,说明其对复合率的影响不显著。

表 2 白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺二次正交旋转组合试验方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
X_1	1 873.37	1	1 873.37	170.44	$<0.000 1$
X_2	418.84	1	418.84	38.10	$<0.000 1$
X_3	62.92	1	62.92	5.72	0.030 3
X_4	600.00	1	600.00	54.59	$<0.000 1$
X_1X_2	12.18	1	12.18	1.11	0.309 2
X_1X_3	34.57	1	34.57	3.15	0.096 4
X_1X_4	56.03	1	56.03	5.10	0.039 3
X_2X_3	6.23	1	6.23	0.57	0.463 4
X_2X_4	5.11	1	5.11	0.46	0.505 8
X_3X_4	0.29	1	0.29	0.027	0.872 8
X_1^2	284.06	1	284.06	25.84	0.000 1
X_2^2	146.44	1	146.44	13.32	0.002 4
X_3^2	144.23	1	144.23	13.12	0.002 5
X_4^2	946.11	1	946.11	86.08	$<0.000 1$
模型	4 243.68	14	4 243.68	27.58	$<0.000 1$
失拟项	157.35	10	15.74	10.46	0.009 1
误差	7.52	5	1.50		
总和	4 408.55	29			

对表 2 中数据进行多元回归拟合,得各影响因素对评价指标复合率编码空间内的二次多项式方程为 $Y = 87.855 + 8.835X_1 + 4.178X_2 + 1.691X_3 - 5X_4 + 0.873X_1X_2 - 1.47X_1X_4 - 1.871X_1X_3 - 0.624X_2X_4 - 0.565X_2X_3 - 0.135X_3X_4 - 3.218X_1^2 - 2.311X_2^2 - 2.293X_3^2 - 5.873X_4^2$ 。该多项式方程的显著性分析 $F = 27.58, P < 0.000 1$,说明该方程的模型拟合较为显著; $R^2 = 0.962 6$,说明响应值的变化有 96.26% 来源于所选的 4 个变量。该回归方程可较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,且可利用该回归方程反映 4 个影响因子的最佳水平范围。

2.3.3 响应因素水平的优化 采用 Design expert 7.1 软件作响应曲面图及等高线图(图 1)。

由回归方程及结合响应面图,得模型预测最大

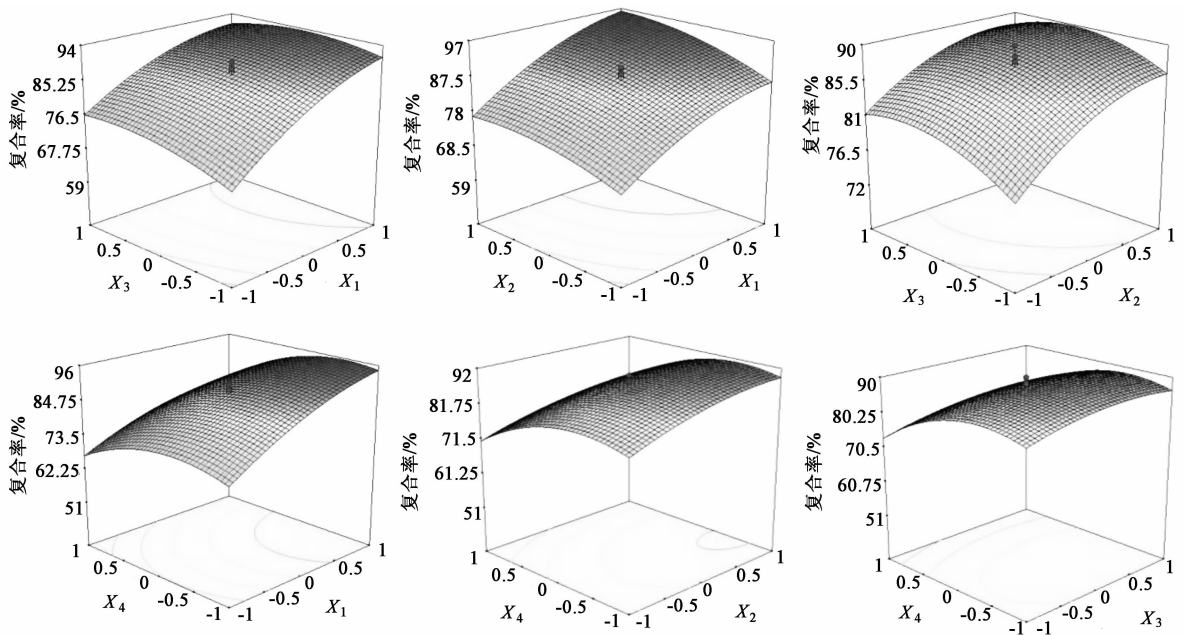


图 1 白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺中各因素交互作用的响应曲面及等高线

响应值为 98.58%。为进一步确定各因素最佳取值,对该非线性回归模型求一阶偏导,并设其为零,得出各因素最佳条件为 $X_1 = 1:3, X_2 = 2.0, X_3 = 50, X_4 = 1.685$,即白芷香豆素磷脂复合物制备的最佳工艺参数为白芷香豆素-磷脂投料比 1:3,药物质量浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,反应温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$,反应时间 1.685 h (101 min)。

2.3.4 模型的验证 为验证白芷香豆素磷脂复合物制备工艺模型方程的普适性,按最佳工艺参数进行 3 次重复试验。结果复合率达 98.55%, RSD 1.7%,与预测值吻合度较好,说明用该模型优化的工艺参数稳定可行,具有较高的实用价值。

3 讨论

药物质量浓度对药物结合影响较大,试验中发现白芷香豆素质量浓度较小时,结合率反而高,因为药物在溶液中须经碰撞才能发生反应,故应控制适宜的药物质量浓度以利于反应发生。

温度对复合率也有较大影响,研究表明温度越高,复合率越高,可能该反应为吸热反应,温度升高,反应平衡向复合物形成方向移动,有利于复合物的形成。但白芷香豆素与磷脂均有热不稳定性,所以试验时设定反应温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:97.
- [2] 郑虎占. 中药现代研究与应用[M]. 北京:文苑出版社,1998:98.
- [3] 王春梅,崔新颖,李贺. 白芷香豆素的抗炎作用研究[J]. 北京大学学报:自然科学版,2006,7(4):318.
- [4] 崔秋兵,张艺,兰莎. 白芷镇痛作用物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):102.
- [5] 杨德. 试验设计与分析[M]. 北京:中国农业出版社,2002:239.
- [6] 秦学功,徐馨. 二次回归正交旋转组合设计优化苦参生物碱渗漉提取条件[J]. 中国中药杂志,2008,33(22):2712.
- [7] Wang X, Zheng X Z, Liu C H. Optimization of microwave-assisted extraction of silymarin from milk thistle seeds[J]. Int J Agric Biol Eng,2008,1(1):75.
- [8] 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.
- [9] Giorgio P, Pirgiorgio A. Resveratrol-phospholipids complexes their preparation and pharmaceutical and cosmetic composition containing same, USA: 20040116386 A1[P]. 2004-06-17.

[责任编辑 全燕]