

·中药制剂与工艺·

本文引用:张可人,张依人,彭买姣,陈叶童,毛文点,钟源,阳佑华,邹龙.陶瓷膜分离技术精制古汉养生精提取液的工艺研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):875-878.

## 陶瓷膜分离技术精制古汉养生精提取液的工艺研究

张可人<sup>1</sup>,张依人<sup>1</sup>,彭买姣<sup>1</sup>,陈叶童<sup>1</sup>,毛文点<sup>1</sup>,钟源<sup>2,3</sup>,阳佑华<sup>2,3</sup>,邹龙<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.启迪古汉集团衡阳中药有限公司,湖南衡阳 421003;

3.湖南省中药液体制剂工程技术研究中心,湖南衡阳 421003)

**[摘要]** 目的 采用陶瓷膜分离技术优化古汉养生精提取液的分离精制工艺,降低生产成本,提高提取液的澄清度。方法 对陶瓷膜孔径、药液浓度、温度进行考察,以淫羊藿苷转移率、多糖及蛋白质去除率、浸膏得率为评价指标,通过正交实验优化古汉养生精提取液的纯化工艺。结果 古汉养生精提取液陶瓷膜分离的最佳工艺参数为膜孔径 500 nm、料液比 1:15、温度 25 ℃。在此优化条件下古汉养生精的淫羊藿苷平均转移率为(92.4±0.6)%,RSD 1.15%;多糖平均去除率(70.4±0.7)%,RSD 1.26%;蛋白平均去除率(23.5±0.2)%,RSD 1.30%;浸膏平均得率(17.6±0.2)%,RSD 1.50%;综合评分 0.1837。结论 采用陶瓷膜技术精制古汉养生精提取液工艺稳定可行,可为古汉养生精工业化生产技术优化提供科学依据。

**[关键词]** 古汉养生精口服液;陶瓷膜;淫羊藿苷

**[中图分类号]**R284.2

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.08.008

### Process Parameters of Ceramic Membrane Separation Technique for Purification of Ancient Han Health-keeping Extract

ZHANG Keren<sup>1</sup>, ZHANG Yiren<sup>1</sup>, PENG Maijiao<sup>1</sup>, CHEN Yetong<sup>1</sup>, MAO Wendian<sup>1</sup>, ZHONG Yuan<sup>2,3</sup>, YANG Youhua<sup>2,3</sup>, ZOU Long<sup>1\*</sup>  
(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hengyang Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Tus-Guhan Group Corporation, Hengyang, Hunan 421003, China; 3. Hunan Engineering & Technology Research Center for Traditional Chinese Medicine Liquid Preparation, Hengyang, Hunan 421003, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the separation and purification process of ancient Han health-keeping extract by ceramic membrane separation technique, in order to reduce production costs and improve the clarity of this extract. **Methods** The pore size of ceramic membrane, solid-liquid ratio, and temperature were analyzed, and with the transferring rate of icariin, removal efficiency of polysaccharides and protein, and extract yield as assessment indices, an orthogonal experiment was performed to optimize the purification process for ancient Han health-keeping extract. **Results** The optimal process parameters for ceramic membrane separation for ancient Han health-keeping extract were a membrane pore size of 500 nm, a solid-liquid ratio of 1:15, and a temperature of 25 ℃. Under these optimized conditions, the mean transferring rate of icariin was (92.4±0.6)% (RSD=1.15%), the mean removal efficiencies of polysaccharides and protein were (70.4±0.7)% (RSD=1.26%) and (23.5±0.2)% (RSD=1.30%), respectively, and the mean extract yield was (17.6±0.2)% (RSD=1.50%); the comprehensive score was 0.1837. **Conclusion** Ceramic membrane separation technique is stable and feasible in the preparation of ancient Han health-keeping extract and provides a scientific basis for the optimization of industrial production technique for ancient Han health-keeping extract.

