

响应面法优化茯苓苦瓜胶囊粗多糖和总皂苷的综合提取工艺

廖红丹*(湖北浠水县人民医院药械科,湖北黄冈 438200)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0092-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.30

摘要 目的:优化茯苓苦瓜胶囊中粗多糖和总皂苷的综合提取工艺。方法:依据单因素试验的结果,分别以料液比、提取时间、提取次数为响应因素,以粗多糖和总皂苷得率为响应值,采用响应面法中的Box-Behnken设计优化茯苓苦瓜胶囊中粗多糖和总皂苷的综合提取工艺并进行验证。结果:最优综合提取工艺为料液比1:12,提取1.4 h,提取2次。在此工艺下,验证试验中实测粗多糖得率为14.44%、总皂苷得率为1.33%(RSD分别为0.14%、0.75%, $n=3$),与预测值14.69%、1.36%接近,偏差分别为1.70%、2.21%。结论:实测值与预测值接近,表明采用响应面法优化后得到的综合提取工艺参数可用于茯苓苦瓜胶囊中粗多糖和总皂苷的提取。

关键词 茯苓苦瓜胶囊;粗多糖;总皂苷;响应面法;提取工艺

Optimization of Comprehensive Extraction Process of Crude Polysaccharides and Total Saponins from Fuling Kugua Capsule by Response Surface Methodology

LIAO Hongdan(Xishui County People's Hospital of Hubei Province, Hubei Huanggang 438200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the comprehensive extraction technology of crude polysaccharide and total saponins from Fuling kugua capsule. METHODS: Based on single factor test, using liquid ratio, extraction time and extraction times as response factors, the parameters of extraction technology of crude polysaccharides and total saponins from Fuling kugua capsule were optimized by using Box-Behnken design of response-surface method. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as liquid ratio of 1:12, extraction time for 1.4 h, extraction times for 2 times. Under this technology, the yield of crude polysaccharide was 14.44% (RSD=0.14%, $n=3$), and that of total saponins was 1.33% (RSD=0.75%, $n=3$). They were close to predicted value 14.69% and 1.36%, and the deviation were 1.70% and 2.21%. CONCLUSIONS: Measured value is close to predicted value, which indicates comprehensive extraction parameters optimized by response-surface methodology can be used for the extraction of crude polysaccharide and total saponins from Fuling kugua capsule.

KEYWORDS Fuling kugua capsule; Crude polysaccharide; Total saponins; Response surface methodology; Extraction technology

目前对于糖尿病致病机制的研究认识仍不完全,中医研究者依据中医理论研究分析,将糖尿病归属为消渴症范畴,并认为消渴症是一种肾阴虚和胃火炽盛的肾虚胃实病症^[1]。茯苓苦瓜胶囊由湖北康进药业有限责任公司研发,是以茯苓、香菇、苦瓜、人参等6种药材为组方制成的胶囊,其组方主要是根据中医基础理论,针对消渴症的病因病机实施辩证论治的组方,且各组方药材的主要活性成分也是以经现代药理研究证明具有降糖作用的多糖、总皂苷为主^[2-8]。为充分提取并富集方中有效成分,笔者在本研究中以其组方药材中的主要成分即多糖和总皂苷的提取率为考察指标,采用响应面法对其提取工艺参数进行优化,为茯苓苦瓜胶囊制订合理的质量标准奠定基础,使其更好地应用于临床。

1 材料

1.1 仪器

UV752型紫外分光光度计、FA1004B型分析天平(上海佑科仪器仪表有限公司);JY-101型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司);DD5型离心机(郑州宏朗仪器设备有限公司);WH-2型旋涡混合器(金坛市新航仪器厂);DZF-6020型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);30B型粉碎机(江阴通达机械厂)。

*主管药师。研究方向:医院制剂。电话:0713-4282730。E-mail:173074924@qq.com

1.2 树脂、药材、对照品与试剂

PT-大孔吸附树脂(河北省津杨滤材厂);人参皂苷Re对照品(批号:110754-201024,纯度:95.9%)、D-无水葡萄糖(以下简称葡萄糖)对照品(批号:110833-200904,纯度:100%)均来源于中国食品药品检定研究院;茯苓(批号:1407023)、香菇(批号:1401022)、苦瓜(批号:1407037)、人参(批号:1406082)、葛根(批号:1403011)、苦丁茶(批号:1406054)均购自安徽亳州市药材总公司中药公司,并由湖北中医药大学陈科力教授鉴定为真品;试验所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 粗多糖的含量测定^[9]

