

丹皮酚-羟丙基- β -环糊精包合物的制备及处方工艺优化^Δ

郑欣*,杨培洪#,何霖,陈希,程模,游必波(重庆市垫江县人民医院药剂科,重庆垫江 408300)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0530-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.27

摘要 目的:制备丹皮酚-羟丙基- β -环糊精(PAE-HP- β -CD)包合物,优化其处方工艺。方法:采用冷冻干燥法制备PAE-HP- β -CD包合物并进行验证。以包合率为指标,主药-辅料投料比、包合时间、包合温度与搅拌速度为因素,采用星点设计-响应面法优化其处方工艺。结果:制备的PAE-HP- β -CD包合物发生了物相转变。最优处方工艺为主药-辅料投料比3.39:1、包合温度50℃、包合时间3.2h、搅拌速度350r/min;所制得包合物的包合率测得值(87.46%)与预测值(89.12%)的相对误差为1.86%($n=6$)。结论:成功制得PAE-HP- β -CD包合物,且其处方工艺稳定可行。

关键词 丹皮酚;羟丙基- β -环糊精;包合物;星点设计-响应面法;制备工艺;优化

Preparation of Paeonol-HP- β -cyclodextrin Inclusion Compound and Its Prescription Technology Optimization

ZHENG Xin, YANG Peihong, HE Lin, CHEN Xi, CHENG Mo, YOU Bibo (Dept. of Pharmacy, Chongqing Dianjiang County People's Hospital, Chongqing Dianjiang 408300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare paeonol-HP- β -cyclodextrin (PAE-HP- β -CD) inclusion compound and to optimize its prescription technology. METHODS: PAE-HP- β -CD was prepared by freeze drying method and validated. Using inclusion rate as index, main drug-accessory ratio, inclusion time, inclusion temperature and stirring speed as factors, the preparation technology was optimized by central composite design-response surface methodology. RESULTS: Prepared PAE-HP- β -CD underwent phase transformation. The optimal inclusion technology was as follows as main drug-accessory ratio of 3.39:1, inclusion temperature of 50℃, inclusion time of 3.2 h, stirring speed of 350 r/min. Relative error between measured value (87.46%) and predicted value (89.12%) of inclusion rate was 1.86% ($n=6$). CONCLUSIONS: PAE-HP- β -CD inclusion compound is prepared successfully, and its prescription technology is stable and feasible.

KEYWORDS Paeonol; HP- β -CD; Inclusion compound; Central composite design-response surface methodology; Prescription technology; Optimization

丹皮酚(Paeonol, PAE)为牡丹皮的主要有效成分之一,具有镇痛、抗炎、解热、镇静的作用^[1]。由于PAE具有的易挥发、水溶性差、对胃肠道黏膜有刺激性等特性^[2],可对生物利用度产生影响。为降低挥发性、增大水溶性、提高稳定性和生物利用度,一般常将PAE磺化成盐或用超声法制备PAE- β -环糊精(CD)包合物^[3],但包合率较低,效果不明显。羟丙基(HP)- β -CD是一种环状低聚糖,较 β -CD有更好的水溶性,且对皮肤黏膜刺激性小,是一种安全有效的助溶辅料^[4]。本试验拟采用星点设计-响应面法,以包合率为指标,优化处方工艺中主药-辅料投料比、包合时间、包合温度与搅拌速度等因素,得到PAE-HP- β -CD的最优包合工艺,为今后PAE的推广使用提供理论依据。

^Δ 基金项目:垫江县科技计划项目(No.djkjxm2015jsyfsfy024)

* 硕士。研究方向:中药制剂与质量。E-mail: 441581197@qq.com

通信作者:主管药师,硕士。研究方向:药事管理。E-mail: 857686684@qq.com

1 材料

1.1 仪器

1200型紫外-可见分光光度(UV)计(上海美普达仪器有限公司);SPS-2001型电子天平(上海海康电子仪器有限公司);iS50傅里叶变换红外光谱(FT-IR)仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 药品与试剂

PAE对照品(大连美仑有限公司,批号:20150315,纯度:>98%);HP- β -CD(中国医药集团上海化学试剂有限公司,批号:20150610,纯度:>98%);无水乙醇、石油醚均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 PAE含量检测方法的建立

