

不同纯化工艺对金钱草水提液的影响

沈芹芹,夏新华*,颜红,雷昌,黄玛莎,彭买娇
(湖南中医药大学药学院,长沙 410208)

[摘要] 目的:探索壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺对中药水提浸膏吸湿性影响的差异。方法:考察 2 种纯化工艺对浸膏得率、糖类和氨基酸保留率、蛋白质和鞣质去除率、浸膏吸湿性的影响。结果:壳聚糖絮凝澄清工艺的浸膏得率、糖类和氨基酸保留率、蛋白质和鞣质去除率均高于醇沉工艺,但浸膏吸湿性低于醇沉工艺。结论:金钱草水提浸膏的吸湿性与多糖保留率、蛋白和鞣质去除率有关,为 2 种纯化工艺的选用提供依据。

[关键词] 金钱草;醇沉;壳聚糖;絮凝澄清;吸湿性

[中图分类号] R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0013-04

[doi] 10.11653/syjf2013180013

Effects of Different Purification Processes on Water Extract of *Lysimachiae Herba*

SHEN Qin-qin, XIA Xin-hua*, YAN Hong, LEI Chang, HUANG Ma-sha, PENG Mai-jiao
(School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To explore differences between effects of chitosan flocculation clarification technology and alcohol precipitation technology on moisture absorption of water extract of Chinese medicinal herb. **Method:** Influences of two purification processes were investigated on extract yield, retention rates of carbohydrates and amino acids, removal rates of proteins and tannins, hygroscopicity of dry extracts. **Result:** Extract yield, retention rates of carbohydrates and amino acids, removal rates of proteins and tannin in chitosan flocculation clarification process were higher than that in alcohol precipitation process, but hygroscopicity of dry extracts was opposite. **Conclusion:** Moisture absorption of water extract of *Lysimachiae Herba* had relationship with retention rate of polysaccharides, removal rates of protein and tannin, it could provide the basis for selection of these two kinds of purification processes.

[Key words] *Lysimachiae Herba*; alcohol precipitation; chitosan; flocculation clarification; hygroscopicity

壳聚糖絮凝澄清法与醇沉法是中药水提液常用的纯化方法^[1-2],但二者的差异性研究较少。楚笑辉等^[3]探索了壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺对乙肝宁复方水提液的影响规律,结果显示前者浸膏

水溶液澄明度和糖类、芍药苷的转移率均高于后者,但丹酚酸 B、丹皮酚转移率与浸膏吸湿性低于后者。欧金秀等^[4]研究发现絮凝澄清工艺除去蛋白质、鞣质的效果优于醇沉工艺。

金钱草为乙肝宁颗粒组成药物之一^[5],主要分布于长江流域^[6],含有槲皮素、山奈素等黄酮类成分,具有清利湿热、通淋、消肿的功效,主治肝胆及泌尿系结石、热淋、肾炎水肿等症^[7]。为深入了解壳聚糖絮凝澄清法与醇沉法对中药水提液化学成分和浸膏吸湿性等的影 响,本实验以金钱草为研究对象,拟通过对单味药的分析,发现 2 种工艺的作用规律,

[收稿日期] 20130330(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973955)

[第一作者] 沈芹芹,硕士,从事中药制剂新技术与新剂型研究,Tel:13467609996,E-mail:532884297@qq.com

[通讯作者] *夏新华,教授,博士生导师,从事中药新剂型、新技术及质量标准研究,Tel:0731-88458305,E-mail:xiaxinhua001@163.com

为二者对复方制剂影响的考察提供参考。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), SP-756 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司), CP114 型电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司), DF101-S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂), 800 型离心沉淀器(长沙市科伟仪器厂), DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

