

星点设计-效应面法优化柘树提取物片剂处方

吴海健¹ 王建新^{2△} 黄建明¹ 韩丽妹² 侯爱君^{1△}

(¹ 复旦大学药学院生药学教研室, ² 药剂学教研室 上海 200032)

【摘要】 目的 通过星点设计-效应面法优化柘树提取物片剂处方。方法 以微晶纤维素(microcrystalline cellulose, MCC)的用量、乳糖的用量和黏合剂聚维酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)的浓度为考察因素,以崩解时间和3个有效成分的溶出度为考察指标,分别用多元线性模型、二次多项式模型描述考察指标和3个考察因素之间的数学关系,绘制效应面和等高线图,确定较优处方并进行验证试验。结果 根据二次多项式模型,发现3个考察因素和4个考察指标之间存在可信的定量关系;优选的最佳处方为MCC的用量40 mg,乳糖的用量为70 mg,PVP浓度为4%,优化处方各设定的预测值和测定值非常接近。结论 采用星点设计-效应面法,得到了基于二次多项式模型的柘树提取物片剂处方优化模型,实现了该片剂的处方优化。

【关键词】 柘树提取物片剂; 星点设计; 效应面法

【中图分类号】 R 284.2 **【文献标识码】** A

Optimization of *Cudrania extractum* tablets formulation by central composite design-response surface methodology

WU Hai-jian¹, WANG Jian-xin^{2△}, HUANG Jian-ming¹, HAN Li-mei², HOU Ai-jun^{1△}

(¹ Department of Pharmacognosy, ² Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To optimize the formulation of *Cudrania extractum* tablets by the central composite design-response surface methodology. **Methods** In the formulation design using response surface methodology plus central composite design, independent variables included the amounts of microcrystalline cellulose (MCC), lactose, and the polyvinylpyrrolidone (PVP) content in 95% EtOH. Disintegration time of tablets and dissolution of three active components in the extractum at 45 minutes were taken as dependent variables. Multilinear and quadratic models were used to estimate the relationship between the dependent and the independent variables, and to delineate response surface method (RSM) and overlay contour plots in order to select the optimal formulations. Finally, predicted responses were verified. **Results** The quantitative relationships between three factors and four evaluation indexes were characterized. Optimal formulation was proposed to contain MCC 40 mg, lactose 70 mg, and 4% PVP. Dissolution test of the selected optimal formulation indicated that there existed high approximation between the observed and estimated values. **Conclusions** The multi-objective simultaneous optimization of *Cudrania extractum* tablets formulation could be achieved by the central composite design and response surface methodology.

【Key words】 *Cudrania extractum* tablets; central composite design; response surface methodology

柘树 *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. 为桑科(Moraceae)柘属植物,其根入药,具有祛风除湿、活血通经、健脾益胃等功效,临床多用于治疗风湿关

节痛、跌打损伤、脾虚泄泻及黄疸等症^[1,2],又可用于治疗胃癌等消化系统肿瘤^[3]。20世纪80年代初,上海中药二厂将柘树根的提取液制成糖浆剂,用

于治疗消化道恶性肿瘤,虽有一定疗效,但该制剂存在活性成分不明确,服用不方便,产品质量的稳定性差等缺点^[4]。我们前期的研究工作表明,柘树吡酮乙、macluraxanthone B 和柘树吡酮丁等黄酮类化合物是柘树的抗肿瘤有效成分,并研究了以黄酮类化合物作为有效部位的柘树提取物的提取纯化工工艺^[5,6]。体内外药效学研究表明该提取物具有显著的抗肿瘤活性,并在联合化疗药增效方面,效果显著,具有良好的开发前景。但柘树提取物的水溶性较差,可能影响其体内的溶出和吸收,使其体内生物利用度低。本文通过对柘树提取物片剂辅料和制备工艺的筛选和优化,制备崩解和溶出迅速的柘树提取物口服制剂,以促进片剂的崩解和有效成分的溶出与吸收,提高生物利用度,保证疗效。

星点设计(central composite design, CCD)是在析因设计(factorial design)的基础上,加上星点(star point)及中心点(central point)而形成的实验次数较少、并可进行线性或非线性拟合的实验设计方法,已经在制剂处方和工艺的优化中得到了一定范围的应用^[7-10]。本研究首次采用3因素5水平的星点设计法优化柘树提取物片剂的处方。

