

## 实验研究

引用:白璐,惠志立,崔春利,等.双黄连口服液不同精制工艺对比评价研究[J].陕西中医药大学学报,2024,47(1):66-71.

## 双黄连口服液不同精制工艺对比评价研究\*

白璐<sup>1</sup> 惠志立<sup>2</sup> 崔春利<sup>3</sup> 史亚军<sup>3</sup> 刘红波<sup>3</sup> 刘航<sup>4\*\*</sup> 刘文豪<sup>3</sup>

(1.西安市第一医院,陕西 西安 710002;2.西安医心演绎医疗科技有限公司,陕西 西安 710301;

3.陕西中医药大学/陕西省中药基础与新药研究重点实验室,陕西 西安 712046;

4.陕西中医药大学附属医院,陕西 咸阳 712000)

**摘要:**目的 基于“溶液环境—化学成分”分析,比较双黄连口服液不同精制方法的适用性。方法 以双黄连口服液为试验体系,分别测定黄连口服液原液、微滤液、醇沉液、壳聚糖絮凝液中 pH 值、电导率、浊度及黏度等物理参数;以 HPLC 法测定双黄连口服液中黄芩苷的含量。测定蛋白质、鞣质、淀粉及果胶等高分子物质含量;以 SPSS 19.0 进行不同精制方法的相关性分析。结果 综合化学成分与溶液环境物化性质改变,双黄连口服液从“去粗”角度,微滤法最佳,絮凝法最差;但从“取精”角度,微滤法不及醇沉法,絮凝法仍最差。采用不同精制工艺测得的黄芩苷含量与 pH、鞣质含量呈正相关;与浊度、电导率呈负相关。结论 随着微滤法在中医药领域的应用推广,有望替代传统醇沉法精制双黄连口服液。

**关键词:**双黄连口服液;精制工艺;溶液环境;高分子物质;指标成分

**中图分类号:**R283

**文献标识码:**A

**文章编号:**2096-1340(2024)01-0066-06

**DOI:**10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.01.013

以水煎服的中药汤剂,是中医临床用药的主要形式,也充分体现出中药水提液临床应用的普遍性与重要性。“溶液环境”是指溶液体系所具有的黏度、pH、离子强度、电解质成分等特征性质<sup>[1-2]</sup>。中药水提液因为溶媒水、极性大、溶出成分多样,使得水提液环境复杂。正如双黄连口服液在提取过程中,不仅提取出了对疾病有治疗作用的有效成分,如黄芩苷、绿原酸等;一些易溶于水的杂质和无效成分也随之被提取出来,如多糖、蛋白质等大分子物质。为了确保药物有效成分的溶出度,提高药物疗效,水提醇沉法<sup>[3-4]</sup>、微滤法<sup>[5-11]</sup>、絮凝法<sup>[12-15]</sup>、高速离心法<sup>[16-17]</sup>均在中药水提液精制中被探索研究。本文以双黄连口服水提液为实验体系,基于“溶液环境”与药物有效成分

密切关系,通过研究双黄连口服液三种不同精制工艺,比较其物化参数、指标性成分黄芩苷的含量和其大分子去除率,从而得出双黄连口服液的最佳精制工艺,以期为复杂“溶液环境”的中药水提液的精制提供实验基础。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);UPR 系列超纯水器(四川优普超纯科技有限公司);Agilent 1260 高效液相色谱(美国);实验室用 LNG-CM-101 膜分离机(上海朗极膜分离设备工程有限公司);DDS-307 电导率仪(上海精密科学仪器有限公司);PHSJ-4F 实验室用 pH 计(上海仪电科学仪

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81803744);陕西省科技厅重点研发计划一般项目(2023-YBSF-376);陕西省教育厅自然科学基金项目(2014JK1196)

