

Plackett-Burman 设计与星点设计-效应面法优化珠子参皂苷磷脂复合物制备工艺^Δ

史亚军*,王 媚,吴 星,宋小妹(陕西中医学院药学院,陕西 咸阳 712046)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0518-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.28

摘要 目的:优化珠子参皂苷磷脂复合物的制备工艺。方法:以溶剂挥发法制备珠子参皂苷磷脂复合物;以复合率为评价指标,采用 Plackett-Burman 设计确定珠子参皂苷磷脂复合物复合工艺的主要影响因素、星点设计优化主要影响因素的水平、效应面法预测最佳工艺。结果:投料比、皂苷的质量浓度和反应温度对磷脂复合物形成具有显著影响;星点设计中的二项式方程拟合度较高(复相关系数 R 为 0.949 8),效应面法优化的最佳工艺为磷脂与珠子参皂苷投料比 3:1、皂苷质量浓度 10 mg/ml、反应温度 40 ℃。最佳工艺试验验证结果与二项式拟合方程预测结果的偏差小于 2%。结论:优化得到的珠子参皂苷磷脂复合物最佳制备工艺稳定、可行。

关键词 珠子参皂苷;磷脂复合物;Plackett-Burman 设计;星点设计;效应面法;制备工艺

Optimization of the Preparation Technology of *Panax japonicus* Saponin-phospholipid Complex Using Plackett-Burman Design and Central Composite Design-response Surface Methodology

SHI Ya-jun, WANG Mei, WU Xing, SONG Xiao-mei (College of Pharmacy, Shaanxi University of TCM, Shaanxi Xianyang 712046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of *Panax japonicus* saponin-phospholipid complex. METHODS: *P. japonicus* saponin-phospholipid complex was prepared by solvent evaporation method. Using complex ratio as evaluation criterion, Plackett-Burman design was used to determine main influential factors of preparation technology; central composite design was adopted to optimize the main influential factors; the optimal technology was predicted by response surface methodology. RESULTS: The ratio of saponin to phospholipid, saponin concentration and reaction temperature had significance effect on the formation of complex. In central composite design, binomial equation had high fitting degree (correlation coefficient $R=0.949\ 8$). The technology optimized by response surface methodology was as follows: ratio of saponin to phospholipid 3:1; saponin concentration 10 mg/ml; reaction temperature 40 ℃. The deviation between the result of the best technology verification test and the binomial fitting equation forecast value was less than 2%. CONCLUSIONS: The optimized preparation technology of *P. japonicus* saponin-phospholipid complex is practical and stable.

KEYWORDS *Panax japonicus* saponin; Phospholipid complex; Plackett-Burman design; Central composite design; Response surface methodology; Preparation technology

珠子参为五加科植物珠子参中的干燥根状茎,具有补肺、养阴、活络、止血之功,主要用于气阴两虚、烦热口渴、虚劳咳嗽、跌扑损伤、关节疼痛、咳血、吐血、外伤出血等^[1]。珠子参主要含有多种皂苷、多糖、氨基酸和多种微量元素等,其中主要

有效成分为皂苷类。现代药理学研究表明,珠子参具有镇痛、镇静、抗炎^[2]、增强免疫力^[3]、抗肿瘤^[4-5]等活性。但由于皂苷口服吸收差^[6]、生物利用度低而影响了其疗效的发挥。磷脂复合物作为一种有效的药物改性技术,在天然药物研究中显示出

[5] 郑虎. 药物化学[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 38-39.

[6] Pawula M, Barrett DA, Shaw PN. An improved extraction method for the HPLC determination of morphine and its metabolites in plasma[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 1993, 11(4):401.

Δ 基金项目:陕西省中药制药重点学科建设项目;陕西省重点科技创新团队项目(No.2013KCT-26)

* 副教授,博士。研究方向:中药新剂型与新型给药系统。电话:029-38185165。E-mail:328573751@qq.com

[7] Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Vérièpe J, et al. Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives[J]. *Neuroscience*, 2013(233):95.

[8] 柯学,王小琼,平其能. 口腔崩解片及其制备技术进展[J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(11):801.

[9] 国家食品药品监督管理局. 药品包装用材料、容器管理办法: 暂行[S]. 2000-10-01.

