

益龄精口服液澄清工艺优选

谷陟欣^{1,2}, 夏新华³, 朱丽^{1,2}, 周芳^{1,2}, 谢安^{1,2}, 欧金秀^{1,2}, 张妮瑜^{1,2}, 陈珍贵^{1,2*}

(1. 九芝堂股份有限公司, 长沙 410021; 2. 湖南省中药固体制剂工程技术研究中心, 长沙 410021;
3. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

[摘要] **目的:** 优选壳聚糖用于益龄精口服液的絮凝澄清工艺条件。**方法:** 以吸光度、二苯乙烯苷保留率为指标, 考察提取液质量浓度、壳聚糖用量、pH、温度、搅拌速度、搅拌时间等因素对絮凝效果的影响; 在单因素试验基础上, 采用正交试验优选提取液质量浓度、壳聚糖用量、絮凝温度等因素对絮凝工艺的影响; 比较絮凝澄清法与醇沉法。**结果:** 最佳澄清工艺条件为提取液质量浓度 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 壳聚糖用量 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 絮凝温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5.0 ~ 5.5, 搅拌速度 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 搅拌时间 10 min。**结论:** 壳聚糖絮凝澄清法可替代乙醇沉淀法用于益龄精口服液的澄清工艺。

[关键词] 益龄精口服液; 壳聚糖; 澄清工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0045-04

Optimization of Clarification Technology of Yilingjing Oral Liquid

GU Zhi-xin^{1,2}, XIA Xin-hua³, ZHU Li^{1,2}, ZHOU Fang^{1,2}, XIE An^{1,2},
OU Jin-xiu^{1,2}, ZHANG Ni-yu^{1,2}, CHEN Zhen-gui^{1,2*}

(1. Jiuzhitang Co. Ltd, Changsha 410021, China;

2. Hunan Engineering Research Center of Solid Preparation of Traditional Chinese Medicine,
Changsha 410021, China; 3. College of Pharmacy, Hunan University
of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize flocculation clarification technology conditions of Yilingjing oral liquid by chitosan. **Method:** Taking absorbance and retention rate of stilbene glucoside as evaluation indicators, influence of the mass concentration of extraction liquid, chitosan dosage, pH, temperature, stirring speed, stirring time and other factors on flocculation effect were investigated. Based on single factor test, orthogonal design was selected to optimize flocculation technology with the mass concentration of extraction liquid, chitosan dosage, flocculation temperature as factors. Flocculation clarification method and alcohol sedimentation were compared. **Result:** Optimal clarification procedure condition was that the concentration of materials-extraction solution $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the adding dosage of chitosan of $1.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, flocculation temperature of $60 \text{ }^\circ\text{C}$, pH of 5.0-5.5, stirring speed of $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ and stirring time of 10 min. **Conclusion:** Chitosan flocculation method could be used as clarification technology of Yilingjing oral liquid, which could substitute ethanol precipitation method.

[Key words] Yilingjing oral liquid; chitosan; clarification technology; orthogonal test

[收稿日期] 20120724(009)

[基金项目] 长沙市科技局重点项目(K0802170-61)

[第一作者] 谷陟欣, 硕士, 高级工程师, 从事中药制剂的研究与开发, Tel: 0731-85353897, E-mail: gzx@hnjzt.com

[通讯作者] * 陈珍贵, 高级工程师, 从事中药制剂的研究与开发, Tel: 0731-85353907, E-mail: ctce_zf@163.com

益龄精口服液来源于湖南省名老中医李聪甫研究员的临床经验方, 由制首乌、金樱子、女贞子、川牛膝等 7 味中药组成, 具有补益肝肾、益精活血、滋阴潜阳之功效, 适用于老年人肝肾阴虚、精血不足、血行不畅、肝阳上亢所致的腰膝酸软等症^[1]。壳聚糖澄清剂是近年来应用最为广泛的新型絮凝剂, 具有操作简便、成本低、效率高、有效成分损失少、安全无

