

# 升白胶囊提取纯化工工艺研究

王洛临<sup>1\*</sup>, 陈路林<sup>2</sup>, 张建军<sup>1</sup>, 宁德山<sup>2</sup>

(1. 广东省中医研究所, 广州 510095; 2. 广州汉方现代中药研究开发有限公司, 广州 510240)

[摘要] 目的: 对升白胶囊的提取纯化工工艺进行研究。方法: 以阿魏酸和黄芪甲苷为指标, 采用正交设计法优选提取工艺; 以薄层比较和黄芪甲苷保留率为指标, 优选纯化工工艺。结果: 提取 3 次, 首次采用 30% 乙醇提取, 后两次采用水提取, 每次加药材量 8 倍的溶媒, 提取 1 h, 提取液采用 ZTC1 + 1 澄清剂方法除杂纯化。结论: 优化的提取工艺简单、稳定, 除杂纯化工工艺可行。

[关键词] 升白胶囊; 正交试验; ZTC 1 + 1 澄清剂; 黄芪甲苷; 阿魏酸

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0010-03

升白胶囊是临床验方, 由黑豆、黄芪、当归等 6 味中药组成, 具有益肾健脾的功效。用于肾病综合症, 低蛋白血症等。处方中药材所含成分为黄酮、皂苷、多糖及脂溶性成分等, 为了尽可能多地提取出有效成分, 同时考虑到后续制剂成型工艺的需要, 我们采用正交试验法对提取工艺进行研究, 采用不同除杂方法比较对提取液进行纯化研究。

## 1 试药与仪器

**1.1 试药** 黄芪甲苷对照品(中国生物制品检定所批号: 110781-200613); 阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所批号: 0773-9910); 型 ZTC1 + 1 澄清剂(天津正天成澄清技术有限公司); 升白胶囊所用药材(广东省药材公司); 所用化学试剂均为分析纯。

**1.2 仪器** CAMAG 型薄层扫描仪(瑞士); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国); RE-52AA 旋转蒸发器(上海); ZK-82A 真空干燥箱(上海)。

## 2 方法与结果

**2.1 提取工艺路线的选择** 根据处方中各味药材所含成分分析, 拟定的工艺路线为: 黑豆、黄芪、当归等 6 味药材提取 3 次, 首先使用水醇回流提取一次, 再用水煎煮提取两次。

**2.2 正交试验设计** 用正交试验法, 以黄芪甲苷和

阿魏酸含量为指标成分, 以首次提取乙醇的浓度、溶媒量、提取时间为考察因素, 因素水平见表 1, 按正交试验表  $L_9(3)^4$  安排试验方案。

表 1 因素水平表

水 平	因 素		
	提取溶媒 (乙醇 水)	每次溶媒 加入量(倍)	每次提取 时间(h)
1	30%	8	1
2	50%	6	1.5
3	70%	4	2

**2.3 样品制备** 按处方比例, 称取药材 9 份, 每份 158g, 按表 3 试验安排提取, 合并提取液, 滤过, 减压浓缩, 真空减压干燥, 称量。

## 2.4 干浸膏中黄芪甲苷含量测定

**2.4.1 供试品溶液的制备** 取研细的干浸膏 1.5 ~ 2 g, 精密称定, 照《中国药典》2000 年版一部黄芪项下的含量测定法, 制备供试品溶液。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 精密称取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液。

**2.4.3 层析条件** 精密吸取供试品溶液 6 ~ 10  $\mu\text{L}$ , 对照品溶液 1  $\mu\text{L}$  与 3  $\mu\text{L}$  分别交叉点于同一高效硅胶 G 薄层板上, 以氯仿 甲醇 水(13 6 2) 10 以下放置过夜的下层溶液为展开剂, 饱和 20 min 后上行展开 8 cm, 取出晾干, 喷硫酸乙醇(取浓硫酸 5.7 mL, 加乙醇至 100 mL) 溶液, 晾干。于 105 加热至斑点显色清晰。

**2.4.4 扫描条件** 双波长反射法锯齿扫描,  $\lambda_s = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_R = 680 \text{ nm}$ , 狭缝 0.4 mm  $\times$  0.4 mm, 散射参

[收稿日期] 2009-04-28

[通讯作者] \* 王洛临, Tel: (020) 83501292; E-mail: luolin\_w@163.com

数  $s_x = 3$ , 背景校正: ON。数据处理定量方法为外标两点法。结果见表 2。

**2.4.5 标准曲线的制备** 吸取对照品溶液 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5  $\mu\text{L}$ , 点样, 展开, 晾干, 显色, 扫描测定峰面积, 计算回归方程为  $Y = 2\ 123.856 + 3\ 378.868X$ ,  $r = 0.990\ 67$ , 表明黄芪甲苷的量在 0.6 ~ 5.4  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

