

Box-Behnken 设计-效应面法优化降糖 1 号胶囊的提取工艺

李洪阳¹, 常惟志¹, 段东升², 闫玉芹², 姜立丽¹, 马宁², 陈璐璐¹, 肖光玲¹, 高宇¹, 李彦冰^{1*}(1.黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2.哈尔滨溢康中医药研究所, 哈尔滨 150036)

摘要: 目的 优选降糖 1 号胶囊的提取工艺。方法 水回流提取, 以提取时间、提取次数、料液比为考察因素, 总黄酮得率为考察指标, 采用 Box-Behnken 设计试验, 效应面法分析试验结果。结果 提取时间和提取次数对实验结果具有极显著的影响, 料液比对试验结果具有显著性影响, 最佳提取工艺为水回流提取 3 次, 每次 59 min, 料液比为 23 mL·g⁻¹, 实测总黄酮得率与预测总黄酮得率的相对偏差为-2.66%。结论 Box-Behnken 设计-效应面法对该提取工艺的优化结果准确、合理、可行。

关键词: Box-Behnken 设计; 效应面法; 降糖 1 号胶囊; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0981-04

Optimization of Extractive Technology for Jiangtangyihao Capsule by Box-Behnken Design-Response Surface Methodology

LI Hongyang¹, CHANG Huaizhi¹, DUAN Dongsheng², YAN Yuqin², JIANG Lili¹, MA Ning¹, CHEN Lulu¹, XIAO Guangling¹, GAO Yu¹, LI Yanbing^{1*}(1.Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2.Harbin Yikang Institute of Chinese Medicine, Harbin 150036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extractive technology of Jiangtangyihao capsule. **METHODS** Water reflux, extraction time, extraction times and solid-liquid ratio were observed as factors, total flavonoids was investigated as the indicator. Box-Behnken design-response surface methodology was used to analyze test data. **RESULTS** Extraction time and the number of extraction times had a very significant impact on the experimental results and the solid-liquid ratio had a significant impact on the test results. The optimum extraction conditions for Jiangtangyihao capsule were obtained as follows: extracting three times with water reflux extraction, each time was 59 min, the ratio of solid-liquid was 23 mL·g⁻¹. Relative deviation between the measured yield of flavonoids and predicted total yield of flavonoids was -2.66%. **CONCLUSION** The extraction method was accurate, rational and feasible.

KEY WORDS: Box-Behnken design; response surface methodology; Jiangtangyihao capsule; extractive technology

糖尿病是一种因胰岛素缺失或细胞胰岛素减少或受体敏感性降低导致的一种全身性的、慢性代谢性疾病。糖的代谢异常, 会引起多个器官的功能异常, 产生多种并发症。在我国, 每年增加约 100 万的糖尿病患者, 其中 2 型糖尿病占 90%~95%。世界卫生组织预测, 至 2030 年, 我国糖尿病患者人数可能达到 4 230 万^[1]; 对于糖尿病患者来说, 糖尿病并发症是致死、致残的主要原因^[2]。

降糖 1 号胶囊为临床经验方, 由桑叶、淫羊藿、夏枯草、藤茶等组成。临床上主要用于治疗 2 型糖尿病及其并发症, 疗效确切。本实验根据处方中的药味的主要成分及活性成分, 采用水回流提取的方法, 以总黄酮得率为考察指标, 采用

Box-Behnken 设计-效应面法优化本方的最佳提取工艺, 为批量化生产提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

721A 型分光光度计(四川仪表九厂); RE-5285A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 指针式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 试药

实验所用桑叶、淫羊藿、夏枯草购自哈药集团世一堂饮片厂, 经黑龙江中医药大学药学院李彦冰教授鉴定分别为 *Morus alba* L.、*Epimedium brevicornu* Maxim.、*Prunella vulgaris* L., 实验所用的藤茶来源于安徽省亳州市药材总公司中药公

作者简介: 李洪阳, 男, 硕士生 Tel: 13945073585 E-mail: lihybc1@126.com *通信作者: 李彦冰, 男, 硕士, 教授, 硕士 Tel: 13313629313 E-mail: liyanbing55@163.com

