

桑蚕蛹多糖胶囊的制备

谭丽鹤, 李红玉*
(锦州医科大学, 辽宁 锦州 121000)

摘要: **目的** 制备桑蚕蛹多糖胶囊。**方法** 超声辅助碱提桑蚕蛹粗多糖, 除蛋白、脱色后透析, 经 SephadexG-150 树脂分离纯化。单因素试验优化乙醇体积分数、料液比和干燥温度 3 种影响因素, 测定多糖粉末的休止角、堆密度和临界相对湿度, 再检测所得胶囊的含水量、装量差异和崩解时限。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 90%, 料液比 1 : 1, 干燥温度 60 ℃。多糖粉末平均休止角 37.74°, 平均堆密度 0.51 g/mL, 临界相对湿度 63%。胶囊内容物含水量 6.87%, 平均装量 0.132 3 g, 平均崩解时限 12.12 min, 均符合《中国药典》规定。**结论** 该工艺简单、稳定、可控, 所得桑蚕蛹多糖胶囊成型性良好, 可为相关药物研发提供实验依据。

关键词: 桑蚕蛹; 多糖; 胶囊; 制备

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)01-0076-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.014

Preparation of silkworm pupa polysaccharide capsules

TAN Li-he, LI Hong-yu*
(Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare the silkworm pupa polysaccharide capsules. **METHODS** The crude silkworm pupa polysaccharide was extracted by alkali-assisted ultrasonic wave. After deproteinization and decolorization, it was dialysed, and then isolated and purified by SephadexG-150 column. Single factor test was applied to optimizing three influencing factors including ethanol concentration, soild-liquid ratio and drying temperature. The polysaccharide powder's angle of repose, bulk density and critical relative humidity were determined, after which the water content, load difference and disintegration time of obtained capsules were investigated. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 90% for ethanol concentration, 1 : 1 for soild-liquid ratio, and 60 ℃ for drying temperature. For polysaccharide powder, the average angle of repose was 37.74°, the average bulk density was 0.51 g/mL, and the critical relative humidity was 63%. With 6.87% for water content, 0.132 3 g for average load, and 12.12 min for average disintegration time, the capsules were qualified according to standard requirements of Chinese Pharmacopoeia. **CONCLUSION** The good formability of silkworm pupa polysaccharide capsules demonstrates that this simple, stable and controllable technology can provide an experimental basis for the development of related drugs.

KEY WORDS: silkworm pupa; polysaccharide; capsules; preparation

桑蚕蛹为蚕蛾科昆虫家蚕的蚕茧缂丝后留下的蛹体,在我国作为食药材料历史悠久,其多种功效最早在《本草纲目》^[1]、《中华本草》^[2]、《神农本草经》^[3]、《蚕沙的考证》^[4]等著作中就有记载,目前市面上已有以蚕蛹油、蚕蛹蛋白等为主要成分的

保健品。近年来研究结果显示,桑蚕蛹中一种水溶性活性多糖具有抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖的作用^[5];小鼠免疫功能实验发现,蚕蛹多糖能明显增强 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖,促进小鼠巨噬细胞的吞噬活力和溶血素生成^[6]。近 30 年临

收稿日期: 2016-08-22

作者简介: 谭丽鹤 (1991—), 女, 硕士, 研究方向为药剂学。Tel: 18841622145, E-mail: 1402334040@qq.com

* 通信作者: 李红玉 (1956—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为载体栓剂及新药开发。E-mail: lihongyu@163.com

床研究证实, 中医药作为现代肿瘤治疗手段的辅助疗法, 在减轻放、化疗毒副作用, 保护机体免疫组织, 预防肿瘤复发等方面发挥着重要作用。而药用多糖作为其选择之一, 已越来越多地用于放、化疗的辅助治疗, 其抗肿瘤活性也日益成为相关研究的热点之一^[7-8]。因此, 本实验选择桑蚕蛹子实体作为原料, 提取其中的水溶性活性多糖, 在前期提取工艺研究的基础上, 研究桑蚕蛹多糖胶囊剂的制备工艺。

