

中心组合设计法优化黄连解毒黏附微球处方工艺

臧琛, 聂其霞*, 王国华, 张保献, 李慧

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 确定黄连解毒黏附微球的最佳处方工艺。方法: 以成品收率, 小檗碱、栀子苷、黄芩苷包封率, 微球在人工胃液中的黏度为指标, 采用中心组合设计法优化黄连解毒黏附微球的处方工艺, 对结果进行二项式拟合, 对最优条件进行预测分析。结果: 各指标二项式方程拟合度较好, 按处方优化得到最佳条件制备黄连解毒黏附微球, 各项指标与预测值接近。结论: 中心组合设计法优化黏附微球工艺条件准确、可靠。

[关键词] 中心组合设计; 黄连解毒; 黏附微球; 处方工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0021-05

Optimization of Formulation of Huanglian-jiedu Bioadhesive Microspheres by Central Composite Design

ZANG Chen, NIE Qi-xia*, WANG Guo-hua, ZHANG Bao-xian, LI Hui

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the formulation of Huanglian-jiedu bioadhesive microspheres. **Method:** The optimum formulation was investigated by central composite design with five responses ie. yield, entrapment efficiency of three effective ingredients and mucoadhesive property. The data were imitated using second-order polynomial equation, and the numerical optimization was performed. **Result:** Prepare microspheres with optimum formulation, and the responses approached the prediction at the optimum. **Conclusion:** The performulation and preparation of microspheres were reasonable and reliable.

[Key words] central composite design; Huanglian-jiedu; bioadhesive microspheres; optimum formulation

胃溃疡是临床常见病, 多发病, 西药治疗方案多用抗生素和胃酸分泌抑制剂联用, 但易产生耐药性, 停药后易复发。治疗胃溃疡的中药不少, 但疗效大多不显著。现代药理研究证明, 黄连解毒汤对幽门螺旋杆菌有明显的抑制和杀灭作用^[1-2]。普通制剂在胃内停留时间较短, 药效不能充分发挥。生物黏

附微球是药物与黏附材料分散在载体中制得的含药微球制剂, 其在到达黏膜表面时, 可与生物黏膜产生黏附作用, 从而在黏膜表面滞留较长时间并持续释放药物。该制剂具有延缓药物在胃肠道中的停留时间, 提高药物的吸收和生物利用度, 可定位于胃肠道等病变部位, 发挥局部疗效等优点, 同时具有长效、缓释、控释等特点。本文即将黄连解毒汤提取物制成黏附微球, 并以中心组合设计法优化处方工艺, 为黄连解毒微球的研制提供依据。

1 材料

Waters 高效液相色谱仪 (2695 自动进样单元, 2487 紫外检测器); Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 电动搅拌器 (D2015 W, 上海司乐仪器有限公司)。

[收稿日期] 2010-07-21

[基金项目] 中国中医科学院自主选题项目 (ZZ2006107)

[第一作者] 臧琛, 主管技师, 研究方向: 中药制剂, Tel: 010-84014127, E-mail: siwfe188@sina.com

[通讯作者] * 聂其霞, 副研究员, 研究方向: 中药制剂, Tel: 010-84014127, E-mail: bjnqx@yahoo.com.cn

黄连解毒提取物(自制);乙基纤维素(Ec,上海卡乐康公司);卡波姆(Cp,美国露博润 Lubrizol 公司);Span-80(化学纯,国药集团化学试剂有限公司);液体石蜡(化学纯,国药集团化学试剂有限公司);盐酸小檗碱(购自中国药品生物制品检定所,批号 110713-200208);栀子苷(购自中国药品生物制品检定所,批号 110749-200309);黄芩苷(购自中国药品生物制品检定所,批号 110715-200212);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄连解毒黏附微球制备 采用液中干燥法制备微球。将黄连解毒提取物均匀分散于含一定比例的 Ec 和 Cp 的无水乙醇溶液中,作为分散相。将上述分散相缓慢滴加入含有 span-80 的液体石蜡中,搅拌乳化一定时间后,低速搅拌挥尽乙醇,待微球析出后,过滤,以石油醚洗涤微球,37 °C 减压干燥 24 h,过筛,收集 16 ~40 目粒径范围的微球,并计算收率。

