

• 药剂与工艺 •

星点设计-响应面优化大黄酚葡聚糖复合物的制备工艺

吴振¹, 李红², 陈岗¹, 詹永¹, 杨勇¹, 谭红军^{1*}

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

摘要: 目的 为提高大黄酚(Chr)的水溶性和生物利用度, 通过星点设计-效应面法优化大黄酚-β-葡聚糖包合物(Chr-β-glu)制备工艺。方法 采用电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备 Chr-β-glu, 采用星点设计优化制备工艺, 以 Chr 与 β-glu 的投料比例、反应温度和搅拌速度为自变量, 复合率为因变量, 分别进行多元线性回归和二项式方程拟合, 并根据最佳数学模型描绘效应面, 选择最佳制备工艺进行验证试验。结果 二项式方程拟合度较高, 预测性好, $R^2=0.9672$; 效应面法优选出的最佳工艺条件为投料比例 1:2.8、反应温度 52.0 °C、搅拌速度 570.9 r/min, 最佳理论复合率为 40.6%, 实际复合率为 $(41.4 \pm 0.81)\%$ 。结论 应用星点设计-效应面优化法能够精确有效地优化 Chr-β-glu 制备工艺, 优选出的最佳工艺稳定可行, 可用于工业生产。

关键词: 大黄酚; 葡聚糖复合物; 增溶; 星点设计; 响应面优化

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)11-1540-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.008

Optimization of preparation technology of chrysophanol-glucon complex based on central composite design and response surface methodology

WU Zhen¹, LI Hong², CHEN Gang¹, ZHAN Yong¹, YANG Yong¹, TAN Hong-jun¹

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

Abstract: Objective To improve the solubility and bioavailability of chrysophanol (Chr), the preparation of inclusion complex of Chr and β-glucon (Chr-β-glu) was optimized by central composite design and response surface methodology. **Methods** The inclusion complex of Chr-β-glu, prepared by electromagnetic stirring and spray drying methods (ES), was optimized by central composite design. Using the mass ratio of β-glu and Chr, temperature, and stirring rate as independent variables and using the inclusion rate as dependent variable, the multiple linear regression and binomial equations were fitted to the data of overall variables, and the resulting equation was used to produce 3-D response surface graphs. The optimal formulation was predicted and the best prescription process was chosen to verification test. **Results** The correlation coefficient of second-order quadratic model was high and the prediction was good ($R^2 = 0.9672$). The optimal conditions for the preparation of Chr-β-glu were as follows: material proportion was 1:2.8, temperature was 52.0 °C, and stirring rate was 570.9 r/min. The maximum inclusion rate predicted by the model was 40.6% and the actual inclusion rate was $(41.4 \pm 0.81)\%$. **Conclusion** Central composite design and response surface methodology are successfully used to optimize the preparation of Chr-β-glu. The optimized process is reliable, stable, and available for the industrial production.

Key words: chrysophanol; glucon complex; solubilization; central composite design; response surface methodology

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 重庆市卫生局中医药科研课题(ZY20132075); 重庆市科研院所创新能力建设计划项目资助(cstc2012pt-kyys10001, cstc2012pt-kyys10004)

作者简介: 吴振(1985—), 男, 助理研究员, 研究方向为天然产物研究与开发。Tel: (023)89029055 E-mail: wuzhen985@126.com

*通信作者 谭红军, 研究方向为中草药质量评价与开发。Tel: (023)89029055 E-mail: thj-1973@163.com

大黄酚 (chrysophanol, Chr) 是大黄、虎杖、何首乌、决明子等药材中的一种蒽醌类活性成分, 化学名为 1, 8-二羟基-3-甲基蒽醌, 具有抗菌、缩短血液凝固时间、兴奋神经、麻痹肌肉、止咳、利尿、抗癌等作用。近年来研究表明, Chr 具有延缓衰老, 清除氧自由基, 增强抗氧化能力和改善学习记忆障碍等作用^[1-2]。但 Chr 具有味苦、对胃有刺激性, 难溶于水、理化性质不稳定, 见光易氧化等不利因素^[3-4], 因而没有适宜的剂型供临床应用。因此, 提高该类小分子生物活性成分的溶解度(增溶)和口服生物利用度对其在医药中的广泛使用和生物功能发挥具有非常重要的意义。

