

• 制剂工艺 •

# 壳聚糖用于湘 A-2 号颗粒的絮凝工艺研究

蒋 敏<sup>1,2</sup>, 夏新华<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省医药学校, 湖南 长沙 410014)

[摘要] 目的: 探索壳聚糖用于湘 A-2 号颗粒的最佳絮凝澄清工艺条件。方法: 在对壳聚糖加入量、药液浓度、pH 值、温度、搅拌速度等进行单因素考察后, 采用正交试验法对药液浓度、壳聚糖加入量、及药液 pH 值进行优化。结果: 湘 A-2 号颗粒的絮凝工艺的优化条件为: 壳聚糖加入量  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , 药液浓度为 1:4, 药液 pH 值为 7, 温度  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 搅拌速度为  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 搅拌时间为 10 min。结论: 壳聚糖絮凝澄清工艺可用于湘 A-2 号颗粒的纯化。

[关键词] 湘 A-2 号颗粒; 壳聚糖; 絮凝工艺; 芍药苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0033-04

## Study on Flocculation Procedure with Chitosan for Xiang A-2 Granules

JIANG Min<sup>1,2</sup>, XIA Xin-hua<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of TCM, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Hunan School of medicine and pharmacy, Changsha 410014, China)

[Abstract] **Objective:** To study the flocculation process with chitosan for Xiang A-2 Granules. **Methods** On the basis of the one-factor investigation such as the amount of chitosan, the concentration and pH of the extracting solution, temperature and stirring etc, the experiments for the further optimization of flocculation process conditions were arranged with orthogonal design. **Results:** The optimal flocculation process conditions were as follows. The adding amount of chitosan was  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , the extract solution and medicinal materials were in the ratio of one to four 1:4, the PH of the solution was 7, the flocculation temperature was  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , the stirring speed was  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  and the stirring time was 10 minutes. **Conclusion:** The flocculation process with chitosan can be used for the purification of Xiang A-2 Granules.

[Key words] Xiang A-2 Granules; chitosan; flocculation; paeoniflorin; HPLC

湘 A-2 号颗粒系由白芍、当归、柴胡、白术、茯苓等 9 味中药组方制备而成, 具有益气健脾养血、滋养肝肾、补肾益精的功能, 临床上对艾滋病具有防治作用。为减少服用剂量, 改善制剂的质量(如溶化性), 并避免多糖类有效成分的损失, 本文采用壳聚糖澄清剂对湘 A-2 号颗粒水提液进行了纯化研究。

### 1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪, Breese 色谱工作站; 800 型离心沉淀器(长沙英泰仪器厂); 岛津 UV-265 型分光光度计(上海顾村光电光仪器厂); DF101-S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂)。

芍药苷对照品(批号: 0736-200527, 中国药品生物制品检定所); 壳聚糖(批号: 060218, 厦门蓝自然蓝贸易有限公司); 白芍、当归、白术等 9 味中药, 购自湖南省医药销售有限公司。

### 2 方法与结果

#### 2.1 样品溶液的测定

**2.1.1 固形物保留率的测定** 取絮凝前后的样品溶液各 25.0 mL, 分别置于干燥至恒重的蒸发皿中,

[收稿日期] 2008-12-01

[基金项目] 湖南省卫生厅中医药科研专项基金(6201-5)

[通讯作者] \* 夏新华, Tel: (0731) 8458231; E-mail: xiaxinhua001@163.com

于 105 °C 干燥 3 h, 移至干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定, 与絮凝前样品液中的固形物相比, 计算固形物保留率。

**2.1.2 吸光度测定** 取样品溶液适量, 以蒸馏水为空白, 照紫外分光光度法于 650 nm 测定吸光度。

**2.1.3 芍药苷的含量测定** 色谱条件<sup>[1]</sup>: C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (13:87) 为流动相; 检测波长为 230 nm; 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为室温。理论板数以芍药苷峰计算应不低于 2000。

对照品溶液的制备 精密称定芍药苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 61.5 μg 的对照品溶液。

供试品溶液的制备与测定 精密量取纯化后提取液 2 mL, 置于离心管中, 再精密加入甲醇 8 mL 摇匀, 离心 10 min, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液 5 μL 与供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 计算含量, 即得。

按上述方法进行测定, 供试品色谱中芍药苷色谱峰与其它成分的色谱峰分离良好, 阴性对照色谱未见干扰。

**2.1.4 线性关系考察** 精密吸取浓度为 61.5 μg·mL<sup>-1</sup> 的芍药苷对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16 μL, 按照芍药苷色谱条件测定峰面积, 以芍药苷对照品的进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标计算回归方程得: A = 100371C - 26334 (r = 0.999 6), 线性范围: 123~984 ng。