\*\* 通讯作者:刘航,主管中药师。E-mail:497240346@qq.com

器股份有限公司);DV-I+黏度计(美国BROOKFIELD公司);WGZ-3.3A 浊度计(上海昕瑞仪器仪表有限公司)。

**1.2 试药** 黄芩、金银花和连翘 3 味药材饮片均购自西安兴盛德中药饮片有限责任公司,经王继涛高级实验师鉴定均符合《中国药典》2020 年版一部规定。黄芩苷标准物质(批号:110715-201318)来源于中国食品药品检定研究院。牛血清白蛋白(BSA);考马斯亮蓝 G-250;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法

**2.1 双黄连口服液水提液的制备** 按处方比例,分别取金银花 375 g,黄芩 375 g,连翘 750 g,称取各味药的 1/15。黄芩煎煮 3 次,第一次加入 14 倍水,煎煮 2 h;第二次加 12 倍水,煎煮 1 h;第三次加 12 倍水煎煮 1 h。分别用四层纱布滤过,合并滤液。金银花、连翘先温浸 30 min,煎煮两次,第一次 14 倍水,煎煮 1.5 h;第二次 12 倍水,煎煮 1.5 h。四层纱布滤过,合并滤液。将两次滤液合并,调整成浓度为  $0.04\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (以生药量计,下同)的水提液,待用。

### 2.2 精制操作工艺

**2.2.1 微滤法** 取双黄连水提液 500 mL,过孔径为  $0.08\text{ }\mu\text{m}$  的无机陶瓷膜,收集滤液,调整成  $0.04\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,待用。

**2.2.2 醇沉法** 取 1 L 双黄连水提液平均分成四等份,不断搅拌并缓慢加入 250 mL、375 mL、583 mL、1000 mL 的 95% 分析乙醇(慢加快搅),分别使含醇量达到 50%、60%、70%、80%,静置 24 h,滤过,挥至无醇味后,调整成  $0.04\text{ 生药}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,待用。

**2.2.3 絮凝法** 取三等份双黄连水提液,每份 500 mL,加入配置好的壳聚糖絮凝液,使壳聚糖含量达 10%、20%、30%,静置 24 h,滤过,挥至无酸味后,调整成  $0.04\text{ 生药}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,待用。

**2.3 物化参数的测定** 分别取双黄连口服液水提液及精制液适量,均通过恒温水浴恒温至  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,分别以已校正精密 pH 计测定 pH 值;以电导率仪测定电导率值;以浊度计测定浊度;依据《中国药典》2020 年版四部通则 0633 黏度测定法第三法中(3)转子型旋转黏度计以 BROOKFIELD 黏度计测定

水提液及各纯化法所得精制液流体的相对黏度。

**2.4 高分子物质的测定** 分取 2.1 项下双黄连口服液水提液及 2.2 项下各精制液适量,采用考马斯亮蓝 G-250 比色法测定蛋白质含量<sup>[18]</sup>;采用《中国药典》2020 年版四部通则 2202 鞣质含量测定法测定鞣质含量<sup>[19]</sup>;采用高锰酸钾滴定法测定酶解前的还原糖量及酶水解和酸水解后还原糖量,依据公式计算:淀粉含量 = 酶水解和酸水解后还原糖量 - 酶解前的还原糖量<sup>[20]</sup>;果胶含量测定利用果胶酸钙不溶于水的特性,向含果胶溶液中加入沉淀剂,使果胶形成果胶酸钙沉淀,测定果胶酸钙量并换算成果胶量<sup>[21]</sup>。

### 2.5 黄芩苷含量测定<sup>[22-25]</sup>

**2.5.1 色谱条件** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;甲醇-水-磷酸(47:53:0.1)为流动相,检测波长为 280 nm。理论板数按黄芩苷峰计算应不低于 2500。

