

优眠宁神口服液提取与澄清工艺的优化^Δ

郑飞^{1*}, 于珊珊¹, 戴雨霖¹, 李晶¹, 越皓¹, 刘淑莹^{1,2#} (1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2266-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.34

摘要 目的: 优选优眠宁神口服液的提取与澄清工艺, 为该制剂的开发研究提供依据。方法: 以五味子醇甲含量为考察指标, 以加水量、提取时间及提取次数为考察因素, 采用正交试验优选提取工艺; 以五味子醇甲含量、澄清度为指标, 采用单因素法从离心法、超滤法(无机陶瓷膜)、醇沉法和壳聚糖法中筛选提取液的最优澄清工艺; 对优选工艺进行中试结果验证。结果: 最优提取工艺为6倍量水提取2次, 每次2 h, 3批提取液中五味子醇甲平均含量为3.537 mg/g (RSD=1.68%, $n=3$); 最优澄清工艺为采用无机陶瓷膜的超滤法。验证试验中3批中试产品澄明, 成品率接近, 分别为72.33%、76.67%、81.00% (RSD=5.65%, $n=3$)。结论: 优化的工艺稳定、可行, 适合工业化生产优眠宁神口服液。

关键词 优眠宁神口服液; 五味子醇甲; 正交试验; 提取工艺; 澄清工艺; 超滤法

Optimization of the Extraction and Clarification Technology of Youmian Ningshen Oral Liquid

ZHENG Fei¹, YU Shan-shan¹, DAI Yu-lin¹, LI Jing¹, YUE Hao¹, LIU Shu-ying^{1,2} (1. Jilin Ginseng Research Institute, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction and clarification technology of Youmian ningshen oral liquid to provide reference for the development and research of such preparation. METHODS: With the index of schisandrin content and the factors of water amount, extraction time and times, orthogonal test was adopted to optimize the extraction technology. With the indexes of content of schisandrin and clarity, the single factor test was used for selecting optimal clarification technology among centrifugation method, ultrafiltration method (inorganic ceramic membrane), alcohol deposition method and chitosan method, followed by verification test. RESULTS: The optimal extraction technology was adding water 6 times and extracted twice, 2 h each time; the average content of schisandrin in 3 batches extractions was 3.537 mg/g (RSD=1.68%, $n=3$). The optimal clarification technology was adopting ultrafiltration method with inorganic ceramic membrane. 3 batches of pilot scale products were clear in the verification test and with close product ratio of 72.33%, 76.67% and 81.00% (RSD=5.65%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimal technology is stable, feasible and suitable for industrial production of Youmian ningshen oral liquid.

KEYWORDS Youmian ningshen oral liquid; Schisandrin; Orthogonal test; Extraction technology; Clarification technology; Ultrafiltration method

优眠宁神口服液由吉林省人参科学研究院研制, 含药食两用药材酒制五味子、红参, 该处方基于酒制五味子与红参物质的基础研究而开发^[1-2]。前期试验中应用高效液相色谱(HPLC)法与电喷雾质谱联用技术(HPLC/ESI-MS)已对酒制五味子与红参在配伍过程中主要化学成分变化进行研究, 并发现人参皂苷类化合物对木脂素类成分的溶出具有促进作用, 能更好地改善睡眠^[3-4]。此外处方中酒制五味子为君药, 研究表明其改善心悸失眠的主要有效成分为木脂素类^[5-6], 而该成分中以五味子醇甲的含量最高, 故选用五味子醇甲的含量作为工艺筛选的考察指标。本试验对该制剂的提取、澄清工艺进行研究, 以优选最优工艺, 为今后该制剂的开发提供相关

数据。

1 材料

1.1 仪器

JA5301N型电子精密天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); JCM-1060型无机陶瓷膜过滤分离设备(太仓华辰净化设备有限公司); GQ105-LD型管式分离机(辽阳北方制药机械厂); TQWZ-3M3型热回流提取浓缩机组(衡阳市金山中药设备制造有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

酒制五味子(亳州永刚中药饮片厂有限公司, 批号: 121006); 红参(吉林省宏检医药药材有限公司, 批号: 121120); 五味子醇甲对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110857-201211, 纯度: 99.9%); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

