

星点设计-效应面法优化银杏酮酯包合物的制备工艺

王 博¹, 任晓文^{1,2}, 李洪起¹, 连潇嫣¹, 徐为人², 汤立达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 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

3. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 星点设计-效应面法优化银杏酮酯 (GBE₅₀) 的 β-环糊精 (β-CD) 包合物的制备工艺。方法 以饱和水溶液法制备 GBE₅₀-β-CD 包合物, 采用星点设计优化制备工艺, 以 β-CD 与 GBE₅₀ 的投料质量比、包合时间和包合温度为自变量, 包合率为因变量, 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, $r=0.966$; 效应面法优选出的最佳工艺条件为 β-CD 与 GBE₅₀ 的投料质量比 3:1, 包合时间 6 h, 包合温度 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 1.07%。结论 应用星点设计-效应面优化法能够精确有效地优化 GBE₅₀-β-CD 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: 银杏酮酯 (GBE₅₀); β-环糊精; 星点设计; 效应面; 包合率

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0262-04

Optimization on preparation of *Ginkgo biloba* extract-β-cyclodextrin inclusion complex by central composite design and response surface

WANG Bo¹, REN Xiao-wen^{1,2}, LI Hong-qi¹, LIAN Xiao-yan¹, XU Wei-ren², TANG Li-da³

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

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

3. Tianjin Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To optimize the preparation of *Ginkgo biloba* extract-β-cyclodextrin inclusion (GBE₅₀-β-CD inclusion) complex by central composite design and response surface methodology. **Methods** Saturated aqueous solution method was used to prepare GBE₅₀-β-CD inclusion complex. The preparation was optimized by central composite design. With the mass ratio of β-CD/GBE₅₀, inclusion time and temperature as the independent variables and with the inclusion rate 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, the best prescription process was chosen to verification test. **Results** It showed that the correlation coefficient of second-order quadratic model was higher and the prediction was better ($r = 0.966$); The optimum conditions for the preparation of GBE₅₀-β-CD inclusion complex were as follows: the mass ratio of β-CD/GBE₅₀ 3:1, inclusion time 6 h, inclusion temperature at 60 °C. The deviation between the result of the best craft verification test and the binomial fitting equation forecast value is 1.07%. **Conclusion** Central composite design and response surface methodology is successfully used to optimize the preparation of GBE₅₀-β-CD inclusion complex. The optimized process is reliable, stable, and available for the industrial production.

Key words: *Ginkgo biloba* L. extract (GBE₅₀); β-cyclodextrin (β-CD); central composite design; response surface; inclusion rate

银杏叶为银杏科银杏属植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶, 性平, 味甘、苦、涩, 归心、肺经, 功能敛肺, 平喘, 活血化瘀, 止痛^[1]。银杏酮酯

(GBE₅₀) 是从银杏叶中提取的黄酮和萜内酯类混合物, 总黄酮质量分数 ≥ 44%, 萜内酯质量分数 ≥ 6%。GBE₅₀ 具有降低血清胆固醇, 改善心血管循环, 抗

收稿日期: 2010-09-22

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项项目 (2011ZX09201-101-19); 国家科技部支撑项目 (2007BAI41B00, 2007BAI41B01); 天津市科技支撑项目 (09ZCKFSH01200)

作者简介: 王 博 (1983—), 男, 硕士, 主要从事药物新剂型与新技术方面研究。Tel: (022)23006953 E-mail: wangbo0990@163.com

氧化、抗病毒、抗癌等药理作用,被广泛用于心脑血管疾病。研究表明,GBE₅₀对心脑血管疾病的防治作用与其抗氧化活性密切相关^[2-3];而其中抗氧化作用主要的活性成分为黄酮类成分,内酯类成分无明显抗氧化作用^[4]。环糊精包合技术能够提高难溶性药物的溶解度,调节药物的释放速率,提高药物的生物利用度和稳定性等优点^[5]。星点设计是近几年来国外药理学工作者常用的集数学和统计方法于一体的实验设计方法,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^[6]。为此,本实验采用 β -环糊精(β -CD)对GBE₅₀中总黄酮成分进行了包合,并采用星点设计(central composite design, CCD)-效应面(response surface methodology, RSM)法对GBE₅₀- β -CD包合物制备工艺进行了优化和研究。