**2.5.2 对照品溶液的制备** 取黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含  $0.064\text{ mg}$  黄芩苷的溶液,即得。

**2.5.3 供试品溶液的制备** 分别取各方法精制样液 25 mL,摇匀,精密吸取 1 mL,置于 50 mL 量瓶中,加 70% 乙醇约 45 mL,超声处理 30 min,放至室温,加 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,精密量取 5 mL,加甲醇稀释至 10 mL,摇匀,  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,备用。

**2.6 相关性统计分析方法** 采用 R 语言 3.4.3 软件和 IBM SPSS Statistics 19.0 软件分别进行性分析,分别对 pH、浊度、黏度、电导率、蛋白质含量、鞣质含量、淀粉含量、果胶含量及黄芩苷含量进行正态性检验。R 语言构建目标数据集,然后批量求解,\* 表示  $P < 0.1$ ,\* 表示  $P < 0.05$ ,\*\* 表示  $P < 0.01$ ,\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

## 3 结果

**3.1 物化参数测定** 结果与原液相比较,唯独微滤液 pH 显著上升,醇沉液的 pH 随着加入醇量的增大变化不明显,絮凝液的 pH 随着絮凝剂浓度变化,其中 20% 絮凝液的 pH 最大,30% 絮凝液次之;浊度微滤液的浊度显著下降,醇沉液的浊度随着醇量的增多先减小后增大,其中 60% 醇沉液浊度

下降最多,随絮凝液浓度增大浊度增加,10%絮凝液浊度最小;三种精制液的黏度变化不大,微滤液的黏度下降最为明显,醇沉液的黏度基本随加入醇量的增大而增大;电导率与原液相比较,微滤液的电导率下降最明显,醇沉液的电导率随加入醇量的增多而减小,絮凝液的电导率随加入絮凝剂的增多而增大。结果见表 1。

表 1 物化参数测定结果

样品	pH	浊度 (NTU)	黏度 (mPa·s)	电导率 ( $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
原液	5.276	573.5	1.55	1170
微滤液	6.307	0.37	1.33	840
50%醇沉液	5.268	468.5	1.43	1030
60%醇沉液	5.228	292.7	1.42	1070
70%醇沉液	5.277	419.9	1.58	920
80%醇沉液	5.193	586.5	1.64	860
10%絮凝液	4.482	373.8	1.36	1230
20%絮凝液	4.725	1148	1.37	1230
30%絮凝液	4.655	1148	1.72	1600

3.2 高分子测定结果 通过数据比较分析,从四种高分子去除总体 70%醇沉液>微滤液>50%醇沉液>80%醇沉液>10%絮凝液>30%絮凝液>60%醇沉液>20%絮凝液,结果见表 2。

3.3 黄芩苷含量测定结果

3.3.1 线性关系考察 分别精密吸取 3.4.1 对照品溶液 2、4、6、8、10 $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,按选

定的色谱条件进行测定,记录色谱图及峰面积。以峰面积的积分值定量,以峰面积积分值  $Y$  为纵坐标,进样量  $X(\mu\text{g})$  为横坐标,绘制标准曲线,并进行回归分析,黄芩苷的回归方程为: $Y=301.1X+27.678$ , $r=0.9997$ 。结果表明,黄芩苷的进样量在 0.128~0.64 mg 范围内具有良好的线性关系。

3.3.2 精密度实验 精密吸取标准品溶液 10 mL,连续进样 5 次,测得黄芩苷峰面积积分值的 RSD 值为 0.38%,结果表明该仪器精密度良好。

3.3.3 稳定性实验 取标准品溶液,依法分别于 0、2、4、6、8、12 h 测定,测得黄芩苷峰面积积分值的 RSD 值为 1.99%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

3.3.4 重复性实验 取微滤液 5 份,分别按 2.5.3 项下供试品溶液制备方法制成 5 份供试品溶液,以 2.5.1 项下色谱条件测定,测得黄芩苷质量浓度分别为 1.145、1.138、1.147、1.135、1.142  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,RSD 值为 0.43%,表明该方法重复性良好。

