

总评“归一值”优选银马口服液的澄清工艺

张林^{1,2}, 李元波³, 张爱军^{2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041;
3. 扬子江药业集团 四川海蓉药业有限公司, 成都 611830)

[摘要] **目的:** 优选银马口服液的澄清工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。**方法:** 建立浊度对数方程测定法, 以绿原酸含量、固含量、浊度的总评“归一值”为评价指标, 采用正交试验考察壳聚糖用量、澄清温度、澄清时间及 pH 对银马口服液澄清工艺的影响, 通过测定粒径及 Zeta 电位进行稳定性分析。**结果:** 最佳澄清工艺条件为调节 pH 4.5, 壳聚糖用量 0.1%, 搅拌时间 10 min, 40 °C 水浴加热 2 h, 4 °C 冷藏静置 12 h; 绿原酸质量浓度 0.085 5 g·L⁻¹, 固含量 6.60 g·L⁻¹, 浊度 9.967 NTU。80.9% 的微粒平均粒径 1.170 μm, 98.2% 的微粒平均 Zeta 电位 -0.778 mV。**结论:** 优选的澄清工艺稳定可行, 澄清效果好。澄清后银马口服液体系稳定。

[关键词] 浊度; 总评“归一值”; 绿原酸; 壳聚糖; Zeta 电位; 银马口服液

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0024-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020024

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151210.1441.014.html>

[网络出版时间] 2015-12-10 14:41

Optimization of Clarification Process for Yinma Oral Liquid by Overall Desirability

ZHANG Lin^{1,2}, LI Yuan-bo³, ZHANG Ai-jun^{2*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

3. Sichuan Hairong Pharmaceutical Co. Ltd., Yangtze River Pharmaceutical Group, Chengdu 611830, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize clarification technology of Yinma oral liquid. **Method:** A logarithmic equation for turbidity determination was established. Orthogonal test was adopted to investigate effects of chitosan dosage, pH value, clarification temperature and time on overall desirability of the content of chlorogenic acid, solid content and turbidity. Particle size and Zeta potential was used for stability analysis. **Result:** Optimal clarification technology conditions was as follows: chitosan dosage of 0.1%, stirring time of 10 min, pH 4.5, heated for 2 h at 40 °C and refrigerated 12 h at 4 °C. The content of chlorogenic acid was 0.085 5 g·L⁻¹, solid content was 6.60 g·L⁻¹ and turbidity was 9.967 NTU. Average particle size of 80.9% particles was 1.170 μm and average Zeta potential of 98.2% particles was -0.778 mV. **Conclusion:** This clarification process is stable and feasible with a good clarifying effect, and Yinma oral liquid system is stable after clarification.

[Key words] turbidity; overall desirability; chlorogenic acid; chitosan; Zeta potential; Yinma oral liquid

[收稿日期] 20150608(005)

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2014AA022202)

[第一作者] 张林, 在读硕士, 从事中药理论与应用研究, Tel:15184442276, E-mail:1107056200@qq.com

[通讯作者] * 张爱军, 研究员, 从事新药研发及与其相关的基础研究, Tel:028-85255137, E-mail:ajzh33@sohu.com

银马口服液为中国中医科学院闫孝诚主任医师的经验方,由山银花、马齿苋等 5 味中药组成,具有清热泻腑、止咳祛痰的功效,临床用于咳嗽属热邪犯肺,症见咳嗽、时有发热、咳痰、痰黄黏稠、口干咽痛等。原剂型为银马颗粒,由于颗粒剂在储藏中易潮解、服用剂量大、口感不佳,给患者服用带来了一定困难,拟制成口服液以获得吸收快、奏效迅速、便于服用等优点的目的^[1]。中药复方口服液多为混合分散体系,为提高其稳定性,减少服用量,本实验通过重力冷藏沉降、机械滤过、乙醇沉淀、絮凝沉淀、离心分离等方法进行澄清处理,通过多指标的总评“归一值”优选澄清工艺,以微粒粒径及 Zeta 电位考察银马口服液的稳定性,为该制剂的工业化生产提供参考。

