



基于有效组分检测与理化表征相结合的 蛻螂有效部位制备工艺研究

马家骅^{1,2}, 谭承佳³, 衣文娇², 杨明^{2*}

(1. 西南科技大学, 四川 绵阳 621010; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137;
3. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000)

[摘要] 目的: 优选蛻螂有效部位的制备工艺, 探索通过提取液理化表征来进行过程控制的可行性。方法: 采用单因素试验法, 主要以有效组分多肽与氨基酸的含量为指标, 结合流变学、表面化学、电学等方面的表征, 系统考察影响蛻螂有效部位制备相关的提取、浓缩、分离、纯化、干燥各环节的各因素。结果: 确定了蛻螂有效部位的制备工艺条件, 即: 取蛻螂药材粉碎为粗粉, 用 3 倍量的 85% 乙醇浸泡 48 h, 加 85% 乙醇 10 倍量, 以 $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的速度渗漉, 收集滤液, 滤过, 滤液在 $50 \sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$ 浓缩至 1:1, 冷藏除脂后, 通过 DA201-C 大孔树脂柱, 先后用 1 BV 水与 4 BV 70% 乙醇为洗脱剂进行洗脱, 分别收集洗脱液。水洗脱液浓缩, 干燥, 加 85% 乙醇洗涤 2 次, 取洗液, 与 70% 乙醇洗脱液合并, 浓缩, 干燥, 即得。同时, 本实验对有效部位制备各环节的液相体系进行表征, 发现与有效物质多肽相关的表面张力基本未变, 而与无效物质盐密切相关的电导率降低了约 90%, 最大限度地保留了药物治疗的有效信息, 去除了无效信息。结论: 筛选的蛻螂有效部位制备工艺条件稳定可靠, 通过提取液理化表征来进行过程控制切实可行。

[关键词] 蛻螂; 有效部位; 有效组分; 理化表征; 制备工艺

中药制剂在制备过程中, 大多采用终端控制, 即最后检测制剂成品的质量, 而缺乏过程控制, 尤其是对提取液的质量往往不加考虑, 而直接进入下道工序, 使得成品的质量差异较大, 疗效不稳定, 存在安全隐患。因此, 亟待加强中药制备工艺过程的质量控制。近年来, 也出现了一些新的评价方法, 郭立玮^[1]等以中药水提液的物理化学参数为指标, 探讨了不同处理方法对提取液的纯化效果等, 这些有益的探索对中药的评价提供了一种新的思路, 但缺乏对提取液系统而全面的表征研究。为此, 有必要在当前这些评价方法的基础上, 探索一种更趋于全面的过程质量评价模式。

本文通过对蛻螂有效部位制备各环节液体分散体系宏观理化性质的表征, 结合现代微观化学成分的指认, 对蛻螂有效部位的制备工艺进行研究。本

课题组前期研究初步发现, 蛻螂中所含多肽、氨基酸可能为其治疗良性前列腺增生症的主要物质基础, 文中根据有效部位的化学性质, 选择适宜的提取与分离方法, 采用单因素试验法, 以组分含量为指标, 结合流变学、表面化学、电学等方面的表征, 对影响制备各环节的关键因素进行系统研究, 以期筛选出蛻螂有效部位最佳制备工艺。

1 材料

BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司), UV-VIS 1700 分光光度计(日本 SHIMADZU 公司), Physica MCR101 型流变仪(奥地利安东帕有限公司), Zetasizer Nano S 激光粒度仪(Malvern 仪器有限公司), DCAT11 表面/界面张力仪, DDS-307A 电导率仪(上海雷磁精密仪器厂);

蛻螂(成都荷花池中药材市场)由成都中医药大学杨明教授鉴定, 丙氨酸对照品(中国药品生物制品检定所, 140680-200401), 牛血清白蛋白 V(瑞士 Roche 公司, 批号 A8020), DA201-C 大孔树脂(江苏苏青水处理工程集团有限公司), 水为蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 评价指标的选择与表征方法

[稿件编号] 20100111005

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801550, 30902005); 绵阳市科技计划项目(09S002-2)

