

综合考虑产物得率和取代度的情况, 试剂对比对产物得率的影响较大, 故选择试剂配比为 1: 6, 时间对取代度的影响较大, 选择反应时间 3 h, 温度对二者影响都不明显, 由于高温会对多糖结构产生影响, 故选择反应温度为 80 ℃。

2.7 验证试验结果: 在反应温度 80 ℃、试剂配比 1: 6、反应时间 3 h 的最佳条件下, 进行 3 次酯化操作, 获得的 3 个 sCPPS 的得率分别为 171%、165%、168%, 取代度分别为 1.42、1.75、1.63, 与正交试验结果的差异不显著, 说明此条件为最佳修饰条件。

### 3 讨论

多糖硫酸酯化的方法很多, 一般吡喃型多糖采用 Wolfrom<sup>[6]</sup> 方法, 呋喃型采用 Nagasawa 方法。常用方法包括浓硫酸法、三氧化硫-吡啶法、氯磺酸-吡啶法、氯磺酸-甲酰胺法等。氯磺酸-吡啶法是在无水环境吡啶中, 利用氯磺酸中的磺酸根取代单糖残基上一个或若干羟基上的氢得到硫酸酯多糖。党参多糖为吡喃型多糖, 所以采用氯磺酸-吡啶法修饰, 此方法相对简单, 取代度高, 产物回收方便<sup>[8]</sup>。

由于反应温度、试剂配比和反应时间对多糖的硫酸化修饰有显著影响, 本研究用正交试验优选出党参多糖硫酸化修饰的最佳条件, 反应温度 80 ℃, 氯磺酸-吡啶配比为 1: 6, 反应时间为 3 h。反应温度为 80 ℃时, 取代度最高、产物得率较高, 若再升高温度可能使多糖结构破坏。有人研究了香菇多糖的

硫酸化修饰, 证明温度达到 90 ℃时产物收率急剧下降<sup>[9]</sup>。本实验发现, 试剂配比在 1: 4 时, 氯磺酸-吡啶盐出现板结, 搅拌困难, 使产物得率和取代度都较低, 这与卢宇等<sup>[9]</sup>的报道一致。反应时间长, 多糖与酯化试剂充分接触反应越完全, 可使取代度升高。综合考虑 3 个因素, 因此选择了适中反应温度、试剂配比和较长的反应时间。同时, 验证试验也证明了选择的条件是最佳条件。

#### 参考文献:

- [1] 任丽清, 张静, 刘志存, 等. 党参多糖的分离纯化及其结构研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 986-989
- [2] Nishimura S I, Kai H, Shibada K, et al. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: Specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates [J]. *Carbohydr Res*, 1998, 306: 427-432
- [3] 陈景耀, 吴国荣, 王建安, 等. 正交试验优选白芨多糖硫酸酯化工艺的研究[J]. 中草药, 2005, 36(1): 432-461
- [4] 黄小燕, 胡元亮, 卢宇, 等. 正交实验优选黄芪多糖硫酸化修饰条件及修饰产物抗 IBDV 活性测定[J]. 中药材, 2008, 31(4): 588-592
- [5] 丛建波, 王长振, 李妍, 等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定硫酸钡比浊法[J]. 解放军药学报, 2003, 19(3): 152-153
- [6] Wolfrom M L, Juliano B O. Chondroitin sulfate modification. sulfated and ndeacetylated preparation [J]. *J Am Chem Soc*, 1960, 82(11): 2588-2592
- [7] 燕航, 钟耀广, 王淑琴, 等. 硫酸酯化香菇多糖衍生物制备的研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(3): 44-45
- [8] 刘占峰, 孙汉文. 多糖的化学修饰研究进展[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2005, 25(1): 104-108
- [9] 卢宇, 胡元亮, 孙峻岭, 等. 淫羊藿多糖硫酸化修饰条件的优化[J]. 中草药, 2008, 39(3): 357-360

## Box-Behnken 设计效应面法优化木犀草素-β-环糊精包合物的制备工艺研究

伍永富<sup>1</sup>, 吴品江<sup>2</sup>, 魏萍<sup>2</sup>, 吴大章<sup>3\*</sup>

(1 太极集团重庆涪陵制药有限公司, 重庆 408000; 2 成都中医药大学, 四川 成都 611137;

3 太极集团重庆桐君阁药厂, 重庆 400066)

**摘要:** 目的 优化木犀草素-β-环糊精包合物的制备工艺。方法 采用饱和水溶液法包合木犀草素, 以包合率、收率和总评“归一值”为评价指标, 采用 Box-Behnken 设计考察 β-环糊精-木犀草素投料比例、包合时间、包合温度对制备工艺的影响, 对结果进行多元线性和二项式拟合, 效应面法选取最佳工艺条件进行预测分析。结果 从相关系数上看, 各项指标二项式拟合方程均优于多元线性回归方程, 根据优化制备工艺制得木犀草素-β-环糊精包合物的平均包合率为 75%, 收率为 66%。结论 优化的木犀草素-β-环糊精包合物制备工艺稳定可行, 包合率和收率同时都高, 可用于生产。

