

基于药效筛选乌鳖颗粒中间体的醇沉工艺

陶永华, 孙兰, 殷洪梅, 王秀海, 李峰, 张艳军, 刘俊超, 李雪峰, 王振中, 萧伟*
(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室,
中药提取精制新技术重点实验室, 江苏连云港 222001)

[摘要] 目的: 优选乌鳖颗粒中间体的醇沉工艺, 降低该制剂的日服用量。方法: 通过考察卵巢摘除大鼠雌二醇(E_2), 卵泡刺激素(FSH), 黄体生成素(LH)的活性和幼鼠子宫、卵巢发育情况, 评价乌鳖颗粒中间体醇沉工艺的合理性。以二苯乙烯苷、川续断皂苷Ⅵ和固含物转移率为指标, 通过单因素试验确定最佳醇沉工艺。采用HPLC测定二苯乙烯苷、川续断皂苷Ⅵ含量。结果: 乌鳖颗粒中间体醇沉前后对药效试验无显著性差异。最佳醇沉工艺为何首乌组提取液浓缩至相对密度1.10(60℃), 加乙醇使含醇量达60%, 静置时间>12h, 上清液减压浓缩至相对密度1.20~1.23(60℃)。结论: 药效评价结合单因素试验确定的何首乌组醇沉工艺更加合理、可靠, 降低乌鳖颗粒日服用量的同时, 还保证了该制剂的有效性。

[关键词] 药效试验; 乌鳖颗粒; 醇沉工艺; 二苯乙烯苷; 川续断皂苷Ⅵ

[中图分类号] R283.6; R284.1; S481+.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0028-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120028

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.1011.006.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 10:11

Optimization of Alcohol Precipitation Technology of Wubie Granules Intermediates Based on Pharmacodynamic Screening

TAO Yong-hua, SUN Lan, YIN Hong-mei, WANG Xiu-hai, LI Feng, ZHANG Yan-jun,
LIU Jun-chao, LI Xue-feng, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei*

(Key Laboratory of New Technique Research of Traditional Chinese Medicine Extraction and Purification,
State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion
Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize alcohol precipitation technology of Wubie granules intermediates for reducing the daily dose of this preparation. **Method:** The rationality of alcohol precipitation technology of Wubie granules intermediates was determined by investigating activities of estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) of ovariectomized rats and uterus, ovaries of mice. Taking transfer rates of stilbene glucoside, asperosaponin Ⅵ and solid content as indexes, single factor tests were adopted to optimize alcohol precipitation technology. Contents of stilbene glucoside and asperosaponin Ⅵ were determined by HPLC. **Result:** Optimum alcohol precipitation process was as follows: concentrated extracting liquid of Polygoni Multiflori Radix praeparata group to relative density of 1.10 (60℃), added ethanol until the concentration of ethanol to 60%, standing time of >12h, concentrated supernatant to relative density of 1.20-1.23 (60℃). **Conclusion:** Optimal alcohol precipitation technology is reasonable and reliable, which determines by pharmacodynamic screening and single-factor tests. This process can reduce the daily dose and ensure the effectiveness of Wubie granules.

[Key words] pharmacodynamic test; Wubie granules; alcohol precipitation technology; stilbene glucoside; asperosaponin Ⅵ

[收稿日期] 20150811(011)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 陶永华, 工程师, 从事药物制剂研究, Tel: 0518-81152325, E-mail: jltaozi@163.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 0518-81152367, E-mail: kanionlunwen@163.com