2.2 影响因素的确定 以成球性、微球形态、成球率为指标,以单因素考察法分别考察温度、相体积

比、搅拌速度、乳化剂 span-80 用量、药和 Ec 比例、Ec 和 Cb 的比例等因素对制备工艺的影响。结果表明,乳化剂含量、药和 Ec 比例、Ec 和 Cb 的比例等对微球制备具有显著性影响,温度在室温下、搅拌速度、相体积比在所选范围内对制备无明显影响。因此确定主要考察因素为 Ec 和 Cb 的比例(X_1),药和 Ec 比例(X_2),span-80 用量(X_3)。

2.3 中心组合设计优化处方工艺 采用三因子等精度旋转中心组合设计,以小檗碱、黄芩苷和栀子苷的包封率、微球收率和在人工胃液中的黏度为指标。因素水平及试验安排与结果见表 1, 2。

表 1 黄连解毒黏附微球处方优化因素水平

因素	X_1 (Cp Ec)	X_2 (药 Ec)	X_3 (span-80/%)
- 1.682	0.120	0.250	2.16
- 1	0.136	0.291	2.45
0	0.160	0.35	2.88
1	0.184	0.409	3.31
1.682	0.200	0.450	3.60

表 2 黄连解毒黏附微球处方优化试验安排与结果

No.	X_1	X_2	X_3	成品收率/%	小檗碱包封率/%	栀子苷包封率/%	黄芩苷包封率/%	黏度/Pa·s
1	- 1	- 1	- 1	75.86	26.8	43.8	6.98	134.4
2	+1	- 1	- 1	77.25	38.53	47.92	7.53	144.5
3	- 1	+1	- 1	65.94	28.15	34.43	2.46	132.5
4	+1	+1	- 1	81.70	54.40	42.24	3.42	148.9
5	- 1	- 1	+1	71.07	33.20	34.09	6.89	138.5
6	+1	- 1	+1	76.37	32.14	42.23	7.14	143.3
7	- 1	+1	+1	61.11	32.26	33.86	2.41	137.9
8	+1	+1	+1	76.55	47.85	38.78	3.04	148.8
9	- 1.682	0	0	63.52	41.34	29.09	5.08	131.2
10	+1.682	0	0	83.34	59.31	42.78	6.34	151.8
11	0	- 1.682	0	92.33	34.85	55.26	9.62	145.5
12	0	+1.682	0	84.12	42.81	44.18	2.16	143.9
13	0	0	- 1.682	69.09	24.65	40.60	6.15	142.5
14	0	0	+1.682	56.51	26.67	34.05	4.48	145.6
15	0	0	0	70.12	37.81	46.65	6.33	143.5
16	0	0	0	70.01	35.57	44.52	6.11	147.8
17	0	0	0	71.55	35.75	42.00	6.51	146.2
18	0	0	0	71.82	38.19	47.76	6.05	143.2
19	0	0	0	73.47	35.73	46.35	6.72	144.7
20	0	0	0	73.20	35.17	45.86	6.65	141.9

2.4 考察指标测定

2.4.1 盐酸小檗碱包封率测定 采用高效液相色谱法测定。色谱条件: 流动相乙腈-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾的 0.2% 三乙胺溶液(磷酸调 pH 2.5) (30 70); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 265 nm; 柱温 30 ; 进样量 10 μL。在此条件下盐酸小檗碱可与其他组分达到基线分离。

对照品溶液的制备: 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成 0.1 g·L⁻¹溶液, 即得。

供试品溶液的制备: 取约 0.1 g 微球, 精密称定, 置锥形瓶中, 准确加入 20 mL 甲醇, 密塞, 称定质量。超声处理 30 min, 放置至室温, 称重, 补加甲醇至原重, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 即得。

包封率测定: 按供试品溶液制备方法和色谱条件测定, 并计算微球中盐酸小檗碱含量。按照包封率 = 载药量 / 理论载药量 × 100%, 求得微球中盐酸小檗碱包封率。