**关键词:** 木犀草素; β-环糊精包合物; Box-Behnken 设计; 效应面法

\* 收稿日期: 2009-09-21

作者简介: 伍永富(1974—), 男(土家族), 重庆黔江人, 制药工程师, 硕士研究生, 从事中药生产新技术和新剂型研究。

Tel: (023) 72801079 E-mail: five1975@126.com

\* 通讯作者 吴大章 E-mail: 271241334@qq.com

中图分类号: R286 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1094-06

## Optimization of preparation for cyanidenon- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound by Box-Behnken design and response surface method

WU Yong-fu<sup>1</sup>, WU Pin-jiang<sup>2</sup>, WEI Ping<sup>2</sup>, WU Da-zhang<sup>3</sup>

(1 Chongqing Fuling Pharmaceuticals Co. Ltd., Taiji Group, Chongqing 408000, China; 2 Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3 Chongqing Tongjunge Pharmaceutical Factory Co., Ltd., Taiji Group, Chongqing 400066, China)

**Abstract:** **Objective** To optimize the formulation of cyanidenon- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound. **Methods** Cyanidenon- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound was prepared by saturated water solution method. The effects of influence factors, such as ingredient proportion, inclusion time, inclusion temperature on inclusion rate, obtaining rate, and overall desirability were investigated by using Box-Behnken design and response surface method. The data were imitated using multi-linear equation and second-order polynomial equation. **Results** The latter was prior to the former considering from multiple correlation coefficients. Under the optimal conditions, inclusion rate and yield were 75% and 66%, respectively. **Conclusion** The optimized preparation technique for cyanidenon- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound is stable, feasible, and has high inclusion rate. It can be used for the production of cyanidenon- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound.

**Key words:** cyanidenon;  $\beta$ -cyclodextrin; Box-Behnken design; response surface method

木犀草素具有止咳、祛痰、抗癌、消炎等功效,但在水中的溶解度较小<sup>[1,2]</sup>。 $\beta$ -环糊精可选择性地与多种芳香化合物形成环糊精包合物,它的包合作用在增加药物的溶解度、稳定性、掩盖药物的臭味等方面具有良好效果<sup>[3]</sup>。将木犀草素制成 $\beta$ -环糊精包合物后,能改善药物溶解度,提高生物利用度。本实验采用正交实验法优选了木犀草素的环糊精的包合工艺,并对影响包合过程的热力学因素进行了探讨。采用Box-Behnken设计实验,并以非线性数学模型拟合,复相关系数高,此种方法应用已成熟,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、直观等优点<sup>[4]</sup>。

### 1 仪器与材料

SHZ-DIII型循环水式真空泵(浙江黄岩求精真空泵厂);79HW-1型恒温磁力搅拌器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);BP61型Sartorius电子分析天平(上海精科仪器厂);木犀草素提取物(自制,质量分数>90%); $\beta$ -环糊精(北京奥博星生物技术责任有限公司,质量分数>98%,批号20010412);水、乙醇等其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

2.1 木犀草素- $\beta$ -环糊精包合物的制备:将 $\beta$ -环糊精溶于适量水中,搅拌加热使其全部溶解,将溶解在少量无水乙醇中的木犀草素缓缓滴入已冷却的 $\beta$ -环

糊精水溶液中,在设定温度下,在规定时间内连续磁力搅拌后,减压抽滤,分别用温蒸馏水和无水乙醇洗涤,真空干燥,得到棕色晶状固体包合物。

#### 2.2 分析方法的建立

2.2.1 标准曲线的绘制:精密称定木犀草素对照品3 mg置于10 mL量瓶中,加40%甲醇溶液溶解,并稀释至刻度,作为储备液;然后分别精密吸取木犀草素对照品储备液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、0.9 mL于10 mL量瓶中,用40%甲醇稀释至刻度,质量浓度为3、6、9、12、15、21、27  $\mu\text{g/mL}$ 系列木犀草素对照品溶液,用40%甲醇作为空白,在354 nm处分别测定吸光度。以木犀草素质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,作图并进行线性回归,得回归方程 $Y=0.0348X+0.0069$ , $R^2=0.9985$ ,结果表明木犀草素在3~27  $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度线性关系良好。

2.2.2 精密度试验:选择3、27  $\mu\text{g/mL}$ 木犀草素对照品溶液分别于1 d内重复测定6次峰面积值;连续6 d测定峰面积值,结果表明高、低两个质量浓度的日内及日间RSD都小于2%。

