

基于生物指标与理化指标结合模式指导的加味甘麦大枣颗粒精制纯化工艺

周琴妹, 朱萱萱, 刘顺, 王伟中* (南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

摘要: 目的 优选加味甘麦大枣颗粒的精制纯化工艺。方法 以药效为指标, 确定制剂的精制纯化工艺路线; 以甘草苷转移率为定量指标, 甘草、合欢皮、地龙的薄层色谱为定性指标优选制剂的工艺参数。结果 最佳精制纯化工艺: 水煎煮液浓缩至相对密度为 1.10(60 ℃), 加乙醇至 50%, 搅拌速率 300 r·min⁻¹, 静置 24 h。结论 制定的制剂工艺可行, 保证了制剂的有效稳定。

关键词: 加味甘麦大枣; 精制工艺; 生物指标; 理化指标

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)06-0845-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.013

引用本文: 周琴妹, 朱萱萱, 刘顺, 等. 基于生物指标与理化指标结合模式指导的加味甘麦大枣颗粒精制纯化工艺[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 845-849.

Studies on the Refinement and Purification Process of Jiawei Ganmai Dazao Granule Based on the Combination of Biological and Physicochemical Indexes

ZHOU Qinmei, ZHU Xuanxuan, LIU Shun, WAN Weizhong* (Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction and purification of Jiawei Ganmai Dazao granules. **METHODS** The purification process of the preparation was determined based on the pharmacodynamics. Transfer rate glycyrrhizin was taken as the quantitative index, the TLC of Glycyrrhiza, *Albizia julibrissin* Durazz and *Pheretima* were selected as the qualitative index, and the technological parameters of the preparation were optimized. **RESULTS** The optimum purification process was as follows: the water decocting solution was concentrated to 1.10 (60 ℃), ethanol to 50%, stirring rate 300 r·min⁻¹, and static 24 h. **CONCLUSION** The formulation process is feasible and the preparation is effective and stabile.

KEY WORDS: Jiawei Ganmai Dazao granules; purification process; biological index; physicochemical index

影响中药材安全、药效、质量的因素相当复杂, 在药材的品种固定、产地固定, 处方组成固定的情况下, 制剂的药效、毒性、理化性质由制剂工艺决定^[1-3]。制剂工艺是药品安全、有效的最后屏障, 因此, 制剂工艺研究中评价指标的选择显得尤为重要。近年来, 生物指标指导制剂研究中的提取纯化工艺已得到广泛应用^[3]。加味甘麦大枣颗粒是根据章永红名中医治疗抑郁症心得而成的组方, 在临床运用甘麦大枣汤加合欢皮、地龙后疗效更显著。笔者采用生物指标指导本制剂的精制纯化工艺路线, 以与制剂相关的理化指标优选

最佳工艺参数, 以达到制剂安全有效、质量可控的目的。

1 材料与仪器

1.1 动物

ICR 小鼠, ♂, 体质量 20~22 g, 由南通大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK-(苏)2008-0010。

清洁级 SD 大鼠, ♂, 体质量(210±10) g, 由南通大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(苏)2014-0001。大鼠(5-HT)批号: 20140728XW; 大鼠(NE)批号: 20140728xn; 大鼠(5-HTR1A)批号:

基金项目: 江苏省中医药局康缘中医药科技创新基金项目(HZ1017KY)

作者简介: 周琴妹, 女, 主任中药师 Tel: (025)86529291 E-mail: zhoumeizi0917@163.com *通信作者: 王伟中, 男, 主任中药师 Tel: (025)86529291 E-mail: 1466229260@qq.com

20140811CE。

1.2 药物与试剂

盐酸氟西汀(礼来苏州制药有限公司, 批号: 3461A); 利血平(美国 Sigma, 批号: BCBk8806v); 酶联免疫检测试剂盒(美国 GBD 公司, 批号: 20130612CT); 甘草苷对照品(供含量测定用, 含量: 95.6%; 批号: 111610-200503), 合欢皮(批号: 121549-201102)、地龙(批号: 120987-201107)、甘草(批号: 120904-201117)对照药材均购于中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯; 乙醇、乙酸乙酯等有机溶剂均为分析纯。

1.3 仪器

Agilent 1100 LC 型高效液相色谱仪(美国 Agilent); MS205DU 型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多); N-1001D-W(D)旋转蒸发仪(日本东京理化 EYELA); inolab pH 7400 酸度计(德国 WTW 公司); HHS11-2-II 型恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂); HL-2 型恒流泵(上海沪西分析仪器厂); 200 μ L 微量移液管(德国 Eppendorf); SUN RISE 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司); TDL-80-2B 型鸽牌系列离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法与结果

