

黄芪提取及提取液陶瓷膜超滤纯化工艺研究

冉鑫¹, 万玲娟¹, 李金田¹, 刘晓霞¹, 何红杰¹, 魏舒畅^{1,2*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 建立适合于工业化生产的黄芪 *Astragali Radix* 提取和超滤纯化工艺方法。方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计及层次分析法, 以加水量、提取时间和提取次数为提取考察因素, 以操作压力、料液温度和膜面错流速度为超滤纯化考察因素, 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、黄芪甲苷、黄芪多糖、醇溶性浸出物含量(保留率)以及出膏率(除杂率)为评价指标, 优选最佳提取和最佳超滤工艺参数。结果 最佳提取条件为饮片加 16 倍量水(6.67、4.67、4.67 倍), 提取 3 次, 总提取时间 210 min (70 min/次); 最佳超滤工艺为孔径 50 nm 的无机陶瓷膜, 操作压力 0.12 MPa, 膜面错流速度 5.3 m/s 和料液温度 25 °C。通过提取液与超滤液的特征图谱建立与相似度分析可以得出, 超滤液与提取液的化学成分一致性较好, 且各批次超滤液中的化学成分稳定存在。结论 所建立的黄芪提取和超滤纯化工艺方法科学合理、简便可行、重复性好, 有良好的工业化生产前景。

关键词: 黄芪; 提取; 超滤纯化; 特征图谱; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 毛蕊异黄酮; 黄芪甲苷; 黄芪多糖

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)19-6035-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.010

Extraction of *Astragali Radix* and purification process of ceramic membrane ultrafiltration of *Astragali Radix* extracts

RAN Xin¹, WAN Ling-juan¹, LI Jin-tian¹, LIU Xiao-xia¹, HE Hong-jie¹, WEI Shu-chang^{1,2}

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gansu Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To establish a process method for extraction and ultrafiltration purification of Huangqi (*Astragali Radix*) suitable for industrial production. **Methods** $L_9(3^4)$ orthogonal design and analytic hierarchy process were adopted, and water addition, extraction time and extraction times were taken as the investigation factors for extraction, and operating pressure, feed-liquid temperature and membrane cross-flow velocity were taken as the investigation factors of ultrafiltration purification. The extract content (retention rate) of calycosin-7-O- β -D-glucoside, calycosin, astragaloside IV, *Astragalus* polysaccharides, alcohol-soluble extract and paste extraction rate (impurity removal rate) were used as evaluation indicators, and the optimal extraction and ultrafiltration process parameters were selected. **Results** The optimal extraction process conditions were determined as the decoction pieces plus 16 times the amount of water (6.67, 4.67, 4.67 times), extraction three times, and the total extraction time was 210 min (70 min/time). Ceramic membrane with aperture of 50 nm, operating pressure 0.12 MPa, membrane cross-flow velocity 5.3 m/s and feed liquid temperature 25 °C. And through the establishment of characteristic maps and similarity analysis of *Astragali Radix* extract and ultrafiltrate, it can be concluded that the chemical components of *Astragali Radix* ultrafiltrate and extract were consistent, and the chemical components in each batch of ultrafiltrate were stable. **Conclusion** The extraction and ultrafiltration purification process of *Astragali Radix* established in this paper is scientific and reasonable, simple and feasible, with good repeatability, and has a good prospect for industrial production.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; extraction; ultrafiltration purification; feature map; calycosin-7-O- β -D-glucoside; calycosin; astragaloside IV; *Astragalus* polysaccharides

收稿日期: 2022-04-11

基金项目: 甘肃省高等学校产业支撑引导项目(2019C-02); 研究生创新基金项目(2021CX42)

作者简介: 冉鑫(1995—), 女, 硕士研究生, 从事中药制剂工艺研究。Tel: 17361551392 E-mail: 1357109522@qq.com

*通信作者: 魏舒畅(1969—), 男, 博士生导师, 从事中药制剂工艺研究。Tel: 13893467387 E-mail: wshch006@163.com

黄芪为补气之圣药,具有补气固表、托毒排脓、利水消肿等功效,可治疗气虚乏力、表虚自汗、内热消渴等病症^[1-4]。黄芪及其提取物应用广泛,既可被制成不同剂型的药品和保健品,还可应用到化妆品等领域中。高品质黄芪提取物是开发相关产品开发的前提,但目前对于黄芪提取物的制备仍然存在相关研究缺乏系统性以及所得提取物的成分损失较大、溶解性较差等问题,鉴于此,本实验通过应用超滤技术对提取液进行纯化,可改进上述不足。

超滤技术用于纯化中药提取液具有精度高、成本低、环保等特点,特别是近年来开始使用的无机陶瓷超滤膜具有耐高温、耐酸碱、耐氧化、机械强度高、受污染后可用苛性条件清洗来恢复膜通量等优势^[5-7],陶瓷超滤膜的出现使超滤技术在中药制药领域的应用得到快速发展。

