

同的展开系统进行了考察。以氯仿-醋酸乙酯-甲酸(5 4 1)为展开剂进行实验,样品无法展开;以正丁醇-冰醋酸-水(4 1 5)展开时,展开速度慢,分离效果差,脱尾较严重。以本实验所采用的展开系统进行鉴别和测定质量分数,效果较好。

结果表明,运用安玛西亚的 A KTA Explorer 100 制备色谱系统分离猫豆胍对照品,具有自动化程度高,收集全面等优点,而且样品质量分数高。该法可作为猫豆胍对照品的分离制备方法。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册. 上海:上海科学技术出版社,1977.
- [2] 蒋伟哲,周燕文,吴 闯,等. 不同产地猫豆中左旋多巴的含量比较[J]. 中草药,2000,31(11):861.
- [3] 广西医科大学. 一种生物碱类化合物及其制备方法和用途[P]. 中国:200810073635.9,2008-06-20.
- [4] 黄增琼,蒋伟哲,黄兴振,等. 猫豆胍镇静催眠和抗震颤麻痹作用研究[J]. 中草药,2009,40(2):276-278.
- [5] 黄海滨,许学健,奉建芳. 高效液相色谱法测定猫豆中左旋多巴的含量[J]. 广西植物,1994,14(3):293-294.

驴胶补血颗粒的壳聚糖纯化工艺研究

谢 安,周文龙,杨顺龙,廖志雄

(九芝堂股份有限公司,湖南 长沙 410008)

摘 要:目的 对驴胶补血颗粒提取液的纯化工艺进行研究。方法 采用壳聚糖为絮凝剂的絮凝澄清法纯化提取药液,并以干膏得率、多糖量为考察指标对絮凝澄清工艺参数进行优选。结果 以絮凝前药液浓缩至密度为 1.06 (60 测定),絮凝时药液温度为 45~85 ,加入 5%的壳聚糖溶液进行絮凝为最佳工艺。结论 采用此方法能有效去除提取药液中的鞣质等亲水性杂质,同时具有生产周期短、工艺简单、成本低廉及环保等特点。

关键词:驴胶补血颗粒;壳聚糖;絮凝澄清;纯化

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)06-0906-03

驴胶补血颗粒由黄芪、党参、熟地、白术、当归、阿胶 6 味中药组成,具有滋阴补血,健脾益气,调经活血的功能,主要用于久病体虚,气虚血亏型月经不调等妇女疾患。本品提取工艺中采用传统的水提醇沉法,经醇沉回收乙醇的药液往往黏性较大,较难浓缩、干燥,制粒亦困难且易吸潮霉变,且醇沉处理生产周期长,成本高。采用壳聚糖为絮凝剂的絮凝澄清法优于醇沉法,提取液经处理后有效成分损失少,易于浓缩、干燥,其干膏不易吸湿,且工艺简单、成本低廉^[1~6]。本实验采用壳聚糖为絮凝剂的絮凝澄清法纯化提取药液,并以固形物保留率、多糖为考察指标对絮凝澄清工艺参数进行优选。

1 仪器与材料

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用)。药材均为道地药材,由九芝堂商南植物药有限公司提供,由九芝堂股份有限公司质量中心检测合格;壳聚糖(南通兴城生物制品厂),D-无水葡萄糖对照品(批号:110833-200302)由中国药品生物制品检定所提供,甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其他

试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 驴胶补血颗粒提取药液的制备:按处方比例称取药材,加水煎煮 3 次,第 1 次 1.5 h,第 2、3 次各 1 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩,即得。

2.2 固形物保留率的测定:取絮凝前后的样品溶液各 25.0 mL,分别置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 干燥至恒重,称定质量,计算絮凝前后固形物保留率。

2.3 干膏得率的测定:精密吸取 10 mL 絮凝后的浸膏,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 干燥 3 h,取出,立即置干燥器中冷却 0.5 h,称定质量,计算干膏得率。

2.4 多糖的测定

2.4.1 对照品溶液的制备:取 105 下干燥至恒重的 D-无水葡萄糖约 51.6 mg,精密测定,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.2 供试品溶液的制备:分别精密吸取絮凝液 10 mL,加 5 倍量无水乙醇至含醇量达 83.33%,离

心(5 000 r/min) 15 min,取沉淀低温干燥,加水溶解,滤过,滤液置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度。精密吸取 5 mL 溶液置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即得。

2.4.3 标准曲线的制备:分别精密吸取 D-无水葡萄糖对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL 于 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度。各取 1.0 mL 于 25 mL 具塞刻度试管中,分别加入 5%苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,加入 5.0 mL 浓硫酸,立即摇匀。沸水浴加热 15 min,冰水浴冷却,放至室温,以蒸馏水同法做成空白参比。照分光光度法(《中国药典》2005 年版一部附录 B),在 490 nm 处测定吸光度(A)。以 A 值为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2.4.4 测定法:分别精密吸取各供试品溶液 1.0 mL 于 25 mL 具塞试管中,依标准曲线制备项下方法,自“加 5%苯酚溶液 1.0 mL”起,依法测定 A 值,从标准曲线上读出供试品溶液中多糖的质量浓度,计算,即得。