**2.5 干浸膏中阿魏酸含量测定**

**2.5.1 色谱条件** 色谱柱: Kromasil(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈 0.085% 磷酸溶液 (17 83); 检测波长 316 nm; 流速: 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.5.2 供试品溶液的制备** 取研细的干浸膏 1 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加 5% 的碳酸钠溶液 25 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 加稀盐酸调节 pH 值至 2, 以乙酸乙酯萃取 3 次, (20, 20, 15 mL), 合并乙酸乙酯液, 水浴蒸干, 残渣加 0.5% 乙酸甲醇液溶解, 转移到 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ) 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.5.3 对照品溶液的制备** 精密称取阿魏酸对照品, 置棕色量瓶中, 加 70% 甲醇制成 20.6  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液。

**2.5.4 标准曲线的绘制** 分别取阿魏酸对照品溶液 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20  $\mu\text{L}$ , 分别注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 计算阿魏酸回归方程为:  $Y = 3.2\ 701\ 763X + 2.1\ 286\ 362$ ,  $r = 0.99\ 981$ 。表明阿魏酸的量在 20.6 ~ 412.0 ng 范围内线性关系良好。

**2.5.5 阴性对照溶液的制备及结果考察** 按处方量称取本处方中除当归外的各味药材, 分别加 10 倍水, 煎煮两次, 每次 2 h, 减压浓缩, 真空干燥, 按上述供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。按上述测定法, 结果表明, 阴性对照溶液在阿魏酸位置无吸收, 处方中其它药味对本测定无干扰。

**2.5.6 测定法** 分别精密吸取上述对照品溶液 5  $\mu\text{L}$  与供试品溶液 5 ~ 10  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 测定, 计算干浸膏中阿魏酸含量, 结果见表 2。

**2.6 数据处理与工艺优选** 用综合加权评分法, 以各指标成分总量 9 次试验的最大值为 100 分, 将各指标成分的总量分别转换为评分值, 考虑到处方中各药材的君臣关系, 黄芪甲苷、阿魏酸总提取量的加权系数分别为 0.5, 将每次试验的各指标成分的评分值乘以相应的加权系数后求和, 得综合评分值, 以

综合评分值计算正交试验结果, 并进行方差分析, 结果见表 3 ~ 4。

表 2 试验

组别	干浸膏量 (g)	得膏率 (%)	阿魏酸含量 (%)	黄芪甲苷含量 (%)
1	33.02	20.90	0.0317	0.021
2	32.96	20.86	0.0296	0.018
3	28.74	18.19	0.0325	0.02
4	33.03	20.91	0.0332	0.016
5	32.02	20.27	0.0321	0.017
6	30.34	19.20	0.0331	0.019
7	30.49	19.30	0.0315	0.016
8	29.29	18.54	0.0333	0.017
9	28.78	18.22	0.0317	0.016

表 3 正交设计试验

组别	A 提取溶媒	B 溶媒量	C 提取时间	D	干浸膏中阿魏酸总量 (mg)	干浸膏中黄芪甲苷总量 (mg)	综合评分
1	1	1	1	1	10.467	6.934	97.73
2	1	2	2	2	9.756	5.933	87.26
3	1	3	3	3	9.341	5.748	84.04
4	2	1	2	3	10.966	5.285	88.11
5	2	2	3	1	10.278	5.443	86.12
6	2	3	1	2	10.043	5.765	87.36
7	3	1	3	2	9.604	4.878	78.97
8	3	2	1	3	9.754	4.979	80.38
9	3	3	2	1	9.123	4.605	74.80
K1	269.03	264.81	265.47	258.65			
K2	261.59	253.76	250.17	253.59			$Y = 764.77$
K3	234.15	246.20	249.13	252.53			$CT = 64\ 985.91$
R	34.88	18.61	16.34	6.12			

表 4 黄芪甲苷和阿魏酸提取率综合评分方差分析表

变异来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
A	224.99	2.00	112.50	31.51	< 0.05
B	58.40	2.00	29.20	8.18	> 0.10
C	55.80	2.00	27.90	7.82	> 0.10
误差	7.13	2.00	3.57		

$F_{0.10}(2, 2) = 9.00$   $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

结果分析: 以综合评分为考察指标, 各因素主次为  $A > B > C$ , 方差分析表明, 因素 A 对试验结果有显著的影响, 因素 B 和因素 C 对试验结果无影响。最佳工艺条件为药材提取 3 次, 第 1 次加 30% 乙醇

回流,第 2、3 次加水提取,每次加药材量 8 倍溶媒,提取 1 h,即 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>。

