

黄连提取液超滤纯化工艺优选

王群, 刘文*, 宋信莉, 陈大业, 杨颂
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 优选黄连提取液的超滤纯化工艺参数。方法: 以出膏率及盐酸小檗碱、巴马汀、黄连碱及表小檗碱含量为指标, 通过单因素试验考察截留相对分子质量分别为 5 000, 10 000, 20 000 的中空纤维膜对黄连提取液超滤工艺的影响; 选取料液温度、料液质量浓度及进样流速为考察因素, 以指标成分的综合含量和转移率的综合评分为指标, 采用正交试验优选黄连提取液的超滤工艺参数。结果: 截留相对分子质量为 5 000 的中空纤维超滤膜分离效果较好, 其最佳超滤工艺参数为料液温度 40 ℃, 体积流量 40 mL·min⁻¹, 药液质量浓度 25 g·L⁻¹。结论: 中空纤维超滤膜可选择性地用于药液的精制, 可提高有效成分的保留率。

[关键词] 中空纤维超滤膜; 超滤; 盐酸小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 表小檗碱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0034-04

Optimization of Ultrafiltration Purification Technology of *Coptis chinensis* Extract

WANG Qun, LIU Wen*, SONG Xin-li, CHEN Da-ye, YANG Song
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrafiltration purification technology parameters of *Coptis chinensis* extract. **Method:** With extract rate, the content of berberine hydrochloride, coptisine, palmatine and

[收稿日期] 20120920(001)

[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合中药[2010]5016)

[第一作者] 王群, 硕士, 从事中药新制剂及新技术研究, Tel: 13765819280, E-mail: 945431270@qq.com

[通讯作者] * 刘文, 硕士生导师, 教授, 从事中药新制剂及新技术研究, Tel: 13984416258, E-mail: liuwen16258@sina.com

药的临床症候, 结合方中药物的药效药理相关研究文献资料, 以药物对干酵母菌导致的发热大鼠的解热效果为指标, 筛选提取溶媒, 研究结果表明本方提取液及阳性对照组对造模动物体温均有显著降低作用, 但两者无显著差异性, 说明本方提取液解热效果与阳性对照药双黄连相当。试验结果表明采用水和乙醇为溶媒, 两者提取液的解热效果无显著性差异, 考虑工业化生产实际, 确定采用水为提取溶媒。

正交试验结果选用了加 12 倍量水, 即最大水平, 主要考虑方中药材大多为根茎类药材, 加水量达到 12 倍已能很好浸没药材, 基于工业化生产耗能问题, 未进一步考察 > 12 倍量的水平, 但通过验证试验表明优化的提取工艺稳定、可行、重复性好。

[参考文献]

[1] 张曦, 李宏, 候茂君, 等. 黄芩及其有效成分的药理学

研究进展[J]. 天津药学, 2000, 12(4): 8.

[2] 史跃杰. 黄芩黄连水煎剂对厌氧菌的体外抑菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 226.

[3] 曾超珍, 刘志祥, 韩磊. 黄芩总黄酮提取技术及其抑菌活性研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1342.

[4] 叶定江. 中药炮制学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 236.

[5] 李韦, 杨伟鹏, 梁日欣, 等. 栽培黄芩和野生黄芩抗炎、解热和免疫作用比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 29.

[6] 肖培根. 新编中药志. 第 1 卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 784.

[7] 韩会玲, 宋小妹, 张选军. 黄芩苷提取工艺的改进[J]. 陕西中医学院学报, 1997, 20(4): 35.

[责任编辑 全燕]

epiberberine as indexes, influence of hollow-fiber membranes with relative molecular weight 5 000, 10 000 and 20 000 on ultrafiltration purification technology of *C. chinensis* extract was investigated by single factor test; Temperature and concentration of sample liquid, sample flow rate were chosen as factors, orthogonal test was used to optimize ultrafiltration purification technology parameters of *C. chinensis* extract with composite score of integrated content and transfer rate of index components as an indicator. **Result:** Hollow-fiber membrane with 5 000 relative molecular weight had better separation efficiency as others, optimum ultrafiltration technology parameters were as followings: liquid temperature 40 °C, liquid speed 40 mL·min⁻¹, liquid concentration 25 g·L⁻¹. **Conclusion:** Hollow-fiber membrane could be selectively used in purification of liquid, it could increase retention rate of active ingredient.

