

Box-Behnken 响应面法优化水溶性壳聚糖对黄莪凝胶水提液的除杂工艺

王冬东*,张辉靠,孙程,吕晓敏,胡荣[#](扬州大学医学院药学系,江苏扬州 225001)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3987-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.27

摘要 目的:优化水溶性壳聚糖对黄莪凝胶水提液除杂的工艺条件。方法:以透光率比、杂质去除率、柚皮苷保留率的综合评分为指标,采用 Box-Behnken 响应面法优化除杂工艺中水溶性壳聚糖用量、振荡时间和温度,并进行验证。结果:比重 ≥ 1.3 的中药水提液与 0.01 g/mL 水溶性壳聚糖溶液用量的体积比为 2.2,70 °C 下振荡 100 min 除杂效果最佳;验证试验中 3 批样品的平均透光率比为 87.3%、杂质去除率为 41.50%、柚皮苷保留率为 131.38%,综合评分的实测值分别为 97.35%、98.92%、98.04%,与预测值(98.27%)的相对误差分别为 -0.87%、0.73%、-0.16%。结论:该方法可有效优化水溶性壳聚糖对黄莪凝胶水提液的除杂工艺参数。

关键词 响应面法;水溶性壳聚糖;中药水提液;柚皮苷

Optimization of Clarification Technology of Water-soluble Chitosan on Huang' e Gel Water Extract by Box-Behnken Response Surface Method

WANG Dongdong, ZHANG Huikao, SUN Cheng, LYU Xiaomin, HU Rong (Dept. of Pharmacy, Medical College of Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225001, China)

累积释放度评价指标上,以 2、6、12 h 时布洛芬缓释滴丸的累积释放度偏差为指标,既考察了滴丸的释药过程,又避免了片面性,使得筛选出的布洛芬缓释滴丸最佳制备工艺客观、合理和可靠。

当制备滴丸过程中,滴制初期和后期时由于滴灌中药液太多或太少,使得滴速不均匀,而中期滴速均匀且温度相对稳定,滴丸质量好,圆整度、丸重差异符合规定。故为了保证滴丸的良好成型性,初始的滴丸和后期的滴丸原则上不采用,而是以中期的缓释滴丸进行评价。

本研究制备的缓释滴丸辅料价廉易得,具有良好的缓释效果,制备工艺简单、稳定、可行。选取接近消化道体液的环境作为释放介质,通过考察不同介质条件下药物的释放情况,根据释放曲线可以直观反映药物体外释放的速度和程度;借助适宜释放曲线相似性评价方法,可提高体内生物等效性试验的成功率^[12-13]。相似性评价结果表明,自制缓释滴丸与市售布洛芬缓释胶囊体外释药行为相似,有望得到与市售缓释胶囊芬必得相似的疗效,为该新滴丸制剂的临床研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 李萍,蔡悄悄,蒋涛.布洛芬缓释制剂研究概况[J].海峡药学,2014,26(10):17-18.
- [2] 祝侠丽,贾永艳,黄海英,等.正交设计法优化布洛芬缓释

* 硕士研究生。研究方向:药剂学。电话:0514-87978840。E-mail:1606974450@qq.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:药剂学。电话:0514-87978840。E-mail:398563432@qq.com

骨架片的处方工艺[J].中国药房,2014,25(9):830-832.

- [3] 李海刚,陈香,郭绍芬.右旋布洛芬缓释微丸的制备及其释药行为分析[J].中国药房,2016,27(1):95-97.
- [4] 辛嫣琼,王金,潘辉,等.缓释滴丸的研究进展[J].黑龙江医药,2013,26(3):428-429.
- [5] 胡瀚文,张学顺.缓释滴丸研究概况[J].药学研究,2013,16(5):404-406.
- [6] 周长征.缓释滴丸的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):250-252.
- [7] 胡昌勤,潘瑞雪.溶出度试验评价/预测固体口服制剂生物等效性的研究进展[J].中国新药杂志,2014,23(1):44-49.
- [8] 孟戎茜,王曼,郭聪.布洛芬滴丸的成型工艺及体外溶出度研究[J].中国药房,2016,27(25):3558-3560.
- [9] 王俊俊,黄挺,董晓蕾,等.马来酸曲美布汀缓释滴丸的制备工艺研究[J].中国药学杂志,2014,49(23):2096-2099.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:121-122.
- [11] 王昕,唐素芳,高立勤.溶出曲线相似性的两种评价方法[J].天津药学,2011,23(1):53-56.
- [12] 陈艳君,胡容峰,朱双双,等. f_2 法与 AV 值法评价国内不同厂家格列齐特缓释片与原研制剂的体外释放曲线的相似性[J].中国药房,2016,27(9):1230-1233.
- [13] 朱凤昌,王爱国,韩凤,等.口服固体仿制品生物等效性研究国际指导原则要点调研[J].中国药学杂志,2016,51(20):1807-1813.

