三黄益肾方的纯化工艺研究Δ

吴小斌[1*],王洛临[2#],李洁环[1],钟如帆[1],袁柳萍[1],郭　鸣[1](1.广州中医药大学,广州　510405;2.广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室,广州　510095)

中图分类号　R95　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2017)07-0957-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.27

摘　要　目的:研究三黄益肾方的纯化工艺。方法:以纯化后澄清液中总多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留率和除杂率为指标,分别考察水提醇沉法(50%、60%、70%乙醇)和澄清剂法(101果汁澄清剂、ZTC天然澄清剂、壳聚糖澄清剂)的纯化效果,以筛选三黄益肾方纯化方法;设计正交试验对最优纯化方法的工艺参数(药液质量浓度、澄清剂用量和药液pH)进行优化,并进行验证试验。结果:纯化方法中以壳聚糖为澄清剂时纯化效果较优,综合评分为98.62;优化后工艺参数为药液质量浓度1 g/mL、1%壳聚糖溶液用量2 mL/g、pH 5.1;验证试验中总多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留率和除杂率平均值分别为79.56%、78.11%、79.46%、32.18%(RSD分别为1.24%、0.97%、1.03%、1.16%,n=3)。结论:采用壳聚糖为澄清剂对三黄益肾方纯化效果较好,且操作简单,优化后工艺稳定、可行。

关键词　三黄益肾方;纯化工艺;正交试验;黄芪甲苷;总多糖;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;壳聚糖;澄清剂

Study on the Purification Technology of Sanhuang Yishen Formula

WU Xiaobin[1], WANG Luolin[2], LI Jiehuan[1], ZHONG Rufan[1], YUAN Liuping[1], GUO Ming[1] (1.Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2.Guangdong Province Engineering and Technology Research Institute of Chinese Medicine/Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To study the purification technology of Sanhuang yishen formula. METHODS: Using retention rate and impurity rate of purified total polysaccharide, astragaloside and calycosin glucoside as index, the purification effects of water extraction and alcohol precipitation method (50%, 60%, 70% ethanol) and clarifying agent method (101 juice clarifying agent, ZTC natural clarifying agent, chitosan clarifying agent) were respectively detected to screen the purification method; orthogonal test was used to optimize the technology parameters (mass concentration of liquid, amount of clarifying agent and pH of liquid) by the optimized purification method, and the verification test was conducted. RESULTS: The purification was better when using chitosan as clarifying agent with comprehensive score of 98.62; the purified technology parameters were mass concentration of liquid 1 g/mL, 1% chitosan solution amount of 2 mL/g, pH 5.1; the average value of retention rate and impurity rate of purified total polysaccharide, astragaloside and calycosin glucoside in verification test were 79.56% (RSD=1.24%, n=3), 78.11% (RSD=0.97%, n=3), 79.46% (RSD=1.03%, n=3) and 32.18% (RSD=1.16%, n=3), respectively. CONCLUSIONS: Using chitosan as clarifying agent shows good purification effect for Sanhuang yishen formula, which is simple. The optimized technology is stable and feasible.

KEYWORDS　Sanhuang yishen formula; Purification technology; Orthogonal test; Astragaloside; Total polysaccharide; Calycosin glucoside; Chitosan; Clarifying agent

三黄益肾方是广东省第二中医院临床用方剂,由熟地黄、黄芪、大黄、茯苓等药材组成,具有补益气血、活血化瘀、泻下祛浊等功效,主要用于慢性肾病的早期治疗,原剂型是煎剂,现计划开发成服用方便的颗粒剂。方中主要活性成分为多糖,如黄芪多糖、熟地黄多糖和茯苓多糖等。现代中药药理研究表明,中药多糖具有补益气

霍中朝霍定C和淫羊藿苷的含量[J].药物分析杂志,2011,31(5):931-934.
[8]　陈彦,赵艳红,贾晓斌,等.RP-HPLC法同时测定不同品种淫羊藿药材中5种主要黄酮类成分的含量[J].中国药房,2008,19(6):431-433.
[9]　黄朝情,彭玉德,黄文华,等.12种中成药中淫羊藿组分的质量考察[J].中国药房,2011,22(43):4086-4088.
[10]　刘艳杰,项荣武.星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学,2007,24(6):455-457.

