

复方黄连注射剂脱色工艺研究

徐芳¹, 谭彬新¹, 贺兰², 毛宇¹, 贺建华^{3*}

1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128

2. 益阳市赫山区沧水铺人民医院, 湖南 益阳 413064

3. 湖南农业大学动物科技学院, 湖南 长沙 410128

摘要: **目的** 确定制备复方黄连注射剂的最佳脱色工艺方法和条件。**方法** 以复方黄连注射剂未脱色药液为原料, 以脱色率、工艺成本、脱色后药液的气味变化及对耐药金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)等为评价指标, 对活性炭吸附法、铅盐沉法、氧化铝吸附法、石灰乳沉淀法、硅胶吸附法5种方法进行综合评价。**结果** 经过综合分析, 确定最佳脱色方法为硅胶吸附法。通过正交试验, 确立硅胶吸附法的最佳工艺条件为硅胶用量35%, 温度40℃, 时间30 min, 在该条件下脱色率为35.98%, 复方黄连注射剂对耐药金黄色葡萄球菌的MIC值为7.8 mg/mL。**结论** 用正交设计确定的硅胶吸附法最适脱色条件可实现复方黄连注射剂的有效脱色。

关键词: 复方黄连注射剂; 正交试验; 脱色工艺; 最低抑菌浓度; 硅胶吸附法; 脱色率

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)17-2386-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.009

Study on decolorization process of Compound Huanglian Injection

XU Fang¹, TAN Pin-xin¹, HE Lan², MAO Yu¹, HE Jian-hua³

1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Cangshuipu Hospital of Heshan District of Yiyang, Yiyang 413064, China

3. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: **Objective** To prepare the Compound Huanglian Injection (CHI) and to optimize the decolorization process of CHI. **Methods** The comprehensive effect of five decolorization processes (active carbon adsorption, lead salt precipitation method, aluminum oxide adsorption method, lime milk precipitation, and silica gel adsorption) was evaluated by the decolorization rate, cost of the process, chemical odor after bleaching, and minimum inhibitory concentration (MIC) to *Staphylococcus aureus*. **Results** The optimal method was silica gel adsorption method, and the optimum conditions calculated by orthogonal test were as follows: 35% of silicone, adsorption time for 30 min at 40℃, and decolorization rate of 35.98%. The MIC of CHI to drug resistant *S. aureus* was 7.8 mg/mL. **Conclusion** The silica gel adsorption in optimal decolorization process could achieve the effective decolorization of CHI. **Key words:** Compound Huanglian Injection; orthogonal test; decolorization process; minimum inhibitory concentration; silica gel adsorption method; decolorization rate

复方黄连注射剂是以黄连解毒汤^[1]为基础, 采用现代制剂生产工艺制备的复方中药注射剂, 主要成分为黄连、黄柏、黄芩、栀子4味中药。这4种药物都含有大量有色物质, 导致制备的注射剂颜色太深, 一方面影响制剂的澄明度, 另一方面也影响产品的稳定性, 因此必须进行脱色处理^[2-3]。目前应用于中药脱色的方法及工艺很多, 如利用溶解度差

异或分配系数的不同进行脱色, 还有根据吸附性差异进行脱色等。

但一般中药注射剂进行脱色处理时, 只考虑了色素的除去, 没有考虑脱色后药液的药理作用是否发生改变。本实验从脱色效率、工艺成本、脱色后药液气味的变化及对耐药金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)等多方面综合考察, 通过正交试验,

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 科技部国际科技合作专项基金(2011DFA30490); 湖南省科技重大专项(2012FJ1004)

作者简介: 徐芳(1989—), 女, 湖南人, 研究生, 研究方向为营养与健康。Tel: 15874165840 E-mail: 872708023@qq.com

