

中心复合设计-效应面法优化黄芩苷磷脂复合物鼻用原位凝胶的制备工艺

许润春¹, 林彦君¹, 吴品江^{1,2*}

1. 成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 扬子江药业集团四川海蓉药业有限公司, 四川 都江堰 611830

摘要: **目的** 优化黄芩苷磷脂复合物鼻用原位凝胶的制备工艺。**方法** 采用中心复合设计-效应面优化法, 以胶凝温度为评价指标, 对黄芩苷磷脂复合物鼻用原位凝胶的制备工艺关键影响因素 Poloxamer407 (P407)、Poloxamer188 (P188)、聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 进行研究, 利用多元数学统计矩模型, 对制备工艺参数和胶凝温度的相关性进行研究, 建立工艺参数与胶凝温度的相关方程, 确立最佳工艺参数。**结果** 先将黄芩苷磷脂复合物 1.0 g 溶于 0.1% 三乙醇胺溶液中, 再加入 18 g P407、6 g P188、1 g PEG 6000、葡萄糖 5 g、苯扎氯胺 0.02 g, 加去离子水至 100 g, 于冰浴 (4 ℃) 磁力搅拌下使其分散均匀, 置 4 ℃ 冰箱中保存 24 h 以上, 直至聚合物完全溶解得到澄明溶液。**结论** 采用中心复合设计-效应面法优化的黄芩苷磷脂复合物鼻用原位凝胶的制备工艺稳定可行。

关键词: 黄芩苷; 磷脂复合物; 鼻用原位凝胶; 中心复合设计; 效应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)06-1092-05

Optimization for preparation technology of baicalin-phospholipid complex *in situ* nasal gel by central composite design-response surface method

XU Run-chun¹, LIN Yan-jun¹, WU Pin-jiang^{1,2}

1. Resources of Traditional Chinese Medicine Research and Development Utilization of Ministry of National Key Laboratory Breeding Base, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Sichuan Heron Pharmaceutical Company Limited, Yangtze River Pharmaceutical Group, Dujiangyan 611830, China

Abstract: **Objective** To optimize the preparation technology of baicalin-phospholipids complex (BPC) *in situ* nasal gel. **Methods** Key factors affecting the preparation technology of BPC *in situ* nasal gel, Poloxamer407 (P407), Poloxamer188 (P188), and polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) were studied using central composite design-response surface method (CCD-RSM) with gelation temperature as evaluation index. The correlation between preparation technology parameters and gelation temperature was analyzed to establish relative equation of preparation technology parameters and gelation temperature and the best preparation technology parameters using multivariate mathematical statistical moment model. **Results** BPC (1.0 g) was dissolved in 0.1% triethylamine solution, then P407 (18 g), P188 (6 g), PEG 6000 (1 g), glucose (5 g), BKC (0.02 g), and deionized water were added to reach 100 g. The mixture was uniformly dispersed in ice bath (4 ℃) under magnetic stirring and then was stored at 4 ℃ in refrigerator for more than 24 h until polymer was fully dissolved and clear solution was obtained. **Conclusion** The preparation technology of BPC *in situ* nasal gel by CCD-RSM is stable and suitable for industry.

Key words: baicalin; phospholipids complex; *in situ* nasal gel; central composite design (CCD); response surface method (RSM)

黄芩苷是中药黄芩的主要有效成分, 在清除氧自由基、减轻组织的缺血再灌注损伤、调节免疫、促进细胞凋亡等多方面均有作用^[1]。本课题组前期研究表明, 制备成磷脂复合物后能改善黄芩苷理化性质, 提高生物利用度^[2-3]; 同时, 黄芩苷磷脂复合物

经鼻给药可有效防治脑内疾病, 且效果优于注射等其他给药途径^[4-5]。经筛选研究, 拟定黄芩苷磷脂复合物防治脑内疾病的较优制剂类型为鼻用温敏凝胶喷雾剂, 本实验采用中心复合设计-效应面优化法 (CCD-RSM) 对该制剂的制备工艺进行优化。

