及其质量研究[J]. 药学学报, 2004, 39(3): 212-216.
[2] 赵明波, 邓秀兰, 王亚玲, 等. 高效液相色谱法测定红花中的羟基红花黄色素 A[J]. 色谱, 2003, 21(6): 593-595.
[3] 陆仙芸, 林德君, 徐升亮. HPLC 法测定注射用红花黄色素中羟基红花黄色素 A[J]. 中草药, 2006, 37(5): 704-705.
[4] 祝 明, 郭增喜. 红花药材中红花黄色素含量的测定[J]. 中药材, 2000, 23(8): 458-459
[5] 清 静, 徐修远. 氯霉素人工抗原的合成及多克隆抗体的制备[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(4): 30-31
[6] 曾华金, 刘吉华, 余伯阳, 等. 抗甘草酸二铵抗血清的制备[J]. 免疫学杂志, 2006, 22 (5): 570-576.
[7] Morinaga O. Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using monoclonal antibody against ginsenoside Re [J]. *Chromatogr* B, 2006, 830: 100-104.
[8] Fodey T L. Use of antigen mimics to produce specific antibodies to anti-coccidial drugs [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 323: 31-38.

Box-Behnken 中心组合设计优化甘草酸二铵缓释片的处方

马 伟, 尹莉芳*, 周建平, 赵存婕
(中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

摘 要: 目的 考察甘草酸二铵缓释片的制备工艺, 并对其体外释药机制进行研究。**方法** 采用羟丙基甲基纤维素 (HPMCk4m)、山嵛酸甘油酯为骨架材料, 制备甘草酸二铵缓释片; 使用 Box-Behnken 中心组合设计试验方案, 借助试验设计软件 Design Expert 绘制响应面曲线图, 筛选适合的处方; 并通过方程拟合探讨释药机制。**结果** 按预测处方制备的缓释片, 在 2、4、8、12 h 的体外累积释放率均值分别为 32.55%、49.94%、73.88%、97.89%。对其体外释药曲线进行模型拟合, 结果表明药物的释放机制为扩散和骨架溶蚀二者的协同作用。**结论** 验证试验证实了预测处方与实际处方之间具有较好的拟合度, Box-Behnken 中心组合设计可以应用于甘草酸二铵缓释片处方的筛选。

关键词: 甘草酸二铵; 缓释片; Box-Behnken 中心组合设计
中图分类号: R286.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)10-1486-05

Optimized formulation of diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablet by Box-Behnken design

MA Wei, YIN Li-fang, ZHOU Jian-ping, ZHAO Cun-jie
(College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To investigate the preparation technique and optimal formulation of diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablets and study the release mechanism of diammonium glycyrrhizinate release from the tablet. **Methods** Using HPMCk4m, Compritol 888 as skeleton material to prepare the diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablet. To optimize the formulations by Box-Behnken design, and use Design Expert program for statistical analysis of experimental results. Release mechanism of diammonium glycyrrhizinate from sustained release tablets was established by equation fitting. **Results** The average accumulate release rates of diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablets in 2, 4, 8, and 12 h were 32.55%, 49.94%, 73.88%, and 97.89%. And the release of diammonium glycyrrhizinate could be controlled by diffusion associated with erosion. **Conclusion** Box-Behnken design could be successfully used to optimize the sustained-release tablet of diammonium glycyrrhizinate.

Key words: diammonium glycyrrhizinate; sustained-release tablets; Box-Behnken design

甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate)是在甘草的有效成分及其衍生物的基础上研究的第三代产品, 临床应用多年, 除在治疗病毒性肝炎方面取得显著疗效外, 还被广泛应用于临床各个领域, 治疗多种疾病和理化因素引起的肝脏损伤。由于肝炎需要长期治疗, 而目前市场上的甘草酸二铵注射剂和胶囊剂用药次数频繁, 患者用药不便, 且血药浓度波动较大, 因此将甘草酸二铵制备成为持续 24 h 释药的缓释制剂可以提高患者的顺应性, 降低药物不良反应。响应曲面优化设计法(response surface