材料和方法

原料与试剂 柘树提取物(本课题组自制);柘树吡酮乙、macluraxanthone B 和柘树吡酮丁对照品均为自制,经 UV、IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 确定其结构,采用 HPLC-DAD-ELSD 法测得其纯度均大于 98%;微晶纤维素(MCC,德国 J. Rettenmeier & Sohne GmbH);乳糖(新西兰乳糖公司);预胶化淀粉(上海淀粉有限公司);聚维酮(PVP k30,德国 BASF 公司);硬脂酸镁(成都第十制药厂);交联聚维酮(PVPP,美国国际特品有限公司);十二烷基硫酸钠(国药集团化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯;江苏汉邦科技有限公司);乙腈(色谱纯;美国 Merck 公司);磷酸(分析纯;中国医药集团上海化学试剂公司);水为重蒸馏水。

仪器 ZDY-8 型单冲压片机(上海远东制药机械厂);CJY-300G 型片剂脆碎度仪和 PYC-A 型片剂硬度仪(上海黄海药检仪器厂);ZRS-4 智能溶出试验仪和 ZB-1C 型智能片剂崩解仪(天津大学无线电厂);Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国惠普公司,包括 G1322A 在线脱气、G1311A 四元泵、G1316A 柱温箱、G1315B DAD 紫外检测器、HP ChemStation 色谱工作站)。

软件 Statistica 统计软件(STATSOFT, Rel 6.0)。

柘树提取物片剂的制备 按处方量称取过 100 目筛的柘树提取物、MCC、乳糖、预胶化淀粉和崩解剂 PVPP,充分混合,加入相应处方中的黏合剂制软材,过 20 目筛制粒,于 40 °C 干燥 1 h,过 20 目筛整理后,加 0.5% 硬脂酸镁混匀压片。片重 300 mg,每片含提取物 100 mg。

片剂崩解时限的测定 按《中华人民共和国药典》2005 年版一部崩解时限测定法有关规定,取供试品 6 片,介质为 900 mL 水,温度为(37±0.5)°C。

片剂溶出度的测定 溶出度测定方法按《中华人民共和国药典》2005 年版一部溶出度测定法有关规定,转速为 50 r/min,温度为 37 °C,溶出介质为 0.5% 十二烷基硫酸钠水溶液 900 mL,实验开始后 45 min 取样 5 mL,溶出液经 0.8 μm 微孔滤膜滤过,滤液进样测定,计算 45 min 的溶出百分率。

柘树吡酮乙、macluraxanthone B 和柘树吡酮的 HPLC 测定 色谱柱 HyperClone BDS C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相甲醇-乙腈-0.2% 磷酸,梯度洗脱,程序如表 1 所示;流速 0.8 mL/min;检测波长 259 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL。理论塔板数按柘树吡酮乙计算应不低于 3 000。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Acetonitrile(%)	0.2% H ₃ PO ₄ (%)	Methanol (%)
0	30	40	30
30	42	28	30
35	48	15	37
50	48	15	37

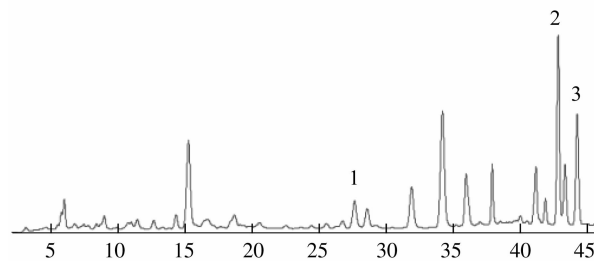


图 1 柘树提取物片剂样品的 HPLC 色谱

Fig 1 HPLC chromatograms of *Cudrania extractum* tablets

1: Cudraticusxanthone B; 2: Macluraxanthone B;
3: Cudraticusxanthone D

混合对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的柘树吡酮乙、macluraxanthone B 和柘树吡酮丁对照品,用甲醇溶解制成每 1 mL 含柘树吡酮乙 50.0 μg、macluraxanthone B 66.0 μg 和柘树吡酮丁 80.0 μg 的混合对照品溶液。

星点设计 根据单因素考察实验, MCC、预胶化淀粉、乳糖在辅料中的比例及黏合剂 PVP 的浓度

对片剂性质有较大影响。根据初步考察结果,将 MCC 用量(X_1)、乳糖用量(X_2)及 PVP 浓度(X_3)作为主要考察因素,其范围以每片计分别为: X_1 :17~68 mg; X_2 :34~102 mg; X_3 :0%~8%。