毒等优点。益龄精口服液的传统纯化工艺多采用水提醇沉法,成本较高且放置过程中易析出沉淀,严重影响药品澄明度。为改善产品的澄明度,提高产品质量,降低生产成本,本试验以壳聚糖为澄清剂,采用正交试验对澄清工艺条件进行优化^[2-9],为益龄精口服液的生产提供试验依据。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(2998PDA 型检测器,美国 Waters 公司),TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),制何首乌、金樱子、桑椹子、女贞子、菟丝子、豨莶草、川牛膝均购自九芝堂连锁药店,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定,均符合《中国药典》2010 年版一部相关项下要求;壳聚糖(南通兴成生物制品厂),二苯乙烯苷对照品(批号 110844-200606,中国药品生物制品检定所),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1% 壳聚糖溶液的制备 取 1 g 壳聚糖溶于 100 mL 1% 乙酸水溶液中,搅拌 15 min,静置 12 h,备用。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 按处方称取制何首乌、金樱子等 7 味中药材,共 1 650 g,其中制何首乌粉碎成最粗粉,与其余金樱子等 6 味加水浸泡 1.0 h,加热回流提取 2 次,第 1 次 2 h,第 2 次 1.5 h,合并提取液,80 ℃ 减压浓缩,测定二苯乙烯苷含量,备用。

2.2 检测波长的选择 益龄精口服液在波长 >550 nm 的吸收值较小且吸收曲线较平坦,说明在此区域的吸收度受药液本身的成分影响较小,可以反映药液的澄清或混浊程度,本试验选择 650 nm 为测定波长,以蒸馏水为空白,测定药液吸光度(A),A 越小,说明药液澄明度越好,即澄清效果越好。

2.3 二苯乙烯苷保留率的测定

2.3.1 色谱条件 Phenomenex-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(20:80),检测波长 320 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,理论塔板数按二苯乙烯苷峰计算不低于 3 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取二苯乙烯苷对照品适量,加稀乙醇制成 0.026 g·L⁻¹的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取样品溶液 3 mL,置于 100 mL 量瓶中,加稀乙醇适量,振摇,用稀乙醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.4 单因素试验

2.4.1 提取液质量浓度的考察 取 1 g·mL⁻¹的提

取液 4 份,每份 100 mL,依次加入 0, 100, 200, 300 mL 水,搅拌均匀,于磁力搅拌器上加热恒温至 60 ℃,搅拌速度 350 r·min⁻¹,按壳聚糖用量 1.2 mL·g⁻¹(壳聚糖溶液体积/生药量)计算,分别缓慢加入壳聚糖溶液 120 mL,搅拌 10 min,静置 12 h,离心 15 min(3 500 r·min⁻¹),抽滤,滤液定容至 500 mL,测定 A 和二苯乙烯苷含量,计算二苯乙烯苷保留率,结果见图 1。结果当提取液质量浓度为 0.25 g·mL⁻¹时,提取液 A 最低,二苯乙烯苷保留率最高。

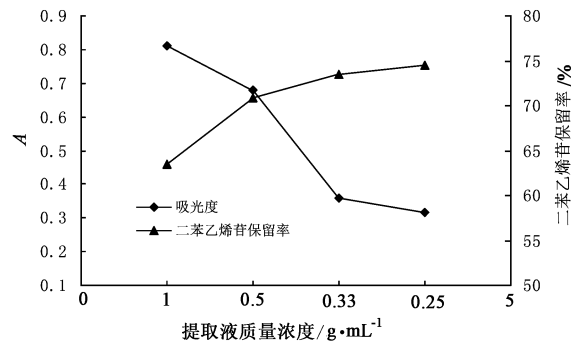


图 1 提取液质量浓度对益龄精口服液的絮凝澄清工艺的影响

2.4.2 壳聚糖用量的考察 取 0.25 g·mL⁻¹提取液 200 mL,平行 5 份,于磁力搅拌器上加热恒温至 60 ℃,搅拌速度 350 r·min⁻¹,分别按 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL·g⁻¹计算加入壳聚糖溶液 30, 40, 50, 60, 70 mL,搅拌 10 min,静置 12 h,离心 15 min(3 500 r·min⁻¹),抽滤,滤液定容至 250 mL,测定吸光度和二苯乙烯苷含量,计算二苯乙烯苷保留率,结果见图 2。说明当壳聚糖用量为 1.2 mL·g⁻¹时提取液 A 较低,二苯乙烯苷保留率最高。

