

· 工艺与制剂 ·

## 黄花草木犀总皂苷提取纯化工艺优选

周媛, 严铭铭\*, 邵帅, 张银铃, 孙永嘉, 闫向竹, 于红威  
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 优选黄花草木犀总皂苷最佳提取纯化工艺。方法: 以黄花草木犀总皂苷含量为考察指标, 采用正交试验, 研究黄花草木犀最佳提取和纯化工艺。结果: 最佳提取工艺为加 14 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h; 最佳纯化工艺为浓缩浸膏上 D101 型大孔树脂柱, 洗脱剂 70% 乙醇, 吸附流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 洗脱流速  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 洗脱体积 6 BV。结论: 黄花草木犀总皂苷优选的提取纯化工艺简便、稳定、可靠。

[关键词] 黄花草木犀; 总皂苷; 正交试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)05-0001-04

## Optimization of Extraction Process and Purification Process of Total Saponins from *Melilotus officinalis*

ZHOU Yuan, YAN Ming-ming\*, SHAO Shuai, ZHANG Yin-ling, SUN Yong-jia, YAN Xiang-zhu, YU Hong-wei  
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize optimum extraction process and purification process of total saponins from *Melilotus officinalis*. **Method:** Orthogonal test was designed for investigating optimum extraction and purification technology for *M. officinalis* with the content of total saponins as index, respectively. **Result:** Optimum extraction process of total saponins were: extracted 3 times with 14 times the amount of 70% ethanol for 1 h each time, extraction solvent to reflux for 1.0 hour and 3 times. Optimum purification process was: concentrated extract passed through D101 resin with eluting by 6.0 BV 70% ethanol, elution flow rate was  $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , adsorption flow rate was  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . **Conclusion:** This optimized process was simple, stable and reliable.

[Key words] *Melilotus officinalis*; total saponins; orthogonal design test

黄花草木犀在民间以叶、花制成软膏外用, 或煎服用于治疗浮肿、腹痛、疟疾等<sup>[1]</sup>。对黄花草木犀皂苷类成分的研究迄今国内尚未见相关文献的报道, 本课题组对黄花草木犀各个有效部位进行了深入研究, 发现其总皂苷含量高, 具有抗炎、镇痛、抗肿

瘤等作用。故本文采用正交试验、大孔吸附树脂分离纯化等方法, 对黄花草木犀总皂苷的提取、纯化精制工艺进行了研究, 最终确定黄花草木犀总皂苷有效部位的提取精制纯化工艺。

### 1 仪器与试剂

UV-1700 型分光光度计 (日本岛津), METTLER-AE240 型电子分析天平 (瑞士 METTLER 公司), 黄花草木犀 (采于吉林省长白山, 经长春中医药大学姜大成教授鉴定为豆科草木犀属植物黄花草木犀 *Melilotus officinalis* L.),  $\beta$ -胡萝卜苷对照品 (批号 100445-200701, 供含量测定用, 中国药品生物制品检定所), D101, D201, D301, AB-8 型大孔吸附树脂购于河北沧州宝恩, 高氯酸、香草醛、冰醋酸、

[收稿日期] 20111031(018)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑项目(2007BAI38B05)

[第一作者] 周媛, 硕士研究生, 从事中药有效成分的提取与分离研究, Tel: 0431-86172017, E-mail: zzzmm\_0102@sina.com

[通讯作者] \* 严铭铭, 教授, 从事中药有效成分的提取与分离研究, Tel: 13578990277, E-mail: yanmm595@yahoo.com.cn

甲醇等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总皂苷含量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取  $\beta$ -胡萝卜素对照品 4.40 mg 于 25 mL 量瓶中,加甲醇超声使其完全溶解,并定容至刻度,得  $0.176 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液。

**2.1.2 样品溶液的制备** 取加热回流提取法所得干膏 1.0 g,精密称定,用 50 mL 水使其充分溶解,过滤,滤液置分液漏斗中,用等量的水饱和正丁醇萃取 3 次,合并萃取液,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中,定容至刻度,即得。