乌鳖颗粒的处方来源于江苏省中医院的临床经验方,是江苏康缘药业股份有限公司开发的 6 类新药,处方由何首乌、鳖甲、续断等 6 味药材组成,具有补肝肾、健脾胃、调冲任的功效,主治卵巢功能早衰引起的持续性闭经、雌激素水平低下和促性腺激素升高,多数患者盆腔超声显示卵巢体积缩小和子宫萎缩,此外,有的患者还伴有自身免疫性疾病^[1]。前期研究结果表明何首乌组煎煮液固含物转移率高达 40%,日剂量较大,因此,有必要采用纯化工艺以降低日服用量。常用中药复方纯化工艺有水提醇沉法、超速离心法、超滤法、絮凝沉淀法等,醇沉法与絮凝澄清法等新技术相比,具有工艺成熟、过程明确、对设备要求不高等优点,在中药制剂生产过程中得到了广泛的应用^[2]。为了保证醇沉后中间体的疗效,拟采用药效学指标评价工艺合理性,以二苯乙烯苷、川续断皂苷 VI 和固含物转移率为指标,通过单因素试验确定何首乌组浓缩液的最佳醇沉工艺,为降低乌鳖颗粒的日服用量提供参考。

1 材料

FA1004 型电子分析天平(上海精科天平厂),SP-756PC 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),r-911 型全自动放射免疫计数仪(中国科技大学实业总公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

乌鳖颗粒工艺 A,B,C(江苏康缘药业股份有限公司,批号分别为 140916,140917,140918,规格依次为 0.84,1.63,3.12 g·g⁻¹),六味地黄丸(河南宛西制药股份有限公司,批号 141215,规格 60 粒/瓶),苯甲酸雌二醇(天津金耀氨基酸有限公司,批号 140115,规格 1 g·L⁻¹),红四氮唑(上海试剂三厂,批号 141115),雌二醇(E₂)试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号 20140410),卵泡刺激素(FSH)试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号 20140322),黄体生成素(LH)试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号 20140321),2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和川续断皂苷 VI 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110844-201109,111813-201202),其他试剂均为分析纯。

雌性 ICR 小鼠,体重 12~16 g,雌性 SD 大鼠,体重 150~180 g,均由扬州大学比较医学中心提供,合格证号 SCXK(苏)2007-0001。

2 方法与结果

2.1 供试品的制备

2.1.1 供试液制备工艺 A 取鳖甲组药材(鳖甲、

茯苓、枸杞子,下同)3 kg,加 10 倍量水煎煮 2 次,合并煎煮液,减压浓缩,备用;取何首乌组药材(何首乌、续断、白术,下同)3 kg,加 10 倍量水煎煮 2 次,合并煎煮液,减压浓缩,将上述 2 组浓缩液合并,得 0.84 g·g⁻¹浸膏。

2.1.2 供试液制备工艺 B 取鳖甲组药材 3 kg,加 10 倍量水煎煮 2 次,合并煎煮液,减压浓缩,备用;取何首乌组药材 3 kg,加水煎煮 2 次,合并煎煮液,减压浓缩,加乙醇使含醇量达 70%,静置过夜,滤过并收集沉淀,备用;醇沉上清液减压浓缩,与鳖甲组浓缩液合并,得 1.63 g·g⁻¹浸膏。

2.1.3 供试液制备工艺 C 取鳖甲组药材 3 kg,加 10 倍量水煎煮 2 次,合并煎煮液,减压浓缩,备用;与制备工艺 B 所得沉淀合并,得 3.12 g·g⁻¹浸膏。