根据星点设计的原理,每因素设 5 水平,可用代码值 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α 来分别表示。对于 3 因素的星点设计 $\alpha = 1.732$ 。代码值之间与实际操作物理量之间为等比关系,见表 2。

表 2 考察因素各水平的代码值及实际操作物理量

Tab 2 Levels of independent variables in codes and physical form

Codes	- 1.732	- 1	0	1	1.732
X_1	17	27.8	42.5	57.2	68
X_2	34	48.4	68	57.6	102
X_3	0	1.69	4	6.31	8

结 果

标准曲线和线性范围 分别精密吸取混合对照

品溶液 0.1,0.5,1.0,2.0,4.0,5.0 mL 于 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,各进样 20 μ L 测定,以浓度(C)对峰面积(A)进行线性回归,结果见表 3。

表 3 标准曲线和线性范围

Tab 3 Standard curve and linearity range

Reference standard	Regression equation	r	Linearity range(μ g/mL)
Cudraticusxanthone B	$Y = 121.758 X - 0.857$	0.999 9	1.00 - 50.0
Macluraxanthone B	$Y = 99.690 X + 0.005$	0.999 9	1.32 - 66.0
Cudraticusxanthone D	$Y = 128.345 X + 29.302$	0.999 9	1.60 - 80.0

实验设计及实验结果 按表 4 中处方平行制备柘树提取物片剂,并对制备过程及片剂质量进行考察。结果表明 20 个处方制得的颗粒性状及流动性均较好,压制成片剂后均具有较好的成型性,片面光洁,片重差异、脆碎度、硬度等各项指标均符合规定。由于柘树提取物在水中难溶,为达到快速起效的目的,片剂的崩解和有效成分从片剂中的溶出应尽量迅速,因此把片剂的崩解和 3 种有效成分的溶出速度作为星点设计中重要的考察指标。

表 4 实验设计及实验结果

Tab 4 Experimentally determined values of different dependent variables

No.	X_1 (mg)	X_2 (mg)	X_3 (%)	Disintegration time (second)	Dissolution of cudraticus-xanthone B (%)	Dissolution of maclura-xanthone B (%)	Dissolution of cudraticus-xanthone D (%)
1	27.8	48.4	1.69	75	64.70	72.36	67.99
2	57.2	48.4	1.69	23	88.07	80.44	90.33
3	27.8	87.6	1.69	50	92.95	79.29	74.28
4	57.2	87.6	1.69	25	77.37	74.86	70.39
5	27.8	48.4	6.31	87	88.03	83.27	78.77
6	57.2	48.4	6.31	48	82.02	70.89	64.67
7	27.8	87.6	6.31	77	96.19	86.59	79.92
8	57.2	87.6	6.31	33	75.66	66.42	60.80
9	17	68	4	56	95.47	90.61	85.55
10	68	68	4	23	96.81	97.44	91.29
11	42.5	34	4	93	86.03	83.41	77.21
12	42.5	102	4	40	91.13	98.31	92.13
13	42.5	68	0	97	83.35	81.81	76.68
14	42.5	68	8	53	80.59	83.13	76.92
15	42.5	68	4	30	99.97	97.56	91.97
16	42.5	68	4	28	98.44	92.60	89.30
17	42.5	68	4	27	99.75	93.01	90.80
18	42.5	68	4	32	96.94	97.66	92.84
19	42.5	68	4	23	98.00	96.45	92.44
20	42.5	68	4	26	97.12	95.27	91.87

模型拟合 以 MCC 用量、乳糖用量和 PVP 浓度为自变量,崩解时间和 3 个化合物在 45 min 时的溶出度为因变量,进行多元线性回归和二次多项式回归,并以拟合优度(r)和置信度(p)作为模型判定标准。

数学模型如下:

多元线性模型: $Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3$

二次多项式模型: $Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_4 X_1 X_1 + B_5 X_2 X_2 + B_6 X_3 X_3 + B_7 X_1 X_2 + B_8 X_1 X_3 + B_9 X_2 X_3$

采用 Statistica 6.0 统计软件中的多元线性回归(Multiple Regression)及非线性回归(Nonlinear Estimation)进行。结果如下:

多元线性回归:4 个方程的复相关系数 r 依次

为 0.625 0、0.225 4、0.191 5、0.123 4, 拟合优度不佳, 因此该数学模型不合适, 应采用多元高次的数学

模型。

二次多项式数学模型进行拟合结果见表 5。

表 5 二次多项式拟合参数值及 r 值

Tab 5 Parameter and r value of each regression equation

Parameter	Disintegration time		Dissolution of cudraticusxanthone B		Dissolution of macluraxanthone B		Dissolution of cudraticusxanthone D	
	Estimate	p -level	Estimate	p -level	Estimate	p -level	Estimate	p -level
B_0	329.828 7	0.007 4	-94.694 3	0.011 5	-47.740 8	0.372 3	-67.456 8	0.179 7
B_1	-2.562 9	0.280 8	2.725 2	0.002 9	2.153 0	0.094 4	2.833 3	0.023 9
B_2	-4.922 5	0.019 9	2.801 7	0.000 5	1.862 7	0.071 2	1.982 1	0.040 8
B_3	-20.183 1	0.153 1	18.614 6	0.001 0	16.226 5	0.037 4	15.854 3	0.028 3
B_4	0.011 2	0.571 6	-0.008 5	0.182 9	-0.013 0	0.218 3	-0.013 5	0.165 3
B_5	0.029 6	0.020 1	-0.011 3	0.006 9	-0.010 0	0.101 0	-0.010 9	0.058 6
B_6	2.671 0	0.006 2	-1.231 8	0.000 4	-1.251 5	0.010 9	-1.277 3	0.005 9
B_7	0.009 5	0.645 4	-0.023 2	0.004 1	-0.008 8	0.418 2	-0.013 8	0.179 5
B_8	-0.022 1	0.899 6	-0.126 3	0.038 8	-0.133 3	0.162 9	-0.191 9	0.039 2
B_9	-0.005 5	0.966 4	-0.126 3	0.300 6	-0.006 9	0.918 7	0.028 9	0.644 2
r	0.883 0		0.923 6		0.787 3		0.841 5	

比较线性回归与二次多项式拟合的结果可知, 二次多项式比线性回归拟合表现出更好的相关性, 复相关系数显著提高。

优化与预测 以拟合的二项式方程为数学模型, 应用 Statistica 6.0 软件分别绘制各应变量曲面图。由于效应面图为三维图, 只能表达含两个自变

量的函数, 故本实验固定其中一个自变量(观察各组三维图及等高线图可知, MCC 用量对崩解时间和 3 个化合物溶出度的影响较乳糖用量和 PVP 浓度小), 综合 MCC 用量对 4 个因变量影响较小的区域, 设其值为 40 mg, 代入目标函数方程, 绘制效应面图, 见图 2。