(收稿日期:2016-12-26 修回日期:2017-02-16)

(编辑:邹丽娟)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the technology conditions of water-soluble chitosan on Huang'e gel water extract solution. METHODS: Using the comprehensive scores of transmittance ratio, impurity removal rate, naringin retention rate as indexes, Box-Behnken response surface method was used to optimize the amount of water-soluble chitosan, shocking time and temperature in clarifying technology, and verification test was conducted. RESULTS: The clarification effect was the best when the volume ratio of TCM extract solution with proportion ≥ 1.3 to amount of 0.01 g/mL water-soluble chitosan was 2.2, shocking for 100 min at 70 °C. In the verification test, the average transmittance ratio was 87.3%, impurity removal rate was 41.5%, and naringin retention rate was 131.38%. The measured values of comprehensive scores were 97.35%, 98.92% and 98.04%, showing relative error of -0.87%, 0.73% and -0.16% with the predicted values (98.27%), respectively. CONCLUSIONS: The method can effectively optimize the clarification technology parameters of water-soluble chitosan on Huang'e gel water extract solution.

KEYWORDS Response surface method; Water-soluble chitosan; TCM extract solution; Naringin

黄莪凝胶是根据《杂病源流犀浊》书中的“接骨紫金丹”和《中医伤科学》中的“损伤风湿膏”,结合中医药活血散瘀、舒筋接骨的用药原理,由黄瓜籽、莪术、骨碎补、细辛、桑枝、栀子、乳香、没药组成。黄瓜籽有补钙、壮骨、调节经络、促进人体细胞再生等作用;莪术行气破血、消积止痛、抗病毒;细辛镇静镇痛、抗菌消炎;栀子可止血消肿;桑枝有活血化瘀的作用;骨碎补活血止血;乳香、没药均具有活血止痛、消肿生肌的作用。

提取药材中有效成分是制备黄莪凝胶的关键工艺,因中药水提液都含有较多的蛋白、鞣酸和果胶等杂质,持续的陈化对制剂质量影响很大。中药水提液的除杂方法中,常用的醇沉法^[1]使有效成分损失大、成本高且不环保;对明胶、果胶酶、硅藻土等的除杂效果褒贬不一。而壳聚糖用于除杂时需加酸溶解,而低 pH 对不同中药提取液影响差异较大,故多用于中药口服制剂的初步研究。水溶性壳聚糖可直接溶于水,对中药提取液影响小,但用于中药水提液除杂目前国内外未见报道;水溶性壳聚糖有效澄清黄莪凝胶水提液并兼作外用凝胶剂基质的应用也未见报道。因此,本试验以透光率比、杂质去除率、柚皮苷保留率为指标,考察水溶性壳聚糖用量、反应时间和温度对除杂效果的影响;在单因素考察基础上进行响应面^[2-4]设计,确定水溶性壳聚糖对黄莪凝胶水提液除杂的最佳工艺条件。

1 材料

1.1 仪器

UV-9200 紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);TDL-5 离心机(昆山飞鸽离心机有限公司);e2695 高效液相色谱(HPLC)仪、包含 2998 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司)。

1.2 药材与试剂

水溶性壳聚糖(济南海得贝海洋生物工程有限公司,批号:150310,纯度:95%);黄瓜籽(亳州市中药饮片厂,批号:150614);莪术、细辛、栀子、骨碎补、桑枝、乳香、没药(安徽普仁中药饮片有限公司,批号:150414、140411、140722、150121、140922、141014、150405),经扬州大学附属医院丁圣清副主任中药师鉴定为真品;柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110722-201111,纯度:98%);甲醇为分析纯,水为娃哈

哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 黄莪凝胶水提液的制备

按处方量称取黄瓜籽、莪术、骨碎补、细辛、桑枝、栀子、乳香、没药,加 5 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h,合并煎煮液,过滤,浓缩至比重 ≥ 1.3 ,即得精滤液。

2.2 水溶性壳聚糖溶液的制备

精密称取水溶性壳聚糖适量,加蒸馏水浸透,磁力缓慢搅匀,稀释至质量浓度为 0.01 g/mL,备用。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品 0.003 1 g,加甲醇 50 mL,超声 10 min,制成质量浓度为 62 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.3.2 阴性对照溶液的制备 按处方量称取除骨碎补外其他药材,按“2.1”项下方法处理后,取精滤液 10 mL 置于坩埚中,于红外线快速干燥器中红外灯照射除水后,研磨成粉末,加甲醇超声 10 min,备用。

2.3.3 对照药材溶液的制备 称取骨碎补药材 5 g,加甲醇超声提取 10 min,滤除药渣备用。

2.3.4 供试品溶液的制备 精密吸取黄莪凝胶水提液 10 mL 置于坩埚中,于红外线快速干燥器中红外灯照射除水后,研磨成粉末,加甲醇超声 10 min,备用。

2.4 黄莪凝胶水提液中柚皮苷鉴别

取“2.3.1”~“2.3.4”项下溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤,分别定量点于同一硅胶 G254 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-88%甲酸-水(1:12:2.5:3, V/V/V/V)为展开剂,展开后晾干,分别在 254、365 nm 波长下观察。结果,供试品、对照品和对照药材在同一位置上显示柚皮苷斑点,提示水提液中保留了药液有效成分,薄层色谱图见图 1。

2.5 黄莪凝胶水提液柚皮苷含量的测定

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-3%醋酸(40:60, V/V);流速:0.8 mL/min;检测波长:283 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μL 。在此色谱条件下,取“2.3.1”“2.3.2”“2.3.4”项下溶液进样测定,结果表明其余色谱峰不干扰柚皮苷的测定,色谱图见图 2。

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取柚皮苷对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL,置于 10 mL 量瓶

