

壳聚糖絮凝沉降法对蒽醌类成分的影响

战兵, 张超, 盛华刚, 林桂涛*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 研究壳聚糖絮凝沉降法对蒽醌类成分的影响。方法: 选择大黄为研究对象, 采用壳聚糖沉降法处理大黄水提液, 以大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数和浸膏率为指标, 选取药液质量浓度、壳聚糖加入量、药液 pH 为考察因素, 通过正交试验优选壳聚糖絮凝沉降工艺; 并与乙醇沉淀法比较。结果: 优选的壳聚糖絮凝沉降工艺为药液质量浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 壳聚糖加入量 10%, 药液 pH 6。壳聚糖沉淀法和乙醇沉淀法均能较好地使水提液沉淀, 但两者均会造成蒽醌类成分的损失, 前者在降低浸膏率、保留有效成分方面优于后者。2 种沉淀法纯化后, 药液中蒽醌类成分与未纯化药液比较无显著性差异。结论: 壳聚糖絮凝沉降法对蒽醌类成分影响较乙醇沉淀法小, 可用于含蒽醌类成分中药的沉淀, 但是否适合于大生产有待进一步研究。

[关键词] 壳聚糖; 絮凝沉降法; 乙醇沉淀法; 蒽醌; 大黄

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0004-04

Effect of Chitosan Flocculation Sedimentation Method on Anthraquinones

ZHAN Bing, ZHANG Chao, SHENG Hua-gang, LIN Gui-tao*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To study on effect of chitosan flocculation sedimentation method on anthraquinones. **Method:** Taking *Rheum palmatum* as research object, water extracting liquid of *R. palmatum* was handled by chitosan sedimentation, with the mass fraction of rhein, emodin, aloe-emodin, chrysophanol, physcion and extract rate as indexes, orthogonal test was used to optimize chitosan flocculation sedimentation by taking the mass concentration and pH of water extracting liquid, the amount of chitosan as factors; And compared with ethanol precipitation method. **Result:** Optimized chitosan flocculation sedimentation technology was: the mass concentration of water extracting liquid $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with pH 6, the amount of chitosan 10%. Both chitosan flocculation sedimentation method and ethanol precipitation method could precipitate water extract preferably, but also lead to loss of anthraquinones. The former was better than the latter in reducing extract rate and retaining

[收稿日期] 20120606(005)

[基金项目] 国家科技重大专项——“重大新药创制”(2009ZX09301-013)

[第一作者] 战兵, 在读硕士, 从事中药炮制原理及中药新药研究, Tel: 15053121623, E-mail: zhanbing1022@126.com

[通讯作者] * 林桂涛, 教授, 硕士生导师, 从事中药炮制原理及中药新药研究, Tel: 0531-89628590, E-mail: linguitaoli@163.com

[8] Kang Y J, Chung H J, Nam J W, et al. Cytotoxic and antineoplastic activity of timosaponin A-III for human colon cancer cells [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4): 701.

[9] Sy L K, Yan S C, Lok C N, et al. Timosaponin A-III induces autophagy preceding mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10229.

[10] 梁雷, 边宝林, 王宏洁. 不同产地知母药材中芒果苷和知母皂苷 B II 的含量测定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(16): 49.

[11] Yang Y S, Zhang T, Yu S C, et al. Transformation of geniposide into genipin by immobilized beta-glucosidase in a two-phase aqueous-organic system [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 4295.

[12] 张李赢, 杨铁彝, 张彤, 等. 牛蒡苷元制备方法的研究 [J]. *中药材*, 2012, 35(3): 467.

[责任编辑 全燕]

active ingredients. There was no significant difference between the purified and unpurified liquid by these two kinds of precipitation methods. **Conclusion:** Effect of anthraquinones by chitosan flocculation sedimentation method was lower than ethanol precipitation method, it could be used in precipitation of Chinese materia medica containing anthraquinones, but it needed more research to decide if this method fitted expandable production.