Δ基金项目:广东省科技计划项目(No.2014A020210017)
*硕士研究生。研究方向:中药制剂。电话:020-83501292。E-mail:wxbzhongyao@163.com
#通信作者:主任中药师,硕士生导师。研究方向:中药制剂。电话:020-83501292。E-mail:luolin_w@163.com

(收稿日期:2016-06-10　修回日期:2016-08-12)
(编辑:刘　萍)

血、增强免疫的作用[1]，能改善肾病所致气血亏虚等症状；同时黄芪中的皂苷类成分也具有改善肾功能作用[2]，黄芪中的黄酮类成分（指标性成分为毛蕊异黄酮葡萄糖苷等）具有调节机体免疫力及改善肾相关功能等作用[3]；大黄中蒽醌类等成分具有泻下通便作用，还可防治慢性肾病的并发症[4]。

本方现采用水提工艺，得膏率约为35.42%，日服生药量较大；同时提取液中鞣质类（大黄含有鞣质）、蛋白质、果胶等成分较多，会影响后续制剂的稳定性，故需要对提取液进行纯化研究。本课题组考察了传统的水提醇沉工艺与澄清剂絮凝澄清工艺的纯化效果[5]，并设定醇沉工艺中乙醇体积分数分别为50%、60%、70%，絮凝澄清工艺中澄清剂分别为101果汁澄清剂、ZTC天然澄清剂、壳聚糖澄清剂，以方中总多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留率和除杂率为评价指标，筛选纯化工艺，为后续制剂工艺的建立提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

DC-NSG-30多功能提取浓缩机组（上海达程实验设备有限公司）；1200高效液相色谱仪（HPLC）（美国安捷伦公司）；电子天平（上海贵虎实业发展有限公司）；XS205DU分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；UV-2550紫外分光光度计（日本岛津公司）。

1.2 药材、药品、对照品与试剂

黄芪（批号：140101）、熟地黄（批号：150201）、大黄（批号：150101）、茯苓（批号：150301）等药材均购自广州中芝源中药饮片有限公司，经广东省第二中医院中药信息研究室刘法锦主任中药师鉴定，均符合现行2015年版《中国药典》（一部）各药材项下规定，测得黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为0.021 5 g/g、黄芪甲苷含量为0.042 1 g/g[6]；葡萄糖对照品（批号：110833-201205，纯度：99.5%）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品（批号：11920-201303，纯度：96.7%）、黄芪甲苷对照品（批号：110781-201314，纯度：95.6%）均来源于中国食品药品检定研究院；壳聚糖（北京正天成澄清技术有限公司，批号：150729）；101果汁澄清剂（主要成分为变性淀粉，上海沃逊生物工程有限公司，批号：150216）；ZTC1+1Ⅱ型天然澄清剂（北京正天成澄清技术有限公司，批号：150629）；液相色谱分析用水为蒸馏水，乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 三黄益肾颗粒浓缩液的制备

按处方比例称取药材4 kg，加8倍量水，煎煮2次，每次2.5 h，滤过，合并滤液，浓缩至药液与药材质量比约为1∶1，即药液质量浓度以生药量计为1 g/mL，备用。

2.2 多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法[7]测定。

2.2.1 葡萄糖对照品溶液的制备 精密称取105 ℃干燥至恒质量的葡萄糖对照品10.20 mg，置于100 mL量瓶中，加水溶解稀释至刻度，摇匀，即得0.102 mg/mL的葡萄糖对照品溶液。

