

Box-Behnken 设计-响应面法优化地龙活性组分的冻干工艺

陈立军^{1,3}, 黄文芳^{1,3}, 石召华^{1,2*}

1. 武汉爱民制药有限公司, 湖北 鄂州 436070
2. 湖北省天然组分药物工程技术研究中心, 湖北 鄂州 436070
3. 湖北李时珍药物研究院, 湖北 武汉 430061

摘要: **目的** 优选地龙活性组分的冻干工艺。**方法** 采用单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法, 以冻干率为指标, 考察 1 次升华温度、升华时间、解析干燥温度、解析干燥时间等因素对冻干工艺的影响, 优化地龙活性组分的冻干工艺, 采用 HPLC 法, 测定优化后工艺样品的指纹图谱, 并比较其与地龙药材指纹图谱相似度, 确定最佳冻干工艺。**结果** 确定地龙活性组分的最佳冻干工艺条件: 预冻温度 $-26.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 预冻 4 h, 升华干燥温度 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、升华时间 7 h、解析干燥温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、解析干燥时间 3.5 h, 冻干率为 96.55%, 与对照药材的氨基酸指纹图谱相似度均大于 0.9。**结论** Box-Behnken 响应面法用于地龙活性组分冻干工艺条件的优选是可行的, 模型预测效果较好, 优化工艺具备可行性。

关键词: 地龙; 活性组分; 指纹图谱; 冷冻干燥; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)21-3166-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.007

Optimization of technology of freeze-dried powder of various fractions from *Pheretima* by Box-Behnken design and response surface method

CHEN Li-jun^{1,3}, HUANG Wen-fang^{1,3}, SHI Zhao-hua^{1,2}

1. Wuhan Aimin Pharmaceutical Co., Ltd., Ezhou 436070, China
2. Hubei Engineering Technology Centre of Natural Component Medicine, Ezhou 436070, China
3. Lishizhen Institute of Natural Medicine, Wuhan 430061, China

Abstract: Objective To optimize the technology of freeze-dried powder of various fractions from lumbricus (*Pheretima*) by Box-Behnken design and response surface method. **Methods** Using single factor experiment with Box-Behnken response surface method, freeze-dried rate as the index, the effects of sublimation temperature, sublimation time, analytical drying temperature, and drying time on the freeze-drying process were observed; The freeze-drying process of the active components in lumbricus was optimized; Using HPLC method, the fingerprint of the sample by the optimized technology was investigated, and the similarity of fingerprint was compared with the earthworm medicine, and the optimum freeze-drying process was obtained. **Results** The best freeze-drying process conditions of active components in lumbricus were as follows: frozen temperature of $-26.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, precool for 4 h, sublimation drying temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sublimation time of 7 h, analytical drying temperature of $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, analytical drying time of 3.5 h, freeze-dried rate of 96.55%, and compared with medicinal materials of amino acid, the similarities of fingerprint were both greater than 0.9. **Conclusion** Box-Behnken response surface method is used for the freeze-drying process conditions of active components in the lumbricus, the optimization is feasible, the effect of model is good, and this optimization process has the feasibility. **Key words:** lumbricus (*Pheretima*); active components; fingerprint; freeze-drying; Box-Behnken design and response surface method

收稿日期: 2015-06-08

基金项目: 国家“十二五”重大新药创制科技重大专项资助项目(2014ZX09201-022-03); 湖北省重大科技创新专项资助项目(2013ACC005)

作者简介: 陈立军, 工程师, 从事中药及天然药物冻干制剂研究。Tel: 18071097003 E-mail: 0207130031@163.com

*通信作者 石召华, 博士, 高级工程师。Tel: (0711)3818216 E-mail: whimzy@163.com

地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier), 习称“广地龙”^[1], 性味咸寒, 现代药理研究表明, 地龙具有溶栓、抗肿瘤、增强免疫力、降压镇静、改善微循环和心脑血管病理状态、调节肝脏等作用, 其主要活性成分是可溶性蛋白质^[2-6]。有研究发现可溶性蛋白是地龙溶血栓、抗血栓的主要活性物质^[7]。