Δ 基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(No.201303111)

* 研究实习生, 硕士。研究方向: 新剂型、新技术研究与新产品开发。E-mail: zhengfei_1986@126.com

通信作者: 研究员, 博士。研究方向: 中药化学、有机质谱学。电话: 0431-86045467。E-mail: syliu@ciac.jl.cn

2.1 五味子醇甲的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取五味子醇甲对照品约4 mg,精密称定,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取正交试验提取浓缩液10 ml,精密量取,蒸干,加适量甲醇溶解残渣,超声处理20 min,并转移至10 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.1.3 阴性溶液的制备 按处方去除酒制五味子外的其余药材,制备成缺酒制五味子的提取液,按“2.1.2”项下方法制成阴性溶液,即得。

2.1.4 色谱条件^[7] 色谱柱为Agilent Eclipse Plus-C₁₈(150 mm×2.1 mm,3.5 μm);流动相为水(A)~甲醇(B),梯度洗脱(0~7 min,70%→75% B;7~20 min,75% B),流速为0.4 ml/min;检测波长为254 nm;柱温为35℃;进样量为10 μl。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取五味子醇甲对照品溶液0.25、0.50、0.75、1.25、1.50 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,进样10 μl测定,记录峰面积。以五味子醇甲对照品质量浓度(x)对峰面积(y)进行线性回归,得回归方程为 $y=46\ 991x-3\ 297\ 9$ ($r=0.999\ 9$),表明五味子醇甲检测质量浓度线性范围为0.004 0~0.024 0 mg/ml。

2.1.6 中间精密度试验 分别取2批平行样品各3份,共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,依法进行含量测定。结果含量RSD为1.53%($n=6$),表明中间精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,依法进行含量测定。结果含量的RSD为1.73%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 在本试验条件下,取供试品溶液分别在室温放置0、2、4、6、8、12 h,依法进行含量测定。结果12 h内含量的RSD为1.78%($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.1.9 加样回收率试验 精密吸取已知含量的供试品溶液,共6份,分别精密加入0.085 mg的五味子醇甲对照品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,测定,计算回收率。结果平均加样回收率为100.19%,RSD为1.40%($n=6$),表明方法准确度好。

2.2 正交试验优化提取工艺

以预试验结果为基础,采用水提法,选择加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,以五味子醇甲含量为考察指标,采用L₉(3⁴)正交设计进行试验。根据处方量比例共称取药材100 g,9份,设计各因素水平进行水提、滤过,滤液浓缩至一定体积,测定其中五味子醇甲的含量。因素与水平见表1;正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(加水量),倍	B(提取时间),h	C(提取次数)	D(空白)
1	6	1	1	1
2	8	2	2	2
3	10	3	3	3

方差分析结果表明,以五味子醇甲含量为指标,影响水提工艺的因素大小为B>C>A,B、C有显著性影响。综合考虑选用最常规的方案,确定最优工艺为A₁B₂C₂,即加6倍量的水,煎煮2次,每次2 h。

取处方量比例酒制五味子及红参200 g,共3份,按最优提

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of the orthogonal test

试验号	A	B	C	D	五味子醇甲含量,mg/g
1	1	1	1	1	1.935
2	1	2	2	2	3.718
3	1	3	3	3	2.292
4	2	1	2	3	3.397
5	2	2	3	1	3.750
6	2	3	1	2	2.684
7	3	1	3	2	2.850
8	3	2	1	3	3.204
9	3	3	2	1	3.111
K ₁	2.648	2.727	2.608	2.932	
K ₂	3.277	3.557	3.409	3.084	
K ₃	3.055	2.696	2.964	2.964	
R	0.629	0.861	0.801	0.152	

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis result of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.610	2	0.305	16.053	
B	1.432	2	0.716	37.684	<0.05
C	0.966	2	0.483	25.421	<0.05
D(空白)	0.038	2	0.019	1.000	
误差	0.04	2	0.02		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$; $F_{0.01}(2,2)=99.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$; $F_{0.01}(2,2)=99.00$