2.4.2 栀子苷包封率测定 采用高效液相色谱法测定。色谱条件: 流动相乙腈-水(13 87); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 238 nm; 柱温 30 ; 进样量 10 μL。在此条件下栀子苷可与其他组分达到基线分离。

对照品溶液的制备: 精密称取栀子苷对照品适量, 加甲醇制成 0.05 g·L⁻¹溶液, 即得。

供试品溶液的制备和包封率测定方法同盐酸小檗碱。

2.4.3 黄芩苷包封率测定 采用高效液相色谱法测定。色谱条件: 流动相甲醇-0.2% 磷酸溶液(47 53); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 280 nm; 柱温 30 ; 进样量 10 μL。在此条件下黄芩苷可与其他组分达到基线分离。

对照品溶液的制备: 精密称取黄芩苷对照品适量, 加甲醇制成 0.1 g·L⁻¹溶液, 即得。

供试品溶液的制备和包封率测定方法同盐酸小檗碱。

2.4.4 黏度测定 取适量黄连解毒提取物, 与不同比例的 Cp 和 Ec 混合均匀, 分别称取相同量置人工胃液中溶胀, 测定其黏度; 另取上述混合物制备微球, 取 100 粒微球, 置离体大鼠胃黏膜上, 于 25 , RH90% 放置 20 min, 使微球充分水化并与大鼠胃黏膜黏附, 将胃黏膜置于 45 倾斜平台上, 用人工胃液以 22 mL·min⁻¹速度冲洗 5 min, 计数留于大鼠胃黏

膜上微球个数, 计算离体大鼠胃黏膜滞留率; 另取 100 粒微球, 以水混悬灌胃给予大鼠, 于 3 h 处死大鼠, 取出胃, 计数胃内残留微球个数, 计算大鼠 3 h 胃内滞留率。3 种黏附指标测定结果见表 3。结果表明, 不同黏附指标均可反映黏附微球胃内黏附性能, 各结果呈正相关。为简便起见, 在试验研究中, 可以人工胃液中黏度值作为检测指标。

表 3 不同黏附指标比较

Ec Cb	人工胃液中的黏度 / Pa·s	胃黏膜滞留率 / %	3 h 胃内滞留率 / %
8 1	148.1	86.4	58.3
7 1	143.6	87.8	55.3
6 1	134.2	71.2	52.3
5 1	115.9	65.3	46.7

2.5 结果与分析 按 2.4 项下方法测定考察指标, 结果见表 2。用试验设计软件 design expert 7.1.3 对结果进行统计分析, 拟合方程如下:

$$Y_1(\text{回收率}) = 217.16205 - 538.96758X_1 - 1460.59270X_2 + 105.06408X_3 + 2166.39840X_1X_2 + 1540.26523X_2^2 - 19.33323X_3^2, (R^2 = 0.9669, P < 0.01)$$

$$Y_2(\text{盐酸小檗碱}) = 12.18428 - 2437.61630X_1 - 384.93013X_2 + 178.21839X_3 + 2755.06480X_1X_2 - 287.87594X_1X_3 + 7991.02973X_1^2 - 22.91542X_3^2, (R^2 = 0.9737, P < 0.01)$$

$$Y_3(\text{栀子苷}) = -207.89597 + 2190.80185X_1 - 295.91842X_2 + 92.84732X_3 - 6384.32445X_1^2 + 357.00809X_2^2 - 17.02338X_3^2, (R^2 = 0.9285, P < 0.01)$$

$$Y_4(\text{黄芩苷}) = -31.65183 + 223.54242X_1 + 24.13753X_2 + 15.40068X_3 - 655.18923X_1^2 - 86.83028X_2^2 - 2.78415X_3^2, (R^2 = 0.9723, P < 0.01)$$

$$Y_5(\text{黏度}) = 142.83 + 5.63X_1, (R^2 = 0.7598, P < 0.01)$$

上述指标中, Y₁ ~ Y₄ 的拟合方程 R² 均大于 0.9, P < 0.01, 说明模型显著, 方程代表性较好, 可准确预测实际情况。黏度方程 Y₅ 为 X₁ 因素的一次线性方程, 说明 X₂, X₃ 对黏度无显著性影响。