**[Keywords]** ancient Han health-keeping extract oral liquid; ceramic membrane; icariin

古汉养生精口服液由淫羊藿、人参、黄芪、枸杞、女贞子、黄精等药材组成,具有补气、滋肾益精,补脑安神之效,可用于气阴亏虚、肾精不足所致的失眠、耳鸣、心悸、健忘等<sup>[1-2]</sup>。

**[收稿日期]**2018-06-25

**[基金项目]**湖南省科技厅县域经济发展技术创新引导专项项目(2015SK2094)。

**[作者简介]**张可人,女,在读硕士研究生,主要从事中药制剂新技术。

**[通讯作者]**\*邹龙,男,教授,博士,硕士研究生导师,E-mail:1042231287@qq.com。

目前,醇沉法是古汉养精口服使用的纯化工艺,主要是利用中药的部分有效成分既溶于醇又溶于水的性质,除去部分不溶于乙醇的成分如蛋白质、多糖等,以达到去除杂质,提高药液澄明度的目的<sup>[9]</sup>。但是醇沉工艺成本高、效率低,甚至会造成某些水溶性小的有效成分的损失,影响药物疗效<sup>[4]</sup>,因此,利用新型分离纯化技术提高古汉养精口服液产品质量显得尤为重要。

陶瓷膜分离技术凭借其节能环保、操作简单、分离效果好等特点,在制药行业中具有一定的优势。陶瓷膜分离技术是以选择性透过膜为分离介质,当膜两侧存在压力差时,原料组分选择性的透过膜,从而达到分离、提纯的目的。整个过滤过程,不涉及任何化学反应,无需添加任何化学试剂,陶瓷膜凭借膜孔径的大小,截留分子量不同的物质,比如多糖、蛋白质、鞣质等杂质,对有效成分影响小,生产成本低。本课题运用陶瓷膜分离技术精制古汉养精提取液,研究报道如下。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

戴安 U3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司); Lambda35 型紫外分光光度仪(珀金埃尔仪器有限公司); BP221S 型电子分析天平(赛多利斯仪器公司); WMK-02 型恒温干燥箱(湖北省黄石市医疗器械厂); DL-360D 型超声机(上海之信仪器有限公司); 陶瓷膜分离装置(湖州东润环保设备有限公司)。

### 1.2 材料

淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110737-200415);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

古汉养精提取液所用的人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、炙黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)、金樱子(*Rosa laevigata* Michx.)、枸杞子(*Lycium barbarum* L.)、女贞子(*Ligustrum lucidum* Ait.)、菟丝子(*Cuscuta australis* R. Br.)、淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)、白芍(*paeonia lactiflora* Pall.)、炙甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、炒麦芽(*Hordeum vulgare* L.)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.),经湖南中医药大学邹龙教授鉴定均符合《中华人民共和国药典》2015年版一部相关药材项下的有关规定<sup>[9]</sup>,药材均购于安国圣山药业有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 陶瓷膜分离操作

在物料桶中加入 30 L 经高速离心后的古汉养

生精提取液(因属于中药保护品种,所制备工艺暂未公开),用不同孔径的膜在不同操作参数下进行分离,收集透过液。当透过液收集到 80%时,在物料桶中加入 20%的纯化水,继续分离,透过液接到 100%后停止。

### 2.2 淫羊藿含量的测定

2.2.1 色谱条件<sup>[5]</sup> 色谱柱(Agilent C<sub>18</sub>, 4.6 mm×150 mm, 5 μm),以乙腈-水(30:70)为流动相,检测波长为 270 nm,进样量为 10 μL,流速 1 mL/min。此色谱条件下,淫羊藿苷可与其他成分达到较好分离,阴性无干扰。供试品与对照品的色谱图见图 1。