目前, 对从地龙中提取得到地龙蛋白的工艺研究较多^[8-9], 但对已获得的活性蛋白后续处理工艺的研究较少, 因此本实验旨在能够最大程度确保其活性组分有效性的基础上, 通过工艺处理后, 较稳定地保存已提取蛋白。本实验采用单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法^[10], 以冻干率为指标, 优化地龙活性组分的冻干工艺, 采用 HPLC 法, 测定优化后工艺样品的指纹图谱, 并比较其与地龙药材指纹图谱相似度, 确定最佳冻干工艺, 为地龙同体制剂的研制提供实验依据。

1 仪器与试剂

UV-2600 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 电子分析天平, 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司; LYO-0.5 (CIP) 真空冷冻干燥机, 上海东富龙科技股份有限公司; SPX-250BZ 型生化培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; TD5A-WS 台式低速离心机, 长沙湘鹰离心机有限公司; 安捷伦 1260 液相色谱仪系统, 美国安捷伦公司; 相似度软件为“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”, 中国药典委员会。17 种氨基酸混合对照品(门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸)、衍生试剂 A (异硫氰酸苯酯-乙腈溶液) 和衍生试剂 B (三乙胺-乙腈溶液) 均来自月旭公司氨基酸分析包; 尿激酶、凝血酶(牛血)、纤维蛋白原(牛血)均购自中国食品药品检定研究院, 批号分别为 140604-201224、140605-201125、140607-201338; 琼脂糖, BR 级, 批号 121129, 上海如吉生物科技发展有限公司; 地龙对照药材, 批号 120987-201107, 购自中国食品药品检定研究院; 实验用水为娃哈哈纯净水; 其他试剂为分析纯。地龙药材购自亳州中药材市场, 产地广东佛山, 批号 20131106, 经湖北省药学会中药鉴定分会陈科力教授鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体。

2 方法与结果

2.1 地龙药材提取物的制备

称取地龙粗粉 100 g, 加水 500 mL, 浸泡 60 min, 超声处理(250 W, 50 Hz) 60 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 得上清液。分别将 A、B 2 种衍生试剂用乙腈稀释至原来浓度的 1/5, 精密量取上清液 1 mL, 置于试管中, 加入稀释后的 A 溶液 0.5 mL 和稀释后的 B 溶液 0.5 mL, 涡旋混合 1 min, 在 50 °C 水浴中加热 45 min, 取出, 加入正己烷溶液 1 mL, 振摇, 涡旋混合 1 min, 静置 30 min, 吸取下层澄清液体, 用孔径为 0.45 μm 有机滤膜滤过, 即得到衍生化后的样品溶液。

2.2 评价指标

2.2.1 冻干率^[11] 冻干率是物料冻干后脱水质量占物料水分总量的比例, 本实验采用费休氏水分测定法测定样品中的含水量从而计算出冻干率。

$$\text{冻干率} = 1 - \text{含水量}$$

2.2.2 指纹图谱相似度分析^[12-13]

(1) 对照品溶液的制备: 取 Welch 公司 17 种氨基酸混合对照品溶液(原浓度)用水稀释至原来浓度的 1/10 作为对照品溶液。

(2) 色谱条件: 色谱柱为 Ultimate Amino Acid AAA 氨基酸分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 月旭材料科技有限公司); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 5 μL; 检测波长 254 nm。流动相 A 为 0.1 mol/L 醋酸钠溶液(pH 6.5)-乙腈(93:7); 流动相 B 为水-乙腈(20:80), 二元梯度洗脱, 洗脱程序: 0~11 min, 100%~93% A; 11~13.9 min, 93%~88% A; 13.9~14 min, 88%~85% A; 14~29 min, 85%~66% A; 29~32 min, 66%~30% A; 32~35 min, 30%~0% A; 35~45 min, 0% A; 45~60 min, 100% A。

(3) 精密密度试验: 取“2.1”项下衍生化后供试品溶液, 按照上述色谱条件连续进样 6 次。将 6 次测定图谱转化为 AIA 格式后依次导入相似度软件, 输出 17 个共有峰峰面积的 RSD 为 0.12%~3.43%, 保留时间的 RSD 为 0.04%~0.31%, 表明仪器精密密度良好。