[通信作者] * 杨明, Tel: (028) 61800127, E-mail: yangming16@126.com

[作者简介] 马家骅, 主要从事物理药剂学, 中药新制剂、新剂型的研究, E-mail: jiahuama@163.com



2.1.1 多肽 多肽为蛻螂抗良性前列腺增生症的主要有效组分,故以多肽的含量作为乙醇渗漉提取工艺的评价指标之一。

对照品溶液制备:精密称取牛血清白蛋白对照品 0.253 2g,置 5 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液的制备:取各试验所得提取液调整总量至 600 mL,摇匀,精密吸取 20 mL 置蒸发皿中,在水浴上蒸发至适量,转移至 10 mL 量瓶中,加 85% 乙醇至刻度,摇匀,即得。

测定法:精密量取供试品溶液 2 mL 置玻璃试管中,加水至 2.0 mL,加双缩脲试剂 4.0 mL,混匀,置 37 °C 水浴中 30 min,以相应的溶剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2005 年版三部附录 A),在波长 540 nm 处测定吸光度,计算多肽的含量。

2.1.2 氨基酸 氨基酸为蛻螂抗良性前列腺增生症的另一有效组分,其测定常用茚三酮显色法,该法灵敏度高,重现性好,简便准确,便于工艺控制,故采用茚三酮显色法测定氨基酸的含量。

对照品溶液制备:精密称取丙氨酸对照品 16.83 mg,置 100 mL 量瓶中,加 10% 异丙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液的制备:取各试验所得提取液调整总量至 600 mL,摇匀,精密量取 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 85% 乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

测定法:精密量取供试品溶液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加水至 2.5 mL,精密加入 1% 维 C 溶液(新鲜配制)0.1 mL,茚三酮溶液 3.0 mL,摇匀,置 80 °C 水浴中加热 15 min,取出,迅速冷至室温,加 60% 乙醇至刻度,摇匀,即得。以相应的溶剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2005 年版三部附录 A),在 570 nm 波长处测定吸光度,计算含量。

2.1.3 出膏率 出膏率是药品日服量,单服剂量及包装规格确定的依据,能够部分代表药物的综合疗效,故以其作为乙醇渗漉提取工艺的另一评价指标,照《中国药典》附录项下方法测定。

2.1.4 理化参数 本实验用流变仪进行流变学表征,电导率仪测定电导率进行电学表征,表面/界面张力仪测定表面张力进行表面化学表征。

2.2 提取工艺条件考察

为保证制剂的有效性,根据物质基础研究的结

果及实际生产的可行性,以多肽与氨基酸的含量及出膏率为评价指标,采用单因素法对乙醇用量、渗漉速度等因素进行考察。试验中称取蛻螂药材粗粉适量,加乙醇渗漉,收集漉液,回收乙醇,照 2.1 项下方法分别测定各指标。对于渗漉溶剂用量,比较了加入 8 倍量、10 倍量、12 倍量 85% 乙醇渗漉的效果,结果加 10 倍量 85% 乙醇,多肽与氨基酸含量及出膏率均较高(与 12 倍量接近),故确定加 10 倍量;对于渗漉速度,比较了 2, 4, 6 mL · min⁻¹ · kg⁻¹ 的速度进行渗漉的效果,结果以 4 mL · min⁻¹ · kg⁻¹ 的速度渗漉,多肽与氨基酸含量及出膏率均较高(与 2 mL · min⁻¹ · kg⁻¹ 接近),故确定以 4 mL · min⁻¹ · kg⁻¹ 速度渗漉,采用上述最佳条件对蛻螂渗漉工艺进行验证,结果见表 1。

表 1 蛻螂渗漉工艺验证试验 %

批次	多肽	氨基酸	出膏率
1	3.663	0.678	28.79
2	3.762	0.654	28.80
3	3.738	0.645	28.72

结果最佳渗漉工艺条件为取蛻螂药材粉碎为粗粉,用 3 倍量的 85% 乙醇浸泡 48 h,加 85% 乙醇 10 倍量,以 4 mL · min⁻¹ · kg⁻¹ 的渗漉速度渗漉,收集漉液即可。3 次验证试验结果表明,该提取条件稳定可行,重复性好。

