

养肝增免合剂澄清工艺的优选

崔思娇¹, 杨光照², 汪宇^{1*} (1 中国人民解放军第四六三医院, 沈阳 110042; 2 沈阳陆军总院, 沈阳 110016)

摘要: 目的 优选养肝增免合剂的澄清工艺。方法 以澄清度和阿魏酸含量为指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察壳聚糖加入量、pH、温度等因素对絮凝澄清工艺的影响; 考察醇沉浓度、pH、醇沉时间等因素对醇沉工艺的影响。比较 2 种工艺在最优条件下的澄清效果。结果 壳聚糖絮凝澄清法为最佳工艺, 优化工艺为壳聚糖加入量 0.1%, 体系 pH 5.0, 絮凝时体系温度为 45 ℃。结论 优选的工艺条件稳定、可行, 缩短了生产周期, 降低了成本, 可作为养肝增免合剂的澄清工艺。

关键词: 养肝增免合剂; 壳聚糖; 阿魏酸; 澄清工艺

中图分类号: R944 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)09-1239-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.005

引用本文: 崔思娇, 杨光照, 汪宇. 养肝增免合剂澄清工艺的优选[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1239-1242.

Optimization of the Clarification Technology of Yanggan Zengmian Mixture

CUI Sijiao¹, YANG Guangzhao², WANG Yu^{1*} (1. Chinese People's Liberation Army No. 463 Hospital, Shenyang 110042, China; 2. The General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize clarification technology conditions of Yanggan Zengmian mixture. **METHODS** With the indexes of content of ferulic acid and clarity, based on single factor test, orthogonal design was selected to optimize flocculation technology with chitosan dosage, pH, flocculation temperature as factors. To optimize alcohol precipitation process with alcohol concentration, pH, alcohol deposition time as factors. The clarification effect of the two processes was compared under the optimized conditions. **RESULTS** The best clarification technology was chitosan flocculation clarification method, the optimized condition was 0.10%, chitosan flocculating agent was added at pH 5.0 and 45 ℃. **CONCLUSION** Flocculation clarification method is stable, reliable, short period and lowered production cost, the clarification process can be used for Yanggan Zengmian mixture.

KEY WORDS: Yanggan Zengmian mixture; chitosan; ferulic acid; clarification technology

养肝增免合剂是解放军第四六三医院院内制剂, 批准文号为“沈制字(2012)F15056”, 主要由西洋参、黄芪、当归、枸杞子等多味中药组成, 具有滋补肝肾、益气养阴、补血填精、拟助正气的功效, 用于肝肾不足型急性病毒性肝炎早期、恢复期的免疫协调治疗, 经临床应用多年, 疗效显著。为提升制剂质量, 本研究对最佳条件下的 2 种澄清工艺的澄清效果进行比较, 确定最佳工艺及其条件, 为提升制剂质量提供依据, 确保患者用药安全、有效。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SSI 高效液相色谱仪(美国科学仪器中国有限公司); UV6000 紫外检测器(美国科学系统公司); ESJ120-4 电子分析天平(沈阳龙腾电子称量仪器有

限公司); CSF-1B 超声提取器(上海医疗器械厂); HH·S 电热恒温水浴锅(江苏红旗医疗器械厂); ZF-C 型三用紫外分析仪(上海康禾光电仪器有限公司)。

1.2 试药

养肝增免合剂(中国人民解放军第四六三医院制剂室, 规格为每袋 100 mL, 批号为 20160129, 20160428, 20160810); 阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110773-201313); 壳聚糖(青岛海维康生物制品有限公司, 批号: 01106); 乙腈、甲醇(天津市四友精细化学品有限公司, 色谱纯); 重蒸水(中国人民解放军第四六三医院自制)。

2 方法与结果

2.1 含量测定^[1-2]

2.1.1 色谱条件 Diamonsil ODS 色谱柱(250 mm×

基金项目: 军队医疗机构制剂标准提高项目(13ZJZ01-5)

作者简介: 崔思娇, 女, 硕士, 药师 Tel: (024)28845262
(024)28845259 E-mail: Ygz463463@sina.com

E-mail: sijiao2228@sina.com

*通信作者: 汪宇, 女, 博士, 主任药师

Tel:

4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(16:84); 检测波长为 320 nm; 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2.1.2 溶液的制备 对照品溶液的制备: 精密称取阿魏酸对照品适量, 加甲醇制成 0.537 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的阿魏酸对照品溶液。

供试品溶液的制备: 精密吸取养肝增免合剂 5.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液备用。

阴性对照品溶液的制备: 按处方量并以相同工艺制备不含当归的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制得阴性对照品溶液。

2.1.3 系统适应性试验 精密吸取“2.1.2”项下对照品、供试品、阴性对照溶液各适量, 按“2.1.1”项下色谱条件测定。理论板数按阿魏酸峰计算 ≥ 3000 , 分离度 >1.5 。色谱图见图 1。

2.1.4 线性关系考察 精密量取“2.1.2”项下对照品溶液, 稀释成 5 个浓度的对照品溶液, 浓度由低到高依次进样, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积值。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作线性回归, 得到阿魏酸对照品回归方程 $Y=59\,925X-8\,751(r^2=0.999\,9)$ 。结果表明, 阿魏酸浓度在 10.74~107.4 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 仪器精密度试验 吸取阿魏酸对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 每次进样 20 μ L, 测定峰面积, RSD 为 0.13%($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 制备同一批号供试品溶液 6 份, 依次进样, 每次进样 20 μ L, 结果显示, 阿魏酸的浓度为 0.134 mg $\cdot$ mL⁻¹, RSD 为 1.28%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 吸取同一供试品溶液于 0, 4,

8, 12, 16, 24 h 进样 20 μ L, 结果阿魏酸峰面积 RSD 为 1.44%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取养肝增免合剂(阿魏酸 0.134 mg $\cdot$ mL⁻¹)6 份, 每份 5 mL, 分别精密加入 1.0 mL 的对照品溶液, 按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 结果阿魏酸的回收率为 97.05%, RSD 为 1.18%($n=6$), 结果表明该方法的回收率良好。

2.2 养肝增免合剂澄清度工艺的研究^[3-7]

2.2.1 溶液的配制 供试品溶液的配制: 按养肝增免合剂处方配比及提取工艺制备供试品溶液。

壳聚糖澄清剂的配制: 用 1% 的醋酸在临用前配成 1% 的壳聚糖胶体溶液作为絮凝剂。

2.2.2 壳聚糖澄清工艺正交试验 在前期单因素试验基础上, 选择对养肝增免合剂澄清度影响较大的 3 个因素(絮凝时体系 pH、壳聚糖加入量、温度)为考察因素, 以药液的澄清度和阿魏酸含量为考察指标, 取供试品溶液 9 份, 每份 50 mL, 通过正交试验优选壳聚糖澄清工艺参数, 因素水平表见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

由方差分析结果可知, 3 个因素对指标的影响均有统计学意义, 经直观分析, 其影响大小顺序为絮凝时体系 pH $>$ 壳聚糖的加入量 $>$ 温度, 综合分析正交试验结果, 最终确定澄清度优化条件为 A₁B₃C₂, 即壳聚糖的加入量为 0.1%, 絮凝时体系 pH 为 5.0, 絮凝温度为 45 $^{\circ}$ C。

2.2.3 验证试验 取供试品药液 50 mL, 置于 100 mL 锥形瓶中, 用磷酸二氢钠和柠檬酸溶液调节药液 pH 5.0, 45 $^{\circ}$ C 水浴中搅拌下加入 0.1% 的壳聚糖, 低速搅拌 10 min, 静置 12 h。依此方法进行 3 次验证试验, 结果 3 份供试品溶液中阿魏酸含量平均值为 70.2 μ g $\cdot$ mL⁻¹, RSD 为 1.22%。表明优选的澄清工艺稳定、可行。

