

壳聚糖对小儿解表止咳口服液澄清效果的影响

张俊侠^{1*}, 魏灿英¹, 焦小珂², 肖 禾²(1.成都大学医护学院, 成都 611137; 2.四川广元蓉成制药有限公司, 四川广元 628000)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1389-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.15

摘要 目的: 建立用壳聚糖提高小儿解表止咳口服液澄清度的方法。方法: 采用壳聚糖的絮凝作用对小儿解表止咳口服液进行处理。采用单因素试验和正交试验考察壳聚糖用量、澄清温度、澄清时间对有效成分盐酸麻黄碱质量浓度的影响, 并与传统的醇沉法相比较。结果: 最佳澄清工艺为1%壳聚糖溶液用量为15%, 澄清温度为80℃, 澄清时间为24h; 用壳聚糖絮凝法处理的小儿解表止咳口服液澄清度优于醇沉法, 但提取的盐酸麻黄碱的质量浓度无明显差异。结论: 壳聚糖絮凝法准确、简便、重现性好、成本低廉, 可明显改善小儿解表止咳口服液的澄清度。

关键词 小儿解表止咳口服液; 壳聚糖; 澄清度; 正交试验

Effects of Chitosan on the Clarification of JBZK Oral Liquid

ZHANG Jun-xia¹, WEI Can-ying¹, JIAO Xiao-ke², XIAO He²(1. Medical and Nursing School, Chengdu University, Chengdu 611137, China; 2. Sichuan Guangyuan Rongcheng Pharmaceutical Co., Ltd., Sichuan Guangyuan 628000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of improving the clarity of JBZK oral liquid by using chitosan. METHODS: JBZK oral liquid was treated with flocculation effect of chitosan. Single factor test and orthogonal experiment were adopted to investigate the effects of different amount of chitosan, clarification temperature and clarification time on the concentration of ephedrine hydrochloride, and then compared with the water extraction and alcohol precipitation method. RESULTS: The optimal flocculation technology was as follows: 15% dose of 1% chitosan, clarification temperature at 80℃ and clarification time of 24 h. The clarity of the JBZK oral liquid treated by chitosan flocculence method was better than treated by alcohol precipitation method. The contents of ephedrine hydrochloride had no significant difference between 2 methods. CONCLUSIONS: The chitosan flocculence method is accurate, simple, reproducible and cheap, and can improve the clarity of JBZK oral liquid.

KEYWORDS JBZK oral liquid; Chitosan; Clarity; Orthogonal test

小儿解表止咳口服液是集六十余载临床实践而形成的经验方, 该经验方取《伤寒论》麻黄汤之义, 选麻黄、杏仁、半夏等构成, 用于治疗小儿呼吸道感染引起的咳嗽、痰多等症, 具有解表清热、止咳祛痰、逐邪宁肺的功效, 标本同治, 疗效确切。小儿解表止咳口服液外观为深棕色, 不透明。其澄清度较差, 且直接影响到产品外观性状的观察和内在质量的稳定性。因此, 提高口服液澄清度显得尤为重要。絮凝澄清法是一种有效的提高药品质量的澄清方法^[1-2], 其中壳聚糖是一种新型的絮凝澄清剂, 在中药中已有成功应用。已有学者从化学成分入手研究发现, 壳聚糖对于大部分药材提取液均能起到一定的澄清作用, 并能充分保留有效成分, 明显提高有效成分的转移率^[3-7]。朱宁等^[8-9]在丹参提取、排铅口服液的澄清工艺改进中应用壳聚糖絮凝法, 既不影响中药质量, 又可节省生产成本, 较传统的中药纯化方法好。笔者以壳聚糖作为澄清剂对小儿解表止咳口服液进行澄清处理, 选择最佳澄清工艺, 并与醇沉法相比较, 结合分光光度法观察其澄清效果, 并采用高效液相色谱(HPLC)法测定指标性成分盐酸麻黄碱的含量, 以确保澄清工艺的合理性。

* 副教授。研究方向: 中药及天然药物的成分和质量。电话: 028-85193189。E-mail: 824380313@qq.com

1 材料

1.1 仪器

SPD-10Avp HPLC 仪、G1314A-UV 紫外检测器(日本岛津公司); 2TU-1901 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); BP211D 分析天平(德国 Sartorius 公司); 微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司, 孔径: 0.45 μm); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 药品与试剂