对各考察指标分别绘制三维因变量效应曲面图, 见图 1 ~ 5。由拟合方程和效应曲面图, X₁ 因素取极大值时 Y₁ ~ Y₅ 均有较好表现; X₂ 因素取值在 0.25 ~ 0.35 时 Y₁ ~ Y₄ 均有较好表现, 对 Y₅ 无影响; X₃ 因素取值在 2.52 ~ 3.24 时 Y₁ ~ Y₄ 均有较好表现, 对 Y₅ 无影响。

2.6 最优工艺条件预测与验证 根据上述拟合方程及效应曲面, 用试验设计软件 design expert 7.1.3

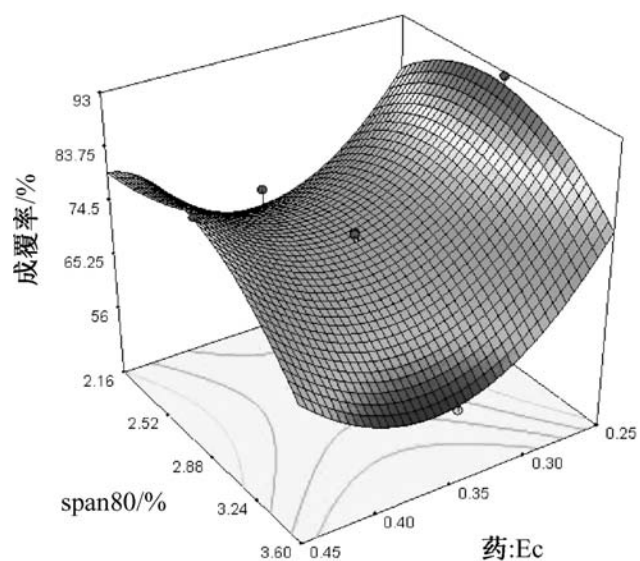


图 1 成品收率与各因素效应曲面

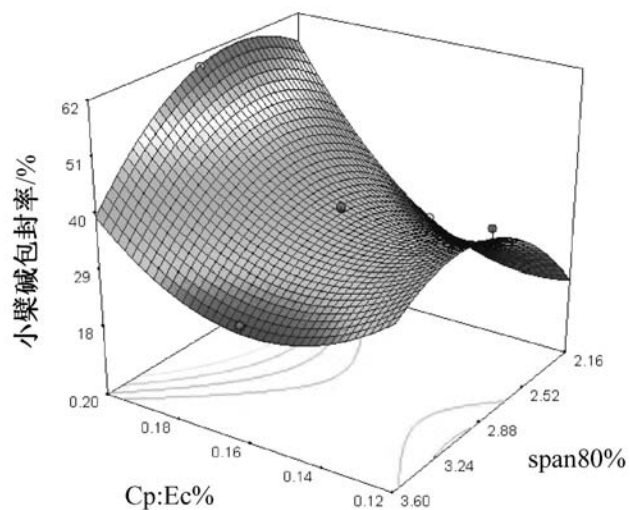


图 2 小檗碱包封率与各因素效应曲面

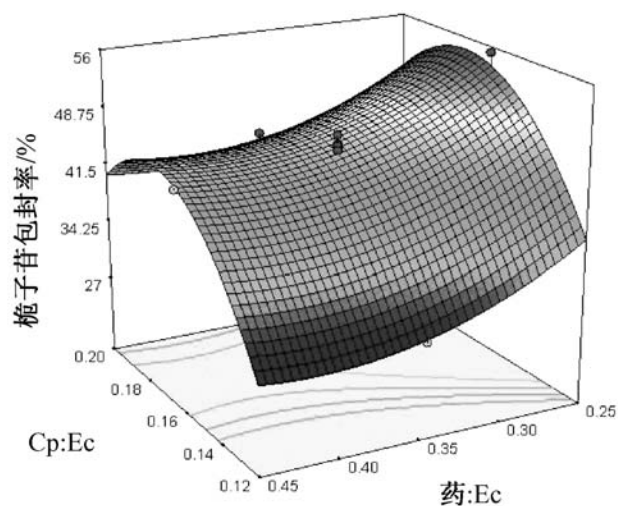


图 3 栀子苷包封率与各因素效应曲面

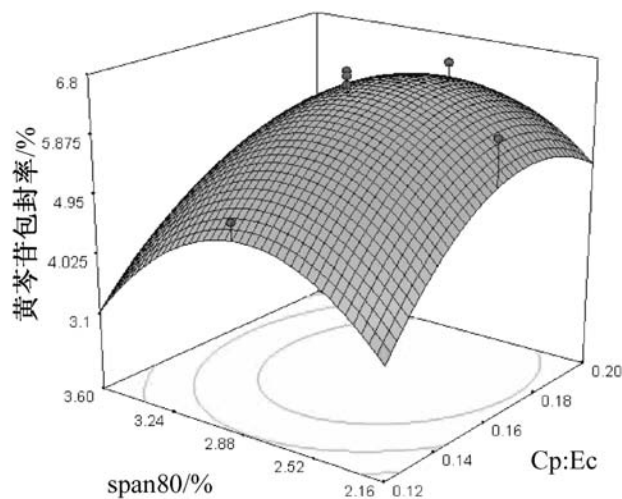


图 4 黄芩苷包封率与各因素效应曲面

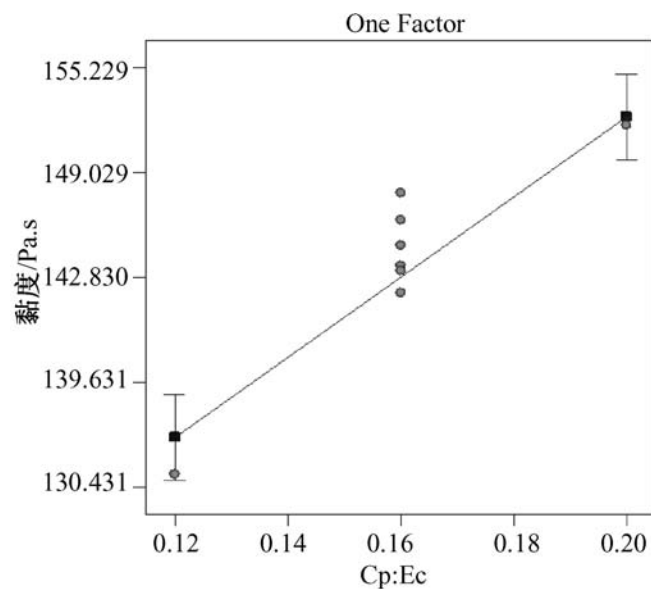


图 5 黏度与各因素效应曲面