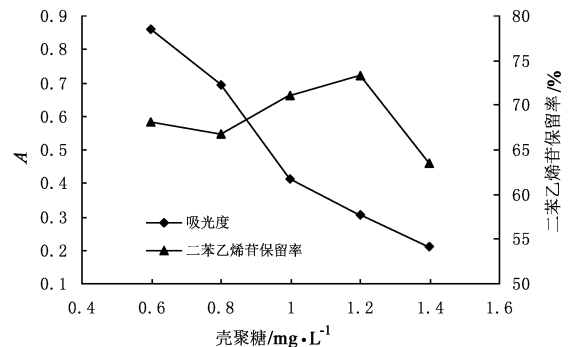


图 2 壳聚糖用量对益龄精口服液的絮凝澄清工艺的影响

2.4.3 提取液 pH、温度、搅拌速度 and 时间的考察 取 0.25 g·mL⁻¹提取液 200 mL,壳聚糖用量 1.2 mL·g⁻¹,其余按试验设计进行,操作同 2.4.2 项下方法。结果表明,pH 5.0~5.5 时 A 均较低,而二苯乙烯苷保留率最高(图 3);温度 60 ℃,搅拌速度 300 r·min⁻¹,搅拌 10 min 时,A 均最小,同时二苯乙烯苷

保留率均最高(图4~6)。

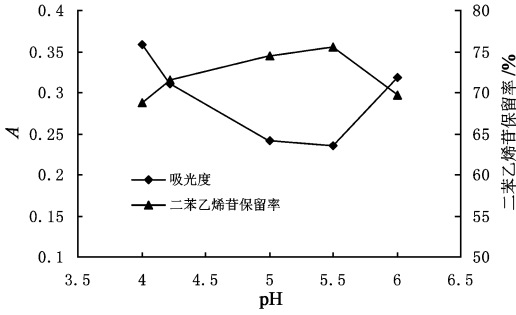


图3 pH对益龄精口服液的絮凝澄清工艺的影响

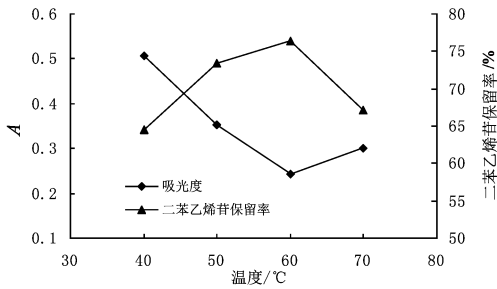


图4 温度对益龄精口服液的絮凝澄清工艺的影响

2.5 正交试验优选 在单因素考察结果基础上,发现提取液质量浓度、壳聚糖用量、絮凝温度对絮凝澄清效果影响较大。采用正交试验法,以吸光度和二苯乙烯苷保留率为指标,选择3个主要影响因素进一步优化,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,其余基本操作同 2.4.2 项下方法。因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3~5。