小儿解表止咳口服液(四川广元蓉成制药有限公司, 批号: 121101); 壳聚糖(青岛海维康生物制品有限公司, 批号: 01106); 盐酸麻黄碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 171241-201007, 供含量测定用); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 壳聚糖溶液的制备

精密称取壳聚糖 1 g, 加入 1% 醋酸溶液 100 ml, 待溶胀后用磁力搅拌器搅拌使之完全溶解, 即得 1% 壳聚糖溶液。

2.2 吸光度的测定

精密量取小儿解表止咳口服液 1 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 以纯水为空白对照, 按分光光度法, 采用

1 cm的石英吸收池,在520 nm波长下测定吸光度,吸光度值大小与溶液澄清效果成反比。

2.3 盐酸麻黄碱的含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(含0.1%三乙胺)(3:97,V/V);检测波长:205 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl。在此条件下,盐酸麻黄碱与其他组分均可达到基线分离,理论板数以盐酸麻黄碱色谱峰计算应不低于4 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸麻黄碱对照品2.250 7 mg,置50 ml量瓶中,用0.1 mol/L的盐酸溶液定容,摇匀,作为对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取小儿解表止咳口服液5 ml,加水10 ml及浓氨试液0.5 ml,用乙醚振荡提取5次(30、30、20、20、20 ml),合并乙醚液,加盐酸乙醇溶液(1→20)2 ml,混匀,低温回收溶剂至干,残渣用乙醇5 ml溶解并转移至25 ml量瓶中,加0.1 mol/L的盐酸溶液至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 线性关系考察 取盐酸麻黄碱对照品适量,加0.1 mol/L的盐酸溶液制成质量浓度分别为10、20、40、80、160 μg/ml的系列对照品溶液,精密吸取系列对照品溶液适量,注入色谱仪进行分析。以盐酸麻黄碱峰面积积分值(y)为纵坐标,质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=29\ 378x-12\ 327$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,盐酸麻黄碱质量浓度在10~160 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 单因素试验考察澄清工艺

2.4.1 壳聚糖用量对澄清效果的影响 取小儿解表止咳口服液5份,各50 ml,水浴加热至80 ℃,分别按5%、10%、15%、20%、25%的用量加入1%的壳聚糖溶液,同时以100 r/min的速度匀速搅拌10 min。4 ℃下静置24 h后,上清液滤过,转移至100 ml量瓶中,加水至刻度。取此溶液1 ml,置50 ml量瓶中,加水定容,在520 nm波长下测定吸光度,并比较溶液的沉淀和澄明度情况以及盐酸麻黄碱质量浓度。壳聚糖用量对澄清效果的影响见表1。

表1 壳聚糖用量对澄清效果的影响

Tab 1 Effects of the amounts of chitosan on the clarification

壳聚糖用量,%	沉淀情况	澄明度	盐酸麻黄碱质量浓度, μg/ml
0	无	棕褐色,不透明	948.1
5	颗粒状,较少	棕褐色,不透明	715.2
10	絮状,较少	深棕色,半透明	559.1
15	絮状,较多	红棕色,半透明	424.2
20	絮状,较多	浅红棕色,半透明	317.2
25	絮状,较多	浅红棕色,半透明	306.9

2.4.2 澄清温度对澄清效果的影响 取小儿解表止咳口服液9份,各50 ml,分别用水浴加热至10、20、…、80、90 ℃,按15%的用量加入1%壳聚糖溶液,其余同“2.4.1”项下操作。澄清温度对澄清效果的影响见表2。

2.4.3 澄清时间对澄清效果的影响 取小儿解表止咳口服液4份,各50 ml,用水浴加热至80 ℃,按15%的用量加入1%的壳聚糖溶液,同时以100 r/min的速度匀速搅拌10 min。4 ℃分别静置6、12、24、48 h,取上清液,滤过,取续滤液在520 nm波

长处测定吸光度,并比较溶液的沉淀和澄明度情况以及盐酸麻黄碱质量浓度。澄清时间对澄清效果的影响见表3。

表2 澄清温度对澄清效果的影响

Tab 2 Effects of clarification temperature of chitosan on the clarification

温度,℃	沉淀情况	澄明度	盐酸麻黄碱质量浓度, μg/ml
10	絮状,较多	棕褐色,不透明	750.6
…	絮状,较多	棕褐色,不透明	…
60	絮状,较多	深棕色,不透明	735.0
70	絮状,较多	红棕色,不透明	736.9
80	絮状,较多	红棕色,半透明	619.6
90	絮状,较多	红棕色,半透明	645.1