考马斯亮蓝 G-250(天津光复精细化工研究所), 壳聚糖(国药集团化学试剂有限公司), 干酪素(甘南州科睿乳品开发有限公司), 茛三酮(上海山浦化工), 无水葡萄糖、没食子酸、精氨酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110833-200904, 0831-201105, 140685-20100), 牛血清白蛋白对照品(北京鼎国生物技术有限公司, 批号 20120317), 金钱草(湖南三湘中药饮片有限公司, 由本校刘塔斯教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾), 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 金钱草水提液的制备 取一定量的金钱草饮片, 分别加 15, 10 倍量水煎煮 2, 1.5 h, 滤过, 合并提取液, 70 °C 减压浓缩(-0.08 MPa), 于 2 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.2 1% 壳聚糖溶液的制备 称取壳聚糖 10 g 置于 1 L 烧杯中, 量取 1% 乙酸溶液 1 L 加入烧杯中, 搅拌均匀, 静置 24 h, 即得。

2.3 样品浸膏的制备

2.3.1 壳聚糖絮凝澄清浸膏 取适量金钱草水提液, 调节水提液的生药质量浓度, 置于恒温加热磁力搅拌器中, 70 °C 保温, 于 400 r·min⁻¹ 搅拌下缓缓加入相应量 1% 壳聚糖溶液, 搅拌 10 min, 静置 24 h, 抽滤, 取滤液, 70 °C 减压浓缩(-0.08 MPa) 至适量, 65 °C 真空干燥, 称重, 计算浸膏得率, 见表 1。

2.3.2 醇沉浸膏 取适量金钱草水提液, 调节药液的相对密度(60 °C), 边搅拌边加入 95% 乙醇使药液含醇量达规定浓度, 静置 24 h, 抽滤, 余下操作同 2.3.1 项, 计算浸膏得率, 见表 1。

将 2 种工艺的浸膏得率进行方差齐性检验, 得 $P = 0.327 > 0.05$, 说明 2 组数据方差无差别(方差齐)。再对 2 组数据进行双侧 t 检验, 得 $P = 2.136 \times 10^{-10}$, 表明 2 组数据具有显著性差异。

2.4 总糖、单糖、多糖的测定^[8-9]

2.4.1 标准曲线的绘制 分别精密量取 0.09 g·L⁻¹

表 1 不同纯化工艺处理金钱草水提液后的浸膏得率

No.	絮凝澄清工艺			醇沉工艺		
	生药 质量浓度 /g·mL ⁻¹	壳聚糖 加入量 /mL·g ⁻¹	浸膏 得率 /%	相对 密度	含醇量 /%	浸膏 得率 /%
	1	1/2	0.6	15.77	1.05	50
2	1/2	1.0	18.47	1.05	60	8.64
3	1/2	1.4	16.67	1.05	70	7.50
4	1/4	0.6	19.19	1.15	50	9.66
5	1/4	1.0	19.82	1.15	60	8.46
6	1/4	1.4	19.10	1.15	70	7.32
7	1/6	0.6	18.74	1.20	50	6.55
8	1/6	1.0	19.19	1.20	60	5.56
9	1/6	1.4	18.65	1.20	70	4.71

的葡萄糖对照品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于试管内, 加水至 1 mL, 各加入 5% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸 5 mL, 于沸水浴中加热 20 min, 冰水冷却, 于 488 nm 处测定吸光度(A), 以质量为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 8.511X + 0.067$ ($R^2 = 0.9994$), 表明葡萄糖在 0.018 ~ 0.091 mg 与 A 呈良好线性关系。

2.4.2 总糖测定 精密称取 2 种纯化工艺所得浸膏各 0.1 g, 均制成质量浓度 0.2 g·L⁻¹ 的溶液, 精密量取 1 mL 置于试管中, 按 2.4.1 项下方法测定 A, 计算总糖含量, 见表 2, 3。

表 2 壳聚糖絮凝澄清工艺浸膏中糖类、氨基酸、蛋白质、鞣质含量测定

No.	总糖	单糖	多糖	氨基酸	蛋白质	鞣质
1	3.36	2.945	0.415	2.333	0.051	1.534
2	4.559	2.723	1.836	2.144	0.048	1.393
3	5.73	2.232	3.498	1.808	0.063	1.214
4	4.671	2.142	2.529	3.036	0.074	1.613
5	3.405	2.660	0.745	2.216	0.064	1.461
6	3.225	2.558	0.667	2.198	0.075	1.349
7	4.198	1.904	0.415	3.072	0.067	1.558
8	3.748	1.826	1.922	2.324	0.073	1.462
9	3.874	2.191	1.683	2.820	0.069	1.199
均值	4.085	2.353	1.732	2.438	0.065	1.420

