

表 3 预测值与实测值的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Comparison of forecasted and true values ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	预测值/h	实测值/h	偏差[(预测值-实测值)/ 预测值×100%]/%
处方1	5 710.4	5 840.7±0.210.2	-2.282.7±3.680.6
处方2	5 943.2	5 973.7±0.168.8	-0.513.2±2.840.6
处方3	6 103.4	5 833.1±0.178.1	4.429.2±2.918.3

预试验中发现,当羧甲淀粉钠用量较少(≤ 20 mg/片)时,制剂无脉冲释药特性,仅缓慢释放药物;其他两因素对释药时滞影响较大,这与盐酸青藤碱脉冲片的释药过程有关,释药初期,脉冲片外层衣膜中凝胶材料吸水形成凝胶层,阻滞水分渗入片芯,无药物释放,随着释药过程进行,衣膜凝胶层不断溶蚀变薄,水分渗入速度加快,片芯药物溶解扩散通过凝胶层有少量释放,同时崩解剂吸水片芯开始膨胀,当衣膜凝胶层溶蚀到一定程度时,其强度不足以承受片芯膨胀产生的作用力,衣膜出现破裂,药物以较快速度释放,实现一定时滞后的脉冲释药。外层衣膜的溶蚀是决定盐酸青藤碱脉冲片释药时滞的关键,而衣膜中 HPMC/卡拉胶比例和凝胶材料用量均对衣膜凝胶层的溶蚀有较大影响,从而决定释药时滞长短,其中 HPMC/卡拉胶比例增加,释药时滞延长,这与卡拉胶形成的凝胶强度较弱,易溶蚀有关;衣膜中凝

胶材料用量增加,释药时滞延长,这与凝胶材料用量增加,水化形成的衣膜强度提高,抗溶蚀能力增加有关^[7]。

本实验通过星点-效应面法设计安排实验并对结果进行方程拟合,建立各因素和脉冲片释药时滞之间的数学模型,在优化处方区域,取影响因素的任意值代入数学模型,可准确预测脉冲片的体外释放行为,实验值与预测结果相近,说明模型方程具有较好的预测性,可用于盐酸青藤碱脉冲片处方的优化。

体外释放度测定证实,盐酸青藤碱脉冲片具有定时脉冲释药特性,其体内释药特性及体内外相关性还有待通过体内试验进一步证实。

参考文献:

- [1] 孔庆峰,李军.青藤碱研究新进展[J].中国中药杂志,2005,30(20):1573-1576
- [2] 王晓维,金方.脉冲给药系统的释药机理及研究进展[J].中国医药工业杂志,2003,34(7):361-365
- [3] Smolensky M H, Peppas N A. Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(4): 828-851
- [4] 许毓,张铁军,赵平,等.中药缓控释制剂的研究现状及研究思路[J].药物评价研究,2010,33(1):30-35
- [5] 邹小燕,魏立新,杜玉枝,等.星点设计-效应面法优化川西獐牙菜提取工艺[J].中草药,2008,39(5):692-696
- [6] 范田园,魏树礼,严文伟,等.盐酸地尔硫卓爆破型脉冲控释片研究[J].药学报,2002,37(3):221-225
- [7] 池志强,毛世瑞,毕悦.黄原胶亲水性骨架片体外释药的影响因素[J].沈阳药科大学学报,2000,17(1):8-11

正交试验优选党参多糖的硫酸化工艺研究

杨淑娟¹,胡元亮^{1*},郭利伟¹,赵晓娜¹,范云鹏¹,俞涛²

(1 南京农业大学 中兽医学研究室,江苏 南京 210095;2 南京市浦口区畜牧兽医站,江苏 南京 211800)

摘要:目的 优选党参多糖硫酸化工艺。方法 用氯磺酸-吡啶法对党参多糖进行硫酸化修饰,以取代度和产物得率为指标,用 $L_9(3^4)$ 正交试验对试剂配比、反应温度、反应时间进行优选,用氯化钡-明胶法测定硫酸基的取代度。结果 试剂配比和反应时间分别对产物得率和取代度的影响最大,氯磺酸与吡啶配比为 1:6 时产物得率最高;反应时间为 3 h 时取代度最高,达 1.83;各因素不同水平对产物得率和取代度的影响无显著差异。结论 综合考虑最适宜的修饰条件为氯磺酸与吡啶配比为 1:6、反应温度 80℃、反应时间 3 h。

