

## 葛根芩连提取液超滤工艺优选

施晓伟, 刘文\*, 陈大业, 张石宇  
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** **目的:** 优选葛根芩连提取液的超滤工艺参数。**方法:** 以葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵转移率的综合评分为指标, 通过正交试验考察超滤压力、料液温度及溶剂用量对葛根芩连提取液的超滤工艺的影响。**结果:** 截流相对分子质量 5 000 的中空纤维膜分离效果最好, 最佳超滤工艺参数为料液温度 40 ℃, 超滤压力 0.025 MPa, 溶剂用量 2 倍; 葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵的转移率分别为 82.78% (RSD 2.76%), 88.63% (RSD 1.43%), 89.75% (RSD 2.52%), 59.91% (RSD 1.97%)。**结论:** 中空纤维超滤膜可选择性地用于药液的精制, 可提高葛根芩连提取液有效成分的保留率。

**[关键词]** 中空纤维超滤膜; 超滤工艺; 葛根素; 黄芩苷; 盐酸小檗碱; 甘草酸铵

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0019-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070019

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000014.html>

**[网络出版时间]** 2014-01-21 9:11

## Optimization of Ultrafiltration Purification Technology of Gegen Qinlian Extract

SHI Xiao-wei, LIU Wen\*, CHEN Da-ye, ZHANG Shi-yu

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrafiltration purification technology parameters of Gegen Qinlian extract. **Method:** With composite score of transfer rates of puerarin, baicalin, berberine hydrochloride and ammonium glycyrrhetate as index, orthogonal test was adopted to optimize purification technology of Gegen Qinlian extract by taking ultrafiltration pressure, liquid temperature and solvent amount as factors. **Result:** Hollow-fiber membrane with 5000 relative molecular weight had better separation efficiency as others, optimum ultrafiltration technology parameters were as follow: ultrafiltration pressure 0.025 MPa, liquid temperature 40 ℃, 2 times the amount of solvent; Transfer rates of puerarin, baicalin, berberine hydrochloride and ammonium glycyrrhetate were 82.78% (RSD 2.76%), 88.63% (RSD 1.43%), 89.75% (RSD 2.52%), 59.91% (RSD 1.97%). **Conclusion:** Hollow-fiber membrane could be selectively used in purification of liquid, it could increase retention rate of active ingredient in Gegen Qinlian extract.

**[Key words]** hollow fiber membrane; ultrafiltration process; puerarin; baicalin; berberine hydrochloride; ammonium glycyrrhizinate

**[收稿日期]** 20130725(001)

**[基金项目]** 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项[黔科合人字(2011)28号]; 贵阳中医学院研究生教育创新计划(ZYYCX110414)

**[第一作者]** 施晓伟, 在读硕士, 从事药物制剂研究, Tel: 13628511020, E-mail: sxw2088@qq.com

**[通讯作者]** \* 刘文, 硕士生导师, 从事药物制剂研究, Tel: 13984416258, E-mail: liuwen12658@sina.com

葛根芩连汤为《伤寒论》中经典方<sup>[1]</sup>, 由葛根、黄芩、黄连、甘草组成, 具有清里泄热、止泻止痢等功效, 临床用于治疗溃疡性结肠炎<sup>[2]</sup> 疗效显著。该方提取物中主要活性成分为黄酮类、生物碱类等, 包括葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸等。该方的纯化工艺多采用醇沉法和离心法, 纯化程度不高、有效成分损失较大。本实验采用超滤法纯化葛根芩连提

取液,可提高有效成分的转移率,并可使提取物的出膏率降至 16.28%,制剂后可有效降低单次服用量,增加患者顺应性,且无环境污染,为超滤纯化工艺代替传统除杂方法提供实验依据。

### 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(HT-20 型柱温箱,SPD-20A 型紫外-可见光检测器)和 Auy 220 型电子天平(日本岛津)。葛根、黄芩、甘草购自北京同仁堂,黄连购自贵阳济仁堂,经贵阳中医学院孙庆文教授鉴定分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根,唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎,毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎;中空纤维膜组件(0.45  $\mu\text{m}$  微滤膜,分子截流量 5 000,1 万,2 万,北京旭邦膜组件有限公司),葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110752-200912,110715-201117,110713-200911,110731-2011116),乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