2.4.3 单糖与多糖的测定 精密称取壳聚糖絮凝澄清工艺浸膏 0.05 g, 醇沉工艺浸膏 0.1 g, 依次配成质量浓度为 0.2, 0.4 g·L⁻¹ 的溶液, 分别精密量取 1 mL 置于不同试管中, 按 2.4.1 项下方法测定 A, 计算单糖、多糖含量, 见表 2, 3。

表3 醇沉工艺浸膏中糖类、氨基酸、蛋白质、鞣质含量测定 %

No.	总糖	单糖	多糖	氨基酸	蛋白质	鞣质
1	1.386	0.977	0.409	1.590	0.102	1.592
2	1.128	1.119	0.009	1.140	0.096	1.769
3	1.086	0.269	0.817	0.984	0.096	1.952
4	1.470	1.373	0.097	1.296	0.117	1.528
5	1.248	0.673	0.575	1.098	0.109	1.789
6	1.026	0.884	0.142	0.984	0.101	1.98
7	1.015	0.610	0.405	0.811	0.082	1.443
8	0.760	0.261	0.499	0.652	0.071	1.585
9	0.718	0.561	0.157	0.535	0.062	1.751
均值	1.094	0.747	0.347	1.010	0.093	1.71

2.5 氨基酸的测定^[10] 分别称密度取 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的精氨酸溶液 0, 1.3, 1.6, 1.9, 2.2, 2.5, 2.8 mL 于试管内, 各加水至 6 mL, 各加入 2% 茚三酮溶液 1 mL 和磷酸盐缓冲液 1 mL, 将试管置于沸水浴中加热 15 min, 取出, 冰水冷却 15 min, 于 568 nm 处测定 A , 以质量为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 970X - 0.21$ ($R^2 = 0.9991$), 表明氨基酸在 0.26 ~ 0.56 mg 与 A 线性关系良好。精密称取 2 种纯化工艺所得浸膏各 0.1 g, 均制成质量浓度 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 精密量取 3 mL 置于试管中, 按上述方法测定 A , 计算氨基酸含量, 见表 2, 3。

2.6 蛋白质的测定^[11-12] 分别称密度取 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的牛血清白蛋白溶液 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL 置于试管内, 加水至 1 mL, 各加入考马斯亮蓝溶液 5 mL, 震荡摇匀, 于 595 nm 处测定 A , 以质量为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 8.717X + 0.008$ ($R^2 = 0.9997$), 表明牛血清白蛋白在 0.01 ~ 0.06 mg 与 A 线性关系良好。精密称取壳聚糖絮凝澄清工艺浸膏 0.2 g, 醇沉工艺浸膏 0.05 g, 分别制成质量浓度为 0.02, $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 各精密移取样品 1 mL, 测定 A , 计算蛋白质含量, 见表 2, 3。

2.7 鞣质的测定 精密量取 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的没食子酸溶液 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加水至 12 mL, 各加入磷钼钨酸溶液 1 mL, 用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 于 760 nm 处测定 A , 以质量为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3.381X + 0.078$ ($R^2 = 0.9990$), 表明没食子酸在 0.025 ~ 0.25 mg 与 A 呈良好线性关系。精密称取壳聚糖絮凝澄清工艺浸膏 0.2 g, 醇沉工艺浸膏 0.1 g, 分别配成质量浓度为 0.8, $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。各称密度取 2 种样品溶液 1 mL, 分

别置于 25 mL 棕色量瓶中, 加水至 10 mL, 测定 A , 计算总酚含量。各称密度取 2 种样品溶液 1 mL, 分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加水 10 mL 和干酪素 0.6 g, 密塞, 置 30 °C 水浴中保温 1 h, 时时振摇, 取出, 放冷, 摇匀, 滤过, 将滤液置于 25 mL 棕色量瓶中, 测定 A , 计算多酚含量。总酚含量减去多酚含量即得鞣质含量, 见表 2, 3。