(收稿日期:2014-03-06 修回日期:2014-05-19)

(编辑:刘 萍)

了广阔的应用前景^[7]。研究表明,卵磷脂与药物制成的磷脂复合物可显著提高药物在体内的吸收,提高其生物利用度^[8-11]。本文通过对珠子参皂苷磷脂复合物的制备工艺进行研究,为珠子参高生物利用度新制剂的开发奠定基础,也为中药有效成分和有效部位制备磷脂复合物研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BP-121S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); DF-101S 磁力加热搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); 101-2 型电热鼓风干燥箱(上海浦东跃欣科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

珠子参皂苷(陕西中医学院中药化学教研室宋小妹教授提供,批号:20120310,含量:90%); 大豆卵磷脂(以下简称磷脂,上海爱康精细化工有限公司,磷脂酰胆碱含量:60%); 四氢呋喃、无水乙醇、三氯甲烷等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 磷脂复合物制备工艺及评价方法^[12]

将皂苷与适量的反应溶剂置于圆底烧瓶中,置于磁力搅拌器上搅拌反应,控制适宜的反应温度,复合一定时间后,回收反应溶剂完全,将圆底烧瓶置于真空干燥器中至完全干燥,刮取黏附于烧瓶壁的磷脂复合物,即得。

本研究利用皂苷难溶于三氯甲烷,而磷脂和磷脂复合物易溶于三氯甲烷的特点,将皂苷和磷脂在适宜溶剂中在一定条件下使其两者发生复合反应;反应完全后,减压蒸发除去反应溶剂,在复合物中加入三氯甲烷,充分溶解其中的磷脂和磷脂复合物,过滤,收集不溶性沉淀,干燥,称质量。珠子参皂苷的初始投药量与沉淀量的差值即为皂苷与磷脂结合的量,依据以下公式计算出复合率:复合率(%) = $(M_1 - M_2) / M_1 \times 100\%$ (其中 M_1 为皂苷初始投入量, M_2 为沉淀量)。

2.2 Plackett-Burman 设计优化影响因素

2.2.1 试验因素及水平的确定^[13] 以 Plackett-Burman 试验设计对影响皂苷磷脂复合物制备工艺的因素进行考察,确定主要影响因素。根据复合反应原理,影响复合效果的主要因素有反应溶剂、磷脂与皂苷的投料比例、反应时的温度、皂苷质量浓度、反应时间、磁力搅拌速度等6个因素。对于反应溶剂的选择,考察了目前复合物的制备中最常使用的四氢呋喃和无水乙醇。依照 Plackett-Burman 试验设计要求,在预试验的基础上,设计了12次试验,因素取高(+1)、低(-1)两个水平,具体试验因素以及水平值见表1。

表1 Plackett-Burman 设计因素及水平范围

Tab 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	+1
反应溶剂	四氢呋喃	无水乙醇
投料比(磷脂-皂苷)	1	4
反应温度, °C	25	55
皂苷质量浓度, mg/ml	5	20
反应时间, h	0.5	2
搅拌速度, r/min	200	600

2.2.2 Plackett-Burman 优化结果 按照上述因素水平表,以 Design-expert 8.0 软件安排试验,进行12组试验,每组试验进行3次,3次复合率的结果取平均值,结果见表2。

表2 Plackett-Burman 设计及结果

Tab 2 Plackett-Burman design and results

反应溶剂	投料比 (磷脂-皂苷)	反应温 度, °C	质量浓度, mg/ml	反应时 间, h	搅拌速度, r/min	复合率, %
无水乙醇	4	25	20	2	600	89.91
四氢呋喃	4	55	5	2	600	81.93
无水乙醇	1	55	20	0.5	600	80.03
四氢呋喃	4	25	20	2	200	91.57
四氢呋喃	1	55	5	2	600	77.01
四氢呋喃	1	25	20	0.5	600	80.82
无水乙醇	1	25	5	2	200	76.13
无水乙醇	4	25	5	0.5	600	82.54
无水乙醇	4	55	5	0.5	200	80.55
四氢呋喃	4	55	20	0.5	200	84.80
无水乙醇	1	55	20	2	200	79.14
四氢呋喃	1	25	5	0.5	200	80.04

从复合率结果可以看出,各因素不同水平制备得到的复合物的复合率为75%~90%,均有一定影响。为了明确不同因素对复合率影响的程度,采用 Design-expert 8.0 软件对结果进行处理,分析各因素的 F 值与可信度,以可信度大于95%的因素作为对工艺有显著影响的因素。各因素显著性分析结果见表3。