近年来发现, 超分子包合技术是提高难溶性非极性分子药物溶解性的有效途径之一。超分子包合技术应用的包合材料主要集中在环糊精、冠醚、杯芳烃、多聚糖等^[5-7], 其中生物大分子多糖 β -葡聚糖 (β -glu) 广泛存在于微生物、植物乃至动物体内, 主要以细胞结构成分(如细胞壁)的形式存在, 对异物宿主防御系统具有较强的诱导和活化作用, 是一类活性强、毒副作用低的良好大分子赋形剂和包合物载体, 并且由于其保健功能以及流变性质、黏性、热学性质等, 应用将更加广泛。国内外研究发现, 葡聚糖对植物多酚有一定的包合能力^[8], 但均未见 Chr 与 β -glu 复合物的缓释制剂制备工艺方面的报道, 为此本实验采用电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备大黄酚- β -glu 复合物(Chr- β -glu)制剂, 旨在提高其溶解度和稳定性, 掩盖不良气味, 减少其对胃的刺激性, 为 Chr 的应用提供更好的实验基础。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); SD-1500 实验型喷雾干燥机(上海沃迪科技有限公司); R-124 旋转蒸发仪(瑞典 Buchi 公司)。

Chr 对照品, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$, 南京奥多福尼生物科技有限公司; 酵母 β -glu, 湖州朗深系生物技术有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯; 所用水为双蒸水, 所用溶液均自行配制。

数据分析软件: Design-Expert 7.1.6 软件, STAT-EASE Inc., 美国 Minneapolis 公司。

2 方法与结果

2.1 Chr- β -glu 的制备

将 β -glu 溶于适量去离子水中, 80 °C 搅拌溶解 1 h 使其充分溶解成为澄清透明的溶液; 采用 ES 制

备 Chr- β -glu, 称取规定量的 Chr 置于 50%乙醇中, 30 °C 回流或者搅拌加热使药物完全溶解; 在搅拌和加热条件下, 向葡聚糖溶液中加入 Chr 溶液, 搅拌 12 h 后, 静置。将溶液真空旋转蒸发除去乙醇, 用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过以除去未被包合的 Chr, 将滤液进行喷雾干燥, 得 Chr- β -glu 固体粉末。喷雾干燥的工艺参数: 蠕动泵流量 1.2 mL/min, 进口温度 90 °C, 喷雾流量 300 mL/h。

2.2 Chr 的测定

Chr 的测定参考文献方法^[9]进行。

2.2.1 HPLC 条件 日本岛津公司 LC-20A 高效液相色谱仪, 色谱柱为 C₁₈ Hypersil BDS 柱 (250 mm \times 4.6 mm)。检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 流动相为甲醇-0.1%磷酸 (65:35); 体积流量 1.2 mL/min, 进样量 20 μ L。

2.2.2 线性关系考察 精密称取 Chr 对照品 1.13 mg, 以甲醇溶解后定容到 10 mL, 摇匀得 113 μ g/mL Chr 对照品溶液, 备用。精密吸取 Chr 对照品溶液 2、10、20、100、200、400、1 000 μ L 至 2 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 使质量浓度分别成为 0.113、0.565、1.13、5.65、11.3、22.6、56.5 μ g/mL 的系列对照品溶液, 进样, 测定。以质量浓度 (X) 对峰面积积分值 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=89\ 977 X-4\ 833.3$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围为 0.113~56.5 μ g/mL。

2.2.3 增溶效果实验 取 Chr 对照品和 Chr- β -glu 适量, 用蒸馏水制备成 20 μ g/mL 的样品溶液, 放置于温度 (40 \pm 2) °C 和相对湿度 (75 \pm 5) % 的条件下 10 d, 观察体系变化^[10]。双蒸水条件下, Chr 溶解性较差并出现沉淀, 可能进一步降解; 相比之下发现 β -glu 能大幅度提高 Chr 的溶解度, 且形成的溶液清澈而不浑浊, 即实现了 β -glu 高分子对 Chr 的包合。

