

清开灵口服液生产工艺优化研究*

王磊,高辉,谌爱富,刘二伟,王家龙

摘要 [目的] 优化清开灵口服液提取醇沉工艺条件。[方法] 高效液相色谱(HPLC)法监测指标成分栀子苷,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验法,考察水提取和醇沉工艺。[结果] 清开灵口服液优化工艺条件为:取处方量栀子、板蓝根和金银花,用9倍量水浸泡药材1h后提取2次,每次2h,合并2次提取液浓缩至生药量与浓缩液体积比1:1,加入95%乙醇调节乙醇浓度为70%,调pH值为6进行醇沉,栀子苷的转移率为64.8%。[结论] 该优选工艺重现性好,栀子苷转移率高,固形物收率适宜,达到了生产工艺优化的目的。

关键词 清开灵口服液;栀子苷;HPLC;正交实验;提取纯化

中图分类号 R758.4

文献标识码 A

文章编号:1673-9043(2012)02-0098-03

清开灵口服液源于安宫牛黄丸,是国家基本药物、国家基本医疗保险目录药品^[1],是由栀子、金银花、板蓝根等8味中药提取制成的口服液制剂,主要作用于脑、肝、心、肺等器官^[2],具有清热解毒、镇静安神之功效。现代药理研究表明其具有抗菌、抗病毒、退热消炎、护肝和提高机体免疫力等作用^[3]。《中国药典》中其生产工艺没有规定具体参数,药厂各自安排生产,生产过程中存在有生产效率不高,资源浪费等问题。本实验通过指标性成分栀子苷转移率考察清开灵口服液的生产步骤,围绕提取和醇沉过程中影响它的多个因素,优化工艺条件,为具体生产提供指导。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters2695液相色谱系统(四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、Waters2487 VWD 检测器、Empower 色谱工作站),超纯水制造机(Mill-Q 型,Millipore 公司),低温高速离心机(德国 Sigma 公司) AX205 十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司),电子天平(上海永杰衡器有限公司) 8205 型

笔式 pH 计(上海康仪仪器有限公司),真空干燥箱(天津市天宇实验仪器有限公司)。

1.2 试药 乙腈(色谱纯,天津康科德公司),超纯水(Milipore 制备),栀子苷对照品(购自中新药业标准品物质中心),氢氧化钙(天津市光复精细化工研究所),药材栀子、金银花、板蓝根(均由唐山容大药业有限公司提供,经天津中医药大学中医药研究院郭俊华副研究员鉴定)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 条件与结果

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent C₁₈(46 mm×150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(30:70);流速:1.0 mL/min;检测波长:238 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.1.2 色谱结果 见图1。

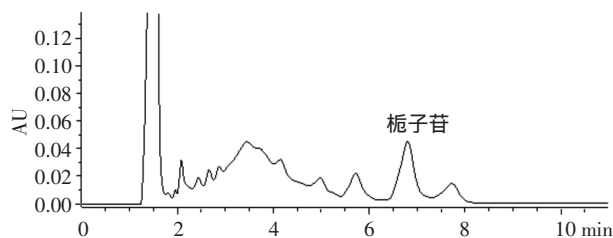


图1 栀子苷对照品色谱图

2.2 提取工艺的考察

2.2.1 提取因素水平表设计 采用正交实验对溶剂用量、提取时间和提取次数的结合、提取前的浸泡时间三因素进行考察,每个因素均匀设计3个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验,以栀子苷转移率结合固形物收率为指标对结果进行评价。正交设计因素与水平见表1。

* 基金项目:科技部国际合作项目(2008DFB30070);天津市高教科技发展基金项目(0090209)。

作者单位:300193 天津中医药大学中医药研究院,天津市中药化学与分析重点实验室(王磊,刘二伟,王家龙)

063020 唐山容大药业有限公司(高辉,谌爱富)

作者简介:王磊(1985-),男,硕士,从事中药化学与分析和中药新药开发研究。

通讯作者:刘二伟。

表 1 清开灵提取正交实验因素水平表

水平	A 溶剂量(mL/g)	B 提取次数和时间(h)	C 浸泡时间(h)
1	6	1,1	1
2	9	2,2	2
3	12	2,1,1	4

2.2.2 提取实验方法与结果 分别称取处方量栀子粗粉、板蓝根、金银花,按正交实验表 2 进行实验,分别合并提取液后确定体积,HPLC 法测定提取液中栀子苷含量,同时测定固形物收率^[4]。结果见表 2 统计结果见表 3。

