

星点设计-效应面法优化酸枣仁黄酮滴丸处方

张婷^{1,2}, 张华¹, 沈宇燕³, 解军波¹, 张彦青^{1*}, 陈大为^{2*}

(1. 天津商业大学制药工程系, 天津 300134; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016;
3. 天津同仁堂股份有限公司, 天津 300132)

【摘要】 目的: 优选酸枣仁黄酮滴丸处方。方法: 以药物基质比、泊洛沙姆 188 和吐温 80 的质量分数为自变量, 溶出 T_{50} 、圆整度和溶散时限为因变量, 采用星点设计-效应面法优化法优选酸枣仁黄酮滴丸处方。运用 SPSS 软件对试验数据进行多元线性模型和二次多项式模型拟合, 得出最佳数学模型, Origin 软件绘制效应图和等高线图, 根据效应图确定最佳提取条件。结果: 二次多项式模型相关系数优于多元线性模型, 复相关系数为 0.941 9, 为最终拟合模型; 拟合模型的理论预测值与实测值偏差较小, 具有良好的预测性。结论: 通过星点设计-效应面法建立的模型预测性良好, 可用于对酸枣仁黄酮滴丸处方的优化。

【关键词】 酸枣仁黄酮; 滴丸; 固体分散体; 星点设计-效应面优化法; 处方

【中图分类号】 R283.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2012)14-0026-06

Optimization of Formulation for Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Dripping Pill by Central Composite Design-Response Surface Methodology

ZHANG Ting^{1,2}, ZHANG Hua¹, SHEN Yu-yan³, XIE Jun-bo¹, ZHANG Yan-qing^{1*}, CHEN Da-wei^{2*}

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;
2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
3. Tianjin Tongrentang Pharmaceutical Co. Ltd, Tianjin 300132, China)

【收稿日期】 20120109(001)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(1101235, 31000749)

【第一作者】 张婷, 硕士, 从事中药制剂研究, Tel: 13602196583, E-mail: zhangting19860511@126.com

【通讯作者】 * 张彦青, 副教授, 博士, 从事中药新剂型与药代研究, Tel: 13752524378, E-mail: zhyanqing@yahoo.com.cn

* 陈大为, 教授, 博士, 从事药物新剂型的研究, Tel: 024-23986308, E-mail: chendawei@syphu.edu.cn

血、止血时间作为指标, 本试验采用综合评分法, 将醋艾炭传统质量标准与药理学指标相结合, 同时考虑炒炭“存性”的要求, 可比较客观地反映各个因素水平对醋艾炭质量的影响, 从而优选其炮制工艺。

黄酮类化合物是艾叶有效成分之一, 有文献报道黄酮中化合物 5,7-二羟基-6,3',4'-三甲氧基黄酮对血小板聚集有显著的抑制作用^[8], 炒炭后其含量较生品降低, 这与传统中医理论中艾叶止血不留痕而炒炭则重于止血相一致, 但对于炮制后黄酮类化合物之间是否存在相互转化需进一步研究。

【参考文献】

[1] 中国药典. 一部[S]. 201;83.

[2] 吴惠时, 麻兵继, 单小兵. 艾叶炮制历史沿革的研究

[J]. 中药材, 1998, 21(10):511.

[3] 李媛, 张丽, 单鸣秋, 等. 正交试验优选甘遂醋制最佳工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):4.

[4] 任淑娟, 考玉萍, 陈世虎, 等. 艾叶炒炭炮制品中总黄酮的含量测定[J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(4):70.

[5] 贺卫和, 蒋孟良, 曾婷, 等. 炮制对胶艾汤止血作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):164.

[6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993:480.

[7] 刘先琼, 许腊英. 多指标综合加权评分研究乌梅炭炮制工艺[J]. 中草药, 2009, 40(12):1898.

