

药物研究

壳聚糖澄清剂对健脑益智胶囊
水提部位的纯化工艺研究^{*}杨伟平¹ 郭东艳¹ 赵晓平² 覃鸿恩¹ 吕 杨¹ 张 红¹

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医学院附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 研究壳聚糖澄清剂对健脑益智胶囊水提部位的纯化效果。方法 以健脑益智胶囊水提部位中葛根素转移率和干膏得率为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计法进行实验, 确定壳聚糖澄清工艺的最佳工艺参数, 并比较壳聚糖纯化前后吸湿性的变化。结果 最佳壳聚糖纯化工艺: 药液浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 静置温度为室温, 1% 壳聚糖溶液加入量为药液体积的 10%。此条件下葛根素转移率可达到 90% 以上, 干膏得率较原药液有所减少。结论 壳聚糖澄清剂用于纯化健脑益智胶囊的方法合理可行。

关键词: 健脑益智; 壳聚糖; 纯化

中图分类号: R 284.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-0571(2014)06-0072-04

健脑益智胶囊由水蛭、葛根、郁金、石菖蒲、白茅根等药物组成。具有豁痰开窍、活血化瘀、通脉益智的功效, 临床上主要用于预防和治疗外部颅脑损伤、缺血性脑损伤、脑震荡及脑水肿等脑部疾病^[1-5]。为了提高健脑益智胶囊质量, 降低临床服药量, 本实验拟在前期提取工艺研究的基础上^[6], 对其纯化工艺进行研究。通过查阅相关文献, 并分析方中水提部位有效成分, 拟以壳聚糖为澄清剂, 以葛根素转移率和干膏得率为评价指标, 采用正交试验进行考察, 并比较壳聚糖纯化前后吸湿性的变化, 优选健脑益智胶囊水提部位的最佳絮凝澄清工艺条件。

1 试药与仪器

1.1 试药 葛根(批号: 121101; 产地: 广西)、白茅根(批号: 130401; 产地: 陕西)、郁金(批号: 130101; 产地: 广西)、石菖蒲(批号: 130401; 产地: 四川), 以上饮片均购自西安盛兴中药饮片有限责任公司。葛根素对照品(供含量测定用, 批号: 110752-201313, 中国食品药品检定研究院); 壳聚糖(69047438, 生化试剂 BR, 国药集团化学试剂有限公司)。甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(G1311C 型四元泵, G1329B 型进样器, G4212B 型二极管阵列检测器); GQ76 管式离心机(上海市离心机械研究所有限公司); PFT-A500 电子天平(福州华志科学仪器有限公司); 101 型恒温干燥箱(北京科委永鑫实验仪器设备厂)。

2 方法与结果

2.1 健脑益智胶囊水提液的制备 按照处方比例, 取石菖蒲、白茅根、郁金、葛根适量, 郁金粉碎, 石菖蒲与郁金加 8 倍量水, 水蒸气蒸馏法提取 6 h, 收集挥发油, 药渣与白茅根、葛根混合后加 10 倍量水煎煮提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 滤液合并, 浓缩至每 mL 相当于原料药 0.25 g, 作为原药液, 备用。

2.2 干膏得率的测定 精密吸取上述原药液各 25 mL, 置已干燥恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 ℃ 烘箱中干燥恒重, 置干燥器中冷却 0.5 h, 称重, 计算干膏得率。

2.3 葛根素含量的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱 Ameritech Accurasil C18 柱(250×4.6 mm), 流动相为: 甲醇-水(25:75), 检测波长: 250 nm, 柱温: 30 ℃, 流速: 1 mL/min, 进样量: 10 μL; 阴性无干扰。

2.3.2 对照品溶液的制备 取葛根素对照品适量,精密称定,加 30 % 乙醇制成每 1 mL 含 87.2 ug 的溶液,即得葛根素对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液制备 取 2.1 项下水提液适量,微孔滤膜(0.45 μm)过滤,即得供试品溶液。