1 材料、试剂和仪器

1.1 材料 桑蚕蛹子实体采自山东省临沂市, 经锦州医科大学李红玉教授鉴定为正品。Sephadex G-150 树脂、SP131198-纤维素透析袋 (上海源叶生物科技有限公司); 3 号空胶囊 (广东省开平金亿胶囊有限公司)。

1.2 试剂 石油醚、三氯甲烷、正丁醇、无水乙醇、甲醇等均为分析纯 (天津永晟精细化工有限公司生产)。

1.3 仪器 500 g 摇摆式中药粉碎机 (温岭市奥力中药机械有限公司); DHG-9075A 型鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); YP202N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); UV2550 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); 德国 Sigma 高速冷冻离心机 (北京兴达恒信科技有限公司); 升降式崩解仪 (天津市精拓仪器科技有限公司)。

2 方法和结果

2.1 桑蚕蛹预处理 桑蚕蛹子实体经 60 ℃ 烘箱烘干后粉碎, 过 60 目筛。将过筛后的蚕蛹粉末与石油醚按 1:9 比例索氏回流提取 5 h 以脱去脂类物质, 再用 95% 乙醇回流提取 5 h 以除去小分子醇溶物, 室温下晾干。

2.2 标准曲线制备 采用苯酚-硫酸法绘制标准曲线, 测定桑蚕蛹多糖含量^[9-10]。称取干燥至恒重的葡萄糖 0.1 g, 蒸馏水定容于 100 mL 量瓶中。吸取 10 mL, 蒸馏水定容于另一 100 mL 量瓶中, 即得 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液。量取标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 置于比色皿中, 蒸馏水补充至 1.0 mL, 加入 1 mL 5% 重蒸酚和 5 mL 浓硫酸, 沸水浴加热 10 min, 反应完全后冷却至室温, 于 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标 (Y), 葡萄糖含量为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 得到回归方程为 $Y = 1.191\ 9X + 0.032\ 6$ ($R^2 = 0.995\ 6$), 在 0.02 ~ 0.08 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.3 桑蚕蛹多糖提取^[11] 采用超声辅助碱提 (0.02 mol/L NaOH) 法提取粗多糖。在超声功率 760 W、超声时间 10 min、液料比 11:1 的条件下提取 2 次, 合并滤液, 浓缩, 按 4 倍体积加入 95% 乙醇, 4 ℃ 冰箱中过夜, 离心, 干燥, 即得粗多糖, 得率约为 15.28%。再采用 Sevag 法除蛋白, 加入 Sevage 试剂, 混合均匀后于 4 ℃、5 000 r/min 低温离心机中离心 20 min, 取上清液, 反复加入试剂混匀、离心至无蛋白层出现^[12], 活性炭 (使用量 30%) 脱色^[13] 60 min, 温度 50 ℃, 多糖含量 82.34%, 脱色率 60.90%, 多糖保留率 49.68%。

2.4 桑蚕蛹多糖分离和纯化^[14-15] 脱色、脱蛋白后的多糖经截留分子量 5 000 Da 的透析袋, 分别于流水和蒸馏水中透析 48 h 以除去小分子杂质。将透析后的多糖经 Sephadex G-150 柱 (30 mm × 300 mm) 进行分离和纯化。以蒸馏水为洗脱液, 体积流量 0.5 mL/min, 每管 6 mL, 苯酚-硫酸法在 490 nm 波长下测定吸光度, 绘制洗脱曲线, 合并洗脱峰所对应的洗脱液, 收集水溶性多糖, 浓缩至一定体积后, 按 4 倍体积加入 95% 乙醇, 4 ℃ 冰箱中静置过夜, 4 ℃、5 000 r/min 下离心 20 min, 无水乙醇反复洗涤, 离心 2 次, 沉淀于 60 ℃ 烘箱中干燥, 备用。