表 2 栀子、板蓝根和金银花提取正交实验结果

实验号	A	B	C	空白	栀子苷转移率(%)	固形物收率(%)
1	1	1	1	1	66.2	31.4
2	1	2	2	2	74.8	34.5
3	1	3	3	3	74.2	37.4
4	2	1	2	3	64.4	35.7
5	2	2	3	1	68.9	36.9
6	2	3	1	2	77.6	40.9
7	3	1	3	2	60.7	36.2
8	3	2	1	3	73.3	37.6
9	3	3	2	1	76.3	45.4

注:A 料液比(mL/g) B 提取次数和时间(h) C 浸泡时间(h)。

表 3 栀子、板蓝根和金银花提取栀子苷转移率和固形物收率方差分析

考察指标	方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F
栀子苷转移率	A	4.76	2	2.38	9.36
	B	237.55	2	118.77	466.80**
	C	35.15	2	17.57	69.07*
	误差	0.51	2	0.25	1.00
固形物收率	A	43.26	2	21.63	27.38*
	B	73.86	2	36.93	46.75*
	C	6.54	2	3.27	4.14
	误差	1.58	2	0.79	1.00

注: $P < 0.05$ 显著差异 $F_{0.10}(2, 2) = 9.0$ $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ 。

直观分析和方差分析表明,影响清开灵口服液栀子苷提取率的因素:提取次数和时间>浸泡时间>料液比。A 因素料液比影响较小,考虑到实验过程中加入溶剂量对样品的浸润程度,A 因素选用 9 倍量溶剂。C 因素中浸泡 1 h 即可达到浸泡效果。B 因素影响较大并且 $B_3 > B_2 > B_1$,3 次提取率较高,但是提取 3 次溶剂消耗量大、成本高,本研究对提取 2 次和 3 次间进行验证,进一步优化提取工艺。

2.2.3 提取工艺的验证 根据正交实验结果比较

提取 2 次和 3 次的工艺对栀子苷转移率的影响。按照药典处方量分别称取药材 6 份,其中 3 份按照提取两次的工艺,另 3 份按 3 次的工艺提取,HPLC 测定提取液中栀子苷含量并计算转移率。结果见表 4。

表 4 栀子、板蓝根和金银花提取 3 次工艺验证结果 %

样品号	提取 2 次栀子苷转移率	提取 3 次栀子苷转移率
1	82.3	80.8
2	82.8	83.0
3	74.2	81.4

验证结果显示,在其他条件已定的条件下,提取 2 次和 3 次转移率差别不大,为降低生产中成本,选用提取 2 次工艺。因此确定的提取工艺条件为:按处方量称栀子粗粉、板蓝根和金银花,9 倍量水浸泡 1 h 后,加热回流提取 2 次,每次 2 h。

2.3 醇沉精制工艺的考察

2.3.1 醇沉因素水平表设计 以提取液浓缩相对密度、醇沉乙醇浓度和醇沉时间为 3 个因素进行考察,每个因素设计 3 个水平,仍以栀子苷转移率为指标,兼顾固形物收率对结果进行分析,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验,正交设计因素与水平见表 5。

表 5 醇沉正交实验因素与水平设计

水平	A	B	C
1	1.00	60	6
2	1.25	70	7
3	1.50	80	8

2.3.2 醇沉纯化实验方法与结果 合并 2.2.3 步骤所得 2 次提取工艺条件的样品,平均分成 9 份,按正交实验表 6 设计安排实验,HPLC 检测栀子苷的含量,测定固形物,计算栀子苷转移率和固形物收率,结果见表 6、表 7。

表 6 醇沉正交实验结果数据 %

实验号	A	B	C	空白	栀子苷转移率	固形物收率
1	1	1	1	1	59.9	22.1
2	1	2	2	2	67.7	20.4
3	1	3	3	3	67.1	18.0
4	2	1	2	3	58.2	16.8
5	2	2	3	1	62.3	15.9
6	2	3	1	2	70.2	17.2
7	3	1	3	2	54.9	15.4
8	3	2	1	3	66.3	17.6
9	3	3	2	1	69.0	15.2

注:A 浓缩相对密度(d) B 醇沉浓度(%) C 醇沉 pH。

表 7 醇沉栀子苷转移率和固形物收率方差分析

考察指标	方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F
栀子苷	A	4.06	2.00	2.03	8.77
	B	194.64	2.00	97.32	421.10**
	C	29.00	2.00	14.50	62.75*
	误差	0.46	2.00	0.23	1.00
固形物	A	29.62	2.00	14.81	256.29**
	B	3.07	2.00	1.53	26.56*
	C	9.74	2.00	4.87	84.25*
	误差	0.12	2.00	0.06	1.00