[8] 梅全喜. 艾叶的药理作用研究概况[J]. 中草药, 1996, 27(5):311.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] Objective: To optimize formulation of flavonoids from *Ziziphus jujuba* dripping pill. **Method:** Central composite design-response surface methodology was applied to optimize formulation of this drooping pill with ratio of drug-matrix, the amount of P188 and Tween-80 as independent variables, while dependent variables were T_{50} , roundness and dissolution time, optimum mathematical model was obtained by SPSS software, which was used to fit multivariate linear model and polynomial model for experimental data. Effect diagram and contour map were draw by Origin software, optimum extraction condition was determined according to effect diagram. **Result:** Correlation coefficient of quadratic polynomial model was better than multivariate linear model, multiple correlation coefficient was 0.941 9, and it was determined as final fitting model; Bias between measured and predicted values of fitting model was negligible, indicating that had good predictive. **Conclusion:** Model established by central composite design-response surface methodology was better to predict and could be used to optimize formulation of flavonoids from *Z. jujuba* dripping pill.

[Key words] flavonoids from *Ziziphus jujuba*; dripping pill; solid dispersion; central composite design-response surface methodology (CCD-RSM); formulation

酸枣仁为鼠李科植物酸枣的干燥成熟种子,具有敛汗、养肝、宁心安神等功效,是养心安神的首选药^[1]。研究表明黄酮类成分是其主要有效成分,具有镇静催眠的药理作用,其中枢抑制作用呈一定的剂量依赖性^[2]。但黄酮类成分在应用中存在溶解度小、溶出速度慢、吸收量低等问题,因而阻碍了其临床应用推广^[3]。

正交试验法较为直观,易于理解,但准确性较差,各因素值的确定比较粗糙并带有主观性,难以有规范的标准进行设计。星点设计-响应曲面法(CCD-RSM)是在析因设计基础上,加上星点及中心点而形成的试验次数较少、且可进行线性或非线性拟合的试验设计方法,已在制剂处方和工艺优化中逐步推广应用^[4-8]。本试验斯皮诺素为指标性成分,采用星点设计优选酸枣仁黄酮滴丸处方,为其进一步体内药代动力学研究提供依据。

1 材料

DWJ-2000S型滴丸机(烟台百药泰中药科技发展有限公司),RCZ-8B型药物溶出仪(天津大学无线电厂),UV-7504型单光束紫外-可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),1100系列高效液相色谱仪(DAD型紫外检测器,美国Agilent),UV7504型紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)。

酸枣仁黄酮粉末(自制),斯皮诺素对照品(成都思科华生物技术有限公司,批号31613304916),聚乙二醇6000(PEG 6000,天津科密欧化学试剂有限公司),泊洛沙姆188(P188,北京凤礼精求商贸有限公司),聚山梨醇酯(吐温80,Tween-80,天津市凯通化学试剂有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 酸枣仁黄酮粉末的制备 将3.50 g酸枣仁粉碎至80目,3倍量石油醚加热回流(60℃)2次进行脱脂,静置冷却,吸除上清液,得到酸枣仁粉末。将酸枣仁粉末倾倒入通风橱挥干,用6倍量75%乙醇于85℃下回流提取2次,每次3 h。静置冷却,合并上清液,于60℃下减压回收乙醇,得酸枣仁醇提物,废弃酸枣仁药渣。真空干燥,冷却,即得酸枣仁黄酮干燥药粉。

2.2 测定波长的选择 分别吸取斯皮诺素对照品贮备液、酸枣仁黄酮样品溶液和空白基质溶液,加人工胃液稀释至适当浓度,于200~400 nm波长绘制紫外吸收光谱。结果斯皮诺素在335 nm波长处有最大吸收,故选择335 nm作为紫外检测吸收波长,空白基质对样品测定无干扰。

2.3 标准曲线的绘制 分别精密量取0.1,0.2,0.4,0.8,1.2,1.6 mL斯皮诺素对照品贮备液(100 mg·L⁻¹)至10 mL量瓶中,加溶出介质稀释至刻度,摇匀,备用。以溶出介质为空白对照,于335 nm处测定吸光度(A)。以斯皮诺素质量浓度为纵坐标,A为横坐标,绘制标准曲线,得其在不同溶出介质中的标准曲线方程(表1)。