司,经黑龙江中医药大学药学院李彦冰教授鉴定为 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W.T Wang; 芦丁(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707,供含量测定用); 甲醇(分析纯,西陇化工股份有限公司); 三氯化铝(分析纯,天津市致远化学试剂有限公司),水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 总黄酮测定方法^[3-6]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁 5 mg,用甲醇溶解配成浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 将每组水回流提取液定容至 1 000 mL 的量瓶,准确量取 200 mL,减压蒸干,用甲醇溶解,过滤,滤液转移至 50 mL 的量瓶中,用甲醇定容,即得。

2.1.3 待测液的制备 精密吸取“2.1.2”项下的供试品溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶,精密加入 2.5 mL 预先配好的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯化铝甲醇溶液,用甲醇定容,室温下放置 15 min,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液 0.0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 mL 置于 7 个 10 mL 量瓶中,精密加入 2.5 mL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯化铝甲醇溶液,用甲醇定容,室温下放置 15 min,在 421 nm 下测定其吸光度,以对照品溶液浓度(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,线性方程为: $Y=0.0241X+0.0155$, 相关系数 $r=0.9991$, 芦丁浓度在 8~32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.2 提取工艺优化

2.2.1 Box-Behnken 设计^[7]与结果

水回流提取原药材(包括桑叶、淫羊藿、夏枯草、藤茶等),投药量为半个处方量,以提取时间、提取次数、料液比为考察因素,总黄酮得率为考察指标,使用 Design Expert 7.1.6,按 Box-Behnken 设计生成 3 因素 3 水平的试验,每次试验的提取液按“2.1.2”项下方法处理,并按照“2.1.3”项下的方法显色,在 421 nm 下测定吸光度,吸光度带入线性方程,计算浓度,折算成总黄酮得率(单位质量的生药材含总黄酮的量),试验结果见表 1,表 2。

表 1 因素水平表

Tab 1 The factors and levels

水平	因素		
	时间/min	提取次数	料液比/ $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
	A	B	C
-1	30	1	15
0	50	2	20
1	70	3	25

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果表

Tab 2 The results of Box-Behnken design

序号	A	B	C	总黄酮得率/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	0	0	0	2.12
2	0	0	0	2.03
3	0	1	-1	2.02
4	1	-1	0	1.50
5	-1	0	-1	1.45
6	-1	-1	0	1.12
7	0	-1	1	1.41
8	1	0	1	2.03
9	-1	1	0	1.78
10	0	0	0	1.99
11	-1	0	1	1.56
12	0	-1	-1	1.32
13	1	1	0	2.16
14	1	0	-1	1.89
15	0	1	1	2.30
16	0	0	0	2.05
17	0	0	0	2.20

2.2.2 效应面法^[8]分析试验结果

2.2.2.1 模型拟合 使用 Design Expert 7.1.6 对试验结果进行效应面法分析,分别采用多元线性拟合和二次多项式拟合 2 种方式进行模型拟合,结果多元线性拟合结果失拟性显著,且复相关系数 R^2 明显低于二次多项式拟合的 R^2 ,最终采用二次多项式拟合作为效应面法的模型拟合方式,拟合方程为 $Y=2.08+0.21A+0.36B+0.077C+0.0075AC+0.047BC-0.23A^2-0.2B^2-0.11C^2$, 去掉二次多项式中极不显著项($P\geq 1$ 项,即 AB 项),简化后方程 R^2 为 0.953,失拟性不显著,模型成立。结果见表 3。

2.2.2.2 最佳工艺预测 使用 Design Expert 7.1.6 对最优工艺进行预测,并绘制 2 个自变量(另一自变量为系统预测的最佳值)对考察指标的影响三维效应面图,见图 1(从左至右分别为 A-B、A-C、B-C 对总黄酮得率的影响);预测的最佳工艺为水回流提取 3 次,每次 59 min,料液比为 23 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$,预测总黄酮得率为 2.32 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