黄芪水提液中含有大量悬浮物和水溶性杂质(淀粉、水溶性蛋白)等,这些物质的存在会导致制备的提取物外观及溶解性较差,故难以得到高品质的提取物。与传统的水提醇沉方法相比,超滤技术既可除去提取液中的悬浮物和大分子杂质等,还能很好保留黄芪中原有的有效成分。因此,本实验选用孔径恰当的陶瓷膜对黄芪水提液进行纯化处理,并通过正交试验结合层次分析法优化提取和超滤纯化工艺条件,建立适合于工业化生产的提取和纯化工艺方法,其不仅可以极大的改进提取物的外观与溶解性等问题,还可为高品质黄芪提取物的工业化生产提供高效、低成本、环保的制备技术,为以黄芪为原料的产品研发提供优质原料以及为黄芪更深入的研究与开发提供理论参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SJM-FHM 型陶瓷复合膜分离设备,合肥世杰膜工程有限责任公司;L2-5K 型台式低速离心机,湖南可成仪器设备有限公司;UV-power 型紫外分光光度计,北京莱伯泰克仪器股份有限公司;Waters e2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;CP313 型电子天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司;ME55/02 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DZF-6090 型真空干燥箱,上海齐欣科学仪器有限公司。

1.2 试药

黄芪饮片购于兰州市黄河药材市场,经甘肃中

医药大学药学院魏舒畅教授鉴定,为豆科黄芪属草本植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。对照品 D-无水葡萄糖(批号 110833-200503,质量分数 99.5%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201606,质量分数 97.6%)、黄芪甲苷(批号 110781-201616,质量分数 96.8%),中国食品药品检定研究院;对照品毛蕊异黄酮(批号 18030505,质量分数 98.8%),成都普菲德生物技术有限公司;甲醇(批号 20210601)、乙腈(批号 20210115)、氨水(批号 20210601)、氢氧化钠(批号 20190501),天津市大茂化学试剂厂。

2 方法与结果

2.1 黄芪多糖的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取无水葡萄糖对照品(置五氧化二磷减压干燥器中干燥 24 h)适量,加纯水制成质量浓度为 0.493 mg/mL 对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取不同工艺条件下的药液适量,加无水乙醇使含醇量为 47%,4000 r/min 离心(离心半径 16 cm) 20 min,上清液继续加无水乙醇使含醇量达 80%,离心,沉淀加纯水溶解定容至 25 mL,摇匀,精密吸取溶液适量,稀释定容至 10 mL,摇匀,备用。

2.1.3 线性关系考察^[8-9] 精密吸取 0.493 mg/mL 无水葡萄糖对照品溶液适量,纯水稀释定容至 10 mL,制成质量浓度分别为 24.65、49.30、73.95、98.60、123.25、147.90 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。精密吸取各储备液 1 mL 于 20 mL 具塞试管中,加新制 5%苯酚溶液 1 mL,混匀,立即加入 83.3%硫酸溶液 5 mL,摇匀,沸水浴加热 30 min,取出,冰浴冷却,以纯水与相应的试剂为空白,按照紫外-可见分光光度法,在 488 nm 波长处测定吸光度(A)值,以 A 值为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),得回归方程为 $Y=5.6 \times 10^{-3} X - 0.0175$, $R^2=0.9994$,结果表明,黄芪多糖在 24.65~147.90 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.4 方法学考察 按照《中国药典》2020 年版^[2]方法进行方法学考察,得精密度、重复性、稳定性、平均加样回收率的 RSD 值分别为 0.15%、2.55%、1.07%、2.37%,平均加样回收率为 91.55%。

2.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.02% 甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱:0~30 min, 16%~49%

乙腈; 30~50 min, 49%~16%乙腈; 柱温 30 °C; 检测波长 360 nm; 进样量 40 μL; 体积流量 1.0 mL/min。检测成分达到基线分离, 理论塔板数均大于 3000。色谱图见图 1。

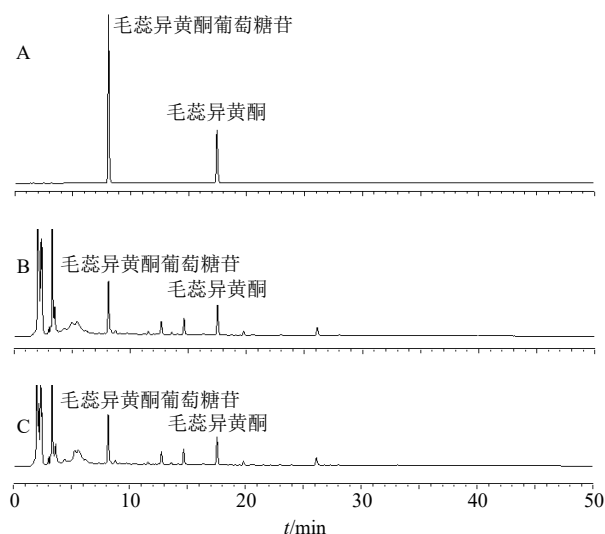


图 1 混合对照品溶液 (A)、黄芪提取液 (B) 和超滤液 (C) 的 HPLC 图 (二极管阵列检测)

Fig. 1 HPLC chart (PDA) of mixed reference substances solution (A), *Astragali Radix* extract (B) and *Astragali Radix* ultrafiltrate (C) (PDA)

2.2.2 对照品溶液的制备

(1) 毛蕊异黄酮葡萄糖苷: 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 1.23 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 mL, 得 0.123 mg/mL 对照品储备液, 精密吸取上述储备液 2 mL, 甲醇定容至 5 mL, 制成含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 49.2 μg/mL 的对照品溶液。

(2) 毛蕊异黄酮: 精密称取毛蕊异黄酮对照品 2.49 mg, 甲醇定容至 10 mL, 得 0.249 mg/mL 对照品储备液; 精密吸取上述储备液 1 mL, 加甲醇制成质量浓度为 24.9 μg/mL 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取黄芪提取液、超滤液各 2.5 mL 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容、摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取上述 49.2 μg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 1.0、2.5、5.0、10.0、15.0 μL 和 24.9 μg/mL 毛蕊异黄酮对照品溶液 2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 μL, 精密进样测定, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X) 做线性回归曲线, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷回归方程为 $Y=230.71 X+43.821$, $R^2=$