[**Key words**] hollow fiber membrane; ultrafiltration; berberine hydrochloride; coptisine; palmatine; epiberberine

黄连中主要活性成分为生物碱类,包括小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱和药根碱等。现代药理研究表明,黄连具有抗菌、抗病毒作用,对幽门螺旋杆菌和痢疾杆菌有较强的杀灭作用,能抑制胃酸分泌,具有抗消化性溃疡作用^[1-2]。目前,黄连纯化工艺多采用离心过滤法和醇沉法,但这2种方法均存在纯化程度不高、有效成分损失大的缺点。本实验采用超滤法纯化黄连提取液,可提高有效成分的保留率,制成制剂后可有效地降低单次服用量,增加患者的顺应性,且无环境污染,为滤超纯化代替传统醇沉法提供实验依据。

1 材料

LC-20A型液相色谱仪和Auy220型电子天平(日本岛津),DZ-28C型真空干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司),300-BS-11型电热恒温干燥箱(上海市仪器总厂),中空纤维膜组件(0.45 μm微滤膜,分子截留量分别为5 000,10 000,20 000,北京旭邦膜组件有限公司)。

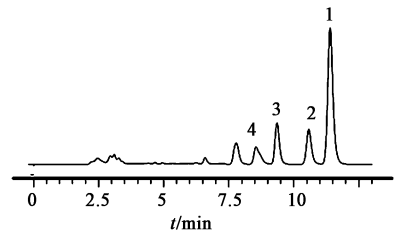
盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号110728-200928),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,黄连购于贵阳市同仁堂药店,经贵阳中医学院周汉华教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎。

2 方法及结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Thermo-ODS2-Hypersil 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),参照2010年版《中国药典》黄连项下含量测定色谱条件。流动相乙腈-50 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(每100 mL中加十二烷基硫酸钠0.4 g,磷酸调节pH 4.0)(50:50),检测波长345 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30 °C,理论板数盐酸小檗碱峰计应不低于5 000,见图1。根据

2010年版《中国药典》规定,表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的峰位相对保留时间分别为0.71,0.78,0.91,1,以盐酸小檗碱峰位即可确定其他有效成分的峰位。



1. 表小檗碱;2. 黄连碱;3. 巴马汀;4. 盐酸小檗碱

图1 黄连 HPLC

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,置10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,配成116.52 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 标准曲线的制备 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液1,2,4,6,8,10 mL,分别置于10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,按上述色谱条件进行测定,以峰面积积分为纵坐标,进样量为横坐标,得标准曲线 $Y = 2 \times 10^5 X - 0.033 8$ ($r = 0.999 6$),线性范围11.652 ~ 116.52 mg·L⁻¹。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称量精制后干浸膏0.05 g,精密加入盐酸-甲醇(1:100)溶液50 mL,超声30 min使溶解,冷却,补足减失的质量。精密量取续滤液2 mL置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2 超滤工艺 取黄连药材100 g,加12倍量50%乙醇回流提取3次,每次90 min,合并提取液,过滤,离心,减压蒸馏至无醇味,得药液原料液,加水定容至1 000 mL,备用(每1 mL药液相当于生药量0.1 g),得超滤前药液,用水将药液稀释至所需浓度,经

0.45 μm 膜微滤过,超滤,收集超滤液约 1/2 时,加适量水,再进行收集,至超滤液体积为原提取液体积的 2 倍为止^[3],减压浓缩,干燥,制备干浸膏。(盐酸小檗碱、黄连碱、巴马汀及表小檗碱的转移率分别为 88.75% ,70.71% ,95.21% ,78.53%)。

2.3 不同膜孔径对超滤工艺的影响 取 2.2 项下超滤前药液 450 mL,加水稀释至 1 800 mL,即得质量浓度 25 g·L⁻¹ 的药液,均分成 9 份,每份药液 200 mL,分 3 组,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别用截留相对分子质量 5 000,10 000,20 000 的超滤膜超滤,收集超滤液,减压浓缩,制备干浸膏。考察不同截留

表 2 不同膜孔径对黄连超滤工艺的影响 SPSS 分析

变量	(I) 组别	(J) 组别	MS (I-J)	SS	P	95% 置信区间	
						下限	上限
出膏率	1	2	-2.570	0.591	0.005	-4.016	-1.124
	1	3	-6.743	0.591	0.000	-8.189	-5.297
	2	3	4.173	0.591	0.000	2.727	5.619
综合含量	1	2	5.470	0.322	0.000	4.681	6.259
	1	3	-5.613	0.322	0.000	-6.402	-4.824
	2	3	0.143	0.322	0.672	-0.646	0.932

由表 2 可知,各组间出膏率均有差异;精制后 1 组和 2,3 组的综合质量分数有显著差异,而 2 组和 3 组间无差异。随着超滤膜截留相对分子质量的增大,超滤膜固体杂质截留能力逐渐降低,出膏率逐渐增大,指标成分在精制后,在样品中的质量分数逐渐降低,故选择截留相对分子质量 5 000 的超滤膜。

2.4 正交试验优选 在预试验基础上,选取料液温度、料液浓度及体积流量为考察因素,以指标成分的综合质量分数和综合转移率的综合评分为指标,采用正交试验优选黄连超滤工艺。综合质量分数 = 盐酸小檗碱含量 × 70% + 黄连碱含量 × 10% + 表小檗碱含量 × 10% + 巴马汀含量 × 10%;综合转移率 = 盐酸小檗碱 × 70% + 黄连碱 × 10% + 表小檗碱 × 10% + 巴马汀 × 10%;综合评分 = (综合质量分数 + 综合转移率)/2。因素水平见表 3,试验安排及结果见表 4,方差分析见表 5。