收稿日期: 2007-12-07
作者简介: 马 伟(1981—), 男, 内蒙古包头市人, 中国药科大学药剂学专业硕士研究生, 从事药物新剂型与新技术的研究。
E-mail: xmgmw@163.com
*通讯作者 尹莉芳 Tel: (025)85391080 E-mail: lifangyin@hotmail.com

万方数据

methodology)是一种优化试验条件的数学统计方法。传统的单变量优化试验存在不考虑各因子之间交互作用的不足，虽然全因子试验可以解决这一问题，但费时费力。而响应曲面优化设计法试验设计不仅可以建立连续变量曲面模型，对影响生物过程的因子及其交互作用进行评价，确定最佳水平范围，而且所需的试验组数相对较少，可节省人力物力[1]。本实验借助试验设计软件 Design Expert (version 7.0.3)，采用 Box-Behnken 中心组合设计，对甘草酸二铵缓释片处方中各辅料的用量对体外累积释放率的影响进行了研究，通过对实验数据的拟合，可求出各因素的最佳值，确定甘草酸二铵缓释片的处方。

1 仪器与试剂

TDP 型单冲压片机(上海天祥健台制药机械有限公司)；UV—9100 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)；RCZ—8A 溶出试验仪(天津大学精密仪器厂)。

甘草酸二铵原料药(西安富杰生物技术有限公司)；烟酰胺(上海百灵威)；乳糖(德国美剂乐股份有限公司)；羟丙基甲基纤维素(HPMC k4m、k15m、k100m)(上海卡乐康包衣技术有限公司)；山嵛酸甘油酯(Compritol 888)、羧甲基纤维素钠(CMC－Na)、硬脂酸镁 (上海运宏辅料有限公司)；海藻酸钠(HVCR)(国际特品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 甘草酸二铵缓释片的制备：采用湿法制粒，称取处方量主药和辅料，混匀，以 85%乙醇为润湿剂，20 目筛制粒，60 ℃干燥，18 目筛整粒，加入硬脂酸镁混匀，选取 12 mm 的冲头压制成片。

2.2 测定方法

2.2.1 对照品溶液的制备：精密称取烟酰胺对照品约 20 mg，置于 100 mL 量瓶中，加水溶解，并加至刻度。精密量取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备：取甘草酸二铵缓释片 10 片，研细，精密称取细粉适量(约相当于甘草酸二铵 40 mg)，置于 100 mL 量瓶中，加水适量，超声溶解，冷却后加水稀释至刻度，滤过。精密量取续滤液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，即得。

2.2.3 测定及计算：照《中国药典》2005 年版二部附录ⅣA 紫外-可见分光光度法，于 261 nm 波长处测定对照品溶液的吸光度，252 nm 的波长处测定供试品溶液的吸光度，计算甘草酸二铵缓释片中甘草酸二铵的质量分数 [甘草酸二铵的质量分数＝(供试品溶液的吸光度/对照品溶液的吸光度)×烟酰胺对照品的实际称样量/甘草酸二铵缓释片粉末的实际称样量×1.898]。

2.3 释放度的测定：取甘草酸二铵缓释片样品，依照《中国药典》2005 年版附录体外释放度试验方法第一法转篮法测定，溶出介质为 1 000 mL 脱气蒸馏水，温度为(37.5±0.5) ℃，转速为 100 r/min。于指定时间点取样 10 mL，同时立刻补充同温同体积介质，滤过后，取续滤液 3 mL 置于 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，于 252 nm 处测定吸光度；配制烟酰胺对照品溶液，并于 261 nm 处测定吸光度值，计算不同时间的累积释放率[累积释放率＝溶出液的吸光度/烟酰胺对照品溶液的吸光度×(烟酰胺对照品的实际称样量/缓释片的标示量)]。

2.4 缓释材料的单因素考察：采用单因素考察法对各种辅料的控释能力进行考察。分别选用型号为 HPMC k4m、HPMC k15m、HPMC k100m 羟丙基甲基纤维素，山嵛酸甘油酯，羧甲基纤维素钠，海藻酸钠为控释材料，处方以 100 片计：甘草酸二铵 22.5 g、缓释材料 15 g、乳糖 6 g、硬脂酸镁 0.5 g，制备甘草酸二铵缓释片，分别于 1、2、4、6、8、12 h 取样，测定，计算累计释放率，结果见表 1。可以看出 3 个黏度的 HPMC 的控释能力都较强，初期释药都较慢，且释药速度与黏度成反比；而山嵛酸甘油酯、羧甲基纤维素钠和海藻酸钠的控释能力非常弱，基本都在 4 h 的时候药物完全释放。