分别将表 2, 3 中 2 组总糖、单糖、多糖、氨基酸、蛋白质、鞣质数据作方差齐性检验, 得 $P_{\text{总糖}} = 0.00377$, $P_{\text{单糖}} = 0.941$, $P_{\text{多糖}} = 0.0011$, $P_{\text{氨基酸}} = 0.417$, $P_{\text{蛋白质}} = 0.107$, $P_{\text{鞣质}} = 0.505$, 说明 2 种工艺浸膏中总糖、多糖数据方差有差异 (方差不齐), 其他数据方差无差别。分别对 2 组总糖、单糖、多糖、氨基酸、蛋白质、鞣质数据进行双侧 t 检验, 得 $P_{\text{总糖}} = 1.277 \times 10^{-6}$, $P_{\text{单糖}} = 1.240 \times 10^{-7}$, $P_{\text{多糖}} = 0.00289$, $P_{\text{氨基酸}} = 6.552 \times 10^{-7}$, $P_{\text{蛋白质}} = 0.00079$, $P_{\text{鞣质}} = 0.00204$, 均 < 0.01 , 说明 2 种工艺的浸膏中总糖、单糖、多糖、氨基酸、蛋白质、鞣质数据均具有显著性差异。结果表明壳聚糖絮凝澄清工艺对金钱草水提液中糖类、氨基酸的保留明显高于醇沉工艺, 而蛋白质、鞣质的保留率则低于醇沉工艺。

2.8 吸湿性的测定

2.8.1 吸湿率的测定 取 18 份浸膏样品适量, 置于含有 P_2O_5 的干燥器内干燥 48 h, 同时将盛有 NaCl 过饱和溶液的玻璃干燥器放入 25 °C 恒温培养箱内, 恒温 24 h (相对湿度约 75.28%), 备用。称取 2 种纯化工艺的浸膏适量, 置于已恒重的称量瓶中 (约 2 mm 厚), 将称量瓶放入上述玻璃干燥器中 (称量瓶盖打开) 于 25 °C 保存, 分别于 2, 6, 12, 24, 32, 48, 56, 72, 88, 104, 120 h 称定质量, 计算吸湿率, 以 t 为横坐标, 吸湿率为纵坐标, 绘制吸湿曲线, 见图 1, 表明壳聚糖絮凝澄清工艺浸膏的吸湿性明显低于醇沉工艺浸膏, 对 2 种纯化工艺浸膏在不同时间点吸湿率进行双侧配对 t 检验, 表明两组数据具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

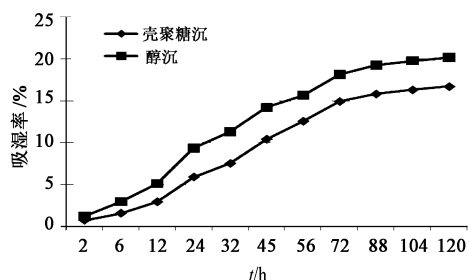


图1 壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺浸膏的吸湿曲线

2.8.2 临界相对湿度的测定 分别称取已干燥至恒重的 18 份浸膏适量,置于已恒重的称量瓶中(厚约 2 mm),精密称定,将称量瓶(瓶盖打开)置于盛有 54% 浓硫酸、48% 浓硫酸、44% 浓硫酸、溴化钠、氯化钠、氯化钾、硝酸钾 7 种过饱和溶液的干燥器内,于 25 ℃ 恒温培养箱中保持 7 d(干燥器内相对湿度分别为 29.55%, 40.52%, 48.52%, 57.70%, 75.28%, 84.26%, 92.48%),称定质量,计算平衡吸湿率。以相对湿度为横坐标,平衡吸湿率为纵坐标,绘制平衡吸湿曲线,作曲线两端的切线,两切线交点对应的横坐标即为临界相对湿度(CRH),见图 2,结果表明壳聚糖絮凝澄清工艺浸膏的 CRH 大于醇沉工艺浸膏,即前者吸湿性更小。