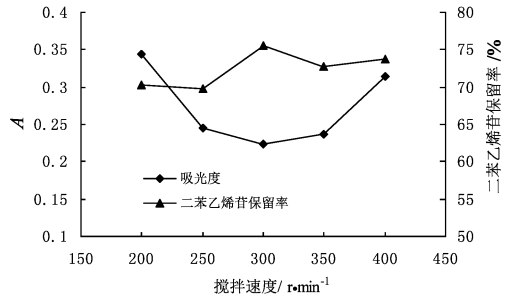


图5 搅拌速度对益龄精口服液的絮凝澄清工艺的影响

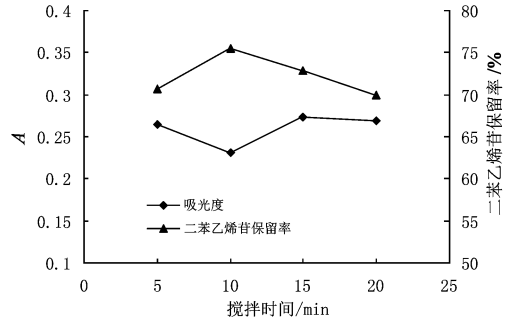


图6 搅拌时间对益龄精口服液的絮凝澄清工艺的影响

表1 益龄精口服液的絮凝工艺条件优选正交试验因素水平

水平	A	B	C
	提取液质量浓度 /g·mL ⁻¹	壳聚糖用量 /mL·g ⁻¹	絮凝温度/°C
1	0.33	1.0	50
2	0.25	1.2	60
3	0.20	1.4	70

表2 益龄精口服液的絮凝工艺条件优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	吸光度	二苯乙烯苷保留率/%	综合评分
1	1	1	1	1	0.244	67.34	91.43
2	1	2	2	2	0.238	68.73	92.84
3	1	3	3	3	0.251	66.84	90.68
4	2	1	2	3	0.205	74.36	98.96
5	2	2	3	1	0.219	72.28	96.61
6	2	3	1	2	0.228	67.50	92.36
7	3	1	3	2	0.242	74.85	97.49
8	3	2	1	3	0.230	73.53	97.05
9	3	3	2	1	0.248	75.67	97.84
K_1	275.0	287.9	280.8	285.9			
K_2	287.9	286.5	289.6	282.7			
K_3	292.4	280.9	284.8	286.7			
R	17.43	7.00	8.80	4.00			

注:综合评分 = (1 - 吸光度)/(1 - 吸光度_{min}) × 40% + 二苯乙烯苷保留率/二苯乙烯苷保留率_{max} × 60%。

表 3 吸光度方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	1.26×10^{-3}	2	6.31×10^{-4}	10.16	>0.05
B	3.24×10^{-4}	2	1.62×10^{-4}	2.60	>0.05
C	7.36×10^{-5}	2	3.68×10^{-5}	0.59	>0.05
D(误差)	1.24×10^{-4}	2	6.21×10^{-5}		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; $F_{0.01}(2,2) = 99.0$ (表 4,5 同)。

表 4 二苯乙烯苷保留率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	74.58	2	37.29	21.40	<0.05
B	7.48	2	3.74	2.15	>0.05
C	18.03	2	9.01	5.17	>0.05
D(误差)	3.48	2	1.74		

表 5 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	54.68	2	27.34	18.34	>0.05
B	9.17	2	4.58	3.07	>0.05
C	12.95	2	6.48	4.34	>0.05
D(误差)	2.98	2	1.49		

由表 4 可知,仅 A 因素对二苯乙烯苷保留率影响差异有统计学意义。以吸光度为评价指标,吸收值越小表明药液澄明度越高,由直观分析可知 $A_2B_2C_2$ 方案最佳;以二苯乙烯苷保留率和综合评分为评价指标,直观分析可知最佳方案均为 $A_3B_1C_2$ 。两方案的提取液质量浓度不同,故本试验选择方案 $A_3B_2C_2$, $A_2B_2C_2$ 及 $A_3B_1C_2$ 进行验证试验。