*通信作者 贺建华, 教授, 博士生导师。E-mail: jianhuahy@hunau.net

确定了复方黄连注射剂的最佳脱色工艺条件。

1 仪器与材料

中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),净化工作台(江苏集苏州安泰空气技术有限公司),全自动高压灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),干燥消毒箱(上海精宏实验设备有限公司),UV—2100 型分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司)。复方黄连注射剂未脱色药液:含生药 1 g/mL,由湖南农业大学动物医学院药学系制备(制备日期是 2010 年 6 月 15 日)。该制剂主要用于动物急性肠炎、急性细菌性痢疾、肺炎、败血症、脓毒血症等细菌性疾病的治疗;盐酸小檗碱对照品(质量分数 99%),郑州荔诺生物科技有限公司;氧化铝、醋酸铅、明胶、活性炭等试剂均为国产分析纯,国药集团化学试剂有限公司提供。硅胶购自青岛海浪硅胶干燥剂厂。

2 方法与结果

2.1 不同脱色方法脱色效果比较

2.1.1 活性炭吸附法^[4] 取复方黄连注射剂未脱色药液适量,加入 0.50 g/mL 经活化处理的活性炭,60 ℃ 搅拌下脱色 30 min,抽滤除去活性炭,滤液备用。观察比较脱色前后药液颜色和气味,并计算脱色率。

2.1.2 铅盐沉淀法^[5] 取复方黄连注射剂未脱色药液适量,加入 0.30 g/mL 醋酸铅溶液,搅拌均匀,静置脱色 30 min 后抽滤出沉淀,用适量无菌超纯水洗涤沉淀,并入滤液,再往滤液中加入过量碱式醋酸铅饱和溶液至不产生沉淀,抽滤,滤液备用。观察比较脱色前后药液颜色和气味,并计算脱色率。

2.1.3 氧化铝吸附法^[6] 取复方黄连注射剂未脱色药液适量,加入 0.35 g/mL 氧化铝,35 ℃ 搅拌脱色 30 min,抽滤去氧化铝,滤液备用。观察比较脱色前后药液颜色和气味,并计算脱色率。

2.1.4 石灰乳沉淀法^[7] 取复方黄连注射剂未脱色药液适量,加入过量 0.30 g/mL 石灰乳,搅拌均匀,静置脱色 30 min 后抽滤出沉淀,滤液备用。观察比较脱色前后药液颜色和气味,并计算脱色率。

2.1.5 硅胶吸附法^[7] 取复方黄连注射剂未脱色药液适量,加入 0.35 g/mL 硅胶,30 ℃ 搅拌下脱色 30 min,抽滤除去硅胶,滤液备用。比较脱色前后药液颜色和气味,并计算脱色率。

2.1.6 不同脱色方法效果比较 不同脱色方法脱色效果见表 1。以脱色率、工艺成本、脱色后药液的质量等多因素分析判断,硅胶吸附法脱色效果最佳。

2.2 硅胶脱色工艺研究

2.2.1 脱色率测定方法 采用吸光度法。精密取复方黄连注射剂未脱色药液 1 mL 置 100 mL 量瓶中,

表 1 不同脱色方法效果比较

Table 1 Comparison on different decolorization methods

脱色方法	药液脱色前	药液脱色后		工艺评价
		颜色	气味	
活性炭吸附法	深棕红色,含有黄连	深棕色	特殊气味变淡	脱色不明显,药液气味改变
铅盐沉淀法	小檗碱特殊气味	棕黄色	特殊气味无明显变化	后续工艺繁琐,成本高
氧化铝吸附法		深棕红色	特殊气味无明显变化	几乎无脱色效果
石灰乳沉淀法		棕黄色	强烈石灰乳气味	石灰乳气味影响产品质量
硅胶吸附法		淡黄色	特殊气味无明显变化	脱色明显,保留药液的特殊气味