2.2.2 葡萄糖标准曲线的绘制及方法学考察 分别量取葡萄糖对照品溶液1、2、3、4、5 mL置于10 mL量瓶中，以水定容。各取2 mL置于具塞玻璃瓶中，分别加入5%苯酚溶液1 mL，摇匀，再缓缓加入浓硫酸5.0 mL，避光放置20 min，在95 ℃水浴中保温20 min，取出后冷却至室温；以水为空白对照。在490 nm波长处测定吸光度，以质量浓度（x）为横坐标、吸光度（y）为纵坐标绘制标准曲线，得回归方程为y=1.772 9x+0.005 6（r=0.999 3）。得葡萄糖检测质量浓度线性范围为2.550～12.750 μg/mL。按要求进行精密度与回收率试验，结果精密度试验中吸光度的RSD值为1.57%（n=6）；低、中、高水平（50%、100%、150%）回收率平均值为101.58%（RSD=2.05%，n=3）。上述结果表明方法学考察结果符合要求。

2.3 固形物质量的测定

精密吸取浓缩液50 mL，置于105 ℃干燥至恒质量的蒸发皿中，水浴蒸干，按2015年版《中国药典》（四部）0831通则中干燥失重测定法[8]测定，计算固形物质量和除杂率（H）[H=（纯化前固形物质量－纯化后上清液固形物质量）/纯化前固形物质量×100%]。

2.4 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷含量的测定

2.4.1 对照品溶液的制备 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷对照品适量，分别加甲醇制成0.150 9、0.504 9 mg/mL的对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 （1）测黄芪甲苷的供试品溶液。精密量取浓缩液/澄清液18 mL，用水饱和的正丁醇振摇提取4次，每次30 mL，合并正丁醇，用40%氨水洗涤2次，每次30 mL；洗涤后将正丁醇层水浴蒸干，残渣加6 mL水溶解，过D101大孔树脂（内径为1.5 cm、柱高为14 cm），以水50 mL洗脱；弃洗脱液，以30 mL 40%乙醇洗脱，弃去洗脱液；以80 mL 70%乙醇洗脱，收集洗脱液，95 ℃水浴蒸干，残渣加甲醇溶解，定容至5 mL，过0.45 μm微孔滤膜滤过，即得[6]。（2）测毛蕊异黄酮葡萄糖苷的供试品溶液。精密量取浓缩液/澄清液1.5 mL，置于10 mL量瓶中，加甲醇至刻度，超声15 min（频率为40 kHz、功率为250 W），过滤，取续滤液过0.45 μm微孔滤膜，即得。

2.4.3 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取除黄芪以外的药材200 g，加8倍水，煎煮2次，每次2.5 h，合并滤液并浓缩至100 mL，分别按“2.4.2”项下方法制备毛蕊异酮葡萄糖苷和黄芪甲苷的阴性样品溶液。

2.4.4 色谱条件 （1）毛蕊异黄酮葡萄糖苷。色谱柱为Kromasil-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.1%甲酸（16∶84）；流速为1.0 mL/min；检测波长为260

nm；柱温为35 ℃；进样量为10 μL。理论板数以毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计应不低于3 000。(2)黄芪甲苷。色谱柱为AichromBond-SB C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相为乙腈-水(32∶68)；流速为1.0 mL/min；检测波长为260 nm；柱温为30 ℃；进样量为20 μL；蒸发光散射检测器检测，氮气流速为1.5 L/min；漂移管温度为45 ℃。理论板数以黄芪甲苷计应不低于4 000。

2.4.5　方法学考察　按照文献[9]方法测定。以峰面积为纵坐标(y)、进样量为横坐标(x)进行线性回归，得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷的回归方程分别为y=3.251 7x+30.147 2(r=0.999 6)、ln$y$=1.427 7ln$x$+4.941(r=0.999 8)，线性范围分别为0.150 9～2.414 4、0.504 9～10.090 μg；精密度试验中RSD分别为1.04%(n=3)、1.17%(n=3)；重复性试验中RSD分别为1.31%(n=3)、0.97%(n=3)；稳定性试验(室温放置16 h)中RSD分别为1.42%(n=3)、1.25%(n=3)；加样回收率试验中回收率平均值分别为99.43%(RSD=1.36%，n=3)、101.02%(RSD=1.15%，n=3)。

