

星点设计-效应面法优化阿德福韦- β -环糊精包合物制备工艺的研究

王 博¹, 李洪起¹, 连潇嫣¹, 任晓文², 徐为人³

1. 天津药物研究院 制剂工程中心, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

3. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 星点设计-效应面法优化阿德福韦包合物的制备工艺。方法 以饱和水溶液法制备阿德福韦- β -环糊精包合物, 采用星点设计优化制备工艺, 以 β -环糊精与阿德福韦的投料配比、包合时间、包合温度为自变量, 包合率、收率为因变量, 分别进行多元线性回归和二项式方程拟合, 依据最佳数学模型描绘效应面选择最佳处方工艺进行验证试验。结果 二项式方程拟合度较高, 预测性好, 相关系数 $r=0.965$; 效应面法优选出的最佳工艺为: β -环糊精与阿德福韦的投料配比约为 3:1, 包合时间为 5 h, 包合温度为 60 °C。最佳工艺验证试验结果与二项式拟合方程预测值偏差为 $(1.31 \pm 0.69)\%$ 。结论 应用星点设计-效应面优化法能够精确有效地优化阿德福韦- β -环糊精包合物的制备工艺, 优选出的最佳工艺稳定可行, 可用于工业生产。

关键词: 阿德福韦- β -环糊精包合物; 星点设计; 效应面法; 包合率; 收率

中图分类号: R944.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)11-1227-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.11.008

Preparation optimization of adefovir- β -cyclodextrin inclusion complex by central composite design and response surface methodology

WANG Bo¹, LI Hong-qi¹, LIAN Xiao-yan¹, REN Xiao-wen², XU Wei-ren³

1. The Pharmaceutics Engineering Research Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To optimize the preparation technology of adefovir- β -cyclodextrin inclusion complex by central composite design and response surface methodology. **Methods** Saturated aqueous solution method was used to prepare adefovir- β -cyclodextrin inclusion complex. The preparation was optimized by central composite design. With β -cyclodextrin / adefovir, inclusion time, and temperature as the independent variables, and with the inclusion rate and yield as the dependent variable, the binomial and linear equations were fitted to the data of overall desirabilities, and the resulting equation was used to produce 3-D response surface graphs, through which optimal formulation was predicted, and the best prescription process was chosen to verify test. **Results** The fitting of second-order quadratic model was high, and the correlation coefficient was 0.965. The optimum conditions for the preparation of adefovir- β -cyclodextrin inclusion complex were as follows: β -cyclodextrin / adefovir of 3:1, inclusion time of 5 h, and inclusion temperature at 60 °C. The deviation between the result of best craft verification test and the binomial fitting equation forecast value was $(1.31 \pm 0.69)\%$. **Conclusion** Central composite design and response surface methodology is successfully used to optimize the preparation technology of adefovir- β -cyclodextrin inclusion complex. The optimized process is reliable, stable, and available for the industrial production.

Key words: adefovir- β -cyclodextrin inclusion complex; central composite design; response surface methodology; inclusion rate; yield

收稿日期: 2014-06-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2010CB735600)

作者简介: 王 博(1983—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事药物新剂型与新技术方面研究。Tel: (022)23006953 E-mail: wangb@tjipr.com

阿德福韦是一种新型的核苷类抗乙型肝炎病毒药物。捷克科学院有机化学与生物化学研究所的 Antonín Holý 首先合成了阿德福韦；随后美国生物技术公司 Gilead Sciences 对其进行研发，将其制成了前药阿德福韦酯并成功上市，成为临床上第 2 个口服抗乙型肝炎病毒药物^[1]。阿德福韦酯对湿、热不稳定，稳定性差，而且腐蚀性很强，极大地影响原料药合成、制剂生产及药物的临床应用，限制了其更广泛的发展和运用。采用 β -环糊精包合技术对阿德福韦进行包合，可以使阿德福韦的溶解性、膜的通透性、蛋白结合性等发生改变，从而提高药物的生物利用度，为其广泛应用创造有利条件^[2-4]。星点设计结合效应面法是近些年来药学科工作者常用的一种集数学和统计于一体的实验设计方法，其特点是各实验点距中心点的距离相等，自变量的极端水平为实验所允许的极大极小值，一次设计即可获得较佳条件，并且多采用非线性数学模型拟合，复相关系数高，应用已经成熟，与国内经常采用的均匀设计和正交设计相比具有精度高、预测性好、简便等优点^[5]。本研究采用星点设计法对阿德福韦- β -环糊精包合物制备工艺进行了优化。