表 1 单因素试验结果 (n=6)

Fig. 1 Result of monofactorial test (n=6)

骨架材料	累积释放率/%					
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
HPMC k4m	10.19	18.09	30.84	43.78	56.79	81.04
HPMC k15m	9.92	16.82	29.12	40.54	52.52	75.17
HPMC k100m	8.04	13.03	22.68	31.61	39.31	55.58
山嵛酸甘油酯	50.65	73.32	97.19	100.84	100.58	100.03
羧甲基纤维素钠	33.65	62.37	95.43	100.02	99.97	99.63
海藻酸钠	41.98	73.57	101.22	101.05	100.78	100.26

本研究希望甘草酸二铵缓释片能够 24 h 给药 1 次，因此确定甘草酸二铵缓释片累积释放度 2 h 的目标值为 20%～40%，4 h 为 40%～60%，8 h 为 60%～80%，12 h 为大于 85%。单因素试验中，以高黏度的 HPMC 为阻滞剂制备的甘草酸二铵缓释片释放度都较期望值低，因此选择控释能力相对较弱的 HPMC k4m 为骨架材料，加入一定量的山嵛酸甘油酯、羧甲基纤维素钠或海藻酸钠调节缓释片的

万方数据

释药行为。进行预试验，结果发现当 HPMC k4m 与海藻酸钠合用，压片时经常出现裂片现象；与羧甲基纤维素钠合用压片，片子表面不光滑；与山嵛酸甘油酯合用压片，压出的片子表面光滑，压力适中，故选用 HPMC k4m 和山嵛酸甘油酯作为甘草酸二铵缓释片的骨架材料。

2.5 甘草酸二铵缓释片处方优化的试验设计[2~6]：本试验欲通过考察甘草酸二铵缓释片不同时间点的累积释放率来确定缓释片的处方，因此，选取 2、4、8、12 h 的累积释放率作为响应值，甘草酸二铵缓释片中两种骨架材料 HPMC k4m 和山嵛酸甘油酯的用量及填充剂乳糖的用量为自变量，分别以 A、B 和 C 代表，每个自变量的低、中、高试验水平编码分别为 −1、0、1，见表 2。其中真实值与编码值的关系为：A＝(HMPC k4m 用量 −80)/40；B＝(山嵛酸甘油酯用量 −150)/50；C＝(乳糖用量 −60)/40。

表 2 Box-Behnken 设计因素水平及编码

Table 2 Level and code of variables chosen for Box-Behnken design

变量	符号	编码		
		−1	0	1
HMPC k4m/g	A	40	80	120
山嵛酸甘油酯/g	B	100	150	200
乳糖的用量/g	C	20	60	100

该模型通过最小二乘法拟合得到二次多项方程：$\hat{Y}=c_0+\sum_{i=1}^{n}a_ix_i+\sum_{j\leq 1}^{n}b_{ij}x_ix_j$。其中 $\hat{Y}$ 为预测响应值，即各时间点累积释放率的预测值；xi 和 xj 为自变量编码值；c_0 为常数项；a_i 为线性系数；b_{ij} 为二次项系数；n 为因子数，本试验中为 3。按照 Box-Behnken 试验设计的统计学要求，中心点取 3 组试验，对方程中各项回归系数需要 15 组试验进行回归拟合，结果见表 3。

利用 Design Expert 软件，对表 3 中个时间点累积释放率数据进行模型拟合，获得个时间点释放度相对于 HMPC k4m、山嵛酸甘油酯和乳糖用量的二次多项回归方程：$Y_{2\,h}=36.95-19.21\,A-1.10\,B+1.24\,C$ ($R=0.929\,8$；$P<0.000\,1$)；$Y_{4\,h}=57.72-25.13\,A-0.81\,B+1.83\,C$ ($R=0.943\,3$；$P<0.000\,1$)；$Y_{8\,h}=69.52-19.67\,A-3.05\,B+0.18\,C-5.51\,AB+1.77\,AC-0.94\,BC+3.31\,A^2+9.38B^2+5.98\,C^2$ ($R=0.985\,7$；$P=0.002\,3$)；$Y_{12\,h}=86.69-12.24\,A-5.63\,B+0.013\,C-8.86\,AB+1.56\,AC+0.40\,BC-3.85\,A^2+8.60\,B^2+1.26\,C^2$ ($R=0.960\,3$；$P=0.025\,5$)。相应曲面图见图 1。