注 $P < 0.05$, 差异有统计学意义, $F_{0.10}(2, 2) = 9.0$, $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ 。

结果:由分析可以看出,固形物收率受三因素影响不大。影响栀子苷转移率的影响因素:醇沉浓度 > 醇沉 pH > 浓缩相对密度,醇沉的乙醇浓度影响最为显著,其次为 pH。醇沉前浓缩相对密度对醇沉栀子苷转移率影响较小,但需要消耗更多的乙醇,且乙醇浓度 70% 时,即可达到 65% 以上,因此选择提取液浓缩至相对密度 1.25 即可。综合考虑以上因素选择 $A_2B_2C_1$, 即最佳工艺为提取液浓缩至相对密度 1.25, 醇沉浓度 70%, 醇沉的 pH 为 6。

2.3.3 醇沉工艺验证 将提取验证中提取 3 次的提取液合并后均分为 3 份,按照正交实验确定的最佳工艺醇沉, HPLC 测定醇沉前后溶液中栀子苷含量,计算栀子苷转移率,同时测定固形物收率,结果见表 8。

由表 8 验证结果可见,所筛选的醇沉工艺中栀子苷转移率较高,工艺稳定,达到了优选的效果。

表 8 醇沉工艺验证结果

样品	醇沉前栀子苷量 (mg)	醇沉后栀子苷量 (mg)	栀子苷转移率 (%)	固形物收率 (%)
样品 1	1 182	724.1	61.3	22.0
样品 2	1 182	791.6	64.4	21.4
样品 3	1 182	810.6	68.6	20.3

3 结论

通过正交试验,对清开灵口服液中栀子、板蓝根和金银花的提取纯化具体参数进行优化,确定了最佳提取和醇沉工艺条件,栀子苷的转移率达 60% 以上,固形物收率 20% 左右。经验证所优选工艺稳定,操作简单,生产提供了相关参考。

4 讨论

实验优选确定醇沉时乙醇比例 70%, 实验中发现降低乙醇比例则沉淀物分层不明显且极黏稠,严重影响后续工艺,这可能是由于果实和花类药材中较高含量的鞣质和树胶类化合物导致,此现象在中成药的生产过程中普遍存在,因此对富含鞣质和树胶类的浓缩液进行纯化时要适当提高乙醇比例。

参考文献:

- [1] 颜海燕,谢丹,罗晶,等.清开灵口服液体外抑菌效果的实验研究[J].数理医药学杂志,2011,24(5):580.
- [2] 李爽.清开灵的药理作用与临床应用[J].现代中西医结合杂志,2009,18(1):108.
- [3] 韦迎春,张海燕,杨明.清开灵口服液临床应用的进展[J].江西中医学院学报,2011,23(2):93.
- [4] 胡震,杨广德,罗国安,等.栀子中栀子苷提取工艺及 HPLC 分析[J].中成药,2006,28(3):336-337.

(收稿日期:2012-02-28)

Optimization in preparation process of Qingkailing oral liquid

WANG Lei¹, GAO Hui², CHAN Ai-fu², LIU Er-wei¹, WANG Jia-long¹

(1. TCM Chemistry and Analysis Key Laboratory of Tianjin, Tianjin 300193, China;

2. Pharmaceutical Co. Ltd of Tangshan Rongda, Tangshan 063020, China)

Abstract: [Objective] To optimize the condition for the extraction and alcohol-purification process of Qingkailing oral liquid. [Methods] Monitoring geniposide by HPLC detection means, the orthogonal design $L_9(3^4)$ was used for the inspection of water-extracting process and alcohol-precipitating process. [Results] The condition for the extraction and purification process of Qingkailing oral liquid was as follows: soaking the medicinal materials with 9 folds of water for 1 hour, decocting 2 times for 2 hours. Both alcohol precipitated solutions were concentrated to the concentration of 1:1 (material:solution volume), then added 95% alcohol, precipitated by 70% alcohol solution, moderated pH to 6; the extraction rate of geniposide was 64.8%. [Conclusion] The optimum process is repeatable, the extraction rate of geniposide is high, recovery rate of solids are suitable. This research result has attained the goal of optimizing production process.

Key words: Qingkailing oral liquid; geniposide; HPLC; orthogonal test; extraction and purification