

不同分离纯化技术对甘草水提液组分的影响

古川, 梁艳妮, 唐志书*, 武婧, 刘红波

(陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心,
陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:** 研究不同纯化技术对甘草水提液的纯化效果, 为中药水提液的纯化提供参考。**方法:** 分别采用微滤与超滤, II型 ZTC 1+1 天然澄清剂、壳聚糖、微滤分别与 DA-201 型大孔吸附树脂联用共 4 种联用技术对甘草水提液进行分离纯化, 以指标性成分(甘草苷和甘草酸)的保留率、物理化学参数及 HPLC 指纹图谱等指标综合分析以上方法的适用性。**结果:** 联用技术会使指标性成分的含量降低, 但可有效去除了大分子物质。在单用纯化技术中, 微滤技术纯化效果最好; 微滤与超滤联用得到的纯化液与原液的相似度 0.886, 在 4 种联用纯化技术中对药液组分影响最小。**结论:** 微滤与超滤联用技术或许是较好的中药水提液分离纯化方法, 该方法避免了有机试剂对中药水提液的污染, 且操作简便、节省成本, 适合工业化连续生产。

[关键词] 甘草; 膜分离; 大孔树脂; 甘草苷; 甘草酸; 超滤; 微滤

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015200005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150826.1527.010.html>

[网络出版时间] 2015-08-26 15:27

Effect of Different Separation and Purification Technologies on Components in Water Extract of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma GU Chuan, LIANG Yan-ni, TANG Zhi-shu*, WU Jing, LIU Hong-bo
(*Shaanxi Province Key Laboratory of Chinese Pharmaceuticals and Drug Innovation, Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of different purification technologies on water extract of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. **Method:** Four kinds of technologies of ZTC 1+1 II natural clarifying agents, chitosan and microfiltration combined with DA-201 macroporous resin respectively, in addition microfiltration-ultrafiltration were all used for purification of water extract of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. Retention rates of index components, physical and chemical parameters, and HPLC fingerprint were all applied to analyze applicability of different technologies. **Result:** Index components were reduced with combination technologies, which effectively removed macromolecules in water extract at the same time. Microfiltration technology in removing impurity was the best among the primary purifications. Similarity of purified liquid with microfiltration-ultrafiltration technology compared with original liquid was 0.886, which had minimal effect on liquid components among four purification technologies. **Conclusion:** Microfiltration-ultrafiltration combination technology might be a better method for separation and purification of water extract of Chinese medicines. This method avoids pollution of organic reagents on water extract of Chinese medicines, which is suitable for industrialized continuous production for easy operating and cost saving.

[Key words] Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; membrane separation; macroporous resin; liquiritin; glycyrrhizic acid; ultrafiltration; microfiltration

[收稿日期] 20150331(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373978)

[第一作者] 古川, 在读硕士, 从事新剂型与新工艺研究, Tel:15891355032, E-mail:977202678@qq.com

[通讯作者] *唐志书, 博士, 教授, 从事中药高新技术制备、中药资源开发与应用研究, Tel:18691970516, E-mail:tzs6565@163.com