关键词:党参多糖;硫酸化修饰;正交试验

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)07-1091-04

Optimization on sulfated technology of *Codonopsis pilosula* polysaccharides by orthogonal design

YANG Shu-juan¹, HU Yuan-liang¹, GUO Li-wei¹, ZHAO Xiao-na¹, FAN Yun-peng¹, YU Tao²

(1 Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2 Pukou District Animal Husbandry & Veterinary Station, Nanjing 211800, China)

* 收稿日期:2009-10-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871887);国家科技支撑计划课题(2008BAD4B06)

作者简介:杨淑娟(1984—),女,硕士研究生,主要从事中药多糖研究。

* 通讯作者 胡元亮 E-mail: ylh@njau.edu.cn

Abstract: Objective To optimize the sulfated modification conditions of *Codonopsis pilosula* polysaccharides (CPPS). **Methods** CPPS was modified by chlorosulfonic acid-pyridine $L_9(3^4)$ Orthogonal test was used to optimize reagent ratio, reaction temperature, and reaction time, taking substitution degree and productivity as index. **Results** The effects of reagent ratio and reaction time respectively on productivity and substitution degree were the strongest. When the ratio of chlorosulfonic acid to pyridine was 1: 6, the productivity was the highest. When reaction time was 3 h, the substitution degree was the highest reaching 1.83. There were no significant differences among different levels of each factor. **Conclusion** The optimum modification conditions are the ratio of chlorosulfonic acid to pyridine of 1: 6, reaction temperature of 80 °C, and reaction time of 3 h in synthetical consideration.

Key words: *Codonopsis pilosula* polysaccharides (CPPS); sulfated modification; orthogonal test

党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 是常用的补益中药, 具有补中益气、和脾胃、除烦渴等功效, 常作为人参的代用品。党参含有多糖、皂苷、甾醇、三萜、生物碱、倍半萜内酯类及香豆素类成分, 其中多糖的量最高。现代药理研究表明, 党参多糖在调节机体免疫力、抗病毒、抗肿瘤、抗应激、抗氧化等多个方面具有较好的生物活性^[1]。为了进一步提高党参多糖的生物活性, 可以对党参多糖进行硫酸化修饰。研究表明, 硫酸化修饰能提高多糖的生物活性。Nishimura 等^[2]定位合成了 O-2 和 O-3 位硫酸酯化的新型硫酸甲壳质, 发现这两种硫酸多糖比 O-6 位硫酸酯化的多糖具有更强的抗 HIV 活性, 而且其抗凝血活性显著减小。硫酸化多糖的抗病毒活性对于当前畜禽病毒性疾病的治疗具有极其重要的临床意义, 有望发展成为继病毒逆转录酶活性抑制剂、蛋白酶抑制剂后的又一类潜在的新型抗病毒药物。本实验选择党参多糖为研究对象, 采用正交试验对党参多糖的硫酸化修饰条件进行优选, 旨在为研究党参多糖的硫酸化修饰奠定基础。

1 材料与仪器

氯磺酸、吡啶, 上海凌峰化学试剂有限公司; 硫酸钾, 上海振欣试剂厂; 3% 三氯乙酸; 0.5% 明胶(5 g 明胶溶于 100 mL 蒸馏水中, 4 °C 过夜备用); 0.5% 氯化钡-明胶(5 g 氯化钡溶于 0.5% 明胶溶液中); 95% 乙醇、NaOH 等, 均为分析纯。

99-2 恒温磁力加热搅拌器, 江苏金坛新一佳仪器厂; SHZ-88 水浴恒温振荡器, 江苏太仓实验设备厂; 透析袋, 上海绿鸟科技发展有限公司; 冷冻干燥器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 754 紫外分光光度计, FA1104N 型电子天平, 上海精密科学仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 党参多糖的制备: 取党参饮片 500 g, 粉碎, 置