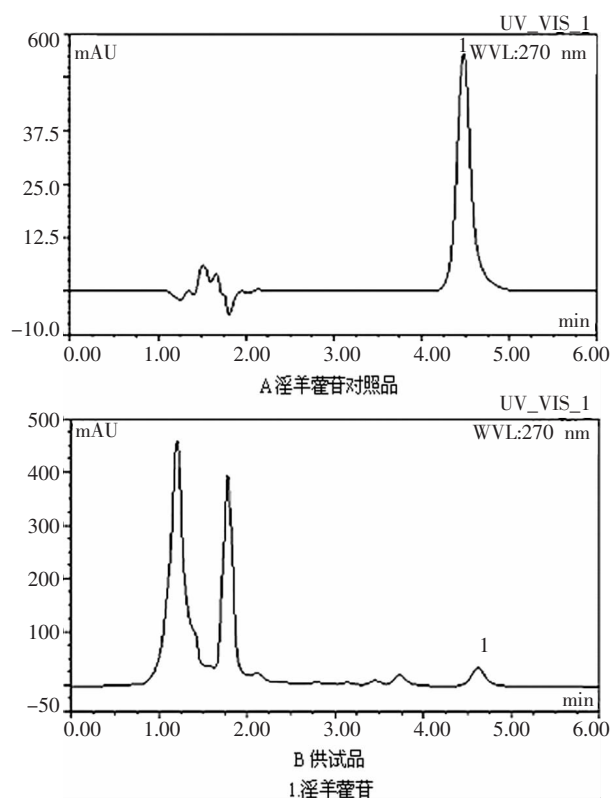


图 1 淫羊藿苷对照品与古汉养精供试品 HPLC 图

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取药液 5 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇 40 mL,超声处理 30 min,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性溶液的制备 按处方取除去淫羊藿药材外的 10 味药材,按其制备工艺制备,再按“2.2.2”项下方法处理,即得。

2.2.4 线性关系 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇溶解制成 1 mL 含 100 μg 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液 1、2、3、4、5、10 mL 于 25 mL 容量瓶,加甲醇至刻度,摇匀。按“2.2.1”项下色谱条件测定淫羊藿苷峰面积。以淫羊藿苷峰面积值(Y)为纵坐标,淫羊藿苷浓度(X)为横坐标进行回归,回归方程为  $Y=0.376 X-0.217 4$ ,相关系数  $r=0.999 1$ 。表明,淫羊藿苷在 4-40 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.5 样品测定 精密吸取“2.2.2”项下供试品液

10  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件测定淫羊藿苷峰面积,按下式计算淫羊藿苷转移率。

$$\text{淫羊藿苷转移率}(\%) = \frac{\text{透过液中淫羊藿苷的质量}}{\text{原液中淫羊藿苷的质量}} \times 100\%$$

### 2.3 多糖含量的测定

2.3.1 对照品溶液的配制 精密称取 D-无水葡萄糖 0.011 4 g 置于 100 mL 容量瓶中,加纯化水溶解并稀释至刻度,摇匀得 114  $\mu\text{g/mL}$  的多糖对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液配制 取原药液、陶瓷膜透过液各 1 mL,加无水乙醇 4 mL,混匀,离心(3 000 r/min) 5 min,弃去上清液,沉淀用 8 mL 的 80%乙醇洗涤,离心 10 min,洗涤 2 次,弃去洗液,残渣用沸水多次提取,合并提取液转移至 25 mL 容量瓶中并定容,即得供试品溶液。

2.3.3 线性关系考察 取对照品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中,加入蒸馏水补至 2 mL,加入 5%苯酚溶液 1 mL,迅速加入浓硫酸 5 mL,摇匀,放置 10 min,再置 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴中 15 min,取出,置于冰水中 5 min 至室温,于 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(Y)为纵坐标,D-无水葡萄糖浓度(X)为横坐标建立标准曲线<sup>[6-8]</sup>。

回归方程: $Y=0.014\ 8\ X+0.019\ 2$ , $r=0.995\ 9$

表明多糖在 5.7~57  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内与吸光度 Y 线性关系良好。

2.3.4 样品测定 取原药液、陶瓷膜透过液的供试品溶液 1 mL,按“2.3.3”项下操作同法制备,测吸光度,将测得的吸光度代入回归方程计算待测溶液中多糖的浓度。按下式计算多糖的去除率。

$$\text{多糖去除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{陶瓷膜透过液中多糖质量}}{\text{原药液中多糖质量}}\right) \times 100\%$$

### 2.4 蛋白质含量的测定

蛋白质的含量测定使用蛋白质定量测定试剂盒,具体操作步骤如下。

2.4.1 考马斯亮蓝染液的配制 取蛋白质定量测定试剂盒中的考马斯亮蓝储备液 10 mL 于 50 mL 容量瓶中,加 40 mL 的纯化水稀释,摇匀得考马斯亮蓝染液。