甘草具有补脾益气、祛痰止咳、清热解毒、缓急止痛、调和诸药的功效,现代常用于治疗阿狄森病、胃及十二指肠溃疡、病毒性肝炎、呼吸系统疾病、皮肤炎症等。甘草中甘草苷和甘草酸是最重要的活性成分^[1],也是决定甘草药材质量的重要参数^[2]。要提高中药有效成分的利用率,应用适宜的先进技术改进传统中药分离纯化工艺显得尤为重要。近年来常用醇沉法、絮凝沉淀法、吸附澄清法、大孔树脂吸附法、高速离心法、膜分离等技术精制中药提取液。为避免单一技术的弊端,如溶剂用量大、成本高、大孔树脂堵塞、严重膜污染等问题^[3],本实验拟分别采用壳聚糖,Ⅱ型 ZTC1 + 1 天然澄清剂和孔径 0.2 μm 无机陶瓷膜粗剔除甘草水提液中悬浮物和大分子物质,并进一步与超滤和大孔吸附树脂联用,对甘草水提液进行分离和纯化。本实验结合指标性成分、指纹图谱和物理化学参数等综合表征不同技术的纯化效果,为膜分离技术在中药分离纯化领域的应用提供实验依据。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),JWCMF-0.2 m² 型陶瓷膜分离系统和 JWUF-2540 型有机膜分离系统(江苏久吾科技股份有限公司),UV-2600 型紫外分光光度计(日本岛津公司),FA20040B 型 1/1 万电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司),DDS-307 型电导率仪(上海精密科学仪器有限公司),WGZ-3P 型浊度计(上海昕瑞仪器仪表有限公司),WB-2000IXA 型全自动色差仪(国家药典会北京卫标技贸公司与北京康兴仪器有限公司联合制造),LVDV-I Prime 型黏度计(美国 Brookfield 公司)。甘草饮片购于西安盛兴中药饮片有限公司(批号 120701,经陕西中医药大学中药鉴定教研室王继涛高级实验师鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎),甘草苷、甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111610-201106,110731-200615),DA-201 型大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司),Ⅱ型 ZTC 1 + 1 天然澄清剂(天津正天成澄清技术有限公司),壳聚糖(国药集团化学试剂有限公司),乙腈、甲醇均为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘草水提液的制备 称取甘草饮片 3 kg,加 12 倍量水煎煮 2 次,每次 90 min,合并 2 次水煎液,浓缩至 15 L(0.2 g·mL⁻¹),得原液,作为样 I,备用。

2.2 甘草水提液的分离纯化

2.2.1 澄清剂的配制 Ⅱ型 ZTC1 + 1 型天然澄清剂是一种天然高分子化合物,由 A、B 两组分组成。A 组分为白色至微黄色粉末,用水配制成 1% 黏胶液;B 组分为微黄色至浅黄色粉末,用 1% 乙酸配制成 1% 黏胶液;备用。

2.2.2 壳聚糖溶液的配制 称取壳聚糖 20 g,加 1% 乙酸 2 L,静置 24 h,混匀,得 1% 壳聚糖溶液。

2.2.3 DA-201 型大孔吸附树脂使用条件^[4] 吸附条件为上样量 7 BV,上样液质量浓度 0.2 g·mL⁻¹,流速 2.5 BV·h⁻¹,吸附时间 6 h;洗脱条件为加 70% 乙醇 12 BV 洗脱。

2.2.4 Ⅱ型 ZTC1 + 1 天然澄清剂-大孔树脂联用法^[5] 采用单因素试验分别考察药液浓度、澄清剂用量及反应温度对澄清效果的影响,以指标性成分(甘草苷和甘草酸)含量为依据确定了天然澄清剂优化工艺为取原液 500 mL,加 4% 澄清剂 B,80 ℃ 保温 2 h,每 30 min 搅拌 1 次,加 2% 澄清剂 A 保温 2 h,以 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,分离得上清液,定容,得样Ⅱ。取一定量上清液,通过 DA-201 型大孔吸附树脂柱,按 2.2.3 项下条件洗脱,收集洗脱液,浓缩至上样体积,得样 V。

2.2.5 壳聚糖-大孔树脂联用法^[6] 采用单因素试验分别考察药液浓度、絮凝剂用量及药液 pH 对壳聚糖絮凝的影响,以指标性成分含量为依据确定壳聚糖优化工艺为取原液 500 mL,加热至 60 ℃ 保温,以 150 r·min⁻¹ 搅拌 10 min,加入占药液体积 30% 的 1% 壳聚糖溶液,继续搅拌 10 min,取出放冷,静置 12 h,抽滤,定容,得样Ⅲ。取一定量上清液,通过 DA-201 型大孔吸附树脂柱,按 2.2.3 项下条件洗脱,收集洗脱液,浓缩至上样体积,得样Ⅵ。