2.4.6　专属性试验　分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液适量，按“2.4.4”项下条件进样测定。结果，2个主成分峰与邻峰分离度均符合要求，阴性样品溶液在2个主成分峰相应位置处无色谱峰出现，详见图1。

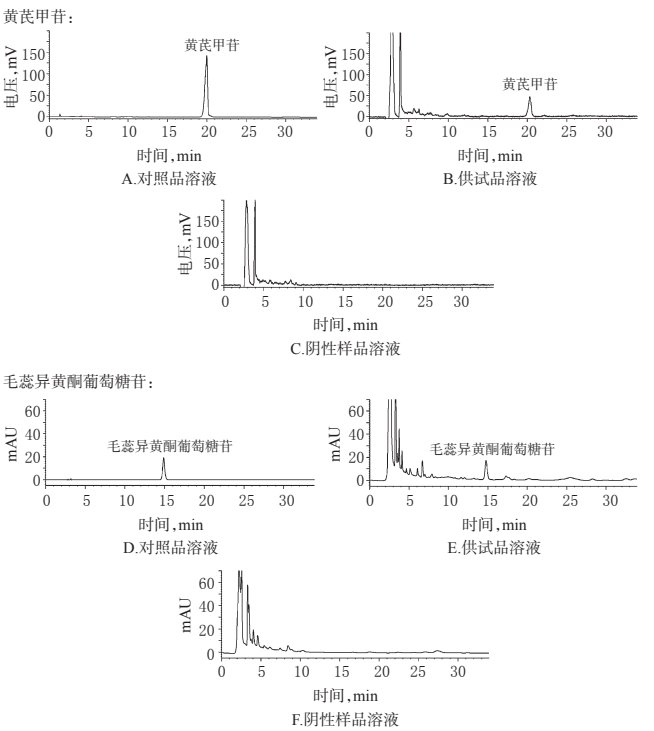

图1　高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms

2.5　纯化样品的制备与测定

按文献[10]方法制备与测定。

2.5.1　101果汁澄清剂溶液的制备　取101果汁澄清剂适量，加入蒸馏水，匀速搅拌，溶胀36 h，制备成5%粘胶液，即得。

2.5.2　ZTC澄清剂A、B组分溶液的制备　分别取适量ZTC1+1Ⅱ型天然澄清剂A、B组分，置于2个烧杯中，分别加入蒸馏水和1%乙酸溶液，匀速搅拌，溶胀36 h，分别制备成2种1%粘胶液，即得。

2.5.3　壳聚糖溶液的制备　取壳聚糖适量，加入1%乙酸适量，匀速搅拌，溶胀36 h，制备成1%粘胶液，即得。

2.5.4　纯化样品的制备　(1)水提醇沉法除杂样品。取“2.1”项相当于250 g生药质量的浓缩液3份，分别加95%乙醇至药液含醇量为50%、60%、70%，匀速搅拌，放置24 h；离心(2 500 r/min，离心半径为130 mm，下同)15 min，收集上清液，上清液加热浓缩并定容至200 mL，备用。(2)澄清剂法中101果汁澄清剂或壳聚糖纯化样品。取“2.1”项相当于250 g生药质量的浓缩液，每1 g生药加入0.05 mL 101果汁澄清剂溶液或1.5 mL壳聚糖溶液。(3)澄清剂法中ZTC澄清剂纯化样品。取“2.1”项相当于250 g生药质量的浓缩液，按每1 g生药加入0.04 mL ZTC澄清剂B组分溶液；再按每1 g生药加入0.02 mL ZTC澄清剂A组分溶液。上述“(2)、(3)”项下3种混合溶液均匀速搅拌0.5 h，放置24 h，离心，收集上清液，并于90 ℃水浴浓缩定容至200 mL，即得。