3.3.5 回收率实验 取微滤液 10 mL,6 份,分别加入一定量的黄芩苷对照品,按照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按上述色谱条件及测定方法进行测定,计算回收率,平均回收率为 96.51%,RSD 值为 1.42%。表明黄芩苷回收率良好,结果见表 3。

表 2 高分子含量测定结果

样品名称	蛋白质 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	去除率 (%)	鞣质 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	去除率 (%)	淀粉含量 (%)	去除率 (%)	果胶含量 (%)	去除率 (%)
原液	0.18314	—	0.00281	—	0.04965	—	0.71527	—
微滤液	0.04579	75	0.00101	64	0.01919	61	0.31023	57
50 醇沉	0.07044	62	0.00271	3.6	0.01676	66	0.30258	58
60 醇沉	0.06315	66	0.00263	6.4	0.02267	54	0.69521	2.8
70 醇沉	0.06423	65	0.00277	1.4	0.02278	54	0.26987	62
80 醇沉	0.0763	58	0.00144	49	0.03012	39	0.29684	58
10 絮凝液	0.09157	50	0.00124	56	0.02893	42	0.31521	56
20 絮凝液	0.07326	60	0.00079	72	0.02919	41	0.69658	2.6
30 絮凝液	0.08325	55	0.00018	94	0.02801	44	0.58245	19

表 3 回收率试验测定结果( $n=6$ )

编号	取样量(mL)	样品中含有的量(mg)	对照品加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	10	0.01397	0.0512	0.0467	98.30		
2	10	0.01397	0.0512	0.0437	96.15		
3	10	0.01397	0.0512	0.0622	94.20	96.51	1.42
4	10	0.01397	0.0512	0.0635	96.74		
5	10	0.01397	0.0512	0.0766	96.35		
6	10	0.01397	0.0512	0.0740	97.32		

**3.3.6 样品含量测定** 分别取供试品溶液,进样 10  $\mu\text{L}$ ,在给定的色谱条件下,测定黄芩苷的峰面积,由对应的线性方程计算其含量,结果见表 4。

表 4 黄芩苷含量测定结果

样品名称	进样量 ( $\mu\text{L}$ )	峰面积	黄芩苷含量 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	保留率 (%)
原液	10	372.400	1.145	-
膜过滤液	10	369.507	1.135	99.13
50%醇沉液	10	389.802	1.202	104.98
60%醇沉液	10	382.842	1.179	102.97
70%醇沉液	10	380.739	1.172	102.36
80%醇沉液	10	381.834	1.176	102.71
10%絮凝液	10	91.146	0.211	18.43
20%絮凝液	10	95.411	0.225	19.65
30%絮凝液	10	80.706	0.176	15.37

由表 4 结果显示,膜过滤液黄芩苷含量略有下降,可能是过滤时黄芩苷随杂质一起被滤过所致;醇沉液黄芩苷含量反而略有上升,这可能与黄芩苷的溶解度密切相关,表明黄芩苷在 50%~80%的醇液中溶解度会增大,其中 50%醇沉液黄芩苷含量最高,60%醇沉液、70%醇沉液、80%醇沉液的黄芩苷含量相近。絮凝液黄芩苷含量大幅下降,其中 20%絮凝液黄芩苷含量较 10%絮凝液、30%絮凝液高。由此可见,对于双黄连口服液最不理想的精制方法为絮凝法。

3.6 相关性分析结果

3.6.1 不同精制工艺“高分子含量-物化参数”“物化参数之间”“高分子含量之间”相关性分析结果

通过分析,物化参数与高分子含量之间均没有相关性。物化参数之间结果显示:pH 与浊度呈显著负相关( $P<0.05$ );pH 与电导率呈显著负相关( $P<0.05$ );浊度与电导率呈显著正相关( $P<0.05$ )。高分子之间相关结果显示:蛋白质含量与淀粉含量呈极显著正相关( $P<0.001$ )。见图 1。