对 5 个考察指标综合运算, 得到最优工艺条件为: X_1 为 0.20, X_2 为 0.29, X_3 为 2.70; 即 Cp 与 Ec 比例为 0.20 1, 药与 Ec 比例为 0.29 1, 液体石蜡中乳化剂 span-80 用量为 2.70%。

为验证预测条件是否与实际结果相符, 按上述条件进行验证试验, 共进行 5 次, 并测定各考察指标。结果显示, 实测结果与预测值非常接近, 采用中心组合设计法优化处方工艺达到预期效果。实测值与预测值的比较见表 4。

表 4 验证试验结果与预测值比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

考察指标	预测值	实测值
成品收率 / %	83.65	79.62 \pm 3.26
小檗碱包封率 / %	51.23	52.07 \pm 2.21
栀子苷包封率 / %	45.64	43.86 \pm 2.38
黄芩苷包封率 / %	7.82	8.18 \pm 0.86
黏度 / Pa·s	152.29	155.34 \pm 6.87

3 讨论

工艺优化普遍采用正交设计或均匀设计, 试验次数少, 数据处理较为方便。但上述方法均为基于线性模型的试验设计, 如因因素与效应间为非线性关系, 特别是各因素间存在相互作用时, 得出的最优工艺可能与实际情况存在较大的偏离。