索式提取器中, 用 80% 乙醇加热回流 3 次, 回流至液体接近无色, 药渣 80 °C 超声处理 2 次, 每次 10 min, 加 20 倍水煎煮 3 次, 第 1 次 2 h, 第 2 次 1 h, 第 3 次 0.5 h, 滤过, 合并 3 次滤液, 浓缩, 加 95% 乙醇使醇浓度达到 80%, 静置沉淀 12 h, 离心, 取沉淀分别用乙醇、丙酮洗涤, 干燥, 得粗多糖。将粗多糖配成 5% 溶液在 -20 °C 冻融数次, 先用 Savege 法除蛋白, 然后过 Sephadex G-75 柱, 流水透析 72 h, 干燥, 得精制的党参多糖。

2.2 正交试验的因素与水平: 根据文献报道^[3,4], 反应温度、试剂配比、反应时间对修饰的影响较大, 因此选取反应温度(A)、氯磺酸与吡啶的配比(B)和反应时间(C)为因素, 确立 3 种水平, 按照 $L_9(3^4)$ 正交表设计修饰条件。

2.3 酯化修饰: 将带有搅拌和冷凝装置的三颈烧瓶置盐水-冰浴中, 按表 1 设定的氯磺酸与吡啶的体积比, 先加入预冷的无水吡啶 50 mL, 剧烈搅拌, 使之充分冷却, 再将氯磺酸 40 min 内逐滴加入, 见烧瓶中出现大量淡黄色固体, 停止反应, 共制备 9 种酯化试剂。精确称取党参多糖 400 mg, 加入酯化试剂中, 按表 1 设定的反应温度和时间在水浴中搅拌反应。反应结束后冷却至室温, 反应液加入预冷的 100 mL 冰水中, 用 5 mol/L NaOH 溶液中和至 pH 7。加入 3 倍体积的无水乙醇, 静置 24 h, 沉淀用自来水透析 2 d, 蒸馏水透析 1 d, 透析液冷冻干燥得硫酸化党参多糖(sulfated *Codonopsis pilosula* polysaccharides, sCPPS), 共得到 9 种 sCPPS。

2.4 硫酸基取代度的测定^[5]

2.4.1 标准曲线的制作: 称取 105 °C 干燥恒重的硫酸钾 100 mg, 以 1 mol/L HCl 定容至 100 mL 得到 1 mg/mL 的硫酸基标准溶液, 取 5 个带塞试管, 分别量取 0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 mL 硫酸钾, 然后补足 1 mol/L HCl 至 0.20 mL, 各管都加入 3%

三氯乙酸 3.8 mL 溶液, 再加氯化钡-明胶溶液 1 mL, 室温静置 15 min 后在 360 nm 处测其吸光值 A_1 , 再以相同体积的 0.5% 明胶溶液代替氯化钡-明胶溶液依法操作, 在 360 nm 处测其吸光值 A_2 。以硫酸基的浓度为横坐标, $(A_1 - A_2)$ 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 1.65X + 0.0226$, $R^2 = 0.9939$ 。

2.4.2 样品测定: 称取各硫酸化多糖样品 5 mg, 溶于 1 mol/L HCl 溶液中, 100 °C 沸水浴水解 4 h, 吸取 0.2 mL 样品同标准曲线的制作项下方法分析, 测量氯化钡-明胶与明胶的吸光度之差。然后代入回归方程, 计算取代度 (DS) [$DS = 1.62S / (32 - 1.02S)$, S 为样品中硫酸基的量]。

2.5 正交试验结果: 由表 1 可见, 在 80 °C、试剂配比 1:8、反应时间 1 h 的条件下的产物得率最高, 达到 1.82。在 80 °C, 试剂配比为 1:6, 时间 3 h 条件下产物的取代度最高, 达 1.83。以产物得率为指标的极差 (R) 值可以看出, 各因素对产物得率影响为 $B > A > C$, 氯磺酸与吡啶的配比对产物得率的影响最大, 最佳的修饰条件为 $A_3 B_2 C_3$; 以取代度为指标的极差值可见, 各因素对取代度的影响为 $C > B > A$, 时间对取代度的影响最大, 最佳组合为 $A_2 B_2 C_3$ 。