定容至刻度;以超纯水为空白,在 200~700 nm 波长范围内进行扫描,得到复方黄连制剂色素在可见光区最大的吸收波长为 460 nm。

精密吸取硅胶脱色前后复方黄连注射剂药液各 1 mL 分置于 100 mL 量瓶中,定容至刻度,在 460 nm 波长处测定吸光度,并计算脱色率,脱色率=(脱色前吸光度-脱色后吸光度)/脱色前吸光度。

2.2.2 MIC 的测定 以体外 MIC 作为考察指标。采用微量稀释法^[8]测定 MIC。将不同脱色条件处理

后的复方黄连注射剂分别作二倍递减浓度稀释,1~9 号试管内药物浓度为 500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、3.9、1.95 mg/mL。第 10 号试管加药液不加菌液,作为阴性对照,第 11 号试管加菌液不加药液,作为阳性对照。将各管置 35 ℃ 振荡培养 18 h 后取出,观察并判定脱色前后药物的 MIC。

2.2.3 硅胶脱色工艺单因素考察 以硅胶用量、脱色温度、脱色时间进行单因素考察。

(1)硅胶用量对 MIC 值及脱色率的影响 取复

方黄连注射剂未脱色药液适量,加入质量浓度 0.05、0.15、0.35、0.50、0.65 g/mL 等不同用量的硅胶,30 ℃脱色 30 min,按照“2.2.1”方法测定吸光度,并计算脱色率;将不同用量的硅胶脱色后的药液按照“2.2.2”项方法测定 MIC 值。结果不同用量硅胶的脱色率分别为 9.15%、21.76%、35.96%、49.98%、62.39%,MIC 值分别为 31.25、31.25、31.25、62.5、125.0 mg/mL。可知,在实验条件下,药液脱色率随着硅胶使用量的提高而显著提高,但当硅胶使用量超过 0.35 g/mL 时药液的 MIC 值显著升高。分析可能为硅胶浓度过高时,虽然脱色效果增加,但导致药液中一些有效成分被吸附,抑菌效果降低。使用量越高,也增加了搅拌以及过滤的难度,因此,硅胶用量以不超过 0.35 g/mL 为宜。

(2)脱色温度对 MIC 值及脱色率的影响 取复方黄连注射剂未脱色药液适量,加入 0.35 g/mL 硅胶后,在 4、20、30、50、80 ℃各温度水平脱色 30 min,考察脱色温度对 MIC 及脱色率的影响。结果不同脱色温度的脱色率分别为 6.64%、29.98%、34.23%、52.11%、54.32%,MIC 值分别为 31.25、31.25、62.5、125.0、125.0 mg/mL。可知,在试验条件下,随着脱色温度的不断升高,药液的脱色率

也不断提高,但超过 50 ℃后,脱色率变化很小;当脱色温度超过 30 ℃时 MIC 值升高,分析可能为在较高温度下硅胶对药液水分、色素乃至有效成分的吸附作用大大增强,因此以温度不超过 30 ℃脱色为宜。

(3)脱色时间对 MIC 值及脱色率的影响 取复方黄连注射剂未脱色药液适量,加入 0.35 g/mL 硅胶后,在 30 ℃条件下脱色 15、30、60、90、120 min,考察脱色时间对 MIC 及脱色率的影响。结果不同脱色时间的脱色率分别为 24.38%、35.96%、36.03%、36.07%、36.12%,MIC 值分别为 62.5、31.25、31.25、31.25、31.25 mg/mL。可见脱色时间达到 30 min 后药液的脱色率就无明显变化,MIC 值也没有升高,说明脱色时间对脱色效果和细菌 MIC 影响较小。

2.3 硅胶脱色工艺优化

以硅胶用量(A)、脱色温度(B)、脱色时间(C)为考察因素,脱色后的复方黄连注射剂对耐药金黄色葡萄球菌的 MIC 和脱色率为考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,通过正交试验确定硅胶脱色最佳工艺。硅胶脱色工艺优化 MIC 和脱色率评价结果见表 2,方差分析结果见表 3。