3.6.2 不同精制工艺“黄芩苷含量-物化参数”相关性分析结果 相关性结果显示:pH 与黄芩苷含量呈显著正相关( $P<0.05$ );浊度与黄芩苷含量呈负相关( $P<0.1$ ),黏度与黄芩苷含量没有相关性;电导率与黄芩苷含量呈显著负相关( $P<0.05$ )。见

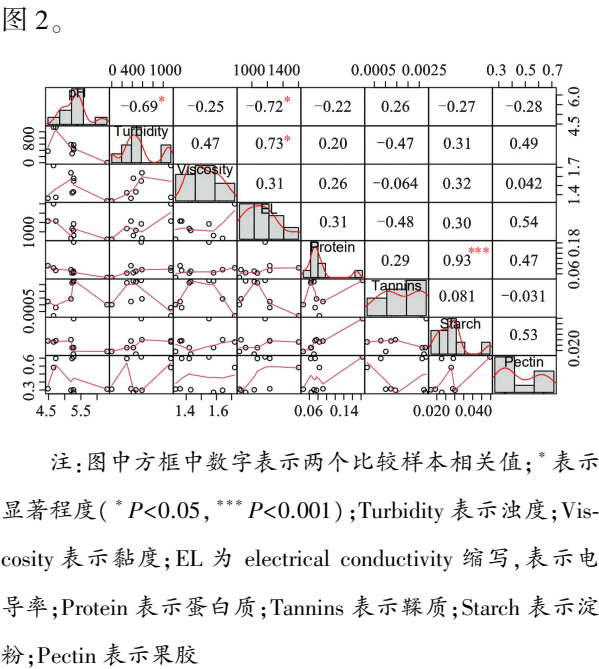


图 1 高分子含量-物化参数

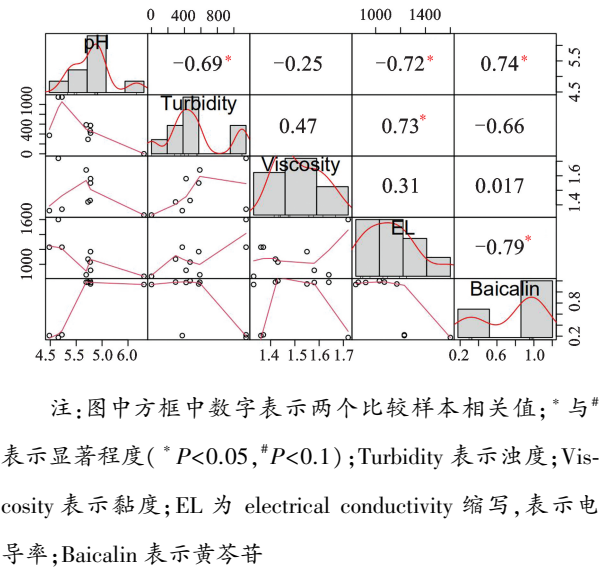
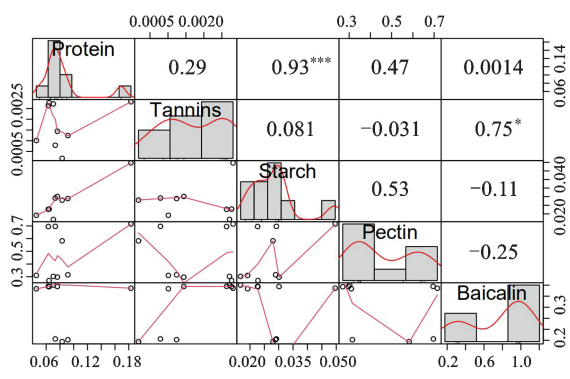


图 2 黄芩苷含量-物化参数

3.6.3 不同精制工艺“黄芩苷含量-高分子含量”相关性分析结果 高分子含量中仅鞣质含量与黄芩苷含量呈显著相关(\* $P<0.05$ ),蛋白质含量、淀粉含量、果胶含量均与黄芩苷含量没有相关性。见图 3。