收稿日期: 2011-11-30

作者简介: 许润春 (1973—), 女, 博士, 研究方向为中药药剂与炮制。Tel: (028)61800127 13308064016 E-mail: 309786953@qq.com

*通讯作者 吴品江 Tel: (028)87197999-5967 E-mail: sunnywoo821@qq.com

网络出版时间: 2012-05-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120511.0847.004.html>

1 仪器与材料

8—52 型数显恒温磁力搅拌仪（上海君竺仪器厂）；FA1104 型上皿电子天平（上海精科仪器厂）；精密温度计（量程 50℃，精确至 0.1℃）；SHB—III 循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）；BP61 型 Sartorius 电子分析天平、SZ—93 自动双重纯水蒸馏器、RE—53C 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；DEF—1B 型真空干燥箱（上海跃进医疗器械厂）；KQ400—DB 型数控超声仪（昆山市超声仪器有限公司）；Franz 扩散池。

黄芩苷磷脂复合物^[6]（自制，复合率>97%）；黄芩苷对照品（中国药品生物制品检定所，批号 110715-200514）；大豆卵磷脂（含氮量>99.8%，成都市科龙化工试剂厂）；泊洛沙姆 407（P407，Pluronic®F-127，德国 BASF 公司，批号 50011254）；泊洛沙姆 188（P188，Pluronic®F-68，德国 BASF 公司，批号 50011388）；去乙酰结冷胶（上海众伟化工有限公司提供）；聚乙二醇 6000（PEG 6000，西陇化工，批号 911128）；四氢呋喃（批号 20081123）、三乙醇胺（TEA，批号 20081001）、苯扎氯胺（BKC，批号 20080925），成都市科龙试剂厂；水为超纯水；其他试剂与试药均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CCD-RSM 试验

2.1.1 黄芩苷磷脂复合物凝胶的制备^[7] 先将药物溶于 0.1% TEA 溶液中，再加入 P407、P188、PEG 6000，冰浴 4℃磁力搅拌下使其分散均匀，然后置于 4℃冰箱中保存 24 h 以上，直至聚合物完全溶解得到澄明溶液。

2.1.2 胶凝温度测定 根据文献报道^[8]，目前胶凝温度的考察方法多为搅拌子法，即在西林瓶中装入储存于冰箱中的不同质量浓度泊洛沙姆温敏凝胶溶液 10 g 和搅拌子，插入精度为 0.1℃的精密温度计，温度计的水银球完全浸没在凝胶溶液中。将其放入低温（10℃）水浴中，转速 300 r/min，保持水浴持续缓慢升温，使凝胶的温度上升速率约为 1~2℃/min，将磁力搅拌子完全停止转动的温度定义为胶凝温度。每一样品平行测定 3 次，取平均值。

2.1.3 CCD-RSM 优化工艺参数 通过前期单因素考察发现，主要影响温度敏感型凝胶胶凝温度的因素为 P407、P188 及 PEG 6000 的用量，而渗透压调节剂、防腐剂及黄芩苷磷脂复合物的用量对胶凝温度影响较小。通过单因素考察基本确定温度敏感型

鼻用原位凝胶的处方组成：P407 16%~24%，P188 0%~12%，PEG 6000 0%~2%，葡萄糖 5%，BKC 0.02%，TEA 0.1%。

前期试验分别制备不同质量浓度的 P407、PEG 6000、P188 含药凝胶，考察质量浓度与胶凝温度的关系，根据初步考察结果，以胶凝温度为评价指标，以胶凝温度 32~34℃为处方效应值最优，从而确定因素水平的范围。根据星点设计的原理，各因素设置 5 水平，用代码值±α、±1、0 来表示，对于 3 因素的星点设计 α=1.732，因素及水平见表 1，具体实验方案安排见表 1，以胶凝温度作为优化考察指标。

通常，CCD 需要进行 2^f+2f+1 次试验（ f 代表考察因素数目），因此，3 因素的 CCD 需按照 15 个不同试验处方进行 15 次试验，为了评估 CCD 单纯的试验不确定性，重复测定对中心点的效应函数关系非常重要，在此情况下，对中心点将重复 5 次试验。试验设计见表 1，按前述方法测定效应值，采