2.2.6 微滤法 采用单因素试验分别考察膜孔径、跨膜压差、提取液浓度,以指标性成分含量为依据确定微滤条件为膜孔径 0.2 μm,跨膜膜压差 0.2 MPa,提取液含生药量 0.1 g·mL⁻¹,水通量 1.625 L·m⁻²·min⁻¹。取一定量提取液稀释至 0.1 g·mL⁻¹,过微滤膜,取渗滤液并浓缩至 0.2 g·mL⁻¹,得样Ⅳ。

2.2.7 微滤-大孔树脂联用法^[7] 取一定量微滤渗滤液,按 2.2.3 项下条件通过 DA-201 型大孔吸附树脂柱,收集洗脱液,浓缩至上样体积,得样Ⅶ。

2.2.8 微滤-超滤联用法^[8] 超滤进出口压差 0.5 MPa,取一定量微滤渗滤液,过截留相对分子质量 8.0 kDa 的超滤膜,收集渗滤液,得样Ⅷ;渗滤液过截留相对分子质量 2.5 kDa 的超滤膜,收集渗滤

液,得样 IX。

2.3 大分子物质的含量测定 根据预试验选取甘草水提液中含量较高的 2 种大分子物质(蛋白质和淀粉)。采用酶水解法测定淀粉的含量,考马斯亮

蓝 G-250 比色法测定蛋白质含量。通过 $R = (1 - C_p/C_f) \times 100\%$ 计算去除率,式中 R 为去除率, C_p 为纯化液中蛋白质或淀粉的质量浓度, C_f 为原液中蛋白质或淀粉的质量浓度,结果见表 1。

表 1 甘草水提液不同纯化液的大分子去除率、物理化学参数、指标性成分保留率和相似度

Table 1 Removal rates of macromolecules, physicochemical parameters, retention rates of index components and similarity of different purified liquids compared with original water extract of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

样品	大分子去除率/%		物理化学参数					保留率/%		含固物 /%	相似度
	蛋白质	淀粉	浊度 /NTU	黏度 /mPa·s	电导率 / $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$	色差 (ΔE)/NBS	pH	甘草苷	甘草酸		
I	-	-	301.7	13.0	4 920	54.36	6.28	-	-	28.94	1.000
II	6.69	61.17	500.1	14.2	4 880	59.69	5.48	61.92	58.82	21.32	0.886
III	34.35	62.47	115.6	12.6	530	58.43	5.53	46.27	8.37	18.79	0.929
IV	47.05	72.62	258.6	10.9	4 330	52.17	5.79	70.23	47.03	21.76	0.946
V	85.91	80.96	203.9	8.6	1 190	47.40	5.47	32.23	23.52	8.51	0.877
VI	87.81	82.10	115.8	12.8	550	34.34	5.67	28.05	3.64	5.77	0.813
VII	85.87	85.96	149.9	9.7	1 180	35.88	5.39	37.75	20.30	4.71	0.765
VIII	94.67	89.63	58.6	9.6	2 780	30.52	6.16	58.76	36.82	11.91	0.886
IX	96.78	90.02	30.5	7.7	1 920	11.58	6.43	28.45	23.32	7.41	0.670

2.4 物化参数的测定 取甘草原液与各纯化液适量,均通过恒温槽控制在 25℃,采用 pH 计精密测定 pH,电导率仪测定电导率,色差计对溶液颜色进行数字量化值的测定,浊度仪测定浊度,旋转式黏度计测定黏度。依法测定原液和各纯化液的物理化学参数,结果见表 1。