2.1.1 检测波长的选择 取PAE对照品(40℃干燥3h)、HP- β -CD、“2.2”项下制备的PAE-HP- β -CD包合物适量,配制成无水乙醇溶液,以无水乙醇为空白对照,在200~400nm波长范围内进行扫描。结果,PAE、PAE-HP- β -CD包合物均在274nm波长下有最大吸收峰,

HP- β -CD 在该波长下无紫外吸收,故确定检测波长为 274 nm^[6]。

2.1.2 标准曲线和线性范围考察 精密称取 PAE 对照品 5 mg(40 °C 干燥 3 h),置于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇定容,即得 0.5 mg/mL 的 PAE 对照品溶液,置于阴凉处密封保存。分别精密量取 0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 对照品溶液于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇定容,以无水乙醇为空白对照,在 274 nm 波长处测定其吸光度(A)。以质量浓度(c)和 A 求得标准曲线方程为 $A=0.0417c+0.0749$ ($r=0.9999, n=6$)。结果表明,PAE 在 5~45 μ g/mL 质量浓度范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度试验 量取 25 μ g/mL 的 PAE 对照品溶液适量,在 274 nm 波长处连续测定 6 次。结果,吸光度的 RSD=0.42%($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 量取 25 μ g/mL 的 PAE 对照品溶液适量,于 0.5、1、2、4、8、24 h 时连续测定 6 次。结果,吸光度的 RSD=0.27%($n=6$),表明对照品溶液 24 h 内稳定。

2.1.5 重复性试验 平行制备 6 份 25 μ g/mL 的 PAE 对照品溶液,分别在 274 nm 波长处测定其吸光度。结果,吸光度的 RSD=0.53%($n=6$),表明本方法重复性较好。

2.1.6 加样回收率试验 分别量取高、中、低 3 个质量浓度(5、25、45 μ g/mL)的 PAE 对照品溶液,加入一定质量 PAE,在 274 nm 波长处分别测定其吸光度。结果,加样回收率在 95.17%~98.32% 之间($RSD\leq 0.88\%, n=9$),表明本方法加样回收率良好。

2.2 PAE-HP- β -CD 包合物的制备

称取 PAE 适量,溶解于无水乙醇中;另称取 HP- β -CD 适量,加入一定量的蒸馏水,水浴下搅拌加热一定时间后取出,置于恒温磁力搅拌机上,缓慢滴加含 PAE 的无水乙醇溶液,设置一定转速和温度,加热一定时间后取出。冷却后置于 0 °C 冰箱 24 h,取出,抽滤,用石油醚进行少量多次洗涤,于 60 °C 恒温干燥箱中干燥 1 h,得到的白色粉末即为 PAE-HP- β -CD 包合物^[6]。

2.3 PAE-HP- β -CD 包合物的验证

采用饱和水溶液法。取 PAE、HP- β -CD、PAE 与 HP- β -CD 物理混合物、PAE-HP- β -CD 包合物分别与溴化钾(KBr)压片后,使用红外光谱法,在 400~4 000 cm^{-1} 范围内扫描。结果显示,PAE、PAE 与 HP- β -CD 物理混合物均在 1 700~2 000 cm^{-1} 处有吸收峰^[7],而 HP- β -CD 与 PAE-HP- β -CD 包合物在该位置均无吸收峰,表明 PAE 与 HP- β -CD 结合生成了新的物相,而非简单的物理混合。

2.4 PAE-HP- β -CD 包合物中 PAE 含量的测定

取“2.2”项下包合物 100 mg,加适量无水乙醇溶解,用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤,取续滤液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,无水乙醇定容。在 274 nm 波长下测定其吸光度,用“2.1.2”项下标准曲线计算 PAE 含量,并计算包合率。

包合率(%)=(包合物中 PAE 的含量/加入 PAE 的质量) $\times 100\%$ 。

2.5 制备工艺对包合率的影响

2.5.1 主药-辅料投料比 按“2.2”项下的方法,分别考察主药-辅料投料比(PAE:HP- β -CD, m/m)为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 时对包合率的影响。结果,包合率分别为 27.54%、42.18%、67.82%、78.17%、63.26%、58.14%。由此可见,包合率先随主药-辅料投料比增大而增加,在 1:4 时达到最高,而后逐渐降低。故确定 1:4 的主药-辅料投料比为星点设计中心点。