表 1 CCD-RSM 试验设计与结果
Table 1 Design and results of CCD-RSM test

试验号	因素水平			胶凝温度 /℃	
	P407 / %	P188 / %	PEG 6000 / %	实测 值	预测 值
1	17.69 (-1)	2.536 (-1)	0.423 (-1)	27.2	27.6
2	22.31 (1)	2.536 (-1)	0.423 (-1)	14.2	12.9
3	17.69 (-1)	9.464 (1)	0.423 (-1)	32.4	31.5
4	22.31 (1)	9.464 (1)	0.423 (-1)	18.0	18.7
5	17.69 (-1)	2.536 (-1)	1.577 (1)	33.9	32.9
6	22.31 (1)	2.536 (-1)	1.577 (1)	14.4	15.0
7	17.69 (-1)	9.464 (1)	1.577 (1)	34.7	35.7
8	22.31 (1)	9.464 (1)	1.577 (1)	20.5	19.7
9	16 (-1.732)	6 (0)	1 (0)	40.5	40.6
10	24 (1.732)	6 (0)	1 (0)	13.8	14.1
11	20 (0)	0 (-1.732)	1 (0)	15.4	16.0
12	20 (0)	12 (1.732)	1 (0)	23.5	23.4
13	20 (0)	6 (0)	0 (-1.732)	22.6	23.0
14	20 (0)	6 (0)	2 (1.732)	28.5	28.5
15	20 (0)	6 (0)	1 (0)	25.5	25.7
16	20 (0)	6 (0)	1 (0)	25.9	25.7
17	20 (0)	6 (0)	1 (0)	25.8	25.7
18	20 (0)	6 (0)	1 (0)	25.6	25.7
19	20 (0)	6 (0)	1 (0)	25.5	25.7

用二次多项式模型进行分析和预测,即通过最小二乘法拟合得到二次多项式方程。

$$Y=A_0+\sum A_iX_i+\sum A_{ii}X_i^2+\sum A_{ij}X_iX_j$$

Y 为效应值 (胶凝温度), 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,建立数学模型,以方差分析检验模型的可靠性。所得到的方程将经过失拟 (lack-of-fit) 检验,以 95% 的显著水平对模型进行简化。根据拟合方程,描绘相应的效应面,以揭示效应值与各因素之间的关系,各因素的最佳取值范围将通过各效应的等高线图来确定,最后,为了评价预测的准确性,将按照优化的比例进行试验,将效应的实测值和预测值进行比较,以偏差的大小进行评判。

2.2 试验结果

利用 Design Expert 7.1 软件对表 1 中试验数据进行回归分析,得各回归模型及各因素之间的相互关系,结果见表 2。表 2 所示为不同处方制备原位凝胶的效应值 (胶凝温度) 的相应变化。第 16~20 次试验为 5 次重复的中心点试验,用于考察模型的误差。在此模型中,一次项 A、B、C,交互项 AC 和二次项 A^2 、 B^2 都是显著性影响因子,而交互项 AB、BC,二次项 C^2 的 $P>0.05$,说明其对胶凝温度影响不显著,因此对其进行调整,去除这些项。模型方差分析 (ANOVA) 可以看出, $P<0.0001$ 表明总模型方程高度显著, $R^2=0.9932$ 表明该回归模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,能准确地预测实际情况。其校正决定系数 (R^2_{adj}) 为 0.9865,表明此模型能解释 98.65% 效应值变化,因此该模型拟合程度良好,实验误差较小,仅有约 2% 不能由此模型进行解释,因此该模型是适合的,可以用此模型对胶凝温度进行分析与预测。拟合得到回归方程。