2.5.5　2种纯化方法纯化效果比较　取上述6种样品，分别测定其中总多糖、黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量，计算保留率(纯化后含量/纯化前含量×100%)、除杂率及综合得分[总多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留率(E、F、G)和H各指标与其最大值之比的加和，各指标的权重分别为0.4、0.2、0.2、0.2]，结果见表1。

表1　6种纯化后样品各指标比较

Tab 1　Comparison of each index in 6 purified samples

纯化方法	纯化试剂	E,%	F,%	G,%	H,%	综合得分
醇沉法	50%乙醇	75.81	71.54	69.86	18.42	90.03
	60%乙醇	75.64	73.18	72.15	20.43	92.76
	70%乙醇	67.15	69.87	70.46	14.86	82.27
澄清剂法	101果汁	79.42	79.56	69.87	14.08	91.65
	ZTC	80.16	82.14	65.17	16.47	91.99
	壳聚糖	80.37	77.42	75.61	22.18	98.62

由表1可见，澄清剂法对有效成分总多糖和黄芪甲苷的保留效果优于水提醇沉法，前者中尤以壳聚糖为澄清剂时综合评分最高。故选择壳聚糖为澄清剂，采用正交试验法进一步优化其纯化工艺参数。

2.6　壳聚糖纯化工艺的优化

壳聚糖的纯化效果与药液质量浓度和壳聚糖用量有关，纯化药液pH以4～6为宜[11]，故以E、F、G和H为指标，对药液质量浓度(g/mL，以生药计)、1%壳聚糖溶液用量(每1 g生药所需壳聚糖溶液体积，mL/g)及药液pH(分别采用稀盐酸与20%氢氧化钠溶液调节)进行优化。参考文献[12-13]并在预试验的基础上设计3因素3水平正交试验表，并对数据结果进行方差分析，结果见

表2、表3、表4。

表2　因素与水平

Tab 2　Factors and levels

水平	因素		
	A(药液质量浓度),g/mL	B(1%壳聚糖溶液用量),mL/g	C(药液pH)
1	0.25	1	4
2	0.5	1.5	5
3	1	2	6

表3　正交试验设计与结果

Tab 3　Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空白)	E,%	F,%	G,%	H,%	综合得分
1	1	1	1	1	67.78	82.78	82.02	18.80	80.54
2	1	2	2	2	79.45	81.28	79.30	19.00	85.75
3	1	3	3	3	73.84	80.88	67.66	23.37	85.38
4	2	1	2	3	80.48	76.94	76.47	21.47	79.60
5	2	2	3	1	73.97	66.44	80.33	17.87	79.66
6	2	3	1	2	63.81	72.63	62.46	32.70	82.82
7	3	1	3	2	67.24	78.45	77.29	21.03	81.43
8	3	2	1	3	61.10	75.51	51.42	40.60	85.12
9	3	3	2	1	65.76	65.84	61.14	31.03	87.16
K_1	251.67	241.58	248.48	247.36					
K_2	242.08	250.53	252.51	250.00					
K_3	253.72	255.35	246.48	250.11					
R	11.64	13.78	6.03	2.75					

表4　方差分析结果

Tab 4　Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	25.74	2	12.87	15.95	<0.10
B	32.58	2	16.29	20.19	<0.05
C	6.29	2	3.14	3.90	>0.10
误差	1.61	2	0.81		

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

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

由直观分析可知各因素主次影响为B>A>C;方差分析结果表明,因素B对试验结果影响显著,因素A对试验结果有一定的影响,而因素C对试验结果几乎无影响。从可操作性考虑选择纯化工艺条件为$A_3B_3C_2$,即药液浓缩至质量浓度为1 g/mL,1%壳聚糖溶液用量为2 mL/g,pH为5.1(无需调节)。