2.4.5 多糖保留率的规定:多糖保留率 = 絮凝后多糖质量/絮凝前多糖质量 × 100%

2.5 单因素试验考察

2.5.1 絮凝前浸膏密度的考察:浸膏的密度是影响絮凝澄清工艺的重要因素,故对絮凝前浸膏的密度进行考察。取浓缩后的浸膏适量,分别稀释至密度为 1.01、1.04、1.07(60 测),调节 pH 值为 4.4。分别精密量取药液 200 mL,水浴加热,用 40% NaOH 调 pH 值为 6.0。加入 20 mL 壳聚糖溶液,边加边搅拌,加完后继续搅拌 10 min。药液自然冷却,静置 2 h,待絮凝液澄清,用 120 目滤布双层滤过,得絮凝液。观察滤过情况,测定絮凝前后固形物比值、多糖保留率,结果见表 1。以滤过情况、絮凝前后固形物保留率、多糖保留率为考察指标,当浸膏密度大于 1.07 时,絮凝液十分黏稠,滤过相当困难,提示絮凝前浸膏密度不能大于 1.07。当浸膏密度为 1.01,絮凝效果较好,但在大生产中浸膏密度太低,影响生产能力及效果,故浸膏密度应选择在 1.01~1.06。

表 1 絮凝前浸膏密度考察结果

Table 1 Results of extract density before flocculation clarification

浸膏密度	滤过情况	固形物保留率/ %	多糖保留率/ %
1.01	容易滤过	99.5	82.1
1.04	容易滤过	96.3	78.3
1.07	不易滤过	82.9	70.0

2.5.2 壳聚糖加入量的考察:壳聚糖的加入量直接

影响到絮凝澄清工艺的纯化结果,因此对壳聚糖的加入量进行考察。取浓缩后的浸膏适量,调节密度为 1.05(60 测),用 40% NaOH 调节 pH 值为 6.0。取浸膏 100 mL,共 6 份,水浴加热至 60,分别加入 0(为原液)、5、10、15、20、25 mL 壳聚糖溶液,边加边搅拌,加完后继续搅拌 10 min。自然冷却,静置 2 h,待絮凝液澄清后,用 120 目滤布双层滤过,观察滤过情况,得各絮凝液,测定絮凝前后含固量比值、多糖保留率。结果见表 2。当壳聚糖加入量超过 15 mL 时,絮凝沉降较困难,絮凝液难以滤过,提示壳聚糖加入量不能超过 15%。当壳聚糖溶液的加入量为 5~10 mL 时,絮凝前后含固量比值及多糖保留率均较高,故采用壳聚糖溶液加入量为浸膏质量的 5.0%~10.0%时较为合适。

表 2 壳聚糖加入量对指标的影响

Table 2 Effects of chitosan amount on indexes

壳聚糖加入量/ mL	滤过情况	固形物保留率/ %	多糖保留率/ %
5	容易滤过	96.01	91.64
10	容易滤过	94.25	82.45
15	较易滤过	93.70	76.58
20	较难滤过	88.05	72.49
25	较难滤过	81.50	69.83

2.6 正交试验优选絮凝澄清工艺

2.6.1 因素水平的确定:在上述单因素试验初步优选壳聚糖絮凝澄清工艺条件的基础上,采用正交试验法对壳聚糖絮凝澄清最佳工艺条件进行进一步验证优选。根据预试结果,选取浸膏密度、壳聚糖用量及絮凝时药液温度为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,以干膏得率、絮凝前后多糖保留率为考察指标,采用方差分析, q 检验确定最佳工艺条件,因素水平见表 3。

表 3 因素与水平

Table 3 Factors and levels

水平	因 素		
	A 浸膏密度	B 壳聚糖用量/ %	C 药液温度/
1	1.02	5	45
2	1.04	7	65
3	1.06	9	85

2.6.2 正交试验与结果:用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,按前述测定方法测定,结果见表 4。

将正交试验结果进行方差分析,结果见表 5。

以干膏得率为指标分析:极差 R 值大小显示,各因素作用主次为 A>B>C,方差分析结果表明:A 因素和 B 因素的影响均有显著性意义,以 $A_3B_1C_3$ 组合为佳,因 C 因素差异性不具显著意义,故在中试和大生产中可选用 $A_3B_1C_1 \sim C_3$ 。以多糖保留率

为指标分析:极差 R 值大小显示,各因素作用主次为 $B > A > C$, 方差分析结果表明: B 因素的影响具有显著性意义,以 $A_2B_1C_1$ 组合为佳,因 A、C 因素差异性不具显著意义,故在中试和大生产中可选用 $A_1 \sim A_3B_1C_1 \sim C_3$ 。