从以上相关性结果可以看出,采用不同精制工艺测得的黄芩苷含量与 pH、鞣质含量呈正相关;与浊度、电导率呈负相关。相关性较好,说明不同精制工艺对双黄连口服液有效成分黄芩苷含量有显著影响。



注:图中方框中数字表示两个比较样本相关值;\*表示显著程度(\* $P<0.05$ );Protein 表示蛋白质;Tannins 表示鞣质;Starch 表示淀粉;Pectin 表示果胶

图 3 黄芩苷含量-高分子含量

#### 4 讨论

中药复方水提液是一个极其复杂的化学体系,对水提液精制方法应建立在能去除杂质,最大程度的保留有效成分,同时还要考虑其经济性、实用性。基于中药复方水提液的特点,膜分离技术在中医药领域的应用彰显优势。郭立玮等<sup>[26]</sup>在 20 多年前分析论证了 21 世纪中药植物药深加工与现代膜分离技术相结合的研究开发思路,之后很多研究者开展了符合国际规范的中药或复方的膜分离技术探究。孙立霞等<sup>[27]</sup>采用 KBT-ZTC 絮凝澄清法、酶解法、微滤法、酶解-微滤法及絮凝澄清-微滤法澄清参玉口服液,研究结果证实絮凝澄清-微滤法为最佳方法。高红宁等<sup>[28]</sup>通过比较分析枳实、苦参和金银花澄清前后固形物、性状、膜通量、指标成分等指标,研究证实微滤法对中药水提液起到较好的澄清除杂效果。不仅如此,微滤法也被应用到中药挥发油的分离,韩志峰<sup>[29]</sup>以常见的九种含油水体进行优化探究,旨在推进微滤在挥发油淋领域的应用。朱华旭等<sup>[30]</sup>探讨了膜分离技术在中药废弃物有效组分资源化的原理、方法与应用实践,比较系统描述了膜技术在中药废弃物的提取、分离、浓缩、纯化工程的应用前景,论述了膜技术在中药资源产业化过程中的适宜性和可行性。

本文以双黄连口服液为例,实验结果显示,采用醇沉法略高保留了有效成分,但其存在耗醇量大、乙醇回收率低、耗能大、醇沉后的药液进行浓缩相对较慢、成本较高、危险性较大的缺点。絮凝

法中絮凝剂在凝结过程中不仅去除了杂质,还去除了一些小分子有效成分,导致其有效成分大幅含量降低。膜过滤法其有效成分含量介于醇沉法和絮凝法之间,但物化参数结果显示膜过滤法能更大程度的去除杂质,保证药液澄明度和稳定性。综合考虑,膜微滤法应用于中药复方水提液的精制效果最佳。

双黄连口服液不同精制工艺研究中,从相关分析性结果看,在物化参数相关性结果中提示 pH 值浊度、电导率测定具有较大意义,而黏度测定意义不大。高分子含量相关性分析结果提示,鞣质测定对方中黄芩苷含量具有显著影响,果胶测定意义不大,处方中蛋白质含量与淀粉含量具极显著正相关性,今后评价时应予以重点关注。