2.1.1 粗多糖的提取与含量测定 准确称取已烘干的净制处方药材饮片粗粉约1 000 g,加入一定量的水,按一定的提取次数和时间进行提取,滤过后将提取液定容至1 000 ml,摇匀,备用。精密量取滤液5.0 ml,置于50 ml离心管中,加入无水乙醇20 ml,混匀,3 000 r/min离心(离心半径13.6 cm)5 min,弃去上清液,残渣用80%乙醇溶液洗涤3次,离心后弃去上清液。残渣加水溶解后定容至50 ml,摇匀。取上述定容液2.0 ml,在485 nm波长处测定吸光度。根据标准曲线回归方程计算出样品中粗多糖得率 $=0.9 \times (A - 0.0039) / 3.656 \times V \times N / M \times 100\%$ 。式中, M 是所取药材的总质量(g), V 是样品提取液体积(ml), N 是样品稀释倍数, A 是吸光度,0.9为葡萄糖换算为粗多糖的系数。

2.1.2 线性关系试验 精密称定105℃干燥至恒质量的葡萄

糖对照品0.500 3 g,加水并定容于50 ml量瓶中,制备成0.1 g/ml对照品溶液。精确吸取上述对照品溶液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml置于25 ml比色管中,加水至2.0 ml,分别加入5%苯酚溶液1.0 ml和浓硫酸10 ml,在旋涡混合器上混匀后,置于沸水浴中煮沸10 min,冷却至室温,在485 nm波长处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得方程 $y=3.656 2x+0.003 9$ ($r=0.999 4$),表明葡萄糖检测质量浓度线性范围为2.84~24.63 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.1.3 精密度、准确度考察 按相关方法进行的操作。结果,精密度试验中吸光度的RSD为0.52%($n=6$);准确度试验中平均回收率为99.13%(RSD=0.71%, $n=6$)。

2.2 总皂苷的含量测定^[9]

2.2.1 总皂苷的提取与含量测定 准确称取已烘干的净制处方药材饮片粗粉约1 000 g,加入一定量的70%乙醇,按一定的提取次数和时间进行提取,滤过后将提取液定容至1 000 ml,摇匀,备用。准确吸取上述溶液1.0 ml于蒸发皿中,蒸干,加5 ml水溶解。准确取1 ml溶解液以PT-大孔吸附树脂上柱,用15 ml水洗柱,弃去洗脱液,用20 ml的85%乙醇洗脱,收集洗脱液于蒸发皿中,挥干。先后加入0.2 ml的5%香草醛冰乙酸溶液和0.8 ml高氯酸,混匀后移入10 ml比色皿中,在60 $^{\circ}\text{C}$ 以下水浴加温15 min后取出,冷却后加入冰乙酸5.0 ml,在560 nm波长处测定吸光度。根据标准曲线回归方程计算样品中的总皂苷得率= $(A-0.012 2)/0.001 9 \times V/1 000/M \times 100\%$ 。式中, M 、 V 、 A 含义同“2.1.1”项下。

2.2.2 线性关系试验 精密称取人参皂苷Re对照品0.020 2 g,加甲醇溶解并定容至10 ml,即每1 ml溶液含人参皂苷Re 2.0 mg。精密吸取上述对照品溶液0、20、40、80、120、160、200 μl 分别置于10 ml比色皿中,随即用氮气吹干,自“2.2.1”项下“60 $^{\circ}\text{C}$ 以下水浴”起同法操作,测定吸光度。以总皂苷质量浓度(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得方程 $y=0.001 9x+0.012 2$ ($r=0.999 3$),表明人参皂苷Re检测质量浓度线性范围为0.012~0.156 mg/ml。