表3 澄清时间对澄清效果的影响

Tab 3 Effects of clarification time of chitosan on the clarification

澄清时间,h	沉淀情况	澄明度	盐酸麻黄碱质量浓度, μg/ml
6	絮状,较多	棕褐色,半透明	805.4
12	絮状,较少	红棕色,半透明	756.5
24	絮状,较少	红棕色,半透明	735.0
48	絮状,较少	红棕色,半透明	738.9

由表1~表3可知,随着壳聚糖用量的逐渐增加,絮状沉淀的量也逐渐增加,过滤也更加容易,澄明度更好,澄清剂加入量>10%时,达到澄明效果,澄清剂的加入量对其澄明度影响力减小,综合对口服液有效成分的保留及成本的考虑,选择15%的壳聚糖加入量最为合适;各温度下处理的供试品均产生较多絮状沉淀,滤液颜色为半透明、红棕色,但80 ℃处理的供试品溶液澄明度最好;对澄清时间考察发现,当静置时间超过24 h后,澄明度的变化不大。

2.5 正交试验优选澄清工艺^[6]

根据文献报道,在预试验的基础上,选择壳聚糖用量(A)、澄清温度(B)、澄清时间(C)为考察因素,以吸光度、盐酸麻黄碱的质量浓度为评价指标,设定搅拌速度为100 r/min,搅拌时间为10 min,用L₉(3⁴)正交表安排试验。因素与水平见表4;正交试验结果见表5;方差分析结果见表6。

表4 因素与水平

Tab 4 Factors and Level

水平	因素		
	A,%	B,℃	C,h
1	10	70	12
2	15	80	24
3	20	90	36

由表5、表6可知,各因素对澄清效果作用的主次顺序为A>B>C。其中,壳聚糖用量对吸光度和盐酸麻黄碱质量浓度的影响有统计学意义($P<0.05$),其他两个因素均无统计学意义,因此着重考虑A因素。综合比较分析结果,并考虑实际生产需要,优先考虑有效成分盐酸麻黄碱的保留,最终确定最佳澄清工艺为A₂B₂C₂,即1%壳聚糖溶液用量为15%,澄清温度为80 ℃,澄清时间为24 h。

2.6 不同澄清工艺的澄清效果比较

2.6.1 醇沉法 取小儿解表止咳口服液50 ml,向其中缓缓加入无水乙醇50 ml,同时用磁力搅拌器以100 r/min的速度匀速

表5 正交试验结果

Tab 5 Results of orthogonal experiment

试验号	因素				吸光度	盐酸麻黄碱质量浓度, $\mu\text{g/ml}$
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	0.389	760.4
2	1	2	2	2	0.317	769.0
3	1	3	3	3	0.331	752.3
4	2	1	2	3	0.287	766.5
5	2	2	3	1	0.132	765.1
6	2	3	1	2	0.256	763.0
7	3	1	3	2	0.121	742.6
8	3	2	1	3	0.118	745.8
9	3	3	2	1	0.127	740.2
K_1	0.346	0.266	0.254	0.216		
K_2	0.225	0.189	0.244	0.231		
K_3	0.122	0.238	0.195	0.245		
R_i	0.224	0.077	0.059	0.029		
K_1	760.567	756.500	756.400	755.233		
K_2	764.867	759.967	758.567	758.200		
K_3	742.867	751.833	753.333	754.867		
R_j	22.000	8.134	5.234	3.333		

表6 方差分析结果

Tab 6 Results of variance analysis

指标	误差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
吸光度	A	0.075	2	0.037 5	75.000	<0.05
	B	0.009	2	0.004 5	9.000	
	C	0.006	2	0.003 0	6.000	
	D(误差)	0.001	2	0.000 5	1.000	
盐酸麻黄碱质量浓度	A	815.780	2	407.990 0	40.693	<0.05
	B	99.947	2	49.973 0	4.986	
	C	41.487	2	20.743 0	2.069	
	D(误差)	20.050	2	10.025 0	1.000	