2.2.3 稳定性试验:选择15  $\mu\text{g/mL}$ 木犀草素对照品溶液分别于0、2、4、6、8、12 h进行吸光度测定,结果RSD为1.54%,表明木犀草素溶液在12 h内稳定。

2.2.4 加样回收率试验:取6份包合物,精密称定,分别加入木犀草素对照品储备液适量,依法测定,结

果木犀草素平均回收率为 98.25%, RSD 为 1.56%。

2.2.5 包含率和收率的计算: 分别精密称取包合物 4 mg 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解至刻度, 于 40 °C 水浴中放置 1 d。定时振荡、摇匀。以 40% 甲醇液为空白取上清液配制成 40% 甲醇溶液。于 354 nm 处测定吸光度, 计算木犀草素包含率(包含率=包合物中木犀草素实际量/木犀草素投入量×100%)。称定质量, 计算收率[收率=干包合物质量/(木犀草素投入量+环糊精投入量)×100%]。

### 2.3 效应面法优化试验

2.3.1 单因素试验考察: 根据文献报道, 影响木犀草素包含的主要因素为包含温度、包含时间、环糊精与药物的投料比例。根据预试验结果及在最高和最低水平制备环糊精包合物的可行性, 将以上每个因素设置成若干个水平, 采用单因素法考察其对木犀草素-环糊精包合物的包含率、收率的影响, 确定各个因素的最高和最低水平, 为 Box-Behnken 设计因素与水平提供参考。结果得到各个因素水平范围分别为:  $\beta$ -环糊精、木犀草素投料比例为 1~2, 包含温度为 50~70 °C, 包含时间为 1~5 h。

2.3.2 Box-Behnken 试验设计: Box-Behnken 试验设计法技能考察各个因素对效应(收得率、包含率)的影响及各影响间交互作用, 也能进行各个因素的最优化。该方法可对环糊精包合物制备中各个独立因素及其各个因素间的交互作用对所考察指标的影响进行综合分析, 建立数学模型并作出相应的三维应变曲面图, 对因素与指标的关系进行直观的量化分析。这种综合考察法比单因素考察更为全面客观。

在单因素考察的基础上, 选择对木犀草素- $\beta$ -环糊精包合物制备工艺影响显著的 3 个因素, 即  $\beta$ -环糊精/木犀草素( $X_1$ )、包含时间( $X_2$ )和包含温度为( $X_3$ )为因素, 设计的因素水平见表 1, 以制备工艺的包含率和收得率为效应进行 Box-Behnken 设计-效应面优化试验, 并采用 design expert 7.1 软件对实验数据进行拟合分析, 见表 2。每一自变量的低、中、高水平分别以 -1、0、1 进行编码, 各自变量的编码见表 1, 其编码制与真是只之间的关系符合方程:  $X_1 = (x_1 - 1.5)/0.5$ ;  $X_2 = (x_2 - 3)/2$ ;  $X_3 = (x_3 - 60)/10$ 。

按照 Box-Behnken 试验设计的统计学要求, 各组试验的安排见表 2, 实验模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程可以表达为:  $Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$ 。其中  $Y$  为效应值(包含率、

收率),  $A_0, A_i, A_{ii}, A_{ij}$  为方程系数,  $X_i, X_j (i = 1, 3; j \neq i)$  为自变量编码值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数  $R^2$  表达, 其统计学上的显著性由  $F$  值检验; 采用 design expert 7.1 软件分析。

不同包含条件制备木犀草素环糊精包合物的效应值包含率和收得率的相应变化见表 2。第 13~17 次试验为 5 次重复的中心点试验, 用于考察模型的误差。

表 1 试验因素水平及编码

| Table 1 Factors and levels of test and codes |                         |              |               |
|----------------------------------------------|-------------------------|--------------|---------------|
| 编码                                           | 因素                      |              |               |
| 水平                                           | $X_1$ $\beta$ -环糊精/木犀草素 | $X_2$ 包含时间/h | $X_3$ 包含温度/°C |
| -1                                           | 1.0                     | 1            | 50            |
| 0                                            | 1.5                     | 3            | 60            |
| 1                                            | 2.0                     | 5            | 70            |