2.2.3 精密度、准确度考察 按相关方法进行的操作。结果,精密度试验中吸光度的RSD为0.61%($n=6$);准确度试验中平均回收率为98.22%(RSD=0.83%, $n=6$)。

2.3 单因素考察试验

设定料液比(g/ml)为1:12、提取次数为2次、不同提取时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h)下的粗多糖和总皂苷得率见图1A;设定料液比为1:12、提取时间为1 h、不同提取次数(1、2、3、4、5次)下的粗多糖和总皂苷得率见图1B;设定提取时间为1 h、提取次数为1次、不同料液比(1:6、1:8、1:10、1:12、1:14)下粗多糖和总皂苷得率见图1C。

由图1可见,随着提取时间的延长,粗多糖和总皂苷得率均有增加,但当提取时间超过1 h后,粗多糖得率有明显的下降,总皂苷得率有小幅下降,考虑到生产成本及成分的稳定性,故选择提取时间为1 h;随着提取次数的增加,粗多糖得率基本无变化,总皂苷得率增加幅度较小,故选择提取次数为2次;随着料液比的增加,粗多糖和总皂苷得率均明显升高,且在料液比为1:12时达到最大值,随后开始下降,故选择料液比为1:12。

2.4 响应面法优化综合提取工艺

根据单因素试验结果,采用响应面法Box-Behnken设计试验方法以提取时间(A)、提取次数(B)、料液比(C)3个因素为响应因子,以粗多糖得率(%)、总皂苷得率(%)为响应值,进

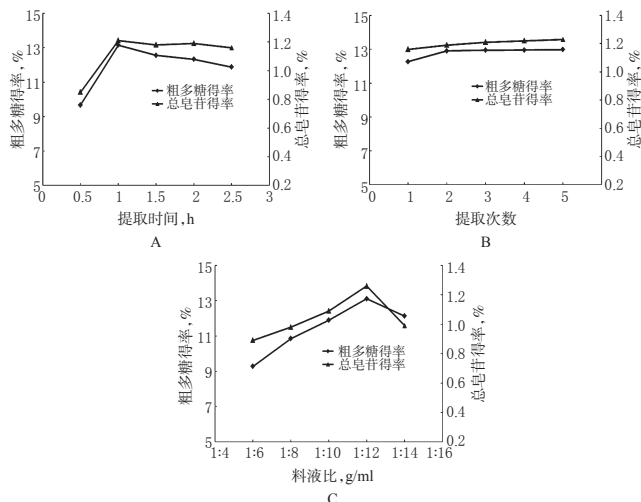


图1 各因素对粗多糖和总皂苷得率的影响

Fig 1 Effects of each factor on the yield of crude polysaccharide and total saponins

行3因素5水平共17个试验点优化试验。响应因素水平分别以-1、0、1进行编码,因素与水平见表1,试验设计方案与结果见表2,方差分析见表3、表4。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(提取时间),h	B(提取次数)	C(料液比),g/ml
-1	0.5	1	1:10
0	1	2	1:12
1	1.5	3	1:14

表2 Box-Behnken设计方案与试验结果

Tab 2 The scheme and test results of Box-Behnken design

试验号	A	B	C	粗多糖得率, %	总皂苷得率, %
1	-1	-1	0	11.07	0.81
2	-1	0	-1	9.41	1.01
3	-1	0	1	10.82	0.82
4	-1	1	0	11.14	0.83
5	0	-1	-1	11.85	0.88
6	0	-1	1	12.11	0.98
7	0	0	0	13.23	1.27
8	0	0	0	12.99	1.29
9	0	0	0	12.91	1.16
10	0	0	0	12.97	1.28
11	0	0	0	13.22	1.31
12	0	1	1	13.23	1.23
13	0	1	-1	11.87	1.21
14	1	-1	0	14.55	1.05
15	1	0	-1	13.87	1.18
16	1	0	1	12.85	1.28
17	1	1	0	14.55	1.31