2.4.2 样品测定 在空白管中加入 50  $\mu\text{L}$  的纯化水、在标准管中加入蛋白质定量测定试剂盒中的 563  $\mu\text{g/mL}$  蛋白质标准品溶液、在样品管中加入 50  $\mu\text{L}$  的原药液或陶瓷膜透过液,最后在空白管、标准管、样品管中均加入 3 mL 的考马斯亮蓝染液,混匀,静置 10 min,于 595 nm 波长处测定各管吸光度值。按下式分别计算样品管中蛋白质浓度和蛋白质去除率。

样品管蛋白质浓度( $\mu\text{g/mL}$ )=

$$\left(1 - \frac{\text{样品管的吸光度} - \text{空白管的吸光度}}{\text{标准品的吸光度} - \text{空白管的吸光度}}\right) \times \text{标准品浓度}$$

$$\text{蛋白质去除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{陶瓷膜透过液中蛋白质的质量}}{\text{原药液中蛋白质的质量}}\right) \times 100\%$$

### 2.5 浸膏得率

取 50 mL 陶瓷膜透过液,置于已恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 105  $^{\circ}\text{C}$  中干燥 3 h,再移至于干燥器中,冷却 30 min。迅速精密称定质量,计算干浸膏得率。

### 2.6 古汉养生精陶瓷膜分离工艺的研究

2.6.1 指标数据的处理 以淫羊藿苷转移率、多糖去除率、蛋白质去除率、浸膏得率为指标,对 4 个指标进行归一化处理<sup>[9-10]</sup>。淫羊藿苷转移率、多糖去除率、蛋白质去除率的值越大越好,其归一化方程是:

$$d(\text{max}) = \frac{(Y_i - Y_{\text{min}})}{(Y_{\text{max}} - Y_{\text{min}})}$$

浸膏得率的值越小越好,其归一化方程是:

$$d(\text{min}) = \frac{(Y_{\text{max}} - Y_i)}{(Y_{\text{max}} - Y_{\text{min}})}$$

按归一化方程得出各指标的归一值后,再以权重系数综合评分法评价,淫羊藿苷转移率、多糖去除率、蛋白质去除率、浸膏得率的权重系数分别是 0.7、0.1、0.1、0.1。

2.6.2 陶瓷膜分离工艺的优化 参照文献[12-14]及预实验结果,选择陶瓷膜孔径、药液浓度、温度进行优化,采用三因素三水平的正交设计,用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验,以淫羊藿苷转移率、多糖去除率、蛋白质去除率、浸膏得率的综合评分为指标,所选因素及其水平见表 1。由表 2 极差分析可知,各因素对古汉养生精提取影响的大小顺序是:A>B>C,即膜孔径>浓度>温度。表 3 方差分析结果表明 A(膜孔径)和 B(浓度)对结果的影响具有显著性意义( $P < 0.05$ ),C(温度)对结果的影响没有显著性意义( $P > 0.05$ ),因此,从经济学角度考虑,最佳分离纯化工艺为  $A_3B_2C_1$ ,即陶瓷膜孔径为 500 nm,料液比 1:15,温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 因素与水平

水平	因素		
	A/膜孔径(nm)	B/料液比	C/温度( $^{\circ}\text{C}$ )
1	100	1:10	25
2	200	1:15	30
3	500	1:20	35

2.6.3 验证实验 为了考察工艺的稳定性与可靠性,按正交设计优选出来的最优工艺陶瓷膜孔径为 500 nm,料液比 1:15,温度 25  $^{\circ}\text{C}$  平行进行 3 次验证



表2 正交设计试验结果

试验号	因素			指标				
	A	B	C	淫羊藿苷转移率/%	多糖去除率/%	蛋白质去除率/%	浸膏得率/%	综合评分
1	1	1	1	65.8	72.3	44.9	13.2	0.057
2	1	2	2	77.1	86.4	48.6	17.6	0.123 3
3	1	3	3	74.0	83.3	38.3	15.7	0.102 1
4	2	1	2	76.9	72.8	30.1	14.4	0.109 8
5	2	2	3	86.4	75.9	36.9	15.6	0.172 8
6	2	3	1	80.8	74.1	32.6	15.5	0.132 2
7	3	1	3	82.5	62.8	22.4	16.2	0.118 9
8	3	2	1	93.2	71.9	23.9	17.8	0.189 4
9	3	3	2	90.9	73.2	18.1	17.7	0.171 9
K1	0.282 4	0.285 7	0.378 6					
K2	0.414 8	0.485 5	0.405					
K3	0.480 2	0.406 2	0.393 8					
R	0.197 8	0.199 8	0.026 4					

