

· 工艺研究 ·

六味生物制剂有效部位残留正丁醇去除工艺优选及正丁醇残留量检测

杨霞, 郭丽冰, 翁志平, 杨银凤, 丁建新, 陈凯, 赵越(广东药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 建立六味生物制剂有效部位正丁醇残留量的检测方法, 确定六味生物制剂有效部位残留正丁醇的最佳去除工艺。方法 运用气相色谱法测定正丁醇残留量, 以正丁醇残留量为考察指标, 结合正交试验设计, 优选最佳的残留正丁醇去除工艺。结果 正丁醇残留量检测方法平均回收率为 99.62 %, RSD 为 2.05 %。六味生物制剂有效部位残留正丁醇的最佳去除工艺为每次加入 0.5 倍量水, 80 ℃ 旋转蒸发 3 次, 测得正丁醇残留量符合《中国药典》规定限量标准。结论 本试验所建立的正丁醇残留量检测方法准确可靠, 优选的正丁醇去除工艺简便可行, 为后续产品研发奠定基础。

关键词: 六味生物制剂有效部位; 正丁醇; 残留量; 气相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)01-0082-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.022

Optimal Technique for Eliminating *n*-Butanol and Determination of *n*-Butanol Residue in Active Composition of LW-PSB

YANG Xia, GUO Libing, WENG Zhiping, YANG Yinfeng, DING Jianxin, CHEN Kai, ZHAO Yue (Guangdong Pharmacological University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for detecting residual *n*-butanol and to optimize the process for eliminating *n*-butanol in active composition of LW-PSB. **Methods** We detected the residual *n*-butanol in active compositions of LW-PSB by gas chromatography (GC), and optimized the process condition for the elimination of *n*-butanol with residual *n*-butanol as the indexes and by using the orthogonal experimental design. **Results** The recovery of residual *n*-butanol was 99.62 % with RSD being 2.05 %. The optimal process for eliminating *n*-butanol was adding 0.5-fold water every time and reduced-pressure distillation at 80 ℃ for three times, and the obtained residual *n*-butanol level was in accordance with the pharmacopeial limit. **Conclusion** The method for detecting residual *n*-butanol in active composition of LW-PSB is accurate and reliable. The optimal technique is convenient and practical, and will lay a good foundation for the product development.

Keywords: Active composition of LW-PSB; *n*-butanol; Residual level; Gas chromatography

六味生物制剂(Liuwei Dihuang decoction metabolized by photosynthetic bacteria, LW-PSB)是由传统名方六味地黄汤经光合细菌生物代谢后所得^[1], 其具有良好的抗衰老和增强免疫力的功效, 且疗效优于传统的六味地黄汤^[2-6]。通过对六味生物制剂进行初步

药效学筛选及提取工艺研究^[7-8], 得到了其有效部位提取物, 从而降低了六味生物制剂的服药量, 改善了用药依从性, 并拟将其有效部位开发成具有抗衰老活性的新型中药制剂。在六味生物制剂有效部位的提取工艺中, 需将六味生物制剂粗提物用水饱和的正丁醇

收稿日期: 2013-10-14

作者简介: 杨霞, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与新技术的研究。Email: yangxia1222@163.com。通讯作者: 赵越, 女, 教授, 研究方向: 中药新剂型与新技术。Email: zybmbylk688@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81374072)。

进行萃取，收集正丁醇萃取液，减压回收正丁醇，浓缩至少有溶剂蒸出，得到的提取物将用于后续制剂工艺研究。根据《中国药典》(2010 年版)制剂中溶剂残留量的相关规定，正丁醇为《中国药典》规定的第三类溶剂，限度要求为不超过 0.5 %^[9]。为完善六味生物制剂有效部位的提取工艺，确保提取物中正丁醇的残留量不超过《中国药典》规定的限度，本实验优选了六味生物制剂有效部位提取物残留正丁醇的最佳去除工艺，并建立相应的正丁醇残留量检测方法。

1 材料

1.1 试药 六味生物制剂有效部位提取物，由广东药学院药剂实验室制备，批号：20120305。熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓 6 味中药按照 8:4:4:3:3:3 的质量比例配药，加入 8 倍量蒸馏水，自然发酵适当时间，过滤，合并滤液，浓缩到 0.5 g·mL⁻¹，按照一定比例加入光合细菌与豆浆培养基，进行生物代谢(代谢过程中每天振摇，调节 pH 值为 8~9)，即可得到六味生物制剂。按照前期研究筛选出的六味生物制剂有效部位最优提取工艺进行提取，即得六味生物制剂有效部位提取物。