根据组方中药材在制剂中的主要成分性质, 5 味药材主要有效成分均能溶于水, 可用水煎煮提取。但由于组方中小麦含有较多淀粉类物质, 水煎液易凝固成半固体状态, 流动性差, 不利于制剂成型, 因此拟定 2 条工艺路线对水提取液进行精制纯化, 用生物指标确定最佳提取纯化工艺路线, 然后用理化指标对确定的工艺参数进行优化。

2.1 水提液高速离心纯化工艺(工艺 I)

取加味甘麦大枣煎煮液(相对密度为 1.10, 60 $^{\circ}$ C), 高速离心, 得离心液(含生药量为 1 g $\cdot$ mL $^{-1}$), 制粒, 即得工艺 I 组颗粒。

2.2 水提液 60%醇沉纯化工艺(工艺 II)

取加味甘麦大枣煎煮液(相对密度为 1.10, 60 $^{\circ}$ C)加乙醇, 边加边搅拌, 使含醇量为 60%, 冷藏 24 h, 滤过, 回收乙醇浓缩至原药液的浓度(含生药量为 1 g $\cdot$ mL $^{-1}$), 制粒, 即得工艺 II 组颗粒。

2.3 生物指标优选工艺路线

根据加味甘麦大枣颗粒可以改善模型动物的抑郁状态, 缓解其在应激环境下的心理绝望情况,

本研究以给药 15, 30 d 后小鼠游泳累积不动时间及利血平所致的抑郁模型大鼠血清中 5-羟色胺受体(5-HTR1A)、5-羟色胺(5-HT)含量水平为指标, 比较 2 种工艺的复方甘麦大枣颗粒药效。用 SPSS 16.1 统计软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2.3.1 同剂量加味甘麦大枣颗粒对小鼠 15, 30 d 游泳累积不动时间的影响^[4] 取 40 只小鼠随机分为 4 组, 将 ICR 小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为空白组(生理盐水); 阳性对照组(氟西汀, 20.0 mg $\cdot$ kg $^{-1}$); 加味甘麦大枣工艺 I 组与工艺 II 组, 灌胃给药 0.1 mL $\cdot$ (10 g) $^{-1}$ 。在各组小鼠第 15, 30 天给予相同剂量的加味甘麦大枣颗粒 45 min 后, 分别将单只小鼠放入自制游泳水箱中, 水温为(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 适应 2 min 后, 开始计算 5 min 内累计不动时间。结果显示, 与空白组相比, 工艺 I 组和工艺 II 组均可明显延长小鼠游泳累积不动时间, 具有抗抑郁作用, 但是工艺 II 组抗抑郁作用更显著。结果见表 1。

表 1 加味甘麦大枣颗粒对小鼠第 15, 30 天游泳累积不动时间的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of Jiawei Ganmai Dazao granules on swimming accumulation time on the 15th and 30th day in mice($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	15 d 累积不动时间/s	30 d 累积不动时间/s
空白组	116.8 $\pm$ 73.95	134.2 $\pm$ 43.63
盐酸氟西汀组	174.9 $\pm$ 36.31 ¹⁾	217.3 $\pm$ 39.07 ²⁾
工艺 I 组	178.6 $\pm$ 75.31	184.9 $\pm$ 58.92 ¹⁾
工艺 II 组	203.8 $\pm$ 36.37 ²⁾	188.6 $\pm$ 55.00 ¹⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.3.2 对利血平所致的大鼠抑郁模型血清中 5-HTR1A, 5-HT 水平的影响 取 90 只 SD 大鼠随机分为 9 组, 每组 10 只。正常对照组(等量蒸馏水)、模型组(等量蒸馏水)、盐酸氟西汀组(5.33 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)以及工艺 I 和 II 的低、中、高剂量组(7.5, 15, 30 g $\cdot$ kg $^{-1}$)的给药容量为 10 mL $\cdot$ kg $^{-1}$ 。适应性饲养 3 d 后, 每日给药 1 次, 给药 30 d, 于末次给药 24 h 后处死大鼠, 置-20 $^{\circ}$ C 冰箱中断头取出大脑, 采用 ELISA 法测定单胺类神经递质 5-HT 和 5-HTR1A 的含量, 结果显示工艺 II 明显优于工艺 I, 结果见表 2。确定复方甘麦大枣颗粒的精制纯化工艺为