[**Key words**] chitosan; flocculation sedimentation method; ethanol precipitation method; anthraquinones; *Rheum palmatum*

壳聚糖是一种碱性多糖,与酸或酸性化合物结合成聚电解质后,具有优异的絮凝作用。目前,壳聚糖絮凝沉降法已被广泛应用于各个领域。中药材所含蒽醌类成分具有抗肿瘤、抗炎、降血脂、增加免疫力等生理活性,具有很高的临床应用价值^[1]。蒽醌类化合物因分子中羧基的有无及酚羟基的数目与位置不同,使得其酸碱性存在一定差异,壳聚糖的沉淀效果受酸碱性影响较大,为考察壳聚糖沉淀法对蒽醌类成分的影响,本试验选择大黄(含有5种不同酸碱性蒽醌类成分)为研究对象,用壳聚糖絮凝法对其水提液进行纯化,同时比较壳聚糖絮凝沉降法与乙醇沉淀法对大黄水提液中蒽醌类成分的影响。

1 材料

Agilent1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm),MS105DU型1/10万电子分析天平(梅特勒公司),LD5-10型离心机(北京医用离心机厂)。

大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为0756-200110,110757-200206,110796-200513,758-9402,110795-200605),试剂为分析纯或色谱纯。

大黄药材购自济南建联中药材店,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 蒽醌类成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15),检测波长254 nm,流速1 mL·min⁻¹。

2.1.2 供试品溶液的制备 取壳聚糖沉淀后的溶液2 mL,水浴蒸干,残渣加75%乙醇10 mL,加水10 mL,10% HCl 5 mL,三氯甲烷15 mL,加热回流1 h,放冷,取三氯甲烷层,酸液用三氯甲烷提取3次,每次15 mL,合并三氯甲烷液,减压回收至干。残渣加甲醇使溶解,转移至10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 线性关系考察 精密称取芦荟大黄素、大黄

酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,分别加甲醇溶解并定容,制成芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为18.8,19.8,22.6,19.0,11.84 mg·L⁻¹的对照品溶液。分别吸取上述各溶液,注入液相色谱仪,以对照品质量浓度对峰面积进行线性回归,得回归方程分别为 $Y_{\text{芦荟大黄素}} = 52.524X + 2.3367$ ($R^2 = 0.9999$), $Y_{\text{大黄酸}} = 95.244X + 4.5884$ ($R^2 = 0.9998$), $Y_{\text{大黄素}} = 48.833X - 0.39$ ($R^2 = 0.9999$), $Y_{\text{大黄酚}} = 95.671X - 2.2301$ ($R^2 = 0.9999$), $Y_{\text{大黄素甲醚}} = 69.516X - 2.3436$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围分别为0.94~18.8,0.99~19.8,1.13~22.6,0.95~19.0,0.592~11.84 mg·L⁻¹。

2.1.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温下放置,分别于配置后0,2,4,8,12 h进样,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积RSD分别为1.20%,1.07%,1.38%,1.17%,1.63%。说明5种成分在12 h内稳定。

2.1.5 重复性试验 对同一样品,连续取样5次,制备供试品溶液,测定5种蒽醌成分的含量,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的RSD分别为1.24%,0.95%,1.30%,1.28%,1.18%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 回收率试验 采用加样回收率试验,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的加样回收率分别为98.2%,97.3%,98.5%,97.4%,98.9%,表明该方法可行。

2.1.7 样品测定 精密吸取供试品溶液和对照品溶液各20 μL,注入液相色谱仪,进行测定。

2.2 壳聚糖絮凝沉降工艺优选^[2-7] 在预试验基础上,选取药液质量浓度、壳聚糖加入量、药液pH为考察因素,按L₉(3⁴)正交表进行试验,考察各因素对药液成分的影响,优选壳聚糖絮凝沉降法的工艺条件,因素水平见表1。分别精密量取0.4,0.2,0.1 g·mL⁻¹大黄药液25,50,100 mL,加热至70℃,调节药液pH,加入相应量壳聚糖溶液,搅拌20 min,静置12 h,离心(3 000 r·min⁻¹)15 min,上清液转移至250 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,进样。试验安排