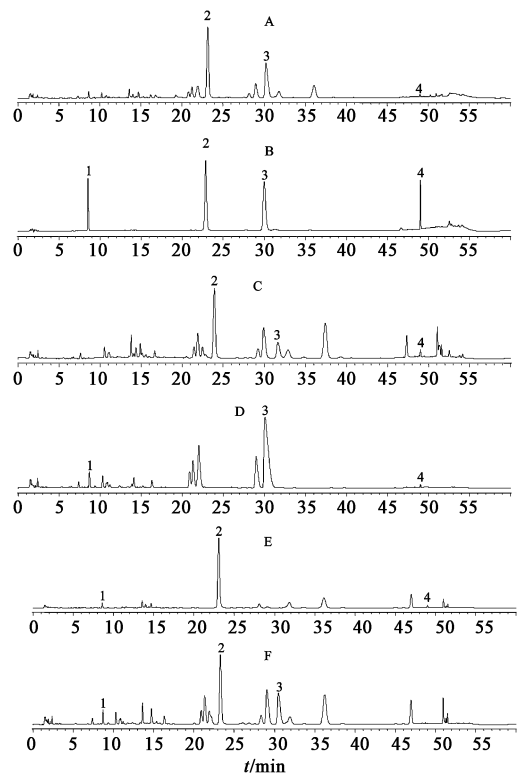
### 2 方法和结果

#### 2.1 含量测定

**2.1.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  15 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸二氢钾溶液(含 0.05% 磷酸,B)梯度洗脱(0 ~ 10 min,10% ~ 20% A;10 ~ 25 min,20% A;25 ~ 30 min,20% ~ 29% A;30 ~ 40 min,29% A;40 ~ 42 min,29% ~ 31% A;42 ~ 45 min,31% ~ 60% A;45 ~ 52 min,10% A),流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,检测波长 270 nm,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 2.5  $\mu\text{L}$ ,见图 1。

**2.1.2 对照品溶液制备** 精密称取葛根素对照品 1.16 mg,置 10 mL 量瓶中,用 30% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;精密称取于 60  $^{\circ}\text{C}$  减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品 9.8 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;精密称取盐酸小檗碱对照品 3.06 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;精密称取甘草酸铵对照品 1.50 mg,置 10 mL 量瓶中,用 70% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密称取过 80 目筛的葛根约 2.5 g,黄芩、黄连各约 1.5 g,过 20 目筛的甘草 1 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加水 100 mL,超声 40 min,静置放冷,取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,即得。



A. 供试品;B. 对照品;C. 缺葛根阴性样品;  
D. 缺黄芩阴性样品;E. 缺黄连阴性样品;F. 缺甘草阴性样品;  
1. 葛根素;2. 黄芩苷;3. 盐酸小檗碱;4. 甘草酸铵

图 1 葛根连提取物 HPLC

**2.1.4 标准曲线的制备** 依次精密吸取葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵对照品溶液 200,4 000,200,1 000  $\mu\text{L}$  配成混合对照品溶液。精密吸取该混合液适量,置于 1 mL 量瓶中,加 50% 甲醇制成 5 个质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得回归方程依次为  $Y = 53\ 409X + 7\ 583$  ( $r = 0.999\ 9$ ),  $Y = 36\ 130X - 57\ 573$  ( $r = 0.999\ 8$ ),  $Y = 25\ 998X - 118.6$  ( $r = 0.999\ 9$ ),  $Y = 13\ 705X + 2\ 018$  ( $r = 0.999\ 8$ ),线性范围分别为 0.429 6 ~ 4.296, 72.59 ~ 725.9, 1.133 ~ 11.33, 2.778 ~ 27.78  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,结果葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 1.54%, 2.16%, 2.75%, 2.84%,表明仪器精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 2.17%, 1.97%, 2.13%, 1.00%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.1.7 重复性试验** 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,分别按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵平均提取量分别为 1.99,29.94,8.84,4.67 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 分别为 1.78%,2.04%,1.40%,2.62%,表明该方法重复性