2.3.4 标准曲线绘制 精密吸取葛根素对照品溶液($C_{\text{标}}=87.2\text{ }\mu\text{g/mL}$)2、4、6、8、10、12 μL,按上述色谱条件注入色谱仪,测定峰面积。以峰面积 A 为纵坐标,葛根素含量 C(ug)为横坐标绘制标准曲线。计算得回归方程为:Y=11377X+6.8305,相关系数 $R^2=0.9997$,结果表明,葛根素在 0.1163 ug~0.6976 ug 范围内线性关系良好。

2.3.5 样品含量测定 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按 2.3.1 项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算葛根素含量。

2.4 壳聚糖溶液的配制 精密称取壳聚糖 2 g,取冰乙酸 2 mL,用纯净水定容至 200 mL 量瓶中,超声混匀后静置 24 h,制成 1 % 的壳聚糖溶液,备用。

2.5 壳聚糖澄清剂纯化处理 将水提液分别浓

缩或稀释至 1.00 g/mL、0.75 g/mL、0.50 g/mL、0.25 g/mL 四种不同浓度,按正交表 6 中的设计,加相应体积的壳聚糖溶液,搅拌 15 min 后,在相应的温度环境内静置 12 h,抽滤,滤液加水定容至 500 mL 量瓶中,摇匀。

2.6 正交试验设计

2.6.1 正交试验方案与结果 查阅相关文献,并通过单因素试验考察结果确定以药液浓度(A)、壳聚糖加入量(B)和温度(C)为考察因素,每个因素设计三个水平,因素水平见表 1。采用 L9(34) 正交试验设计进行纯化,测定各实验组葛根素转移率和干膏得率,结果见表 2。葛根素转移率=(纯化后葛根素含量/纯化前葛根素含量)×100 %。

表 1 因素水平表

因素 Levels	水平 Factor		
	A(g/mL)	B(%)	C(℃)
1	0.10	10	室温
2	0.25	20	40
3	0.50	30	60

表 2 正交试验设计及结果

实验组 Group	因素 Factor				干膏得率 (%)	葛根素转移率 (%)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	25.41	99.03
2	1	2	2	2	23.91	97.35
3	1	3	3	3	25.22	91.78
4	2	1	2	3	26.82	98.01
5	2	2	3	1	23.85	91.69
6	2	3	1	2	26.26	85.79
7	3	1	3	2	27.94	94.47
8	3	2	1	3	24.39	86.03
9	3	3	2	1	27.62	80.04
K1	24.847	26.723	25.353	25.627		
K2	25.643	24.050	26.117	26.037		
K3	26.650	26.367	25.670	25.477		
R	1.803	2.673	0.764	0.560		
K1	96.053	97.170	90.283	90.253		
K2	91.830	91.690	91.800	92.537		
K3	86.847	85.870	92.647	91.940		
R	9.206	11.300	2.364	2.284		

2.6.2 方差分析 以空白项(D)作为误差项,对正交设计实验结果进行方差分析,固形物保留率方差分析见表3,葛根素转移率方差分析见表4。从方差分析结果可看出,壳聚糖加入量B对固形物保留率和葛根素转移率均有显著性影响,药液浓度A、温度C均无显著性影响,综合实际情况考虑,确定健脑益智胶囊水提部位壳聚糖最优精制工艺为A₁B₁C₁,即将水提液含生药量调整到0.10 g/mL,加入壳聚糖溶液的体积百分数为10%,絮凝温度为室温。

表3 固形物保留率方差分析表

数据来源	SS	ν	F	P
A	4.900	2	9.722	>0.05
B	12.641	2	25.081	<0.05
C	0.882	2	1.750	>0.05
D(E)	0.50	2		

F_{0.05(2,2)}=19.0

表4 葛根素转移率方差分析表

数据来源	SS	ν	F	P
A	127.433	2	15.145	>0.05
B	191.593	2	22.771	<0.05
C	8.602	2	1.022	>0.05
D(E)	8.41	2		