利用Design-Expert 8.0.6软件对表3、表4试验数据进行多元回归拟合,设3个因素17个试验,零点试验重复5次。从表3和表4的方差分析结果可以得出,模型 P 均小于0.001,说明各响应值对该模型是极其显著的,具有统计学意义。失拟项 P 值分别为0.162 9、0.879 0,且均大于0.05,为不显著,说明回归方程与试验拟合情况好、试验误差小,可应用该回归方程对不同提取条件下原料药中粗多糖和总皂苷得率进行预测。试验值与回归方程预测值的校正决定系数分别为0.978 5、0.927 4,表明模型能解释97.85%和92.74%响应值随响应因素的变化。

表3 粗多糖得率方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	30.31	9	3.37	81.97	0.000 1	非常显著
A	24.43	1	24.43	194.52	0.000 1	非常显著
B	0.18	1	0.18	4.45	0.072 7	
C	0.85	1	0.85	20.72	0.002 6	显著
AB	1.225×10^{-3}	1	1.225×10^{-3}	0.030	0.867 8	
AC	0.84	1	0.84	20.37	0.002 8	显著
BC	0.30	1	0.30	7.36	0.030 1	显著
A ²	0.40	1	0.40	9.66	0.017 1	显著
B ²	0.021	1	0.021	0.51	0.489 5	
C ²	3.18	1	3.18	77.47	0.000 1	非常显著
残差	0.29	7	0.041			
失拟项	0.20	3	0.066	2.93	0.162 9	
纯误差	0.090	4	0.022			
相关系数	0.990 6					
校正决定系数	0.978 5					

表4 总皂苷得率方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.49	9	0.055	23.70	0.000 2	非常显著
A	0.23	1	0.23	98.71	0.000 1	非常显著
B	0.054	1	0.054	23.59	0.001 8	显著
C	3.613×10^{-3}	1	3.613×10^{-3}	1.57	0.251 1	
AB	0.014	1	0.014	6.24	0.041 1	显著
AC	0.021	1	0.021	9.11	0.019 4	显著
BC	3.600×10^{-3}	1	3.600×10^{-3}	1.56	0.251 8	
A ²	0.10	1	0.10	45.11	0.000 3	非常显著
B ²	0.046	1	0.046	20.02	0.002 9	显著
C ²	4.379×10^{-3}	1	4.379×10^{-3}	1.90	0.210 8	
残差	0.016	7	2.308×10^{-3}			
失拟项	2.275×10^{-3}	3	7.583×10^{-4}	1.22	0.879 0	
纯误差	0.014	4	3.470×10^{-3}			
相关系数	0.968 2					
校正决定系数	0.927 4					

由表3可以得出,影响粗多糖得率的主次因素顺序为:A>C>B。其中项A、C²为非常显著影响因素,项C、AC、BC达到显著水平。粗多糖得率的回归方程: $Y=13.06+1.75A+0.15B+0.33C-0.018AB-0.46AC+0.28BC-0.31A^2+0.071B^2-0.87C^2$ ($R^2=0.990 6$)。通过回归模型预测的粗多糖提取的最优工艺条件为:料液比1:12.16、提取时间1.35 h、提取次数2.2次。在此条件下,预测粗多糖得率为14.71%、总皂苷得率为1.32%。

同样,由表4可以得出,影响总皂苷提取得率的主次因素顺序为A>B>C。其中项A、A²达到非常显著水平,项B、AB、AC、B²达到显著水平。总皂苷得率的回归方程: $Y=1.26+0.17A+0.083B-0.021C+0.060AB+0.073AC+0.030BC-0.16A^2-0.10B^2-0.032C^2$ ($R^2=0.968 2$)。通过回归模型预测的总皂苷提取的最优工艺条件为:料液比1:12.38、提取时间1.23 h、提取次数1.80次。在此条件下,预测总皂苷得率为1.42%、粗多糖得率为13.82%。

当提取时间、提取次数、料液比其中一个为固定值时,绘制其他两因素及其交互作用对粗多糖得率影响的响应面及等高线图。其中,在粗多糖得率和总皂苷得率中均以料液比与提取时间的交互作用较为显著,结果见图2、图3;其余交互作用不显著的图略。