2.5.2 包合时间 按“2.2”项下方法,分别考察包合时间为 1、2、2.5、3、4、5 h 时对包合率的影响。结果,包合率分别为 40.19%、44.84%、47.35%、52.64%、46.85%、42.48%。由此可见,包合率先随包合时间延长而增加,在 3 h 时达到最高,而后逐渐降低。故确定 3 h 的包合时间为星点设计中心点。

2.5.3 包合温度 按“2.2”项下方法,分别考察包合温度为 30、35、40、45、50、55 °C 时对包合率的影响。结果,包合率分别为 42.37%、46.35%、57.19%、62.49%、55.47%、50.26%。由此可见,包合率先随包合温度升高而增加,在 45 °C 时达到最高,而后逐渐降低。故确定 40 °C 的包合温度为星点设计中心点。

2.5.4 搅拌速度 按“2.2”项下方法,分别考察搅拌速度为 150、200、250、300、350、400 r/min 时对包合率的影响。结果,包合率分别为 44.78%、46.1%、49.85%、51.78%、46.29%、45.96%。由此可见,包合率先随搅拌速度加快而增加,在 300 r/min 时达到最高,而后逐渐降低。故确定 300 r/min 的搅拌速度为星点设计中心点。

2.6 包合工艺优化

2.6.1 星点设计试验安排 根据“2.5”项下结果,以主药-辅料投料比(X_1)、包合时间(X_2)、包合温度(X_3)、搅拌速度(X_4)为因素,以包合率(y)为指标进行星点设计。因素与水平见表 1,星点设计安排与结果见表 2^[8]。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平				
	-2	-1	0	+1	+2
X_1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
X_2 , h	1	2	3	4	5
X_3 , °C	20	30	40	50	60
X_4 , r/min	200	250	300	350	400

2.6.2 模型拟合和方差分析 运用 Design Expert 8.0 软件进行多元线性可得多元线性回归方程 $y=78.63-2.97X_1+2.45X_2+1.93X_3-0.16X_4$ ($r=0.3447, P>0.05$)。该线性回归方程的相关系数较低,表明 y 与各因素之间的线性关系较差、拟合度较差、数学模型不好,不适用于该试验。进行非线性拟合,可得二项式方程 $y=84.12-$

表2 星点设计安排与结果

Tab 2 Design and result of central composite design-response surface methodology

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	包含率, %
1	-1	-1	-1	-1	73.14
2	1	-1	-1	-1	72.78
3	-1	1	-1	-1	86.15
4	1	1	-1	-1	79.65
5	-1	-1	1	-1	79.29
6	1	-1	1	-1	74.84
7	-1	1	1	-1	82.46
8	1	1	1	-1	70.18
9	-1	-1	-1	1	67.94
10	1	-1	-1	1	69.15
11	-1	1	-1	1	80.21
12	1	1	-1	1	75.49
13	-1	-1	1	1	83.12
14	1	-1	1	1	80.16
15	-1	1	1	1	88.26
16	1	1	1	1	73.95
17	-2	0	0	0	75.91
18	2	0	0	0	62.47
19	0	-2	0	0	67.17
20	0	2	0	0	78.64
21	0	0	-2	0	79.85
22	0	0	2	0	89.18
23	0	0	0	-2	82.95
24	0	0	0	2	81.13
25~30	0	0	0	0	84.12

$2.97X_1 + 2.45X_2 + 1.93X_3 - 0.16X_4 - 1.95X_1X_2 - 1.48X_1X_3 + 0.18X_1X_4 - 2.57X_2X_3 - 0.053X_2X_4 + 2.35X_3X_4 - 3.71X_1^2 - 2.78X_2^2 + 0.12X_3^2 - 0.50X_4^2$ ($r=0.9901, P<0.0001$)。该二项式方程的相关系数较高($r=0.9901$)，拟合度较好，具有较好的可信度，可以作为该试验的分析预测模型^[8]。