1 材料

AUW200D 型电子分析天平(日本岛津),DZF-6050AB 型真空干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司),1200 系列高效液相色谱分析仪(美国安捷伦),UV-759S 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),ST16R 型高速冷冻离心机(美国赛默飞),Zetasizer Nano ZEN3600 型激光粒度仪(马尔文仪器有限公司)。山银花、马齿苋等药材购于四川省中药饮片有限责任公司或新荷花中药饮片股份公司,经四川省中医药科学院方清茂研究员鉴定,均符合《中国药典》2010 年版一部项下规定^[2];绿原酸(中国食品药品检定研究院,批号 110753-201415,纯度 99.9%),壳聚糖、明胶、硫酸联氨(成都市科龙化工试剂厂),乌洛托品(阿达玛斯试剂有限公司),水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 银马口服液提取液的制备^[3] 取 4 倍处方量饮片,按原颗粒剂提取工艺提取,即加 12 倍量水煎煮 2 次,每次 1.5 h,合并煎液,经 200 目筛网过滤,4 ℃ 冷藏静置 24 h,滤过,滤液浓缩至适量,均匀分成 4 份,即得。

2.2 绿原酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 0.4% 磷酸-乙腈(90:10),检测波长 330 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取绿原酸对照品适量,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,得约 25 mg·L⁻¹ 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 取样品溶液 6 mL 至 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密量取绿原酸对照品溶液 1,3,5,7,10,15,20,25,30 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 2.824X - 0.7495$ ($r = 0.9999$),线性范围 25.3 ~ 759.0 μg。

2.3 浊度检查方法 中药口服液浊度检测有肉眼观察法、显微计数法、质量法、比浊法、浊度计法^[4],而食品行业大部分采用分光光度法测定浊度^[5-9]。故采用分光光度法表征浊度。

2.3.1 标准比浊贮备液的制备 按《中国药典》2010 年版二部附录 IX B 项下方法,以硫酸联氨和乌洛托品制备浊度 4 000 NTU 的标准贮备液。取标准贮备液 15 mL 至 1 L 量瓶中,于 550 nm 处测得吸光度 A 为 0.123,满足规定的 0.12 ~ 0.15,符合贮备液要求^[2,10-11]。

2.3.2 波长选择 取提取液,稀释 10 倍,经 0.2 μm 滤膜过滤 3 次,备用。取储备液稀释 100 倍,备用。以水为空白,于 220 ~ 1 000 nm 扫描,最终选择药液对浊度测定无影响的 800 nm 为检测波长。

2.3.3 回归方程 取标准贮备液 10,25 μL 及 0.25,0.5,1,1.5,2,2.5 mL 分别至 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,得系列标准溶液^[12],于 800 nm 处测定 A ,以 A 的对数值为纵坐标,浊度的对数值为横坐标,得回归方程 $Y = 0.9345X - 2.7432$ ($r = 0.9997$),表明浊度在 4 ~ 1 000 NTU 与 A 线性关系良好。

2.4 固含量的测定 精密移取样品溶液 10 mL 至已恒重蒸发皿中,水浴浓缩至适量,减压干燥 12 h,立即取出放至室温后精密称定,即得。

2.5 不同澄清工艺考察^[5,13-14]

2.5.1 离心分离 取 2.1 项下提取液 1 份,在 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,滤过,加水定容,即得。

2.5.2 乙醇沉淀 取 2.1 项下提取液 1 份,加 95% 乙醇使含醇量达 60%,边加边搅拌,搅拌 10 min,4 ℃ 冷藏静置 24 h,滤过,减压回收乙醇至无醇味,加水定容,滤过,即得。

2.5.3 壳聚糖絮凝沉淀 取壳聚糖约 1 g,加入 1% 乙酸溶液 100 mL,80 ℃ 水浴溶胀 2 h,搅拌均匀,4 ℃ 冷藏静置 24 h 备用。取 2.1 项下提取液 1 份,调节 pH 4.5,加 1% 壳聚糖溶液使壳聚糖质量分数

达 0.1%, 边加边搅拌, 搅拌 10 min, 80 °C 水浴加热 2 h, 冷藏静置 24 h, 滤过, 加水定容, 即得。

2.5.4 明胶絮凝沉淀 取明胶 1 g, 加水 100 mL, 80 °C 水浴溶胀 2 h, 搅拌均匀, 4 °C 冷藏静置 24 h 备用。取 2.1 项下提取液 1 份, 调节 pH 4.5, 加 1% 明胶溶液使明胶质量分数达 0.06%, 边加边搅拌, 搅拌 10 min, 80 °C 水浴加热 2 h, 冷藏静置 24 h, 滤过, 加水定容, 即得。