0.999 5, 线性范围 49.2~738.0 g; 毛蕊异黄酮回归方程为 $Y=133.08 X-38.364$, $R^2=1.000 0$, 毛蕊异黄酮在 49.8~622.5 μg 线性关系良好。

2.2.5 方法学考察 按照《中国药典》2020 年版^[2]方法进行方法学考察, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷的精密密度、重复性、稳定性、平均加样回收率的 RSD 分别为 0.98%、2.28%、1.18%、2.88%, 平均加样回收率为 99.94%; 毛蕊异黄酮的精密密度、重复性、稳定性、平均加样回收率的 RSD 分别为 0.63%、2.51%、1.48%、2.79%, 平均加样回收率为 99.72%。

2.3 黄芪甲苷含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 键合硅胶柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.02% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~30 min, 16%~49% 乙腈; 30~50 min, 49%~16% 乙腈; 柱温 30 °C; 进样量 40 μL; 体积流量 1.0 mL/min; 蒸发光散射检测器: 气体压力 275.79 kPa (40.0 psi); 漂移管温度 65 °C。检测成分达到基线分离, 理论塔板数均大于 4000。色谱图见图 2。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 5.28 mg, 加 80% 甲醇溶解并定容至 10 mL, 制成 0.528 mg/mL 黄芪甲苷对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 量取不同工艺条件下的提取液和超滤液各 20 mL, 水饱和正丁醇溶液萃取

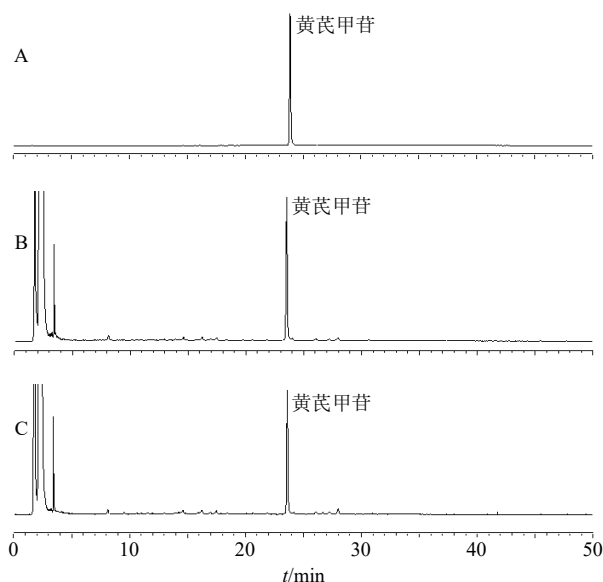


图 2 对照品溶液 (A)、黄芪提取液 (B) 和超滤液 (C) 的 HPLC 图 (蒸发光散射检测)

Fig. 2 HPLC chart (ELSD) of reference substance solution (A), *Astragali Radix* extract (B) and *Astragali Radix* ultrafiltrate (C) (ELSD)

4次(40 mL/次),合并正丁醇液,氨水洗2次(40 mL/次),保留正丁醇液,新的水饱和和正丁醇液反萃取氨试液2次(20 mL/次),弃去氨试液,合并所有正丁醇液,水浴蒸干,甲醇定容至10 mL,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取质量浓度为0.528 mg/mL对照品溶液1.0、2.0、5.0、10.0、15.0 μL,进样测定,记录峰面积。以峰面积的对数为纵坐标(Y),进样体积的对数为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y=1.6506X+1.9844$, $R^2=0.9992$,黄芪甲苷在0.528~7.920 μg呈良好的线性关系。

2.3.5 方法学考察 按照《中国药典》2020年版^[2]方法进行方法学考察,得精密度、重复性、稳定性、平均加样回收率的RSD分别为1.02%、1.47%、2.02%、2.81%,平均加样回收率为99.52%。

2.4 醇溶性浸出物含量测定

精密称取不同工艺条件下的干膏适量于锥形瓶中,加入40倍无水乙醇,称定质量,超声45 min,放置室温后补足缺失的质量,离心,上清液水浴蒸干,于鼓风干燥箱中105℃干燥3 h,取出放置干燥器中冷却30 min,称定质量,计算其含量。

2.5 层次分析法确定各指标权重

2.5.1 建立优先矩阵^[10-13]

(1) 提取:选取黄芪多糖(W_1)、醇溶性浸出物(W_2)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(W_4)、黄芪甲苷(W_5)、毛蕊异黄酮(W_6)的含量以及出膏率(W_3)作为权重指标,以层次分析法进行量化,令6项指标分4个层次,并规定各指标的先行顺序为 $W_1=W_2>W_3>W_4=W_5>W_6$,构建成对比较的判断优先矩阵见表1。

(2) 超滤纯化:以黄芪多糖(W_1)、醇溶性浸出物(W_2)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(W_4)、毛蕊异黄酮(W_6)、黄芪甲苷(W_5)的保留率以及除杂率(W_3)

表1 指标成对比较优先判断矩阵(提取)

Table 1 Priority judgment matrix for pairwise comparison of indicators (extract)

指标	W_1	W_2	W_3	W_4	W_5	W_6
W_1	1	1	3	4	4	5
W_2	1	1	3	4	4	5
W_3	1/3	1/3	1	3	3	4
W_4	1/4	1/4	1/3	1	1	3
W_5	1/4	1/4	1/3	1	1	3
W_6	1/5	1/5	1/4	1/3	1/3	1