2.3 星点设计-响应面优化复合物制备工艺

2.3.1 评价指标 Chr- β -glu 复合率测定 制备得到复合物后, 体系搅拌均匀, 用移液管精密移取 5 mL 混悬液至 10 mL 量瓶中, 加甲醇(色谱纯)至刻度; 超声振荡后, 用有机微孔滤膜滤过, HPLC 测滤液中 Chr 的量, 计算 Chr- β -glu 的复合率。

$$\text{复合率}=(M_1-M_2)/M_1$$

式中 M_1 为 Chr 初始投入量, M_2 为 Chr 沉淀量

2.3.2 试验设计 在前期预试验基础上, 采用响应面法(RSM)对影响 Chr- β -glu 制备的主要因素 Chr

与 β -glu 的投料比例 (A)、反应温度 (B, $^{\circ}\text{C}$)、搅拌速度 (C, r/min) 进行优化。每个因素设计 5 个水平, 分别用代码 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α (在本实验中 $\alpha=1.732$) 表示, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 1。

2.4 响应面优化复合物制备工艺条件

2.4.1 数值模型回归方程与方差分析 本实验利用

Design-Expert 7.1.6 软件中的星点设计, 可获得 Chr- β -glu 复合率 (Y) 的 3 因素 3 水平试验设计及结果 (表 1)。对表 1 中的结果进行统计分析, 可建立如下二次回归方程: $Y=37.80+3.36 A+5.14 B-1.49 C-2.39 AB-3.19 AC-2.16 BC-2.67 A^2-5.61 B^2-4.21 C^2$ 。

对二次回归方程进行方差分析, 结果见表 2。

表 1 星点设计试验及结果

Table 1 Design and results of central composite

序号	A	B / $^{\circ}\text{C}$	C / ($\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)	复合率 / %	序号	A	B / $^{\circ}\text{C}$	C / ($\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)	复合率 / %
1	1 : 1 (-1)	45 (-1)	550 (-1)	9.3	11	1 : 2 (0)	41.3 (-1.732)	600 (0)	15.3
2	1 : 3 (1)	45 (-1)	550 (-1)	25.6	12	1 : 2 (0)	58.7 (1.732)	600 (0)	29.8
3	1 : 1 (-1)	55 (1)	550 (-1)	29.2	13	1 : 2 (0)	50 (0)	513.4 (-1.732)	29.7
4	1 : 3 (1)	55 (1)	550 (-1)	37.8	14	1 : 2 (0)	50 (0)	686.6 (1.732)	23.8
5	1 : 1 (-1)	45 (-1)	650 (1)	16.4	15	1 : 2 (0)	50 (0)	600 (0)	38.6
6	1 : 3 (1)	45 (-1)	650 (1)	21.8	16	1 : 2 (0)	50 (0)	600 (0)	38.7
7	1 : 1 (-1)	55 (1)	650 (1)	29.5	17	1 : 2 (0)	50 (0)	600 (0)	36.6
8	1 : 3 (1)	55 (1)	650 (1)	23.5	18	1 : 2 (0)	50 (0)	600 (0)	35.5
9	1 : 0.3 (-1.732)	50 (0)	600 (0)	24.8	19	1 : 2 (0)	50 (0)	600 (0)	38.9
10	1 : 3.7 (1.732)	50 (0)	600 (0)	37.9	20	1 : 2 (0)	50 (0)	600 (0)	38.5

表 2 Chr- β -glu 复合率回归方程的方差分析

Table 2 Variance analysis on regression equation for complex rate of Chr- β -glu

方差来源	自由度	Y				方差来源	自由度	Y			
		平方和	均方	F 值	P 值			平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	1 455.95	161.77	32.72	<0.000 1	A ²	1	112.53	112.53	22.76	0.000 8
A	1	157.72	157.72	31.90	0.000 2	B ²	1	495.04	495.04	100.14	<0.000 1
B	1	370.44	370.44	74.93	<0.000 1	C ²	1	278.67	278.67	56.37	<0.000 1
C	1	31.26	31.26	6.32	0.030 7	残差	10	49.44	4.94		
AB	1	45.60	45.60	9.22	0.012 5	失拟	5	39.56	7.91	4.00	0.077 1
AC	1	81.28	81.28	16.44	0.002 3	纯误差	5	9.88	1.98		
BC	1	37.41	37.41	7.57	0.020 4	合计	19	1 505.39			