## 2.2 水提液絮凝澄清工艺条件的考察

**2.2.1 湘 A-2 号颗粒水提液的制备** 照湘 A-2 号颗粒处方称取药材, 加水浸泡 0.5 h, 提取 2 次, 加水量分别为 12, 10 倍, 提取时间分别为 2.5, 2.0 h, 收集提取液, 备用。

**2.2.2 壳聚糖溶液的制备** 取 1 g 壳聚糖溶于 100 mL 1% HAc 溶液中, 搅拌 15 min, 静置 24 h, 备用。

**2.2.3 壳聚糖加入量对絮凝工艺的影响** 取湘 A-2 号颗粒水提液适量, 减压浓缩至 1:5 (生药 g: 药液 mL), 分取 5 等份, 每份 100 mL, 于磁力搅拌器上加热至 60 °C 恒温, 然后在搅拌 (350 r·min<sup>-1</sup>) 下, 分别按 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL·g<sup>-1</sup> (按药液含生药量计算) 加入壳聚糖溶液, 搅拌 10 min, 静置 24 h, 离心 10 min (3 000 r·min<sup>-1</sup>), 滤过, 取滤液于 1 cm 吸收池, 在 650 nm 波长处测定其吸光度。结果表明, 壳聚糖加

入量对吸光度值影响明显, 当加入量为 0.6 mL·g<sup>-1</sup> 时药液吸光度值最小, 药液澄清效果最佳 (见表 1)。

表 1 壳聚糖用量考察

样品	壳聚糖加入量 (mL)	溶液澄清度	沉淀物形状	吸光度
1	8	+	颗粒状	0.321
2	12	++	颗粒状	0.307
3	16	+++	絮状	0.184
4	20	++	絮状	0.252
5	24	++	絮状	0.316

**2.2.4 药液浓度对絮凝工艺的影响** 取等量湘 A-2 号颗粒水提液 5 份, 分别真空浓缩至生药量 (g) 与药液体积 (mL) 之比为 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9, 置于磁力搅拌器上加热至 60 °C, 搅拌 (350 r·min<sup>-1</sup>) 10 min, 加入壳聚糖溶液 (按药液中生药量计, 每克生药加入 0.8 mL, 其余操作同“2.2.3”项下的方法。实验结果表明, 药液浓度对絮凝澄清效果影响明显, 当药液浓度在 1:3 (生药 g: 药液 mL) 时吸光度最低, 见表 2。

表 2 药液含量对澄清效果影响

样品	水提液浓缩程度	溶液澄清度	沉淀物形状	吸光度
1	1:1	-	颗粒状	1.183
2	1:3	+	絮状	0.287
3	1:5	++	絮状	0.359
4	1:7	++	絮状	0.391
5	1:9	+++	絮状	0.416

**2.2.5 pH 的考察** 取浓度为 1:3 的湘 A-2 号颗粒水提浓缩液 (pH 4.8) 100 mL, 共 5 份, 用 HCl/NaOH 调 pH 为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 加热至 60 °C, 以下操作同 2.2.3 项下方法。结果表明, 药液 PH 为 7.0 时吸光度最低, 药液澄清效果较好。

**2.2.6 温度的考察** 取浓缩程度为 1:3 的湘 A-2 号颗粒水提浓缩液 100 mL, 共 5 份, 分别加热至 40, 50, 60, 70, 80 °C, 搅拌 10 min (350 r·min<sup>-1</sup>), 以下操作同 2.2.3 项下方法。结果表明, 以 60 °C 时絮凝澄清效果较好。

**2.2.7 搅拌速度的考察** 取浓度为 1:3 的湘 A-2 号颗粒水提浓缩液 100 mL, 共 5 份, 加入 0.6 mL·g<sup>-1</sup> 壳聚糖溶液, 搅拌速度分别为 200, 250, 300, 350, 400 r·min<sup>-1</sup>, 其余操作同 2.2.3 项下方法。结果表明, 搅拌速度为 200 r·min<sup>-1</sup> 时, 吸光度最小。

**2.2.8 搅拌时间的考察** 取浓度为 1:3 的湘 A-2 号

颗粒水提浓缩液 100 mL, 共 5 份, 加入  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  壳聚糖溶液, 搅拌时间分别为 5, 10, 15, 20, 25 min, 结果以搅拌 10 min 吸光度最小。

**2.2.9 正交试验优选壳聚糖絮凝澄清最佳工艺条件** 在上述单因素考察的基础上, 采用正交试验法对壳聚糖絮凝澄清工艺的主要工艺参数进行优化。选择药液浓度、壳聚糖加入量、药液 pH 值 3 个主要影响因素进行考察(因素水平设计见表 3), 以吸光度、固形物保留率及芍药苷含量作为评价指标, 用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验方案, 实验基本操作同 2.2.3 项下方法, 结果见表 4。

表 3 因素水平表

水平	A	B	C
	生药: 药液(g: mL)	药液 pH	壳聚糖加入量( $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ )
1	1: 2	6	0.6
2	1: 3	7	0.8
3	1: 4	8	1.0