2.7　验证试验

按正交试验优化的工艺条件进行3次试验。取“2.4”项下相当于250 g生药质量的浓缩液,每1 g生药加入2 mL 1%壳聚糖溶液,匀速搅拌0.5 h,静置24 h,离心,收集上清液,并于90 ℃水浴浓缩定容至200 mL,测定。分别计算E、F、G、H,结果分别为79.56%、78.11%、79.46%、32.18%(RSD分别为1.24%、0.97%、1.03%、1.16%,n=3),表明该纯化工艺稳定、可行。

3　讨论

处方中各药材所含活性成分多为多糖类、黄酮类、皂苷类和蒽醌类成分,在水中溶解度较大[14],故澄清剂法对总多糖和有效成分的保留,相对于水提醇沉法具有明显优势;且前者还具有成本低、稳定性好等优点[15],适用于纯化药液。

本试验中原药液pH约为5.1,加入澄清剂后测得药液pH约为5.0,故最终确定的优化工艺中无需调节pH。

由于中药复方制剂成分比较复杂,而本试验只考察了壳聚糖澄清剂法对三黄益肾方中臣药黄芪的主要有效成分黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷,以及黄芪、大黄、熟地黄和茯苓等药材中含有的总多糖含量的影响,而对其他有效成分如君药大黄中的蒽醌类成分、臣药熟地黄中的毛蕊花糖苷类的保留效果,还需进一步研究。另外,本次试验反应皆在常温下操作,反应后澄清液统一水浴浓缩至200 mL,故纯化工艺中的反应温度还需进一步考察,其他因素如静置时间、搅拌速率等也有待进一步的研究和优化。

参考文献

[1] 崔换天,边育红,王丽.中药多糖对免疫功能调节的研究进展[J].中国现代中药,2013,15(4):286-290.

[2] 刘红,孙伟,顾刘宝,等.黄芪治疗慢性肾脏病机制及其延缓细胞衰老研究[J].中华肾病研究电子杂志,2014,3(6):40-43.

[3] 张冬青,汪德清.黄芪总黄酮生物学活性作用研究进展[J].中国中药杂志,2010,35(2):253-256.

[4] 朱伟,王学美.大黄治疗慢性肾功能衰竭机制的研究进展[J].中国中西医结合杂志,2005,25(5):471-475.

[5] 张兆旺.中药药剂学[M].北京:中国中医药出版社,2007:1101-1103.

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:302-303.

[7] 李辉,罗佳波.苯酚-硫酸法测定围乐颗粒中总多糖的含量[J].中国药房,2008,19(9):685-686.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:103.

[9] 王洛临,吴小斌,周蓉,等.复方芪麻胶囊的提取工艺研究[J].中国药房,2016,27(22):3128-3131.

[10] 谢伟容,褚克丹,徐伟,等.不同天然澄清剂对醒鼻凝胶水提液澄清工艺研究[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(5):43-45.

[11] 罗世江.影响壳聚糖絮凝法澄清效果因素浅析[J].中国医药指南,2012,10(12):455-457.

[12] 朱立俏,盛华刚,魏强强,等.壳聚糖絮凝沉降法对延胡索水提液的纯化工艺研究[J].中药新药与临床药理,2012,23(2):212-214.

[13] 盛华刚,朱立俏,林桂涛.壳聚糖澄清剂对枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的纯化工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(4):15-17.

[14] 梁丽娟,谢俊大,赵奎君.黄芪中化学成分的比较研究进展[J].中国药房,2009,20(36):2877-2878.

[15] 王笳,吴诗惠,陈帅,等.壳聚糖在黄芪水提取液中的澄清效果[J].华西药学杂志,2007,22(6):640-642.

(收稿日期:2016-06-03　修回日期:2016-08-12)

(编辑:刘　萍)