由直观分析可知,各因素对综合评分的影响顺序 B > C > A;方差分析表明 B 因素对黄连指标成分精制后的质量分数及转移率均有显著性影响,A,C 因素则无显著性差异,确定黄连超滤最佳工艺为 A₃B₂C₃,即黄连药液质量浓度 25 g·L⁻¹,药液温度 40 ℃,进样流速 40 mL·min⁻¹。

2.5 验证试验 取 3 批黄连药材,按 2.2 项下方法

相对分子质量对黄连精制后出膏率及盐酸小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱含量的影响,结果见表 1,SPSS 分析见表 2。

表 1 不同截留相对分子质量膜孔径对黄连出膏率及精制后指标成分的影响

孔径 /K	出膏率 /%	盐酸小檗碱 /mg·g ⁻¹	巴马汀 /mg·g ⁻¹	黄连碱 /mg·g ⁻¹	表小檗碱 /mg·g ⁻¹
5	18.54	233.1	62.8	32.9	24.0
10	21.11	161.1	38.6	22.8	15.2
20	25.29	159.8	34.1	24.4	12.8

表 3 黄连提取液超滤纯化工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C
	料液温度 /℃	料液质量浓度 /g·L ⁻¹	体积流量 /mL·min ⁻¹
1	15	10	35
2	25	25	38
3	40	40	40

制备原料液,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,按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液,分别制备原药液样品和超滤液样品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进行 HPLC 分析。结果以 3 批黄连药材平均值计,超滤前出膏率 26.06% (RSD 1.07%),盐酸小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱质量分数分别为 235.9% (RSD 1.21%),51.1 (RSD 1.01%),48.9 (RSD 1.12%),25.4 (RSD 1.09%) mg·g⁻¹;超滤后出膏率 15.33% (RSD 1.03%),盐酸小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱质量分数分别为 324.1 (RSD 1.15%),59.5 (RSD 1.23%),34.7 (RSD 1.13%),21.9 (RSD 1.07%) mg·g⁻¹。

3 讨论

收集完膜滤液后,由于膜的污染导致膜通量下

表4 黄连提取液超滤纯化工艺正交试验安排

%

No.	A	B	C	D	转移率					综合质量 分数	综合 评分
					盐酸小檗碱	巴马汀转移	黄连碱	表小碱	综合		
1	1	1	1	1	48.79	49.06	41.28	43.04	47.50	11.84	26.13
2	1	2	2	2	72.59	74.19	48.98	57.60	68.89	18.01	34.60
3	1	3	3	3	62.95	63.99	38.07	46.09	58.88	17.64	33.56
4	2	1	2	3	71.46	65.70	39.47	45.72	65.11	19.03	29.03
5	2	2	3	1	53.92	54.71	48.97	45.82	52.69	15.39	36.18
6	2	3	1	2	73.17	76.95	56.88	55.92	70.19	22.81	30.65
7	3	1	3	2	55.86	56.49	41.69	49.35	53.86	14.56	29.38
8	3	2	1	3	64.89	67.57	47.68	52.14	62.16	16.01	32.08
9	3	3	2	1	75.12	78.08	44.28	56.61	70.48	19.49	35.46
K_1	31.430	28.180	29.620	32.590							
K_2	31.953	34.287	33.030	31.543							
K_3	32.307	33.223	33.040	31.557							
R	0.8770	6.1071	3.4200	1.0470							

表5 综合评分方差分析

误差来源	SS	f	F	P
A	1.167	2	0.540	>0.05
B	63.857	2	29.522	<0.05
C	23.325	2	10.784	>0.05
D(误差)	2.16	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

降,必须对膜及时进行清洗^[4-5],常规化学清洗程序为水洗,碱洗(酸洗),水洗到中性测水通量;或酸洗(碱洗),水洗到中性,测水通量;直到水通量恢复到膜初始水通量90%以上才可结束清洗。

黄连主要有效成分已明确为生物碱类化合物,本课题以黄连中生物碱为指标,对超滤膜的孔径、温度、压力及药液质量浓度等进行考察,黄连提液按优化的超滤工艺纯化后,多数大分子量化合物被截留,故盐酸小檗碱在精制后样品中所占质量分数较精制前明显提高,巴马汀、表小檗碱所占质量分数有所降低,推测可能是由于聚砜膜材质对黄连中黄连碱、表小檗碱有一定吸附作用,且质量浓度越高,损失越大,微量成分吸附不明显,但在实验中可通过稀释药

液质量浓度得以解决,综合权衡各个有效成分的质量分数,超滤后指标成分的综合质量分数明显提高,验证试验表明该方法稳定可靠,且重复性良好,可用于黄连提取液的精制。

[参考文献]

- [1] 余圆媛,王伯初,彭亮,等. 黄连的药理研究进展[J]. 重庆大学学报:自然科学版,2006,29(2):107.
- [2] 谭璇,蔡光先. 超微戊己丸治疗肝胃郁热型胃溃疡临床疗效及其炎症机理研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2009.
- [3] 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.
- [4] 罗友华,李成付,杨辉,等. 陶瓷膜微滤技术精制复方咽舒宁水提液的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):12.
- [5] 王永香,徐海娟,张静,等. 金银花提取液超滤工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):12.

[责任编辑 仝燕]