

丹桃颗粒提取液的除杂工艺优选

吴建军¹, 刘新^{1*}, 陈犁²

(1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400042; 2. 重庆市希尔安药业有限公司, 重庆 401520)

[摘要] **目的:** 优选丹桃颗粒的壳聚糖絮凝剂澄清工艺, 并与乙醇沉淀法、离心法进行比较。**方法:** 以水浸出物收率、苦杏仁苷及芍药苷保留率为综合评价指标, 选择壳聚糖加入量、絮凝时药液温度、药液 pH 为考察因素, 通过正交试验优选丹桃颗粒的壳聚糖絮凝剂澄清工艺, 并与乙醇沉淀法和离心法进行比较, 确定最佳除杂工艺。**结果:** 优选的壳聚糖絮凝剂澄清工艺为加入 10% 药液量的 1% 壳聚糖澄清剂, 药液 pH 6.0, 50 °C 保温; 苦杏仁苷、芍药苷保留率均 > 89%, 水浸出固形物量约下降 19%, 整体优于乙醇沉淀法和离心法。**结论:** 壳聚糖絮凝剂澄清法可作为丹桃颗粒提取液的除杂工艺, 该工艺合理可行、稳定可靠, 符合工业化生产要求。

[关键词] 丹桃颗粒; 除杂工艺; 壳聚糖; 正交试验; 多指标加权综合评价法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0036-04

[doi] 10.11653/syfy2013230036

Optimization of Clarification Process of Dantao Granules

WU Jian-jun¹, LIU Xin^{1*}, CHEN Li²

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400042, China;
2. Chongqing Hilan Pharmaceutical Co. Ltd, Chongqing 401520, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize chitosan flocculant clarification process of Dantao granules and compare with ethanol precipitation method and centrifugation method. **Method:** With yield of water extract, retention rates of amygdalin and paeoniflorin as comprehensive evaluation index, orthogonal test was adopted to optimize chitosan flocculant clarification process of Dantao granules with chitosan dosage, flocculation liquid temperature and pH of liquid as factors, three clarification processes including ethanal precipitation method, adsorption clarification technique, high-speed centrifugation method were compared with nature sedimentation. **Result:** Optimized chitosan flocculant clarification process was as following: added 10% liquid volume of 1% chitosan, pH of liquid 6.0, flocculation liquid temperature 50 °C; Water extract amount reduced to around 19%, retention rate of amygdalin and paeoniflorin were more than 89%, it was superior to ethanol precipitation method and centrifugation method. **Conclusion:** Chitosan flocculant clarification could be used as clarification process of Dantao granules, and this optimized technique was reasonable, stable and feasible for industrial production.

[Key words] Dantao granules; clarification process; chitosan; orthogonal test; multi-weighted index comprehensive evaluation method

丹桃颗粒由桃仁、牡丹皮、柴胡、蒲公英、忍冬藤、白芍、枳实、甘草共 8 味中药组成, 具有活血化瘀、清解郁热、行气止痛的功效, 临床用于缓解慢性盆腔炎所致的小腹或腰骶疼痛、带下量多等症状。原方以合剂 [WS-5885(B-0885)-2002] 应用于临床, 疗效确切。但合剂携带、运输、贮藏不便, 拟改为颗粒剂, 采用水提取工艺。提取液含有较多的多糖等水溶性大分子无效成分, 使得水提浸膏固形物多, 剂

[收稿日期] 20130618(012)

[基金项目] 国家重大新药创制专项课题(2010zx09401-306-3-11)

[第一作者] 吴建军, 在读硕士, 从事中药制剂方面研究, Tel: 13657653987, E-mail: wjjpharmacy@163.com

[通讯作者] * 刘新, 教授, 从事中药学和临床药学方面研究, Tel: 023-68485161, E-mail: liuxin8829@sina.com

量大,极大影响了制剂成型与患者服用。为减少水提液中杂质,同时又最大限度地保留有效成分,本实验通过正交试验优选水提取液的壳聚糖絮凝剂澄清工艺,并和乙醇沉淀法、离心法进行对比,为丹桃颗粒的临床应用和临床推广提供实验依据。