表4 正交试验设计表及结果

Table 4 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	干膏得率/ %	多糖保留率/ %
1	1	1	1	1	37.86	86.54
2	1	2	2	2	35.53	82.03
3	1	3	3	3	36.84	80.02
4	2	1	2	3	37.93	88.31
5	2	2	3	1	36.05	85.13
6	2	3	1	2	37.07	83.02
7	3	1	3	2	40.81	90.54
8	3	2	1	3	38.09	84.46
9	3	3	2	1	40.05	80.35
干膏得率 K_1	110.23	116.60	113.02	113.96		
K_2	111.05	109.67	113.51	113.41		
K_3	118.95	113.96	113.70	112.86		
R	8.72	6.93	0.68	0.55		
多糖含量 K_1	248.59	265.39	254.02	252.02		
K_2	256.46	251.62	250.69	255.59		
K_3	255.35	243.39	255.69	252.79		
R	7.87	22.00	5.00	3.57		

表5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

误差来源	SS	V	MS	F	显著性
干膏得率 A	15.460	2	7.730	76.6500	$P < 0.05$
B	8.160	2	4.080	40.4400	$P < 0.05$
C	0.080	2	0.040	0.4100	
D	0.200	2	0.100		
多糖保留率 A	12.096	2	6.048	5.1406	
B	82.372	2	41.186	35.0058	$P < 0.05$
C	4.320	2	2.160	1.8358	
D	2.353	2	1.177		

$$F_{0.05}(2,2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2,2) = 99.00$$

综合上述试验结果及指标分析,拟定以 $A_3B_1C_1 \sim C_3$ 为最佳絮凝工艺,即絮凝前药液浓缩至密度为 1.06(60 测),絮凝时药液温度为 45~85,加入 5%的壳聚糖溶液进行絮凝。

2.7 絮凝澄清工艺的验证:按上述较优工艺条件进行试验验证,即絮凝前药液浓缩至密度为 1.06(60 测),絮凝时药液温度为 45,加入 5%的壳聚糖溶液进行絮凝。以干膏得率、絮凝前后药液中多糖保留率为考察指标,结果见表 6。结果表明,该方法重复可行。

表6 正交试验验证($n=3$)Table 6 Verification test ($n=3$)

试验序号	浸膏得率/ %	多糖保留率/ %
1	39.70	88.84
2	38.97	89.37
3	40.13	90.26

3 讨论

本品采用传统的水提醇沉法不仅可沉淀淀粉、蛋白质等大量的亲水性杂质,同时也去除了药材提取液中大多数低分子多糖成分(多糖保留率 $\leq 50\%$),而现代研究表明大多数中药中的低分子多糖类成分具有增加免疫力、抗癌、抗辐射、抗突变、保肝和养颜及造血等作用,如黄芪、党参、当归中的多糖等都具上述作用^[7~10],按现代的中药研究理论,本品目前采用的纯化工艺将部分有效成分作为无效杂质去除,在一定程度上影响产品的质量及疗效,故本实验采用多糖为主要考察指标对絮凝澄清工艺参数进行优选,经验证的絮凝方法,多糖保留率 $\geq 80\%$,大部分多糖物质得以保留。

中药提取液中常含有大量的糖类、无机盐、黏液质等强吸潮性成分,特别是醇沉后的浸膏更易吸潮,对固体制剂的成型影响较大,而采用絮凝澄清法纯化提取液,能较好的去除此类成分,纯化后药液易干燥,较难吸潮,易于制剂成型,且成品稳定性好。进行中试放大表明,本实验提取纯化方法方便,可行,生产周期短,且环保、节能、安全。

参考文献:

- [1] 张彤,徐莲英,蔡贞贞.壳聚糖澄清剂精制中药水提液的应用前景[J].中国中药杂志,2001,26(8):516-519.
- [2] 李汉保,谢虞升.壳聚糖澄清法取代醇沉法制备平疣口服液[J].中草药,1998,29(2):95-97.
- [3] 储秋萍.壳聚糖用于黄芪口服液澄清的工艺探讨[J].中草药,1998,20(12):2-3.
- [4] 龚慕辛,贾春伶.天然澄清剂在中药提取液精制中的应用[J].北京中医,2001(6):43-45.
- [5] 曾敏,谢兴亮,杨明,等.壳聚糖游离膜在不同溶出介质中的降解性能研究[J].中草药,2009,40(7):1050-1052.
- [6] 吴大章,刘世琪,吴品江,等.丹参水提液的纯化工艺研究[J].中草药,2009,40(6):889-892.
- [7] 包文奇,吕美,王志祥.黄芪多糖的药理研究进展[J].河南农业科学,2005,4:78-80.
- [8] 孟慧玲,魏道武.当归多糖的药理研究新进展[J].甘肃中医,2007,20(1):44-46.
- [9] 张晓军,胡黎,赖小平,等.党参多糖对小鼠免疫和造血功能的影响[J].中药新药与临床药理,2003,5(3):174-176.
- [10] 张洪建,杨琳,李力平.海带多糖药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2009,24(4):217-219.