

四季草颗粒纯化工艺改进研究*

庞秀清^{1,2}, 李勇军¹, 何 迅^{1△}

(1. 贵州医科大学·贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省食品检验检测所, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 探讨新纯化工艺替代原纯化工艺用于四季草颗粒生产工艺的可行性。方法 以槲皮苷和总固体为评价指标, 对 5 种常用澄清剂进行比较试验。采用正交试验设计对最优澄清剂进行条件优化, 优选出最佳澄清剂。以最优澄清工艺与传统的醇沉工艺进行药效学试验比较, 对吸附澄清工艺进行综合评价。结果 吸附澄清剂为壳聚糖, 最佳工艺条件为提取液浓缩至 1:8 [生药(g):药液(mL)], 提取液 pH 为 4, 每 1 L 药液加入 1% 壳聚糖冰醋酸溶液 100 mL。结论 壳聚糖吸附澄清工艺具有工艺简单、成本低、有效成分损失少的特点, 可代替传统工艺用于四季草颗粒的制备。

关键词:四季草颗粒; 纯化工艺; 工艺改进

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)01-0020-04

Improvement of Purification Process of Sijicao Granules

Pang Xiuqing^{1,2}, Li Yongjun¹, He Xun¹

(1. Guizhou Medical University, Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guiyang, Guizhou, China 550004;

2. Guizhou Institute for Food Control, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To investigate a new purification process to substitute the original process for Sijicao Granules. **Methods** With quercetin and total solids as the evaluation indexes, the best clarifier was selected from five kinds of commonly used clarifier. The optimal clarifier was optimized by orthogonal test. Finally, the best clarification process was compared with the traditional alcohol precipitation process, and the comprehensive evaluation of the adsorption clarification process was carried out. **Results** The optimized adsorption clarifier was chitosan, and the conditions were as follows: the extract was concentrated to 1:8 [crude drug(g):liquid(mL)], the pH of extraction solution was 4, and 100 mL 1% chitosan glacial acetic acid solution was added into every 1 L drug solution. **Conclusion** The chitosan adsorption clarification process has the characteristics of simple process, low cost, and less loss of active ingredient, which can be used in the preparation of Sijicao Granules instead of the traditional process.

Key words: Sijicao Granules; purification process; process improvement

*基金项目: 2016 年贵州省科技创新人才团队建设计划项目 [黔科合平台人才 [2016]5613 号]。

第一作者: 庞秀清 (1987-), 女, 主管药师, 研究方向为中药新药研究开发, (电子信箱) pangxiuqing@163.com。

△通信作者: 何迅 (1969-), 男, 教授, 研究方向为中药新药研究开发, (电子信箱) 442170191@qq.com。

- [4] 杨 青, 王桂芳. 肺泡 II 型上皮细胞功能的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2012, 39(6): 658-662.
- [5] Ahmad IM, Britigan BE, Abdaila MY. Oxidation of Thiols and Modification of Redox-Sensitive Signaling in Human Lung Epithelial Cells Exposed to *Pseudomonas pyocyanin*[J]. J Toxicol Environ Health A, 2011, 74(1): 43-51.
- [6] Janssen WJ, McPhillips KA, Dickinson MG, et al. Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(2): 158-167.
- [7] Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease[J]. Annu Rev Med, 2010, 61(1): 105-119.
- [8] 肖纯凌, 李舒音, 尚德志, 等. 模拟大气混合物污染对大鼠肺表面蛋白 A 的影响[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(1): 46-48.
- [9] Xu GP, Xu D, Li HX, et al. Epithelial-mesenchymal transition of type II alveolar epithelial cells induced by TGF- β 1[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2007, 34(2): 223-227.
- [10] 闫庆倩, 赵学彬, 杨 莉, 等. 不同地区大气 PM_{2.5} 致肺损伤的比较实验研究[J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(1): 7-11.
- [11] 曲红梅, 牛静萍, 魁发瑞, 等. 大气中 PM_{2.5} 致大鼠呼吸道急性损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(5): 598-599.
- [12] 晓开提·依不拉音, 可丽别娜·吐尔逊, 范妙莉, 等. 某地大气细颗粒物对大鼠肺损害与维生素 E 的拮抗作用[J]. 毒理学杂志, 2013, 27(4): 287-290.
- [13] Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, et al. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor- α , macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 β , and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor- β 1 mRNA expression in acute lung inflammation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 10(2): 148-153.
- [14] Todd DA, Marsh MJ, George A, et al. Surfactant phospholipids, surfactant proteins, and inflammatory markers during acute lung injury in children[J]. Pediatr Crit Care Med, 2010, 11(1): 82-91.