由表 1 可知,粗纯化对蛋白质的去除率顺序为 II < III < IV,淀粉去除率顺序为 II ≈ III < IV,说明微滤膜对蛋白质和淀粉的去除效果比澄清剂和壳聚糖好,但对蛋白质的去除率小于淀粉。联用纯化时,蛋白质去除率排序为 IX > VIII > VI > VII ≈ V,淀粉去除率排序为 IX > VIII > VII > VI > V,联用纯化技术使蛋白质与淀粉的去除率明显提高,特别是蛋白质的去除效果比单一纯化技术增高较多。其中微滤-超滤联用技术对提取液中蛋白质与淀粉的去除率均 > 89%。超滤膜随截留相对分子质量的减小会进一步去除蛋白质和淀粉,但效果不大。在中药水提液中,大分子物质(淀粉、黏液质、果胶等)的含量与药液的黏度密切相关^[9];浊度可反映提取液中大小、相对密度不同的悬浮物和胶体物质的含量;电导率与中药提取液中带电胶体粒子(如蛋白质和鞣质)密切相关。样 III 和样 VI(壳聚糖絮凝及与大孔树脂联用得样)的电导率测定值分别为 530,550 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$,明显低于其他纯化样品,而且与大孔树脂联用后电导率变化不大,说明壳聚糖絮凝对某些带电胶体粒子影响很大。提取液的颜色及其与规定颜色的差异能在一定程度上反映药物的纯度,色差计能直接测

定溶液的透射三刺激值,对其颜色进行定量表述和分析;与原液比较,随着膜孔径的减小和联用级数的增加,黏度、浊度、电导率、色差都明显减小,说明联用有利于进一步去除大分子物质,纯化中药提取液;所有的纯化过程中 pH 变化较小。

2.5 甘草苷和甘草酸的含量测定

2.5.1 色谱条件^[10] Accurasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 19% A; 8 ~ 35 min, 19% ~ 50% A; 35 ~ 36 min, 50% ~ 100% A),检测波长 237 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 10 μL 。

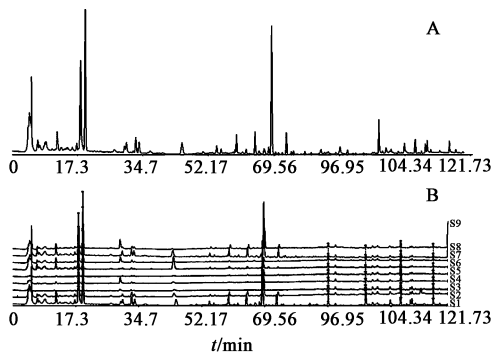
2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷、甘草酸铵对照品适量,加 70% 乙醇制成质量浓度分别为 10.02, 20.28 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得(甘草酸质量 = 甘草酸铵质量/1.0207)。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密移取原液及各纯化液 1 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.6 固含物及指标性成分的保留率 分别精密吸取甘草酸铵、甘草苷对照品溶液 3, 6, 9, 12, 15, 18 μL ,按 2.5.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程分别为 $Y = 1.547 \times 10^6 X - 1 077.53 (r = 0.999 4)$, $Y = 7.356 \times 10^6 X - 1 571.67 (r = 0.999 2)$,线性范围依次为 0.060 ~ 0.365, 0.030 ~ 0.180 μg 。计算各纯化液中指标性成分的保留率,见表 1。结果显示微滤-超滤

一次联用纯化技术对指标性成分(甘草苷和甘草酸)的保留率均高出其他3种联用技术,但与截留相对分子质量2.5 kDa的超滤膜二次联用后会使得指标性成分大大降低。由于壳聚糖分子中有活泼的羟基和氨基,化学反应能力较强,使甘草酸含量非常低,说明此类指标性成分不宜采用壳聚糖絮凝。另外,联用纯化会使固含物明显减少,应用时需结合实际尽心选择。