表 2 Box-Behnken 试验设计下包合物包含率和收率

| Table 2 Inclusion rate and yield of inclusion compound under Box-Behnken test design |       |       |       |             |            |          |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------------|------------|----------|--|
| 试验                                                                                   | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $Y_1$ 包含率/% | $Y_2$ 收率/% | $Y_3$ 总评 |  |
| 1                                                                                    | -1    | -1    | 0     | 77.2        | 42.5       | 0.00     |  |
| 2                                                                                    | 1     | -1    | 0     | 55.9        | 68.3       | 0.46     |  |
| 3                                                                                    | -1    | 1     | 0     | 80.3        | 43.5       | 0.15     |  |
| 4                                                                                    | 1     | 1     | 0     | 54.5        | 68.8       | 0.44     |  |
| 5                                                                                    | -1    | 0     | -1    | 78.9        | 44.6       | 0.21     |  |
| 6                                                                                    | 1     | 0     | -1    | 47.2        | 78.9       | 0.34     |  |
| 7                                                                                    | -1    | 0     | 1     | 88.8        | 42.7       | 0.07     |  |
| 8                                                                                    | 1     | 0     | 1     | 58.3        | 66.9       | 0.49     |  |
| 9                                                                                    | 0     | -1    | -1    | 52.3        | 60.4       | 0.33     |  |
| 10                                                                                   | 0     | 1     | -1    | 41.7        | 64.3       | 0.00     |  |
| 11                                                                                   | 0     | -1    | 1     | 58.9        | 66.8       | 0.49     |  |
| 12                                                                                   | 0     | 1     | 1     | 69.6        | 55.7       | 0.46     |  |
| 13                                                                                   | 0     | 0     | 0     | 80.9        | 62.2       | 0.67     |  |
| 14                                                                                   | 0     | 0     | 0     | 80.5        | 61.9       | 0.66     |  |
| 15                                                                                   | 0     | 0     | 0     | 79.8        | 62.7       | 0.67     |  |
| 16                                                                                   | 0     | 0     | 0     | 79.3        | 61.8       | 0.65     |  |
| 17                                                                                   | 0     | 0     | 0     | 77.5        | 62.5       | 0.65     |  |

2.3.3 木犀草素- $\beta$ -环糊精包合物制备工艺包含率的效应面优化: 包含率试验的方差分析结果见表 3, 经  $F$  值检验显示总模型方程显著( $P < 0.0001$ ),  $R^2 = 0.9825$ , 表明该回归模型的拟合情况良好, 回归方程的代表性较好, 能准确的预测实际情况。其校正决定系数( $R^2_{adj}$ )为 0.9599, 表明此模型能解释 95.99% 效应值变化, 因此该模型拟合程度良好, 实验误差小, 仅有约 4% 不能由此模型进行解释。拟合回归方程为  $Y_1 = 79.6 - 13.66 X_1 + 0.22 X_2 + 6.94 X_3 - 1.13 X_1 X_2 + 0.3 X_1 X_3 + 5.32 X_2 X_3 + 0.025 X_1^2 - 12.65 X_2^2 - 11.32 X_3^2$ 。而多元线性回归的相关系数  $R^2$  为 0.5618, 其校正决定系数( $R^2_{adj}$ )为 0.4606, 不如二项式回归拟合好, 线性方

表 3 包含率二项式回归模型系数显著性检验表

Table 3 Significance of second-order regression model coefficients of inclusion rate

| 方差来源                | 平方和       | 自由度 | 均方        | F 值       | P 值       |
|---------------------|-----------|-----|-----------|-----------|-----------|
| Model               | 3 285.673 | 9   | 365.074 8 | 43.578 01 | < 0.000 1 |
| A (X <sub>1</sub> ) | 1 493.311 | 1   | 1 493.311 | 178.252 6 | < 0.000 1 |
| B (X <sub>2</sub> ) | 0.405     | 1   | 0.405     | 0.048 344 | 0.832 2   |
| C (X <sub>3</sub> ) | 385.031 3 | 1   | 385.031 3 | 45.960 16 | 0.000 3   |
| AB                  | 5.062 5   | 1   | 5.062 5   | 0.604 297 | 0.462 4   |
| AC                  | 0.36      | 1   | 0.36      | 0.042 972 | 0.841 7   |
| BC                  | 113.422 5 | 1   | 113.422 5 | 13.538 94 | 0.007 9   |
| A <sup>2</sup>      | 0.002 632 | 1   | 0.002 632 | 0.000 314 | 0.986 4   |
| B <sup>2</sup>      | 673.778 9 | 1   | 673.778 9 | 80.427 21 | < 0.000 1 |
| C <sup>2</sup>      | 540.023 7 | 1   | 540.023 7 | 64.461 2  | < 0.000 1 |
| Residual            | 58.642 5  | 7   | 8.377 5   |           |           |
| Pure error          | 7.04      | 4   | 1.76      |           |           |
| Core total          | 3 344.315 | 16  |           |           |           |