2.6 各因素对产物得率和取代度的影响: 反应温度越高, 产物得率就高; 试剂配比为 1:6 时产物得率最高, 继续提高试剂配比产物得率变化不大; 反应时间为 3 h 时产物量最高。以产物得率为指标的方差分析可见, 反应温度、试剂配比和反应时间的 F 值分别为 0.835、2.153、0.308, P 值分别为 0.545、

0.317、0.764, 均大于 0.05 (表 2), 说明各因素不同水平对提取率的影响无显著差异。

随着反应时间的延长取代度逐渐提高, 反应 3 h 时取代度最高; 反应温度为 80 °C 取代度最高, 升高到 95 °C 时取代度下降; 氯磺酸与吡啶配比在 1:6 时取代度达到最高, 为 1.83, 再提高配比取代度下降。以取代度为指标的方差分析可见, 反应温度、试剂配比和反应时间的 F 值分别为 1.578、3.184、4.249, P 值分别为 0.388、0.239、0.191, 均大于 0.05 (表 2), 说明各因素不同水平对取代度的影响无显著差异。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 1 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test					
编号	A 温度/°C	B 配比	C 时间/h	产物得率/%	取代度
1	60	1:4	1	48	0.36
2	60	1:6	2	173	1.47
3	60	1:8	3	151	1.41
4	80	1:4	2	98	1.22
5	80	1:6	3	167	1.83
6	80	1:8	1	182	1.26
7	95	1:4	3	170	1.48
8	95	1:6	1	176	1.31
9	95	1:8	2	163	1.17
产物得率					
k_1	124.0	105.3	135.3	126.0	
k_2	149.0	172.0	144.7	175.0	
k_3	169.7	165.3	162.7	141.7	
R	45.7	66.7	27.4	49.0	
取代度					
k_1	1.080	1.020	0.977	1.120	
k_2	1.437	1.537	1.287	1.403	
k_3	1.320	1.280	1.573	1.313	
R	0.357	0.517	0.596	0.283	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

	来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
产物得率	固定模型	12 384.667 (a)	6	2 064.111	1.099	0.548
	交互	195 953.778	1	195 953.778	104.299	0.009
	温度	3 137.566	2	1 568.778	0.835	0.545
	试剂配比	8 088.889	2	4 044.444	2.153	0.317
	时间	1 158.222	2	579.11	0.308	0.764
	误差	3 757.566	2	1 878.778		
	总和	212 096	9			
	校正总和	16 142.222	8			
取代度	固定模型	1.133 (b)	6	0.189	3.004	0.271
	交互	14.720	1	14.72	234.105	0.004
	温度	0.198	2	0.099	1.578	0.388
	试剂配比	0.400	2	0.200	3.184	0.239
	时间	0.534	2	0.267	4.249	0.191
	误差	0.126	2	0.063		
	总和	15.579	9			
	校正总和	1.259	8			

a: $R^2 = 0.767$ (Adjusted $R^2 = 0.069$); b: $R^2 = 0.900$ (Adjusted $R^2 = 0.600$)

综合考虑产物得率和取代度的情况, 试剂配比对产物得率的影响较大, 故选择试剂配比为 1: 6, 时间对取代度的影响较大, 选择反应时间 3 h, 温度对二者影响都不明显, 由于高温会对多糖结构产生影响, 故选择反应温度为 80 ℃。

2.7 验证试验结果: 在反应温度 80 ℃、试剂配比 1: 6、反应时间 3 h 的最佳条件下, 进行 3 次酯化操作, 获得的 3 个 sCPPS 的得率分别为 171%、165%、168%, 取代度分别为 1.42、1.75、1.63, 与正交试验结果的差异不显著, 说明此条件为最佳修饰条件。

3 讨论

多糖硫酸酯化的方法很多, 一般吡喃型多糖采用 Wolfrom^[6] 方法, 呋喃型采用 Nagasawa 方法。常用方法包括浓硫酸法、三氧化硫-吡啶法、氯磺酸-吡啶法、氯磺酸-甲酰胺法等。氯磺酸-吡啶法是在无水环境吡啶中, 利用氯磺酸中的磺酸根取代单糖残基上一个或若干羟基上的氢得到硫酸酯多糖。党参多糖为吡喃型多糖, 所以采用氯磺酸-吡啶法修饰, 此方法相对简单, 取代度高, 产物回收方便^[8]。