取工艺条件进行验证试验,结果3批提取浓缩液中五味子醇甲的平均含量为3.537 mg/g(RSD=1.68%, $n=3$),表明该工艺稳定可行。

2.3 澄清工艺的优选

2.3.1 澄清方法的选择 分别采用离心法、超滤法、醇沉法、壳聚糖(絮凝)法对口服液进行纯化澄清处理。前期预试验中,以浓缩液中五味子醇甲含量及澄清度为考察指标,采用单因素法分别对离心法的转数、超滤法不同膜截留孔径、醇沉法不同含醇量、壳聚糖(絮凝)法中加入的不同体积分数壳聚糖溶液进行考察^[8-10],优选出相应的工艺参数;再根据预试验结果,采用单因素法对不同澄清方法进行考察,优选澄清工艺。(1)离心法样品的制备:取相对密度为1.05的提取浓缩液适量,采用小试设备管式离心机过滤离心,离心半径为105 mm,转数15 000 r/min,通过能力(通水量)为1 600 L/h,取滤液,定容。(2)超滤法样品的制备^[11]:取相对密度为1.05的提取浓缩液适量,采用小试无机陶瓷膜过滤分离设备过滤,膜面流速3~5 m/s,截留孔径100~200 nm,取滤液,定容。(3)醇沉法样品的制备:取相对密度为1.05的提取浓缩液适量,加乙醇使含醇量达40%,静置48 h,滤过,滤液回收乙醇,定容。(4)壳聚糖(絮凝)法样品的制备^[12]:先取壳聚糖适量,精密称量,用2%醋酸溶液制备成1%壳聚糖溶液;再取相对密度为1.05的提取浓缩液适量,加入2%的壳聚糖溶液,搅拌,50℃加热30 min,静置,滤过,定容。

4种澄清方法所得样品及原提取浓缩液中五味子醇甲含量、澄清度及外观稳定性考察(30 d后)结果见表4。

综合考虑,选择外观稳定性良好、能最大限度保留有效成分的超滤法为澄清方法,即采用无机陶瓷膜过滤分离设备进行纯化。

表4 澄清工艺的筛选

Tab 4 Screening of clarification technology

方法	五味子醇甲含量,mg/ml	澄清度	外观稳定性
原提取液浓缩液	1.45	浑浊	浑浊
离心法	1.26	澄清	少量沉淀,轻摇不散
超滤法	1.15	澄清	微量沉淀,轻摇即散
醇沉法	1.10	澄清	少量沉淀,轻摇不散
壳聚糖法	1.08	澄清	少量沉淀,轻摇不散

2.3.2 超滤法的条件优化 (1)浓缩液相对密度的考察。取相同体积的提取液,分别浓缩至相对密度为1.00~1.05、1.05~1.10、1.10~1.15(60℃条件下测定)的浓缩液,通过无机陶瓷膜过滤分离设备滤过。结果表明,不同相对密度的浓缩液中所含五味子醇甲含量相差不多。综合考虑膜面流速及过滤时间,确定提取液浓缩至相对密度1.05~1.10(60℃)后通过无机陶瓷膜过滤分离设备滤过。(2)截留孔径的考察。取相同体积相对密度为1.05~1.10(60℃)的浓缩液,通过不同截留孔径的无机陶瓷膜滤过,以五味子醇甲含量、澄清度及口感为考察指标,确定最优截留孔径大小。经综合考虑,确定截留孔径为50~100 nm,详见表5。

表5 截留孔径的选择

Tab 5 Selection of interception bore diameter

孔径大小,nm	五味子醇甲含量,mg/ml	澄清度	口感
50~100	1.07	澄清	稍酸涩、苦
100~200	1.20	澄清	酸涩、苦
200~300	1.35	澄清	非常酸涩、苦

2.4 中试工艺验证

取处方量酒制五味子、红参,加6倍药材量的水煎煮2次,每次2 h,滤过,合并滤液,浓缩至相对密度为1.05~1.10(60℃),无机陶瓷膜过滤分离设备滤过;滤液加入0.3%阿斯巴甜、4%木糖醇、2.5%山梨酸钾,加热使之溶解,加纯化水至1 000 ml,加入适量碳酸氢钠调节pH至3.5~4.5^[13],搅匀,静置,滤过,灌封。按上述制备工艺进行3批中试试验研究。结果见表6。