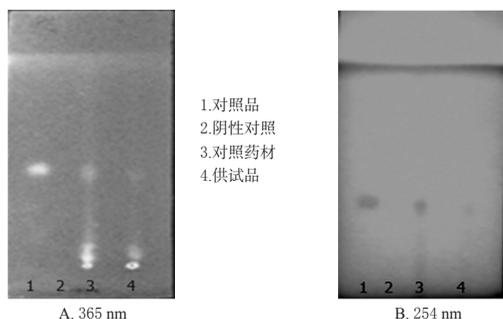


图1 薄层色谱图
Fig 1 TLC chromatograms

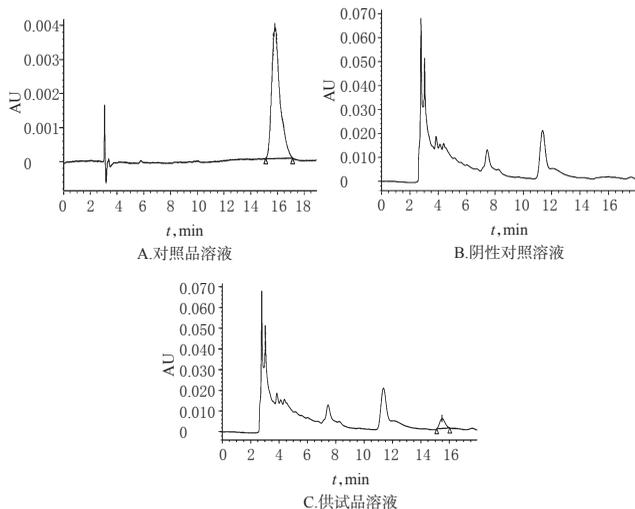


图2 高效液相色谱图
Fig 2 HPLC chromatograms

中,用甲醇稀释,定容,按“2.5.1”项下色谱条件进样测定。以峰面积为纵坐标(y)、柚皮苷质量浓度为横坐标(x)进行线性回归,得回归方程 $y=8\ 590.3x+1\ 609$ ($r=0.999\ 5$),表明柚皮苷在质量浓度为 $1.55\sim 18.6\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.5.3 精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验 按照相关要求进行操作,考察本方法的精密度、稳定性、重复性和加样回收率。结果,精密度试验的 $\text{RSD}=0.93\%$ ($n=5$),24 h稳定性试验的 $\text{RSD}=1.30\%$ ($n=6$),重复性试验的 $\text{RSD}=1.76\%$ ($n=5$),平均加样回收率为 98.92% ($\text{RSD}=1.47\%$, $n=9$),均符合相关规定。

2.6 水溶性壳聚糖除杂评价指标的选择

2.6.1 透光率比 以蒸馏水为空白,在 $650\ \text{nm}$ 波长下测定除杂前后黄莪凝胶水提液透光率比。透光率比($T, \%$)=除杂前透光率/除杂后透光率 $\times 100\%$ 。

2.6.2 杂质去除率 精密量取除杂前后黄莪凝胶水提液各 $10\ \text{mL}$,置于干燥至恒质量的蒸发皿中, $105\ ^\circ\text{C}$ 恒温 $2\ \text{h}$,冷却 $1\ \text{h}$ 后精密称定,计算杂质去除率。杂质去除率($Z, \%$)=(除杂前黄莪凝胶水提液蒸发后精密称定的质量-除杂后黄莪凝胶水提液蒸发后精密称定的质量)/除杂前黄莪凝胶水提液蒸发后精密称定的质量 $\times 100\%$ 。

2.6.3 柚皮苷保留率 HPLC法测定除杂前后黄莪凝胶水提液中柚皮苷含量,计算保留率。柚皮苷保留率

($U, \%$)=除杂后柚皮苷质量/除杂前柚皮苷质量 $\times 100\%$ 。

2.6.4 综合评分(OD) 权重系数的设定^[14-15]: T 为 0.1 , Z 为 0.3 , U 为 0.6 ; $\text{OD} = T_i/T_{\text{max}} \times 0.1 + Z_i/Z_{\text{max}} \times 0.3 + U_i/U_{\text{max}} \times 0.6 \times 100\%$ (i 为 $1\sim 17$ 组各项数值, max 为各项的最大值)。

2.7 除杂工艺单因素考察

2.7.1 水溶性壳聚糖的用量对除杂效果的影响 取比重为 1.3 的黄莪凝胶水提液 $25\ \text{mL}$,各 5 份,加 $0.01\ \text{g}/\text{mL}$ 水溶性壳聚糖溶液适量,使中药水提液与 1% 水溶性壳聚糖溶液用量的体积比(S/K)分别为 1.6 、 1.8 、 2.0 、 2.2 、 2.4 , $60\ ^\circ\text{C}$ 下恒温振荡 $1\ \text{h}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱静置 $24\ \text{h}$,过滤。取滤液分别测定 T 、 Z 、 U ,并计算 OD 值。结果显示,随着 S/K 的增大, OD 值先增大, S/K 为 2.2 时达到最大,随后呈下降趋势,详见表1。因此选择 S/K $1.8\sim 2.2$ 进行进一步优化。

表1 水溶性壳聚糖用量对除杂效果的影响

Tab 1 Effects of the amount of water-soluble chitosan on clarification effect

| S/K | T, % | Z, % | U, % | OD, % |
|-----|------|-------|--------|-------|
| 1.6 | 80.5 | 40.45 | 46.82 | 49.1 |
| 1.8 | 87.3 | 52.47 | 108.09 | 82.8 |
| 2.0 | 88.9 | 43.80 | 122.54 | 83.0 |
| 2.2 | 84.3 | 57.16 | 142.20 | 98.5 |
| 2.4 | 86.3 | 41.56 | 145.66 | 91.7 |