#### 参考文献

- [1]郭立玮.中药分离原理与技术[M].北京:人民卫生出版社,2010.
- [2]郭立玮,朱华旭.基于膜过程的中药制药分离技术:基础与应用[M].北京:科学出版社,2019.
- [3]刘健,王娜.中药口服液提取工艺的分析[J].云南化工,2019,46(9):118-119.
- [4]赵跃东,曹春琪,叶永山,等.水提醇沉法及其替代方法的研究进展[C]//中华中医药学会中药化学分会第九届学术年会论文集(第一册),2014:316-322.
- [5]张红要.微滤去除悬浮物和天然有机物的试验研究[J].水利科学与寒区工程,2022,5(10):12-15.
- [6]李权.膜分离技术的研究进展及应用展望[J].化学工程与装备,2022(8):247-248.
- [7]宁利敏,朱本伟,姚忠,等.膜分离技术在寡糖制备与分离中的应用[J].中国生物工程杂志,2022,42(4):102-110.
- [8]吴光夏,刘贺之.膜分离技术在中药方面的应用[J].新材料产业,2012(5):17-20.
- [9]郭立玮.制药分离工程[M].北京:人民卫生出版社,2014.
- [10]刘红波,徐思宁,唐志书,等.膜技术在康妇炎胶囊制剂二次开发中的应用研究[J].膜科学与技术,2021,41(4):117-123.
- [11]崔春利,郭立玮,唐志书,等.伴生物质对何首乌水提液微滤过程的影响[J].西北药学杂志,2014,29(5):454-458.
- [12]章国磊,王静,李珺铭,等.人参口服液澄清工艺的优化

[J].中成药,2021,43(11):3121-3124.

[13]张丽华,叶世莉,刘思美,等.白及多糖的超滤陶瓷膜分离工艺研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(6):34-39.

[14]吴琼,李三鸣,姜爱萍,等.壳聚糖絮凝法精制红景天提取液[J].沈阳药科大学学报,2005,22(3):220-222.

[15]张文清,金鑫荣,杜晨捷,等.絮凝法在丹参口服液制备中的应用[J].华东理工大学学报(自然科学版),1996,22(1):108-113.

[16]蒲维维,杨万政,王捷.高速离心法对清喉颗粒除杂效果的研究[J].内蒙古石油化工,2011,37(23):3-4.

[17]王国栋,李玲.高速离心法替代醇沉法制备流浸膏研究[J].新疆中医药,2001,19(4):10-11.

[18]刘双双,刘丽芳,朱华旭,等.超滤膜技术用于脉络宁注射液废弃物中多糖分离及其活性筛选研究[J].中草药,2016,47(13):2288-2293.

[19]国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:773.

[20]郭东艳,覃鸿恩,赵晓平,等.ZrO<sub>2</sub> 无机陶瓷膜微滤技术精制健脑益智胶囊水提部分的研究[J].现代中药,2014,34(5):69-72.

[21]董洁,郭立玮,文红梅,等.中药水提液中果胶含量测定方法研究[J].现代中药研究与实践,2007,21(5):39-41.

[22]王健芬,张枝雪,尹兴章.HPLC 法测定和肝利胆颗粒中 7 种成分的含量[J].西北药学杂志,2021,36(6):890-893.

[23]廖辉,张璐,杨红霞,等.一测多评法测定双黄连口服液 4 种指标性成分[J].海峡药学,2020,32(2):55-57.

[24]张静娴,孙健,陈军,等.痰热清注射液特征图谱建立及 4 种成分测定[J].中成药,2022,44(4):1063-1070.

[25]李纳,李姣娇,范蕾,等.用山银花与金银花制备双黄连口服液质量比较研究[J].西北药学杂志,2018,33(1):6-10.

[26]郭立玮,金万勤,彭国平.21 世纪的植物药深加工现代化技术——膜分离[J].南京中医药大学学报(自然科学版),2000,16(2):65-67.

[27]孙立霞,常桂娟,李秋萌,等.参玉口服液澄清工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):4-7.

[28]高红宁,殷奕,潘金火.微滤法澄清枳实、苦参和金银花中药水提液的研究[J].中国当代医药,2020,27(35):12-15.

[29]韩志峰.微滤法用于中药挥发油含油水体的油水分离研究[D].南京:南京中医药大学,2011.

[30]朱华旭,段金廪,郭立玮,等.基于膜科学技术的中药废弃物资源化原理及其应用实践[J].中国中药杂志,2014,39(9):1728-1732.

(修回日期:2023-01-19 编辑:崔春利)