

正交试验法优选染料木素固体分散体制备工艺

包琳琳*, 孟庆杰, 潘五九, 王伟明*(黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0528-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.30

摘要 目的: 优选染料木素固体分散体的制备工艺。方法: 以45 min的累计溶出度和溶出50%所用的时间($t_{1/2}$)的综合评分为指标, 通过单因素试验和正交试验考察药载比(m/m)、熔融温度、搅拌时间、表面活性剂及过筛目数对染料木素固体分散体制备工艺的影响, 并进行验证试验。采用高效液相色谱法测定染料木素含量, 色谱条件为Diamonsil C₁₈色谱柱, 流动相为甲醇-0.05%磷酸(70:30), 检测波长为262 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μl。结果: 固体分散体的最优制备工艺为药载比1:9, 熔融温度75 ℃, 搅拌时间10 min, 过40目筛, 不加表面活性剂。按最优制备工艺所制的3批样品的 $t_{1/2}$ 分别为23.32、23.10、23.28 min, 累计溶出度分别为91.90%、89.63%、90.08%。结论: 优化的制备工艺可行, 成功制得染料木素固体分散体。

关键词 染料木素; 固体分散体; 正交试验; 制备工艺

Optimization of Preparation Process for Genistein Solid Dispersions by Orthogonal Test

BAO Linlin, MENG Qingjie, PAN Wujie, WANG Weiming (Heilongjiang Academy of TCM, Harbin 150036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize preparation process of Genistein solid dispersions. METHODS: With the cumulative dissolution for 45 min and the time of 50% dissolution ($t_{1/2}$) as index, single factor test and orthogonal test were used to investigate the effects of drugs and carrier ratio (m/m), melting temperature, mixing time, surfactants and mesh sieve on preparation process, and validated. The content of genistein was determined by HPLC. Chromatographic conditions were as follows as Diamonsil C₁₈ column, mobile phase consisted of methanol-0.05% phosphoric acid (70:30), detection wavelength 262 nm, column temperature 30 ℃, sample size 10 μl. RESULTS: Optimal preparation process was as follows as drugs and carrier ratio of 1:9, melting temperature 75 ℃, mixing time 10 min, mesh sieve 40, no active agent. $t_{1/2}$ of 3 batches of samples prepared by optimized preparation technology were 23.32, 23.10 and 23.28 min, and cumulative dissolution of them were 91.90%, 89.63% and 90.08%, respectively. CONCLUSIONS: Optimized preparation process is reliable, and Genistein solid dispersion is prepared successfully.

KEYWORDS Genistein; Solid dispersion; Orthogonal test; Preparation process

染料木素(Genistein, GEN)为异黄酮类化合物, 具有抗炎、镇痛、抗骨质疏松、降血脂、抗肿瘤等作用^[1-5], 与雌二醇具有相似的化学结构, 且有弱的雌激素样作用, 可代替雌二醇用于更年期综合征的治疗。但由于其难溶性, 使得GEN应用受到限制^[6]。固体分散技术可将药物高度分散于水溶性载体中, 用于提高难溶性药物的溶解度及溶出度^[7]。本研究应用固体分散

技术将GEN制备成GEN固体分散体(GSD), 以提高GEN的溶出度。笔者根据预试验结果, 通过单因素考察及正交试验进一步对GSD制备过程中的主要影响因素进行筛选, 最终确定GSD的最优制备工艺, 为GSD后续研究工作奠定了基础。

1 材料

1.1 仪器

- [11] 赵晨晨, 承伟, 王立冬. 微波辅助提取络石藤总黄酮的工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(4): 718.
- [12] 金时, 杨梅, 孔羽, 等. 木豆叶中黄酮微波提取工艺研究[J]. 中草药, 2011, 42(11): 2 235.
- [13] 彭胜, 彭密军, 黄美娥, 等. 双水相体系萃取分离杜仲黄酮[J]. 中药材, 2009, 32(11): 1 754.
- [14] 文赤夫, 向小奇, 曾卫湘, 等. 双水相体系萃取盐酸小檗碱[J]. 中药材, 2011, 34(10): 1 608.
- [15] 成明建, 陈小英, 黄齐慧. 正交试验优选双水相分配与超声提取集成法提取分离连钱草总黄酮的工艺[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2 532.
- [16] 郭永学, 王立红, 张大勇, 等. 乙醇/硫酸铵双水相体系从丹

- 参粗提液中分离丹酚酸B[J]. 化工学报, 2012, 63(6): 1 773.
- [17] 马春宏, 朱红, 王良, 等. 双水相萃取技术的应用研究进展[J]. 光谱实验室, 2010, 27(5): 1 906.
- [18] 谭平华, 林金清, 肖春妹, 等. 双水相萃取技术研究进展及应用[J]. 化工生产与技术, 2003, 10(1): 19.
- [19] 李艳芝, 付英杰, 于婷. 正交试验优选枸骨果实中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房, 2014, 25(3): 238.
- [20] 张艳军, 彭重威, 徐淑庆, 等. 银叶树叶中总黄酮提取工艺优化[J]. 中药材, 2012, 35(4): 638.
- [21] 杨斌, 胡福朝, 陈功锡. 微波提取槲蕨根茎中黄酮类物质的条件优化实验[J]. 中药材, 2009, 32(12): 1 907.
- [22] 白林山, 杨云, 吕丹丹. 微波辅助提取花生衣中总黄酮工艺研究[J]. 中药材, 2012, 35(6): 977.