表6 3批中试产品的生产数据(n=3)

Tab 6 Production data of 3 batches of pilot scale products (n=3)

项目	批号		
	1	2	3
投入生药量,kg	9	9	9
提取液量,kg	76.80	80.00	82.00
浓缩液量,kg	38.00	40.00	41.00
过膜滤液量,kg	35.00	36.50	37.50
阿斯巴甜,g	5.78	6.13	6.48
木糖醇,kg	0.87	0.92	0.97
山梨酸钾,g	54.25	57.50	60.75
碳酸氢钠,g			少量
投料成品量,支	3 000	3 000	3 000
实际成品量,支	2 170	2 300	2 430
以支计成品率,%	72.33	76.67	81.00
以支计平均成品率,%		76.66	
理论盒数	300	300	300
实际盒数	210	225	240
以盒计成品率,%	70.00	75.00	80.00
以盒计平均成品率,%		75.00	

3批中试产品的成品率(实际成品量/投料成品量×100%)相似,分别为72.33%、76.67%、81.00%(RSD=5.65%,n=3),证明本制备工艺可行性和重现性好,且成品外观稳定性也良好。

3 讨论

无机陶瓷膜分离技术目前在分离、浓缩、提纯过程中已有应用。陶瓷膜是以陶瓷材料制成的不对称分离膜,其在操作压差的作用下,料液在膜管内错流流动,小于膜孔径的部分通过膜孔进入渗透侧成为滤液,而大于孔径的物质被膜截留而成为浓缩液,从而达到物质的分离、浓缩和提纯的目的。陶瓷膜分离过滤技术生产过程中未使用有机溶剂,故既不会造成溶剂在样品中残留,又不会对环境造成污染,且操作简单、易于控制,适合工业化生产。

在成型工艺研究过程中,矫味剂以0.3%阿斯巴甜、4%木糖醇为宜,口感良好;防腐剂以2.5%山梨酸钾为宜,微生物限度检查符合标准;pH在3.5~4.5范围时,溶液澄清度、外观稳定性、口感均较好,必要时可加入少量碳酸氢钠调节pH。

参考文献

- [1] 张宪臣,张旭,陈光,等.高效液相色谱-电喷雾质谱联用分析红参与五味子配伍机制[J].中草药,2007,38(1):41.
- [2] 葛会奇,贾天柱.五味子炮制品镇静催眠作用研究[J].辽宁中医杂志,2007,34(5):636.
- [3] 陈燕.鲜人参、生晒参和红参的比较研究[J].海峡药学,2006,18(4):137.
- [4] 黄鑫.五味子、黄芪化学成分及抗氧化活性的质谱研究[D].长春:中国科学院长春应用化学研究所,2009:112-135.
- [5] 王雯雯.五味子镇静催眠活性部位的分离及其分散片的研制[D].镇江:江苏大学,2012:5-29.
- [6] 林蔚,黄宗锈,陈冠敏,等.中药五味子改善小鼠睡眠作用的研究[J].海峡预防医学杂志,2009,15(4):51.
- [7] 范文成,常美玲,张国良,等.不同产地野生五味子的含量研究[J].中国药房,2011,22(3):248.
- [8] 高顺国,张俊玮,邹贤德.参苏口服液的制备工艺研究[J].上海中医药杂志,2005,39(1):59.
- [9] 冯倩茹,胡建焜,董玉珍.复方北芪口服液的澄清工艺研究[J].中药材,2009,32(5):814.
- [10] 刘颖,管娜,盛蓉,等.参脉五味口服液澄清工艺优选[J].中国医院药学杂志,2011,31(16):1 354.
- [11] 李淑莉,刘振丽,宋志前.超滤膜截留分子量对双黄连口服液超滤效果的影响及与醇沉法的比较[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(5):3.
- [12] 廖家荣,谢渝.贞杞肝泰口服液的制备[J].中国社区医师:医学专业,2012,14(22):198.
- [13] 彭凯丽,李新民,李元林,等.正交试验优选复方桑菊口服液中药材的提取工艺[J].中国药房,2014,25(3):243.

(收稿日期:2014-07-29 修回日期:2014-11-13)

(编辑:刘 萍)