$$Y=109.86-6.93 X_1+2.62 X_2+14.52 X_3-0.59 X_1X_3+0.11 X_1^2-0.17 X_2^2$$

而多元线性回归的相关系数 R^2 为 0.9132,其 R^2_{adj} 为 0.8959 不如二项式回归拟合好。线性方程如下。

$$Y=84.61-3.32 X_1+0.62 X_2+2.71 X_3$$

2.2.1 P407 与 P188 的交互作用 根据 P407 与 P188 的交互作用的响应面和等高线图 (图 1) 可以看出,增加 P407 的用量,溶液的胶凝温度下降, P188 用

表 2 二项式回归模型系数显著性校验表

Table 2 Significance calibration of second-order regression model coefficient

方差来源	平方和	自由度	F 值	显著性
模型	1 002.09	9	146.69	$P<0.0001$
A	823.08	1	1084.41	$P<0.0001$
B	63.98	1	84.30	$P<0.0001$
C	34.23	1	45.21	$P<0.0001$
AB	1.90	1	2.50	$P=0.1480$
AC	4.96	1	6.54	$P=0.0309$
BC	0.55	1	0.73	$P=0.4162$
A^2	4.76	1	6.27	$P=0.0336$
B^2	59.58	1	78.50	$P<0.0001$
C^2	0.018 148	1	0.021	$P=0.8891$
残差	6.83	9		
纯误差	0.13	4		
总变异	1 008.92	18		

量过高或过低也会导致胶凝温度的降低,此时,若胶凝温度控制在 32~34℃,宜将 P407 的用量控制在 18%~20%,若超出此范围则难以达到要求。

2.2.2 P407 与 PEG 6000 的交互作用 根据 P407 与 PEG 6000 交互作用的响应面图和等高线图 (图 1) 可以看出,溶液的相变温度与 P407 和 PEG 6000 呈用量依赖性,即前者是负相关,后者正相关。从等高线可以看出,若使溶液的胶凝温度在 32~34℃,宜将 P407 用量控制在 17%~19% 才能满足要求。

2.2.3 P188 与 PEG 6000 的交互作用 根据 P188 与 PEG 6000 的交互作用的等高线图与响应面图 (图 1) 可以看出,增加 P188 和 PEG 6000 的用量,溶液的胶凝温度增加,而 P188 用量的改变则使胶凝温度变化趋势呈抛物线,从等高线可以看出,若使溶液的胶凝温度在 32~34℃,则宜将 PEG 6000 用量控制在 0.5%~2%,而 P188 用量控制在 3%~9%,才能满足要求。

2.3 效应面优化处方

根据上述试验结果,可以得到 P407 用量的最佳范围为 18%~19%, P188 用量的最佳范围为 3%~9%, PEG 6000 用量的最佳范围为 0.5%~2%。