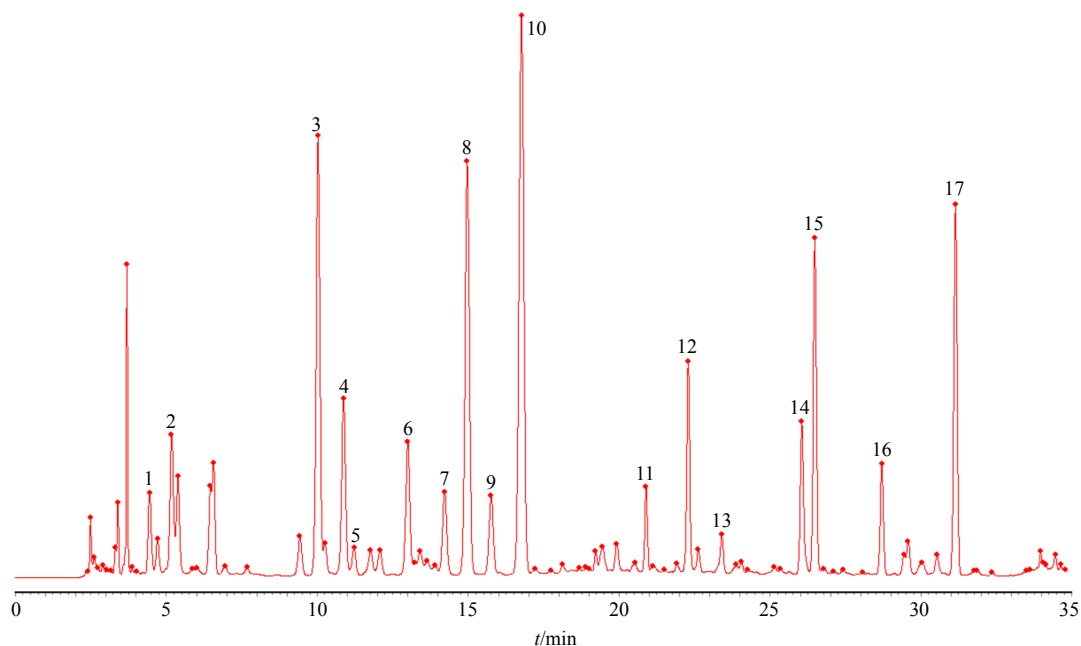
(4) 稳定性试验: 取“2.1”项下制备的同 1 份衍生化后供试品溶液, 在上述色谱条件下分别在 0、2、4、6、8、12、24、48、72 h 进样, 进行测定。测定图谱转化为 AIA 格式后依次导入相似度软件, 输出 17 个共有峰峰面积的 RSD 为 0.17%~2.81%,

保留时间的 RSD 为 0.03%~0.13%，表明样品在 72 h 内稳定。

(5) 重复性试验：取“2.1”项下平行制备的 6 份衍生化后供试品溶液，按照上述色谱条件进行测定。测定图谱转化为 AIA 格式后依次导入相似度软件，输出 17 个共有峰峰面积的 RSD 为 0.41%~3.58%，保留时间的 RSD 为 0.03%~0.15%，表明方法的重复性良好，证明分析方法和提取工艺的稳定性及可靠性。

(6) 共有图谱的建立：取“2.1”项下的衍生化

后供试品溶液，按照上述色谱条件连续进样 10 次，取对照品溶液，按色谱条件项下条件进行测定并标示，如图 1 所示，峰 1~17 为地龙氨基酸组分提取物中含有的 17 种氨基酸成分，分别为门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸。其中峰 10（胱氨酸）在 HPLC 图谱中分离良好，质量分数较高且稳定，所以选择其为参照峰，共标示了 17 个共有峰。



1-门冬氨酸 2-谷氨酸 3-丝氨酸 4-甘氨酸 5-组氨酸 6-精氨酸 7-苏氨酸 8-丙氨酸 9-脯氨酸 10-胱氨酸 11-缬氨酸 12-蛋氨酸
13-异亮氨酸 14-亮氨酸 15-酪氨酸 16-苯丙氨酸 17-赖氨酸
1-aspartic acid 2-glutamic acid 3-serine 4-glycine 5-histidine 6-arginine 7-threonine 8-alanine 9-proline 10-cystine acid 11-valine
12-methionine 13-isoleucine 14-leucine 15-tyrosine 16-phenylalanine 17-lysine