1 试药与仪器

阿德福韦原料药、对照品（天津药物研究院新药创新中心提供，质量分数 $\geq 99.0\%$ ）； β -环糊精（上海元吉化工有限公司，批号 130121，质量分数 $\geq 96.0\%$ ）；其余试剂均为分析纯。

Thermo evolution 220 紫外-可见分光光度仪（美国赛默飞世尔科技）；Startorius BP211D 电子天平（德国赛多利斯）；KA-1000 离心机（上海安亭科学仪器厂）；Autoscience AS3120 超声波清洗机（奥特赛恩斯仪器有限公司）；RE-5205 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；DF-101S 型智能集热式恒温加热磁力搅拌器（河南省予华仪器有限公司）；SHB-III 型循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）。

2 方法与结果

2.1 阿德福韦- β -环糊精包合物的制备方法

采用饱和水溶液法制备。称取一定量阿德福韦原料药，加无水乙醇 40 mL，以热水浴加热至一定温度使其溶解，按不同物质的量比例称取一定量的 β -环糊精，加水 40 mL 加热至一定温度使其溶解，恒温，电磁搅拌。将阿德福韦乙醇溶液移至分液漏斗中，缓慢滴入 β -环糊精饱和水溶液中，在恒温状

态下搅拌一定时间，室温静置 12 h，滤过，沉淀用蒸馏水、乙醇各洗涤 3 次，再 45℃ 减压干燥，即得白色的包合物。

2.2 包合物中阿德福韦的测定^[6]

2.2.1 对照品溶液的制备 取经 50℃ 减压干燥至恒定质量的阿德福韦对照品适量，精密称定，加无水乙醇溶解并稀释制成 20 $\mu\text{g/mL}$ 阿德福韦溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取阿德福韦- β -环糊精包合物适量，用无水乙醇分多次洗脱，并将洗脱液合并转移至 100 mL 量瓶中，加无水乙醇至刻度，再用 0.45 μm 有机滤膜滤过，取续滤液，制得 20 $\mu\text{g/mL}$ 供试品溶液。

2.2.3 空白辅料溶液的制备 取 β -环糊精适量，照 2.2.2 项下方法同法制备空白辅料溶液。

2.2.4 样品测定 分别取空白辅料溶液、阿德福韦对照品溶液和包合物供试品溶液，以空白辅料溶液为空白对照，按照紫外-可见分光光度法在 258 nm 处测定其吸光度值，采用外标法计算包合物洗脱溶液中阿德福韦的质量浓度。

2.3 工艺评价标准的确定

通过紫外-可见分光光度法计算包合物中阿德福韦的质量分数，并根据质量分数按照包合率 = 包合物中阿德福韦的质量 / 包合物的投入量 $\times 100\%$ 计算阿德福韦- β -环糊精包合物的包合率。由阿德福韦投药量和 β -环糊精的投药量，根据包合物收率可以计算出包合物的收率 = (阿德福韦的投药量 + β -环糊精的投药量) / 包合物产量 $\times 100\%$ 。由于以上两个指标可以很好地筛分包合物的包合工艺，所以采用包合率和收率作为阿德福韦- β -环糊精包合物包合工艺的评价指标。

2.4 星点设计-效应面法优化处方

2.4.1 因素与水平的确定 采用单因素考察法对方中各影响因素进行了初步考察，其中 β -环糊精与阿德福韦的投料配比 (X_1)、包合时间 (X_2) 和包合温度 (X_3) 是影响包合物包合率和收率的主要因素，因此作为主要考察因素，3 个自变量取值范围分别为 1 : 2~5 : 1 mol/mol、0.5~6 h、40~80℃。