1 试药与仪器

GBE₅₀(总黄酮醇苷质量分数 $\geq 24\%$,银杏总内酯质量分数 $\geq 6\%$,黄酮醇苷、黄烷醇、内酯比例为12:10:3,银杏酸质量分数 $\leq 5 \times 10^{-6}$)(上海杏灵科技药业股份有限公司);芦丁对照品(批号100080-200306,中国药品生物制品检定所); β -CD(上海元吉化工有限公司);其余试剂均为分析纯。

UV-2550紫外-可见分光光度仪(日本岛津公司);Mettler AG104电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);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)。

SPSS V16.0统计学软件(美国SPSS软件公司);Origin V8.0绘图软件(美国Origin Lab公司)。

2 方法与结果

2.1 GBE₅₀总黄酮的测定^[7]

2.1.1 供试品溶液的配制 精密称取银杏酮酯原药约5 mg(含GBE₅₀总黄酮约2.5 mg)置100 mL量瓶中,用70%乙醇溶解,40 mL/次,每次超声溶解10 min,共2次,滤过,将滤液定量转移至100 mL量瓶中,并用70%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 对照品溶液的配制 取在105℃干燥至恒重的芦丁对照品30 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加70%乙醇适量,于水浴上微热使溶解,放冷,再加70%乙醇至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.3

mg/mL对照品溶液。

2.1.3 测定波长的确定 分别精密量取芦丁对照品溶液、供试品溶液适量,置25 mL量瓶中,按“标准曲线的制备”项下依法操作,置紫外-可见分光光度计中,在400~600 nm进行全波长扫描,结果均显示在510 nm波长处有最大吸收,其他成分对测定无干扰,故选择510 nm为测定波长。

2.1.4 标准曲线的制备 精密量取芦丁对照品溶液0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置25 mL量瓶中,加蒸馏水至6 mL,加5%亚硝酸钠1.0 mL,摇匀、静置6 min,再加入10%硝酸铝溶液1.0 mL,摇匀、静置6 min,再加入4%氢氧化钠溶液5 mL,加70%乙醇至刻度,摇匀、静置15 min。以0号溶液作为空白对照,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010年版一部附录VA)试验,在510 nm波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,芦丁质量浓度为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A=0.0122C-0.0066$, $r=0.9998$,表明芦丁在12.2~61.0 mg/L线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取同一批显色后的供试品溶液5份,分别在510 nm波长处测定吸光度,结果吸光度的RSD为0.68%。

2.1.6 稳定性试验 取显色后的供试品溶液,每隔5 min测一次吸光度,连续测定6次,结果吸光度的RSD为0.32%,结果表明样品溶液在测定时间30 min内稳定。

2.1.7 重现性试验 精密量取同一供试品溶液5份,照“标准曲线的制备”项下的方法测定吸光度,计算得样品中总黄酮的平均质量分数为46.5%,RSD为0.57%。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取芦丁对照品12 mg,分别加入到已知总黄酮质量分数的样品中,照“标准曲线的制备”项下的方法测定吸光度,计算回收率,结果平均回收率为98.57%,RSD为0.55%。

2.1.9 样品的测定 精密量取供试品溶液,照“标准曲线的制备”项下的方法,依法测定吸光度,并根据标准曲线测定中得到的回归方程计算出样品溶液中总黄酮的质量分数(以芦丁为基准物计)。

2.2 GBE₅₀- β -CD包合物的制备方法

采用饱和水溶液法制备GBE₅₀- β -CD包合物。称取一定量原料药GBE₅₀加70%乙醇40 mL,以热水浴加热至60℃使其完全溶解,按物质的量2:1

称取一定量的 β-CD,加水 40 mL 加热至 60 °C 使其溶解,恒温,电磁搅拌。将 GBE₅₀ 乙醇溶液移至分液漏斗中,维持温度在 50 °C 左右,缓慢滴入 β-CD 饱和水溶液中,在恒温状态下搅拌 5 h,室温静置 12 h,滤过,沉淀用蒸馏水、乙醇各洗涤 3 次,再减压干燥(45 °C),即得棕黄色的 GBE-β-CD 包合物。