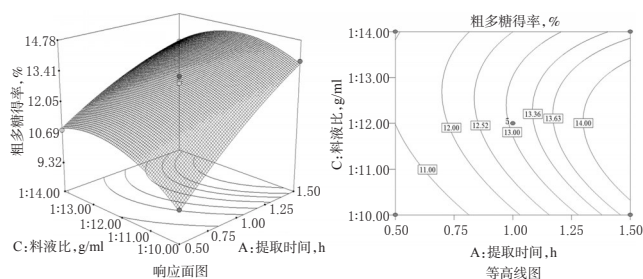


图2 提取时间与料液比对粗多糖得率影响的响应面图和等高线图

Fig 2 The response surface plot and contour plot for the effects of extraction time and liquid ratio on the yield of crude polysaccharide

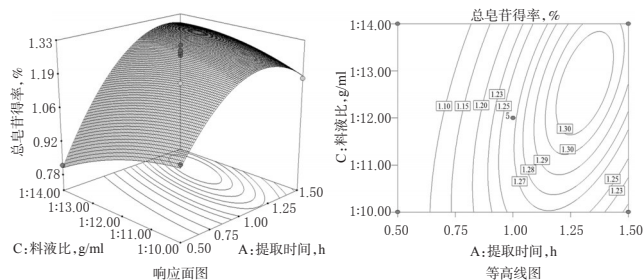


图3 提取时间与料液比对总皂苷得率影响的响应面图和等高线图

Fig 3 The response surface plot and contour plot for the effects of extraction time and liquid ratio on the yield of total saponins

2.5 验证试验

结合生产实际,最终确定粗多糖、总皂苷的综合提取工艺条件为:料液比1:12、提取时间1.4 h、提取2次。该条件下预测粗多糖得率为14.69%、总皂苷得率为1.36%。按此条件分别进行3次验证试验,结果粗多糖得率分别为14.44%、14.42%、14.46%,平均值为14.44%($RSD=0.14\%$, $n=3$);总皂苷得率为1.33%、1.32%、1.34%,平均值为1.33%($RSD=0.75\%$, $n=3$)。与模型预测值比较,粗多糖得率偏差为1.70%,总皂苷得率偏差为2.21%,实测值与预测值相接近,说明模型可靠。

3 讨论

本研究应用响应面法来优化粗多糖和总皂苷提取工艺,取得了较好的结果。但在研究中发现,综合确定的最优提取工艺条件下两者的得率较各自最优提取工艺下的得率略低,2个成分的得率不能同时达到最大化,表明此研究方法存在一定的局限性,还需要结合其他分析方法进一步深入研究。

茯苓苦瓜胶囊处方及比例是根据老中医多年的行医经验总结出来的,且所选用的药材经现代药理研究均认为有不同程度的降糖、降脂以及调节机体免疫力的功效,处方中的主要成分粗多糖、总皂苷检验方法比较成熟,且临床应用较广。本研究得到的茯苓苦瓜胶囊综合提取工艺,为后续质量标准的控制研究提供了基础。

参考文献

[1] 黄俊华,王健彬.糖尿病的辩证施护[J].中国中医药资讯,2011,3(16):224.
 [2] 郑彩云.茯苓多糖抗糖尿病作用的实验研究[J].中国医疗前沿,2010,5(14):12.
 [3] 陶群,周志文,柳冬月,等.香菇茯苓复方降血糖作用的实

右旋布洛芬缓释微丸的制备及其释药行为分析

李海刚^{1*}, 陈香², 郭绍芬¹, 葛朝晖¹(1.临沂大学药学院, 山东临沂 276000; 2.临沂职业学院, 山东临沂 276017)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0095-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.31

摘要 目的:制备右旋布洛芬缓释微丸,并对其体外释药行为进行分析。方法:以3%羟丙基甲基纤维素(HPMC)为黏合剂,采用离心造粒粉末层积-丙烯酸树脂水分散体包衣法制备右旋布洛芬缓释微丸;以1、4、10 h的累积释放度(Q)的综合评分为指标,以蔗糖-药物的质量比、HPMC-丙烯酸树脂NE30D的质量比、包衣增质量为因素,用正交试验设计优化处方,验证并分析其体外释药情况。结果:最优处方为蔗糖-药物的质量比1:10、HPMC-丙烯酸树脂NE30D质量比1.5:1、包衣增质量8%;所制缓释微丸的 Q_{1h} 、 Q_{4h} 、 Q_{10h} 分别为21%、57%、89%($n=3$),其零级、一级、Higuchi方程释药模型的相关系数分别为0.956 6、0.989 9、0.996 5。结论:成功制得具有体外缓释作用的右旋布洛芬缓释微丸,其体外释药更符合Higuchi方程。