**2.1.3 标准曲线的绘制**<sup>[2-3]</sup> 精密量取 2.1.1 项下的  $\beta$ -胡萝卜素对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 于 10 mL 具塞试管中,沸水浴中挥干,依次加入新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.4 mL,高氯酸 1.6 mL,密塞,于 65 °C 水浴中加热 20 min,取出,冰水浴中冷却后加入冰醋酸 8 mL,混匀,在 541 nm 下测定其吸光度。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,得  $\beta$ -胡萝卜素标准曲线  $Y = 15.602X + 0.0877$  ( $r = 0.9995$ )。表明  $\beta$ -胡萝卜素在  $0.0088 \sim 0.044 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  与吸光度呈良好线性关系。

**2.1.4 样品含量测定** 精密吸取按照 2.1.2 项下方法制备的样品溶液 0.3 mL,沸水浴中挥干,按照 2.1.3 项下的方法测定。以相应的试剂为空白对照,在 541 nm 处测定吸光度,计算其总皂苷质量浓度。

**2.2 乙醇体积分数优选** 选取体积分数分别为 60%, 70%, 80%, 90% 的乙醇进行试验。分别称取黄花草木犀 500 g,设 2 组平行试验,提取 3 次,每次 1.5 h,加醇量为 12 倍(没过药材为宜),合并提取液,回收乙醇浓缩至稠膏并减压干燥。精密称取样品 1.0 g,按照 2.1.2 项下的方法配制样品溶液,并参照 2.1.4 项下的方法计算总皂苷的含量,结果总皂苷质量分数分别为 1.33%, 1.42%, 0.71%, 0.49%。结果表明 70% 乙醇提取总皂苷含量最高,所以在设计提取工艺因素水平表时,将乙醇体积分数因素设为 65%, 70%, 75% 3 个水平。

**2.3 正交试验设计** 根据文献[4]和单因素试验分析结果,以提取次数、提取时间、乙醇体积分数以及溶剂用量为考察因素,采用四因素三水平依正交试验表  $L_9(3^4)$  进行正交试验(表 1)。

称取黄花草木犀药材 500 g,按表 2 设计方案进行提取,过滤,回收溶剂,减压干燥,得黄花草木犀总

表 1 黄花草木犀总皂苷提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取 次数/次	B 提取 时间/h	C 提取 溶剂/%	D 溶剂 用量/倍
1	1	1	65	10
2	2	1.5	70	12
3	3	2	75	14

皂苷提取物干膏,称重,备用。精密称取样品干膏 1.0 g,按照 2.1.2 项下方法配制样品溶液,精密量取 0.3 mL,参照 2.1.4 项下的方法测定总皂苷含量。结果见表 2,3。

表 2 黄花草木犀总皂苷提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总皂苷质量 分数%
1	1	1	1	1	1.007
2	1	2	2	2	1.222
3	1	3	3	3	1.336
4	2	1	2	3	3.102
5	2	2	3	1	2.600
6	2	3	1	2	1.695
7	3	1	3	2	2.418
8	3	2	1	3	2.776
9	3	3	2	1	3.125
$K_1$	3.565	6.526	5.477	6.733	
$K_2$	7.397	6.5980	7.449	5.335	
$K_3$	8.319	6.157	6.355	7.214	
R	1.585	0.147	0.657	0.626	

表 3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	4.236 3	2	2.118 2	113.18	<0.01
B(误差)	0.037 4	2	0.018 7	1.00	
C	0.650 4	2	0.325 2	17.38	
D	0.635 0	2	0.317 5	16.97	

注:  $F_{0.01}(2,2) = 99.00, F_{0.05}(2,2) = 19.00$  (表 7 同)。

由表 2,3 综合分析可知,以总皂苷量为指标进行分析时,直观分析表明  $A_3B_1C_2D_1$  为最佳,以 B 因素为误差项进行的方差分析表明 A 因素有显著性影响,应选  $A_3, C, D$  因素 3 个水平间无显著性影响,选择最佳条件为  $A_3B_1C_2D_1$ ,加 10 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 1 h。