程为:  $Y_1 = 68.33 - 13.66 X_1 + 0.22 X_2 + 6.94 X_3$ 。

根据回归分析结果作出相应曲面图和等高线图, 见图 1。投料比例与包含温度对木犀草素-β-环糊精包合物包含率影响具有显著性意义, 而包含时间影响不大。包含率随药物投料比例增加而降低, 当投料比例较高时, 包含时间对包含率影响不大, 当投料比例降低后, 随着包含时间增加到 3~4 h 后, 其包含率能达到最大值。再延长包含时间, 包含率反而降低。当包含温度较低时, 其 β-环糊精与药物投料比例对包含率影响不大, 当温度增大到 60~65 °C, 其包含率能达到最大值, 但是再升高温度, 包含率就会降低。在一定范围内, 其包含率与包含温度、包含时间呈正相关, 当包含时间为 3 h 左右时, 包含温度为 60 °C 左右时, 包含率能达到最大值。

2.3.4 木犀草素-β-环糊精包合物制备工艺收率的效应面优化: 收率试验的方差分析结果见表 4, 经 F 值检验显示总模型方程显著 ( $P < 0.000 1$ ),  $R^2 = 0.980 8$ , 表明该回归模型的拟合情况良好, 回归方程的代表性较好, 能准确的预测实际情况。其校正决定系数 ( $R^2_{adj}$ ) 为 0.956 2, 表明此模型能解释 95.6% 效应值变化, 因此该模型拟合程度良好, 实验误差小, 仅有约 4% 不能由此模型进行解释。拟合回归方程为  $Y_2 = 62.22 - 13.7 X_1 - 0.71 X_2 - 2.01 X_3 - 0.13 X_1 X_2 - 2.53 X_1 X_3 - 3.75 X_2 X_3 - 4.99 X_1^2 - 1.46 X_2^2 + 1.04 X_3^2$ 。多元线性回归的相关系数  $R^2$  为 0.867 5, 其校正决定系数 ( $R^2_{adj}$ ) 为 0.836 9, 不如二项式回归拟合好。线性方程为  $Y_2 = 59.68 + 13.7 X_1 - 0.71 X_2 - 2.01 X_3$ 。

根据回归分析结果作出相应曲面图和等高线图, 见图 2。投料比例对木犀草素-β-环糊精包合物

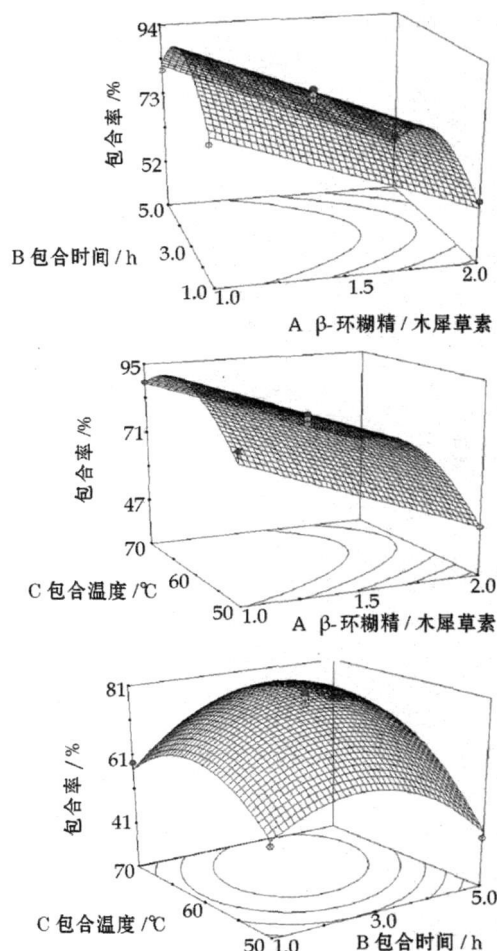


图 1 各因素对木犀草素-β-环糊精包合物包含率影响效应图

Fig. 1 Response surface of factors on inclusion rate of cyanidin-β-cyclodextrin inclusion compound

表 4 收率二项式回归模型系数显著性检验表

Table 4 Significance of second-order regression model coefficients of yield

| 方差来源                | 平方和       | 自由度 | 均方        | F 值       | P 值       |
|---------------------|-----------|-----|-----------|-----------|-----------|
| Model               | 1 738.925 | 9   | 193.213 9 | 39.772 9  | < 0.000 1 |
| A (X <sub>1</sub> ) | 1 501.52  | 1   | 1 501.52  | 309.086 5 | < 0.000 1 |
| B (X <sub>2</sub> ) | 4.061 25  | 1   | 4.061 25  | 0.836 004 | 0.390 9   |
| C (X <sub>3</sub> ) | 32.401 25 | 1   | 32.401 25 | 6.669 767 | 0.036 3   |
| AB                  | 0.062 5   | 1   | 0.062 5   | 0.012 866 | 0.912 9   |
| AC                  | 25.502 5  | 1   | 25.502 5  | 5.249 665 | 0.055 7   |
| BC                  | 56.25     | 1   | 56.25     | 11.579 01 | 0.011 4   |
| A <sup>2</sup>      | 104.632 5 | 1   | 104.632 5 | 21.538 51 | 0.002 4   |
| B <sup>2</sup>      | 8.975 158 | 1   | 8.975 158 | 1.847 528 | 0.216 2   |
| C <sup>2</sup>      | 4.554 105 | 1   | 4.554 105 | 0.937 458 | 0.365 2   |
| Residual            | 34.005 5  | 7   | 4.857 929 |           |           |
| Pure error          | 0.588     | 4   | 0.147     |           |           |
| Core total          | 1 772.931 | 16  |           |           |           |