F_{0.05(2,2)}=19.0

2.6.3 最优壳聚糖絮凝工艺验证试验 按处方比例,水提液通过正交实验设计得到最佳壳聚糖

表6 不同精制工艺后药粉吸湿变化 (T=25℃,RH=75%,n=3)

吸湿率(%)	时间(h)								
	2	4	8	12	24	48	60	72	84
原药粉	2.33	3.94	5.44	8.58	10.18	12.11	14.34	15.44	15.64
壳聚糖工艺	1.35	2.35	3.42	7.09	9.63	11.77	12.44	15.26	15.59

由表6可知,在温度为25℃,相对湿度为75%时,原药粉及壳聚糖絮凝后的粉体在72h时吸湿率达到平衡,且两粉体达到吸湿平衡时吸湿率无明显区别。

3 结论

采用壳聚糖澄清法对健脑益智胶囊水提部位进行纯化,最终确定最佳工艺参数为药液浓度为0.1 g/mL,1%壳聚糖加入量为药液体积的10%,体系温度为室温,此条件下,葛根素转移率可达到90%以上,干膏得率较原药液有一定程度减小(纯化前干膏得率为35%)。表明壳聚糖对健脑益智

絮凝工艺,即:药液浓度为0.10 g/mL,壳聚糖加入量为10%,絮凝温度为室温。平行3次试验,按照供试品溶液制备方法制备供试品溶液,再按照色谱条件测定葛根素含量,计算葛根素转移率,并计算干膏得率率。结果见表5。

表5 最佳壳聚糖絮凝工艺验证试验结果 (n=3)

试验号	1	2	3	平均值	RSD(%)
葛根素转移率(%)	99.02	99.02	99.16	99.07	0.08
干膏得率(%)	28.97	28.48	28.50	28.65	0.97

由表5可知,在最佳壳聚糖絮凝工艺条件下葛根素转移率可达到99%,干膏得率可降低至28%,通过验证试验可看出稳定性和重复性良好。

2.7 吸湿性比较 取2.1项下水提液及最佳壳聚糖纯化样液1000 mL,浓缩至相对密度为1.30(60℃),80℃减压干燥,粉碎,过80目筛,密封保存备用。将盛有NaCl过饱和溶液放入培养皿中,培养皿置于玻璃干燥器内并放入恒温箱中25℃恒温24h,测定此时干燥器内的相对湿度为75%。恒重扁型称量瓶后放入厚约2 mm已干燥恒重的原药浸膏粉和壳聚糖纯化浸膏粉,准确称重,置于上述干燥器中,于恒温箱中25℃保存,分别在0、4、8、12、24、48、60、72、84 h时取出,准确称重,即达到吸湿平衡,停止称量,平行3次试验。按下式计算吸湿率^[7-8],结果见表6。吸湿率(%)=(吸湿后重量-吸湿前重量)/吸湿前重量×100%。

胶囊水提部位可达到较好的纯化效果。

此研究对健脑益智胶囊生产工艺提供了实验参考依据。但是壳聚糖絮凝澄清工艺是否为健脑益智胶囊水提部位的最佳工艺条件,还有待于进一步结合化学指纹图谱及主要药效学指标综合评价方可确定。

参考文献

[1]张宝丽,范小璇,赵晓平.健脑益智胶囊对基底节区脑出血术后的疗效观察[J].陕西中医学院学报,2007,30(5):10-11.