表1 斯皮诺素于不同溶出介质中标准曲线方程

溶出介质	标准曲线方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
0.1 mol·L ⁻¹ HCl	$C = 28.729A + 0.0037$	0.9999	1.0~16.0
水	$C = 27.027A + 0.1712$	0.9991	1.0~16.0
pH 6.8 PBS	$C = 28.064A + 0.0618$	0.9997	1.0~16.0

2.4 溶出度的测定 取酸枣仁黄酮滴丸6粒,置于

溶出仪转篮中,转速为 $(100 \pm 2) \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,以人工胃液 200 mL 为溶出介质,温度为 37 ℃。于 2,5,10,20,30,45,60 min 分别取样 4 mL,同时立即补充溶出介质 4 mL。样品液经 0.8 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液于 335 nm 处采用紫外分光光度法测定 A,计算样品中酸枣仁黄酮中斯皮诺素含量。

2.5 溶出介质的选择 试验分别考察以人工胃液(0.1 mol·L⁻¹HCL)、pH 6.8 磷酸盐缓冲液(pH 6.8 PBS)、蒸馏水为溶出介质时药物的溶出情况,结果见表 2。

表 2 不同溶出介质中酸枣仁黄酮的溶出率($\bar{x} \pm s, n=3$) %

t/min	0.1 mol·L HCL	水	pH 6.8 PBS
5	44.38 ± 3.06	39.88 ± 2.01	41.08 ± 2.32
10	85.56 ± 2.11	78.73 ± 1.87	79.03 ± 3.16
30	99.06 ± 3.64	97.74 ± 2.09	98.99 ± 2.90

结果显示,在考察的 3 种溶出介质中,酸枣仁黄酮在人工胃液中的溶出最快。口服给药后,滴丸在胃中的停留时间约为 2 h,即主要在胃液中崩解溶出,故选择人工胃液为溶出介质,以更好的模拟体内药物溶出的过程。

2.6 处方优选

2.6.1 滴丸的制备 称取一定量酸枣仁黄酮提取物,过 80 目筛,按处方比例加入 PEG 6000、P188 和 Tween-80 于 50 mL 烧杯中,置于 80 ℃ 水浴中,待基质完全熔融,将熔融液倾倒入滴丸机中,保温 10 min,以一定速度(30 滴/min)滴入冷凝剂二甲基硅油中,待其成型后,收集滴丸,用滤纸吸除表面的二甲基硅油,置于干燥器干燥 24 h,即得。

2.6.2 考察因素的确定 采用单因素试验对方剂中各影响因素进行初步考察,其中药物基质比、P188 和 Tween-80 质量分数是影响药物溶出行为最主要因素。初步设定药物与基质的比例(X_1)、P188 质量分数(X_2)及 Tween-80 质量分数(X_3)分别为 1:20 ~ 1:10, (0 ~ 10)%, (0 ~ 5)% 进行星点设计。本试验应用旋转 CCD 法进行设计,采用计算公式 $\alpha = (2k)^{1/4}$ 确定 α 值,其中 k 为待考察因素个数,本试验中 k 即为 3,故计算得 $\alpha = 1.682$ 。每个因素确定 5 个水平,分别为 0, ±1, ± α 。试验设计见表 3。将各指标最佳测定值定为满分,然后按正比和反比关系将各值换算成相应的百分数,以影响滴丸质