及结果见表 2, 极差分析见表 3。

表 1 大黄水提液壳聚糖絮凝沉淀工艺正交试验因素水平

水平	A 药液质量浓度 /g·mL ⁻¹	B 壳聚糖加入量 /%	C pH
1	0.4	10	5
2	0.2	20	6
3	0.1	40	7

注: 大黄水提液 pH 约 5, 用 1% NaOH 溶液调节 pH; 壳聚糖溶液配制是加 1% 乙酸使溶解, 制成质量分数 1% 的溶液。

表 2 大黄水提液壳聚糖絮凝沉淀工艺正交试验安排

No.	A	B	C	芦荟大黄素 /mg·g ⁻¹	大黄酸 /mg·g ⁻¹	大黄素 /mg·g ⁻¹	大黄酚 /mg·g ⁻¹	大黄素甲醚 /mg·g ⁻¹	浸膏率 /%
1	1	1	1	2.82	5.32	0.68	0.75	0.58	22.88
2	1	2	2	2.52	5.05	0.76	0.67	0.49	24.15
3	1	3	3	2.77	5.12	0.77	0.71	0.52	24.25
4	2	1	2	3.79	6.67	0.85	0.84	0.50	26.15
5	2	2	3	4.15	6.95	0.98	0.92	0.66	27.45
6	2	3	1	2.74	3.45	0.58	0.63	0.41	21.50
7	3	1	3	4.30	7.46	1.17	1.03	0.72	28.8
8	3	2	1	3.38	3.72	0.68	0.75	0.46	23.10
9	3	3	2	3.62	5.26	0.83	0.82	0.58	28.48

表 3 大黄水提液壳聚糖絮凝沉淀工艺正交试验极差分析

指标		A	B	C
芦荟大黄素	K ₁	2.703	3.637	2.943
	K ₂	3.553	3.313	3.310
	K ₃	3.733	3.040	3.737
	R	1.030	0.597	0.794
大黄酸	K ₁	5.163	6.483	4.163
	K ₂	5.690	5.240	5.660
	K ₃	5.480	4.610	6.510
	R	0.527	1.873	2.347
大黄素	K ₁	0.737	0.900	0.647
	K ₂	0.803	0.807	0.813
	K ₃	0.893	0.727	0.973
	R	0.156	0.173	0.326
大黄酚	K ₁	0.710	0.873	0.710
	K ₂	0.797	0.780	0.777
	K ₃	0.867	0.720	0.887
	R	0.157	0.153	0.177
大黄素甲醚	K ₁	0.530	0.600	0.483
	K ₂	0.523	0.537	0.523
	K ₃	0.587	0.503	0.633
	R	0.064	0.097	0.150
浸膏率	K ₁	23.76	25.94	22.49
	K ₂	25.03	24.90	26.26
	K ₃	26.79	24.74	26.83
	R	3.03	1.20	4.34

由表 2, 3 可知, pH 对大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的损失及浸膏率的影响较大, 而对芦荟大黄素的影响较大的是药液质量浓度。以芦荟大黄素为指标, 最佳沉淀条件为 A₃B₁C₃; 以大黄素为指标, 最佳沉淀条件为 A₃B₁C₃; 以大黄酚为指标, 最佳沉淀条件为 A₃B₁C₃; 以大黄素甲醚为指标, 最佳沉淀条件为 A₃B₁C₃; 以大黄酸为指标, 最佳沉淀条件为 A₂B₁C₃; 以浸膏率为指标, 最佳条件为 A₁B₃C₁。

综上所述, 确定最佳沉淀工艺为 A₃B₁C₃, 即药液质量浓度 0.1 g·mL⁻¹, 壳聚糖加入量 10%, 药液 pH 6。

2.3 沉淀工艺比较

2.3.1 乙醇沉淀处理 取 0.2 g·mL⁻¹ 的大黄原药液 50 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加 95% 乙醇至刻度, 摇匀, 静置 24 h, 滤过, 滤渣用 50% 乙醇洗涤, 洗涤液与滤液合并, 置于 250 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 浸膏率的测定 精密吸取壳聚糖絮凝沉淀后药液、乙醇沉淀后药液各 20 mL 和原提取液 (0.4 g·mL⁻¹) 2 mL, 分别置于已干燥至恒重的蒸发皿中, 蒸干, 于 105 °C 烘 3 h, 取出, 置于玻璃干燥器中冷却 30 min 后称定质重, 计算浸膏率。

壳聚糖沉淀法和乙醇沉淀法对大黄提取液中蒽醌类成分的影响见表 3, 4。

结果表明壳聚糖沉淀法和乙醇沉淀法均能造成蒽醌类成分的损失, 但前者损失较少; 浸膏率前者较后者低。2 种沉淀法对不同成分造成的损失不同, 对含量较高的成分 (芦荟大黄素、大黄酸) 造成的损失较小, 而对含量较低的成分 (大黄素、大黄酚、大黄素甲醚) 造成的损失较大, 损失量可达 50%。相对于原药液, 不同沉淀法对大黄提取液中 5 种蒽醌