从表 2 可知, Y 的 A、B、C、AB、AC、BC、A²、B²、C² 项均表现出了显著水平, 二次回归方程整体模型极显著, 并且失拟项不显著, 该回归模型与实测值能较好地拟合。进一步对该回归模型进行显著性检验发现, 模型的决定系数 (R²) 为 0.967 2, 表明预测值和实测值之间的相关性很好; 为增加模型预测的可靠性, 将 R² 给予适当的修正 R²_{adj}=0.937 6, 则仅有 6.24% 的响应值的总变异不能用该模型表示。P<0.000 1, 表明回归模型极显著。模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率, 表 2 中,

失拟项 P>0.05, 不显著, 因此证明该模型可以充分地解释响应中的变异, 模型拟合度良好^[11]。

2.4.2 复合率的响应面分析 为了考察投料比例、反应温度、搅拌速度及其交互作用对 Chr 与 β -glu 二者复合率的影响, 固定其他因素条件不变, 获得任意 2 个因素及其交互作用对复合率影响的响应面图, 结果见图 1。在响应面图中, 如果响应面坡度相对平缓, 说明该因素对复合率影响较小; 反之, 如果响应面坡度比较陡峭, 说明该因素对复合率影响较大。

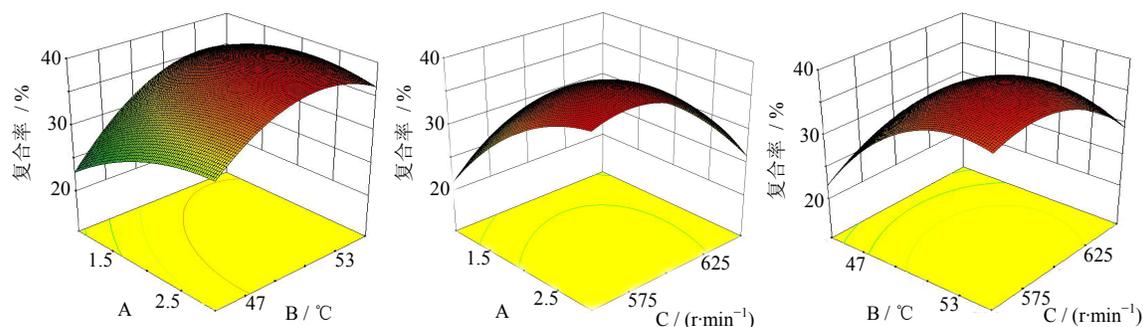


图1 投料比例(A)、反应温度(B)、搅拌速度(C)对Chr-β-glu复合率的影响

Fig. 1 Influences of material proportion (A), temperature (B), and stirring rate (C) on complex rate of Chr-β-glu

2.4.3 响应面分析和优化参数的优化与验证 验证分析结果表明,回归模型存在稳定点编码值(0.795、0.403、-0.582),稳定点的特征值表明稳定点为Chr与β-glu复合率最大值点,即投料比例1:2.8、反应温度52.0℃、搅拌速度570.9 r/min时,Chr-β-glu复合率达到最大值40.6%。为了验证试验结果提供的Chr与β-glu制备条件的可行性,按响应面优化试验确定的工艺条件进行验证试验,将预测值与实测值(41.4±0.81)% (n=6)进行比较并计算偏差[偏差=(预测值-实测值)/预测值]。可知预测值与实测值的偏差为1.97%,证明所得到的拟合方程可以较好地描述工艺中各因素与评价指标的关系。

3 讨论

传统中草药的功能及其对机体的作用一方面取决于其中各类化学物质的种类与含量,另一方面也受到这些化学物质之间的相互作用的影响。因此,研究药物小分子与生物大分子聚糖成分之间的相互作用对提高药物小分子的功能以及阐明药物小分子在体内的代谢是非常重要的。