表 3 方差分析表

Tab 3 Analysis of Variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	1.970 7	9	0.219 0	37.198 4	<0.000 1	***
A-提取时间	0.348 6	1	0.348 6	59.223 1	0.000 1	***
B-提取次数	1.058 5	1	1.058 5	179.822 5	<0.000 1	***
C-料液比	0.048 1	1	0.048 1	8.162 8	0.024 4	*
AB	0.000 0	1	0.000 0	0.000 0	1.000 0	
AC	0.000 2	1	0.000 2	0.038 2	0.850 5	
BC	0.009 0	1	0.009 0	1.533 2	0.255 5	
A ²	0.230 6	1	0.230 6	39.166 6	0.000 4	***
B ²	0.1752	1	0.175 2	29.767 7	0.000 9	***
C ²	0.052 3	1	0.052 3	8.892 7	0.020 5	*
残差	0.041 2	7	0.005 9			
失拟性	0.013 7	3	0.004 6	0.665 9	0.615 5	
纯误差	0.027 5	4	0.006 9			
总体	2.011 9	16				

注: ***-为具有极显著差异, *-为具有显著性差异

Note: ***-indicates extremely significant difference, *-indicates significant difference

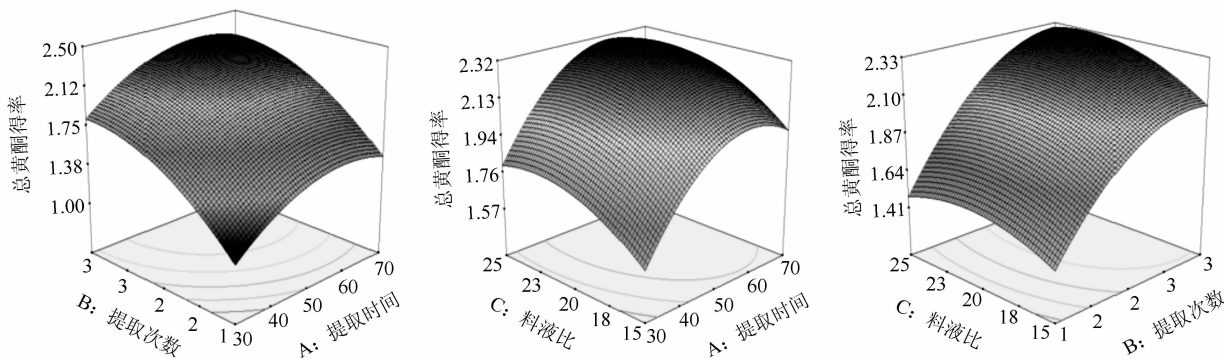


图 1 A-B、A-C、B-C 对总黄酮得率影响的三维效应面图

Fig 1 Response surface plots for the effects of A-B, A-C and B-C on the total flavonoids yield

2.2.3 工艺验证 根据预测出的最佳提取工艺进行实验, 测定总黄酮得率, 3 次测定结果分别为 2.24, 2.21, 2.37 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 2.27 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 并与预测的总黄酮得率 2.32 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 比较, 计算相对平均偏差, 结果偏差为 -2.66%, 表明预测的工艺准确, 稳定。

3 讨论

3.1 测定指标的选择

本处方的主要成分及活性成分均为黄酮类物质, 为确保工艺稳定以及制剂的有效, 所以选择总黄酮作为考察指标。

3.2 总黄酮测定方法的选择

$\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定总黄酮^[9]为最常用的测定方法, 此方法下, 黄酮类与显色剂的作用部位为邻位无取代的邻二酚羟基结构, 本处方中的迷迭香酸、绿原酸等成分虽然不是黄酮类成分, 但具有邻位无取代的邻二酚羟基结构, 也会显色, 在 510 nm 有最大吸收, 所以选择 AlCl_3 显色法, 与 AlCl_3 发生络合的基团为 3 位羟基或 4 位羰基、以及邻二酚羟基结构, 专属性更强, 从而使测定结果更加准确。

3.3 关于 Box-Behnken 设计-效应面法

Box-Behnken 设计是在 2 水平析因设计的基础上, 加入中心点组成的 3 水平多因素设计, 该

设计合理, 准确度较高。由于本实验中采用多元线性拟合结果失拟, 复相关系数过低, 所以采用了二次多项式拟合, 这是一种非线性拟合的方式, 同线性拟合相比(正交设计采用线性拟合), 能够更好地回避相关系数发生偏差, 具有较高的精度。