**2.4 验证试验** 称取黄花草木犀药材 3 批,按正交

试验优选结果进行提取并测定其含量,结果总皂苷平均含量为 3.31%,表明,提取工艺稳定可靠。

## 2.5 大孔树脂纯化工艺

### 2.5.1 大孔树脂型号筛选

**2.5.1.1 样品的制备及其总皂苷含量测定** 取 4 份依照醇提正交试验方法制得的干膏 0.5 g,精密称定,用 50 mL 水使其全部溶解,分别上样于 D101, D201, D301, AB-8 4 种型号树脂柱,水洗至洗脱液 Molish 试剂检测显阴性,分别用 10% 乙醇、30% 乙

醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇依次洗脱,洗脱流速为  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,各梯度均洗至近无色。分别收集洗脱液,回收溶剂浓缩后再减压干燥,然后称定各部分洗脱物的质量。精密称取各树脂洗脱物干膏(水洗物除外)分别全部置 10 mL 量瓶中,加 70% 乙醇超声 15 min 使其完全溶解,定容至刻度,摇匀即得样品溶液。精密吸取样品溶液 0.5 mL 分别置 10 mL 具塞试管中,按照 2.1.4 项下方法测定总皂苷的含量,结果见表 4。

表 4 不同型号树脂乙醇洗脱液中总皂苷量比较

树脂类型	总洗脱皂苷量/mg					总洗脱率/%	总洗脱物质量/mg	总皂苷质量分数/%
	10% 乙醇	30% 乙醇	50% 乙醇	70% 乙醇	95% 乙醇			
AB8	3.41	7.25	14.02	25.06	9.22	98.40	492.00	11.98
D101	3.45	7.49	15.22	28.27	10.09	98.74	493.71	13.06
D201	3.02	6.64	11.18	21.97	7.92	91.57	457.85	11.08
D301	3.13	6.01	10.55	21.06	7.62	87.76	438.81	11.02

**2.5.1.2 树脂洗脱量的考察** 分别比较 D101, D201, D301, AB-8 4 种型号大孔树脂,考察对总皂苷的洗脱量以及洗脱物中总皂苷含量(见表 4)。结果表明 D101 与 AB8 型大孔树脂洗脱量相近,D101 型大孔树脂洗脱物中总皂苷的含量最高,其洗脱性能要明显优于其他类型的 3 种树脂,故本试验选择 D101 型大孔树脂为其纯化树脂。50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇洗脱部位的量明显高于 10% 乙醇和 30% 乙醇洗脱的,故将 D101 型大孔树脂纯化工艺中洗脱剂乙醇体积分数分别设为 50%,70%,95% 进行进一步优选。

**2.5.1.3 树脂用量考察** 取醇提取的干膏 1 g,4 份,加水 50 mL 溶解,滤过,滤液分别加至 250 mL 烧杯中,加入已处理好的 D101 型树脂 60,80,100,120 mL。每隔 10 min 振摇 20 s,持续 2 h,静置 24 h,使其达到吸附平衡,吸取上层液,测定总皂苷的质量浓度,结果分别为 0.23,0.12,0.01,0.01  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (吸附前药液含总皂苷 0.67  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。表明用 100 mL 树脂可使 1 g 干膏静态吸附完全,故确定每克干膏用 100 mL 树脂处理。

**2.5.2 纯化工艺优选** 用大孔吸附树脂进行纯化,其影响因素有乙醇体积分数、洗脱体积、洗脱流速及吸附流速,同时经过多次预试验,设计四因素三水平  $L_9(3^4)$  正交试验,见表 5,6。

取醇提正交试验制备的样品干膏 1.0 g,以 50 mL 蒸馏水充分溶解,过滤,取滤液上样于 100 mL

表 5 D101 型大孔树脂纯化总皂苷工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 洗脱液体积/BV	C 洗脱流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	D 吸附流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
1	50	4	1	0.5
2	70	5	2	1
3	95	6	3	1.5

表 6 D101 型大孔树脂纯化总皂苷工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总皂苷/%
1	1	1	1	1	31.28
2	1	2	2	2	35.11
3	1	3	3	3	37.88
4	2	1	2	3	44.11
5	2	2	3	1	50.32
6	2	3	1	2	45.27
7	3	1	3	2	38.47
8	3	2	1	3	35.16
9	3	3	2	1	38.14
$K_1$	104.27	113.86	111.71	119.74	
$K_2$	139.7	120.59	117.36	118.85	
$K_3$	111.77	121.29	126.67	117.15	
R	11.81	2.476 7	4.986 7	0.863 3	