肠的实验研究开展很少,我们根据大鼠的肠道解剖特点及与预实验结果,形成了本实验采用的灌肠方法,即以儿童型导尿管为灌肠工具,以 8 cm 左右为灌肠深度,以助手取出大鼠,置大鼠头低尾高位,左手轻轻按住动物的头部和前肢,右手提起大鼠尾部露出大鼠的肛门,实验者用左手将导尿管轻缓插入肛门,右手持一次性注射器吸取适量的药液,轻轻推注到导尿管内灌肠,药物灌完后取适量蒸馏水将导尿管内的药物全部冲入肠道内,将导尿管在肛门外保留 5 分钟后再拔出,随后提着大鼠的尾部倒置抖动 5 分钟的灌肠法。结果显示灌肠后药物保留时间平均超过 30 分钟,未发生明显副作用,值得推广。至于阳性对照药物选择,我们通过查阅文献,发现临床和中药灌肠同样用法的西药主要为爱西特,爱西特是药用炭类吸附剂,研究表明可利用吸附原理结合尿毒素,排出体外,从而达到清除尿毒素,维持人体内环境平衡的目的^[6,7],因此我们选用他作为对照药物。血清肌酐、尿素氮、24 小时尿肌酐定量、红细胞计数及血红蛋白及肾脏病理学改变等指标是反应 CRF 病情的重要指标,因此我们选用上述指标作为观察指标。实验结果表明,模型对照组血肌酐、尿素氮明显升高,24 小时尿肌酐定量显著升高,红细胞计数及血红蛋白明显下降,病理方面局灶肾小球硬化,肾小管萎缩,肾间质片状纤维化,伴淋巴、单核细胞浸润,部分小动脉亮变,说明模型复制成功。结果提示药用炭在降低血肌酐、尿素氮方面具有一定作用,其他方面无明显

作用,此与文献报道一致^[6],灌肠方各剂量组对上述异常指标都有不同程度改善,提示涤毒灌肠方对于大鼠 CRF 确实具有综合的保护作用,其中以灌肠方大、中剂量组改善明显,提示涤毒灌肠方干预大鼠 CRF 具体一定量效依赖关系。综上所述,本实验证明涤毒灌肠方对 CRF 大鼠具有保护作用,为临床应用该疗法提供了依据,更重要的是可为进一步开展中医灌肠疗法的内在机制研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 康萍,姜国红,张洪波.慢性肾功能衰竭非透析疗法[J].黑龙江医药,2008,21(4):116-117.
- [2] 吕佩佳,魏连波,陈香美,等.中医药治疗慢性肾衰竭的系统分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2013,14(8):703.
- [3] 施新猷,顾为望.人类疾病动物模型[M].北京:人民卫生出版社,2008:206~207.
- [4] 毕增祺,郑法雷.慢性肾衰非透析治疗的进展[J].中华肾脏病杂志,1985,1(4):44.
- [5] 雷洋洋,杨洪涛.大黄为主中药灌肠治疗慢性肾衰相关机理研究进展[J].实用中医内科杂志,2007,21(2):8-9.
- [6] 邓建龙,焦闻文.尿毒清、爱西特、析清保留灌肠治疗慢性肾衰竭的疗效观察[J].中国中西医结合肾病杂志,2010,11(1):48-49.
- [7] 孙红娟,吴红梅,王锋,等.药用炭治疗慢性肾脏疾病的系统评价[J].中国循证医学杂志,2009,9(12):1310-1314.

(收稿日期:2014-07-18 编辑:文颖娟)

(上接第 74 页)

- [2] 范小璇,赵晓平,梁格婷.健脑益智胶囊对外伤性脑出血患者 IgG-CSF 的影响[J].中国中医急症,2011,20(10):1552-1554.
- [4] 周振国,范小璇,赵晓平,等.健脑益智胶囊对颅脑损伤大鼠血浆 NPY 含量的影响[J].现代中西医结合杂志,2012,21(31):3437-3439.
- [5] 畅涛,赵晓平,周振国.健脑益智胶囊治疗脑震荡疗效观察[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(11):120-121.
- [6] 赵晓平,吕杨,范小璇,等.健脑益智胶囊提取工艺研究[J].陕西中医学院学报,2013,36(5):83-85.
- [7] 丁志平,乔延江.不同粒径黄连粉体的吸湿性实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(3):5-7.

- [8] 李小燕.清瘟败毒胶囊的吸湿性研究及数据分析[J].时珍国医国药,2002,13(8):459-461.

(收稿日期:2014-06-09 编辑:文颖娟)