2.5 桑蚕蛹多糖胶囊剂的制备 查阅文献 [16-17] 可知, 多糖胶囊剂的制备大多以乙醇为润湿剂。故本实验将多糖过 40 目筛后, 喷入乙醇混合均匀, 再过 20 目筛进行制粒, 鼓风干燥箱中干燥后过 20 目筛, 进行整粒。以干燥后的颗粒硬度、休止角、黏连程度为评价指标进行润湿剂条件的优选, 再通过测定休止角、堆密度、临界相对湿度来考察药粉成型性, 对所得胶囊剂进行检查。

2.5.1 制粒工艺条件筛选

2.5.1.1 乙醇体积分数 称取过 40 目筛后的多糖粉末适量, 共 5 份, 按 1:1 比例加入 75%、80%、85%、90%、95% 乙醇, 混合均匀, 按“2.5”项下方法制备, 结果见表 1。由表可知, 90% 乙醇时颗粒外形及流动性均较好。

2.5.1.2 料液比 称取过 40 目筛后的多糖粉末适量, 共 5 份, 按 1:0.6、1:0.8、1:1、1:1.2、1:1.4 料液比加入 90% 乙醇溶液, 混合均匀, 按“2.5”项下方法制备, 结果见表 2。由表可知, 1:1 料液比时颗粒外形及流动性均较好。

表 1 乙醇体积分数筛选结果

Tab. 1 Results of ethanol concentration screening

乙醇/%	制粒情况	黏连情况	休止角/(°)
75	软材黏度非常大,成块状	颗粒无黏连	—
80	软材黏度大,无法过筛	颗粒无黏连	—
85	软材过筛时有长条状	颗粒有黏连	41.5
90	软材适中、易制粒,颗粒均匀	颗粒黏连少,硬度适中	37.8
95	软材易制粒,颗粒均匀,但有细粉	颗粒无黏连,易碎	39.2

注：—表示无法测定

表 2 料液比筛选结果

Tab. 2 Results of solid-liquid ratio screening

料液比	制粒情况	黏连情况	休止角/(°)
1:0.6	软材松散,无法制粒	颗粒无黏连	—
1:0.8	软材松散,不易制粒	颗粒无黏连	—
1:1	易制粒,颗粒均匀	干燥时少黏连,易整粒	37.8
1:1.2	易制粒	干燥时有黏连,干燥后颗粒较硬	40.9
1:1.4	软材较湿,不易制粒	颗粒无黏连	—

注：—表示无法测定

2.5.1.3 干燥温度 称取过 40 目筛后的多糖粉末适量,共 5 份,按 1:1 料液比加入 90% 乙醇,混合均匀,置于 40、50、60、70、80 ℃ 鼓风干燥箱中干燥,干燥后过 20 目筛整粒,测定含水量,结果见表 3。由表可知,60 ℃ 干燥温度效果较好,虽然颗粒略有黏连,但其用时短,干燥后易于整粒,含水量符合《中国药典》要求(含水量不得超过 9.0%)。

表 3 干燥温度筛选结果

Tab. 3 Results of drying temperature screening

干燥温度/℃	干燥时间/h	颗粒情况	含水量/%
40	3	颗粒无黏连	9.27
50	1	颗粒无黏连	8.53
60	0.75	颗粒略有黏连,易于整粒	6.48
70	0.5	易于整粒,但有少数结块	5.26
80	0.25	颗粒严重结块	4.35

2.5.2 多糖药粉成型性研究^[18-19]

2.5.2.1 休止角测定 采用固定漏斗法测定休止角。将串联的 3 只漏斗固定于下口距离水平放置坐标纸 2.0 cm 处的位置,将药粉沿最上层漏斗壁缓慢、小心地注入,使其自动滑落到坐标纸上至形成高 2.0 cm 的圆锥体为止,按公式 $\text{tg}\alpha = H/R$ 计算休止角(H 为圆锥体高度, R 为圆锥体半径),反复测定 5 次。结果,测得休止角分别为 37.46°、37.85°、37.92°、37.65°、37.83°,平均 37.74°,可以满足药粉流动性要求。