表 4 正交试验统计结果

NO	A	B	C	D	吸光度	固形物保留率(%)	芍药苷含量(mg)
1	1	1	1	1	0.324	41.08	42.99
2	1	2	2	2	0.354	41.02	38.78
3	1	3	3	3	0.356	37.48	31.45
4	2	1	2	3	0.215	43.58	44.80
5	2	2	3	1	0.243	45.59	44.64
6	2	3	1	2	0.233	38.23	43.79
7	3	1	3	2	0.205	48.25	48.63
8	3	2	1	3	0.189	47.11	51.07
9	3	3	2	1	0.198	48.70	46.13
吸光度	$K_1$	1.034	0.744	0.746	0.765		
	$K_2$	0.691	0.786	0.767	0.792		
	$K_3$	0.592	0.787	0.804	0.76		
	R	0.442	0.043	0.058	0.032		
固形物保留率	$K_1$	119.58	132.91	126.42	135.37		
	$K_2$	127.4	133.72	133.3	127.5		
	$K_3$	144.06	124.41	131.32	128.17		
	R	24.48	9.31	6.88	7.87		
芍药苷含量	$K_1$	113.22	136.42	137.85	133.76		
	$K_2$	133.23	134.49	129.71	131.2		
	$K_3$	145.83	121.37	124.72	127.32		
	R	32.61	15.05	13.13	6.44		

根据表 4 中实验数据的处理结果, 以吸光度为评价指标, 由于吸光度越小表明药液澄清度越高, 故由直观分析可知  $A_3B_1C_1$  方案最佳, 方差分析表明药液浓度对絮凝澄清效果具有显著性影响( $P < 0.05$ ), 而药液 pH 值、壳聚糖加入量的影响则不显著( $P > 0.05$ ); 以固形物保留率为评价指标, 方差分析表明各因素对固形物保留率均无显著性影响( $P > 0.05$ ); 以芍药苷含量为评价指标, 直观分析表明最佳方案为  $A_3B_1C_1$ , 方差分析表明药液浓度对絮凝澄清效果具有显著性影响( $P < 0.05$ ), 而药液 pH 值、壳聚糖加入量的影响则不显著( $P > 0.05$ )。综合以上分析, 可确定湘 A-2 号颗粒水提液絮凝澄清纯化的最佳工艺条件为  $A_3B_1C_1$ , 即取浓度为 1: 4(生药 g: 药液 mL) 的药液, 调 pH6, 加热恒温至  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 在  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的搅拌条件下加入 1% 壳聚糖溶液(按药液中生药量计, 每克生药加入 0.6 mL), 搅拌 10 min, 静置 24 h 后离心, 过滤即得。

**2.2.10 纯化工序验证试验** 由于优选的工艺未包括在正交表安排的实验中, 所以进行工艺的验证试验, 取相同提取液适量, 共 3 份, 分别按上述优选方案  $A_3B_1C_1$  进行实验。结果表明, 3 次平行试验结果较为接近, 且纯化后芍药苷含量均高于上述正交试验 9 个方案的含量, 说明此方案稳定可行, 故确定  $A_3B_1C_1$  为最优工艺条件(见表 5)。

表 5 验证试验结果

批次	固形物保留率(%)	芍药苷含量		
		絮凝前(mg)	絮凝后(mg)	保留率(%)
1	46.68	66.10	52.36	79.21
2	45.22	64.16	51.89	80.87
3	45.71	65.89	52.48	79.65

### 3 讨论

中药絮凝澄清技术目前主要作为中药水提液无醇澄清工艺或作为中药醇沉工艺的替代方法, 用于中药液体制剂和固体制剂的生产, 以提高中药制剂的质量。大量研究表明<sup>[2-4]</sup>, 絮凝澄清法优于醇沉法, 具有生产安全, 周期短, 成本低, 可溶性有效成分损失少, 特别是乙醇法损失严重的多糖类和无机成分在纯化中能得到很好的保留等优点。目前, 常用的絮凝澄清剂主要有壳聚糖(ZTC 1+ 1)天然澄清剂及 101 果汁澄清剂, 以壳聚糖的应用最多。因此, 选

择壳聚糖作为澄清剂用于本制剂的纯化精制。

药液澄清度与药液在某一波长的吸光度有关,故选择药液的吸光度作为絮凝工艺条件筛选的指标之一。预实验表明,湘 A-2 号颗粒澄清水提液在波长 600 nm 以上区域的吸收值很小,且吸收曲线较为平坦,表明在此区域的吸收值受药液本身的成分影响小,可用于反映药液中混悬微粒对澄清度的影响,故本实验选择 650 nm 为测定波长。

通过纯化前后芍药苷含量的对比,得知芍药苷的保留率为 78%,表明壳聚糖用于湘 A-2 号颗粒的纯化可行,且产品具有良好的溶化性。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 69.
- [2] 冯年平, 郁 威. 中药提取分离技术原理与应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 151.
- [3] 任荣军, 夏新华, 严建业. 壳聚糖用于驴胶补血颗粒的絮凝工艺研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 9 - 11.
- [4] 苗兰兰, 秦雪梅. 清热解毒口服液的絮凝澄清技术[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(7): 413-415.