* 硕士研究生。研究方向: 中药新药研究与开发。E-mail: linlin7055@163.com

通信作者: 研究员, 博士, 硕士生导师。研究方向: 中药剂型。电话: 0451-55665478。E-mail: zyyjy@163.com

(收稿日期: 2015-05-15 修回日期: 2015-07-06)

(编辑: 刘 萍)

HWCL-5型集热式恒温磁力搅拌器、R-1001N型旋转蒸发仪和R-1001N型恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);2010型高效液相色谱仪(日本岛津公司);RC-806型溶出度测定仪(天津市天大天发科技有限公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);BP211D型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

染料木素粉末(陕西大田生物科技有限公司,批号:DT20141009,纯度:>98%);染料木素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111704-201302,纯度:99.1%);聚乙二醇4000(PEG4000)、磷酸、磷酸二氢钾(天津市科密欧化学试剂有限公司);脱氧胆酸钠(天津市兴复精细化工研究所);聚山梨酯80(吐温80,天津市化学试剂三厂);氢氧化钠(湖南尔康制药股份有限公司);甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 GSD的制备

采用溶剂-熔融法制备GSD。精密称取GEN 1 g,置于50 ml烧杯中,加10 ml 95%乙醇使GEN溶解制成GEN乙醇溶液;另精密称取PEG4000 9 g,置于100 ml蒸发皿中,于75℃水浴上熔融后加入GEN乙醇溶液,充分搅拌10 min,在60℃水浴下旋转蒸发除去溶剂,取出析出物,于-20℃冷冻固化6 h;取出,置鼓风干燥箱中干燥24 h后粉碎,过筛,置于干燥器中备用。

2.2 GEN的含量测定

2.2.1 色谱条件^[9] 色谱柱为Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.05%磷酸(70:30),流速为1.0 ml/min;检测波长为262 nm;柱温为30℃;进样量为10 μl。取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液进样测定,记录色谱图,见图1。

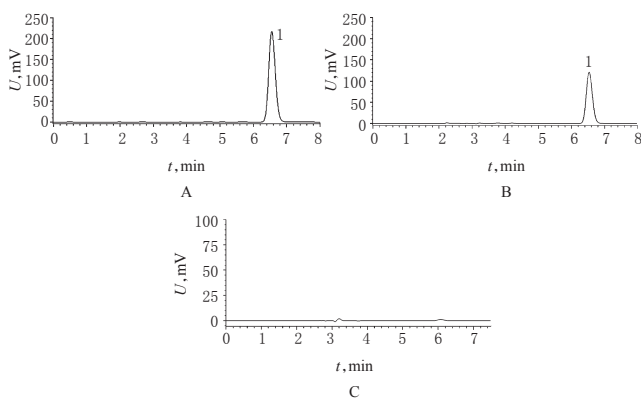


图1 高效液相色谱法

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. GEN

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control solution; B. test sample solution; C. negative control solution; 1. GEN

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取GEN对照品2.20 mg,置于50 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,超声处理,使其溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,即得质量浓度为44 μg/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取GSD 0.1 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇50 ml,称定质量,超声处理30 min使其溶解,放冷,再称定质量,加无水乙醇补足减失的质量,摇匀,过滤;精密吸取续滤液1 ml,置于25 ml量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)过滤,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按“2.1”项下方法制备不含GEN的阴性样品,再按“2.2.3”项下方法制备成阴性对照溶液。

2.2.5 标准曲线的绘制 精密吸取“2.2.2”项下制备的对照品溶液0.1、0.1、1、1 ml,分别置于100、10、10、5 ml量瓶中,加甲醇溶液定容至刻度,得到质量浓度为0.044、0.44、4.4、8.8 μg/ml的系列对照品溶液。将上述4种系列对照品溶液与44 μg/ml对照品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、GEN质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=92\ 336.73x+55\ 490.54$ ($r=0.999\ 99$)。结果表明,GEN检测质量浓度的线性范围为0.044~44 μg/ml。