图 1 地龙氨基酸组分提取物参照图谱

Fig. 1 Reference fingerprint of extract components of amino acid in lumbricus

2.3 冻干工艺单因素试验考察

2.3.1 共晶点（共融点）的测定及预冻温度的确定
溶液装入 10 mL 烧杯中，置于冻干机前箱，插入共晶点探头及温度探头，启动共晶点测定仪，设定冻干机预冻温度为 -50 °C，预冻 3 h，测定共晶点。按照冻干理论^[7]，为保证物料完全冻结，产品预冻温度一般应选择在其共晶点温度以下 5~15 °C 为宜，经测定该制品溶液的共晶点为 -16.5 °C，共融点为 -17.9 °C，据此推测预冷冻温度应低于 -26.5 °C，为确保产品在预冻时完全冻结，试验选择 -26.5 °C 为预冻温度。

2.3.2 预冻时间的确定 精密吸取地龙药液，在 -26.5 °C 下预冻，在 -25 °C 进行升华干燥 16 h，40 °C 进行解析干燥 6 h，绝对压力维持在 15 Pa 左右^[14]，预冻时间分别设置为 2、3、4、5 h，以冻干产品外观性状和冻干率为指标考察不同预冻时间对产品质量的影响，结果见表 1。预冻时间仅 2 h 时，冻干产品外观收缩，呈黄色团块，随着预冻时间的延长，产品的性状良好，质地疏松，在预冻时间为 4~5 h 时，冻干品的外观及冻干率质量最好，因此确定预冻时间为 4 h。

2.3.3 升华干燥温度对产品质量影响的单因素试验

表 1 预冻时间对产品质量的影响

预冻时间/h	性状	冻干率/%
2	收缩, 黄色团块	50.00
3	略有鼓泡, 淡黄色块状物, 质地疏松	93.46
4	淡黄色块状物, 质地疏松	94.31
5	淡黄色块状物, 质地疏松	94.33

升华干燥又称第 1 阶段干燥, 是指冻结产品中的冰晶升华成水蒸气逸出而使产品脱水干燥。当全部冰晶除去时, 第 1 阶段干燥完成, 此时除去全部水分的 90%左右。升华时所需热量由搁板供给, 产品在干燥时期温度必须低于其共融点的温度, 同时考虑到产能, 因此在-26.5 °C 的温度下预冻 4 h, 绝对压力维持在 15 Pa 左右, 40 °C 进行解析干燥 6 h 的条件下, 选择升华干燥温度-18、-20、-22、-24 °C 4 个水平进行单因素试验, 结果见表 2。升华阶段搁板温度在低于共融点下, 温度越高, 产品的性状良好, 质地疏松, 颜色均匀, 产品冻干率提高; 温度越低, 在同等升华干燥时间内, 产品外观颜色深, 冻干率明显降低, 可能是产品干燥不充分, 需要延长升华干燥时间, 但是从能耗角度, 已经不具备可行性, 因此确定升华干燥温度-18、-20、-22 °C 作为 Box-Behnken 设计实验的 3 个水平。

表 2 升华干燥温度对产品质量的影响

搁板温度/°C	性状	冻干率/%
-18	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	92.60
-20	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色较均匀	96.01
-22	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	94.18
-24	质地疏松, 淡黄色块状, 中间颜色深	88.75

2.3.4 升华时间对产品质量影响的单因素试验 在升华干燥阶段, 升华时间是很关键的因素, 时间太短, 搁板温度很快达到预定的温度, 使供给物料的热量也增加的过快, 导致超过物料的共融点温度使其融化。因此在确定-26.5 °C 的温度下预冻 4 h, 40 °C 进行解析干燥 6 h, 暂定升华温度为-20 °C 不变的条件下, 选择以下 4 个时间段位因素进行考察, 结果见表 3。进入升华干燥阶段, 升华时间过短会导致冰晶融化, 冻干率很低, 随着升温时间的延长, 产品性状良好, 时间过长会加长冻干周期且消耗不