D101 型树脂柱(内径 2.5 cm,柱长 20 cm),按表 5 条件进行试验,得大孔树脂纯化总皂苷干膏。经测定计算,大孔树脂纯化总皂苷结果见表 6,以 D 因素

# 芪葛口服液制备工艺

周恩丽, 孟文娟, 徐连明, 尚强, 杨璐, 萧伟\*

(江苏康缘药业股份有限公司中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001)

**[摘要]** 目的: 优选芪葛口服液制备工艺参数。方法: 采用黄芪甲苷含量为检测指标, 通过正交设计及单因素试验考察, 优选得到最佳制备工艺。结果: 最佳工艺为加 5 倍量水, 提取 2 次, 每次 2 h, 醇沉体积分数 60%, 采用聚山梨醇酯-80(吐温-80)进行挥发油增溶。结论: 芪葛口服液水提、精制工艺满足生产工艺要求。

**[关键词]** 芪葛口服液; 黄芪甲苷; 正交试验; 增溶; 澄清度

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0004-03

## Preparation Technology of Qige Oral Liquid

ZHOU En-li, MENG Wen-juan, XU Lian-ming, SHANG Qiang, YANG Lu, XIAO Wei\*

(Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co Ltd, State Key Laboratory of New-Tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

**[收稿日期]** 20111011(015)

**[基金项目]** 国家科技部 973 计划(2010CB735604)

**[第一作者]** 周恩丽, 学士, 工程师, 从事新药工艺研究, Tel: 0518-85521936, E-mail: zel315@sina.com

**[通讯作者]** \* 萧伟, 博士, 高级工程师, 从事创新中药的开发与研究, Tel: 0518-85521956, E-mail: kanionxw2010@126.com

为误差项的方差分析见表 7。

表 7 纯化工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	232.402	2	116.201	201.307	<0.01
B	11.221	2	5.610	9.720	
C	38.045	2	19.022	32.954	<0.05
D(误差)	1.155	2	0.577		

从表 6, 7 可见, 以干膏中总皂苷的质量分数为指标进行分析, 其最佳工艺为  $A_2B_3C_3D_1$ , 影响其总皂苷含量的主要因素是乙醇体积分数, 其次是乙醇体积及洗脱流速, 影响最小的是吸附流速, 根据优选结果, 最佳洗脱条件为 6 BV 70% 乙醇洗脱, 洗脱流速  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 吸附流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 为了节省时间, 选择吸附流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 即最佳工艺为  $A_2B_3C_3D_2$ 。

**2.5.3 验证试验** 按上述正交工艺条件制备 3 批样品, 10 倍放大上样, 测定洗脱物中总皂苷平均质量分数为 51.93%。结果表明, 该工艺稳定可靠, 可推广应用用于黄花草木犀总皂苷有效部位的大量

制备。

### 3 讨论

首次建立了以  $\beta$ -胡萝卜素为对照品测定总皂苷含量的方法。预试表明黄花草木犀总皂苷有效部位中含有一定量的  $\beta$ -胡萝卜素, 仅含有微量的齐墩果酸, 为此试验选择香草醛-冰醋酸比色法, 比较了分别以齐墩果酸为对照品和以  $\beta$ -胡萝卜素为对照品的皂苷含量测定方法, 方法学考察表明以  $\beta$ -胡萝卜素为对照品皂苷含量测定方法更加准确可靠重现性好。

### [参考文献]

- [1] 吉林省中医中药研究所. 长白山植物药志[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1982: 1177.
- [2] 王玉芝, 于天霞, 王嘉滨. 荔枝核中总皂苷的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 48.
- [3] 桂双英, 周亚球, 张跃飞. 正交试验法优选人参总皂苷的提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(10): 591.
- [4] 张国松, 封传华, 罗晓健, 等. 柴胡总皂苷提取工艺的优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 17.

[责任编辑 全燕]