(收稿日期 2017-10-09)

四季草颗粒已上市销售多年,用于治疗泌尿系统疾病,疗效显著^[1-2]。原生产工艺为水煮醇沉工艺,乙醇用量较大,工艺耗时较长,能耗大,有效成分损失也较为严重,可能会影响其疗效。吸附澄清剂纯化中药提取液是近年发展起来的一种新技术^[3],具有用量少、工艺简单、天然无毒、成本低、有效成分损失少等优点,已广泛用于中药提取纯化工艺研究。本研究中采用吸附澄清工艺代替传统工艺用于四季草颗粒工艺改进,不仅克服了传统工艺的弊端,同时对中药民族药资源的研究开发也起到了探索和示范作用。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

LC-10Avp 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);WML 色谱工作站(广西威玛龙色谱科技公司);AE240 型电子天平(十万分之一,梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 试药

槲皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号为111538-200403);四季红 *Polygonum capitatum* D. Don, 车前草 *Plantago asiatica* 药材购于贵阳市药材市场,由贵阳医学院药物研究开发中心生药学研究室(中药民族药标本馆长)龙庆德教授鉴定,符合相关规定,均为正品^[1,4-6];壳聚糖(浙江玉环县海洋生物化学有限公司);ZTC1+1 天然澄清剂(天津振天成科技有限公司);101 果汁澄清剂(上海沃逊生物工程有限公司);明胶(上海鲁博明胶有限公司);果胶酶(杰诺生物酶公司);甲醇为色谱纯(美国 Tedia 公司),水为纯净水;甲睾酮片(天津飞鹰制药有限公司,批号为 0804002);前列康(浙江康恩贝制药股份有限公司,批号为 081028);消痔灵(北京双鹤高科天然药物有限公司,批号为 090705)。

1.3 动物

昆明种小鼠 40 只,体质量 18~22 g,雌雄兼用,动物合格证号为云动管 9806 号。将小鼠随机分为 4 组,各 10 只。

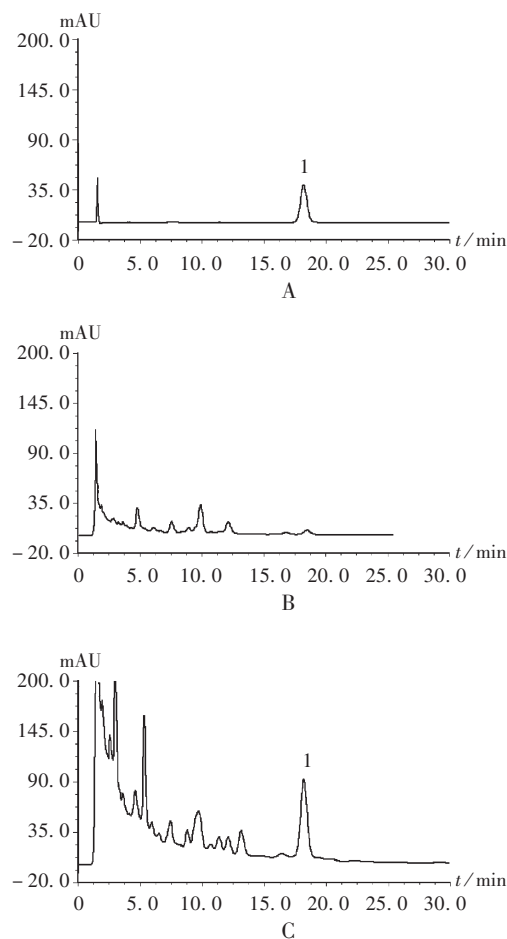
2 方法与结果

2.1 槲皮苷含量测定^[7-11]

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸(38:62);流速:1 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:35℃。理论板数按槲皮苷峰计算应不低于 5 000。在该色谱条件下,按 2005 年版《中国药典(一部)》附录 VI D 中高效液相色谱法测定,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。色谱图见图 1。



1. 槲皮苷

A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

2.1.2 溶液制备

称取槲皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 50 μg/mL 的溶液,摇匀,即得对照品溶液。按处方比例称取经粉碎成粗粉的四季红和车前草,加水煎煮 3 次(12 倍、8 倍、8 倍),滤过,合并滤液,浓缩至 1:6[药材(g):药液(mL)],备用,即得四季草颗粒提取液;精密吸取试验样品适量,用滤膜(0.45 μm)滤过,即得供试品溶液。

2.2 吸附澄清剂选择^[12-13]