运用 Design Expert 8.0 软件进行方差分析，结果见表3。

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1 282.10	14	91.58	107.44	<0.0001	极显著
X_1	211.52	1	211.52	248.17	<0.0001	极显著
X_2	144.40	1	144.40	169.42	<0.0001	极显著
X_3	89.75	1	89.75	105.29	<0.0001	极显著
X_4	0.62	1	0.62	0.72	0.4080	
X_1X_2	61.04	1	61.04	71.61	<0.0001	极显著
X_1X_3	34.90	1	34.90	40.94	<0.0001	极显著
X_1X_4	0.49	1	0.49	0.58	0.4585	
X_2X_3	105.32	1	105.32	123.57	<0.0001	极显著
X_2X_4	0.045	1	0.045	0.053	0.8211	
X_3X_4	88.60	1	88.60	103.94	<0.0001	极显著
X_1^2	377.51	1	377.51	442.91	<0.0001	极显著
X_2^2	212.15	1	212.15	248.91	<0.0001	极显著
X_3^2	0.40	1	0.40	0.47	0.5017	
X_4^2	6.79	1	6.79	7.96	0.0129	
残差	12.79	15	0.85			
失拟项	12.79	10	1.28			
总差	1 294.89	29				

由表3可得，该预测模型F值为107.44($P<0.0001$)，为极显著模型。该分析模型中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_1X_3 均为极显著($P<0.0001$)。由二项式方程可知，包含率影响因素的主次顺序为 $X_1>X_2>X_3>X_4$ 。

2.6.3 响应面图 根据拟合方程作响应面图，详见图1(影响不显著的图略)。

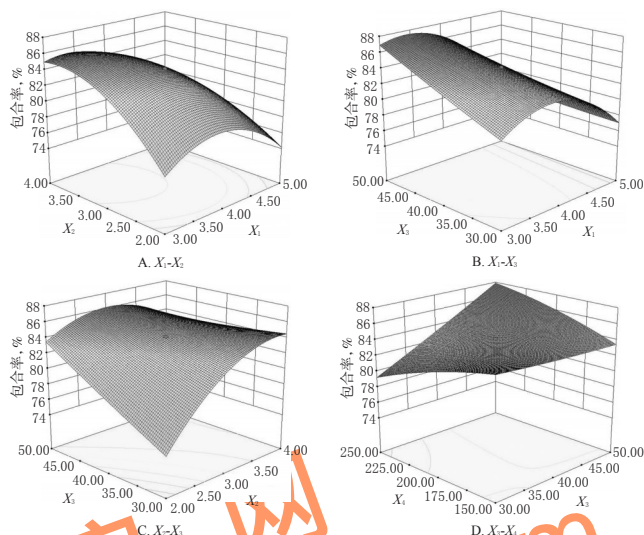


图1 投料比(X_1)、包含时间(X_2)、包含温度(X_3)、搅拌速度(X_4)对包含率影响的响应面图

Fig 1 Response surface plot of the effects of feed ratio (X_1), inclusion time (X_2), inclusion temperature (X_3) and stirring speed (X_4) on inclusion rate

由图1可知，各响应面均具有稳定点，该稳定点下包含率为最大值。根据二项式方程，采用三维响应面对最优包含工艺进行预测，得出最优工艺为主药-辅料投料比3.39:1、包含时间3.2 h、包含温度49.99℃、搅拌速度349.65 r/min。该条件下包含率为89.12%。

2.6.4 验证试验 按照生产实际，将搅拌速度设置为350 r/min，包含温度设置为50℃，在此条件下，对最优处方工艺进行验证。平行制备6份PAE-HP-β-CD包合物，测得其包含率分别为87.15%、87.98%、87.46%、87.86%、86.92%、87.41%，平均值为87.46% ($n=6$)，测得值与预测值(89.12%)的相对误差为1.86%。这说明该预测模型良好，该工艺条件下制备的包合物包含率较高，数据可靠，重复性较好。

3 讨论

PAE临床上用于治疗风湿痛、胃痛、湿疹、过敏性皮炎具有良好的疗效^[9]。近年来对PAE的药理和药化研究不断深入^[10]，但是对于其运用在制剂方面的研究报道较少。本研究以HP-β-CD对PAE进行包合，通过星点设计-响应面法建立预测模型，得到最优包含工艺条件，数据可靠，重复性较好。

包合物的制备方法主要包括饱和水溶液法、超声法和研磨法，本研究仅考察饱和水溶液法，未对其余两种

抗肿瘤药H6聚合物胶束的制备及体外抗肿瘤作用研究

潘超^{1,2*}, 刘会丽², 许俊鹏¹, 唐俏欣¹, 万丽^{1#}(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0533-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.28