由于反应温度、试剂配比和反应时间对多糖的硫酸化修饰有显著影响, 本研究用正交试验优选出党参多糖硫酸化修饰的最佳条件, 反应温度 80 ℃, 氯磺酸-吡啶配比为 1: 6, 反应时间为 3 h。反应温度为 80 ℃时, 取代度最高、产物得率较高, 若再升高温度可能使多糖结构破坏。有人研究了香菇多糖的

硫酸化修饰, 证明温度达到 90 ℃时产物收率急剧下降^[9]。本实验发现, 试剂配比在 1: 4 时, 氯磺酸-吡啶盐出现板结, 搅拌困难, 使产物得率和取代度都较低, 这与卢宇等^[9]的报道一致。反应时间长, 多糖与酯化试剂充分接触反应越完全, 可使取代度升高。综合考虑 3 个因素, 因此选择了适中反应温度、试剂配比和较长的反应时间。同时, 验证试验也证明了选择的条件是最佳条件。

参考文献:

- [1] 任丽清, 张 静, 刘志存, 等. 党参多糖的分离纯化及其结构研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 986-989
- [2] Nishimura S I, Kai H, Shibada K, et al. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: Specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates [J]. *Carbohydr Res*, 1998, 306: 427-432
- [3] 陈景耀, 吴国荣, 王建安, 等. 正交试验优选白芨多糖硫酸酯化工艺的研究[J]. 中草药, 2005, 36(1): 432-461
- [4] 黄小燕, 胡元亮, 卢 宇, 等. 正交实验优选黄芪多糖硫酸化修饰条件及修饰产物抗 IBDV 活性测定[J]. 中药材, 2008, 31(4): 588-592
- [5] 丛建波, 王长振, 李 妍, 等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定-硫酸钡比浊法[J]. 解放军药学报, 2003, 19(3): 152-153
- [6] Wolfrom M L, Juliano B O. Chondroitin sulfate modification. sulfated and ndeacetylated preparation [J]. *J Am Chem Soc*, 1960, 82(11): 2588-2592
- [7] 燕 航, 钟耀广, 王淑琴, 等. 硫酸酯化香菇多糖衍生物制备的研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(3): 44-45
- [8] 刘占峰, 孙汉文. 多糖的化学修饰研究进展[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2005, 25(1): 104-108
- [9] 卢 宇, 胡元亮, 孙峻岭, 等. 淫羊藿多糖硫酸化修饰条件的优化[J]. 中草药, 2008, 39(3): 357-360

Box-Behnken 设计-效应面法优化木犀草素-β-环糊精包合物的 制备工艺研究

伍永富¹, 吴品江², 魏 萍², 吴大章^{3*}

(1. 太极集团重庆涪陵制药有限公司, 重庆 408000; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137;

3. 太极集团重庆桐君阁药厂, 重庆 400066)

摘 要: 目的 优化木犀草素-β-环糊精包合物的制备工艺。方法 采用饱和水溶液法包合木犀草素, 以包合率、收率和总评“归一值”为评价指标, 采用 Box-Behnken 设计考察 β-环糊精-木犀草素投料比例、包合时间、包合温度对制备工艺的影响, 对结果进行多元线性和二项式拟合, 效应面法选取最佳工艺条件进行预测分析。结果 从相关系数上看, 各项指标二项式拟合方程均优于多元线性回归方程, 根据优化制备工艺制得木犀草素-β-环糊精包合物的平均包合率为 75%, 收率为 66%。结论 优化的木犀草素-β-环糊精包合物制备工艺稳定可行, 包合率和收率同时都高, 可用于生产。

关键词: 木犀草素; β-环糊精包合物; Box-Behnken 设计; 效应面法

* 收稿日期: 2009-09-21

作者简介: 伍永富(1974—), 男(土家族), 重庆黔江人, 制药工程师, 硕士研究生, 从事中药生产新技术和新剂型研究。

Tel: (023) 72801079 E-mail: five1975@126.com

* 通讯作者 吴大章 E-mail: 271241334@qq.com