取样品提取液,均分为 7 份,1 份取样测定槲皮苷的含量,其余 6 份分别按比例加入 101 果汁澄清剂、壳聚糖、ZTC1+1、明胶、果胶酶 5 种常用吸附澄清剂,搅拌,静置过夜,抽滤,量取滤液体积,分别取样测定槲皮苷含量和总固体物。以槲皮苷转移率和总固体收率为评价指标进行评价,水煎药液槲皮苷提取率为 63.15%,总固体收率为 16.75%。结果见表 1。可见,以壳聚糖为

吸附澄清剂的澄清效果最好,故选择壳聚糖作为四季草颗粒水提液的吸附澄清剂。

表 1 5 种不同吸附澄清剂筛选试验结果(%, $n=3$)

吸附澄清剂	槲皮苷转移率	总固体收率(%)
101 果汁澄清剂	75.21	12.44
壳聚糖	86.98	10.48
明胶	62.15	9.57
ZTC1 + 1	79.44	11.41
果胶酶	56.17	13.62

2.3 正交试验设计

2.3.1 因素水平表

根据上述试验结果,用壳聚糖处理综合效果较好,故采用正交试验对其吸附除杂的影响因素进行考察。通过预试验,药液的浓缩比例(因素 A)、吸附澄清剂加入量(因素 B)、药液的 pH(因素 C)是影响其吸附效率的主要因素^[7]。正交试验设计因素水平见表 2。

2.3.2 指标选择

采用综合评分法,以槲皮苷和总固体物转移率为评价指标进行评价,权重系数分别为 0.8 和 0.2。综合评分值 = (槲皮苷转移率/最大槲皮苷转移率) × 80 + (总固体转移率/最大总固体转移率) × 20。结果见表 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	因素 A(mL/g)	因素 B(g/L)	因素 C
1	4	0.5	3
2	6	1	4
3	8	2	5

2.3.3 方差分析

由表 4 可知,三因素均有显著性差异($P < 0.05$);在所选因素范围内,各因素作用主次顺序为 $A > C > B$ 。最佳工艺条件为 $A_3B_2C_2$,即药液浓缩至 1:8[生药(g):药液(mL)],pH = 4,每升药液加入 1% 壳聚糖冰醋酸溶液 100 mL。静置 24 h,抽滤,收集滤液,备用。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验安排及结果

试验号	因素				槲皮苷转移率 (%)	总固体收率 (%)	综合评分 (分)
	A	B	C	D(空白)			
1	1	1	1	1	53.28	6.97	58.32
2	1	2	2	2	79.36	10.11	86.44
3	1	3	3	3	65.79	9.69	73.67
4	2	1	2	3	80.76	13.02	92.16
5	2	2	3	1	84.26	12.88	95.08
6	2	3	1	2	75.37	10.17	82.97
7	3	1	3	2	71.78	12.01	82.59
8	3	2	1	3	86.44	10.09	92.74
9	3	3	2	1	89.53	11.31	97.37
K_1	218.43	233.07	234.03	250.77	$G = 761.34$		
K_2	270.21	274.26	275.97	252.00	$CT = 64\ 404.29$		
K_3	272.70	254.01	251.34	258.57			
R	54.27	41.19	41.94	7.80			

注:原药液 pH = 4。

表 4 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	625.85	2	312.92	53.38	< 0.05
B	282.80	2	141.40	24.12	< 0.05
C	296.14	2	148.07	25.26	< 0.05
D(误差)	11.72	2	5.86		

2.4 原纯化工艺与新纯化工艺比较

结果见表 5。四季草颗粒药材水煎煮液采用壳聚糖吸附纯化,槲皮苷损失较小;采用乙醇沉淀处理,槲皮苷损失较大;2 种处理方法所得总固体物和水煎液比较均降低了约 35%,达到了试验目的。采用壳聚糖处理,避免了使用大量乙醇,有利于安全生产。

表 5 原工艺与新工艺研究结果(%, $n=3$)

评价指标	槲皮苷提取率	原工艺	新工艺
水煎药液	60.11		
槲皮苷转移率		68.12	87.32
总固体收率	16.65	10.76	11.02

表6 对甲睾酮引起小鼠前列腺增生的影响($n=3$)

组别	给药剂量(g/kg)	前列腺重($\bar{X} \pm s, g$)	前列腺指数($\bar{X} \pm s, mg/g$)
模型组($n=10$)		0.075 ± 0.020	2.50 ± 0.74
原工艺组($n=10$)	0.35	0.052 ± 0.015**	1.71 ± 0.50*
新工艺组($n=10$)	0.35	0.047 ± 0.012**	1.55 ± 0.43**
前列康组($n=10$)	0.70	0.052 ± 0.017*	1.70 ± 0.52*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,表7同。