1 材料

LC-2010AHT型高效液相色谱仪(日本岛津),TDDSM型多管低速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司),CS101-3ABN型电热鼓风干燥箱(重庆永生实验仪器厂),DZF-6050型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),HH-4型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。芍药苷、苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110736-201035,110820-200403),壳聚糖絮凝剂(浙江澳兴生物科技有限公司),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;桃仁 *Prunus persica* (L.) Batsch、牡丹皮 *Paeonia suffruticosa* Andr.、柴胡 *Bupleurum chinense* DC.、蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.、忍冬藤 *Lonicera japonica* Thunb.、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall.、枳实 *Citrus aurantium* L.、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.均由重庆市希尔安药业有限公司提供,由本公司技术中心工程师唐桂英鉴定,均符合2010年版《中国药典》一部相关项下要求。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 称取处方量药材,牡丹皮、枳实、柴胡加15倍量水浸渍2h,蒸馏4h,收取蒸馏液200mL,备用;药渣与桃仁等其余5味(桃仁煮沸后下)加8倍量水煎煮3次,每次1h,合并煎液,提取液浓缩至生药质量浓度 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,备用。取样品液适量,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 水浸出物收率的测定^[1] 精密吸取样品液25mL,照干燥失重法(《中国药典》2010年版一部附录IX G)测定,计算水浸出物(干膏)收率34.29%。

2.3 苦杏仁苷保留率的测定^[1]

2.3.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相甲醇-水(20:80),检测波长210nm,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。理论塔板数按苦杏仁苷峰计算不低于3000。

2.3.2 对照品溶液的制备 取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成每1mL含苦杏仁苷 $487\text{ }\mu\text{g}$ 的溶液,即得。

2.3.3 线性关系 精密吸取苦杏仁苷对照品溶液

1.0,2.0,3.0,4.0,5.0mL,分别置于10mL量瓶中,分别加70%甲醇定容至刻度,摇匀,按2.3.1项下方法测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 9.245 \times 10^7 X - 1.347 \times 10^5$ ($r = 0.9997$),表明苦杏仁苷在 $48.7 \sim 243.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.3.4 样品测定 精密吸取供试品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$,按2.3.1项下色谱条件进样,测得苦杏仁苷提取量 $386.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n = 3$),以自然沉降法澄清液中苦杏仁苷含量为100%计,计算样品液中苦杏仁苷保留率。

2.4 芍药苷保留率的测定^[1]

2.4.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86),检测波长230nm。理论塔板数按芍药苷峰计算应不低于2000。

2.4.2 对照品溶液的制备 取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成芍药苷质量浓度 $380\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,即得。

2.4.3 标准曲线的绘制 分别精密吸取芍药苷对照品溶液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0mL于10mL量瓶中,各加甲醇定容至刻度,摇匀,各精密吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 按2.4.1项下色谱条件进样,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.025 \times 10^7 X + 2.224 \times 10^4$ ($r = 0.9996$),表明芍药苷在 $38 \sim 190\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.4.4 样品测定 精密吸取供试品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$,按2.4.1项下色谱条件进样,测得芍药苷提取量 $191.7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n = 3$),以自然沉降法澄清液中芍药苷含量为100%计,计算芍药苷保留率。

2.5 壳聚糖絮凝剂的制备 称取壳聚糖1g,加入1%乙酸溶液60mL,浸渍2h,快速搅拌使溶解,加相同溶剂稀释至100mL,静置24h,配成1%壳聚糖胶体溶液,备用。

2.6 壳聚糖絮凝工艺优选 在预试验基础上,选择壳聚糖加入量、絮凝时药液温度、药液pH为考察因素,以水浸出物收率及苦杏仁苷、芍药苷保留率为综合考察指标,将每个指标均化为0~1的归一值(d)按权重系数(γ)进行加权求和^[2-3],得总评价值(OD),即 $OD = d_1\gamma_1 + d_2\gamma_2 + \dots + d_n\gamma_n$ (n 为指标数), $\gamma_1 + \gamma_2 + \dots + \gamma_n = 1$,根据各指标对壳聚糖除杂工艺影响的大小,设定水浸出物收率、苦杏仁苷保留率、芍药苷保留率的权重系数分别为0.4,0.3,0.3。精密量取提取液9份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,调pH至