工艺Ⅱ。但表 2 中高剂量组数据工艺Ⅱ组与中剂量组比反而降低了,可能是由于药物剂量到一定程度后对所测成分无明显作用,且数据的绝对值与大鼠的个体差异存在一定的相关性。

2.4 理化指标优选工艺参数

由于醇沉时药液的浓度、乙醇的浓度、搅拌速度对提取液纯化效果以及化学成分有较大的影响,选定药液的相对密度、醇沉浓度、醇沉时搅拌速率为考察因素,每个因素各设 3 水平(表 3),以甘草苷转移率为定量指标、以甘草薄层色谱图、合欢皮薄层色谱图、地龙薄层色谱图作为定性指标,优选醇沉工艺参数。设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。醇沉工艺:取加味甘麦大枣煎煮液,浓缩至规定的相对密度,加入乙醇,边加边搅拌,使含醇量为规定的浓度,冷藏 24 h,滤过,回收乙醇,浓缩至原药液的浓度,得 9 份样品溶液,分别测定甘草苷的转移率,并进行薄层色谱的比较。

表 2 不同工艺的加味甘麦大枣颗粒对抑郁症大鼠血清 5-HT_{1A}、5-HT 水平的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of Jiawei Ganmai Dazao granules of different processes on serum 5-HT_{1A} and 5-HT levels in rats with depression($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	
	5-HT _{1A}	5-HT
正常对照组	7.100±3.73	12.264±4.019
模型组	3.474±1.849 ¹⁾	6.711±2.864 ¹⁾
盐酸氟西汀组	5.381±1.446	14.278±2.923 ²⁾
工艺Ⅰ组(低剂量组)	3.421±1.741	10.567±4.729
工艺Ⅰ组(中剂量组)	5.416±1.23	11.894±3.786
工艺Ⅰ组(高剂量组)	4.945±1.346	9.787±2.726
工艺Ⅱ组(低剂量组)	4.413±1.070	12.662±5.51
工艺Ⅱ组(中剂量组)	6.516±1.075 ⁴⁾	13.140±4.788 ³⁾
工艺Ⅱ组(高剂量组)	5.493±1.452 ³⁾	11.537±2.726 ³⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较,³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

表 3 醇沉工艺因素水平表

Tab. 3 Level table of process factors for alcohol precipitation

水平	A 相对密度	B 醇沉浓度/%	C 搅拌速率/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$
1	1.10	50	200
2	1.15	60	300
3	1.20	70	500

2.4.1 对照品溶液的制备 取甘草苷对照品适量,精密称定,加 70%乙醇制成含甘草苷浓度为 $17.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,即得。

2.4.2 供试品溶液的制备 精密量取样品溶液 1 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 100 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4.3 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 19%A; 8~35 min, 19%→50%A; 35~36 min, 50%→100%A; 36~40 min, 100%→19%A);检测波长: 237 nm;流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温: 室温;进样量: 10 μL 。理论板数按甘草苷峰计算应 ≥ 5000 ^[4-9]。

2.4.4 甘草苷转移率的测定^[10] 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,测定醇沉液中甘草苷含量,计算其转移率,结果显示影响甘草苷转移率大小依次为 C>A>B,结果见表 4。由表 5 方差分析可知,A、B、C 3 因素对甘草苷转移率均无显著影响。根据定量测定结果分析并出于节约成本考虑,醇沉时的相对密度 1.10(60℃),醇沉浓度为 50%,搅拌速率为 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 较合适。

表 4 正交试验数据及极差分析结果

Tab. 4 Orthogonal test data and range analysis results table

水平	A	B	C	D	转移率/%
1	1(1.10)	1(50%)	1(200)	1	72.85
2	1(1.10)	2(60%)	2(300)	2	73.10
3	1(1.10)	3(70%)	3(500)	3	74.21
4	2(1.15)	1(50%)	2(300)	3	84.82
5	2(1.15)	2(60%)	3(500)	1	74.97
6	2(1.15)	3(70%)	1(100)	2	80.10
7	3(1.20)	1(50%)	3(500)	2	73.58
8	3(1.20)	2(60%)	1(200)	3	79.75
9	3(1.20)	3(70%)	2(300)	1	90.61
K_1	220.16	231.25	232.70	238.43	
K_2	239.89	227.82	248.53	226.78	
K_3	243.94	244.92	222.76	238.78	
R	7.93	5.70	8.59	4.00	