包含率与包含温度影响具有显著性意义, 而包含时间对包含率影响不大。收率随着 β-环糊精与木犀草素投料比例增加而增加, 影响较大, 而受包含温度和包含时间影响较大。当包含温度在 50~55 °C 时, 收

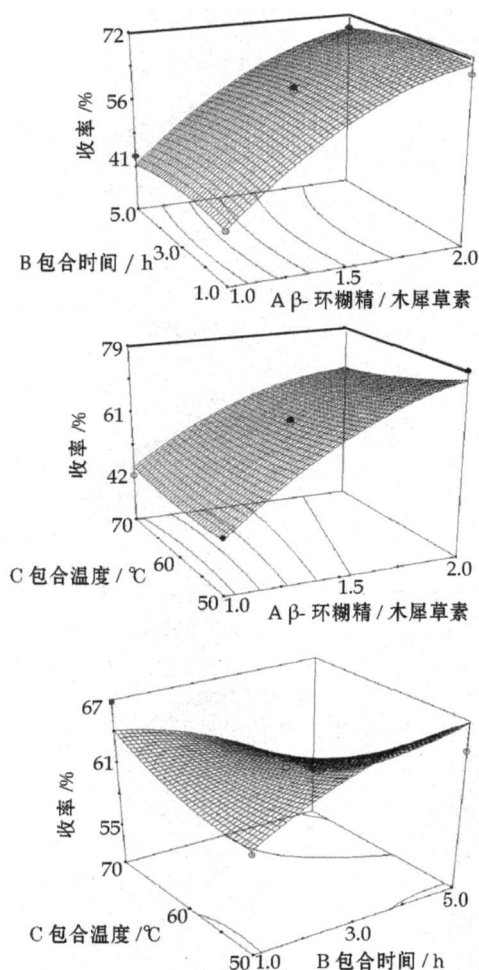


图 2 各因素对木犀草素-β-环糊精包合物收率影响效应图

Fig. 2 Response surface of factors on yield of cyanidone-β-cyclodextrin inclusion compound

率随包含时间增加而增加,且收率能达到最大值,当包含温度大于 55℃后,其收率随包含时间延长而降低。

2.3.5 包含率与收率归一值 OD 的效应面实验数据分析:由于上述交互因素影响较大,造成当包含率较大时,而收率会降低,当收率较小时,包含率反而较大。因此,实验中引入一个综合指标归一值 OD 对工艺进行综合评价,即包含率与收率的综合评价指标,该值可反映总体效应结果。数据处理方法为“归一法”。每个指标均标准化为 0~1 间的“归一值”,各个指标归一值求几何平均数,即得总评归一值 OD。两指标采用 Hassan 方法<sup>[5]</sup>进行数学转换求“归一值”d,计算公式:  $d = (y_{\min} - y_i) / (y_{\max} - y_{\min})$ ,  $OD = (d_1 d_2 \dots d_n)^{1/n}$ , n 为指标数。

OD 实验的方差分析结果见表 5,经 F 值检验显示总模型方程显著 ( $P < 0.0001$ ),  $R^2 = 0.9089$ ,表明该回归模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,能准确的预测实际情况。拟合回归方程为

$Y_3 = 0.66 - 0.16X_1 - 0.029X_2 + 0.079X_3 - 0.042X_1X_2 + 0.073X_1X_3 + 0.075X_2X_3 - 0.22X_1^2 - 0.18X_2^2 - 0.16X_3^2$ 。多元线性回归的相关系数  $R^2$  为 0.2975,其校正决定系数 ( $R^2_{adj}$ ) 为 0.1353,模型不具有显著性意义 ( $P < 0.02$ ) 不如二项式回归拟合好。多元线性方程为  $Y_2$  (包含率) =  $-0.40 + 0.16X_1 - 0.029X_2 + 0.079X_3$ 。