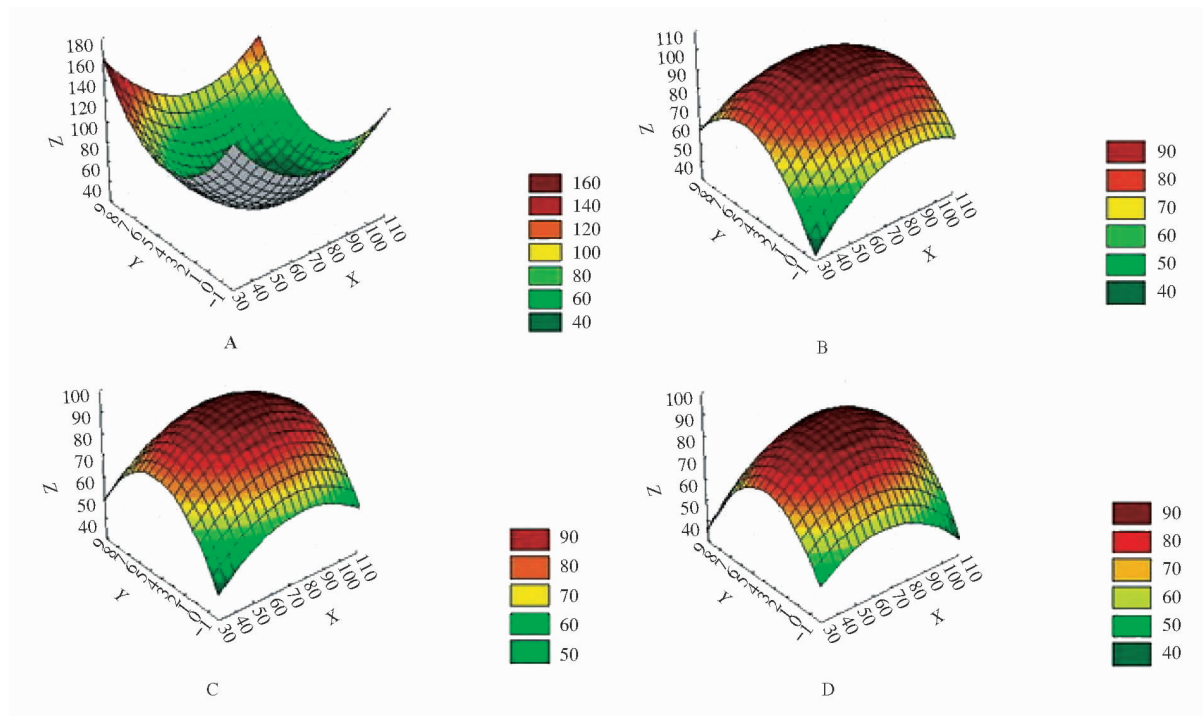


图 2 不同指标对乳糖用量(X_2)和 PVP 浓度(X_3)的效应面图

Fig 2 Different indexes as functions of amount of lactose (X_2) and PVP concentration (X_3)

A: Disintegration time; B: Dissolution of cudraticusxanthone B;

C: Dissolution of macluraxanthone B; D: Dissolution of cudraticusxanthone D

从效应面图上可知, 随着乳糖和 PVP 用量的增

大, 崩解时间先缩短后延长; 对柘树吡酮乙、maclu-

raxanthone B 和柘树吡酮丁溶出度的影响为随着乳糖和 PVP 用量的增大,各溶出度均为先增加后降低,可见 3 个因素之间存在交互作用。从图 1 中还可以看出每个效应面都具有各自的较优区域,将其叠加可进一步缩小较优区域的范围,故我们将图 2 中效应面对应的等高线图叠加,得到理想的最优区域,见图 3,结合制剂制备的实际情况,在重叠区域内得到片剂的最优处方为: $X_1 = 40 \text{ mg}$, $X_2 = 70 \text{ mg}$, $X_3 = 4\%$ 。

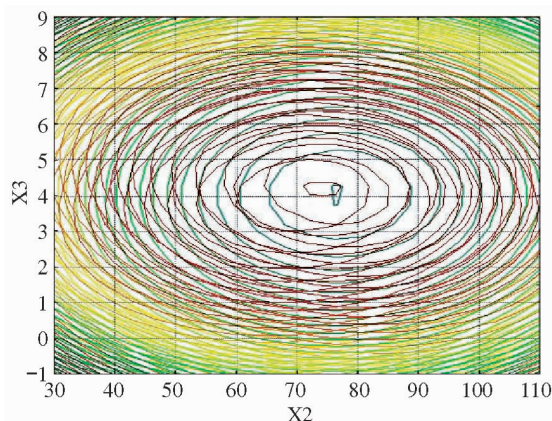


图 3 柘树提取物片剂处方优化模型的等高线叠加图
Fig 3 Overlay contour plots of the optimized formulation of *Cudrania extractum* tablets based on quadratic models

验证实验 根据最优处方制备 3 批片剂,测定其崩解时间和溶出度,结果表明预测值与实际值之间偏差较小(表 6),说明二次多项式数学模型进行等高线叠加所得到的优化区域符合设计目标,实验设计和数学模型具有可靠性与重现性。优化所得处方制备的片剂崩解时间约为 30 s,3 种有效成分 45 min 的溶出百分率均大于 90%,达到了实验设计的目的。

表 6 预测值与实验值的比较

Tab 6 Comparison of the observed and predicted values of dependent variables

Dependent variables	Predicted response	Observed response	Bias (%)
Disintegration time(s)	29.22	30.67	-4.9
Dissolution of cudraticusxanthone B (%)	98.86	102.6	-3.8
Dissolution of macluraxanthone B (%)	95.95	95.80	0.15
Dissolution of cudraticusxanthone D (%)	91.34	92.87	-1.7