2.5.2.2 堆密度测定 精密称取多糖药粉适量,

记录质量,倒入量筒中,不断摇晃振动以使其自然压紧,记录体积。根据药粉质量及体积计算堆密度,反复测定 5 次,结果见表 4。

表 4 堆密度测定结果 ($n=5$)

Tab. 4 Results of bulk density determination ($n=5$)

编号	药粉质量/g	药粉体积/mL	药粉堆密度/($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均堆密度/($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	3.02	6.2	0.49	0.51
2	2.95	5.6	0.53	
3	2.93	5.9	0.50	
4	2.98	5.8	0.51	
5	2.95	5.9	0.50	

2.5.2.3 临界相对湿度测定 配制相对湿度 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的溶液,置于干燥器中,25 ℃ 恒温箱中平衡 24 h。将所制多糖药粉干燥至恒重,平铺于干燥至恒重的称量瓶底部(厚度约为 2 mm),精密称定质量并记录,打开瓶盖,置于相对湿度已平衡的干燥器中,25 ℃ 恒温箱中恒温 96 h,精密称定质量并记录,计算吸湿率。以吸湿率为纵坐标,相对湿度为横坐标绘制临界相对湿度曲线(图 1),再沿曲线两端做切线,其相交点对应的横坐标轴上数值即为临界相对湿度。通过计算可知,药粉临界相对湿度约为 63%。

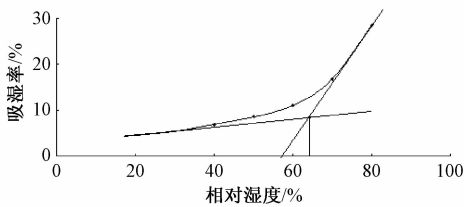


图 1 临界相对湿度曲线

Fig. 1 Critical relative humidity curve

2.5.3 蚕蛹多糖胶囊制备 称取多糖适量,过 40 目筛,按 1:1 比例喷入 90% 乙醇,混合均匀,过 20 目筛制粒,置于 60 ℃ 烘箱中干燥 45 min,再过 20 目筛整粒。将上述药粒在相对湿度低于 63% 的环境下装填于 3 号空胶囊中。

2.6 胶囊剂检查^[20]

2.6.1 水分 将称量瓶干燥至恒重,精密称定,再取 2 g 左右胶囊内容物平铺于称量瓶中,精密称定。打开瓶盖,在 105 ℃ 烘箱中干燥 5 h,盖上瓶盖,移入干燥器中,冷却 30 min 后精密称定,再在上述温度下干燥 1 h,冷却后精密称定,至连续 2 次称重的差异不超过 5 mg 为止,根据减失质量计算胶囊内容物含水量。结果,胶囊内容物含水量为

6.87%，符合《中国药典》规定（含水量不得超过9.0%）。

2.6.2 装量差异 取胶囊10粒，精密称定质量，倾出内容物（不得损失囊壳），小刷刷干净，再精密称定囊壳质量，测定装量差异，结果见表5。由表可知，每粒内容物的平均装量为0.132 3 g，10粒胶囊中只有1粒超出平均装量的10%，符合《中国药典》规定（装量差异限度应在±10%以内）。

表 5 装量差异测定结果 (n=10)

Tab. 5 Results of load difference determination (n=10)				
编号	胶囊/g	囊壳/g	内容物/g	装量差异/%
1	0.191 5	0.051 3	0.140 2	5.971 3
2	0.190 1	0.051 2	0.138 9	4.988 7
3	0.184 6	0.051 2	0.133 4	0.831 4
4	0.175 3	0.051 6	0.123 7	-6.500 4
5	0.187 5	0.051 3	0.136 2	2.947 8
6	0.193 2	0.051 4	0.141 8	7.180 7
7	0.167 8	0.051 1	0.116 7	-11.791 4
8	0.179 4	0.051 2	0.128 2	-3.099 0
9	0.185 6	0.051 0	0.134 6	1.738 5
10	0.180 6	0.051 2	0.129 4	-2.192 0