表 5 归一值 0.00 回归模型系数显著性检验表

Table 5 Significance of OD regression model coefficients of normalized value

| 方差来源           | 平方和       | 自由度 | 均方        | F 值       | P 值     |
|----------------|-----------|-----|-----------|-----------|---------|
| Model          | 0.817 263 | 9   | 0.090 807 | 7.758 916 | 0.006 6 |
| A ( $X_1$ )    | 0.211 25  | 1   | 0.211 25  | 18.050 05 | 0.003 8 |
| B ( $X_2$ )    | 0.006 613 | 1   | 0.006 613 | 0.564 998 | 0.476 8 |
| C ( $X_3$ )    | 0.049 613 | 1   | 0.049 613 | 4.239 091 | 0.078 5 |
| AB             | 0.007 225 | 1   | 0.007 225 | 0.617 333 | 0.457 8 |
| AC             | 0.021 025 | 1   | 0.021 025 | 1.796 46  | 0.222 0 |
| BC             | 0.022 5   | 1   | 0.022 5   | 1.922 49  | 0.208 1 |
| A <sup>2</sup> | 0.203 789 | 1   | 0.203 789 | 17.412 59 | 0.004 2 |
| B <sup>2</sup> | 0.132 658 | 1   | 0.132 658 | 11.334 82 | 0.012 0 |
| C <sup>2</sup> | 0.111 184 | 1   | 0.111 184 | 9.500 024 | 0.017 8 |
| Residual       | 0.081 925 | 7   | 0.011 704 |           |         |
| Pure error     | 0.000 4   | 4   | 0.000 1   |           |         |
| Core total     | 0.899 188 | 16  |           |           |         |

效应面分析立体图见图 3。可以看出,投料比例,包含温度对包含工艺的影响都比较显著,两辆因素间仍存在比较一定的交互作用,从效应面图可以判断出,最佳点落在实验考察区域内。

为了更进一步求证最佳点的值,对回归方程分别求  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  的一阶偏导,并赋值为零,得到方程组。

$$\begin{cases} 0.16 - 0.44X_1 - 0.042X_2 + 0.073X_3 = 0 \\ -0.029 - 0.042X_1 - 0.36X_2 + 0.075X_3 = 0 \\ 0.079 + 0.073X_1 + 0.075X_2 - 0.32X_3 = 0 \end{cases}$$

解以上方程组求得:  $X_1 = 0.4241$ ,  $X_2 = -0.0614$ ,  $X_3 = 0.03292$ 。

带入  $Y_1$ 、 $Y_2$  回归方程,解得预测的包含率为 741.8% 和收率为 661.34%。进行编码代换后,β-环糊精:药物投料比例为 11.712 05 B 1,包含时间为 21.877 2 h,包含温度为 63.1292 e,考虑到实际操作的方便,确定木犀草素-β-环糊精包合物制备工艺最优条件为:β-环糊精-木犀草素投料比例为 11.7 B 1,包含时间为 3 h,包含温度为 63 e。

2.4 验证试验:为了确定建立模型与实验结果是否相符,通过进一步实验对模型的可靠性进行验证。在验证试验中,各因素取值为上述确定的最优条件,共进行 4 组试验,结果包含率和收率分别为 751.1%、751.2%、741.8%、741.9% 和 651.6%、661.2%、651.7%、651.9%,其值与模型计算值相差低于 2%,

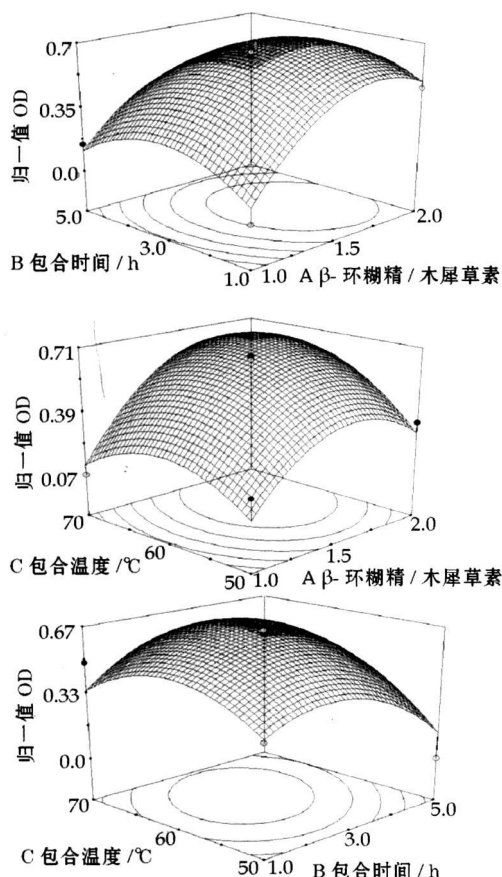


图 3 各因素对归一值 OD 影响效应图

Fig. 3 Response surface of factors on OD of normalized value

说明模型是比较可靠的。证明用效应面法来寻求木犀草素-B 环糊精包合物最佳制备工艺是可行的。

2.5 包合物形成稳定常数测定: 在 0~20 mmol/L 环糊精溶液中分别加入过量的木犀草素, 摇匀, 放入超声波清洗器中于指定温度反应 3 d, 离心, 取上清液配成 40% 的甲醇液, 于 354 nm 处测定吸光度, 计算平衡常数。若包合物的形成摩尔比为 1 B 1, 则有