2.7.2 振荡时间对除杂效果的影响 取比重为 1.3 的黄莪凝胶水提液 $25\ \text{mL}$,共 5 份,固定 S/K 为 2.0 , $60\ ^\circ\text{C}$ 下分别恒温振荡 20 、 40 、 60 、 80 、 $100\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱静置 $24\ \text{h}$,过滤。取滤液分别测定 T 、 Z 、 U ,并计算 OD 值。结果显示,随着振荡时间的延长, OD 值先变小,再增大,振荡时间为 $100\ \text{min}$ 时达到最大,随后呈下降趋势,详见表2。因此选择振荡时间为 $60\sim 100\ \text{min}$ 进行进一步优化。

表2 振荡时间对除杂效果的影响

Tab 2 Effects of shocking time on clarification effect

| 振荡时间, min | T, % | Z, % | U, % | OD, % |
|-----------|------|-------|--------|-------|
| 40 | 86.7 | 52.69 | 139.31 | 90.5 |
| 60 | 90.2 | 44.70 | 104.05 | 73.8 |
| 80 | 91.0 | 37.09 | 136.42 | 81.9 |
| 100 | 91.0 | 37.89 | 159.54 | 90.9 |
| 120 | 91.6 | 54.02 | 123.12 | 86.0 |

2.7.3 温度对除杂效果的影响 取比重为 1.3 的黄莪凝胶水提液 $25\ \text{mL}$,共 5 份,固定 S/K 为 2.0 ,分别在 40 、 50 、 60 、 70 、 $80\ ^\circ\text{C}$ 条件下振荡 $60\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱静置 $24\ \text{h}$,过滤。取滤液分别测定 T 、 Z 、 U ,并计算 OD 值。结果显示,随着温度的增加, OD 值先变小,再增大,温度 $70\ ^\circ\text{C}$ 时达到最大,随后呈下降趋势,详见表3。因此择振荡时间为 $50\sim 70\ ^\circ\text{C}$ 进行进一步优化。

2.8 响应面法优选除杂工艺条件

2.8.1 Box-Behnken设计 采用Box-Behnken响应面法,以 T 、 Z 、 U 、 OD 为评价指标,温度(X_1)、振荡时间(X_2)、 S/K (X_3)为影响因素,进行试验设计。Box-Behnken设计因素与水平见表4;Box-Behnken设计安排与结果见表5。

表3 温度对除杂效果的影响

Tab 3 Effects of temperature on clarification effect

| 温度, °C | T, % | Z, % | U, % | OD, % |
|--------|------|-------|--------|-------|
| 40 | 86.7 | 38.64 | 135.84 | 89.3 |
| 50 | 91.0 | 34.43 | 128.32 | 84.8 |
| 60 | 91.6 | 38.48 | 130.06 | 86.8 |
| 70 | 88.5 | 57.05 | 119.08 | 92.5 |
| 80 | 93.1 | 38.70 | 127.75 | 86.0 |

表4 Box-Behnken 设计因素与水平

Tab 4 Box-Behnken design factors and levels

| 因素 | 水平 | | |
|------------------|-----|-----|-----|
| | -1 | 0 | 1 |
| 温度(X_1), °C | 50 | 60 | 70 |
| 时间(X_2), min | 60 | 80 | 100 |
| S/K(X_3) | 1.8 | 2.0 | 2.2 |

表5 Box-Behnken 设计安排与结果

Tab 5 Box-Behnken design arrangement and results

| 试验号 | X_1 , °C | X_2 , min | X_3 | T, % | Z, % | U, % | 实测OD, % |
|-----|------------|-------------|-------|------|-------|--------|---------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 88.9 | 39.21 | 110.02 | 77.74 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 86.5 | 50.52 | 106.38 | 81.31 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 89.4 | 35.07 | 120.21 | 80.32 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 87.5 | 51.66 | 119.49 | 89.35 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 90.8 | 42.78 | 107.50 | 79.54 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 88.3 | 48.84 | 106.81 | 82.48 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 88.7 | 39.25 | 125.98 | 85.12 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 87.4 | 46.25 | 136.00 | 93.21 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 91.5 | 47.10 | 98.52 | 78.32 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 92.4 | 52.35 | 109.87 | 86.21 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 89.5 | 41.88 | 126.51 | 86.95 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 88.6 | 43.45 | 142.16 | 94.38 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 93.2 | 40.54 | 116.12 | 82.13 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 93.4 | 40.37 | 120.05 | 83.72 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 92.8 | 41.30 | 115.79 | 82.45 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 93.7 | 40.94 | 118.94 | 83.68 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 93.9 | 40.77 | 118.82 | 83.45 |