摘要 目的:制备抗肿瘤药H6(内酯类化合物)聚合物胶束,考察其体外抗肿瘤作用。方法:以甲氧基聚乙二醇-聚(ϵ -己内酯)(mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀)为载药材料,制备H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束。以粒径、多分散系数(PDI)和48 h是否产生沉淀为指标筛选处方投料比、H6质量浓度、有机溶剂体积比,检测所制胶束的包封率和载药量。采用MTT法检测所制胶束与H6溶液对人非小细胞肺癌细胞A549、人肺癌细胞H460的毒性。结果:确定处方为投料比为1:25、H6质量浓度为2 mg/mL、乙醇-氯仿为1:1(V/V);所制备的H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的粒径为(40.74 ± 0.116 3) nm, PDI为0.101 ± 0.006,包封率为(94.87 ± 0.016 3)%,载药量为(7.07 ± 0.001 5)%(n=3)。胶束和H6溶液对A549细胞的IC₅₀分别为15.62、12.57 nmol/L,对H460细胞的IC₅₀分别为27.68、15.19 nmol/L。结论:成功制得H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束,其具有体外抗肿瘤作用。

关键词 抗肿瘤药H6; mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀; 胶束; 抗肿瘤作用

Study on Preparation of Anti-tumor Drug H6 Polymeric Micelles and Their *in vitro* Anti-tumor Effects

PAN Chao^{1,2}, LIU Huili², XU Junpeng¹, TANG Qiaoxin¹, WAN Li¹(1.School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.State Key Lab of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare anti-tumor drug H6 (lactone compound) polymeric micelles, and to investigate its *in vitro* anti-tumor effects. METHODS: Using mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ as carrier, H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ micelles were prepared. Using particle size, PDI and 48 h whether to produce precipitation as indexes, feeding ratio, H6 concentration, volume ratio of organic solvent were screened. The encapsulation efficiency and drug-loading amount of micelle were all detected. MTT assay was used to detect the tox-

方法进行研究,后续拟进行相关试验。包合物的验证主要有红外光谱法、差示扫描热量法、紫外扫描法和薄层色谱法,本试验选取红外光谱法来验证包合物,具有特征性强、应用范围广、操作简便等优点。

星点设计较于传统正交试验设计和均匀试验设计采用非线性二项式方程拟合,预测值接近测得值,得到的预测模型良好、相对误差较小,但尚需结合实际情况对预测值进行优化。

参考文献

[1] Okubo T, Nagai F. The inhibitory effects of moutan cortex and paeoniae radix on oxidative DNA damage by t-butyl hydroquinone, phenolic antioxidant[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*, 1997, 379(1):S178.

[2] 廖正根,平其能,梁新丽,等.丹皮酚 β -环糊精包合物的

* 硕士研究生。研究方向:中药有效成分分析。电话:028-61800231。E-mail:1335126865@qq.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析、中药有效成分及质量标准研究。电话:028-61800231。E-mail:wani8801@163.com

研究[J].中国新药杂志,2005,14(10):1173-1175.

[3] 张冕,王德堂,万芳.相溶解度法研究不同环糊精对丹皮酚的增溶作用[J].分子科学学报,2012,28(5):422-426.

[4] 何海云,黄华,王慧,等.伊潘立酮-羟丙基- β -环糊精包合物的制备及验证[J].中国药房,2012,23(29):2737-2739.

[5] 高锦红.牡丹皮中丹皮酚含量的测定[J].湖北农业科学,2013,52(3):669-671.

[6] 张冕. Box-Behnken 实验设计法优化丹皮酚-羟丙基- β -环糊精包合物的制备工艺[J].荆楚理工学院学报,2014(2):5-10.

[7] 李颖,曾茂贵,郑笈,等.星点设计-响应面法优化鱼腥草挥发油- β -环糊精包合物的制备工艺[J].中草药,2014,45(13):1855-1862.

[8] 杨涛,盛欢欢,李岩,等.星点设计-响应面法优化穿心莲提取工艺[J].中国药学杂志,2011,46(2):208-213.

[9] 王昌恩.丹皮酚对大鼠离体工作心脏作用研究[J].中国药理毒理学杂志,1993,7(6):351-353.

[10] 孙言才,沈玉先,孙国平.丹皮酚的主要药理活性研究进展[J].中成药,2004,26(7):579-582.

(收稿日期:2016-11-01 修回日期:2016-12-10)

(编辑:刘明伟)