表3 各因素显著性分析结果

Tab 3 Analysis results of factor significance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	221.46	6	36.91	9.52	0.012 9
反应溶剂	5.16	1	5.16	1.33	0.300 9
投料比(磷脂-皂苷)	121.01	1	121.01	31.20	0.003
反应温度, °C	25.65	1	25.65	6.61	0.050
皂苷质量浓度, mg/ml	65.65	1	65.65	16.93	0.009
反应时间, h	3.99	1	3.99	1.03	0.357 1
搅拌速度, r/min	8.67×10^{-6}	1	8.67×10^{-6}	2.24×10^{-6}	0.998 9

因素显著性分析结果表明,各影响因素对复合率影响的显著性差异较大,其中投料比、皂苷质量浓度与反应温度对磷脂复合物形成具有显著性影响。由此,确定上述3个因素作为重点考察的因素。考虑到反应溶剂、反应时间、搅拌速度等因素对复合物复合率影响较小,并不具显著性影响,结合操作的便利与溶剂安全性,最终确定反应溶剂为无水乙醇,反应时间为1 h,搅拌速度为300 r/min。对于投料比、皂苷质量浓度与反应温度采用星点设计-效应面法进行水平的最终确定。

2.3 星点设计-效应面法优化试验

2.3.1 星点设计试验 通过 Plackett-Burman 试验设计确定影响复合物制备工艺的主要因素为投料比、皂苷质量浓度和反应温度。根据预试验结果与在最高和最低水平时制备复合物的可行性,将上述3个因素的水平范围确定为:投料比(A)为1:1~4:1,反应温度(B)为30~55 °C,皂苷质量浓度(C)为5~20 mg/ml。按照星点试验设计进行试验安排(见表4),测定各试验组的复合率,对复合率进行拟合分析。

2.3.2 试验结果及模型拟合 根据上述试验设计,按照表5试验方案制备复合物并测定复合率,其中15~20次试验为中心

点试验的重复性验证,结果用于考察模型的误差。20次试验测定结果见表5。

表4 星点设计因素水平表

因素	水平				
	-1.732	-1	0	1	1.732
A(投料比)	1	1.63	2.5	3.37	4
B(反应温度,℃)	30	35.28	42.5	49.72	55
C(皂苷质量浓度,mg/ml)	5	8.17	12.5	16.83	20

表5 星点设计与指标测定结果

试验序号	因素			复合率, %
	A	B	C	
1	-1	-1	-1	78.33
2	1	-1	-1	92.40
3	-1	1	-1	75.55
4	1	1	-1	90.99
5	-1	-1	1	78.59
6	1	-1	1	85.18
7	-1	1	1	78.59
8	1	1	1	80.26
9	-1.732	0	0	76.00
10	1.732	0	0	93.03
11	0	-1.732	0	82.50
12	0	1.732	0	78.04
13	0	0	-1.732	83.81
14	0	0	1.732	85.01
15	0	0	0	88.08
16	0	0	0	90.37
17	0	0	0	87.53
18	0	0	0	89.41
19	0	0	0	88.63
20	0	0	0	88.38

以评价指标分别对3个因素进行多元线性回归和二项式拟合。二项式拟合方程为 $Y = -77.91 + 27.91A + 4.97B + 3.83C - 0.11AB - 0.64AC + 0.01BC - 1.96A^2 - 0.056B^2 - 0.08C^2$, 拟合相关系数 R 为0.949 8, 结果表明拟合度良好。而多元线性回归拟合方程为 $Y = 80.42 + 5.38A - 0.15B - 0.24C$, 相关系数 R 为0.574 9, 不如二项式回归拟合好。二项式拟合方差分析结果见表6。

表6 二项式回归模型系数显著性检验结果

Tab 6 The coefficients significance test results of binomial regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	553.74	9	61.53	21.04	<0.000 1
A	304.27	1	304.27	104.03	<0.000 1
B	15.72	12	15.72	5.37	0.042 9
C	15.17	1	15.17	5.19	0.046 0
AB	3.85	1	3.85	1.32	0.277 9
AC	46.32	1	46.32	15.84	0.002 6
BC	0.93	1	0.93	0.32	0.584 9
A ²	33.98	1	33.98	11.62	0.006 7
B ²	130.98	1	130.98	44.78	<0.000 1
C ²	35.61	1	35.61	12.81	0.005 8

由表6可知,总模型方程显著($P < 0.000 1$),提示该模型的

拟合情况良好、试验误差小,能准确地预测实际情况,可以用于水平预测与优化。

2.3.3 效应面法优化与预测 根据上述分析结果,投料比对磷脂复合物形成影响极其显著。从3个因素交互作用看,投料比与皂苷质量浓度的交互影响在统计学上具有显著性意义;而反应温度与皂苷质量浓度交互作用和投料比与反应温度交互作用影响较小。采用Design-expert 8.0作相应曲面图和等高线图,见图1。