关键词 右旋布洛芬;缓释微丸;离心造粒法;丙烯酸树脂;体外释药

Preparation of Dexibuprofen Sustained-release Pellets and Analysis on Drug Release Behavior

LI Haigang¹, CHEN Xiang², GUO Shaofen¹, GE Chaohui¹(1.College of Pharmacy, Linyi University, Shandong Linyi 276000, China; 2.Linyi Vocational College, Shandong Linyi 276017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare dexibuprofen sustained-release pellets, and to analyze the drug release behavior *in vitro*. METHODS: Centrifugal granulation powder layering-eudragit dispersion coating method was used to prepare dexibuprofen sustained-release pellets using 3% HPMC as adhesive agent. The formula of the pellets was optimized by orthogonal test with weight ratio of sucrose to dexibuprofen, weight ratio of HPMC to Eudragit NE30D and coating weight as factors, using 1, 4 and 10 h accumulated release rate (Q) as index. The release of the drug from the pellets was analyzed. RESULTS: The optimized formulation was that the proportion of sucrose to drug was 1:10, the weight ratio of HPMC to Eudragit NE30D was 1.5:1, the increased weight of coating material was 8%. Q_{1h} , Q_{4h} and Q_{10h} of prepared pellets were 21%, 57% and 89%, respectively ($n=3$). The correlation coefficient of zero-order, one-order and Higuchi equation release model were 0.956 6, 0.989 9, 0.996 5. CONCLUSIONS: Prepared pellets show good sustained-release effect *in vitro*. Drug release of pellets is more in accordance with Higuchi equation.

KEYWORDS Dexibuprofen; Sustained-release pellets; Centrifugal granulation; Eudragit; Drug release *in vitro*

布洛芬是一种非甾体类抗炎药,临床上用于风湿类风湿性关节炎及骨关节炎的长期治疗,同时还用于治疗发热、各种中度疼痛及炎症,疗效确切^[1-3]。布洛芬由等量的右旋布洛芬及左旋布洛芬组成,研究表明,外消旋布洛芬中右旋布洛芬对映体是活性成分,发挥治疗作用^[4-5],而左旋布洛芬对映体为非活性成分,且具有潜在的毒性作用^[6]。因此,右旋布洛芬临床应用前景良好。目前国内上市的右旋布洛芬剂型主要有胶

囊、栓剂和口服混悬液等。由于右旋布洛芬半衰期短,需多次给药,给患者带来不便,而开发右旋布洛芬缓释制剂,有助于降低血药浓度峰谷波动,减少服药次数^[7-8],提高患者依从性。

1 材料

1.1 仪器

BJZ-360M包衣造粒机(中国运载火箭技术研究院十五所、北京天民高科技开发公司);流化床包衣机(常州市磐丰干

验研究[J].湖北中医杂志,2011,33(7):3.
[4] Li TH, Hou CC, Chang CL, et al. Anti-hyperglycemic properties of crude extract and triterpenes from *Poria cocos* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, doi: 10.1155/2011/128402.
[5] Perera PK, Li YM. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes[J]. *FFHD*, 2011, 1(4):161.
[6] 李健,张文令,黄艳,等.苦瓜总皂苷降血糖及抗氧化作用的研究[J].食品科学,2007,28(9):518.

[7] Chaturvedi P, George S. *Momordica charantia* maintains normal glucose levels and lipid profiles and prevents oxidative stress in diabetic rats subjected to chronic sucrose load[J]. *J Med Food*, 2010, 13(3):520.
[8] Luo JZ, Luo LG. Ginseng on hyperglycemia: effects and mechanisms[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2009, 6(4):423.
[9] 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,2010:288,367-368.

*讲师,博士。研究方向:药物传递系统。E-mail: lihg2014@126.com

(收稿日期:2015-03-16 修回日期:2015-05-14)
(编辑:刘萍)