2.2 对卵巢摘除大鼠激素活性的影响^[3-4] 取雌性大鼠 100 只,摘除两侧卵巢;取 10 只大鼠,仅进行卵巢暴露,不摘除两侧卵巢。手术后 1 周,选取造模成功的大鼠 70 只随机分 7 组,每组 10 只,即假手术组(按 10 mL·kg⁻¹给予水),模型组(按 10 mL·kg⁻¹给予水),雌二醇组(0.001 g·kg⁻¹),六味地黄丸组(3 g·kg⁻¹),工艺 A 组(11 g·kg⁻¹),工艺 B 组(11 g·kg⁻¹),工艺 C 组(11 g·kg⁻¹),各组按上述剂量每天灌胃给药 1 次,连续给药 3 周。末次给药 30 min 后,每鼠阴道内注入新鲜配制的 25 g·L⁻¹红四氮唑水溶液 0.1 mL,停留 30 min,取血,离心(1 万 r·min⁻¹,5 min),检测 E₂,FSH 和 LH 血清水平;大鼠立即处死,分离阴道,剪碎后置离心试管中,加入无水乙醇-四氯乙烯(1:1)混合液 4 mL,浸泡提取 2 h,2 000 r·min⁻¹离心 5 min,吸取上清液,以无水乙醇-四氯乙烯混合液作空白对照,于 490 nm 处测定吸光度 A。结果表明乌鳖颗粒工艺 A 和 B 组均可使卵巢摘除大鼠血清 E₂,FSH 水平增高,与模型组比较,具有显著性差异(P<0.05, <0.01),乌鳖颗粒工艺 C 组对 E₂,FSH,LH 均无显著性作用,提示乌鳖颗粒工艺 A 和 B 具有调节机体激素作用。乌鳖颗粒工艺 B 组的 A 与模型组比较具有极显著性差异(P<0.01),提示其对大鼠阴道角化上皮细胞有明显增加作用,具有提高雌激素活性的作用。提示乌鳖颗粒工艺 B 作用为佳,见表 1。

2.3 对幼鼠子宫、卵巢发育的影响^[5-7] 取未成熟 ICR 健康雌性幼鼠 50 只,随机等分为空白组(等量生理盐水),阳性组(4.5 g·kg⁻¹),工艺 A 组(16.5 g·kg⁻¹),工艺 B 组(16.5 g·kg⁻¹)和工艺 C 组(16.5 g·kg⁻¹)。各组灌胃体积均为 0.02 mL·

表 1 不同工艺乌鳖颗粒对卵巢摘除大鼠血清 E₂, FSH, LH 及雌激素活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Influences of Wubie granules with different process on activities of E₂, FSH, LH and estrogen of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	A	E ₂ /ng·L ⁻¹	FSH/MIU·mL ⁻¹	LH/MIU·mL ⁻¹
假手术	-	0.184 ± 0.031	37.24 ± 5.85	8.43 ± 1.69	33.13 ± 2.68
模型	-	0.139 ± 0.008 ²⁾	29.68 ± 3.57 ²⁾	8.20 ± 0.86	34.73 ± 3.89
六味地黄丸	3	0.159 ± 0.015 ⁴⁾	33.96 ± 4.30 ³⁾	9.98 ± 1.54	36.84 ± 3.36
雌二醇	0.001	0.191 ± 0.046 ⁴⁾	124.36 ± 26.23 ⁴⁾	10.16 ± 1.12 ⁴⁾	37.19 ± 3.41
工艺 A	11	0.146 ± 0.018	34.08 ± 3.77 ³⁾	9.47 ± 1.36 ³⁾	34.70 ± 3.81
工艺 B	11	0.154 ± 0.009 ⁴⁾	39.76 ± 5.79 ⁴⁾	9.59 ± 1.02 ⁴⁾	32.90 ± 3.87
工艺 C	11	0.138 ± 0.014	33.87 ± 6.37	9.26 ± 1.35	33.26 ± 3.85

注:与假手术组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01。

g⁻¹, 每天给药 1 次, 共 10 d, 末次给药后 12 h 脱颈椎处死, 解剖, 取子宫、卵巢、脾、胸腺, 分离脂肪, 迅速称重。采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 计算脾、胸腺、卵巢、子宫系数, 比较各组间差异。结果表明乌鳖颗粒工艺 A 和 B 组具有促进子宫、卵巢

发育的作用, 与空白组比较, 具有显著性差异 (P < 0.05, < 0.01), 乌鳖颗粒工艺 C 组无促进子宫、卵巢生长的作用; 各组对脾脏、胸腺均无明显影响。提示乌鳖颗粒工艺 A 和 B 具有促进子宫、卵巢发育的作用, 以乌鳖颗粒工艺 B 作用为佳。见表 2。