一定值,于磁力搅拌器上加热恒温至一定温度,在搅拌下加入一定量 1% 壳聚糖溶液,搅拌 10 min,静置一定时间后,用 120 目滤布双层滤过,得絮凝澄清液,测定,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 丹桃颗粒壳聚糖絮凝剂澄清工艺正交试验因素水平

水平	A 壳聚糖用量/%	B 絮凝时药液温度/℃	C 药液 pH
1	5	30	5
2	10	40	6
3	15	50	7

表 2 丹桃颗粒壳聚糖絮凝剂澄清工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	水浸膏提取物收率/%	苦杏仁苷保留率/%	芍药苷保留率/%	OD
1	1	1	1	1	28.46	76.99	70.49	0.75
2	1	2	2	2	26.81	83.77	85.15	0.83
3	1	3	3	3	26.54	68.65	65.87	0.72
4	2	1	2	3	20.42	80.21	81.22	0.89
5	2	2	3	1	24.82	89.63	84.69	0.87
6	2	3	1	2	18.37	67.93	91.37	0.93
7	3	1	3	2	28.34	65.07	70.84	0.70
8	3	2	1	3	23.13	74.03	75.74	0.81
9	3	3	2	1	22.58	84.16	85.15	0.89
K_1	2.30	2.34	2.49	2.51				
K_2	2.69	2.51	2.61	2.46				
K_3	2.41	2.54	2.29	2.42				
R	0.39	0.20	0.32	0.09				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.027	2	27	<0.05
B	0.008	2	8	>0.05
C	0.017	2	17	>0.05
D(误差)	0.003	2		

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

由直观分析可知,各因素对壳聚糖絮凝剂澄清工艺的影响顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明因素 A 对澄清工艺的影响显著,因素 B, C 则对澄清工艺无显著影响,综合考虑,确定最佳壳聚糖絮凝工艺为

$A_2B_3C_2$,即壳聚糖加入量 10%,反应温度 50℃,反应液 pH 6.0。按最佳工艺进行 3 次验证试验,结果苦杏仁苷保留率分别为 90.48%, 88.29%, 89.23%,芍药苷保留率分别为 88.58%, 90.14%, 88.91%,水浸出物收率分别为 18.27%, 19.37%, 19.44%,表明该方法稳定可靠、重复性好。

2.7 澄清方法比较

2.7.1 乙醇沉淀法 取提取液 5 份,分别加 95% 乙醇醇沉至乙醇体积分数 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,搅匀,静置 24 h,抽滤,取滤液,用相应体积分数的乙醇定容,测定各指标含量,结果见表 4。

表 4 丹桃颗粒的不同澄清工艺比较

No.	澄清方法	苦杏仁苷提取量	苦杏仁苷保留率	芍药苷提取量	芍药苷保留率	水浸出物收率	
		$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	%	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	%	%	
1	自然沉降法	386.5	100	191.7	100	34.29	
2	乙醇沉淀	50%	304.1	78.67	169.2	88.26	24.73
		60%	291.4	75.41	159.1	82.09	22.91
		70%	267.4	69.21	141.5	73.83	21.45
		80%	239.1	61.88	126.9	66.23	18.22
		90%	180.6	46.73	116.1	60.57	17.65
3	离心法	353.1	91.38	177.6	92.65	29.12	
4	壳聚糖澄清	345.2	89.33	171.1	89.21	19.03	

2.7.2 离心法 取提取液适量,于 2 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,滤过,取续滤液,测定各指标含量,结果见表 4。

3 讨论

壳聚糖作为中药药液及其制剂的理想澄清剂,具有良好的生物学可溶性、安全无毒、制备简单、成本低等优势;既能除去杂质,保证药液和制剂的稳定

大孔树脂分离纯化楮叶总黄酮的工艺优选

潘晓微^{1,2}, 黄一平^{2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210028;
2. 江苏省中医药研究院国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 南京 210028)