良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 精密称取已知含量的供试品 6 份,分别精密加入对照品适量,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果见表 1。

表 1 葛根芩连汤中 4 种有效成分的加样回收率试验

药材	No.	取样量/g	样品中质量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
葛根	1	0.752 8	1.497 6	1.491 5	2.962 7	98.23	100.51	1.45
	2	0.752 4	1.496 8	1.491 5	2.994 2	100.39		
	3	0.752 2	1.496 4	1.491 5	2.998 2	100.89		
	4	0.752 4	1.496 8	1.491 5	3.007 4	101.41		
	5	0.752 7	1.497 4	1.491 5	3.027 9	102.75		
	6	0.752 3	1.496 7	1.491 5	2.986 0	100.05		
黄芩	1	0.081 7	2.445 8	2.491 3	5.013 7	103.07	100.64	2.47
	2	0.082 7	2.474 2	2.491 3	5.005 9	101.62		
	3	0.083 7	2.505 6	2.491 3	4.999 1	100.08		
	4	0.083 2	2.489 2	2.491 3	4.901 7	96.84		
	5	0.081 6	2.441 3	2.491 3	5.013 2	103.23		
	6	0.081 7	2.445 8	2.491 3	4.912 6	99.01		
黄连	1	0.652 8	5.770 9	5.903 0	11.545 5	95.66	99.25	1.85
	2	0.682 3	6.031 7	5.903 0	12.025 7	103.04		
	3	0.688 9	6.090 0	5.903 0	11.957 1	102.38		
	4	0.668 0	5.905 3	5.903 0	11.742 2	98.58		
	5	0.681 6	6.025 5	5.903 0	11.739 3	98.29		
	6	0.686 7	6.070 6	5.903 0	12.038 2	102.36		
甘草	1	0.601 4	2.811 1	2.731 9	5.601 3	102.13	99.63	2.59
	2	0.602 2	2.814 9	2.731 9	5.613 6	102.44		
	3	0.571 3	2.670 4	2.731 9	5.314 4	96.78		
	4	0.603 5	2.820 9	2.731 9	5.574 0	100.77		
	5	0.570 4	2.666 2	2.731 9	5.375 3	99.16		
	6	0.570 1	2.664 8	2.731 9	5.301 8	96.52		

**2.1.9 样品测定** 称取 3 批样品,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果见表 2。

表 2 葛根芩连汤中 4 种有效成分的含量测定 mg·g<sup>-1</sup>

批号	葛根素	黄芩苷	盐酸小檗碱	甘草酸
1	2.10	31.01	8.89	4.75
2	1.99	29.69	8.97	4.63
3	2.03	30.45	8.56	4.65

**2.2 不同膜孔径对超滤工艺的影响** 取葛根 10 g,黄芩 6 g,黄连 6 g,甘草 4 g,加 8 倍量 50% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,稀释至 450 mL,均

分成 3 组,每组 3 份,每份 50 mL,于 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别用截留相对分子质量 5 000,1 万,2 万的超滤膜超滤,收集超滤液,减压浓缩,制备干浸膏,计算平均出膏率分别为 17.89%,28.42%,40.11%,RSD 均 < 5%,故选择截留相对分子质量 5 000 的超滤膜。

**2.3 超滤工艺优选** 在预试验基础上,选取料液温度、超滤压力及溶剂倍数为考察因素,葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵转移率的综合评分为指标,复方中葛根、黄芩、黄连和甘草处方比例为 5:3:3:2,故拟定权重系数分别为 0.384 6,0.230 8,0.230 8,0.153 8,按处方比例称取各药味(葛根 30 g,黄芩

18 g, 黄连 18 g, 甘草 12 g), 按 2.2 项下方法提取, 提取液稀释至 1 800 mL, 均分为 9 份, 每份 200 mL, 按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验, 不断加适量 50% 乙醇溶液超滤<sup>[3-4]</sup>, 收集滤液, 转移至 1 L 量瓶中, 加 50% 乙醇定容, 摇匀, 备用。因素水平见表 3, 试验安排及结果见表 4, 方差分析见表 5。