表 5 方差分析表

Tab. 5 ANOVA table

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	107.91	2	53.95	3.47	>0.05
B	54.56	2	27.28	1.75	>0.05
C	112.61	2	56.30	3.62	>0.05
D(误差)	31.09	2	15.55		

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

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

2.4.5 不同醇沉工艺的薄层色谱图比较

2.4.5.1 地龙的薄层图谱 取“2.4”项下正交试验 9 份样品上清液作为供试品溶液。称取地龙对照药材 1 g, 粉碎成细粉, 加水 10 mL, 加热煮沸, 放冷, 离心, 取上清液, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法试验^[8], 吸取上述 10 份溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇-冰醋酸-水(4:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以茚三酮试液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果见图 1。

2.4.5.2 合欢皮的薄层图谱 取“2.4”项下正交试验 9 份样品液各 15 mL, 水浴浓缩至 5 mL, 加 50%甲醇 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 5 mL 水使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次, 每次 10 mL, 合并正丁醇液, 蒸干,

残渣加 2 mL 甲醇使溶解, 作为供试品溶液; 称取合欢皮对照药材 1 g, 粉碎成细粉, 同法制备, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法实验, 吸取上述 10 份溶液各 5 μ L 分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-甲醇-水(13:5:2)的下层溶液(每 10 mL 加甲酸 0.1 mL)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5%磷钼酸-乙醇试液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果见图 1。

2.4.5.3 甘草的薄层图谱 取“2.4”项下正交试验 9 份样品液各 15 mL, 水浴浓缩至 5 mL, 加入 30 mL 乙醚, 振摇提取, 弃去醚液, 水溶液中加入 30 mL 甲醇, 超声提取 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水溶解, 用水饱和正丁醇振摇提取 3 次, 每次 10 mL, 合并正丁醇液, 用水洗涤 3 次, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加 2 mL 甲醇, 使溶解, 作为供试品溶液。称取甘草对照药材 1 g, 粉碎成细粉, 同法制备, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法实验, 吸取上述 10 份溶液各 2 μ L, 分别点于同一用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10%硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果见图 1。

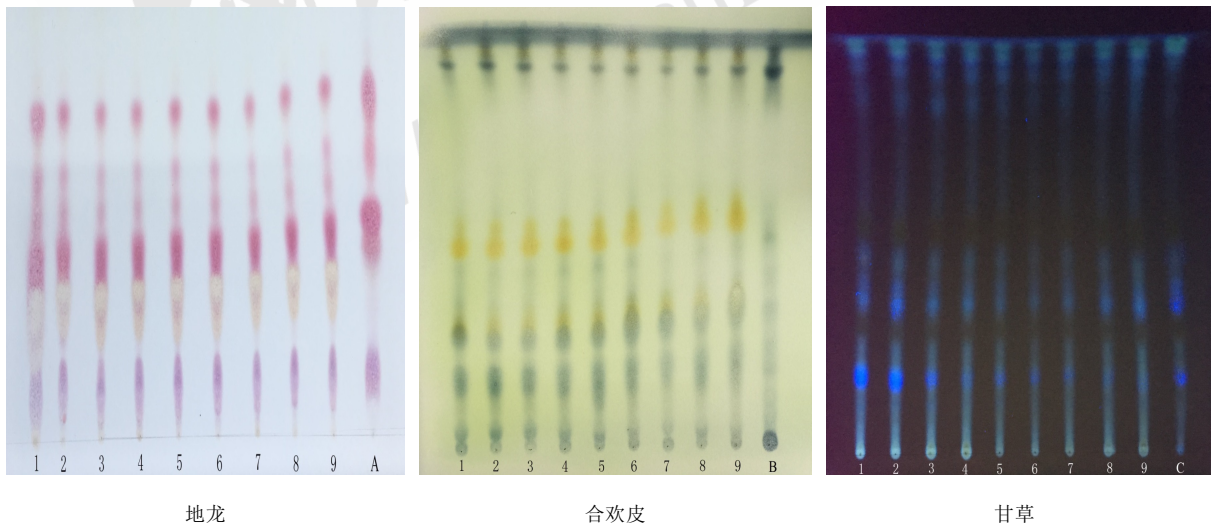


图 1 薄层色谱图

A-地龙对照药材; B-合欢皮对照药材; C-甘草对照药材; 1~9-正交试验的 9 份样品。

Fig. 1 The TLC chromatogram

A-control species of *Pheretima*; B-control species of *Albizia julibrissin* Durazz; C-control species of *Glycyrrhiza*; 1~9-nine samples of orthogonal test.