2.8.2 方差分析及回归方程 用Design Expert 7.0.0软件进行多元回归拟合,得到以响应值(y)为目标函数的二次多项回归方程 $y=83.09+2.95X_1+3.24X_2+4.41X_3+1.36X_1X_2+1.29X_1X_3-0.12X_2X_3-1.14X_1^2+0.24X_2^2+3.14X_3^2$ ($R^2=0.9660$)。对模型进行方差分析和显著性检验,结果见表6。

由表6可知,该模型F值为51.49($P<0.0001$),说明模型具有统计学意义;模型的确定系数 R^2 为0.9660、变异系数为1.03%,提示模型拟合度较好,可用其进行初步分析和预测。回归方程的失拟项F值为1.87, $P=0.2750>0.05$,表明失拟项不显著,无失拟因素存在,说明方程拟合度良好,可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 ($P<0.0001$),交互项 X_1X_2 ($P=0.0165$)、 X_1X_3 ($P=0.0212$),二次项 X_1^2 ($P=0.0310$)、 X_3^2 ($P=0.0001$)对响应值作用显著,且 X_1X_2 、 X_1X_3 对响应值有较强的交互作用。

2.8.3 响应面图分析 采用Design Expert 7.0.0软件绘制等高线图和响应面图,结果见图3。

由图3可知, X_1X_2 和 X_1X_3 交互对结果的影响较大,剩

表6 方差分析结果

Tab 6 Analysis of variance results

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P |
|----------|--------|-----|--------|--------|---------|
| 模型 | 351.21 | 9 | 39.02 | 51.49 | <0.0001 |
| X_1 | 69.80 | 1 | 69.80 | 92.10 | <0.0001 |
| X_2 | 84.11 | 1 | 84.11 | 110.98 | <0.0001 |
| X_3 | 137.03 | 1 | 137.03 | 180.81 | <0.0001 |
| X_1X_2 | 7.45 | 1 | 7.45 | 9.83 | 0.0165 |
| X_1X_3 | 6.63 | 1 | 6.63 | 8.75 | 0.0212 |
| X_2X_3 | 0.053 | 1 | 0.053 | 0.070 | 0.7992 |
| X_1^2 | 5.49 | 1 | 5.49 | 7.24 | 0.0310 |
| X_2^2 | 0.23 | 1 | 0.23 | 0.31 | 0.5957 |
| X_3^2 | 41.60 | 1 | 41.60 | 54.89 | 0.0001 |
| 残差 | 5.31 | 7 | 0.76 | | |
| 失拟项 | 3.10 | 3 | 1.03 | 1.87 | 0.2750 |
| 纯误差 | 2.21 | 4 | 0.55 | | |
| 合计 | 356.53 | 16 | | | |