$$g = \frac{K_f S_0}{1 + K_f S_0} h + S_0$$

式中  $g$  为 B 环糊精存在时木犀草素分子的总浓度;  $S_0$  为游离木犀草素分子的浓度;  $h$  为 B 环糊精的总浓度。  $K$ 、 $S$  均为常数, 因此  $g$  与  $h$  间呈线性关系。通过斜率和截距可以求得  $K_f$ 。60 °C 时的线性方程为  $g = 0.02321h + 51.2 \times 10^{-5}$ ,  $r = 0.9988$ , 证实形成的是 1 B 1 包合物<sup>[2]</sup>。将各温度下的  $g$  对  $h$  进行线性回归得出斜率和截距, 再经计算得出稳定常数  $K_f$ , 结果见表 6。可见包合反应是放热反应 ( $\Delta H$  为负值), 温度对包合物稳定性有很大影响, 随着温度升高, 稳定常数  $K_f$  降低, 包合反应为一自发过程 ( $\Delta G$  为负值)。在一定温

度范围内,  $\Delta G$  的绝对值随温度的升高而增大, 有利于包合反应的进行。当超出此温度范围, 则不利于反应的进行。

表 6 B 环糊精与木犀草素的包合物的常数及热力学参数

Table 6 Constants and thermodynamic parameters of cyanidone-B-cyclodextrin inclusion compound

| $T/K$  | $K_f/$<br>(mol# L <sup>-1</sup> ) | $\Delta G_{\text{mH}}/$<br>(kJ# mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta S_{\text{mH}}/$<br>(J# mol <sup>-1</sup> # K <sup>-1</sup> ) | $\Delta H_{\text{mH}}/$<br>(kJ# mol <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 320.38 | 5211.56                           | -16.14                                              | -6.98                                                                | -18.34                                              |
| 331.27 | 4401.92                           | -16.23                                              | -6.98                                                                | -18.74                                              |
| 342.54 | 3201.34                           | -15.94                                              | -6.98                                                                | -18.12                                              |

### 3 讨论

国内文献报道中, 环糊精包合工艺常用均匀设计和正交设计的方法选择较佳工艺, 由于试验次数少, 数据处理和操作都较方便, 其应用已达到普及的程度, 然而在这两种方法的应用过程存在误区, 他们是基于线性模型设计的方法, 然而事实上影响因素与效应间有时可能不是线性关系, 若忽略这种情况简单进行线性模式设计, 则会很大程度上与真实值偏离, 而效应面法运用效应曲面模型进行分析, 基于非线性模式进行设计和研究。

本实验采用了 Box-Behnken 设计, 其充分考虑到各因素的交互作用, 设计方法简单, 试验次数少, 在中心点进行重复实验以提高实验精度, 同时采用非线性模型拟合, 复相关系数较高, 可信度较好, 预测值更接近真实值, 与正交及均匀设计相比, 此方法所得结果更加直观, 便于分析, 同时提高了实验精度。

本实验分析了对包合物制备工艺的主要影响因素与收率和包合率的关系, 从而了解因素与收率和包合率的相关性。有文献采用正交实验设计的方法对木犀草素-B 环糊精包合物制备工艺进行了研究, 得到最佳工艺包合物工艺的包合率比本工艺低, 收率比本工艺偏高<sup>[6]</sup>, 可能是木犀草素提取物含量不同引起的。而本实验得到的包合物能同时满足较高包合率和收率, 适合生产与临床需要。

### 参考文献:

- [1] 李小林, 徐玉英, 孙向珏, 等. 1 木犀草素增强顺铂诱导的人肺癌细胞 A549 凋亡作用[J]. 中草药, 2009, 40(3): 431-433.
- [2] 孔令珏, 于治国, 曲树明. 1 RP-HPLC 法测定注射用苦碟子中木犀草素[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1076-1077.
- [3] 任晓文, 王玉丽, 张士俊, 等. 1 B 环糊精对黄酮类结构包合作用的理论研究[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1308-1312.
- [4] 高志江. 1 制粒和压片的工艺参数对片剂质量影响的研究[D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [5] Zhao X B, He B L. Sorption of unconjugated bilirubin by means of novel immobilized cyclodextrin polymers[J]. React Polym, 1994, 24(1): 11.
- [6] 李锦莲, 刘红, 单静影. 1 正交试验法优选木犀草素的 B 环糊精包合工艺[J]. 数理医药学杂志, 2004, 17(1): 60-64.