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

搅拌, 至含乙醇量达到50%(原生产工艺)。4℃静置24 h, 上清液滤过, 回收乙醇至无醇味, 转移至100 ml量瓶中, 加水至刻度, 贮藏, 备用。

2.6.2 壳聚糖法 取小儿解表止咳口服液50 ml, 按“2.5”项下优选的最佳工艺, 用水浴加热至80℃, 加入1%的壳聚糖溶液15%, 同时以100 r/min的速度匀速搅拌10 min。4℃静置24 h, 取上清液, 滤过, 转移至100 ml量瓶中, 加水至刻度, 贮藏, 备用。

2.6.3 澄清效果比较 分别精密量取“2.6.1”、“2.6.2”项下溶液各1 ml, 置50 ml量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 以蒸馏水为空白对照, 照分光光度法, 采用1 cm的石英吸收池, 在520 nm波长处测定吸光度, 比较溶液的沉淀和澄明度情况以及盐酸麻黄碱质量浓度。醇沉法与壳聚糖澄清法澄清效果比较见表7。

由表7可知, 无水乙醇与壳聚糖均可以改善小儿解表止咳口服液的澄明度, 但壳聚糖法的样品澄明度优于醇沉法样品,

表7 醇沉法与壳聚糖澄清法澄清效果比较

Tab 7 Comparison of the clarification of alcohol precipitation process and chitosan clarification method

方法	沉淀情况	澄明度	吸光度	盐酸麻黄碱质量浓度, $\mu\text{g/ml}$
不加澄清剂	无	棕褐色, 不透明	0.250	821.0
醇沉法	颗粒状, 较多	深棕色, 半透明	0.181	775.8
壳聚糖法	絮状, 较多	红棕色, 半透明	0.127	769.7

并且醇沉法产生的沉淀呈细小颗粒状, 给过滤带来很大困难, 而壳聚糖法产生的沉淀呈疏松的絮状, 易于过滤。最佳工艺下的壳聚糖澄清法与醇沉法对盐酸麻黄碱质量浓度都影响较小且无明显差异, 可有效保留小儿解表止咳口服液的有效成分。综上, 壳聚糖澄清法较醇沉法的澄清效果更好, 且工艺简便、节省时间。

3 讨论

本研究采用壳聚糖作为澄清剂用于小儿解表止咳口服液澄清工艺优化, 结合紫外-可见分光光度法与HPLC法检测澄明度的变化和对盐酸麻黄碱含量的影响, 并通过正交试验优化出最佳澄清工艺。

通过比较壳聚糖法与醇沉法发现, 壳聚糖法所得的小儿解表止咳口服液澄明度优于醇沉法, 对盐酸麻黄碱质量浓度的影响与醇沉法相比无明显差异, 可有效保留有效成分。壳聚糖法操作简单, 壳聚糖用量较少, 相比于醇沉法更节约成本, 故可以代替醇沉法用于小儿解表止咳口服液以改善其澄明度。总体来讲, 壳聚糖在中药口服液澄清方面的研究已经展示出良好的应用前景, 加强此方面的研究, 有助于其在纯化工艺方面的推广应用。

参考文献

- [1] 王海军, 罗文早. 吸附澄清剂在中药提取分离中的应用[J]. 重庆中草药研究, 2006(2): 30.
- [2] 李锋涛, 潘星火. 絮凝剂在中药制剂中的应用[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 647.
- [3] 张彤, 徐连英, 李海燕, 等. 壳聚糖用于大青叶等中药浸提液澄清效果的研究[J]. 中成药, 1998, 20(10): 7.
- [4] 张红岭, 阿有梅, 吕双喜, 等. 壳聚糖澄清剂对金银花水提液中有效成分的影响[J]. 河南中医, 2002, 22(5): 20.
- [5] 黄秉南, 杨义雄. 壳聚糖澄清剂用于中药提取液澄清工艺的实验[J]. 海峡药学, 2002, 11(4): 11.
- [6] 楚笑辉, 唐路梅, 夏新华. 壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺纯化乙肝宁复方水提液的对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 1.
- [7] 朱海涛, 黄志利, 袁胜浩, 等. 壳聚糖用于风湿II号合剂澄清工艺探讨[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(14): 1 190.
- [8] 朱宁, 张艳艳, 高亚男. 丹参水提液絮凝澄清工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(10): 1 439.
- [9] 罗兰, 张志福, 李启华, 等. 壳聚糖用于排铅口服液澄清工艺的研究[J]. 中药材, 2011, 34(9): 1 449.

(收稿日期: 2013-05-15 修回日期: 2013-09-15)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