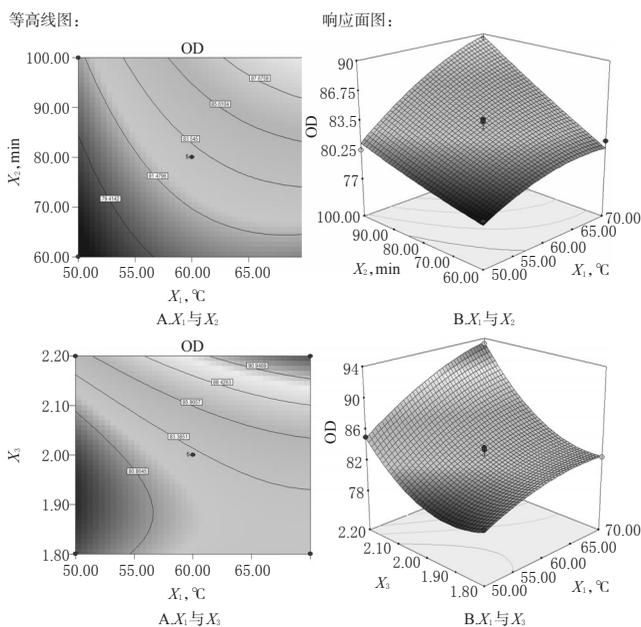


图3 X_1 、 X_2 、 X_3 对OD的等高线图和响应面图

Fig 3 Contour plots and response surface of X_1 , X_2 , X_3 to OD

余指标间影响不显著。按此结果并结合模拟方程进行优化,得到最佳除杂工艺为S/K 2.2、70 °C振荡100 min; OD预测值为98.2%。

2.8.4 验证试验 按处方量称取药材3份,按上述最优条件进行除杂,分别测定各指标及OD。结果,3份样品T、Z、U分别为87.3%、41.50%、131.38%, OD实测值分别为97.35%、98.92%、98.04%,与预测值的相对误差分别为-0.87%、0.73%、-0.16%。验证试验结果详见表7。

表7 验证试验结果

Tab 7 Results of verification test

| 试验号 | T, % | Z, % | U, % | 预测OD, % | 实测OD, % | 相对误差, % |
|-----|------|-------|--------|---------|---------|---------|
| 1 | 87.6 | 41.56 | 130.24 | | 97.35 | -0.87 |
| 2 | 86.9 | 42.86 | 131.35 | 98.27 | 98.92 | 0.73 |
| 3 | 87.4 | 40.09 | 132.54 | | 98.04 | -0.16 |

3 讨论

3.1 选择柚皮苷含量作为水提液除杂效率考察指标的依据

2015年版《中国药典》(一部)未收录黄瓜籽,《中华本草》中记载其具有续筋接骨、祛风、消痰的功效;其有效成分主要是挥发油,也含有黄酮类化合物^[5-7]。莪术、细辛、乳香、没药有效成分主要是挥发油,《中国药典》对这几味药材的质控指标都是挥发油的含量。《中国药典》对骨碎补、栀子和桑枝的质控指标分别是柚皮苷、栀子苷和乙醇浸膏,桑枝的有效成分主要是黄酮类化合物^[8-11]。以《中国药典》和《中华本草》为依据,确定由上述药材组方制备的黄芪凝胶含量质控指标有两项,一是总挥发油,二是以柚皮苷计的黄酮类化合物。

水提液除杂主要考察黄芪凝胶质控指标成分柚皮苷的含量变化情况。本文“2.1”项为黄芪凝胶水提液的制备,水煎煮在多功能提取罐中进行,挥发油蒸发冷凝在接收器中,水提液由提取罐底部放出进行除杂处理。主要由黄瓜籽、莪术、细辛、乳香、没药贡献的挥发油部分不涉及水溶性壳聚糖除杂处理,故本文未涉及。

3.2 柚皮苷保留率超过了100%的解释

中草药水提液都含有较多的蛋白、鞣酸和果胶、黏液质等亲水性杂质,其分子表面形成很厚的水化膜,水化膜也包裹了柚皮苷等药效成分,因这些高分子杂质水化膜的高黏度和高渗透压使被包裹的柚皮苷等有效成分不能释放出来,即除杂前检测到的是未被包裹的柚皮苷。

水溶性壳聚糖也是高分子化合物,其沉淀蛋白质、鞣酸和果胶、黏液质等高分子杂质的主要机制包括结构絮凝和电性中和。在较高温度(70℃)下,高分子杂质水化膜因黏度和渗透压大幅度降低而变薄,温度高使水分子热运动加剧也使水化膜变薄,电性中和也使水化膜变薄,加上100 min的70℃恒温振荡或搅拌,使舒展的高分子杂质分子链卷曲缠绕成团,挤压变薄的水化膜使其破裂,失去水化膜的高分子杂质水溶液稳定性降低而沉淀下来;也有多个线团状高分子杂质聚集搭在壳聚糖分子链上使比重进一步增加,使该结构絮凝聚沉下来。高分子杂质水化膜破坏的同时,被包裹的柚皮苷等有效成分完全释放出来,能通过HPLC含量测定时样品溶液经0.45 μm过滤的微孔滤膜而被检测到,即除杂后未被包裹的柚皮苷和被包裹除杂释放出来的柚皮苷可同时被检测到,因此其保留率可超过100%。