2.4 拟合方程验证试验

按照预试验的辅料优化比例制备样品,测定其胶凝温度,结果见表 3。比较表中胶凝温度的实测值和预测值可知,二者比较接近,偏差较小,辅料

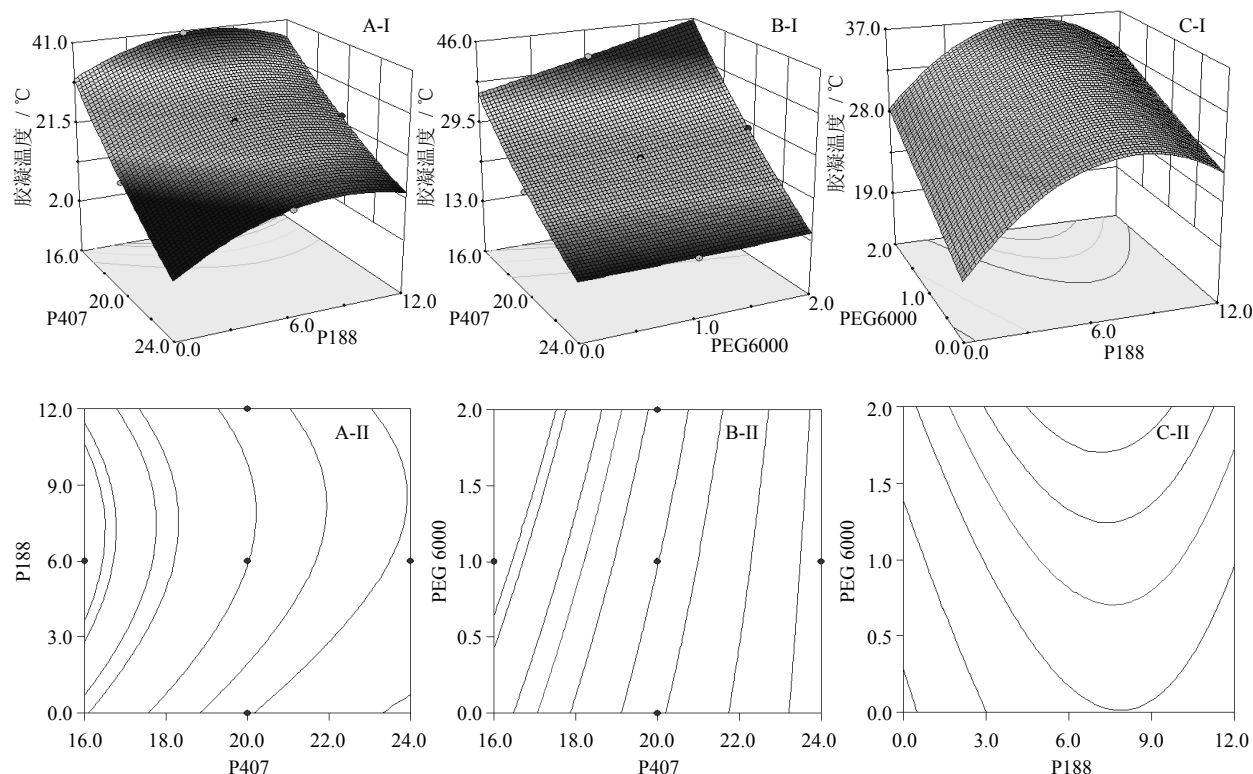


图 1 P407 与 P188 (A, PEG 6000 1%)、P407 与 PEG 6000 (B, P188 6%) 及 P188 与 PEG 6000 (C, P407 18%) 交互作用的响应面图 (I) 和等高线图 (II)

Fig. 1 Response surfaces (I) and contour plots (II) of interactions between P407 and P188 (A, PEG 6000 1%), P407 and PEG 6000 (B, P188 6%), and P188 and PEG 6000 (C, P407 18%)

表 3 优化区域内处方效应实测值与预测值比较
Table 3 Comparison on actual and predicted values of prescription within optimized region

试验号	P407-P188-PEG 6000	胶凝温度 / °C	
		预测值	实测值
1	17 : 2 : 1	32.2	32.5
2	17 : 3 : 1	33.8	34.7
3	18 : 5 : 1	32.1	35.4
4	18 : 6 : 1	32.7	32.1
5	18 : 7 : 1	33.1	32.6
6	18 : 8 : 1	33.0	32.4
7	18 : 9 : 1	32.7	31.8
8	18 : 10 : 1	32.0	31.5
9	18 : 2 : 2	32.6	36.5
10	18 : 12 : 2	32.9	30.6
11	19 : 6 : 2	32.5	31.7
12	19 : 7 : 2	32.7	31.4
13	19 : 8 : 2	32.7	31.0
14	19 : 9 : 2	32.3	31.2

优化最佳范围选择正确, 从胶凝温度的实测值可以看出, 拟合方程能够较好地预测实测值。

2.5 辅料比例的优化

以效应值在 32~34 °C, 黏度较小, 偏差较小为指标, 筛选以下优化组合作为优化后处方进行试验得出以下结果, 见表 4。

2.6 验证试验

根据上述确定的最佳工艺参数, 照此条件分别制备 3 批制剂, 胶凝温度验证试验结果见表 5。可见, 各考察指标与预测值差异较小, 偏差均在 2% 以内。验证试验结果表明, P407-P188-PEG 6000 比例为 18 : 6 : 1 时最好, 说明通过本实验的效应面法

表 4 辅料比例的优化
Table 4 Optimization of adjuvant ratio

试验号	P407-P188-PEG 6000	胶凝温度 / °C	
		预测值	实测值
1	17 : 2 : 1	32.2	32.5
2	18 : 6 : 1	32.7	32.1
3	18 : 7 : 1	33.1	32.6

表5 验证试验 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Verification test ($\bar{x} \pm s, n=3$)