2.6 澄清方法筛选 取各澄清工艺项下溶液, 4 °C 冷藏, 放置 1 月后, 取样测定。按 2.2 项下方法测定绿原酸含量, 按 2.3 项下方法测定 A, 按 2.4 项下方法测定固含量。用 Hassan 的方法对 3 个指标进行归一化处理^[15], 绿原酸含量、固含量 2 个指标为取值越大越好 (d_{max}), 浊度为取值越小越好 (d_{min}), 计算公式为 $d_{max} = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$, $d_{min} = (Y_{max} - Y_i) / (Y_{max} - Y_{min})$, Y_{min} 为指标中最小值, Y_{max} 为指标中最大值。总评归一值 (overall desirability, OD) = $(d_1 + d_2 + d_3 + \dots + d_k) / k$ (k 为指标数)^[16-17], 见表 1。结果显示壳聚糖絮凝沉淀法优于其他工艺。

表 2 银马口服液壳聚糖澄清工艺正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of chitosan clarification process of Yinma oral liquid

No.	A 壳聚糖用量/%	B 澄清温度 / °C	C pH	D 澄清时间 /h	绿原酸 /g·L ⁻¹	固含量 /g·L ⁻¹	浊度 /NTU	OD
1	0.06	40	3.0	12	0.094 0	5.78	13.315 0	0.550 7
2	0.06	60	4.5	24	0.078 3	5.57	14.582 2	0.150 7
3	0.06	80	6.0	36	0.078 5	5.92	10.114 0	0.424 5
4	0.08	40	4.5	36	0.082 8	5.63	10.182 9	0.420 7
5	0.08	60	6.0	12	0.082 0	6.56	16.638 9	0.417 8
6	0.08	80	3.0	24	0.076 1	5.87	16.923 9	0.103 6
7	0.10	40	6.0	24	0.078 3	5.50	8.264 6	0.374 3
8	0.10	60	3.0	36	0.082 6	6.15	9.015 1	0.607 6
9	0.10	80	4.5	12	0.083 5	6.69	10.182 9	0.730 6

表 3 总评“归一值”方差分析

Table 3 Variance analysis of overall desirability

方差来源	SS	MS	F	P
A	0.108	0.054	88.686	<0.05
B	0.005	0.002	3.940	>0.05
C(误差)	0.001	0.001	1.000	
D	0.210	0.105	172.181	<0.01

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$, $F_{0.01}(2, 2) = 99$ 。

2.8 验证试验 按 1/2 处方量称取各药材, 共 3 份, 按优选的工艺条件进行试验, 4 °C 冷藏, 放置 1 月后,

表 1 银马口服液澄清工艺筛选

Table 1 Screening of clarification process of Yinma oral liquid

工艺	绿原酸 /g·L ⁻¹	固含量 /g·L ⁻¹	浊度 /NTU	OD
离心分离	0.205 2	8.33	124.127	0.909 1
乙醇沉淀	0.154 6	7.47	164.401	0.194 5
壳聚糖絮凝沉淀	0.196 2	8.27	47.630	0.917 7
明胶絮凝沉淀	0.188 0	8.30	328.000	0.541 6

2.7 澄清工艺优化^[5,7,18-19] 选择壳聚糖用量、澄清温度、澄清时间和 pH 为考察因素, 以绿原酸含量、固含量、浊度的 OD 为评价指标, 取 1/2 处方量药材 9 份, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。直观分析表明各因素影响澄清工艺的次序为 $D > A > B > C$ 。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析, 结果表明因素 A, D 具有显著性差异或极显著性影响, 因素 B 则无显著性差异, 最优组合为 $A_3B_1C_2D_1$, 即调 pH 4.5, 壳聚糖质量分数 0.1%, 搅拌 10 min, 40 °C 水浴加热 2 h, 4 °C 冷藏静置 12 h。

取样测定, 结果绿原酸质量浓度 0.085 5 g·L⁻¹, 固含量 6.60 g·L⁻¹, 浊度 9.967 NTU, OD 0.751 (RSD 1.3%), 表明优选的澄清工艺重复性和稳定性较好。

2.9 稳定性试验

2.9.1 激光粒度的测定 取 2.8 项下样品, 4 °C 冷藏放置 1 个月, 用激光粒度仪于 25 °C 以水为分散介质测定粒度及 Zeta 电位。结果发现 80.9% 的微粒平均粒径 1.170 μm, 19.1% 的微粒平均粒径 0.128 μm。根据 Stokes 定律, 微粒沉降速度与微粒半径平