表 3 Box-Behnken 设计试验结果的实测值

Table 3 Box-Behnken design matrix along with test values

试验号	A	B	C	累计释放率/%			
				2 h	4 h	8 h	12 h
1	120	100	60	24.71	42.49	75.67	100.04
2	80	100	20	32.21	54.82	85.38	100.68
3	80	150	60	30.99	49.32	69.29	87.74
4	120	150	100	21.69	36.49	60.77	71.35
5	120	150	20	19.54	33.22	54.05	65.84
6	80	200	100	36.13	58.00	82.51	93.21
7	40	150	20	54.30	77.09	100.39	99.97
8	120	200	60	19.11	32.71	52.85	64.90
9	40	100	10	66.67	91.71	100.55	100.26
10	40	150	100	65.96	93.25	100.01	99.25
11	80	200	20	39.36	62.95	86.83	94.77
12	80	150	60	29.26	46.91	71.27	87.72
13	80	150	60	30.90	47.94	68.00	84.62
14	80	100	100	31.56	54.97	84.81	97.55
15	40	200	60	51.79	83.89	99.77	100.57

通过 F 检验，4 组回归模型的 P 值均小于 0.05，R 均大于 0.9，表明拟合情况良好，回归方程的代表性较好，能准确地预测实际情况。

2.6 甘草酸二铵缓释片的处方优化及验证：以缓释片累积释放度目标值 2 h 20%～40%，4 h 40%～60%，8 h 60%～80%，12 h 为大于 85%为限度，绘制重叠等高线图，得到能够同时满足上述条件的区

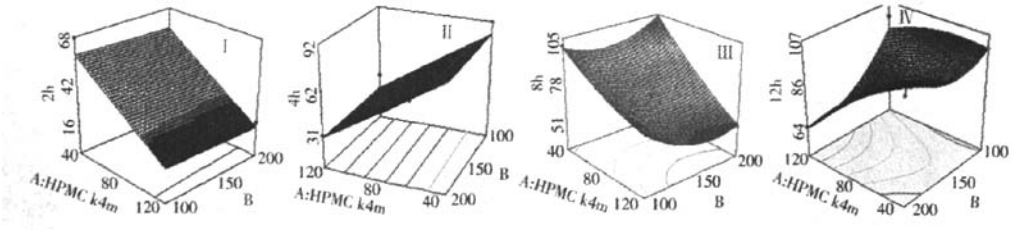

图 1 2 h(Ⅰ)、4 h(Ⅱ)、8 h(Ⅲ)、12 h(Ⅳ)累积释放率的相应曲面图

Fig. 1 Response surface plot of accumulate release rate in 2 (Ⅰ), 4 (Ⅱ), 8 (Ⅲ), and 12 (Ⅳ) h

万方数据

域(图 2)。

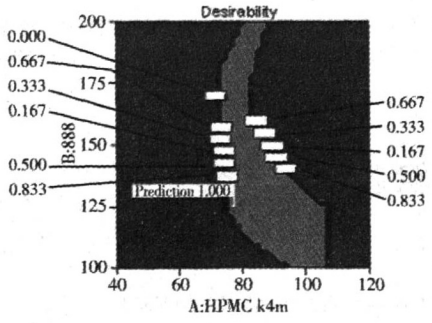

图 2 处方优化的重叠等高线图

Fig. 2 Overlay plot of formulation optimization

选择该区域中的一点,得到优化后的因素 A 的水平为 100 mg,因素 B 的水平为 115 mg、因素 C 的水平为 90 mg。按照优化后处方制备 3 批片剂,其体外累计释放率结果见表 4,由表 4 可知 2、4、8、12 h 的体外累积释放率预测值和实测值比较接近,试验结果达到预期目标。可见实际测定结果与 Box-Behnken 中心组合设计的预测结果与符合的很好。