本文采用中心组合设计, 充分考虑了因素与效应间的非线性可能和各因素间交互作用, 可克服正交设计和均匀设计精度低、预测性差的不足。结果分析采用专门的试验设计软件 design expert, 可同时处理多个考察指标, 综合筛选寻找最优区间, 方法简便可靠, 预测值与真实值接近, 可用于黏附微球的处方工艺优选。

(下转第 27 页)

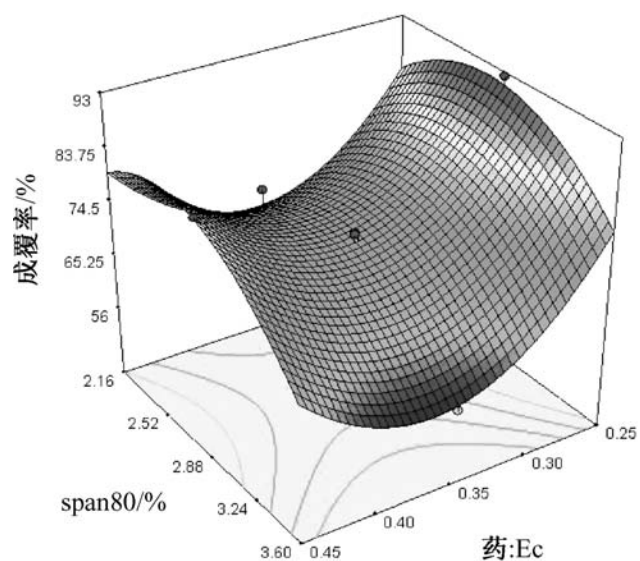


图 1 成品收率与各因素效应曲面

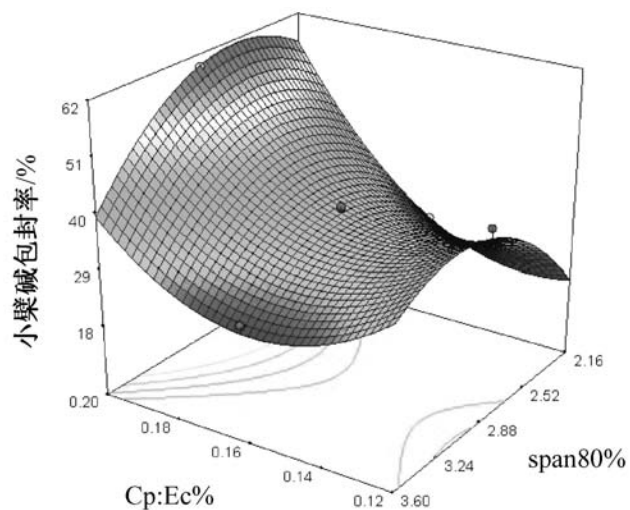


图 2 小槩碱包封率与各因素效应曲面

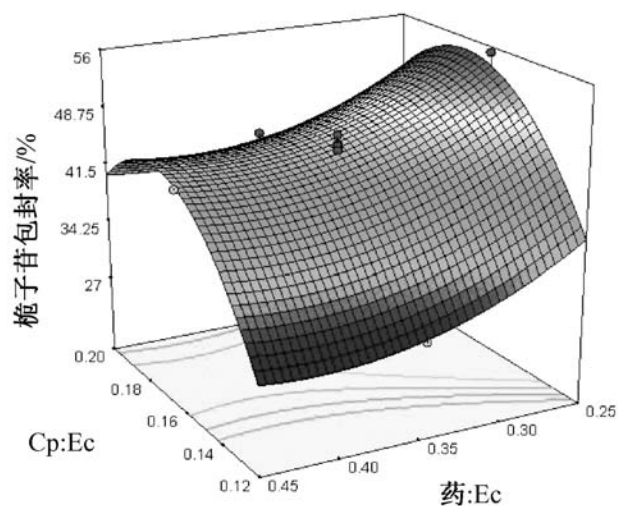


图 3 桅子苷包封率与各因素效应曲面

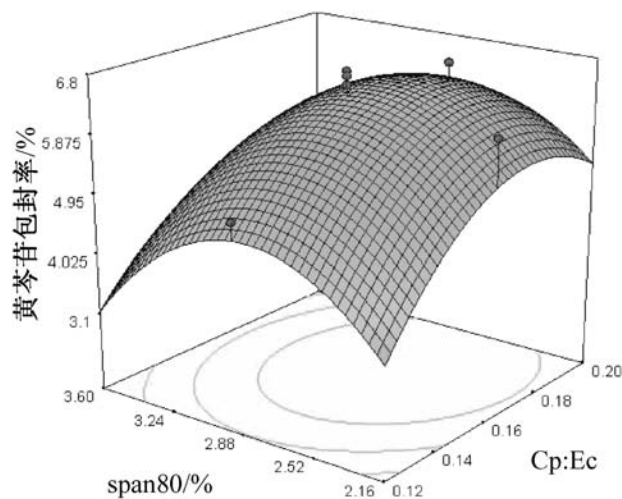


图 4 黄芩苷包封率与各因素效应曲面

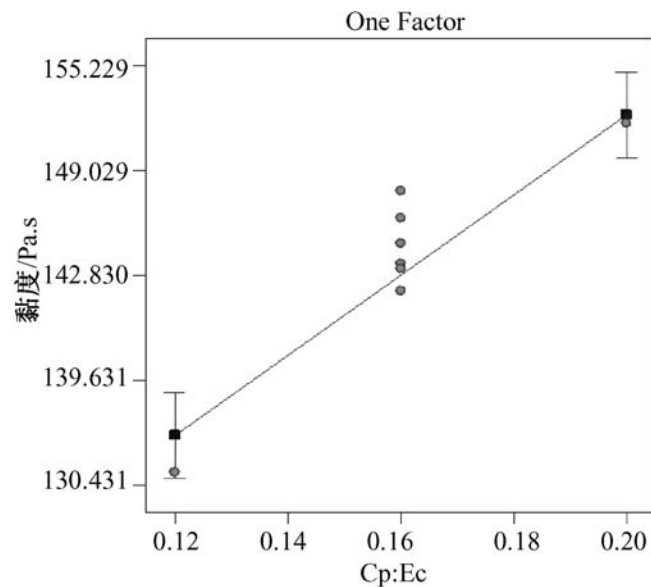


图 5 黏度与各因素效应曲面

对 5 个考察指标综合运算, 得到最优工艺条件为: X_1 为 0.20, X_2 为 0.29, X_3 为 2.70; 即 Cp 与 Ec 比例为 0.20 1, 药与 Ec 比例为 0.29 1, 液体石蜡中乳化剂 span-80 用量为 2.70%。