表 2 不同工艺乌鳖颗粒对幼鼠子宫、卵巢、脾和胸腺发育的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Influences of Wubie granules with different process on uterus, ovaries, spleen and thymus of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$) g·g⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	子宫系数(×10 ⁻¹)	卵巢系数(×10 ⁻¹)	脾系数(×10 ⁻¹)	胸腺系数(×10 ⁻¹)
空白	-	0.002 2 ± 0.000 7	0.001 0 ± 0.000 1	0.007 9 ± 0.002 1	0.003 3 ± 0.000 4
六味地黄丸	4.5	0.003 2 ± 0.000 4 ²⁾	0.001 4 ± 0.000 2 ²⁾	0.007 3 ± 0.000 3	0.003 4 ± 0.000 4
工艺 A	16.5	0.002 6 ± 0.000 3 ¹⁾	0.001 1 ± 0.000 1 ²⁾	0.006 9 ± 0.000 4	0.003 6 ± 0.000 5
工艺 B	16.5	0.003 4 ± 0.000 3 ²⁾	0.001 2 ± 0.000 1 ²⁾	0.008 4 ± 0.001 0	0.003 5 ± 0.000 5
工艺 C	16.5	0.002 4 ± 0.000 4	0.001 0 ± 0	0.0074 ± 0.000 8	0.003 1 ± 0.000 2

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

2.4 二苯乙烯苷的含量测定^[7]

2.4.1 色谱条件 Luna C₁₈(2) 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (25:75), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 320 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取二苯乙烯苷对照品 12.26 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4.3 线性关系考察 精密量取上述对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按 2.4.1 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 = 23.946X - 11.333 (r = 0.999 7), 线性范围 24.52 ~ 147.12 μg。

2.4.4 供试品溶液的制备 精密称取醇沉上清液 1.0 g, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 川续断皂苷 VI 的含量测定^[8]

2.5.1 色谱条件 Luna C₁₈(2) 色谱柱 (4.6 mm ×

250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (30:70), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 212 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.5.2 对照品溶液制备 精密称取川续断皂苷 VI 对照品 15.46 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加稀乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.3 线性关系考察 分别精密量取上述对照品溶液 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加稀乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按 2.5.1 项下色谱条件测定。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得线性方程 Y = 4.598X - 9.795 (r = 0.999 8), 线性范围 30.92 ~ 108.22 μg。

2.5.4 供试品溶液的制备 同 2.4.4 项。

2.6 何首乌组醇沉工艺优化

2.6.1 醇沉浓度考察 取何首乌组煎煮液, 浓缩至相同密度, 放置至室温, 搅拌下分别加乙醇使含醇量达 50%, 60%, 70%, 80%, 静置时间 > 12 h, 分别测定上清液中二苯乙烯苷、川续断皂苷 VI 和固含物转移率, 见表 3。综合指标性成分转移率和中间体收

率,将醇沉浓度定为加乙醇使含醇量达 60%。

表 3 乌鳖颗粒浓缩液的醇沉浓度考察

Table 3 Investigation of alcohol precipitation concentration of Wubie granules concentrated liquid %

醇沉乙醇 体积分数	二苯乙烯 苷转移率	川续断皂苷 VI转移率	固含物转移率
50	91.83	91.59	79.88
60	94.60	94.59	76.89
70	94.92	95.13	70.81
80	93.74	95.24	58.87

2.6.2 醇沉液密度考察 取何首乌组浓缩液 4 份,相对密度(60℃)分别为 1.05,1.10,1.15,1.20,分别醇沉至上清液含醇量达 60%,静置时间 >12 h,计算上清液中二苯乙烯苷、川续断皂苷 VI 和固含物转移率,见表 4。

表 4 乌鳖颗粒浓缩液的相对密度考察

Table 4 Investigation of relative density of Wubie granules concentrated liquid

相对 密度 (60℃)	二苯乙烯 苷转移率 /%	川续断皂苷 VI转移率 /%	固含物 转移率 /%	沉淀性状
1.05	91.28	90.75	61.98	沉淀不实,不易分离
1.10	86.94	85.23	53.86	沉淀实,易分离
1.15	85.75	84.01	46.07	沉淀实,易分离
1.20	75.51	75.52	37.00	沉淀实,易分离