根据星点设计的基本原理，每个因素设 5 个水平，用代码值 $-\alpha$ 、-1、0、1、 α 分别表示。对于 3 因素的星点设计 $\alpha=1.682$ ，代码值之间与实际操作物理量之间为等比关系，见表 1，实验方案安排及结果见表 2。

表 1 考察因素各水平的代码值及实际操作物理量 (n=3)
Table 1 Levels of independent variables in coded and physical form (n=3)

水平	自变量		
	X ₁ /(mol·mol ⁻¹)	X ₂ /h	X ₃ /°C
-1.682	0.500	0.500	40.000
-1	1.412	1.615	48.109
0	2.750	3.250	60.000
1	4.088	4.885	71.891
1.682	5.000	6.000	80.000

2.4.2 模型拟合^[7] 根据以上 20 次包合试验结果,应用 SPSS 19.0 统计软件,以包合物的包合率和收率为因变量,β-环糊精与阿德福韦的投料配比(X₁)、包合时间(X₂)和包合温度(X₃)为自变量,进行多元线性回归和二项式方程拟合,模型拟合的优劣通过相关系数 r 进行判断。将实验数据进行拟合后得拟合方程。可见二项式方程拟合相关系数 r 值高于多元线性方程拟合,拟合度较高,预测性较好,最终选择二项多项式方程拟合模型为最佳模型。

多元线性拟合方程: $Y = 52.104 + 3.394 X_1 + 3.655 X_2 + 0.209 X_3$ (r=0.714)

二次多项式方程: $Y = -59.174 + 18.837 X_1 + 13.580 X_2 + 2.967 X_3 - 3.047 X_1^2 - 1.563 X_2^2 - 0.023 X_3^2 + 0.114 X_1 X_2 + 0.016 X_1 X_3 - 0.001 X_2 X_3$ (r=0.965)

2.4.3 效应面优化及预测性评价 根据以上所拟合的二项式方程,应用 Origin V8.5 软件分别绘制各考察指标与影响较显著的 2 个自变量的三维效应面(其他 1 个自变量设为中心点值),从中筛选出最佳的工艺水平^[8],结果见图 1。可见相同类型等高线

之间的区域即为此指标的最佳区域,找出各等高线最佳区域的重合部分即为此工艺的最佳区域。因此阿德福韦-β-环糊精包合物制备工艺的最佳工艺条件为:β-环糊精与阿德福韦的投料配比为 2.7:1~3.5:1 mol/mol,包合时间为 4~6 h 和包合温度为 57.5~65 °C。

表 2 星点设计及结果

Table 2 Arrangement and results of central composite design

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	包合率/%	收率/%
1	-1	-1	-1	72.6	51.4
2	1	-1	-1	74.8	57.8
3	-1	1	-1	80.5	71.2
4	1	1	-1	87.2	78.5
5	-1	-1	1	75.4	66.3
6	1	-1	1	82.1	76.9
7	-1	1	1	86.7	79.8
8	1	1	1	90.9	81.1
9	-1.682	0	0	67.4	50.7
10	1.682	0	0	92.5	83.2
11	0	-1.682	0	71.3	63.2
12	0	1.682	0	95.8	80.7
13	0	0	-1.682	81.9	71.2
14	0	0	1.682	90.2	73.5
15	0	0	0	94.7	77.8
16	0	0	0	93.5	76.8
17	0	0	0	94.6	79.6
18	0	0	0	95.1	82.3
19	0	0	0	95.9	82.5
20	0	0	0	94.1	81.9