作为权重指标,以层次分析法进行量化,令6项指标分5个层次,并规定各指标的先行顺序为 $W_1>W_2>W_3>W_4=W_5>W_6$,构建成对比较的判断优先矩阵,见表2。

表2 指标成对比较优先判断矩阵(超滤纯化)

Table 2 Priority judgment matrix for pairwise comparison of indicators (ultrafiltration purification)

指标	W_1	W_2	W_3	W_4	W_5	W_6
W_1	1	3	4	5	5	6
W_2	1/3	1	3	4	4	5
W_3	1/4	1/3	1	3	3	4
W_4	1/5	1/4	1/3	1	1	3
W_5	1/5	1/4	1/3	1	1	3
W_6	1/6	1/5	1/4	1/3	1/3	1

2.5.2 权重系数的计算 按公式 $w_i'=(a_1a_2\cdots a_n)^{1/n}$ 计算初始权重系数(w_i'),并按公式(1)进行归一化权重系数(w_i),经计算,提取各指标 w_i 分别为0.3185、0.3185、0.1610、0.0805、0.0805、0.0411;超滤纯化各指标 w_i 分别为0.4207、0.2504、0.1448、0.0732、0.0732、0.0377。

$$w_i = w_i' / \sum_{i=1}^n w_i' \quad (1)$$

2.5.3 一致性检验 通过随机一致比例因子(CR)=CI/RI(CI为一一致性指标,RI为平均随机一致性指标,RI=1.26,式中RI为固定值,即查表值,与对应的n相关,本实验中n为6,对应的RI值为1.26)来权衡 w_i 是否合理。结果 $CR<0.1$,表明优先比较矩阵一致性良好,权重系数合理有效。

$$CI = (\lambda_{\max} - n) / (n - 1) \quad (2)$$

$$\lambda_{\max} = 1/n \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (a_{ij} w_j / w_i) \quad (3)$$

λ_{\max} 为最大特征根, i 为矩阵中的行, j 为矩阵中的列, n 为指标个数

2.5.4 综合评分(Y) 按式(4)计算Y。

$$Y = w_1 W_{1i} / W_{1\max} + w_2 W_{2i} / W_{2\max} + \cdots + w_6 W_{6i} / W_{6\max} \quad (4)$$

W_{1i} 、 W_{2i} 、 \cdots 、 W_{6i} 分别为6种指标的含量, W_{\max} 为各指标含量的最大值, w_1 、 w_2 、 \cdots 、 w_6 分别为各指标的权重系数

2.6 提取工艺研究

2.6.1 提取 称取200 g黄芪饮片置于圆底烧瓶中,采用加热回流法,按表3中正交试验设计进行提取。前期通过预实验测得黄芪饮片的吸水量和最小加水

量分别为干饮片质量的2倍和4倍量。

2.6.2 正交试验 以加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,以“2.5.1”项中各指标

的综合评分为评价指标,优选黄芪最佳提取工艺,

$L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果见表3,方差分析见表4。

由正交试验结果的直观分析可知,各因素对黄

表3 黄芪提取工艺的正交试验因素水平设计及结果

Table 3 Orthogonal test factor level design and results of extraction process of *Astragali Radix*

序号	A/倍	B/min	C/次	D(空白)	$W_1/(mg \cdot g^{-1})$	$W_2/(mg \cdot g^{-1})$	$W_3/\%$	$W_4/(mg \cdot g^{-1})$	$W_5/(mg \cdot g^{-1})$	$W_6/(mg \cdot g^{-1})$	Y
1	8(1)	90(1)	1(1)	(1)	7.163 4	25.268 2	27.92	0.207 1	0.702 7	0.103 4	0.657 0
2	8(1)	150(2)	2(2)	(2)	8.378 3	36.556 9	33.00	0.230 0	0.805 2	0.119 0	0.818 7
3	8(1)	210(3)	3(3)	(3)	9.354 8	39.555 7	34.94	0.239 1	0.856 1	0.105 3	0.878 5
4	12(2)	90(1)	2(2)	(3)	8.229 2	30.945 6	33.77	0.217 0	0.838 4	0.102 7	0.768 3
5	12(2)	150(2)	3(3)	(1)	10.051 3	41.002 4	36.89	0.237 7	0.896 7	0.122 3	0.924 9
6	12(2)	210(3)	1(1)	(2)	7.997 8	39.019 0	33.10	0.231 0	0.858 5	0.109 8	0.830 1
7	16(3)	90(1)	3(3)	(2)	10.807 2	37.448 0	36.43	0.240 9	0.886 3	0.125 7	0.916 5
8	16(3)	150(2)	1(1)	(3)	10.651 2	35.841 8	33.22	0.225 3	0.846 4	0.1234	0.877 4
9	16(3)	210(3)	2(2)	(1)	12.134 0	40.617 3	37.34	0.281 7	0.954 4	0.115 3	0.993 7
K_1	2.354 2	2.341 8	2.364 5	2.575 6							
K_2	2.523 3	2.621 0	2.580 7	2.565 3							
K_3	2.787 6	2.702 3	2.719 9	2.524 2							
R	0.433 4	0.360 5	0.355 4	0.051 4							

表4 正交试验方差分析结果

Table 4 Results of ANOVA of orthogonal test

误差来源	偏差平方和/ ($\times 10^{-4}$)	自由度	F值	显著性
A	318.094 3	2	64.518 4	$P < 0.05$
B	238.358 4	2	48.345 7	$P < 0.05$
C	213.809 2	2	43.366 5	$P < 0.05$
D(误差)	4.930 3	2		