表 3 升华时间对产品质量的影响

升华时间/h	性状	冻干率/%
5	收缩, 颜色不均匀	33.00
6	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	94.18
7	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	96.01
8	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	95.60

必要的能量, 因此确定升华时间 6、7、8 h 作为 Box-Behnken 设计实验的 3 个水平。

2.3.5 解析干燥温度对产品质量影响的单因素试验 为了使产品达到合格的残余含水量, 必须对产品进一步干燥, 产品的热量主要靠搁板供给, 所以在-26.5 °C 的温度下预冻 4 h, -20 °C 进行升华干燥 7 h 不变的条件下, 选择 20、25、30、35 °C 4 个温度进行单因素试验, 结果见表 4。在解析干燥阶段, 随着温度的上升, 冻干效果显著, 当搁板温度为 30 °C 时, 冻干产品性状良好, 骨架结构完整, 海绵状, 颜色均匀, 冻干效果已经较好, 随着搁板温度继续增高, 冻干率也不能增加, 且增加产能, 因此确定解析温度 20、25、30 °C 作为 Box-Behnken 设计实验的 3 个水平。

表 4 解析干燥温度对产品质量的影响

搁板温度/°C	性状	冻干率/%
20	质地疏松, 黄色块状物, 中间颜色稍深	93.08
25	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	94.25
30	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	95.51
35	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	95.48

2.3.6 解析干燥时间对产品质量影响的单因素试验 解析干燥时间同样是影响冻干工艺样品的参数之一, 因此在-26.5 °C 的温度下预冻 4 h, -20 °C 进行升华干燥 7 h, 解析干燥温度暂定为 30 °C 不变的条件下, 选择以下 4 个时间进行试验, 结果见表 5。在解析干燥阶段, 随着解析干燥时间的延长, 冻干效果显著, 冻干周期也延长, 能耗越来越高, 至解析干燥 4 h 后, 再延长时间, 已基本无影响, 因此确定解析干燥时间 3.0、3.5、4.0 h 作为 Box-Behnken 设计实验的水平。

2.4 响应面优化试验

2.4.1 试验设计及结果 通过预试验和单因素试验

表 5 解析干燥时间对产品质量的影响

Table 5 Effects of analytical drying time on product quality

解析时间/h	性状	冻干率/%
3.0	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	95.06
3.5	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	95.25
4.0	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	96.01
4.5	质地疏松, 淡黄色块状, 颜色均匀	95.94

的考察, 仅确定部分参数, 其最佳工艺需进一步优选, 本实验选取升华干燥温度 (A)、升华时间 (B)、解析干燥温度 (C)、解析干燥时间 (D) 为考察因素, 以冻干率为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应面法对工艺进行优化, 考察各因素对产品质量的综合影响, 试验设计及结果见表 6。方差分析见表 7。

2.4.2 回归模型的建立及方差分析 采用 Design

表 6 地龙活性组分冻干工艺响应面优化试验设计及结果

Table 6 Design and experimental results of process of freeze-dried optimization of active components in lumbricus