讨 论

柘树根作为传统的药用植物,近年来又用于治疗胃癌等消化系统肿瘤,以总黄酮为有效部位的提

取物显示了良好的开发前景。但柘树中的黄酮类化合物在水中的溶解度较小,以总黄酮计仅约为 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。为保证溶出度测定时的漏槽状态,考察了含有不同表面活性剂或有机溶剂的溶出介质,最后选择 0.5% 的十二烷基硫酸钠水溶液作为溶出介质。

在进行溶出度测定时,曾考虑采用紫外-可见分光光度法测定总黄酮的溶出度作为指标,但在测定中我们发现,以总黄酮为指标,难以反映不同极性黄酮化合物的溶出情况。因此我们以柘树提取物中 3 个含量高且活性好的化合物作为测定溶出度的指标,采用 HPLC 法测定其在溶出介质中的含量。这 3 个化合物极性差别较大,可以比较全面、有效地反映黄酮类化合物从片剂中的溶出情况。从实验结果可以看出,不同组成比例的处方对 3 个化合物溶出速率的影响相似,3 个化合物 45 min 溶出量顺序为:柘树吡酮乙 > macluraxanthone B > 柘树吡酮丁,与它们的极性大小顺序一致。

在片剂的试制过程中,曾分别考察了糊精、淀粉、甘露醇等多种辅料,发现辅料的种类及配比对片剂的崩解和有效成分的溶出影响显著。综合考虑预实验结果及生产成本,我们选用 MCC、乳糖及预胶化淀粉作为片剂辅料进行处方的进一步优化。结果显示,通过三者的合理配比,不仅片剂的外观光滑,硬度高,崩解迅速,而且有效成分的溶出释放快,成本较低。

目前处方设计优化多采用采用正交设计、均匀设计等方法,由于其不宜采用线性和非线性方程拟合实验结果与影响因素之间的关系,因此很难得出较佳的处方和制备工艺。星点设计-效应面优化法既可以进行线性拟合,也可以进行非线性拟合。通常在最佳条件附近,指标与影响因素之间的关系为非线性,此时应选用二次多项式或更高层次的多项式进行拟合,以得到最佳的模型拟合度。本实验结果表明二次多项式模型拟合的可信度非常高且预测性好。

参 考 文 献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2000, 1731-1732.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999: 517-518.
- [3] 张民庆, 龚惠明. 抗肿瘤中药的临床应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998, 286-286.
- [4] 丁红华, 陈栋晖, 朱莉菲, 等. 柘木糖浆治疗胃癌疗效观察[J]. 中成药, 2001, 23(2): 151-152.

- [5] Zou YS, Hou AJ, Zhu GF, *et al.* Cytotoxic isoprenylated xanthenes from *Cudrania tricuspidata* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(8): 1 947-1 953.
- [6] Zou YS, Hou AJ, Zhu GF. Isoprenylated xanthenes and flavonoids from *Cudrania tricuspidata* [J]. *Chem Biodiv*, 2005, 2(1): 131-138.
- [7] Giannakou SA, Dallas PP, Rekkas DM, *et al.* In vitro evaluation of nimodipine permeation through human epidermis using response surface methodology [J]. *Int J Pharm*, 2002, 241(1): 27-34.
- [8] Kagkadis KA, Rekkas DM, Dallas PP, *et al.* A freeze-dried injection form of flurbiprofen; development and optimization using response surface methodology [J]. *Int J Pharm*, 1998, 161(1): 87-94.
- [9] 赵刚, 平其能, 栾杨, 等. 中心多点等距设计法优化雌二醇聚乳酸羟基乙酸微球的制备工艺 [J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(2): 122-126.
- [10] 吴伟, 阙俐, 陈健, 等. 星点设计-效应面优化苯甲酸利扎曲普坦片的处方 [J]. 复旦学报: 医学版, 2003, 30(4): 381-387.

(收稿日期: 2007-12-21; 编辑: 王蔚)

(上接第 362 页)

- [10] Mansour SR, Clarke DB, Wang YC, *et al.* Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(5): 1 632-1 636.
- [11] Unoki K, LaVail MM. Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994; 35(3): 907-915.
- [12] Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, *et al.* Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(3): 764-774.
- [13] Rudzinski M, Wong TP, Saragovi HU. Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension [J]. *J Neurobiol*, 2004, 58(3): 341-354.

(收稿日期: 2007-09-12; 编辑: 张秀峰)