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

芪提取工艺的影响顺序为A(加水量)>B(提取时间)>C(提取次数),由方差分析结果可知,因素A、B、C的 $P < 0.05$,表明3因素对实验结果均具有显著性影响。结合2种分析结果,最终优选最佳提取工艺为 $A_3B_3C_3$,即溶剂为16倍(6.67、4.67、4.67倍),提取次数为3次,提取总时间为210 min(70 min/次)。

2.6.3 验证试验 以最佳提取工艺条件平行提取3批饮片,按含量测定方法处理及测定各指标。经计算分析可知各指标RSD值均 $< 3\%$,表明该提取工艺稳定可靠、可行性高。结果见表5。

2.7 超滤纯化工艺研究

2.7.1 超滤纯化 量取提取液19.0 L进行超滤纯化,接收超滤液14.5 L后(超滤设备死体积4.5 L),于截留液中加纯水4.5 L(第1次稀释),连续稀释3次,共得超滤液28 L,截留液4.5 L。

2.7.2 正交试验 影响纯化效果的主要因素为膜孔径、操作压力、料液温度、膜面错流速度,前期预实验通过固定后三者,优选最佳膜孔径(100、50、20 nm),结果表明膜孔径为50 nm时,其超滤纯化效果最佳。故本实验选用孔径为50 nm的陶瓷膜,以操作压力(A)、料液温度(B)和膜面错流速度(C)为考察因素,以“2.5.1”中各指标的综合评分

表5 最佳提取工艺验证结果

Table 5 Validation results of best extraction process

批次	$W_1/(mg \cdot g^{-1})$	$W_2/(mg \cdot g^{-1})$	$W_3/\%$	$W_4/(mg \cdot g^{-1})$	$W_5/(mg \cdot g^{-1})$	$W_6/(mg \cdot g^{-1})$	Y
1	13.379 0	42.068 1	35.30	0.228 6	0.913 6	0.122 8	0.993 1
2	13.538 1	41.978 3	35.41	0.223 7	0.908 8	0.118 9	0.993 3
3	13.628 0	40.740 7	34.51	0.224 9	0.897 9	0.124 7	0.983 3
RSD/%	1.24	1.98	1.40	1.13	0.89	2.42	0.58

为评价指标, 优选最佳超滤工艺参数, $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果见表6, 方差分析见表7。

由正交试验结果直观分析可知, 各因素对黄芪超滤纯化工艺的影响顺序为 B(料液温度) > A(操作压力) > C(膜面错流速度)。

表6 黄芪超滤纯化工艺的正交试验设计及结果

Table 6 Orthogonal experimental design and results of ultrafiltration process of Astragali Radix

序号	A/MPa	B/℃	C/(m·s ⁻¹)	D(空白)	W ₁ /%	W ₂ /%	W ₃ /%	W ₄ /%	W ₅ /%	W ₆ /%	Y
1	0.08 (1)	25 (1)	3.3 (1)	(1)	64.65	90.88	14.47	86.67	86.04	84.82	0.878 1
2	0.08 (1)	32.5 (2)	4.3 (2)	(2)	61.18	88.25	10.84	93.23	90.22	88.99	0.827 1
3	0.08 (1)	40 (3)	5.3 (3)	(3)	63.86	89.54	8.43	95.08	96.00	96.73	0.828 6
4	0.10 (2)	25 (1)	4.3 (2)	(3)	76.49	84.67	10.99	92.90	97.12	97.12	0.903 2
5	0.10 (2)	32.5 (2)	5.3 (3)	(1)	73.75	90.31	9.29	93.17	96.20	90.28	0.884 8
6	0.10 (2)	40 (3)	3.3 (1)	(2)	75.04	78.99	8.47	93.15	96.73	95.62	0.854 6
7	0.12 (3)	25 (1)	5.3 (3)	(2)	84.40	86.74	10.26	92.59	98.04	95.12	0.940 6
8	0.12 (3)	32.5 (2)	3.3 (1)	(3)	78.87	82.02	8.90	90.83	89.04	97.14	0.879 3
9	0.12 (3)	40 (3)	4.3 (2)	(1)	70.53	91.88	7.52	95.66	98.02	97.46	0.861 3
K ₁	2.533 8	2.721 9	2.612 0	2.624 2							
K ₂	2.642 6	2.591 2	2.591 6	2.622 3							
K ₃	2.681 2	2.544 5	2.654 0	2.611 1							
R	0.147 4	0.177 4	0.062 4	0.013 1							

表7 正交试验方差分析结果

Table 7 Results of ANOVA of orthogonal test

误差来源	偏差平方和/ (×10 ⁻⁴)	自由度	F 值	显著性
A	38.949 1	2	116.590 7	P<0.01
B	56.371 3	2	168.742 6	P<0.01
C	6.748 8	2	20.202 0	P<0.05
D(误差)	0.334 1	2		

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

作压力) > C(膜面错流速度)。且结果显示, 操作压力与膜面错流速度越大, 料液温度为室温时, 超滤结果越好。较高的压力更有利于有效成分透过膜; 较高的膜面错流速度有利于带走膜表面的溶质和颗粒, 降低浓差极化, 从而使有效成分更易进入透过液中; 料液温度接近室温时, 可防止因超滤时间过长而导致的料液变质。

由方差分析结果可知, 因素 A、B、C 的 $P < 0.05$, 表明 3 者对实验结果均具有显著性影响。结合 2 种分析结果, 最终优选出最佳超滤纯化工艺为 A₃B₁C₃, 即操作压力 0.12 MPa, 料液温度 25 ℃, 膜面错流速度 5.3 m/s。