2.4.5.4 薄层色谱比较结果 由地龙、合欢皮、甘草薄层定性实验结果可知,正交试验9份样品的3味饮片色谱图中,在与对应的对照药材色谱相应位置上,均有相同颜色的斑点或荧光斑点,但醇沉时药液浓度(相对密度)越低,主斑点色泽(荧光强度)越清晰;而醇沉浓度越高,主斑点色泽(荧光强度)越弱。

综合正交试验的定量结果(甘草苷含量)与3味药的薄层定性结果,确定加味甘麦大枣颗粒的精制纯化工艺为醇沉法,醇沉工艺参数:水煎煮液浓缩至相对密度为1.10(60℃),加乙醇至50%,醇沉时搅拌速率为300 r·min⁻¹,静置24 h。

3 讨论

本研究在制剂工艺研究中,引入了饮片的薄层色谱图作为定性指标,作为制剂工艺研究中的辅助指标,在定量指标无显著性差异的情况下,为制剂工艺参数的确定提供了较有力的证据,为成品的质量标准制定提供依据,对今后的制剂研究工作具有一定的参考意义。

课题组前期研究结果表明^[11],复方甘麦大枣颗粒有抵抗利血平降低抑郁大鼠肛温的作用,可对抗抑郁症患者情绪低落、活动减少的症状,并可以阻断利血平排空脑内单胺5-HT神经递质,阻断利血平释放脑内5-HT_{1A}^[8]。因此在确定其制剂工艺路线时,同时考察了复方甘麦大枣颗粒对利血平所致的抑郁大鼠血清中5-HT_{1A}、5-HT水平的影响,并以此作为工艺研究的评价指标。

制剂的质量可控是指质量标准可以有效控制制剂工艺的稳定性、安全性和有效性,使制剂质量保持一致和稳定;而精制纯化后提取液的有效性是由其成分决定的,把提取液的理化指标制定为制剂的质量标准,使制剂的质量标准与工艺、药效相关联,解决了质量标准与工艺、药效相关

系数较小或不具有相关性的问题。工艺决定制剂的质量和疗效,因此应用生物指标与理化指标结合作为制剂工艺优选的指标,对中药制剂的研究具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] 于喜水. 建立安全、有效、质量可控的中药工艺研究模式的构想[J]. 科技创新与应用, 2015, 36(27): 3-4.
- [2] XIAO X H, XIAO P G, WANG Y Y. Some key issues about scientific research on traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(2): 119-123.
- [3] YU X S, SU H, LI L L, et al. Optimization of extraction and purification for alkaloids of *Sophora flavescens* by safe, effective and quality controllable research mode [J]. Central South Pharmacy(中南药学), 2016, 14(2): 150-153.
- [4] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 人民卫生出版社: 807-808.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2015: 86-87.
- [6] WU Q F, DAI X Y, WEN X X. Determination of the contents of amarogentin and glycyrrhizic acid in Quyu Qingre granules [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2012, 30(8): 1708-1710.
- [7] CHAI J, WANG J P, XIE Z Y. Determination of baicalin, berberine hydrochloride, prim-o-glucosylcimifugin and liquiritin in Mingmu Jili Pill by HPLC at the same time [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31(3): 652-654.
- [8] BATU D, GAO Y F, QING Y. Determination of glycyrrhizin glycyrrhizic acid and gentiopicrin in Liyanxiao particle and Liyanxiao Traditional decoction by HPLC [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28(11): 2265-2269.
- [9] YANG X J, ZHAO X L, DI L Q, et al. Determination of paeoniflorin, liquiritin, liquiritigenin and ammonium glycyrrhizinate in total effective fractions from paeonia and glycyrrhiza decoction [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2007, 25(3): 522-524.
- [10] LIU S, XU T S, ZHOU Q M. Quality standard research of Jiawei Ganmai Dazao granule [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2015, 33(10): 2433-2436.
- [11] ZHOU Q M, ZHU X X, ZHANG X F, et al. Influence of compound Ganmai Dazao granule on 5-HT and 5-HT_{1A} in brain of depression rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2015, 33(7): 1639-1643.

收稿日期: 2017-07-27

(本文责编: 蔡珊珊)