2.2.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,重复进样6次,记录峰面积。结果,GEN峰面积的RSD为0.06%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别放置0、3、6、9、12、24、48、72 h,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,GEN峰面积的RSD为0.69%($n=8$),表明供试品溶液在72 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 按“2.2.3”项下方法制备6份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,GEN含量的RSD为1.43%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.2.9 准确度试验 精密称取已知GEN含量的GSD各0.05 g,共9份,置具塞锥形瓶中,分别加入低、中、高质量的GEN对照品,各3份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=3$)

试验号	称样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
1	51.00	3.96	2.97	6.89	98.21		
2	50.00	3.88	2.95	6.87	101.38		
3	51.20	3.97	2.88	6.86	100.19		
4	51.20	3.97	3.88	7.93	102.01		
5	51.40	3.99	3.80	7.77	97.71	100.22	1.69
6	51.10	3.97	3.85	7.85	102.85		
7	50.70	3.94	4.54	8.46	99.51		
8	51.00	3.96	4.54	8.40	99.53		
9	52.20	4.05	4.46	8.64	99.18		

2.3 溶出度测定方法

照溶出度测定法[2010年版《中国药典》二部附录X C]第一法(篮法)^[9]进行。溶出介质为含2.0%吐温80的pH 6.8磷酸盐缓冲液(PBS),体积为900 ml,温度为(37±0.5)℃,转速为100 r/min。将GSD装入胶囊,置于转篮中,依法操作,分别于5、10、20、30、45、60 min定时定位取样5 ml,经0.45 μm微孔滤膜过滤,同时补充同温同体积的溶出介质。按“2.2.1”项下色谱条件测定续滤液中GEN的含量,计算累计溶出度。

2.4 单因素考察

2.4.1 药载比 以药载比(GEN-PEG4000, m/m)分别为1:1、1:3、1:5、1:7、1:9,按照“2.1”项下方法制备GSD,再按照“2.3”项下方法测定溶出度。结果表明,药载比对GSD的溶出度有较大影响,随着载体比例逐渐增大,GSD的溶出度亦逐渐增高;按上述药载比所制GSD 45 min时的累计溶出度分别为59.69%、76.93%、93.01%、91.76%、98.67%。后期以药载比为1:3、1:7、1:9进行正交试验。

2.4.2 表面活性剂 分别以1.0%的吐温80和脱氧胆酸钠为表面活性剂,药载比为1:9,按照“2.1”项下方法制备GSD,再按照“2.3”项下方法测定溶出度。结果表明,加入表面活性剂并未对GSD的溶出度有显著改善,且加入吐温80反而降低了GEN的溶出,故本处方中不加入表面活性剂。

2.4.3 熔融温度 以熔融温度分别为75、80、90、100℃,药载

比为1:9,按照“2.1”项下方法制备GSD,再按照“2.3”项下方法测定溶出度。结果,按上述熔融温度所制GSD 45 min时的累计溶出度分别为91.71%、88.17%、94.27%、95.22%,说明熔融温度对GSD的溶出影响较小。从节能降耗的角度,选择熔融温度为75℃。

2.4.4 搅拌时间 以搅拌时间分别为5、10、20、30 min,药载比为1:9,按照“2.1”项下方法制备GSD,再按照“2.3”项下方法测定溶出度。结果表明,按上述搅拌时间所制GSD的 T_d (溶出63.2%所用时间)分别为29.86、27.67、25.95、30.82 min。由于搅拌5 min和30 min时的 T_d 值较接近,故后期以搅拌时间为10、20、30 min进行正交试验。

2.4.5 过筛目数 将制备好的GSD干燥后分别过筛(40、60、80、100目),再按照“2.3”项下测定溶出度,结果 T_d 分别为20.91、28.33、27.49、26.51 min。由于60和80目时的 T_d 值较接近,故后期以过筛目数为40、80、100目进行正交试验。

2.5 制备工艺优选

根据单因素考察结果,以药载比(A, m/m)、搅拌时间(B, min)、过筛目数(C)为因素,以45 min的溶出度(P)和溶出50%所用的时间($t_{1/2}$)的综合评分为指标,根据 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表设计试验。采用多指标综合评价法中的优劣距离综合评判法^[10],计算综合评分(Y)= $(t_{1/2 \min}/t_{1/2}+P/P_{\max})\times 0.5$,式中 $t_{1/2}$ 为溶出50%所用的时间, P 为累计溶出度, $t_{1/2 \min}$ 、 P_{\max} 分别为正交试验结果中 $t_{1/2}$ 的最小值、 P 的最大值。因素与水平见表2,正交试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A(药载比, m/m)	B(搅拌时间, min)	C(过筛目数)
1	1:3	10	40
2	1:7	20	80
3	1:9	30	100

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and results of orthogonal test