1.2 仪器及试剂 GC-2010 高效气相色谱仪，日本岛津；RV10 basic 旋转蒸发仪，德国 IKA 公司；SHB-Ⅲ 循环式多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司；DLSO-5/20 低温冷却循环泵，郑州长城科工贸有限公司；BL-220H 电子天平，日本 SHIMADZU 公司；GZX-9070MBE 恒温鼓风干燥箱，上海博迅实业有限公司医疗设备厂。正丁醇、甲醇均为色谱纯，天津科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 正丁醇去除工艺设计 常用的制剂中残留有机溶剂去除工艺有超临界二氧化碳萃取法、氮气-高真空干燥法、共沸法以及生物膜萃取法等^[10-12]。六味生物制剂有效部位提取过程中水饱和正丁醇用量较大，综合考虑药品生产中的实际情况，在保证正丁醇残留量不超过《中国药典》规定限度的前提下，以生产成本为导向，初步选定共沸法除去六味生物制剂有效部位提取物中残留的正丁醇。

正丁醇-水物系能够形成二元非均相共沸物，二者的最低共沸点为 92.5 ℃^[13]，因此，通过加入蒸馏水，与六味生物制剂有效部位提取物中的残留正丁醇形成共沸物并进行工艺优化，以此达到最大限度

去除六味生物制剂有效部位提取物中残留正丁醇的目的。

2.2 因素与水平 选取加水量(以六味生物制剂有效部位提取物体积倍数计)、加水次数及旋蒸温度为考察因素，采取正交试验设计，运用气相色谱法测定正丁醇残留量，并以正丁醇残留量为正交试验考察指标，优选最佳的残留正丁醇去除工艺，见表 1。

表 1 正丁醇去除工艺正交设计因素与水平

水平	A(加水量 / 倍)	B(加水次数 / 次)	C(旋蒸温度 / ℃)
1	0.25	1	60
2	0.5	2	70
3	1	3	80

2.3 正交试验方法 取六味生物制剂有效部位提取物 100 mL，置于旋转蒸发仪中，按照正交试验设计因素水平表进行试验，减压蒸出正丁醇与水的混合液，观察少有溶剂蒸出时，试验结束，如需加水，则重复上述操作，所得中间浓缩液用甲醇溶解并转移至 100 mL 量瓶中，用甲醇定容，测定样品中正丁醇的含量。

2.4 正丁醇残留量含量测定

2.4.1 色谱条件 AT.PEG-20M 毛细管色谱柱 (30.0 m × 0.32 mm, 0.5 μm)，FID 检测器；进样口温度：220 ℃，检测口温度：240 ℃，体积流量：1 mL·min⁻¹，程序升温：起始温度 40 ℃，保持 2 min，以 5 ℃·min⁻¹ 速率升至 70 ℃，保持 2 min，进样量 1 μL，进样方式不分流进样。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称定 75 mg 正丁醇，置于 100 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取正交试验样品溶液约 0.4 g，精密称定，置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.4 线性关系考察 精密量取 2.4.2 项下配置的正丁醇对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL，分置于 10 mL 量瓶中，以甲醇定容，摇匀，依次精密吸取 1 μL，注入气相色谱仪，以峰面积(A)为纵坐标，以对照品质量浓度(C)为横坐标，进行线性回归，得线性方程 $Y=38881X+42427(r=0.9996)$ ，表明正丁醇在 75~525 μg·mL⁻¹ 线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液按照 2.4.1 项下色谱条件进样分析，连续进样 6 次，正丁醇峰面积的 RSD 为 0.90 %，表明方法精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 依据 2.4.1 项下色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样检测, 得正丁醇峰面积的 RSD 为 0.95 %, 表明方法在 24 h 内稳定性良好。

2.4.7 重复性试验 取同一正交试验样品制备的 6 份供试品溶液各 1 μ L, 依据 2.4.1 项下色谱条件, 进样测定正丁醇峰面积, 得 RSD 为 1.70 %, 表明方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 精密称取 6 份同一正交试验样品约 0.45 g, 置 10 mL 量瓶中, 各精密加入 2.4.2 项下配置的对照品溶液, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按照 2.4.1 项下色谱方法进样测定, 结果如表 2。

表 2 正丁醇去除工艺加样回收率($n=9$)