2.3 工艺评价标准

精密称取 GBE₅₀-β-CD 包合物适量,用适量 70% 乙醇分多次洗脱,并定量转移至 50 mL 量瓶中,然后照“标准曲线的制备”项下的方法,依法测定吸光度,并根据回归方程计算出洗脱溶液中总黄酮的质量浓度(以芦丁为基准物计),计算包合物中 GBE₅₀ 总黄酮的包合率(GBE₅₀ 总黄酮包合率=包合物中 GBE₅₀ 总黄酮质量/GBE₅₀ 总黄酮投入量),并以 GBE₅₀ 总黄酮包合率作为 GBE-β-CD 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^[8-10]

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的作用进行了初步考察,其中 β-CD 与 GBE₅₀ 的投料质量比、包合时间和包合温度是影响包合物包合率的最主要因素。根据初步考察结果确定 β-CD 与 GBE₅₀ 的投料质量比(X_1)、包合时间(X_2)和包合温度(X_3)作为主要考察因素,3 个自变量取值范围分别为 $X_1: 1:2 \sim 5:1$; $X_2: 0.5 \sim 6 \text{ h}$; $X_3: 40 \sim 80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

根据星点设计的原理,每个因素设 5 个水平,用代码值 -a、-1、0、1、a 分别表示。对于三因素的星点设计 $a=1.682$ 。代码值之间与实际操作物理量之间为等比关系,见表 1,方案安排及结果见表 2。

2.4.2 模型拟合 根据结果,应用 SPSS 16.0 统计软件,以包合物的包合率为因变量,β-CD 与 GBE₅₀ 的投料质量比、包合时间和包合温度为自变量,进行多元线性回归和二项式方程拟合,模型的好坏通过相关系数(r)进行判断。拟合后所得多元线性拟合方程为 $Y=53.352+3.345 X_1+3.624 X_2+0.207 X_3$ ($r=0.726, 0.05 < P < 0.10$),二次多项式方程为 $Y=-47.019+17.801 X_1+12.680 X_2+2.677 X_3-2.966 X_1^2-1.477 X_2^2-0.021 X_3^2+0.194 X_1X_2+0.020 X_1X_3$ ($r=0.966, 0.05 < P < 0.10$)。可知,二项式拟合 r 值高于多元线性回归,拟合度高,预测性较好,故选择二项式拟合模型为最佳模型。

2.4.3 效应面优化及预测性评价 根据所拟合的二项式方程,应用 OriginV8.0 软件分别绘制各指标与

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 Code value and physical practice of independent variables levels ($n=3$)

水平	因素		
	X_1	X_2	X_3
-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

表 2 星点设计表及结果

Table 2 Central composite design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	包合率/%
1	-1	-1	-1	73.80
2	1	-1	-1	75.63
3	-1	1	-1	81.82
4	1	1	-1	88.39
5	-1	-1	1	76.60
6	1	-1	1	82.71
7	-1	1	1	87.62
8	1	1	1	92.43
9	-1.682	0	0	68.38
10	1.682	0	0	93.24
11	0	-1.682	0	72.92
12	0	1.682	0	96.35
13	0	0	-1.682	83.23
14	0	0	1.682	91.50
15	0	0	0	95.18
16	0	0	0	93.95
17	0	0	0	95.32
18	0	0	0	95.61
19	0	0	0	96.14
20	0	0	0	94.26

影响较显著的 2 个自变量的三维效应面和二维等高图(其他 1 个自变量设为中心点值),从中筛选出较佳的工艺水平,结果见图 1。选取 GBE₅₀-β-CD 包合物包合条件的最佳范围为:β-CD 与 GBE₅₀ 的投料质量比为 3:1~5:1,包合时间为 5.5~6 h 和包合温度为 60~62.5 °C。

2.4.4 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 GBE₅₀-β-CD 包合物的最佳包合条件为 β-CD 与 GBE 的投料质量比为 3:1,包合时间为 6 h 和包合温度为 60 °C。按照选取的最佳包合