2.7.3 验证试验 按上述优选出的提取及超滤工艺平行制备 3 批超滤液, 以建立的含量测定方法测定各指标, 结果见表 8。通过计算可知, 各指标的 RSD 值均 < 3%, 结果表明该超滤纯化工艺科学合理、稳

表8 最佳超滤纯化工艺验证结果

Table 8 Validation results of best ultrafiltration purification process

序号	W ₁ /%	W ₂ /%	W ₃ /%	W ₄ /%	W ₅ /%	W ₆ /%	Y
1	80.38	84.25	10.29	97.72	98.22	96.73	0.980 5
2	81.13	81.25	10.05	95.12	97.95	94.79	0.969 1
3	84.20	80.28	9.95	94.46	95.84	97.79	0.979 2
RSD/%	2.47	2.53	1.73	1.80	1.34	1.58	0.64

定可行。

2.8 黄芪提取液与超滤液的特征图谱建立

2.8.1 色谱条件及溶液的制备 色谱条件及溶液的制备同含量测定(供试品溶液的制备均采用“2.2.3”项下方法)。

2.8.2 检测波长的确定 将提取液通过 PDA 测器检测, 于 200~400 nm 波长下进行扫描, 确定色谱图中化学成最多、各色谱峰分离完全、峰形较好的吸收波长为 230 nm。

2.8.3 特征图谱的测定^[14-17] 平行制备 6 批超滤液(S1~S6), 按照“2.8.1”项下方法制备供试品溶液, 分别进行 HPLC-PDA 和 HPLC-ELSD 检测, 记录 40 min 色谱图, 将测得的液相色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)对色谱图进行匹配, 建立特征图谱。以超滤前提取液的特征图谱(R)为参照, 时间窗宽度设置为 0.5 min, 通

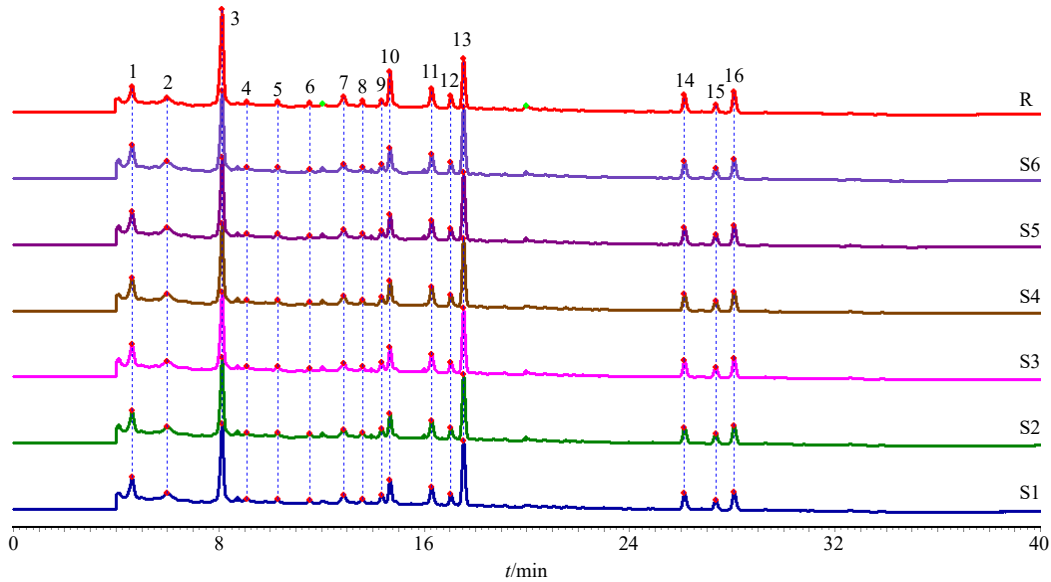
过多点校正、全谱峰匹配生成6批超滤液的共有特征图谱，并以R图谱为对照特征图谱。

HPLC-PDA 检测结果见图3。确定16个共有特征峰，共有峰面积占总色谱峰面积95%以上，符合特征图谱的规定，根据对照品保留时间，共指出4个色谱峰，分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷(3号峰)、芒柄花苷(10号峰)、毛蕊异黄酮(13号峰)、芒柄花素(14号峰)。