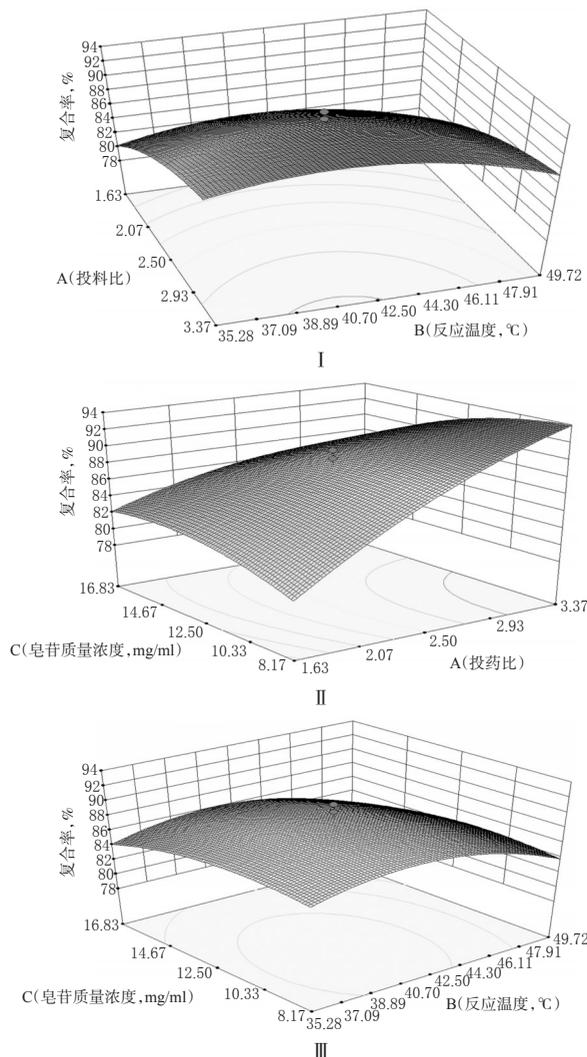


图1 投料比、反应温度与皂苷质量浓度对复合率的影响效应面图

I. 投料比与反应温度; II. 投料比与皂苷质量浓度; III. 反应温度与皂苷质量浓度

Fig 1 Response-surface of the effect of the ratio of saponin to phospholipid, reaction temperature and saponin concentration on complex ratio

I. the ratio of saponin to phospholipid with reaction temperature; II. the ratio of saponin to phospholipid with saponin concentration; III. reaction temperature with saponin concentration

从图1中各因素的较优区域范围进行优化,从A、B因素等高线可以看出,磷脂用量越大,复合率越高;结合图形实际,暂定投料比(A)为3:1~3.4:1、反应温度(B)为36~44℃。而

A、C因素等高线也同样提示,磷脂用量越大,复合率越高;皂苷质量浓度越低,复合率越高。结合等高线进行综合考虑,确定投料比(A)为3:1~3.4:1,皂苷质量浓度(C)为8~12 mg/ml;从B、C因素等高线优化反应温度(B)为39~42 ℃,皂苷质量浓度(C)为9~12 mg/ml。通过上述优化范围的重叠区域,结合投料的方便性,最终确定制备磷脂复合物的条件为:投料比磷脂-皂苷(3:1),复合反应温度控制在40 ℃,皂苷质量浓度控制在10 mg/ml。

2.4 优化工艺验证

为了验证上述建立的模型与试验结果是否相符,通过进一步试验对模型的可靠性进行了验证。各因素取值为上述确定的最优条件,共进行5组验证试验,测定各组样品的复合率;计算5组复合率平均值,并与二项式方程预测值相比较。结果,磷脂复合物复合率的实测值为(92.68±1.36)%,而模型预测值为91.93%,实测值与预测值的偏差小于2%,提示该模型是可靠的。结果表明,采用效应面法来优选珠子参总皂苷磷脂复合物最佳制备工艺是可行的。

3 讨论

Plackett-Burman设计是一种较为经济的二水平试验方法,能以较少的试验次数对试验的影响因素进行快速优化,找出影响试验结果的主要因素;再采用星点设计效应面法优化^[14],得到最佳制备工艺。优化的试验水平经过验证,如果实测值与预测值之间的偏差较小,表明拟合的数学模型方程在因素水平优化过程中是可行的。