2.6.3 崩解时限 将升降式崩解仪的吊篮悬挂于金属支架上，浸入1 000 mL烧杯中，调节吊篮位置，使其下降时筛网距烧杯底部25 mm处；调节水位高度，使其上升时筛网在水面下15 mm处。待水温(37±1)℃时，将6粒胶囊放入吊篮中，加挡板，启动崩解仪进行检查，记录胶囊全部通过筛网的时间。结果，6粒胶囊崩解时限分别为11.46、12.03、11.29、12.37、13.11、12.48 min，平均12.12 min，符合《中国药典》规定（硬胶囊应在30 min内全部崩解）。

3 讨论和结论

本实验研究了桑蚕蛹多糖胶囊剂制备工艺，得到最佳条件为乙醇体积分数90%，料液比1:1，干燥温度60℃，此条件下药粉成型性较好，而且方法简单、稳定、可控。再按照《中国药典》一部（附录II）胶囊剂项下相关规定对其进行检查，发现各项指标均符合要求。

文献显示，蚕蛹具有重要的食用和药用价值，人们在日常生活中已有通过食用蚕蛹来达到预防和保健的目的，并且市面上已有大量以其提取物为主要原料的非处方药，但都不可避免地存在服用量大的问题。本研究所制备的胶囊在降低服用量的同

时，更有助于促进天然抗肿瘤药物的研发。

参考文献:

[1] 明·李时珍.本草纲目[M]. 1版. 成都: 四川大学出版社, 2014: 352-353.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 8097.

[3] 中国药科大学. 中药辞海[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 1758.

[4] 陈纪鹏. 蚕沙的考证[J]. 中国药品标准, 2009, 10(3): 173-174.

[5] 严 鹏. 蚕蛹多糖的提取分离及对 HeLa 细胞增殖影响的研究[D]. 锦州: 辽宁医学院, 2014.

[6] 王国基, 殷伟芬, 王 俊, 等. 蚕蛹多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 江苏大学学报, 2007, 17(5): 373-375.

[7] 李 杨, 赖 雁. 螺旋藻多糖抗肿瘤作用的研究进展[J]. 临床荟萃, 2011, 26(2): 170-172.

[8] 韦露薇. 紫杉醇、顺铂在中晚期宫颈癌同步放化疗中的临床疗效比较[J]. 医学与哲学, 2014, 35(7): 23-25.

[9] 吴海燕, 袁秋梅. 导数光谱法快速测定蚕蛹中的多糖含量[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 309-311.

[10] Rover M R, Johnston P A, Lamsal B P, et al. Total water-soluble sugars quantification in bio-oil using the phenol-sulfuric acid assay[J]. J Anal Appl Pyrolysis, 2013, 104: 194-201.

[11] 谭丽鹤, 李红玉. 桑蚕蛹多糖超声提取优化及水溶性多糖组分分析[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1010-1015.

[12] 蔡 铭, 罗印龙, 孙培龙. 黑木耳多糖的抑菌活性与单糖组分分析[J]. 浙江工业大学学报, 2014, 42(5): 534-535.

[13] 孙 颀, 何 慧, 谢笔钧. 活性炭脱色对灵芝水提液活性成分的影响[J]. 化学工业与工程技术, 2001, 22(1): 5-8.

[14] Matsuda M, Yamori T, Naitoh M, et al. Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine Pseudomonas species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines [J]. Mar Biotechnol, 2003, 5(1): 13-19.

[15] Cai W R, Xie L L, Chen Y, et al. Purification, characterization and anticoagulant activity of the polysaccharides from green tea[J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(2): 1086-1090.

[16] 闫 舒, 仰榴青, 赵 婷, 等. 五味子多糖胶囊的制备工艺研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1617-1619.

[17] 延 英, 李 耿, 王秀丽, 等. 玉米须多糖胶囊的制备[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 25-27.

[18] 刘玉明, 钱甜甜, 蒋定文, 等. 海洋星虫多糖胶囊的制备及质量控制[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(5): 72-76.

[19] 张选红. 附子多糖胶囊剂的制备工艺及其抗肿瘤作用的实验研究[D]. 广州: 中山大学, 2007.

[20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 6-7, 103, 118.