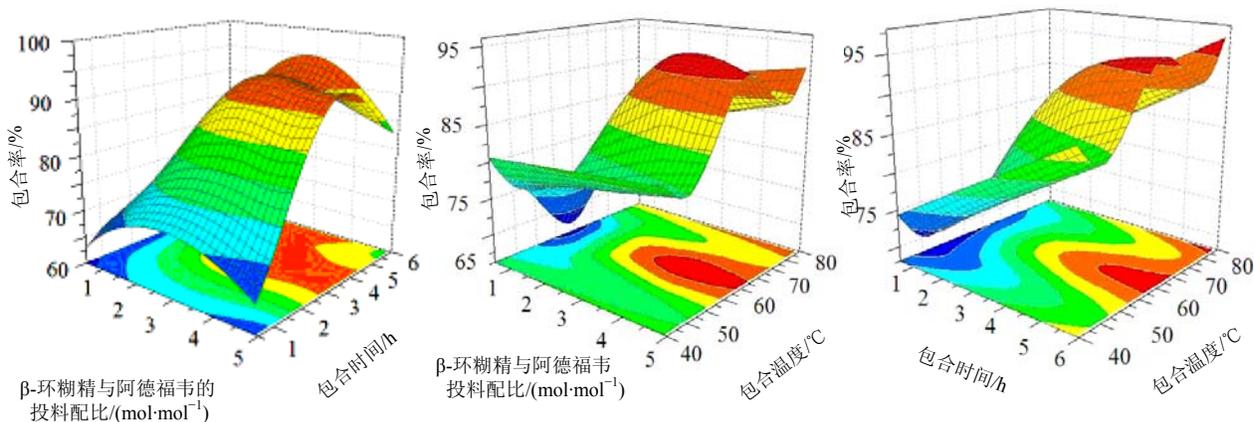


图 1 各因素对包合率影响的三维效应面
Fig. 1 3D-response surfaces of factors on encapsulation efficiency

2.5 最优处方工艺验证

综合考虑工业可行性和投入产出比,选取阿德福韦- β -环糊精包合物的最佳制备工艺条件为: β -环糊精投料量 170 g,阿德福韦投料量为 25 g,物质的量比约为 3:1,包合时间为 5 h 和包合温度为 60 °C。按照选取的最佳制备工艺条件重复 3 次试验,结果真实值为 $(96.96 \pm 0.68)\%$,预测值为 98.25%。将预测值与实测值进行比较,按照偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值 $\times 100\%$ 计算偏差,结果预测值与实测值的偏差为 $(1.31 \pm 0.69)\%$,小于 5%,提示实验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

近些年来广泛使用的星点设计结合效应面法,采用非线性数学拟合建立模型,相关系数较高,预测值更加接近真实值,结果非常理想,很大程度上弥补了正交设计和均匀设计法的不足,更能体现质量源于设计的理念。星点设计结合效应面法实验所得到的信息量更大,更直观,更适合于探索性的试验研究。本实验采用星点设计 - 效应面法优化阿德福韦- β -环糊精包合物的制备工艺,通过二项式方程拟合描绘三维效应面,从而确定较优的制备工艺区间。实验结果科学可靠,优选出的最佳制备工艺参数范围较宽,且在此范围内包合率变化较小,说明工艺稳定可靠,适合于工业生产。

目前分子包合技术在药剂学领域非常活跃,越来越多的科研工作者认识到包合物对药剂处方前工

作有着十分重要的意义,如包合物增加药物的稳定性或溶解度,影响药物在体内的吸收和分布等。国内外环糊精包合物的上市药物已达几十种,可以预见随着包合技术以及分子生物学技术的进一步成熟和完善,采用包合技术的药物新剂型和新品种将会得到更大的发展空间。

参考文献

- [1] 郭晓敏,陈国华,王 生. 阿德福韦酯合成路线图解 [J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(9): 707-709.
- [2] 任晓文,王 博,李洪起,等. β -环糊精包合阿德福韦的理论研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 173-176.
- [3] 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]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 455-457.
- [4] 邹小艳,魏立新,杜玉枝,等. 星点设计-效应面法优化川西獐牙菜提取工艺 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 692-696.
- [5] 陈 飞,邢雪飞,白 雪,等. 星点设计-效应面法优选欣宁泡腾片提取工艺 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1566-1572.
- [6] 王 超,王长斌,袁 玉. HPLC 法和 UV 法测定阿德福韦酯片的含量比较 [J]. 现代医药卫生, 2009, 25(24): 3687-3689.
- [7] 许伯慧,柯 学,平其能. 星点设计-效应面法优化氢氯噻嗪盐酸可乐定复方缓释制剂处方 [J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(6): 505-509.
- [8] 陈 飞,张 悦,刘 强,等. 星点设计法优化盐酸小檗碱树脂复合胃黏附给药系统的研究 [J]. 药学学报, 2008, 43(9): 963-968.