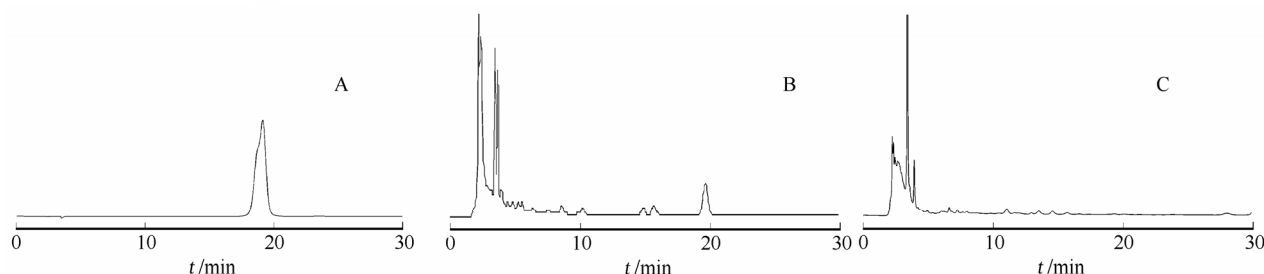


图 1 养肝增免合剂的高效液相色谱图

A-阿魏酸对照品; B-供试品; C-阴性对照。

Fig. 1 HPLC chromatograms of Yanggan Zengmian mixture

A-control sample; B-test sample; C-negative control sample without of angelica.

表 1 因素与水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	A 絮凝剂加入量/%	B pH	C 温度/℃
1	0.10	4.0	40
2	0.15	4.5	45
3	0.20	5.0	50

表 2 正交试验结果

Tab. 2 Results of the orthogonal test

No.	A	B	C	D	阿魏酸/ μg·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	67.5
2	1	2	2	2	71.2
3	1	3	3	3	64.7
4	2	1	2	3	56.9
5	2	2	3	1	67.3
6	2	3	1	2	55.7
7	3	1	3	2	62.1
8	3	2	1	3	66.9
9	3	3	2	1	55.6
K ₁	67.800	63.367	62.167	63.467	
K ₁	59.967	61.233	68.467	63.000	
K ₁	61.533	64.700	58.667	62.833	
R	7.833	9.800	3.467	0.634	

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Analysis result of variance

方差来源	偏差平方和	F 比	显著性
A	117.087	41.126	P<0.05
B	209.180	73.474	P<0.05
C	56.347	19.792	P<0.05
误差	2.85		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ 。

2.2.4 醇沉澄清工艺正交试验 前期单因素试验基础上,选择对养肝增免合剂澄清度影响较大的3个因素(醇沉浓度、系统 pH、醇沉时间)为考察因素,以药液的澄清度和阿魏酸含量为考察指标,取供试品溶液9份,每份50 mL,通过正交试验优选醇沉澄清工艺参数,因素水平表见表4,试验安排及结果见表5,方差分析见表6。

表 4 因素与水平

Tab. 4 Actors and levels

水平	A 醇沉浓度/%	B pH	C 时间/h
1	55	5.0	18
2	60	5.5	24
3	65	6.0	30

表 5 正交试验结果

Tab. 5 Results of the orthogonal test

No.	A	B	C	D	阿魏酸/ μg·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	42.2
2	1	2	2	2	35.9
3	1	3	3	3	28.8
4	2	1	2	3	44.8
5	2	2	3	1	33.9
6	2	3	1	2	30.3
7	3	1	3	2	41.4
8	3	2	1	3	34.3
9	3	3	2	1	31.8
K ₁	55.633	62.800	55.600	55.967	
K ₁	56.333	54.700	57.500	55.867	
K ₁	55.833	50.300	54.700	55.967	
R	0.700	12.500	2.800	0.100	

表 6 方差分析结果

Tab. 6 Analysis result of variance

方差来源	偏差平方和	F 比	显著性
A	0.780	39.000	P<0.05
B	241.220	12061.000	P<0.05
C	12.260	613.000	P<0.05
误差	0.02		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ 。

由方差分析结果可知,3个因素对指标的影响均有统计学意义,经直观分析,其影响大小顺序为醇沉时体系 pH>醇沉时间>醇沉浓度,综合正交试验结果,最终确定澄清度优化条件为 A₂B₁C₂,即醇沉浓度为60%,醇沉时体系 pH 为5.0,醇沉时间为24 h。