**2.7 工艺验证试验** 按上述方法和最佳工艺条件进行 3 批提取验证试验,结果见表 5。

表 5 最佳提取工艺验证

试验 序号	干浸膏 量(g)	黄芪甲苷 含量(%)	黄芪甲苷 总量(mg)	阿魏酸 含量(%)	阿魏酸 总量(mg)	综合 评分
1	20.61	0.021	6.840	0.0331	10.781	98.48
2	20.68	0.021	6.863	0.0332	10.850	98.96
3	20.70	0.020	6.542	0.0321	10.50	95.06

结果表明,3 批样品指标成分的综合评分平均值为 97.5,与正交试验的综合评分最大值 97.73 接近,表明优选出的工艺条件稳定、合理、可行。

## 2.8 除杂方法的优选

**2.8.1 提取浓缩液的制备** 按工艺优选结果提取,浓缩成与药材比 1:5 的浓缩液,作为除杂浓缩液。

**2.8.2 离心沉淀除杂(工艺 A) 样品制备** 取浓缩药液,3 600 r·min<sup>-1</sup>离心分离,收集沉淀,干燥;上清液继续浓缩,制成干浸膏。

**2.8.3 乙醇沉淀除杂(工艺 B) 样品制备** 取浓缩药液,继续浓缩成与药材比 1:1 的浓缩液,加入乙醇至药液含醇量为 60%,搅拌均匀,静置 24 h,3 600r·min<sup>-1</sup>离心分离,收集沉淀,干燥;上清液回收乙醇并浓缩,制成干浸膏。

**2.8.4 澄清剂沉淀除杂(工艺 C) 样品制备** 按澄清剂使用说明书的使用方法,取浓缩药液,水浴加温至 70℃,搅拌下加入药液量 6% 的澄清剂胶黏液 B(取澄清剂 B 组分,加 1% 醋酸配成 1% g·mL<sup>-1</sup> 的溶液),60℃ 保温,每隔 30 min 搅拌一次,2 h 后加入药液量 3% 的澄清剂胶黏液 A(取澄清剂 A 组分,配成 1% g·mL<sup>-1</sup> 的水溶液),每隔 30 min 搅拌一次,2 h 后取出,放冷,3 600 r·min<sup>-1</sup>离心分离,收集沉淀,干燥;上清液继续浓缩,制成干浸膏。

**2.8.5 除杂效果比较** 分别按上述方法测定 3 种工艺所得除杂干浸膏中黄芪甲苷的含量,以工艺 A 黄芪甲苷保留率为 100%,计算工艺 B、C 黄芪甲苷相对保留率,并进行薄层色谱比较。见表 6。

表 6 3 种纯化方法试验

工艺	沉淀量 (g)	得膏率 (%)	黄芪甲苷 含量(%)	黄芪甲苷 保留率(%)
A	1.25	19.99	0.0229	100
B	11.18	16.41	0.0253	90.68
C	8.63	17.40	0.0251	95.45

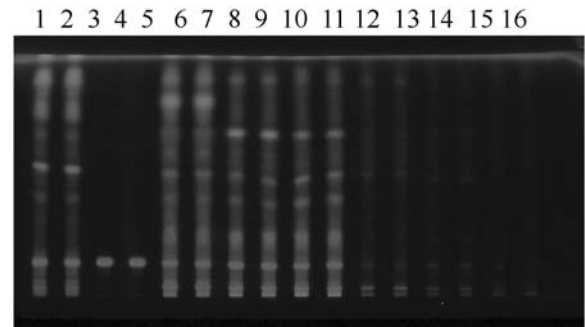


图 1 黄芪的薄层鉴别比较

1. 2 黄芪药材; 3. 4 黄芪甲苷; 5. 6 工艺 A 浸膏; 7. 8 工艺 B 浸膏; 9. 10 工艺 C 浸膏; 11. 12 工艺 A 沉淀; 13. 14 工艺 B 沉淀; 15. 16 工艺 C 沉淀

结果表明:3 种工艺浸膏的薄层色谱比较其斑点基本一致,在与对照品相当位置上均显示相同的斑点,而沉淀物均无显著斑点。醇沉法和澄清剂法的黄芪甲苷保留率比较,以后法除杂效果较好。

## 3 讨论

采用溶媒梯度提取法,即考虑到处方中水溶性成分,又兼顾到部分脂溶性成分,且简单,符合中医用药共煎的特点。

ZTC 系列澄清剂是从食品中提取的天然高分子物质,也是中草药制备水提醇沉工艺中乙醇的理想替代品,主要除鞣质、蛋白质、蜡质等胶体不稳定成分,对中草药中的黄酮、皂苷、多糖等物质不受影响,经澄清剂残留试验研究,澄清后的提取物中未见澄清剂残留物质存在,与文献报道“不残留”一致<sup>[1]</sup>。

## [参考文献]

- [1] 李朝兴. 新一代纯天然澄清剂 ZTC 系列天然澄清剂 [J]. 离子交换与吸附, 1994, 10(6): 565.