Table 2 The result of recovery test

称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.4507	1.7577	1.4302	3.1604	98.08	99.62	2.05
0.4499	1.7546	1.4302	3.1876	100.20		
0.4469	1.7429	1.4302	3.1047	95.22		
0.4507	1.7577	1.7508	3.5543	102.61		
0.4523	1.7640	1.7508	3.5030	99.33		
0.4494	1.7527	1.7508	3.4845	98.92		
0.4521	1.7632	2.0620	3.8652	101.94		
0.4517	1.7616	2.0620	3.8219	99.91		
0.4519	1.7624	2.0620	3.8328	100.41		

2.4.9 最低检出限 采用逐步稀释法进行测定, 以信噪比约为 3 时计算最低检出限, 结果显示正丁醇的最低检出限为 0.41 ng。

2.4.10 正交试验样品中正丁醇的含量测定 依次测定正交试验样品正丁醇的含量, 并对试验结果进行方差分析, 由此确定最佳的六味生物制剂有效部位残留正丁醇去除工艺, 见表 3 和表 4。

由方差分析结果可知, 三个因素均对六味生物制剂有效部位中残留正丁醇的去除有显著性影响。同时, 直观分析结果表明, 各因素对六味生物制剂有效部位中正丁醇残留量影响顺序为加水次数(B)>加水量(A)>旋蒸温度(C), 因素 D 为误差项。因此, 确定去除六味生物制剂有效部位中残留正丁醇的最佳工艺为 $A_2B_3C_3$, 即加水量为 0.5 倍, 旋蒸 3 次, 每次温度为 80 $^{\circ}$ C。

2.4.11 最佳工艺验证试验 取六味生物制剂有效部位提取物 3 份, 按最佳工艺操作, 测得其中正丁醇含量平均值为 0.06 %, 见表 5。

表 3 正丁醇去除工艺正交试验中正丁醇残留量测定

Table 3 The results and analysis of orthogonal experiment

试验号	因素				正丁醇 残留量 /%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.67
2	1	2	2	2	0.40
3	1	3	3	3	0.18
4	2	1	2	3	0.47
5	2	2	3	1	0.09
6	2	3	1	2	0.11
7	3	1	3	2	0.38
8	3	2	1	3	0.27
9	3	3	2	1	0.07
k1	1.25	1.52	1.05	0.83	
k2	0.67	0.76	0.94	0.89	
k3	0.72	0.36	0.65	0.92	
R	0.42	0.51	0.35	0.28	

表 4 方差分析

Table 4 The results of variance analysis

误差来源	SS	f	S	F	P
A	0.07	2.00	0.03	49.19	$P < 0.05$
B	0.23	2.00	0.12	165.33	$P < 0.05$
C	0.03	2.00	0.01	20.33	$P < 0.05$
误差	0.00	2.00	0.00		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.1}(2, 2)=9.0$ 。

表 5 六味生物制剂有效部位提取物中正丁醇残留量的测定结果($n=3$)

Table 5 Determination of *n*-butanol vestigial in active composition of LW-PSB

批号	正丁醇含量 /%
20130414	0.07
20130420	0.06
20130424	0.06

3 讨论

减压蒸出正丁醇、水混合溶剂过程中, 旋转蒸发仪的真空度指示值应小于 -0.085 mPa, 即绝对压力应小于 0.015 mPa, 从而保证正丁醇/水二元物系形成共沸物后, 六味生物制剂有效部位中的残留正丁醇能够以水为夹带剂被蒸出^[15-16]。

对比残留正丁醇去除工艺处理前后的六味生物制剂有效部位中指标性成分的含量测定, 表明指标性成分总环烯醚萜苷和马钱苷含量均无显著性变化, 说明该工艺不会对药物的有效性产生显著影响。六味生物制剂有效部位提取物经本试验优选的最佳去除工艺处理后, 其中残留正丁醇平均含量为 0.06 %, 低于《中国药典》规定的限度。因此, 该工艺所确定的正丁

醇残留量检测方法可作为六味生物制剂有效部位应用于生产的内控质量标准,能够提高用药安全性,操作简便,成本较低,具有实际应用价值。

由于大多中药成分复杂,为了确定中药的药效成分,中药研发过程中常会应用分级萃取进行初步分离,正丁醇萃取物是常见的中药有效成分集中部位^[17-19]。在不影响药效的前提下,能够同时确保制剂中有机溶剂残留量低于《药典》规定限度,保证用药安全性,仍是目前中药研究亟待解决的问题之一,本试验确定了去除六味生物制剂有效部位提取物中残留正丁醇的最佳工艺,也为其他同类产品的工艺优化和质量标准研究提供了思路。去除中药有效部位研发及生产过程中所产生的可能影响药物疗效的残留有机溶剂,是涉及中药有效部位新药研发质量标准的根本性和原则性问题,直接关系到此类新药研发立项的必要性和可行性,故有机溶剂残留问题应当在中药研发工作中得到重视,从而提高中药有效部位的质量标准。