试验号	P407-P188-PEG 6000	胶凝温度 / °C	RSD / %
1	17 : 2 : 1	32.9 ± 0.4	1.09
2	18 : 6 : 1	32.2 ± 0.1	0.18
3	18 : 7 : 1	33.1 ± 0.5	1.36

优化的工艺参数稳定可行。

3 讨论

国内文献报道中常用均匀设计和正交设计优化法选择较佳工艺, 由于试验次数少, 数据处理及操作均较方便, 其应用已达到普及的程度, 然而在两种方法的应用过程中似乎存在某种误区。不管优化法采用何种实验设计方案, 它必须(1)建立可信的数学模型来表达效应和因素的关系; (2)通过模型优选出较佳工艺条件。笔者认为, 两种优化法在这两个环节上均存在较大弊端: (1)均匀设计和正交设计是基于线性模型的设计, 某些设计表如正交 $L_9(3^4)$ 不适于二次以上多项式模型。一般效应值在最佳试验条件区域附近变化比较灵敏, 实验条件的微小变化均可造成效应值的大幅变化, 用效应面表示多为弯曲面, 适合于用非线性模型拟合, 并且随着试验条件远离较优区, 效应面弯曲度逐渐减小, 愈远离, 线性愈好。该现象的启示是, 均匀设计和正交设计法在模型拟合时, 线性相关系数愈大, 表明因素水平的选择离最优区愈远(效应与因素之间关系呈线性的除外, 但完全线性关系的较少), 这与优化的目的背道而驰。相反, 如果相关性不好, 排除获得试验数据的误差外, 可能是因为所选因素水平范围正好在较优区附近, 面弯曲度较大, 但均匀设计和正交设计优化法的操作者一般认为优化失败。如果改用适用于非线性模型的试验设计优化法, 相关系数可能会有很大的提高; (2)优化的目的就是选择最佳工艺条件。但均匀和正交设计优化法受所选线性模型的限制, 只能指出某一因素的取值方向, 无法求得极值, 往往选择的条件均接近自变量

的极大或极小值。而在极大和极小值附近试验操作通常较难控制。由于线性模型选用的不合适, 所以均匀和正交设计优化法所选择的最优条件下测得的效应值与用数学模型预测的值偏差大。

CCD-RSM 可以用非线性模型拟合, 能把自变量和应变量的关系扩展到曲面, 拟合后可通过描绘效应对考察因素的效应面, 从效应面上选择较佳的效应区, 从而预测出自变量取值范围, 因此, 可以很好地克服以上不足, 能保证较高的实验精度和预测性。

本实验通过采用 CCD-RSM 法对黄芩苷磷脂复合物凝胶的制备工艺进行优化, 得到了几种辅料的最佳范围, 通过验证试验证明, 所得的优化工艺参数稳定可行, 为该制剂的制备提供了可靠的科学依据。

参考文献

- [1] 张喜平, 田 华, 程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(11): 1212-1215.
- [2] 许润春, 林彦君, 吴品江, 等. 黄芩苷磷脂复合物理化性质研究 [J]. 中成药, 2008, 30(6): 932-934.
- [3] 吴品江, 许润春, 苏柘僮, 等. 黄芩苷脂质体、 β -环糊精包合物及磷脂复合物鼻黏膜渗透性及毒性研究 [J]. 药学报, 2009, 44(4): 417-424.
- [4] 许润春, 林彦君, 周晓玲, 等. 黄芩苷及其磷脂复合物药效学对比研究——在体鼻粘膜吸收及不同给药途径抗大鼠脑水肿和神经功能损伤对比 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 132-136.
- [5] 史亚军, 吴品江, 许润春, 等. 黄芩苷磷脂复合物基本性质研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 78-80.
- [6] 许润春, 林彦君, 吴品江, 等. 黄芩苷磷脂复合物制备工艺的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011(1): 132-134.
- [7] 宋成君, 王 莹, 王春艳, 等. 黄芩温度敏感凝胶剂的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 628-630.
- [8] Choi H G, Oh Y K, Kim C K. *In situ* gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability [J]. *Int J Pharm*, 1998, 165(1): 23-32.