表 3 酸枣仁黄酮滴丸处方优选星点设计安排

No.	代码			实际操作值			Y_1/min	Y_2	Y_3/s	OD
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3				
1	-1	-1	-1	1:17	2.03	1.01	7.705 3	0.975 3	250	0.891 5
2	1	-1	-1	1:19	2.03	1.01	8.675 8	0.963 9	221	0.865 2
3	-1	1	-1	1:17	2.03	3.99	7.512 2	0.975 9	256	0.897 3
4	1	1	-1	1:19	2.03	3.99	9.161 3	0.969 5	208	0.859 8
5	-1	-1	1	1:17	7.97	1.01	7.561 2	0.965 2	255	0.891 5
6	1	-1	1	1:19	7.97	1.01	9.270 2	0.963 3	206	0.855 8
7	-1	1	1	1:17	7.97	3.99	7.113 9	0.966 8	171	0.980 5
8	1	1	1	1:11	7.97	3.99	7.952 0	0.971 0	242	0.883 3
9	- α	0	0	1:20	5.00	2.50	6.914 0	0.969 7	223	0.946 3
10	α	0	0	1:10	5.00	2.50	8.585 6	0.974 5	279	0.840 1
11	0	- α	0	1:13	5.00	0.00	9.517 3	0.966 9	200	0.854 2
12	0	α	0	1:13	5.00	5.00	8.292 4	0.965 0	231	0.873 0
13	0	0	- α	1:13	0.00	2.50	10.345 8	0.978 8	183	0.851 7
14	0	0	α	1:13	10.00	2.50	9.301 3	0.974 2	205	0.859 8
15	0	0	0	1:13	5.00	2.50	7.047 1	0.977 6	274	0.913 6
16	0	0	0	1:13	5.00	2.50	7.150 3	0.975 5	270	0.909 0
17	0	0	0	1:13	5.00	2.50	6.972 2	0.977 0	277	0.916 1
18	0	0	0	1:13	5.00	2.50	6.853 7	0.978 1	282	0.921 2
19	0	0	0	1:13	5.00	2.50	6.987 9	0.974 5	276	0.914 5
20	0	0	0	1:13	5.00	2.50	7.017 6	0.976 8	275	0.914 3

量的溶出 T_{50} (Y_1)、圆整度(滴丸最短径/最长径) (Y_2)、溶散时限(Y_3)为指标,根据各指标的重要性,确定其权重系数依次为 0.4,0.4,0.2,按综合评判公式:归一化值(OD) = $0.4a/Y_1 + 0.4Y_2/b + 0.4c/Y_3$,其中 a 为 20 个溶出 T_{50} 中最小值, b 为 20 个圆整度中最大值, c 为 20 个溶散时限中最小值。

2.6.3 模型拟合 效应与因素之间的关系多为非线性,与此对应的效应面一般有所弯曲,绝对的线性关系不存在。尤其是当考察多因素时,由于各因素之间相互影响,曲面的弯曲度更大,使用线性模型相关系数较低,数学模型预测性不好,须用多元非线性方程式提高优化效果。以 X_1, X_2, X_3 为自变量, Y_1, Y_2, Y_3, OD 为因变量,进行多元线性回归、二次多项式回归,并以拟合优度(r)和置信度(P)作为模型判定标准。

多元线性模型:

$$OD = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3$$

二次多项式模型:

$$OD = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_4X_1X_2 + B_5X_2X_3 + B_6X_1X_3 + B_7X_1^2 + B_8X_2^2 + B_9X_3^2。$$

其中 B_0 为常数项。

根据最优方程绘制三维效应面和二维等高线,选取优化区,并在优化区内选择代表性的处方进行验证,计算偏差。

2.6.4 最优试验条件的选择 参数优化拟合后代入方程,得到 OD 对因素的响应曲面关系。使 OD 值最高的因素值可通过直观作图分析法、对方程用偏导的方法求解等方法。采用 Microsoft Excel 中规划求解功能求出曲面中最高点,具体实施方法为在工作表中选择 3 个单元格分别输入 3 个因素值,初始值按试验情况适当选择;在另外 1 个单元格内输入公式,内容为回归后的多元二次方程,其中变量与因素值的单元格位置对应,则回车后此单元格显示的值为相应的 OD 值;选择软件中的规划求解功能,设置因素单元格为可变区、 OD 值单元格为目标单元格且在最大值处收敛,并将 OD 的上限设为 1;计算后,因素单元格中的数值变为 OD 达到最高时的最佳条件组合。

2.6.5 处方优化与预测 采用 SPSS 16.0 统计软件,经多元线性回归处理后,拟合所得方程 $OD = 0.89 - 0.027X_1 + 0.011X_2 + 8.124 \times 10^{-3} X_3$ ($r = 0.7271, P = 0.0062$),由 r 可知多元线性拟和不理想, OD 值与各因素之间线性相关性较差。故进一步采用二次多项式非线性回归拟合,并经过方差分