表3 方差分析结果

方差来源	偏平方和	自由度	均方	F值	P值
A	0.006 8	2	0.003 4	41.476 7	<0.05
B	0.006 7	2	0.003 4	41.338 5	<0.05
C	0.000 1	2	0.000 1	0.717 1	>0.05
D	0.000 2	2	0.000 1		

注:  $F_{0.05}(2,2)=19.0$ ,  $F_{0.01}(2,2)=99.0$ 。

试验,结果无显著差异,测定淫羊藿苷平均转移率为(92.4±0.6)%,多糖平均去除率(70.4±0.7)%,蛋白平均去除率(23.5±0.2)%,浸膏平均得率(17.6±0.2)%,4个指标的RSD分别为1.15%、1.26%、1.30%、1.50%,综合评分0.183 7,表明优选的工艺基本可靠。

### 3 结论与讨论

本实验通过正交设计对精制古汉养生精提取液的膜孔径、料液比、温度3个因素进行考察,确定了最佳工艺为:膜孔径500 nm、料液比1:15、温度25℃。验证实验结果表明优选的工艺稳定、可行。

采用多指标正交实验进行工艺优选,以权重系数综合评分法评价,对各指标归一化后再分别赋予不同的权重系数。在追求除杂效果的同时,要保证有效成分的转移率,故将淫羊藿苷转移率、多糖去除率、蛋白质去除率、浸膏得率的权重系数分别设为0.7、0.1、0.1、0.1,其优选工艺更符合实际生产。

本实验使用陶瓷膜分离技术精制古汉养生精提取液,代替传统醇沉工艺,操作简单,可避免大量使用乙醇,降低生产成本。通过该技术所得到的提取液其透明度和稳定性都有明显的改善,我们计划将这一生产技术应用用于古汉养生精的工业化生产中

去,此项实验目前正在进行中。

### 参考文献:

- [1] 钟永红,刘文.HPLC法测定古汉养生精中淫羊藿苷的含量[J].医学临床研究,2012,29(4):779-780.
- [2] 于岩,乔志诚,雷萍,等.古汉养生精合谷维素治疗失眠症51例临床观察[J].湖南中医杂志,2014,30(9):41-42.
- [3] 沈亮,徐方成,蓝云才,等.应用膜技术分离当归浸取液中的阿魏酸[J].厦门大学学报(自然版),2006,45(2):234-237.
- [4] 伍利华,黄英,刘婷,等.陶瓷膜分离技术应用于中药口服液的研究进展[J].药物评价研究,2014,37(2):184-187.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2015:761.
- [6] 贾东升,温春秀,赵江丽,等.固体制剂中多糖含量测定的样品预处理方法研究[J].药物分析杂志,2015,35(3):409-413.
- [7] 孙锋,谷文英,丁霄霖.山药粗多糖的提取工艺[J].食品与生物技术学报,2006,25(3):79-83.
- [8] 张彦丽,阿布都热合曼·合力力,阿依吐伦·斯马义.苯酚-硫酸法测定维吾尔药昆仑雪菊多糖含量的研究[J].药物分析杂志,2010,30(11):2205-2207.
- [9] 吴伟,崔光华,陆彬.实验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J].中国药理学杂志,2000,35(8):530-533.
- [10] 张林,李元波,张爱军.总评“归一值”优选银马口服液的澄清工艺[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(2):24-27.
- [11] 赵丹,朱澄云,王中彦.参芝安神口服液澄清工艺研究[J].吉林中医药,2017,37(10):1046-1048.
- [12] 宋晓春,王继龙,魏舒畅,等.超滤-纳滤集成技术纯化、浓缩当归水提取液的工艺考察[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(3):13-15.
- [13] 魏舒畅,袁文珺,余琰,等.红芪提取液的超滤纯化工艺研究[J].中成药,2011,33(4):599-603.
- [14] 胡琴,王汝上,程慧荃,等.超滤陶瓷膜精制黄芪葛根汤组成药物提取液的工艺参数研究[J].广州中医药大学学报,2017,34(5):753-757.

(本文编辑 苏维)