表 3 葛根芩连提取液超滤工艺正交试验因素水平

水平	A 超滤压力/MPa	B 溶剂用量/倍	C 温度/℃
1	0.025	1.0	30
2	0.05	1.5	40
3	0.075	2.0	50

表 4 葛根芩连提取液超滤工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	转移率/%				综合评分
					葛根素	黄芩苷	盐酸小檗碱	甘草酸	
1	1	1	1	1	0.608 2	0.613 7	0.550 2	0.220 3	0.536 5
2	1	2	2	2	0.684 1	1.057 7	1.190 8	1.027 5	0.940 1
3	1	3	3	3	0.713 0	0.989 2	1.253 3	1.016 9	0.948 2
4	2	1	2	3	0.494 6	0.607 0	0.636 6	1.297 6	0.676 8
5	2	2	3	1	0.628 2	0.909 9	0.921 9	0.881 0	0.799 9
6	2	3	1	2	0.656 8	0.927 5	0.944 1	0.982 9	0.835 7
7	3	1	3	2	0.540 6	0.556 0	0.552 1	0.426 5	0.529 3
8	3	2	1	3	0.530 4	0.858 4	1.008 1	0.529 5	0.716 2
9	3	3	2	1	0.608 7	1.106 1	1.072 5	0.731 1	0.849 4
$K_1$	0.808	0.581	0.696	0.729					
$K_2$	0.771	0.819	0.822	0.768					
$K_3$	0.698	0.878	0.759	0.780					
R	0.110	0.297	0.126	0.051					

表 5 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.019	2	4.57	>0.05
B	0.148	2	37.00	<0.05
C	0.024	2	6.00	>0.05
D(误差)	0.004	2	1.00	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

由直观分析可知, 各因素对综合评分的影响顺序为  $B > C > A$ 。方差分析表明 B 因素对葛根芩连提取物中有效成分转移率具有显著差异, A, C 因素则无显著差异, 确定最佳超滤工艺为  $A_1B_3C_2$ , 即超滤压力 0.025 MPa, 溶剂用量 2 倍, 药液温度 40 ℃。  
**2.4 验证试验** 取葛根芩连提取液 3 份, 每份等分为 2 组, 一组直接制备干浸膏; 另一组按最佳工艺参数进行超滤, 收集超滤液, 减压浓缩, 制备干浸膏; 分别按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果超滤前平均出膏率为 26.56% (RSD 1.78%), 超滤后平均出膏率 16.28% (RSD 2.39%), 葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵的转移率分别为 82.78% (RSD 2.76%), 88.63% (RSD 1.43%), 89.75% (RSD 2.52%), 59.91% (RSD 1.97%)。

### 3 讨论

葛根芩连汤中存在较多大分子杂质, 主要为淀

粉、纤维素、果胶等, 相对分子质量从数千至数万不等, 而主要有效成分如葛根素、黄芩苷等多为小分子物质, 故采用超滤法可将相对分子质量较大的杂质除去, 进而提高有效成分含量。

由于药液杂质较多, 大分子物质沉积于膜表面, 使膜孔堵塞, 膜通量下降, 故在超滤前先将药液离心, 再通过 0.45 μm 微孔滤膜进行预处理, 以除去药液中悬浮颗粒和大分子杂质。在超滤过程中, 由于膜表面杂质的沉积, 使膜通量降低, 保持相对较低的超滤压力, 可保持膜通量, 较大超滤压力虽然可以提高膜通量, 但随着超滤的进行, 膜表面杂质沉积严重, 反而使小分子物质不易滤出。

### [参考文献]

- [1] 张仲景. 伤寒论. 第 7 卷[M]. 北京: 中国古籍出版社, 1997: 23.
- [2] 王家华. 葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎的疗效观察[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(22): 3462.
- [3] 王群, 刘文, 宋信莉, 等. 黄连提取液超滤纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 34.
- [4] 崔健, 张英华, 陈新. 超滤技术与醇沉法在金钱草总黄酮纯化工艺中的比较研究[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(6): 595.

[责任编辑 仝燕]