2.2.5 验证试验 取供试品药液50 mL,置于100 mL 锥形瓶中,用磷酸二氢钠和柠檬酸溶液调节药液 pH 5.0,搅拌下分别加入乙醇使得醇沉浓度为60%,静置24 h,过滤,滤液蒸至无醇味,加水定容到50 mL。依此方法进行3次验证试验,结果3份供试品溶液中阿魏酸含量平均值为43.9 μg·mL⁻¹,RSD 为1.32%。表明优选的澄清工艺稳定、可行。

3 讨论

与醇沉澄清工艺相比,在取得相近澄清效果的同时,壳聚糖澄清工艺大幅度减少了有效成分阿魏酸的损失量,保证了制剂质量,而且较好地体现了中药多成分、多组分的传统特色。就用药

安全性而言,壳聚糖是天然高分子物质,具有良好的生物相容性,可生物降解,利用天然胶体保护作用使制剂澄清,使用安全^[8-9]。从生产成本上考虑,与醇沉法相比,壳聚糖工艺制备方法简单,不需任何特殊设备,显著减少了劳动量,大幅度缩短了养肝增免合剂的生产周期,并且使用量极少,生产成本更低^[10]。

对壳聚糖澄清工艺的研究发现,絮凝时体系 pH 对工艺影响最大,其原因是碱性的溶液体系中负电荷与壳聚糖产生中和作用,减弱了壳聚糖的絮凝作用,澄清效果差。酸性环境有利于壳聚糖长链分子的伸展,充分发挥其吸附架桥作用和电中和作用,但是过低的 pH 值也会使壳聚糖由链状变成球状,黏度下降,同样影响澄清效果。阿魏酸化学结构决定了它在碱性条件下不稳定,因此要选择合理的 pH 范围来保证药品质量。综合絮凝效果和有效成分损失量这 2 方面因素,最终选择絮凝时体系 pH 值为 5.0。壳聚糖加入量对工艺影响也较为显著,长链结构的壳聚糖随着加入量的增加,吸附架桥作用逐渐增强,澄清效果逐步提升;但是阿魏酸含量随着壳聚糖加入量的增加呈下降的趋势,其原因可能是壳聚糖的加入导致药液中某些成分与杂质同时被絮凝沉降出来。为确保药品质量,最终选择壳聚糖的加入量为 0.1%。

REFERENCES

- [1] 邓松岳,王伟丽,朱明伟. 高效液相色谱法测定桂丹莪棱口

服液中阿魏酸含量[J]. 中国药业, 2012, 21(13): 26-27.

- [2] ZHANG H Z, LI Q X, SUN B Y, et al. Simultaneous determination of bergapten and ferulic acid in seselopsis by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(6): 648-651.
- [3] ZHAN Q, CHEN H M, YU Z M, et al. Optimization for extraction technology of Bitongxiao cataplasm by multicriteria comprehensive assessment [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(7): 891-895.
- [4] LEI C, XIA X H, HUANG M S, et al. Two purification processes of water extract from Herba Artemisiae [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 35(12): 2626-2630.
- [5] LU P, NI D J, GUO L J. Comparative studies on Jiangu oral liquids prepared with chitosan as the clarifier and ethanol precipitation method [J]. China Pharm(中国药师), 2012, 15(11): 1580-1582.
- [6] YANG L, XIA X H, ZHU Q, et al. Study on the rule of influence of two purification methods on the chemical compositions in aqueous solution of Paeoniae Radix Alba [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2013, 8(1): 12-15.
- [7] YE B B, SHI S L. Optimization of the extracting process of total organic acid from Cassia Twig by orthogonal experiment with ethanol reflux [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(4): 428-431.
- [8] HU Y. Studies on clarifying action of Chinese herbal medicine's water-extract with chitosan solution [J]. Jiangsu Pharm Clin Res(江苏药学与临床研究), 2002, 10(2): 23-25.
- [9] SHAN D T, XIE F, LI R H. Advances in research on relationship between biomedical properties of chitosan and its structure [J]. New Chem Mater(化工新型材料), 2012, 40(6): 19-21.
- [10] XIE W R, CHU K D, XU W, et al. Study of different natural clearing medium in clearing crafts of extraction liquid of Xingbi Gels [J]. J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学学报), 2012, 5(14): 43-45.

收稿日期: 2017-02-28

(本文责编: 蔡珊珊)