试验号	因素				冻干率/%		试验号	因素				冻干率/%	
	A/°C	B/h	C/°C	D/h	实测	预测		A/°C	B/h	C/°C	D/h	实测	预测
1	-18 (1)	7 (0)	25 (-1)	3.5 (0)	94.06	94.44	15	-20 (0)	8 (1)	30 (0)	3.0 (-1)	91.28	91.67
2	-18 (1)	6 (-1)	30 (0)	3.5 (0)	93.90	93.63	16	-20 (0)	6 (-1)	35 (1)	3.5 (0)	94.66	94.36
3	-20 (0)	6 (-1)	30 (0)	4.0 (1)	93.82	94.21	17	-20 (0)	7 (0)	30 (0)	3.5 (0)	96.57	96.62
4	-20 (0)	7 (0)	30 (0)	3.5 (0)	96.50	96.62	18	-20 (0)	7 (0)	30 (0)	3.5 (0)	96.79	96.62
5	-20 (0)	8 (1)	30 (0)	4.0 (1)	94.45	94.81	19	-20 (0)	6 (-1)	30 (0)	3.0 (-1)	90.58	91.01
6	-22 (-1)	6 (-1)	30 (0)	3.5 (0)	94.79	94.67	20	-22 (-1)	7 (0)	35 (1)	3.5 (0)	94.76	95.16
7	-18 (1)	7 (0)	30 (0)	3.0 (-1)	89.92	89.64	21	-20 (0)	7 (0)	35 (1)	3.0 (-1)	90.66	90.37
8	-18 (1)	8 (1)	30 (0)	3.5 (0)	94.52	94.26	22	-22 (-1)	8 (1)	30 (0)	3.5 (0)	95.42	95.30
9	-20 (0)	7 (0)	25 (-1)	4.0 (1)	93.96	93.86	23	-18 (1)	7 (0)	35 (1)	3.5 (0)	91.12	91.82
10	-20 (0)	6 (-1)	25 (-1)	3.5 (0)	94.82	94.69	24	-20 (0)	7 (0)	25 (-1)	3.0 (-1)	90.82	90.69
11	-22 (-1)	7 (0)	30 (0)	4.0 (1)	93.96	93.84	25	-18 (1)	7 (0)	30 (0)	4.0 (1)	93.07	92.80
12	-20 (0)	7 (0)	35 (1)	4.0 (1)	93.79	93.54	26	-20 (0)	8 (1)	35 (1)	3.5 (0)	95.27	95.00
13	-20 (0)	8 (1)	25 (-1)	3.5 (0)	95.41	95.31	27	-22 (-1)	7 (0)	25 (-1)	3.5 (0)	93.10	93.18
14	-22 (-1)	7 (0)	30 (0)	3.0 (-1)	90.79	90.67							

表 7 方差分析

Table 7 ANOVA regression analysis

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
A	3.23	1	17.71	0.001 2	**	A ²	14.92	1	81.70	<0.000 1	**
B	1.19	1	6.52	0.025 3	*	B ²	1.25	1	6.84	0.022 6	*
C	0.30	1	1.66	0.221 3		C ²	8.94	1	48.98	<0.000 1	**
D	30.08	1	164.75	<0.000 1	**	D ²	55.00	1	301.20	<0.000 1	**
AB	2.50×10 ⁻⁵	1	1.37×10 ⁻⁴	0.990 9		残差	2.19	12			
AC	5.29	1	28.97	0.000 2	**	失拟项	2.15	10	9.37	0.100 2	
AD	1.00×10 ⁻⁴	1	5.48×10 ⁻⁴	0.981 7		纯误差	0.046	2			
BC	1.00×10 ⁻⁴	1	5.48×10 ⁻⁴	0.981 7		总和	103.27	26			
BD	1.23×10 ⁻³	1	6.71×10 ⁻³	0.936 1		变异系数	0.004 6				
CD	2.50×10 ⁻⁵	1	1.37×10 ⁻⁴	0.990 9		校正决定系数	0.978 8				

*P<0.05, 模型或考察因素有显著影响; **P<0.01, 模型或考察因素有极显著影响

*P < 0.05, model or investigation factor with significant effect; **P < 0.01, model or investigation factor with extremely significant effect

Expert 8.05 软件, 分别对各因素水平进行多元线性回归和非线性回归(二项式拟合), 建立地龙活性组分冻干率(Y)对4个因素(A、B、C、D)的2次回归模型方程为 $Y=96.62-0.52 A+0.32 B-0.16 C+1.58 D-0.002 5 AB-1.15 AC-0.005 AD+0.005 BC-0.017 BD-0.002 5 CD-1.67 A^2-0.48 B^2-1.29 C^2-3.21 D^2$ 。

经方差分析(表7)得知, 自变量1次项B, 2次项B²显著(P<0.05), 1次项A、D, 2次项AC、A²、C²、D²极显著(P<0.01), 表明模型具有统计学意义。失拟项用来表示所用模型与实验拟合的程

度, 即二者差异的程度, 本例P值为0.100 2>0.05, 对模型是有利的, 无失拟因素存在。进一步, 校正决定系数(0.978 8>0.80)和变异系数为0.46%, 说明该模型只有2.12%的变异, 表明该模型拟合优度较好, 可用该模型及回归方程代替试验真实点对实验结果进行分析和预测(预测结果见表6)。