由表 2 可知 3 因素对 MIC 值和脱色率的影响顺

表 2 硅胶脱色工艺正交试验设计结果

Table 2 Results of orthogonal test for silica gel decolorization process

试验号		A / (g·mL ⁻¹)	B / ℃	C / min	D (误差)	MIC / (mg·mL ⁻¹)	脱色率 / %
1		0.25 (1)	20 (1)	20 (1)	(1)	62.5	17.17
2		0.25 (1)	30 (2)	30 (2)	(2)	31.2	21.46
3		0.25 (1)	40 (3)	40 (3)	(3)	31.2	21.33
4		0.30 (2)	20 (1)	30 (2)	(3)	31.2	21.13
5		0.30 (2)	30 (2)	40 (3)	(1)	31.2	27.26
6		0.30 (2)	40 (3)	20 (1)	(2)	31.2	25.45
7		0.35 (3)	20 (1)	40 (3)	(2)	31.2	27.30
8		0.35 (3)	30 (2)	20 (1)	(3)	15.6	29.07
9		0.35 (3)	40 (3)	30 (2)	(1)	7.8	35.16
MIC	K_1	124.9	124.9	109.3	101.5		
	K_2	93.6	78.0	70.2	93.6		
	K_3	54.6	70.2	93.6	78.0		
	R	70.3	54.7	39.1	23.5		
脱色率	K_1	59.96	65.60	71.69	79.59		
	K_2	73.84	77.79	77.75	74.21		
	K_2	95.53	81.94	75.89	71.53		
	R	31.57	16.34	6.06	8.06		

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源		偏差平方和	自由度	F 值	显著性
MIC	A	826.976	2	8.674	无
	B	583.616	2	6.122	无
	C	258.096	2	2.707	无
	D (误差)	95.336	2		
脱色率	A	166.917	2	14.861	无
	B	48.090	2	4.282	无
	C	6.425	2	0.572	无
	D (误差)	11.232	2		

 $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

序均为 $A > B > C$ ，即对脱色后药液 MIC 值和脱色率的影响最大的因素是硅胶使用量，其次是脱色温度，最后是脱色时间。两者的最佳工艺组合都是 $A_3B_3C_2$ ，即使用 35% 硅胶在 40 °C 脱色 30 min，药液脱色率为 35.16%，MIC 值为 7.8 mg/mL。

表 3 方差分析结果表明，3 因素对 MIC 值和脱色率的影响均不显著 ($P < 0.05$)，因此，不必再进行各因素水平间的多重比较。

2.4 最佳脱色工艺验证试验

取复方黄连制剂 3 份，按照最佳工艺条件脱色，分别测定 MIC 值和脱色率，结果 MIC 值分别为 7.8、7.8、7.8 mg/mL，脱色率分别为 35.47%、35.76%、36.01%。经 3 次验证试验证明，在该条件下药液的脱色率和 MIC 值均较为稳定。

3 讨论

3.1 植物色素及对中药注射剂生产的影响

植物色素类在中草药中分布很广，主要有脂溶性色素与水溶性色素 2 类。脂溶性色素主要为叶绿素、叶黄素与胡萝卜素，三者常共存。水溶性色素有花青素、黄色素、水溶性褐色色素、粉末辣椒红色素等等。在中药注射剂生产过程中，这些植物色素常常使得中药注射液为棕褐色、棕红色和褐色等，导致制备的注射剂颜色太深，影响制剂的色度，另一方面也影响产品的稳定性。如现在已经熟知，黄色素广泛存在于植物的花、叶、茎和果实中，多为黄色，它易与金属离子作用而改变颜色，黄色素在空气中也容易被氧化，产生褐色沉淀，导致中药注射剂变色产生浑浊。所以在制备中草药注射剂或提取其他有效成分时这些色素成分常须作为杂质去除，以使中药注射剂的澄明度和稳定性符合药典的规定。