2.7 甘草酸二铵缓释片释药机制的研究[7]:以优选的缓释片处方制备甘草酸二铵缓释片,进行试验,绘制体外累积释放曲线,见图 3。将体外释放结果用常见的释放动力学模型进行拟合,寻找描述药物释放的最佳模型。结果见表 5。相关系数(r)越接近 1,表明拟合效果越好。

结果表明,采用以上各模型,释放度与时间均有

表 4 优化处方评价指标的预测值和实测值

Table 4 Predicted values and test values of formulation optimization

项 目	累计释放率/%			
	2 h	4 h	8 h	12 h
预测值	29.79	48.05	73.84	92.44
实测值 1	32.05	49.98	73.82	91.51
实测值 2	31.13	47.18	72.33	87.60
实测值 3	34.47	52.67	75.48	89.54
实测值均值	32.55	49.94	73.88	89.55

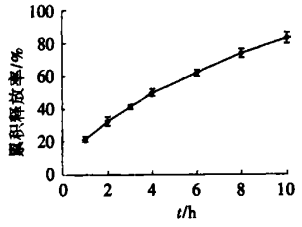

图 3 甘草酸二铵缓释片优化处方的释药曲线 (n=6)

Fig. 3 Release curve of optimal formulation of diammonium glycyrrhizinate sustained release tablets (n=6)

表 5 缓释片中甘草酸二铵释药模型的拟合结果 (n=6)

Table 5 Model-fitting parameters for releasing of diammonium glycyrrhizinate from sustained-release tablets (n=6)

模 型	方 程	r
Zero-order	Q=0.061 3 t+0.215 4	0.986 4
First-order	ln(100−Q) = −0.18 t+0.006	0.994 7
Higuchi	Q=0.282 9 $t^{1/2}$−0.070 7	0.999 5
Ritger-Peppas	ln$Q$=0.583 ln$t$−1.526 9	0.999 3

较好的相关性。根据 Ritger-Peppas 方程,药物的溶解性及制剂骨架的形状有关。对于圆柱形制剂,当 0.45<n<0.89 时,药物释放机制为非 Fickian 扩散;当 n<0.45 时为 Fickian 扩散;当 n>0.89 时为骨架溶蚀。试验结果通过曲线的拟合可得,n 值为 0.583,说明该药物的释放为非 Fickian 扩散,释放机制为扩散和骨架溶蚀二者的协同作用。

3 讨论

Box-Behnken 中心组合设计是响应曲面优化设计法中的一种,被广泛地应用于各种生化反应和微生物发酵条件的优化中。本研究利用统计学方法建立了 HPMC k4m、山嵛酸甘油酯及乳糖的用量影响甘草酸二铵缓释片各时间点累积释放率的二次多项数学模型,通过对模型方程的 3-D 图及其等高线图进行分析,获得了甘草酸二铵缓释片的优选处方。结果表明采用 Box-Behnken 中心组合设计优化缓释片的处方科学合理、快速有效。

通过单因素试验考察可知,高黏度的 HPMC 在释放的初期控释能力较强,因此加入山嵛酸甘油酯来调节药物的释放。但通过模型的检验所的结果显示,HPMC 的用量在各时间段对药物的释放都有显著性的影响,而山嵛酸甘油酯的影响不论是在初期还是后期都不如 HPMC k4m 显著。这可能是由于山嵛酸甘油酯的疏水性使凝胶层强度、黏度尤其是吸水速度降低,从而使骨架片对 HPMC k4m 的敏感度加强;混合骨架中的蜡质部分则因释药孔道减少及曲率增加而使山嵛酸甘油酯在混合骨架片中的影响减弱的原因。

参考文献:

[1] 王永菲,王成国. 响应面法的理论与应用 [J]. 中央民族大学学报:自然科学版 2005,14(3):236-240.

[2] 王允祥,吕凤霞,陆兆新. 杯伞(*Olitocybe sp.*)培养条件 Box-Behnken 法优化研究 [J]. 中国农业科学,2005,38(1):145-150.

[3] Kramar A, Turk S, Vrečer F. Statistical optimisation of diclofenac sustained release pellets coated with polymethacrylic films [J]. *Int J Pharm*, 2003, 256:43-52.