2.4.3 反应条件的优化及模型验证 各因素之间的响应面图和等高线图见图2, 由Design Expert 8.05 软件分析得响应面值最大时, A、B、C、D对应的编码值分别为0、0、0、0, 与之对应的地龙活性组分最佳冻干工艺条件为升华干燥温度-20℃、升华

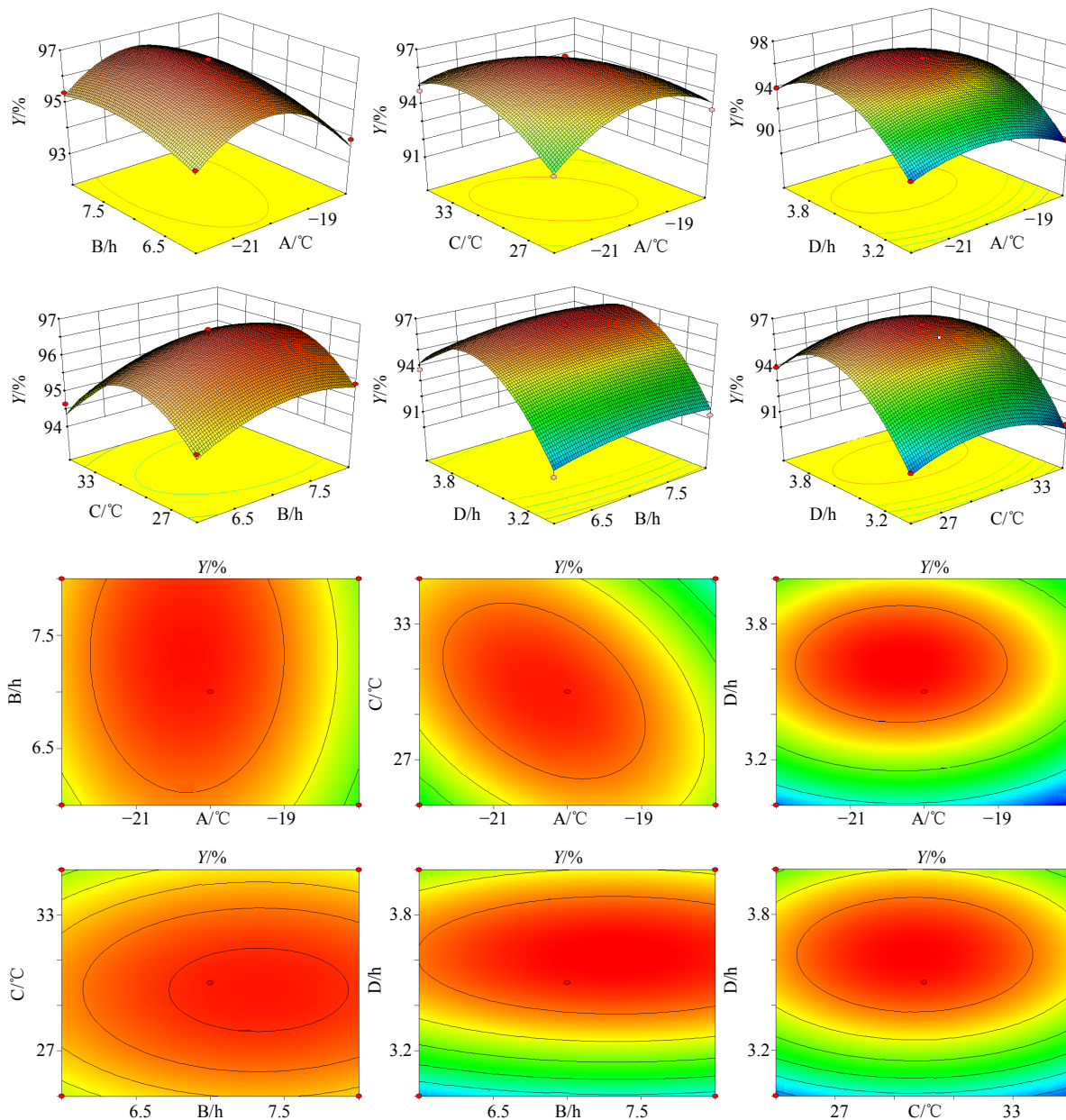


图2 Y与4因素的三维效应面图和等高线图

Fig. 2 3D Response surface plots and contour plots of Y and four factors

时间 7 h、解析干燥温度 30 °C、解析干燥时间 3.5 h，此时冻干率的理论值达 96.62%。

2.5 验证试验

为检验单因素及响应面预测的可靠性，选择最佳冻干工艺条件（预冻温度-26.5 °C，预冻 4 h，升华干燥温度-20 °C、升华时间 7 h、解析干燥温度 30 °C、解析干燥时间 3.5 h）进行 3 批放大工艺验证试验，测定冻干率，并为确认本工艺不影响地龙氨基酸组分的活性，将验证批样品与对照药材的氨基酸指纹图谱进行相似性分析，判断是否最大程度保留其活性组分的有效性^[2-3]。

结果 3 批样品的冻干率分别为 96.59%、96.45%、96.61%，指纹图谱相似度分别为 0.912、0.905、0.915。采用最佳冻干工艺条件得到的地龙提取物颜色均匀，性状良好，测得冻干率在 96.55%，与预测值 96.62% 基本吻合，说明响应面法优化的冻干工艺条件稳定，与对照药材的氨基酸指纹图谱相似度均大于 0.9，表明该工艺具备可行性。

3 讨论

动物药活性成分以多肽和蛋白质为主，地龙中含量最为丰富的物质即为蛋白质，但其主要成分氨基酸类具有水溶性和对热不稳定的性质，因此对提取后活性成分处理和保存是非常关键的。本实验采用冷冻干燥技术，应用单因素及 Box-Behnken 响应面设计方法，对其活性组分冻干工艺进行优化。结果表明，此优化方法在保证获得较好冻干率的基础上，能够最大程度地保留地龙提取物有效成分的活性，工艺稳定可行，为地龙制剂研究及临床应用提供一定的实验基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 吴 畏, 阳崇德, 刘才平. 地龙药理作用的研究新进展 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18(2): 48-49.

- [3] Xie J B, He W G, Weng N, *et al.* Extraction and isolation of the antitumor protein components from earthworm (*eisenia fetida* Andrei) and the antitumor activity [J]. *Chin J Biomol Biol*, 2003, 19(3): 359-366.