2.6 验证试验 取 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提取液 9 份,每份 200 mL,每方案重复 3 次,分别按方案 $A_3B_2C_2$ (1), $A_2B_2C_2$ (2), $A_3B_1C_2$ (3) 稀释至不同质量浓度,调 pH 5.0 ~ 5.5,按要求加入相应量的壳聚糖溶液,其他操作同 2.4.2 项下方法,结果见平均吸光度依次为 0.228, 0.236, 0.223;二苯乙烯苷平均保留率分别为 77.25%, 81.50%, 71.94%。对以上 3 个方案二苯乙烯苷保留率进行两两 t 检验,结果表明方案 1 与 2 差异无统计学意义,方案 1 与 3,方案 2 与 3 差异有统计学意义。综上,确定益龄精口服液絮凝澄清的最佳工艺条件为 $A_2B_2C_2$,即提取液质量浓度 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 5.0 ~ 5.5,于磁力搅拌器上加热恒温至 $60 \text{ }^\circ\text{C}$,搅拌速度 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,按 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 缓慢加入壳聚糖溶液,搅拌 10 min,静置 12 h,离心 15 min ($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。

2.7 絮凝澄清法与醇沉法的比较

2.7.1 絮凝澄清法 取 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提取液适量,按优选的絮凝澄清工艺条件进行处理,按 2.4.2 项下方法操作至离心步骤,抽滤,滤液于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓

缩至约 85 mL,加入炼蜜 20 g,搅匀,静置,抽滤,滤液定容至 100 mL,即得。

2.7.2 醇沉法 提取液减压浓缩至相对密度 1.08 ($60 \text{ }^\circ\text{C}$),加入 1.5 倍量乙醇,搅匀,冰箱里静置 24 h,滤过,滤液回收乙醇,加入 20 g 炼蜜,搅匀,制成约 100 mL,静置,抽滤,定容至 100 mL,即得。

分别取絮凝澄清和醇沉所得成品适量,测定吸光度分别为 0.205, 0.358;二苯乙烯苷保留率分别为 44.16%, 21.02%;2 周后采用醇沉法纯化后得到的澄清液有沉淀析出,且振摇后不易分散。表明絮凝澄清所得产品有效成分含量明显提高,且药液澄明度问题也得以明显改善。

3 讨论

在絮凝澄清过程中,壳聚糖用量不可过低或过高,絮凝剂加入量较少时,不足以与蛋白质、鞣酸等杂质分子发生较强的吸附架桥和电中和作用,溶液澄明度得不到明显改善;而过高时则由于絮凝剂加入量的增加,有效成分保留率有所下降(图 2)。壳聚糖澄清法纯化中药提取液优于醇沉法,提取液经处理后,有效成分损失少,易于浓缩、干燥,其干膏不易吸湿,且具有操作简便、生产安全、生产周期短、成本低廉等优点,目前已越来越受到人们的重视。

[参考文献]

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂. 第 6 册, WS₃-B-1220-92 [S]. 1992:155.
- [2] 刘斐,陈虹,罗亚娇,等. 壳聚糖对紫花苜蓿醇提液中总皂苷含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(4):56.
- [3] 楚辉辉,唐路梅,夏新华. 壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺纯化乙肝宁复方水提液的对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):1.
- [4] 李静,王晓义,蒲宇红,等. 健胃消食口服液澄清工艺的实验研究[J]. 中成药, 2011, 33(1):158.
- [5] 刘诗青,夏新华,彭买姣,等. 壳聚糖用于湘 A-1 号颗粒剂的絮凝工艺研究[J]. 中成药, 2010, 32(5):873.
- [6] 朱海涛,黄志利,袁胜浩,等. 壳聚糖用于风湿 II 号合剂澄清工艺探讨[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(14):1190.
- [7] 盛华刚,朱立俏,林桂涛. 壳聚糖澄清剂对枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的纯化工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4):15.
- [8] 蒋敏,夏新华. 壳聚糖用于湘 A-2 号颗粒的絮凝工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6):33.
- [9] 罗兴洪,周进东,吴静,等. 壳聚糖用于咳喘宁口服液澄清工艺的研究[J]. 中成药, 2002, 24(5):337.

[责任编辑 仝燕]