2.3 浓缩工艺研究

本工艺考虑采用减压浓缩,以多肽、氨基酸的含量为指标考察浓缩前后成分变化,照 2.1 项下方法分别测定,结果见表 2,同时对浓缩液进行理化表征,结果见表 3。

表 2 蛻螂有效部位浓缩工艺考察 %

温度 /°C	多肽质量分数		氨基酸质量分数	
	浓缩前	浓缩后	浓缩前	浓缩后
50		3.700		0.648
60	3.720	3.631	0.655	0.632
70		3.275		0.571

表 3 蛻螂有效部位制备过程的信息传变

过程	黏度/Pa · s	表面张力/mN · m ⁻¹	电导率/ms · cm ⁻¹
提取	0.001 96	24.994 ± 0.022	0.31
浓缩	0.001 72	24.832 ± 0.021	0.26
分离	0.001 75	25.040 ± 0.023	0.28
纯化	0.001 65	24.915 ± 0.023	0.025

注:流体类别均为牛顿流体。



结果表明,在 50,60 ℃下,浓缩前后多肽与氨基酸含量变化不大,而在 70 ℃,指标成分含量有比较明显的减少,考虑到在最大限度地保留有效成分的同时,提高生产效率,选择浓缩温度为 50~60 ℃。

2.4 脱脂工艺考察

由于蛻螂含有大量的脂肪,将药液回收至无乙醇后冷藏放置过夜,药液表面会凝固一层脂肪,影响后续工艺的进行,由于脂肪部位无抗良性前列腺增生症的药理活性,故考虑用冷藏法将其除去。试验中,对提取液的浓缩比例进行了考察,即取渗漉液 3 份,分别在 55 ℃将药液浓缩为 1:1,1:2,1:3(原药材-提取液),静置,抽滤除去脂类成分。取滤液与沉淀测定多肽、氨基酸的含量及出膏率,结果见表 4,同时对脱脂液进行理化表征,结果表明,浓缩比例为 1:1 时,多肽与氨基酸损失较少,同时又可基本除去油脂,故选定浓缩比例为 1:1。

表 4 3 批样品质量分数测定 %

批次	氨基酸	多肽
1	6.48	64.8
2	7.39	72.8
3	6.96	70.2

2.5 纯化工艺考察

通过前期药效物质基础研究,表明蛻螂的药效组分主要为多肽等生物活性物质,但蛻螂作为动物药,在产地常采用盐水烫制的方法进行加工,使得药材中含有大量的无机盐,影响对其有效部位生物活性的分析、药效物质基础的筛选、后续制剂的研究,故有必要对其提取液进行脱盐。文献[2-3]表明 DA201-C 大孔吸附树脂对于蛋白酶、多肽等化合物具有脱盐效果好、活性组分保留率高的优点,因此本研究直接采用其对蛻螂提取液的脱盐工艺进行研究,并对大孔树脂吸附处理后的过柱液进行理化表征,结果见表 2,4。

结果用 1 BV(树脂床体积, BV)水即可将盐基本除去,脱除率达到 98.81%,用 70%乙醇约 6 BV 后,可以将大部分吸附的多肽洗脱下来,回收率达到 87.39%。表明 DA201-C 大孔吸附树脂对蛻螂提取液中蛋白、多肽具有较好的吸附特性,能够从盐溶液中将多肽类成分分离出来,以达到脱盐及纯化的效果。

2.6 干燥工艺考察

浓缩工艺研究表明,在 50,60 ℃下,浓缩前后多肽与氨基酸含量变化不大,故干燥时采用减压干燥,温度为 50~60 ℃。

2.7 制备工艺小结

由表 3 可知,药液纯化后仍为牛顿流体(newtonian fluid),黏度和表面张力基本未变,而电导率显著降低。表明在整个制备过程中与有效物质多肽相关的表面张力基本未变,而与无效物质盐密切相关的电导率有了很大变化,降低约 90%,表明该工艺能最大限度地保留药物治病的有效物质,去除无效物质,工艺稳定可行。