HPLC-ELSD 检测结果见图4。确定15个共有特征峰，共有峰面积占总色谱峰面积90%以上，符合特征图谱的规定，并共指出6个色谱峰，分别

为毛蕊异黄酮葡萄糖苷(1号峰)、芒柄花苷(3号峰)、毛蕊异黄酮(6号峰)、黄芪甲苷(8号峰)、黄芪皂苷II(10号峰)、黄芪皂苷I(14号峰)。

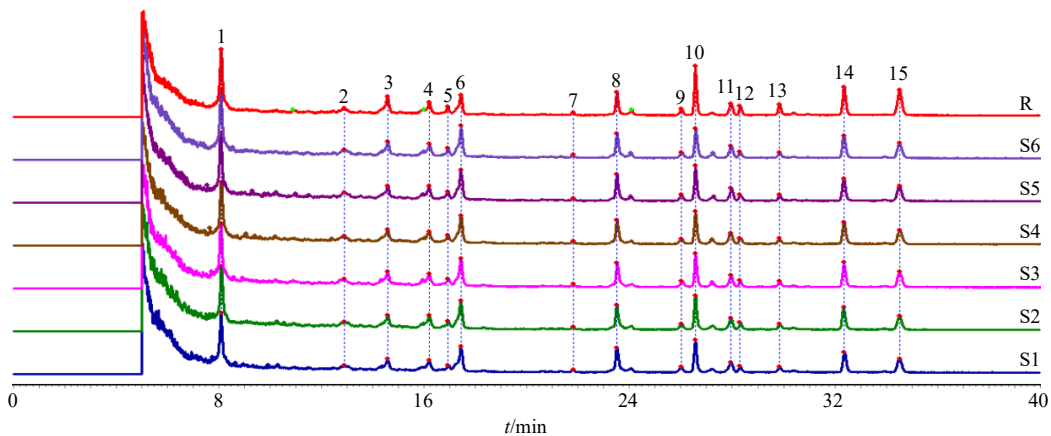
2.8.4 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)评价相似度，分析6批超滤液特征图谱各批次间以及各批次与对照特征图谱的相似度，结果见表9、10，相似度均在0.965~1.000，故各批次间以及各批次与对照特征图谱的相似度良好。其结果表明黄芪超滤液与提取液的化学成分一致性较好，并且各批次超滤液中的化学成分稳定存在，所优化的超滤纯化工艺稳定合理。



3-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 10-芒柄花苷 13-毛蕊异黄酮 14-芒柄花素
3-calycosin-7-O-β-D-glucoside 10-ononin 13-calycosin 14-formononetin

图3 黄芪超滤液特征图谱及对照图谱(二极管阵列检测)

Fig. 3 Characteristic spectrum and control spectrum (PDA) of *Astragali Radix* ultrafiltrate



1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 3-芒柄花苷 6-毛蕊异黄酮 8-黄芪甲苷 10-黄芪皂苷II 14-黄芪皂苷I
1-calycosin-7-O-β-D-glucoside 3-ononin 6-calycosin 8-astragaloside IV 10-astragaloside II 14-astragaloside I

图4 黄芪超滤液特征图谱及对照图谱(蒸发光散射检测)

Fig. 4 Characteristic spectrum and control spectrum (ELSD) of *Astragali Radix* ultrafiltrate

表9 相似度评价结果 (二极管阵列检测)

Table 9 Similarity evaluation results (PDA)

批次	相似度						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	R
S1	1.000	0.996	0.993	0.997	0.995	0.995	0.977
S2	0.996	1.000	0.988	0.994	1.000	0.995	0.981
S3	0.993	0.988	1.000	0.996	0.993	0.989	0.980
S4	0.997	0.994	0.996	1.000	0.996	0.992	0.977
S5	0.995	1.000	0.993	0.996	1.000	0.988	0.983
S6	0.995	0.995	0.989	0.992	0.988	1.000	0.967
R	0.977	0.981	0.980	0.977	0.983	0.967	1.000

表10 相似度评价结果 (蒸发光散射检测)

Table 10 Similarity evaluation results (ELSD)

批次	相似度						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	R
S1	1.000	0.996	0.993	0.997	0.995	0.995	0.977
S2	0.996	1.000	0.988	0.994	1.000	0.995	0.981
S3	0.993	0.988	1.000	0.996	0.993	0.989	0.980
S4	0.997	0.994	0.996	1.000	0.996	0.992	0.977
S5	0.995	1.000	0.993	0.996	1.000	0.988	0.983
S6	0.995	0.995	0.989	0.992	0.988	1.000	0.967
R	0.977	0.981	0.980	0.977	0.983	0.967	1.000

3 讨论

现代研究表明黄芪中主要含有黄酮类、多糖类和皂苷类等有效成分,具有较高的药用价值^[18-20]。既能最大限度的提取和保留黄芪中原有有效成分,又兼顾去粗取精是本研究的首要目的以及需解决的主要问题。黄芪水提液中存在直链淀粉,以苯酚-硫酸法测定多糖时其会对结果产生影响,因此,本实验考察了水提液初步沉淀的含醇量,以碘液为指示剂,于水提液中加入乙醇,使含醇量从30%逐步增到55%,经考察,当含醇量为47%时,既可除去提取液中绝大部分直链淀粉,又基本不会损失分子量较小的多糖。

在醇浸出物测定中,乙醇的用量对于最大限度保留黄酮类和皂苷类等小分子有效成分至关重要。因此,考察了不同乙醇量(25~45倍量)对醇溶性物质浸出率的影响,结果随着乙醇用量倍数的增加,浸出率随之增加,但增加趋势于40倍用量后逐渐趋于平缓,故本实验最终选用40倍量醇测定醇浸出物。

前期研究考察了孔径为100、50、20 nm的超滤

膜对提取液的纯化效果,研究发现,膜孔径为100 nm时,多糖的保留率最高,由于孔径大,部分杂质未被截留,使得杂质透过滤膜进入到超滤液中,使得超滤液的澄明度、色泽以及浊度等均不抵其他二者;20 nm的膜由于孔径小,相对分子质量相对较大的有效成分难以透过,导致各有效成分的保留率较低;同时,测得20、50、100 nm膜孔径下的膜通量分别为40.25、54.32、45.53 L/(m²·h)。综上所述,本实验最终选择孔径为50 nm的陶瓷膜超滤纯化黄芪水提液。