序号	A	B	C	D(空白)	$t_{1/2}$, min	P , %	Y
1	1	1	1	1	27.92	84.98	0.916 0
2	1	2	2	2	34.64	72.74	0.762 1
3	1	3	3	3	32.21	88.02	0.874 7
4	2	1	2	3	32.56	74.34	0.793 7
5	2	2	3	1	35.63	73.15	0.754 6
6	2	3	1	2	31.70	68.96	0.773 6
7	3	1	3	2	24.59	86.69	0.984 9
8	3	2	1	3	27.95	88.94	0.937 7
9	3	3	2	1	24.47	87.84	0.993 8
I	2.552 8	2.694 6	2.627 3	2.664 4			
II	2.321 9	2.454 4	2.549 6	2.520 6			
III	2.916 4	2.642 1	2.614 2	2.606 1			
R	0.594 5	0.240 2	0.077 7	0.143 8			

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.059 9	2	0.030 0	25.000 0	<0.05
B	0.010 6	2	0.005 3	4.416 6	>0.05
C	0.001 2	2	0.000 6	0.497 5	>0.05
D(误差)	0.003 5	2	0.001 8		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

由表3可知,各个因素对综合评分影响的主次顺序依次为:A>B>C。由表4可知,各因素对GSD制备工艺的影响顺

序依次为:A>B>C,其中因素C的离均差平方和小于D(误差)项,表明因素C对试验结果影响甚微,可认为因素C的离均差平方和主要是由试验误差引起的。为提高分析精度,故将C、D项合并作为误差项^[11]。方差分析结果表明,因素A有显著影响,因素B、C无显著影响,对于无显著影响的因素B、C自主选择其最优水平。故结合直观分析与方差分析结果,确定其最优组合为A₃B₁C₁,即GSD最优制备工艺为:药载比1:9,搅拌10 min,过40目筛。

2.6 验证试验

按照正交试验所得最优制备工艺同时制备3批样品进行验证试验。结果,3批样品的 $t_{1/2}$ 分别为23.32、23.10、23.28 min, P 分别为91.90%、89.63%、90.08%,均优于正交试验中的9次试验结果,说明正交试验所得制备工艺稳定可靠、可行性好。

3 讨论

固体分散技术是将药物通过一定的方法分散于某一种载体中,得到药物与载体的固体分散物。PEG4000以其熔点低、易于被胃肠道吸收等优点被视为最常用水溶性载体^[12]。在本试验中,GEN与PEG4000的比例越大,GSD的溶出度越高。因为载体所占比例越大,包裹GEN越完全,但过多的载体辅料会对用药剂量产生影响,故本试验选用1:9为载体使用上限。此外,GSD干燥后经研磨粉碎可破坏GEN高度分散于载体中时所形成的晶体或非晶体结构。通过试验数据分析,当过筛颗粒大于40目时,GSD溶出度下降,分析可能是颗粒过细破坏其原本已形成的结构,导致溶出度降低。综上所述,GSD制备工艺中的每一道工序均会影响成品质量,故对每一个影响因素进行筛选以确定最佳制备工艺是保证GSD质量的必要条件。

参考文献

- [1] 黄敬群,朱妙章,王四旺.染料木素抗炎、镇痛、降尿酸作用实验研究[J].西北药学杂志,2011,26(3):193.
- [2] 孙纪元,缪珊,李纪鹏,等.染料木素对雌激素缺乏诱发的大鼠骨质疏松症的作用研究[J].中国药理学杂志,2009,44(12):900.
- [3] Wang ZL, Sun JY, Wang DN, et al. Pharmacological studies of the large-scaled purified genistein from *Huaijiao* (*Sophora japonica*-Leguminosae) on anti-osteoporosis[J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(2): 718.
- [4] 戴支凯,黄姣娥,余雨梅.染料木素的体外抗肿瘤作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(12):3 060.
- [5] 王晖,周玉生,郑兴.染料木素防治前列腺癌的研究进展[J].中国药房,2013,24(3):279.
- [6] 彭游,钟婵娟,邓泽元,等.植物雌激素染料木素的体内转运过程研究进展[J].食品科技,2011,36(8):28.
- [7] 张惠平,向大雄,罗杰英,等.固体分散技术在药剂学中的研究进展[J].中国药理学杂志,2007,42(11):807.
- [8] 孟庆杰,潘五九,王伟明,等.染料木素阴道片质量控制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(23):132.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第二增补本[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:390.
- [10] 周珊珊.葛根素固体分散体及葛根缓释片的研制[D].成都:西南交通大学,2013.
- [11] 吴秉纯.医学动物实验基础及基本技术方法[M].哈尔滨:黑龙江人民出版社,2008:89.
- [12] 臧可昕.格列苯脲固体分散体及其复方胶囊剂的研制[D].天津:天津大学,2009.

(收稿日期:2015-05-05 修回日期:2015-07-12)

(编辑:邹丽娟)