析化简方程系数,得到如下方程:

$$OD = 0.91 - 0.027X_1 + 0.011X_2 + 8.124 \times 10^{-3} X_3 - 9.078 \times 10^{-3} X_1X_2 - 8.618 \times 10^{-3} X_1X_3 + 0.015X_2X_3 - 2.892 \times 10^{-3} X_1^2 - 0.013X_2^2 - 0.016X_3^2 (r = 0.9419, P = 0.0011),$$

结果表明采用二次多项式非线性回归拟合,拟合效果明显优于多元线性回归,可作为分析及预测的模型。

各项系数经方差分析,所得 P 代表各项系数的可信程度,其值越小对应的系数对模型的影响越显著。一般认为 $P < 0.05$ 时可认为此项系数的存在对模型有意义, $P > 0.1$ 时则此系数对模型没有明显贡献。从表 4 回归系数的显著性检验可知,模型二次项 X_1, X_3^2 ($P < 0.001$) 极显著; X_2, X_2X_3, X_2^2 ($P < 0.05$) 显著,其他因素不显著。

表 4 二项式回归模型系数显著性检验

因素	r	SS	t	P
Intercept	0.914 1	0.006 8	135.363 3	0.000 0
X_1	-0.027 5	0.004 5	-6.136 9	0.000 1
X_2	0.010 9	0.004 5	2.428 0	0.035 6
X_3	0.008 1	0.004 5	1.813 4	>0.05
X_1X_2	-0.009 1	0.005 9	-1.550 8	>0.1
X_1X_3	-0.008 6	0.005 9	-1.472 3	>0.1
X_2X_3	0.014 5	0.005 9	2.479 6	0.032 6
X_1^2	-0.002 9	0.004 4	-0.663 2	>0.1
X_2^2	-0.013 4	0.004 4	-3.063 2	0.012 0
X_3^2	-0.016 1	0.004 4	-3.700 1	0.004 1

按照二项式拟合方程,用 Origin 8.5 软件描绘 OD 值对两因素的三维效应面图和二维等高线图(其他 1 个自变量设为中心点值),见图 1。

由图 1 可知,选取较理想的区域,求其 OD 值较大的自变量范围,结合实际滴丸的生产工艺,优化最佳处方条件为药质比为 1:16, P188 质量分数为 5%, Tween-80 质量分数为 3%。同时将 X_1, X_2, X_3 的优化值代入最佳模型方程,得 OD 理论预测值 0.933 8,用此条件制备 3 批滴丸。结果各项指标 RSD 均 $< \pm 5\%$,说明建立的模型方程能较好的描述效应面与因素之间的关系。

2.7 质量检查

2.7.1 丸重差异 取本品 20 粒,精密称定求出平均丸重,并分别称定每粒滴丸质量,每丸质量为 (15.88 ± 0.33) mg,平均丸重差异为 2.14%。

2.7.2 药物含量测定 采用 HPLC 进行测定。Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 检测波长 335 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C, 流动相乙腈(A)-0.1% 冰乙酸(B)进行梯度洗脱(0~5 min, 10% A; 6~20 min, 17% A; 21~30 min, 23% A; 30 min, 35% A)。

斯皮诺素在 1~40 mg·L⁻¹ 呈良好线性关系, 回归方程 $C = 0.0225A - 0.093$ ($r = 0.9999$)。在此条件下, 滴丸中斯皮诺素色谱峰的保留时间与对照品一致, 约为 10 min, 空白样品无干扰。称取酸枣仁黄酮干燥药粉适量加甲醇溶解, 加入流动相稀释至刻度, 摇匀。取续滤液进样, 计算其总黄酮含量, 按斯皮诺素折算为 60.94%。取自制酸枣仁黄酮滴丸 20

粒, 粉碎研磨, 精密称取适量置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声 5 min, 加入流动相稀释至刻度, 摇匀。取续滤液进样, 计算酸枣仁黄酮滴丸以斯皮诺素计含量为 33.42 mg·g⁻¹, 色谱图见图 2。

3 讨论

CCD-RSM 试验设计法对显著影响相应值的因素进行考察, 并可以采用多种模型进行拟合, 同时可对具有显著影响的因素进行分析, 从而预测出最优结果。本试验采用 CCD-RSM 法对制剂处方中的因素进行考察, 预测结果与实际结果接近, 表明各指标与理论值能够较好吻合, 二者相关性良好。