REFERENCES

- [1] FAN L Y, DU J L, LI X H, et al. Detriment and protection of diabetes mellitus [J]. J Pract Tradit Chin Int Med(实用中医内科杂志), 2012, 26(6): 56-57.
- [2] JANSSON S P, ANDERSSON D K, SVARDSUDD K, et al. Mortality trends in subnity [J]. Am J Prev Med, 2010, 38(6): 628-636.
- [3] MA T T, ZHANG Q L, LI J, et al. AlCl₃ colorimetry for determination of total flavonoids [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2008, 19(1): 54-56.
- [4] ZHANG Q, LIU H L, ZHU R, et al. The determination of total flavonoids and rutin in Tartary buckwheat [J]. Food Sci(食品科学), 2003, 24(7): 113-116.
- [5] PEI Y P, LI W L, ZHANG H Q, et al. Improvement of AlCl₃ colorimetry for determination of total flavonoids [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2009, 23(4): 58-60.
- [6] YU Q, JIANG Y, ZHOU D Y, et al. Content determination of active ingredients and flavonoids in extract from Chrysanthemi Flos [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(6): 530-532, 547.
- [7] TIAN B C, JIA C P, YANG J T, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Hypericum ascyron* by Box-Behnken design [J]. Tradit Chin Med Pat Prescrip(中成药), 2010, 32(3): 389-392.
- [8] TENG K, RUN H S, WU Z J, et al. Optimal extraction of total flavone from Tengligen by central composite design and response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(7): 610-614.
- [9] GUO Y J, FAN L, WANG X Q, et al. Discussion about NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH colorimetry for determination of total flavonoids[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2002, 22(2): 97-99.

收稿日期: 2012-12-02

吲哚美辛结肠靶向胶囊的制备及体外释药评价

傅红兴¹, 李慧¹, 万常伟¹, 赵应征¹, 张福志²(1.温州医学院药学院, 浙江 温州 325035; 2.平阳人民医院药剂科, 浙江 平阳 325401)

摘要: 目的 开发一种结肠靶向胶囊, 使吲哚美辛达到结肠部位实现靶向释放。方法 以蘸胶工艺制备不溶性半透膜囊体, 灌装药物后以果胶片封住囊体, 外套上普通胶囊壳后外包肠溶衣, 进行体外释放试验。结果 该给药系统在人工胃液中不变形, 药物不释放, 采用 PEG-2 000 : CA 为 60%的不溶性囊体, 包衣增重 90%, 药物 : NaCl 为 1 : 1 制备的胶囊, 药物在人工肠液中 3 h 释放 < 10%, 在人工结肠液中 10 h 药物释放超过 70%, 基本释放完全, 达到结肠定位释放要求。结论 吲哚美辛结肠靶向胶囊能实现在结肠定位释放药物。

关键词: 结肠靶向胶囊; 吲哚美辛; 体外释药

中图分类号: R944.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0984-05

Preparation and *in Vitro* Evaluation of Indometacin Capsule for Colon-specific Delivery

FU Hongxing¹, LI Hui¹, WAN Changwei¹, ZHAO Yingzheng¹, ZHANG Fuzhi²(1.School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2.Department of Pharmacy, County People's Hospital of Pingyang, Wenzhou 325401, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a colon-targeted capsule to achieve targeted release in colon of indometacin. **METHODS** The insoluble semi-permeable capsule body was prepared by dipping-drying process. After filling with drugs, the capsule body were stuffed by pectin tablet. The insoluble body was capped into a stomach-soluble capsule, following with the enteric coating outside the capsule. Then *in vitro* release was investigated. **RESULTS** The system was undeformed and no drug released in artificial gastric fluid. The indometacin capsule made of PEG-2 000 : CA 60% insoluble capsule body, coating weight gain 90% and drugs : NaCl 1 : 1, reached to colon specific release completely, with drugs released < 10% in artificial intestinal juice in 3 h, and > 70% in artificial colonic juice in 10 h. **CONCLUSION** The indometacin colon-targeted capsule can realize

基金项目: 温州市科技局项目(S20100042)

作者简介: 傅红兴, 男, 硕士, 讲师 Tel: (0577)86699575 E-mail: hx_fu79@163.com