很多药物小分子虽然有确切的药理效应,但由于本身的各种缺陷使其生物利用度低下,极大地限制了其临床应用。聚糖复合物系指在非质子传递溶剂中,天然活性成分与聚糖以一定配比,通过电荷迁移或极性相互作用而形成的较为稳定的化合物或络合物。聚糖复合物的形成能改善天然活性成分的脂溶性,增强机体对天然活性成分的吸收,提高其生物利用度^[7,12-14]。本实验进行的Chr-β-glu复合物制备工艺研究未见相关文献报道,同时关于多聚糖超分子包合物的文献也并不多见,但经笔者实验发现,复合制备方法改善了Chr的应用限制,说明包合工艺有较好增溶及掩盖不良气味作用。

本研究中采用电磁搅拌法与喷雾干燥法相结合

制备了Chr-β-glu。包合工艺的优化采用星点设计-响应面优化方法,结合多元线性回归和二项式方程拟合,确定优化工艺为投料比例1:2.8、反应温度52.0℃、搅拌速度570.9 r/min,在此条件下复合率理论值达到40.6%。目前,关于葡聚糖包合功能性小分子的研究未见报道,对Chr-β-glu的包合效率、活性和结构等需要进一步深入研究。该研究发现,应用响应曲面法优化制备Chr-β-glu工艺是可行的,取得了较好的结果。

提供了一种利用β-glu为大分子配体化合物,以水难溶性小分子药物Chr为客体分子制备的β-glu复合物及其制备方法,经过ES制备的Chr-β-glu改善了Chr的溶解性,制备得到的Chr-β-glu粉末大多为液滴经膨胀产生的空心颗粒,为Chr的经胃肠道给药剂型以及保健食品的设计提供新的思路。国内外研究发现,β-glu是一类活性强、毒副作用低的良好大分子赋形剂和包合物载体,其中酵母β-glu分子具有空心、多孔、2~4 μm的球形空穴结构^[15],该空穴结构可能通过弱相互作用力,如氢键和疏水作用力等实现β-glu对Chr的包合作用,其确切机制将在以后系列实验中作进一步研究。

参考文献

- [1] 李淑娟,李春更,侯勇,等. 大黄酚抗衰老作用研究进展 [J]. 河北北方学院学报:医学版, 2009, 26(1): 69-71.
- [2] 严春临,张季,张丹参,等. 大黄酚包合物的制备及其体外释药的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 339-342.
- [3] 严春临,张季,张丹参,等. 大黄酚微囊的制备及其体外释药的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011(3): 7-10.
- [4] 王永利,张明媚,李维爽,等. 大黄酚脂质体的制备工艺研究 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(9): 825-827.

- [5] 朱成琳, 张丹参, 宋金艳, 等. 三种大黄酚制剂在小鼠体内的组织分布研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(11): 898-902.
- [6] 郑晓霞, 张丹参. 大黄酚-羟丙基- β -环糊精包合物的工艺优选及鉴定 [J]. 中成药, 2010, 32(9): 1518-1521.
- [7] 赵梅, 王晓东, 王晓, 等. 超分子包合技术在新药研制中的应用 [J]. 山东科学, 2012, 25(1): 103-107.
- [8] Xiong S, Melton L D, Easteal A J, *et al.* Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(17): 6201-6208.
- [9] 戴德雄, 朱莹, 蔡仁华. HPLC 法测定利胆片中大黄素和大黄酚 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1111-1112.
- [10] Wang Z, He Z, Zhang L, *et al.* Optimization of a doxycycline hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex based on computational modeling [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2013, 3(2): 130-139.
- [11] 王博, 任晓文, 李洪起. 星点设计-效应面法优化银杏酮酯包合物的制备工艺 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 262-265.
- [12] 唐勤, 顾勇, 李纳. 姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球在大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1939-1943.
- [13] 曾巧玲, 樊小林, 赵希娟, 等. 壳聚糖与左氧氟沙星的共价偶联载药复合物的抗菌活性研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 38(4): 75-79.
- [14] 唐勤, 孙晓辉, 陈毫, 等. 制备方法和工艺对姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球体外性质的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2377-2385.
- [15] Wu C, Chu B, Kuang L, *et al.* Synthesis of β -1, 3-glucan esters showing nanosphere formation [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(1): 807-812.