表7 对消痔灵引起小鼠前列腺炎的影响($n=3$)

组别	给药剂量(g/kg)	前列腺重($\bar{X} \pm s, g$)	前列腺指数($\bar{X} \pm s, mg/g$)
模型组($n=9$)		0.105 ± 0.050	3.56 ± 1.78
原工艺组($n=8$)	0.35	0.059 ± 0.011*	2.00 ± 0.35*
新工艺组($n=9$)	0.35	0.052 ± 0.014**	1.74 ± 0.47**
前列康组($n=10$)	0.70	0.069 ± 0.017*	2.32 ± 0.65

2.5 原纯化工艺与新纯化工艺样品药效学比较

取2.4项下所得样品,加入蒸馏水配制成溶液。以0.35 g/kg的剂量进行药效学试验,考察四季草颗粒对甲睾酮所致小鼠前列腺增生,对消痔灵所致小鼠前列腺炎的影响^[14-16]。实验过程中,模型组死亡1只,原工艺组死亡2只,新工艺组死亡1只。结果见表6和表7。与模型组比较,四季草颗粒新工艺组、原工艺组前列腺质量及前列腺指数明显降低($P<0.01$, $P<0.05$),但无显著性差异($P>0.05$)。与模型组比较,四季草颗粒新工艺组、原工艺组前列腺质量及前列腺指数明显降低($P<0.01$, $P<0.05$),但无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

预试验时,为保证吸附澄清剂在试验过程中能发挥各自的优点,故再进行正交试验,进一步优化工艺条件,以期得到最佳吸附澄清工艺。选择处方主药四季红中含有较高的槲皮苷为考察指标能较客观地评价该新工艺,同时,经过对新工艺、原工艺所制备样品进行药效学比较试验,发现2种工艺的药物效应并无显著性差异,进一步证明了该工艺的可行性,达到了多方面客观评价的要求。

该工艺的改进不仅可以节省能源,保护环境,还可以提高经济效益。吸附澄清剂用于中药制剂的纯化工艺已有报道,本研究中尝试将其用于多种药材提取液的纯化工艺中,结果适用于很多药材,但是不适用于含糖量较高的中药材。

参考文献:

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准(2003年版)[M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 2003: 147.
- [2] 李孟林, 梁斌. 苗药——头花蓼研究综述[J]. 中国医院用药评价与分析, 2005, 5(6): 383-384.

- [3] 侯向明, 王桂英. 吸附澄清剂在中药制剂中的应用[J]. 天津药学, 2005, 17(2): 67-73.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 69.
- [5] 李敏, 程敏. 中药车前草化学成分与药理研究的新进展[J]. 现代中医药, 2005, 25(3): 60-61.
- [6] 夏玲红, 金冠钦, 孙黎, 等. 车前草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2013, 16(2): 294-295.
- [7] 王洪平, 曹芳, 杨秀伟, 等. 头花蓼地上部分化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(1): 24-30.
- [8] 荆文光, 赵叶, 张开霞, 等. 头花蓼水提取物化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 47-50.
- [9] 谢宇, 张丽艳, 梁斌, 等. HPLC法测定头花蓼及制剂热淋清颗粒中槲皮苷的含量[J]. 中国中药, 2009, 34(8): 984-986.
- [10] 曹芳, 段萍, 王洪平, 等. 高效液相色谱法测定头花蓼冻干粉中槲皮素和槲皮苷的含量[J]. 重庆医学, 2017, 46(14): 1972-1973.
- [11] 曹芳, 谭辉, 邓先扩, 等. 头花蓼化学成分及其黄酮类化合物含量的研究进展[J]. 黔南民族医专学报, 2012, 25(2): 121-125.
- [12] 何迅, 庞秀清, 李勇军, 等. 壳聚糖用于头花蓼水提液澄清工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3260-3262.
- [13] 刘谨, 曹妹芳, 李世芳. 壳聚糖在金灯山根口服液制备中的实验研究[J]. 中国实验方剂学, 2003, 9(4): 5-7.
- [14] 李咏梅, 龚元. 头花蓼的化学成分及药理研究进展[J]. 贵州大学学报, 2007, 24(2): 205-207.
- [15] 张丽娟, 王永林, 王珍, 等. 头花蓼活性组分化学成分研究[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1425-1428.
- [16] 王开金, 张颖君, 杨崇仁, 等. 蓼属植物的化学成分与生物活性成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(1): 151-164.

(收稿日期: 2017-05-23; 修回日期: 2017-10-24)