为验证预测条件是否与实际结果相符, 按上述条件进行验证试验, 共进行 5 次, 并测定各考察指标。结果显示, 实测结果与预测值非常接近, 采用中心组合设计法优化处方工艺达到预期效果。实测值与预测值的比较见表 4。

表 4 验证试验结果与预测值比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

考察指标	预测值	实测值
成品收率 / %	83.65	79.62 \pm 3.26
小槩碱包封率 / %	51.23	52.07 \pm 2.21
桅子苷包封率 / %	45.64	43.86 \pm 2.38
黄芩苷包封率 / %	7.82	8.18 \pm 0.86
黏度 / Pa·s	152.29	155.34 \pm 6.87

3 讨论

工艺优化普遍采用正交设计或均匀设计, 试验次数少, 数据处理较为方便。但上述方法均为基于线性模型的试验设计, 如因因素与效应间为非线性关系, 特别是各因素间存在相互作用时, 得出的最优工艺可能与实际情况存在较大的偏离。

本文采用中心组合设计, 充分考虑了因素与效应间的非线性可能和各因素间交互作用, 可克服正交设计和均匀设计精度低、预测性差的不足。结果分析采用专门的试验设计软件 design expert, 可同时处理多个考察指标, 综合筛选寻找最优区间, 方法简便可靠, 预测值与真实值接近, 可用于黏附微球的处方工艺优选。

(下转第 27 页)