在制备工艺研究中发现,四氢呋喃与无水乙醇具有相似的复合效果,考虑到溶剂毒性的残留可能造成的影响,最终采用无水乙醇作为复合溶剂,以利于生产实际。另外,考虑到大豆卵磷脂在高于60 ℃条件下稳定性降低,故在试验设计中将试验温度设定在55 ℃以下。

磷脂复合物是被复合药物与磷脂分子在一定的溶剂环境中,在适宜的外力作用下,两分子的特定部位相互靠近,两者之间产生一种吸引力而使两者稳定的固定在一起形成的结合体,对被复合药物的物理性质、生物学性质有显著改善可使药物的脂溶性提高、药理作用增强、生物利用度提高、药物作用时间延长、毒副作用降低等。其制备方法简单,复合过程中并未形成新的化合物,药物生物活性并未发生改变,形成的复合物具有其组成单元物不具备的一些优良特性,而这些特性在制剂学中具有特殊用途,能极大改善中药有效成分的临床效果^[15-16]。因此,珠子参皂苷类成分通过磷脂复合物技术的改性,可有效提高其生物利用度。

磷脂复合物制备工艺评价主要采用反应液是否澄清、药物与磷脂的结合率、以连续递变法测得的吸光度之差、产物收率等为指标,其中又以结合率的高低为主要评价指标^[7]。当以有效部位为药物时,以结合率为指标更能解释复合反应发生的程度。本研究中投料的皂苷含量达到了90%,其在氯仿中不溶,而形成复合物后在氯仿中易于溶解,按照不溶解的皂苷转移至可以溶解的复合物中的比例能够提示复合的效果。笔

者也曾尝试采用紫外分光光度法来检测有效成分的含量,但由于皂苷类成分末端吸收的影响而不能测定;且通过显色反应测定时,磷脂复合物中磷脂的存在会严重影响测定结果的准确性,故最终确定以复合率作为评价指标。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:254.
- [2] 赵仁,赵毅,李东明,等. 珠子参研究进展[J]. 中国现代中药, 2008, 10(7):3.
- [3] 考玉萍,姜炜,宋小妹. 珠子参叶总皂苷抗疲劳抗应激作用的实验研究[J]. 陕西中医, 2008, 29(8):1 092.
- [4] 陈涛,陈龙飞,金国琴,等. 珠子参体外诱导人肝癌细胞凋亡效应及机制研究[J]. 肿瘤, 2006, 26(2):144.
- [5] 陈涛,龚张斌. 珠子参对人早幼粒白血病 HL-60 细胞增殖的抑制和诱导分化作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(4):278.
- [6] 王娟,单进军,狄留庆,等. 五环三萜类皂苷成分口服吸收及代谢研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(1):196.
- [7] 李凤,高尔. 天然活性成分-磷脂复合物的研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(7):550.
- [8] Gatti G, Peruua E. Plasma concentrations of free and conjugated silybin after oral intake of a silybin-phosphatidylcholine complex in healthy volunteers[J]. *J Clin Pharmacol Ther*, 1994, 32(11):614.
- [9] 韩文莉,陆巍,何东平. 盐酸小檗碱磷脂复合物在兔体内的药动学及相对生物利用度研究[J]. 中国药房, 2011, 22(17):1 564.
- [10] 胡霓霓,谭群友,张梨. 美斯地浓磷脂复合物大鼠体内药代动力学研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2012, 43(6):873.
- [11] 吴慧仪,龙晓英,陈莉. 磷脂复合物及其对中药活性成分透过生物膜的影响[J]. 中草药, 2012, 43(2):393.
- [12] 陈新梅,吴晓坤,孔得刚. 人参皂苷磷脂复合物的制备与质量评价初步研究[J]. 齐鲁药事, 2011, 30(9):497.
- [13] 史亚军,吴品江,魏萍. Plackett-Burman设计与星点设计-效应面法优化山楂总黄酮磷脂复合物制备工艺[J]. 中药材, 2010, 33(3):437.
- [14] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(5):292.
- [15] 史亚军,吴品江,许润春. 黄芩苷磷脂复合物基本性质研究[J]. 中草药, 2012, 43(1):78.
- [16] 李颖. 葛根素磷脂复合物的制备技术及体内外特性研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2006:43.
- [17] 廉洁,王伯初. 药物磷脂复合物工艺评价标准及应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(5):830.

(收稿日期:2014-04-21 修回日期:2014-11-10)

(编辑:刘萍)