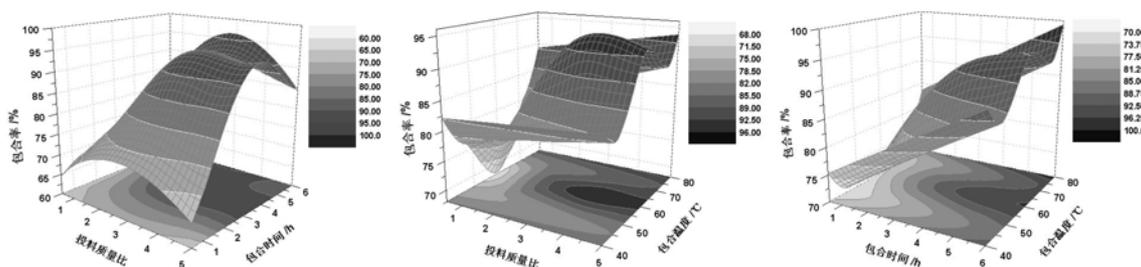


图 1 各因素对包含率影响的三维效应面和二维等高图

Fig. 1 3D-Response surface and 2D-contour map of various factor effects on inclusion rate

条件重复 3 次试验, 将预测值与实测值进行比较并计算偏差(偏差=(预测值-实测值)/预测值×100%), 结果见表 3。可知, 预测值与实测值的偏差为 1.07% (小于 2%), 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。

表 3 验证试验结果 (n=3)

Table 3 Results of verification test (n=3)

项目	总黄酮包含率/%
实验 1	93.62
实验 2	94.23
实验 3	94.18
平均值	94.01
预测值	95.03
偏差	1.07

3 讨论

目前国内外对 GBE₅₀ 的大量实验研究表明, 银杏叶体外抗氧化作用的主要活性物质为黄酮类成分, 即 GBE₅₀ 总黄酮^[11]。理论上讲, β-CD 在包含 GBE₅₀ 中总黄酮成分的同时, 也可能存在同时包含其他成分的情况。本研究实际显示的是 β-CD 对 GBE₅₀ 总黄酮类成分进行的有效包含, 由于包合作用而引起的药物组成成分变化, 从而改变活性的情况还需要进行进一步的深入研究。

在环糊精包合物的制备工艺优选方面, 本实验采用星点设计结合效应面法, 而在模型建立上采用非线性数学模型拟合, 这样得到的数学模型相关系数较高, 预测值更接近真实值, 结果较理想。相对于均匀设计和正交设计, 本实验的设计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结合效应面法优化 GBE-β-CD 包合物的制备工艺, 通过二项式拟合描绘三维

效应面, 从而确定较优的制备工艺区间。实验结果科学可靠, 实验优选出的最佳工艺范围较宽, 且在此范围内包含率变化较小, 证明工艺稳定可靠, 适合于工业生产, 并通过最优处方工艺验证试验证明, 所得处方工艺包含率较高, 重现性较好, 达到了优选处方工艺的目标。

参考文献

- [1] 金虹, 黄毅, 王继生, 等. 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1339-1342.
- [2] 赵保路. 银杏叶提取物抗氧化和防治心脑血管疾病的作用机制 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2000, 2(1): 65-68.
- [3] 牟玲丽, 寇俊萍, 朱丹妮, 等. 银杏叶的化学成分及其抗氧化活性 [J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 26-29.
- [4] 徐艳芬, 张丽娟, 宋新波. 银杏叶提取物的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 453-457.
- [5] 伍永富, 吴品江, 魏萍, 等. 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 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1094-1099.
- [6] 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.
- [7] 吴瑛. 紫外分光光度法测定复方银杏胶囊中总黄酮含量 [J]. 中国医学研究与临床, 2007, 5(3): 19-21.
- [8] 张瑜, 白颖. 星点设计-效应面法优化盐酸青藤碱脉冲片处方的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1088-1091.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 林浩东, 王欢, 陈德松, 等. 银杏酮酯促进大鼠坐骨神经再生的实验研究 [J]. 复旦学报: 医学版, 2006, 33(4): 467-469.