3.2 脱色工艺探讨

中药制剂常用的脱色方法有醇沉法、活性炭吸附法、氧化铝吸附法、聚酰胺或大孔树脂吸附法、石灰乳沉淀法、絮凝澄清法、膜分离法、硅胶吸附法等。醇沉法是利用色素在不同溶剂中的溶解度差异除去小部分水溶性色素；硅胶是极性吸附剂，可吸附亲水性色素；硅胶比表面很大，吸附性能高、热稳定性好、化学性质稳定、有较高的机械强度，而且不溶于水和任何溶剂，具有许多其他同类材料难以取代的特点，能吸附许多物质，是一种很好的吸附剂。氧化铝也是极性吸附剂，但其吸附能力根据吸附物质的极性强弱来确定，对水、氧化物、醋酸、碱等具有较强的亲和力，因此也常作为干燥剂使用；活性炭、硅藻土等非极性吸附剂可除去亲脂性色素；活性炭是黑色细微多孔性物质，具有芳香环式的结构，其靠范德华力将色素吸附到自身表面，从而使有色物质脱色。活性炭擅于吸附芳香族有机物，并易于吸附含有 3 个碳原子以上的其他有机物。它对不带电物质的吸附力较强，而对带电物质（如阴离子）的吸附较弱。同时活性炭脱色效果受多种因素的制约，包括活性炭用量、吸附时间、温度、溶液 pH 值、活性炭质地等。

石灰乳沉淀法是利用钙离子与色素形成钙盐沉淀去除色素，但不能分离极性色素^[5]。铅盐沉淀法是利用醋酸铅在水或稀醇溶液中能与某些色素生成难溶的铅盐或络盐沉淀而除去色素，但存在后期处理残留铅的问题。

本实验通过比较活性炭吸附法、氧化铝吸附法、铅盐沉淀法、石灰乳沉淀法、硅胶吸附法 5 种脱色工艺方法的脱色效率，所得结果是硅胶脱色效率最佳，说明复方黄连注射剂中的色素主要是亲水性色素，氧化铝虽然也是极性吸附剂，但吸水性大，而且其吸附能力与被吸附物质的极性有关，所以对复方黄连注射剂中的色素物质吸附性较差。同时硅胶脱色后药液的色泽、气味的变化及脱色后期处理等都优于其他脱色方法。

以硅胶使用量、脱色温度、时间为考察因素，以药液脱色率、脱色后药液对耐药金黄色葡萄球菌的 MIC 值为评价指标，得出硅胶吸附法的最佳工艺条件为：硅胶用量为药液体积量的 35%，温度 40 °C，时间 30 min，在该条件下脱色率为 35.98%，复方黄连注射剂药液可达到理想的脱色效果。

参考文献

- [1] 谢 鸣. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [2] 王丽霞, 刘 坤, 张秀媛. 植物性天然色素的研究进展 [J]. 北方园艺, 2011(17): 208-211.
- [3] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [4] 周登高, 张科举, 田淑琴, 等. 复方秦皮提取液脱色工艺研究 [J]. 兽医导刊, 2008(6): 38-40.
- [5] 刘学芝, 韩富根, 焦桂珍. 烟叶中氯含量测定方法的改进效果 [J]. 河南农业科学, 2004(4): 22-24.
- [6] 秦孝敏, 苏明华, 李 翔, 等. 活性氧化铝吸附对大豆卵磷脂品质的影响 [J]. 中国油脂, 2008, 33(8): 57-59.
- [7] 毕丽华, 谭 志. 谈中药脱色方法 [J]. 中国医药导报, 2007, 4(36): 235.
- [8] 李伟奇, 刘湘新, 李俊超, 等. 10 种中药提取物对耐药金黄色葡萄球菌抑制作用的研究 [J]. 动物医学研究进展, 2010, 31(9): 41-46.