方成正比^[20],故粒度越小,稳定性越好。样品放置 1 个月,粒径不足 2 μm ,且无可见颗粒出现,故认为该制剂稳定性良好。

2.9.2 Zeta 电位的测定 一般认为,微粒的 Zeta 电位的绝对值在 5 ~ 15 mV 会产生少量的沉淀,绝对值在 30 mV 以上较稳定^[11]。结果发现 98.2% 的微粒的平均 Zeta 电位 -0.778 mV,1.8% 的微粒平均 Zeta 电位 43.1 mV。可见大部分微粒不能相互排斥,微粒易于聚集,但结合粒径测定结果,微粒聚集后粒径依然很小,不足以形成沉淀。

3 讨论

本文以绿原酸含量、固含量、浊度为考察指标,从多个角度对工艺进行了较全面的评价,优选的工艺重复性和稳定性较好,可为相关产品的研究提供参考。以浊度及吸光度建立的对数线性方程关系显著优于一般线性方程^[11],相关系数从 0.998 1 上升至 0.999 7;且一般线性方程中允许浊度出现负值,显然与实际不符,而对数线性方程浊度的定义域 > 0,符合实际要求;但对数方程定义域不能为 0,对于浊度为 0 NTU 时,此时方程无意义,有待进一步优化。

本文研究发现明胶絮凝效果不佳,可能与药液中鞣质含量低有关,因明胶可与鞣质形成明胶鞣质酸盐络合物,随着络合物的沉淀,混悬液的悬浮物颗粒被网捕卷扫而随之沉淀^[21]。如一定要使用明胶絮凝,可考虑使用明胶-单宁联合絮凝剂。本研究中 Zeta 电位接近于 0 mV 时,此时微粒表面不带电,此时的 pH 为等电点。在长期放置过程中,稳定性可能会受到影响,本文中尚未出现不稳定现象,可能与液体中高分子化合物的保护作用有关^[21];或者放置时间短,布朗运动克服重力作用,尚未发生沉降,需进一步观察研究证实。

[参考文献]

[1] 张兆旺. 中药药剂学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2005:184,204.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:28,46,附录 71.
[3] 国家食品药品监督管理局. 银马解毒颗粒标准[S]. 2007:YBZ00702012.
[4] 洪燕龙,冯怡,徐德生,等. 中药口服液澄明度表征

方法的研究进展及浊度测量技术[J]. 中药材,2011, 34(9):1462-1465.
[5] 陈彦雄,祝霞,潘陆霞,等. 不同澄清处理对赤霞珠干红葡萄酒澄清度和色度的影响[J]. 农产品加工·学刊,2010(1):19-21.
[6] 俸毅,张伟敏,蒋盛军,等. 红茶菌饮料澄清度与抗氧化性能的研究[J]. 茶叶科学,2009,29(6): 426-429.
[7] 何志刚,李维新,林晓姿,等. 壳聚糖澄清杨梅果酒的影响因素与效果评价[J]. 农业工程学报,2006,22(8):199-202.
[8] 李升锋,徐玉娟,张友胜,等. 玫瑰茄提取液澄清工艺的研究[J]. 食品科学,2008,29(3):184-187.
[9] 王迪,杨远帆,黄高凌,等. 柚苷酶处理对瑯溪蜜柚果汁澄清度和营养品质的影响[J]. 中国食品学报, 2014,14(9):100-109.
[10] 朱双燕. 穿心莲内酯固体自乳化颗粒剂的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2013.
[11] 王姣. 膜法提高消食退热糖浆澄明度的研究[D]. 天津:天津大学,2005.
[12] 郝然,刘婷,易艳,等. 动态浊度法检测 5 种中药注射液的內毒素含量[S]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):120-123.
[13] 常桂娟,白雪媛,孙立霞,等. 参精口服液的澄清工艺考察[J]. 中华中医药杂志,2014,29(9):2792-2796.
[14] 孙立霞,常桂娟,李秋萌,等. 参玉口服液澄清工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):4-7.
[15] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中的多指标优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000,35(8):530-533.
[16] 滕亮,马桂芝,孙殿甲,等. 采用三种综合指标量化法优选三越麻黄颗粒的处方[J]. 中成药,2009,31(5):708.
[17] 郝宁,朴钟云,臧健,等. 总评归一值优选酒炒威灵仙炮制工艺[J]. 中药材,2015,38(1):65-68.
[18] 田洋,史崇颖,候艳,等. 壳聚糖絮凝法澄清天麻提取液的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):25-28.
[19] 罗燕. 越鞠口服液制备工艺及质量标准研究[D]. 成都:成都中医药大学,2009.
[20] 毕殿洲. 药剂学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:214.
[21] 孙泽沾. 中药复方水提液絮凝除杂效果的研究[D]. 天津:天津大学,2012.

[责任编辑 刘德文]