注:上清液性状均为澄清。

2.6.3 验证试验 分别按处方比例取各药材 2 kg,根据最佳工艺条件进行 3 次验证试验,结果二苯乙烯苷平均转移率 95.32%,RSD 0.9%;川续断皂苷 VI 平均转移率 92.46%,RSD 0.9%;固含物平均转移率 76.34%,RSD 0.5%,说明优选的醇沉工艺重复性好、稳定可行。

3 讨论

何首乌为方中君药,主要含有二苯乙烯苷等多羟基芪类化合物,二苯乙烯苷具有抗氧化、清除自由基、保护肝脏、调节机体免疫功能等作用^[9-10];续断为方中臣药,主要含有川续断皂苷乙、川续断皂苷 VI 等齐墩果烷型五环三萜类化合物,川续断皂苷 VI 有防止骨质疏松、增强骨密度、保肝降脂等作用^[11-12],二者与乌鳖颗粒治疗卵巢功能早衰的功能是一致的,故本文选择二苯乙烯苷和川续断皂苷 VI 含量为工艺优选的评价指标。固含物的转移率可直接说明中间体的得率,故增加固含物转移率评价指标。

一般情况下,多数的中药成分都可采用醇沉技术进行纯化。当含醇量为 50%~70% 时可除去淀

粉、无机盐等杂质;含醇量达 75%~80% 时,可除去多糖、蛋白质等杂质^[13]。何首乌、续断中主要含有中等极性苷类化合物,因此醇沉浓度调至 60%,可除去淀粉、大分子多糖等杂质,保留有效成分的同时还可保留小分子的多糖、蛋白质等成分。

乌鳖颗粒中间体采用醇提取、浓缩等工序处理。鳖甲组采用水煎煮后直接浓缩,且鳖甲组的目标产物为蛋白、多肽、多糖类成分,与治疗目的相关,故未对该中间体进行精制;何首乌组由于煎煮液固含物转移率较高,故仅对该中间体进行精制。由于其他中间体未采用特殊提取、精制工艺,故未对其进行描述。

[参考文献]

[1] 史春兰. 卵巢早衰的诊断和治疗[J]. 当代医学, 2009,15(13):16-17.

[2] 孙玉琦,刘晓娟,代春美,等. 中药醇沉技术应用与评价[J]. 中成药,2010,32(11):1961-1963.

[3] 李仪奎. 中药药理试验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:836.

[4] 张军武. 归肾丸对大鼠卵巢早衰防治作用的实验研究[J]. 中国现代医药志,2008,10(6):79-80.

[5] 戚本明,戚本玲. 葛根提取物对正常及去势大鼠血清雌激素水平影响的研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(11):850-851.

[6] 孙永忠,程涇,石其贤. 滋肾益冲抗衰汤治疗卵巢早衰实验研究[J]. 实用中医药杂志,2008,24(2):71-73.

[7] 李娟. 益坤精汤治疗卵巢早衰的实验研究[J]. 中国药物与临床,2008,8(2):133-135.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:329-330.

[9] 王春英,张兰桐. 何首乌中有效成分二苯乙烯苷的研究进展[J]. 河北医科大学学报,2008,29(1):157-160.

[10] 吕旻,王伽伯,嵇扬,等. 提取溶剂对何首乌肝细胞毒性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(20):268-272.

[11] 李广润,宫丽雨,吕亚丽,等. 川续断皂苷 VI 药理作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2014,33(7):477-480.

[12] 罗君,卿娟,赵琳璐,等. 续断酒炙前后无机元素含量及其灰关联度对比分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):79-82.

[13] 刘苗,于筛成,张虹,等. 中药醇沉工艺及设备浅析[J]. 中成药,2007,29(8):1202-1204.

[责任编辑 刘德文]