在超滤过程中由于水透过膜,使膜表面的溶质浓度增高,形成梯度,在浓度梯度的作用下,溶质与水以相反的方向扩散,当扩散达到平衡状态,膜表面形成溶质浓度较高的边界层,这种膜表面溶质浓度高于主体溶质浓度的现象,称之为浓差极化现象^[21-23]。浓差极化边界层的形成,会增大膜两层的渗透压差,使有效压差减小,从而导致膜通量降低。目前膜分离技术在中药制剂生产研究中,将膜面错流速度作为考察因素的研究鲜有报道,而膜面错流速度是降低浓差极化的重要措施之一,较高的膜面错流速度拥有较大的剪切力,其有利于将膜表面的溶质和颗粒带走,降低浓差极化,进而可以有效的提高膜通量。因此,本实验首次在超滤纯化工序研究中考察了膜面错流速度对超滤工艺的影响,研究结果显示,膜面错流速度对实验结果具有显著性影响,并且随着错流速度的增大效果越好,但也不可过大,还需结合仪器的使用限度。

黄芪提取液经超滤后颜色由土黄色转为金黄色,且更加澄清透明,浊度与黏度也均降低。最终得到的超滤液中黄芪多糖和醇溶性浸出物含量的保留率分别可达81.90%和81.93%,除杂率为10.10%,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷和毛蕊异黄酮含量的保留率分别为95.77%、97.34%和96.44%。

综上所述,以超滤技术纯化黄芪提取液,既可除去提取液中的悬浮物和水溶性大分子杂质,又可极大限度的保留黄芪中原有有效成分,即达到了去粗取精的目的。并且通过验证试验以及特征图谱结果表明所建立的黄芪提取与超滤纯化工序方法稳定可靠、科学合理、安全经济,有良好的工业化生产前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曲敬蓉,张艳艳,宿宏佳,等.黄芪多糖激活Nrf2/HO-

- 1 信号通路改善模型大鼠糖尿病性肝损伤 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(10): 1422-1427.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 315.
- [3] Hao J, Li J, Li X X, *et al.* Aromatic constituents from the stems of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 354.
- [4] Liang W F, Li H T, Zhou H Y, *et al.* Effects of *Taraxacum* and *Astragalus* extracts combined with probiotic *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* on *Escherichia coli*-infected broiler chickens [J]. *Poult Sci*, 2021, 100(4): 101007.
- [5] 朱应怀, 刘晓霞, 王继龙, 等. 基于陶瓷膜超滤技术的甘草酸和甘草苷同步提取纯化工艺研究 [J]. 中草毒, 2016, 47(23): 4173-4178.
- [6] 成小翔, 朱学武, 梁恒, 等. 臭氧/陶瓷超滤膜短流程净水工艺试验研究 [J]. 中国给水排水, 2017, 33(1): 22-26.
- [7] 武景路, 王青, 祝帆, 等. 陶瓷膜超滤精制金银花水提液的工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(2): 148-150.
- [8] 王彦平, 娄芳慧, 陈月英, 等. 苯酚-硫酸法测定紫山药多糖含量的条件优化 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 170-174.
- [9] 魏舒畅, 王继龙, 李昶, 等. 改良差示酚磺法测定红芪粗多糖的方法研究 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 634-636.
- [10] 钱怡洁, 皮文霞, 朱广飞, 等. 基于熵权法结合层次分析法和反向传播神经网络优选酒萸肉蒸制工艺 [J]. 中草毒, 2021, 52(22): 6816-6824.
- [11] 万玲娟, 李真真, 魏舒畅, 等. 基于流变学指标的后交联祖师麻凝胶贴膏剂混合工艺研究 [J]. 中草毒, 2020, 51(12): 3187-3193.
- [12] 高畅, 吴振起, 杨璐, 等. 层次分析法多指标正交试验优选养阴清肺汤加味醇提工艺 [J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(3): 50-53.
- [13] 刘蕤, 陈紫雯, 华桂丰, 等. 基于层次分析法(AHP)的保健食品原料评价体系构建及分析 [J]. 中草毒, 2020, 51(18): 4829-4836.
- [14] 任松鹏. 复方黄柏凝胶特征图谱建立及相关质量评价研究 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [15] 谢平, 陈丹, 陈红, 等. 三叶青藤叶配方颗粒与饮片化学等量性及抗炎等效性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 2945-2954.
- [16] 任明军, 胡云飞, 朱永波, 等. 基于色谱指纹图谱和含量测定相结合的青风藤质量控制方法研究 [J]. 中草毒, 2022, 53(5): 1338-1344.
- [17] Yang X S, Kong J, Zhang L L, *et al.* Study on the fingerprint of *Stellariae Radix* by UPLC [J]. *J Phys: Conf Ser*, 2020, 1549(3): 032025.
- [18] 姜辉, 顾胜龙, 张玉婷, 等. 黄芪化学成分和药理作用研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(5): 93-96.
- [19] 杨志城, 杨羽君, 鄂秀辉. 蒙古黄芪与膜荚黄芪差异性研究进展 [J]. 中药材, 2020, 43(5): 1261-1265.
- [20] 谢静, 龚易昕悦, 丁立生, 等. 黄芪及其活性成分对脓毒症临床和药理作用的研究进展 [J]. 中草毒, 2021, 52(8): 2502-2510.
- [21] Field R W, Wu J J. Permeate flux in ultrafiltration processes-understandings and misunderstandings [J]. *Membranes*, 2022, 12(2): 187.
- [22] 闫治攀, 武瑞洁. 超滤膜分离技术在中药制剂生产中的应用进展 [J]. 中成药, 2018, 40(7): 1571-1575.
- [23] 李存玉, 马赞, 刘奕洲, 等. 超滤-纳滤联用优化益母草生物碱的浓缩工艺 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 100-106.

[责任编辑 郑礼胜]