2.7 HPLC 指纹图谱 色谱条件参照 2.5.1 项,梯度洗脱(0~10 min, 15%~20% A; 10~25 min, 20%~25% A; 25~40 min, 25% A; 40~50 min, 25%~32% A; 50~70 min, 32%~42% A; 70~95 min, 42%~80% A; 95~110 min, 80%~100% A; 110~120 min, 100% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,柱温 30 ℃,进样量 15 μL。分别精密吸取原液与各纯化液 15 μL,参照物(甘草酸铵、甘草苷) 15 μL,记录 120 min。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版),经过数据导入、峰点校正和数据匹配,建立对照指纹图谱(R)。根据峰匹配结果,以峰面积为参数,计算各分离单元指纹图谱与 R 的整体相似度,评价纯化技术对甘草水提液中小分子物质的影响,见表 1 和图 1。结果发现与联用纯化相比,粗纯化前后小分子物质的变化较小。微滤纯化液与原液的相似度 0.946,略高于其他 2 种单用纯化方法。综合考虑,微滤-超滤联用技术在 4 种联用纯化技术中与原液相似度最高,与指标性成分的保留率结果一致,表明膜分离技术对药液组分影响相对较小;但进一步与超滤技术(截留相对分子质量 2.5 kDa)联用后,相似度减小至 0.670,说明此联用没有必要。



A. 对照图谱; B. 纯化液; S1~S9. 样 I~IX

图 1 甘草水提液 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

3 讨论

本文通过指标性成分、物理化学参数和 HPLC

指纹图谱等分析 II 型 ZTC 1 + 1 天然澄清剂、壳聚糖、微滤、超滤及 DA-201 型大孔吸附树脂等联用纯化技术对甘草水提液组分的影响。结果表明联用会进一步损失指标性成分,但大分子物质去除率明显提高。单一技术纯化中微滤技术对大分子去除效果最好,并且与原液组分相似度最高,壳聚糖絮凝会很大程度减少甘草酸含量;综合分析认为 4 种联用纯化技术中最适合甘草水提液纯化的是微滤-超滤(截留相对分子质量 8.0 kDa)联用,与原液的相似度 0.886。

壳聚糖和 II 型 ZTC 1 + 1 天然澄清剂在澄清过程中对温度有一定的要求,且静置、抽滤工艺繁琐;大孔吸附树脂成本较高;微滤与超滤联用技术操作可自动化,节省劳动力,在常温下进行,减少工艺环节,适合工业化连续生产。

膜污染是影响膜分离技术在中药领域应用的主要原因之一,本文采用陶瓷膜错流微滤技术对中药水提液进行初步澄清,有效地去除了水提液中大分子物质,使下步超滤更可行,联用技术在提高大分子物质去除率的同时降低了膜污染,但膜孔径的选择仍为重要因素。

[参考文献]

- [1] 苑可武,白芳,杨波,等. 甘草酸的提取和精制法概述[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(7): 362-364.
- [2] 田武生. 甘草的化学成分和临床研究概况[J]. 中医临床研究, 2012, 4(16): 31-32.
- [3] 张来华,王博,朱盛山. 中药水提液纯化技术研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(7): 154-157.
- [4] 张宇燕,杨洁红,万海同,等. 大孔吸附树脂提取纯化甘草有效部位研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10(6): 29-31.
- [5] 王世宇,廖婉,付超美. II 型 ZTC1 + 1 天然澄清剂与大孔树脂联用在香菇多糖纯化中的作用[J]. 中国药房, 2007, 18(18): 1381-1383.
- [6] 田洋,史崇颖,候艳,等. 壳聚糖絮凝法澄清天麻提取液的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 25-28.
- [7] 李维莉,马银海,张亚平,等. 无机陶瓷膜-树脂联用技术纯化三七叶苷的工艺研究[J]. 中药材, 2009, 32(6): 980-982.
- [8] 高红宁. 微滤-超滤法精制金银花水提液[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 54-55.
- [9] 郭立玮,潘林梅,朱华旭. 中药提取物伴生物质的生物药剂学特性及其制剂学意义[J]. 中草药, 2007, 38(9): 1281-1286.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 59-60.

[责任编辑 刘德文]