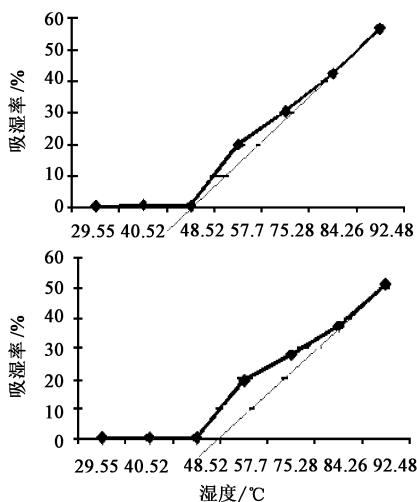


图 2 不同纯化工艺浸膏的平衡吸湿曲线

3 讨论

以往研究多注重于考察 2 种工艺对水提液的澄明度和主要有效成分(或指标成分)的影响,本实验重点针对与中药水提浸膏吸湿性密切相关的几类亲水性成分进行考察,探索这些亲水性成分与 2 种工艺对中药水提浸膏吸湿性影响具有差异性的关系,结果表明 2 种纯化工艺对金钱草水提液的影响存在明显差异。采用壳聚糖絮凝澄清工艺处理金钱草水提液,可使其浸膏吸湿性较醇沉工艺明显降低。前期对乙肝宁水提取物中糖类成分的吸湿性考察表明,总多糖的吸湿性较低,显著低于总单糖与总低聚糖^[13]。推测壳聚糖絮凝澄清工艺降低金钱草水提浸膏吸湿性的作用优于醇沉工艺可能与多糖保留、除蛋白和鞣质的效果有关。

在醇沉工艺中,药液相对密度与含醇量对试验指标的影响具有明显规律性,随相对密度与含醇量

的增加,浸膏得率与糖类、氨基酸、蛋白质含量呈明显下降趋势,其中药液相对密度的影响比含醇量大;但对鞣质的影响,趋势则有所不同,随含醇量的增加,鞣质含量增加。在壳聚糖絮凝澄清工艺中,药液质量浓度与壳聚糖加入量二因素对各项试验指标的影响不像醇沉工艺那样具有明显规律性,但二者对不同指标的影响程度存在差异的,其中药液质量浓度对浸膏得率和糖类、氨基酸、蛋白质含量的影响比壳聚糖加入量大,对鞣质的影响则反之。

[参考文献]

- [1] 王龙虎,吴国良,程翼宇.壳聚糖及其衍生物在中药制药工业中的应用[J].中国中药杂志,2004,29(4):289.
- [2] 陈燕军,冯青然.常用精制方法在纯化中药制剂中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(3):56.
- [3] 楚笑辉,唐路梅,夏新华.壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺纯化乙肝宁复方水提液的对比研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):1.
- [4] 欧金秀,夏新华.絮凝澄清技术与醇沉工艺用于精制乙肝宁水提液的对比研究[D].长沙:湖南中医药大学,2006.
- [5] 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,2010:403.
- [6] 刘基柱.中草药识别与应用[M].广州:人民杂志社,2010:302.
- [7] 刘隽,邹国林.金钱草的研究进展[J].唐山师范学院学报,2002,24(2):8.
- [8] 李静,桂卉,颜红,等.壳聚糖絮凝乙肝宁复方水提液的实验研究[J].中成药,2012,34(12):37.
- [9] 王宏洁,李鹏跃,刘婷,等.苯酚硫酸法测定清开灵注射液中总多糖的含量[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(11):2.
- [10] 李仲秋.壳聚糖絮凝澄清法对乙肝宁复方中氨基酸类吸湿性研究[D].长沙:湖南中医药大学,2012.
- [11] 赵英永,戴云,崔秀明,等.考马斯亮蓝 G-250 染色法测定草乌中可溶性蛋白质含量[J].云南民族大学学报:自然科学版,2006,15(3):235.
- [12] 包华音,石俊英.不同产地和不同部位的壁虎药材蛋白质比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):69.
- [13] 桂卉,严航,李静,等.乙肝宁水提取物中糖类成分吸湿性考察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):32.

[责任编辑 仝燕]