[4] 王允祥,陆兆新. 翅鳞伞培养条件响应面法优化研究[J]. 微

万方数据

生物学通报，2004,31(6):42-47.
[5] 吴 伟，阙 俐，陈 健，等. 星点设计-效应面法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.
[6] 崔凤杰，许泓瑜，许正宏，等. 运用多元数学模型优化灰树花发酵培养基组成的研究[J]. 食品与发酵工业，2006,32(4):18-21.
[7] 陈大为，张彦青，邹艳霜，等. 灯盏花素缓释微丸制备工艺与处方优化的研究 [J]. 中草药，2003,34(11):990-993.

无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖的研究

韩永萍[1,2] ，林 强[2]
(1. 北京联合大学生物化学工程学院，北京 100023；2. 中国矿业大学，北京 100083)

摘 要：**目的** 研究无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖溶液，确定操作工艺条件和有效清洗方法。**方法** 主要考察膜通量和膜通量恢复率。**结果** 在 60 ℃，pH 7～8、0.3～0.4 MPa 压差操作条件下微滤虫草粗多糖溶液，多糖收率较传统醇提工艺高出 30%，同时可除去大部分不溶固体物和蛋白质胶体等大分子有机物杂质。采用 80 ℃热水与 1%NaOH 溶液交替清洗并伴有间歇、短时反冲洗，可使膜的清水通量恢复率达到 90%以上。**结论** 无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖溶液工艺简单、可行。

关键词：冬虫夏草；多糖；无机陶瓷微滤膜；膜通量
中图分类号：R286.1 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2670(2008)10-1490-04

Purification of rough cordyceps polysaccharides solution by inorganic ceramic micro-filtration membrane

HAN Yong-ping[1,2], LIN Qiang[2]
(1. Bio-chemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China; 2. China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To apply the membrane technology for purifying rough cordyceps polysaccharides solution, the optimal operation condition and effective cleaning method were researched. **Methods** To mainly analyze the flux of membrane and its recovery. **Results** The optimal experiment operation condition obtained is 60℃, pH value 7—8, and pressure 0.3—0.4 MPa, by which the polysaccharides recovery was about 30%, more than by traditional ethanol extraction, and the most impurities as infusibility substance and protein colloid *etc.* were taken out. Moreover, the flux of membrane recovery can be above 90% after 80℃ water and 1% NaOH solution was alternately used to wash the fouling membrane under intermittent little back-pulsing. **Conclusion** The process of membrane technology purifying rough cordyceps polysaccharides is simpl and feasible.

Key words: *Cordyceps*; polysaccharides; inorganic ceramic micro-filtration membrane; membrane flux

冬虫夏草作为我国传统名贵的珍稀药用植物，是中医药三大补药之一。虫草多糖可活化巨噬细胞，刺激抗体产生，具有增强人体免疫力、抗肿瘤及延缓衰老等功效[1]。采用传统水煮醇沉工艺提取冬虫夏草菌丝体中粗多糖的效率较低，其中固形物的量接近 70%，使用前还需要经过脱蛋白和乙醇分级沉淀等工艺进一步纯化[2]。由于该过程中多糖的回收率直接受乙醇体积分数的影响，在工艺设计中不仅需要对提取液进行浓缩，还要考虑乙醇的回收，因此整体工艺比较复杂，操作困难，多糖收率低且生产成本高，生产环境较恶劣。微滤-超滤或纳滤组成的膜集成系统具有能耗低、单级分离效率高、工艺简单、可在室温或低温下操作，产品收率和质量分数均高于传统的提取工艺，在中药澄清、发酵液纯化等生物产品提取方面有着十分广阔的应用前景。然而，将该系统用于虫草粗多糖纯化的关键问题在于有效解决膜的污染和堵塞，尤其是系统前端微滤膜的污染和清洗[3,4]。为此，本实验考察了无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖的过程，优化运行工艺参数，确定清洗方案，预期为该工艺的工业化应用提供参考，同时也为

收稿日期：2007-12-04
基金项目：北京市教委项目(KM200511417005)
作者简介：韩永萍(1971—)，女，山东人，讲师，中国矿业大学在读博士，研究方向为天然产物提取马分离。
Tel：(010) 67377485 E-mail：hypyyt @163.com

万方数据