3.3 应用Box-Behnken设计的优点和水溶性壳聚糖除杂的优势

本研究开展Box-Behnken^[12-13]优化除杂工艺试验,在单因素考察基础上,连续对17组试验的各个水平进行分析,在整个区域得到回归方程,从而得到响应值的最优组合,试验精确度高。响应面法在设计时,试验点必须包括试验的最佳条件,否则不能得到很好的优化结果。

本试验首次采用水溶性壳聚糖作为澄清剂,其对蛋蛋白质、鞣酸、色素、胶质等具有较强的絮凝作用,克服了

以往使用壳聚糖加酸^[14-15]溶解致低pH对有效成分带来的不良影响,对以柚皮苷为代表的黄酮类成分以及其他有效成分有较高的保留率。水溶性壳聚糖还可兼作外用凝胶剂基质,利于药效的发挥,可辅助创面愈合。

此外,笔者在试验中发现,水提液除杂后,于4℃冰箱冷藏静置后过滤的澄清液柚皮苷保留率比室温静置后过滤的澄清液更高,故建议除杂后水提液于低温放置,使杂质沉淀更完全;另外薄层色谱鉴别时365 nm下的荧光斑点较254 nm下的暗斑更容易观察,建议应根据实际情况改变经典鉴别方法条件。

综上所述,Box-Behnken响应面法可有效优化水溶性壳聚糖澄清黄芪凝胶水提液工艺参数。

参考文献

- [1] 楚笑辉,唐路梅,夏新华.壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺纯化乙肝宁复方水提液的对比[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):1-4.
- [2] Wang Y, Zhou J, Huang K, et al. Research on application of chitosan clarification of blackberry dry-redwine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology, 2014, 14(11): 136-141.
- [3] Cui TT, Wang C, Shan CS, et al. Optimization of the extraction technology of chlorogenic acid in honeysuckle response surface method[J]. Oalib Journal, 2014, 1(6): 1-9.
- [4] 陈敬,温庆果,刘韶,等.正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究[J].中草药,2012, 43(11): 2183-2188.
- [5] 孙志忠,李凤芹,郝文辉,等.黑龙江黄瓜籽挥发油化学成分研究[J].黑龙江大学自然科学学报,1994(4): 98-102.
- [6] 田桂丽,苗晗,张圣平,等.黄瓜籽化学成分及其功效[J].中国蔬菜,2014,1(8): 7-11.
- [7] 吴晓毅.黄瓜子化学成分和瓜蒌含水量、酸值测定研究[D].北京:中国中医科学院,2012.
- [8] 陈倩,孙登阳,邓霖芳,等. HPLC法同时测定桑枝中桑皮苷A和桑皮黄素的含量[J].中国药房,2015,26(3): 364-366.
- [9] 王秀珍,石贵荣.桑枝化学成分黄酮的药理作用及其应用研究进展[J].中国社区医师:医学专业,2012, 14(31): 25.
- [10] 陈亚洁,张作法,黄世荣,等.桑枝黄酮类化合物含量的测定方法[J].蚕桑通报,2015, 46(3): 18-21.
- [11] 李平平.桑枝药用综合研究进展[J].云南农业科技,2013(1): 28-30.
- [12] 令博,王捷,吴洪斌,等.葡萄皮渣多酚超声波辅助提取工艺响应面法优化及抗氧化活性研究[J].食品科学,2011, 32(18): 24-29.
- [13] 徐涓,张弘,孙彦琳,等.响应面法优化壳聚糖固定果胶酶对玛咖汁澄清的效果[J].食品科学,2013, 34(16): 33-37.
- [14] 沈涛,李季文,梁海宁,等.多指标优选益气固本颗粒澄清工艺[J].中国药房,2016, 27(1): 76-79.
- [15] 盛华刚.壳聚糖做澄清剂对黄芩水提液的纯化工艺研究[J].食品与药品,2013, 15(4): 229-231.

(收稿日期:2017-01-23 修回日期:2017-08-20)

(编辑:刘明伟)