- [4] Trisina J, Sunardi F, Suhartono M T, *et al.* DLBS1033, a protein extract from *Lumbricus rubellus*, possesses antithrombotic and thrombolytic activities [J]. *Biomed Biotechnol*, 2011. doi: 10.1155/2011/519652.
- [5] 丁文明, 李春兰, 丁 伟, 等. 蚓激酶对老年冠性病血液流变异常及甲微循环障碍的近期疗效 [J]. 中国微循环杂志, 1999, 3(3): 159-159.
- [6] 李淑兰, 谢桂芹, 曲竟南, 等. 地龙降压作用的研究 [J]. 中医药信息杂志, 1995, 12(3): 22-24.
- [7] Yan X M, Kim C H, Lee C K, *et al.* Intestinal absorption of fibrinolytic and proteolytic lumbrokinase extracted from earthworm, *eisenia and rei* [J]. *Physiol Pharmacol*, 2010, 14(2): 71-75.
- [8] 杨丰云, 付延明, 郭立玮, 等. 响应面分析法优化湿法超微粉碎地龙蛋白的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 33-37.
- [9] 何 超, 索绪斌, 张 涵, 等. 响应曲面法优化鲜地龙可溶性蛋白提取工艺 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 758-762.
- [10] 王章姐, 胡容峰, 王国凯, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化柚皮素自微乳给药系统 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2461-2466.
- [11] 石召华, 陈立军, 黄文芳, 等. 七叶皂苷钠冻干粉针的工艺优化研究 [J]. 中药材, 2014(7): 1265-1269.
- [12] 黄文芳, 石召华, 陈立军. 指纹图谱技术评价不同干燥方式对地龙氨基酸组分提取物的影响 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 297-301.
- [13] 杨 菁, 孙黎光, 白秀珍, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生化反相高效液相色谱法同时测定 18 种氨基酸 [J]. 色谱, 2002, 20(4): 369-371.
- [14] 姚 静, 张自强. 药物冻干制剂技术的设计及应用 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2007.