2.7.3 溶出速率的测定 如图 3 所示, 滴丸中酸枣仁黄酮的溶出度高于酸枣仁黄酮原料药。酸枣仁黄

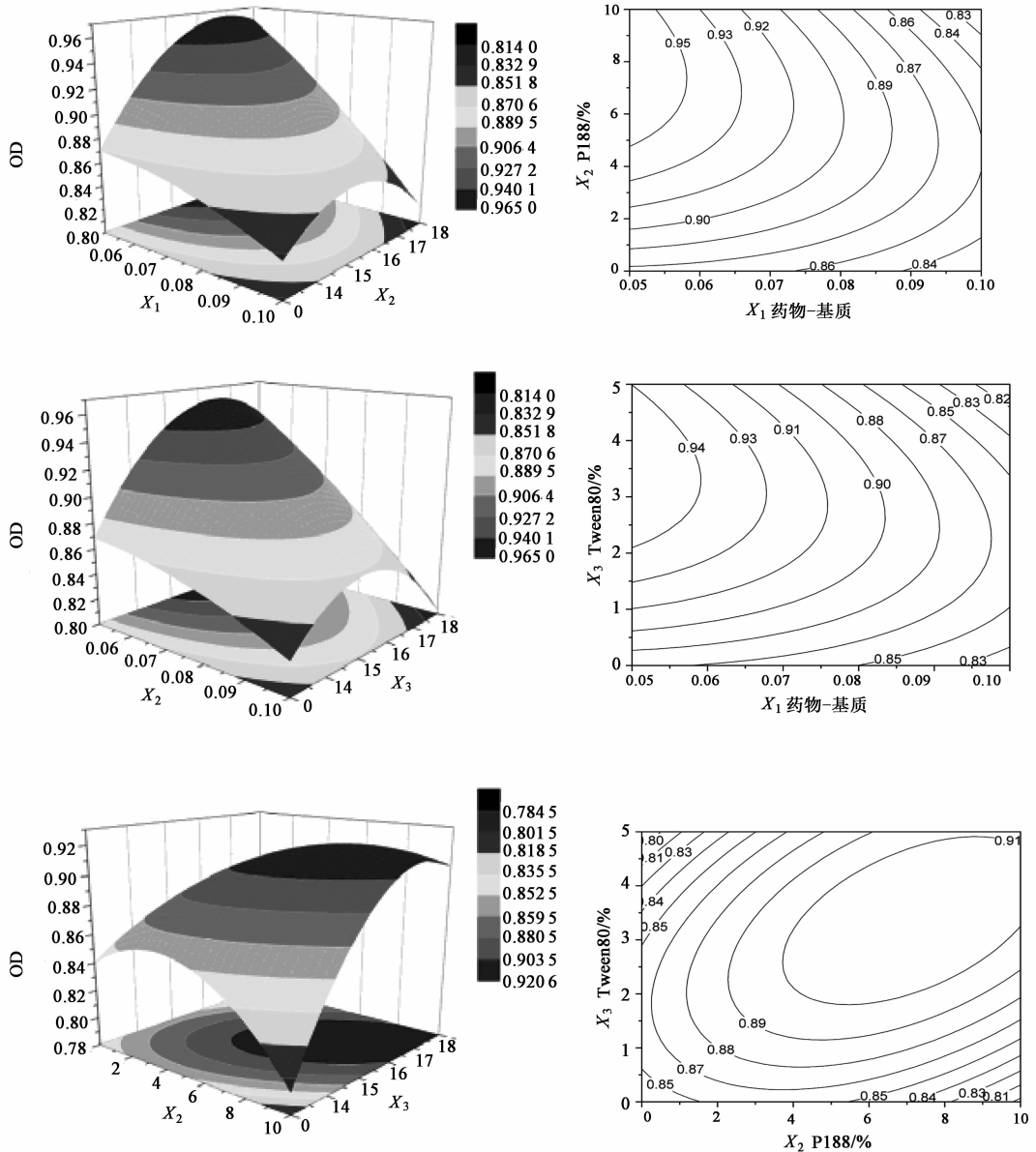
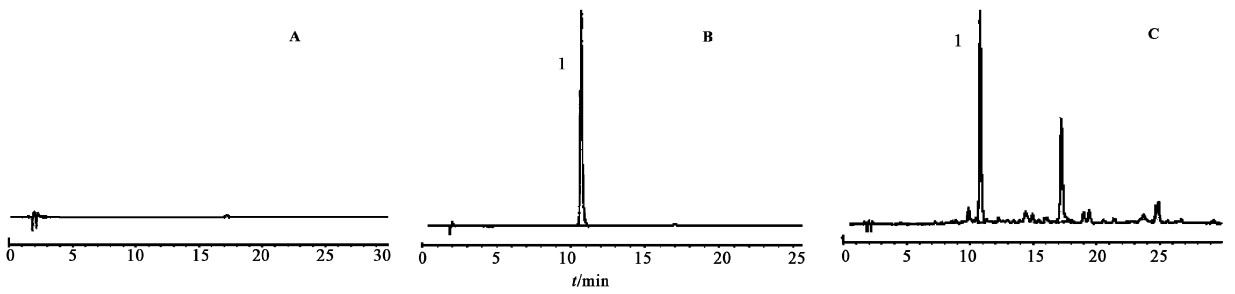