参考文献:

- [1] 赵越. 六味地黄汤的中药生物制剂及制备方法 [P]. 中国专利: ZL2006 10123868. 6, 2010-09-08.
- [2] 臧建伟, 胡旭光, 唐春萍, 等. 六味地黄汤生物制剂的抗衰老作用[J]. 中草药, 2007, 38(1): 99-100.
- [3] 丘婷, 李天河, 吴思, 等. 六味地黄生物制剂对衰老模型小鼠脑海马区神经元 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学, 2012, 18(21): 196-198.
- [4] 李天河, 丘婷, 杨霞, 等. 六味地黄生物制剂对衰老小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 644-646.
- [5] 朱颖, 夏少秋, 吴亚军, 等. 六味地黄生物制剂对果蝇寿命和繁殖力的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2473-2474.

- [6] 朱颖, 夏少秋, 赵越. 六味地黄生物制剂对残疾果蝇寿命的影响[J]. 中成药, 2011, 33(3): 396-399.
- [7] 朱颖, 夏少秋, 吴亚军, 等. 六味地黄生物制剂抗衰老活性部位的筛选研究[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(10): 1997-1999.
- [8] 夏少秋, 朱颖, 吴亚军, 等. 六味地黄生物制剂正丁醇提取物延缓果蝇衰老作用的研究[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1417-1419.
- [9] 国家药典委员会. 中国药典(1 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 VIII.
- [10] 李小兵, 钟运斌, 龚红梅. 粗粒盐酸土霉素生产中正丁醇的回收利用[J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(4): 59.
- [11] 胡忠. 利用膜分离技术回收正丁醇/水混合液的工艺研究[J]. 广西化工, 1998, 27(3): 12-15.
- [12] 姚玉英. 化工原理 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 9-16.
- [13] 王锦玉, 张旭, 全燕, 等. 天舒滴丸正丁醇去除工艺优选及正丁醇残留量检测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 15-17.
- [14] 孔伶俐, 伊惠贤, 崔青娟. GC 法测定心宁提取物中正丁醇的残留量[J]. 中草药, 2004, 35(10): 1132-1133.
- [15] Hongji Zhu, Xiaoyue Ren, Jiangxin Wang, et al. Integrated OMICS guided engineering of biofuel butanol - tolerance in photosynthetic Synechocystis sp. PCC 6803[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(106): 14.
- [16] Natasha D, Mallette W, Berk Knighton, et al. Resolution of volatile fuel compound profiles from Ascomycete sarcoides: a comparison by proton transfer reaction-mass spectrometry and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry[J]. AMB Express, 2012, 2(23): 2-7.
- [17] 高思国, 李冠业, 丁霞. 龙葵正丁醇提取物体外抗肿瘤活性的研究[J]. 江苏中医药, 2010, 42(11): 76-78.
- [18] 梁淑珍, 孟玉彩, 安锡忠, 等. 蔷薇红景天提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(20): 10683-10689.
- [19] 张晓东, 张磊, 潘国凤. 中药有效部位新药研发中有效部位筛选存在问题浅析[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(4): 58-59.

(编辑: 宋威)

北沙参茎叶黄酮类化合物提取优选条件研究

杨同章, 叶国华, 许一平, 吕方军(山东中医药高等专科学校, 山东 烟台 264199)

摘要: **目的** 优选北沙参茎叶中黄酮类化合物的提取条件。**方法** 采用超声波提取北沙参茎叶中的黄酮类化合物, 以得率为指标, 在单因素试验基础上采用正交试验优选提取条件。**结果** 提取条件为乙醇浓度: 70%, 温度: 70℃, 时间: 40 min, 料液比为 1:30 时, 北沙参茎叶总黄酮得率最高, 达 3.31%。**结论** 所用方法为

收稿日期: 2013-09-09

作者简介: 杨同章, 男, 主管药师, 研究方向: 中药质量标准。Email: yangtongzhang66@163.com。通讯作者: 吕方军, 男, 副教授, 研究方向: 中药分析与质量控制的教学与科研。Email: 95456578@163.com。

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2009-264)。