综合提取、分离、浓缩、纯化的考察结果,确定蛻螂有效部位的制备工艺条件为:取蛻螂药材粉碎为粗粉,用 3 倍量的 85%乙醇浸泡 48 h,加 85%乙醇 10 倍量,以 4 mL·min⁻¹·kg⁻¹的渗漉速度渗漉,收集漉液,滤过,滤液在 50~55 ℃浓缩至 1:1,冷藏除脂后,通过 DA201-C 大孔树脂柱,先后用 1 BV 水与 4 BV 70%乙醇为洗脱剂进行洗脱,分别收集洗脱液。水洗脱液浓缩,干燥,加 85%乙醇洗涤 2 次,取洗液,与 70%乙醇洗脱液合并,浓缩,干燥,即得。

3 讨论

前期研究发现,蛻螂中所含多肽为其治疗良性前列腺增生症的主要物质基础,而多肽作为小分子蛋白,具有较强的表面活性,可通过表面张力的变化来推测体系中多肽的多寡,通过制备过程中各环节的表征,发现与其实际含量一样基本未变,表明以表面张力作为整个制备过程的评价指标具有较强的可行性与可信度。

电导率能反映出体系中电解质的存在程度,体系中电解质的浓度不同,则溶液导电的程度也不同,可通过测定体系的电导率来分析电解质的多寡。本研究中,电导率在纯化后降低约 90%,与实际盐含量的降低数值基本一致,表明无效物质盐基本已被除去,以电导率作为纯化评价指标准确可信。

本研究还对蛻螂有效部位制备各环节的液体体系进行了流变学、粒径分布等方面的测定,结果整个过程未见明显变化,可能与体系中的有效或无效物质关系不密切所致,规律待寻。

总之,通过对提取液宏观理化性质的表征,结合现代微观化学成分的指认,可以建立一种符合中药特色的中药质量评价体系和模式,达到对中药质量基于微观之上的系统控制与过程控制,从而促进



中医药的现代化和国际化。

[参考文献]

[1] 柳扬,姚薇薇,郭立玮. AB-8 大孔树脂对黄连解毒汤不同药物组合物理化学参数影响的初步研究[J]. 化工时刊, 2006, 20(9):10.

[2] 宫霞,赵骏. 大孔吸附树脂对酪蛋白酶解液的脱盐作用研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11):301.
[3] 赵利,王璋,许时婴. 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽的脱盐和色谱分离[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(4):69.

Preparation technology of effective fraction of *Catharsius molossus* based on determination of effective composition and characterization of physico-chemical property

MA Jiahua^{1,2}, TAN Chengjia³, YI Wenjiao², YANG Ming^{2*}

(1. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China;

3. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the preparation technology of effective fraction of *Catharsius molossus*, and investigate the feasibility of process control by the physical and chemical characterization of extracts. **Method:** Used single-factor test method, choosed the main effective components of peptides and amino acids as indexes, combined with rheology, chemistry, electricity, and other characterization, the study researched the prepared technology of effective fraction of *C. molossus* including extraction, concentration, separation, purification, drying and so on. **Result:** The optimal preparation technology of effective fraction of *C. molossus* was that soaked an amount of crude drugs with three times of 85% ethanol for 48 h, added 10 times of 85% ethanol, percolated in 4 mL · min⁻¹ · kg⁻¹, collected percolation liquid, concentrated to 1:1 at 50-55 °C, removed fat by frozen, adopted DA201-C macroporous resin, used 1 BV of water and 4 BV of 70% ethanol as eluting agent, collected eluant respectively. The water part was concentrated and dried, then washed twice with 85% ethanol, collected washing liquid and mixed with 70% ethanol eluant. The product was obtained by concentrating and dring. At the same time, the liquid-phase system of each link was characterized in preparation of effective fraction of *C. molossus*, which showed that the surface tension related to polypeptide was essentially unchanged, and the conductivity related to salt decreased by about 90% with ineffective substances closely related to salt. The results showed that the preparation technology maximully retained the effective information, and removed the invalid information. **Conclusion:** The preparation technology of effective fraction of *C. molossus* is stable and reliable, and the process control in physico-chemical characterization of extracts is feasible.

[Key words] *Catharsius molossus*; effective fraction; effective composition; characterization of physicochemical properties; preparation technology

doi: 10.4268/cjcmm20100907

[责任编辑 周驰]