图 1 酸枣仁黄酮滴丸三因素的三维效应面(左)和二维等高线(右)



A. 空白样品;B. 对照品;C. 样品;1. 斯皮诺素

图2 酸枣仁黄酮滴丸 HPLC

酮滴丸 20 min 已经达到 90% , 30 min 药物全部溶出。

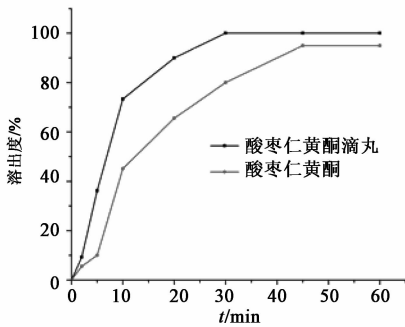


图3 酸枣仁黄酮及其滴丸溶出度考察

试验过程中发现 P188 能增加药物的溶解性和溶出速度,但其量超过 10% ,药液黏稠度增大,产生拖尾,且下滴时速度慢,丸重差异变大;PEG 6000 能增加滴丸的机械强度,但其对于滴丸中的药物无抑晶作用,且成型性差,药物在 PEG 6000 中的溶解度较在 P188 中差,故加少量无水乙醇助溶。前期研究发现,Tween-80 能增加药物在肠道的吸收速率和吸收量,同时对药物有增溶作用,故将其一并作为考察因素进行处方筛选。滴速越快,产量越高;但滴速过大,滴丸易黏结,成型效果不好;滴速慢成型效果虽然好,但产量低,试验过程中选择 30 滴/min 可获得较好的成丸率。固体分散体普遍存在“老化”现象,对酸枣仁黄酮滴丸的稳定性研究正在考察中。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010;343.
- [2] 郭胜民,范晓雯,何建伟. 酸枣仁总黄酮的中枢抑制作用[J]. 中药材,1998,21(11): 578.
- [3] LI Yujuan, YAO Meicun, CHENG Shan. Quantitative determination of spinosin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(4): 1169.
- [4] Körbhati B K, N Aktas, A Tanyolac. Optimization of electrochemical treatment of industrial paint wastewater with response surface methodology [J]. J Hazard Mater, 2007, 148(1): 83.
- [5] F Karacan, U Ozden, S Karacan. Optimization of manufacturing conditions for activated carbon from Turkish lignite by chemical activation using response surface methodology [J]. Appl Therm Eng, 2007, 27(7): 1212.
- [6] Myers R H, Montgomery D C. Response surface methodology [M]. 2 ed Newyor:USA publishing, 2002.
- [7] Myers R H, Montgomery D C, Vining G G, et al. Response surface methodology: a retrospective and literature survey [J]. J Qual Technol, 2004, 36(1): 53.
- [8] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学:药学分册,2000,27(5): 292.

[责任编辑 仝燕]