[摘要] 目的: 优选楮叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺。方法: 以楮叶总黄酮为指标, 通过大孔树脂静态吸附和动态吸附试验筛选树脂型号, 通过单因素试验考察上样液质量浓度、洗脱剂用量、洗脱流速等因素对纯化工艺的影响。结果: HPD450 型大孔树脂分离效果最好, 其最佳工艺参数为上样液质量浓度 $4.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 径高比 1:8, 上样量 6 BV, 吸附速度 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 加 5 BV 水洗除杂, 用 50% 乙醇 8 BV 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱。总黄酮纯度由精制前的 30.65% 提高至 75.75%, 总黄酮保留率达 79.89%, 除杂率达 64.88%。结论: HPD450 型大孔树脂纯化楮叶总黄酮的效果良好, 且工艺合理稳定, 可推广于工业生产中应用。

[关键词] 大孔树脂; 楮叶; 总黄酮; 吸附; 分离纯化工艺; 单因素试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0039-04

[doi] 10.11653/syfy2013230039

Optimization of Separation and Purification Technology for Total Flavonoids from Leaves of *Broussonetia Papyrifera* by Macroporous Resin

PAN Xiao-wei^{1,2}, HUANG Yi-ping^{2*}

[收稿日期] 20130603(008)

[基金项目] 康缘中医药科技创新基金项目(HZ1015KY)

[第一作者] 潘晓微, 在读硕士, 从事中药质量标准与制剂工艺研究, Tel:025-85637809, E-mail:panxiaowei.1990@163.com

[通讯作者] * 黄一平, 研究员, 硕士生导师, 从事中药质量标准与制剂工艺研究, Tel:025-85637809, E-mail:yiping@163.com

性, 又能保留有效成分, 缩短生产周期, 避免了传统乙醇沉淀法成本高、流程长等弊端, 且已有学者证明了壳聚糖絮凝沉降法对药液中高分子物质、多糖及可溶性固形物的保留效果优于乙醇沉淀法^[5]。试验中仅选取处方中芍药苷和苦杏仁苷为考察指标, 未对其他成分如牡丹皮中丹皮酚、枳实中辛弗林等进行研究, 主要原因是经过减压浓缩后丹皮酚和辛弗林损失率较高^[6]。

不同药材及其处方需进行针对性研究。由表 4 可知, 90% 乙醇虽可使水浸出物收率降至 17.65% (表 4), 但苦杏仁苷和芍药苷保留率降低太多; 离心法虽可使 2 种有效成分保留率较高, 但水浸出物收率未受较大影响; 采用壳聚糖絮凝剂吸附澄清技术可使水浸出物收率降至 19.03%, 又可使苦杏仁苷和芍药苷具备较高保留率, 且该方法稳定性、重复性较好, 且操作简单、成本较低, 综合考虑, 可将壳聚糖絮凝剂澄清技术作为丹桃颗粒的澄清工艺。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 62, 96.
- [2] 陶菊春, 吴建民. 综合加权评分法的综合权重确定新探[J]. 系统工程理论与实践, 2001, 8(8): 43.
- [3] 魏效玲, 赵立新, 任建华. 多指标试验设计综合加权评分值的确定[J]. 河北建筑科技学院学报, 2003, 20(4): 68.
- [4] 祝连彩, 王伯初. 壳聚糖在中药药液澄清中的应用[J]. 重庆大学学报, 2003, 26(12): 55.
- [5] 陈以新, 盛华刚, 林桂涛, 等. 壳聚糖絮凝沉降法与乙醇沉淀法对二冬汤精制的对比研究[J]. 中成药, 2011, 33(4): 612.
- [6] 孙运从, 林桂涛, 盛华刚, 等. 壳聚糖絮凝沉降法与乙醇沉淀法对炙甘草汤的纯化效果的比较[J]. 中成药, 2011, 33(1): 173.

[责任编辑 仝燕]