表4 不同沉淀方法对大黄水提液中蒽醌类成分含量的影响

处理方法	芦荟大黄素 /mg·g ⁻¹	大黄酸 /mg·g ⁻¹	大黄素 /mg·g ⁻¹	大黄酚 /mg·g ⁻¹	大黄素甲醚 /mg·g ⁻¹	总蒽醌 /mg·g ⁻¹	浸膏率/%
壳聚糖沉淀	3.78	5.71	0.82	0.81	0.64	11.76	22.74
乙醇沉淀	3.56	5.88	0.76	0.69	0.58	11.47	24.13
原药液	4.52	6.19	1.40	1.32	1.15	14.58	26.94

类成分之间的比率有一定影响,增大了含量高的成分与含量低成分之间的差异,但含量高的成分之间及含量低的成分之间的比例无较大改变。

2.3.3 相似度分析

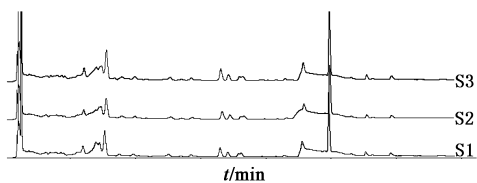
表5 大黄水提液不同沉淀法处理后各成分相对比率 %

药液处理方法	芦荟 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素 甲醚
壳聚糖沉淀	5.91	8.92	1.28	1.27	1
乙醇沉淀	6.14	10.14	1.31	1.19	1
原药液	3.93	5.38	1.22	1.15	1

2.3.3.1 供试品溶液的制备 取壳聚糖沉淀后和乙醇沉淀后药液各 25 mL,0.2 g·mL⁻¹原药液 5 mL,分别置于锥形瓶中,蒸干,精密加入 75% 乙醇 25 mL,称定质重,超声处理 15 min,称定质重,用 75% 乙醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3.2 色谱条件^[8] 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,柱温 25 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,流动相甲醇(A)-0.4% 冰乙酸溶液(B)梯度洗脱(0~50 min,32%~62% A;50~60 min,62%~83% A),进样量 20 μL。

2.3.3.3 检测波长的选择 考察 254,222,226,230,280 nm 等波长处获得的色谱图,发现在 254 nm 处检测的峰数目最多,分离度较好,故选择检测波长 254 nm。见图 1。



S1. 原药液;S2. 乙醇沉淀法;S3. 壳聚糖沉淀法

图1 大黄提取液指纹图谱比较

由图 1 可知,壳聚糖沉淀法及乙醇沉淀法相对于原药液的相似度分别为 0.945,0.923。说明沉淀后药液虽造成了成分损失和不同成分间比率的变化,但沉淀后药液保留了原药液的成分信息。

3 讨论

壳聚糖絮凝沉淀法与乙醇沉淀法在保留大黄总蒽醌类有效成分上差别不大,以总蒽醌保留量和浸膏率为指标,壳聚糖沉淀法优于乙醇沉淀法,但沉淀效果均不是十分理想。且 2 种纯化后药液的 HPLC 与原药液相似度均 >0.9,说明纯化后药液保留了原药液的大部分成分。

壳聚糖絮凝沉淀法和乙醇沉淀法均能造成蒽醌类成分的损失,损失量可达 20%,但对不同的成分造成的损失有较大的差异。因此有可能会改变其作用性质。壳聚糖絮凝沉淀造成的蒽醌类成分的损失与蒽醌苷元酸性的大小关系不大,可能与其多以苷形式存在有关,苷加热后不稳定,可能转化为游离蒽醌,加入壳聚糖会加速其沉淀;也可能与 5 种成分酸性均较弱有关,具体原因还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 曹亮,周建军. 蒽醌类化合物的研究进展[J]. 西北药学杂志,2009,24(3):237.
- [2] 杜成安,严襄陵,方剑文. 吸附澄清法在中药水提液澄清中的应用研究[J]. 中成药,1993,15(11):2.
- [3] 储秋萍. 壳聚糖用于黄芪口服液澄清的工艺探讨[J]. 中成药,1998,20(12):2.
- [4] 李汉保,谢虞升,任海洋,等. 壳聚糖法代替醇沉法制备平疣口服液[J]. 中草药,1998,29(2):167.
- [5] 周昕,徐莲英. 抗感颗粒剂絮凝工艺的研究[J]. 中成药,1999,21(4):167.
- [6] 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.
- [7] 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):1.
- [8] 石志红,何建涛,常文保. 中药指纹图谱技术[J]. 大学化学,2004,19(1):33.

[责任编辑 全燕]