

# 壳聚糖絮凝沉降法对葛根芩连汤中黄酮和生物碱类成分的影响

孙星, 盛华刚, 张超, 林桂涛\*  
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

**[摘要]** 目的: 考察壳聚糖絮凝沉降法对葛根芩连汤中黄酮及生物碱类成分的影响。方法: 以葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、浸膏率作为考察指标, 采用正交试验法研究药液浓缩程度、壳聚糖用量、pH对壳聚糖絮凝沉降法精制葛根芩连汤中黄酮和生物碱类成分的影响, 并与乙醇沉淀法、离心沉降法及滤过法进行比较。结果: 壳聚糖絮凝沉淀法的最佳条件为药液质量浓度  $0.78 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 壳聚糖加入量 10%、药液 pH 6, 与不同沉淀方法比较, 壳聚糖的沉淀效果最佳。结论: 壳聚糖可有效保留药液中有有效成分, 降低浸膏率, 同时改变药液中成分的组成比例, 因此选用此方法时需慎重。

**[关键词]** 壳聚糖; 絮凝沉降法; 葛根芩连汤; 黄酮; 异黄酮; 生物碱

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0012-05

## Influence of Chitosan Flocculation Sedimentation Method on Flavonoids and Alkaloids from Gegen Qinlian Decoction

SUN Xing, SHENG Hua-gang, ZHANG Chao, LIN Gui-tao\*

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate influence of chitosan flocculation sedimentation method on flavonoids and alkaloids from Gegen Qinlian decoction. **Method:** With puerarin, baicalin, berberine hydrochloride and extract rate as indexes, orthogonal design method was used to study effect of three factors including liquid concentrated degree, pH and the amount of chitosan on refining flavonoids and alkaloids from Gegen Qinlian decoction by chitosan flocculation sedimentation method, and compared with ethanol precipitation, centrifugal sedimentation and filtration method. **Result:** Optimum purification process of chitosan flocculation sedimentation method was: the mass concentration of liquid  $0.78 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the addition amount of chitosan 10%, pH 6, by comparing with different precipitation method, sedimentation effect of chitosan was the best. **Conclusion:** Chitosan could effectively retain active ingredients in liquid and reduce extract rate, but this method could change composition proportion of ingredients in liquid, so it should be cautious to choose this method.

**[Key words]** chitosan; flocculation sedimentation method; Gegen Qinlian decoction; flavonoids; isoflavones; alkaloids

葛根芩连汤原载于东汉张仲景《伤寒论》,由葛

根、黄芩、黄连、炙甘草 4 味中药组成,具有解表清里、升清止痢之功效。近几年来,壳聚糖絮凝沉淀法用于中药提取液的澄清显示了较好的效果<sup>[1-4]</sup>。为进一步考察壳聚糖絮凝沉淀法对含黄酮类及生物碱类成分的中药成分的影响,本试验选用葛根芩连汤进行研究,其中葛根、黄芩含黄酮类成分,黄连含生物碱类成分,以有效成分含量、浸膏率为考察指标,优选壳聚糖絮凝沉降法的工艺条件,并与其他传统方法进行比较。

**[收稿日期]** 20120604(006)

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2009ZX09301-013)

**[第一作者]** 孙星,在读硕士,从事中药炮制原理及中药新药的研究, Tel: 15953106416, E-mail: sunxing\_1234@163.com

**[通讯作者]** \*林桂涛,教授,硕士生导师, Tel: 0531-89628590, E-mail: linguitaoli@163.com

## 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),KromasilC<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),UV3010 型紫外分光光度计(日立公司),BT 25S 型 1/10 万电子分析天平(梅特勒-托利多仪器公司),LD5-10 型离心机(北京医用离心机厂),PHS-3C 型 pH 计(上海三信仪表厂)。

药材均购自济南建联中药店,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相应品种项下的相关规定。壳聚糖(山东奥康生物科技有限公司),葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱等对照品均购于中国药品生物制品检定所,批号分别为 110752-200511,110715-200514,110731-200614。

## 2 方法与结果

**2.1 壳聚糖絮凝沉降工艺条件优选** 由于提取药液质量浓度、壳聚糖加入量、pH 对壳聚糖絮凝沉降效果影响较大<sup>[5-6]</sup>,本试验以葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量和浸膏率为考察指标,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表安排试验,考察各因素对纯化效果的影响。因素水平见表 1。

表 1 葛根芩连汤的壳聚糖絮凝沉降工艺正交试验因素水平

水平	A 药液质量 浓度/g·mL <sup>-1</sup>	B 壳聚糖 加入量/%	C pH
1	0.78	10	4(原药液)
2	0.39	20	5
3	0.195	40	6

注:未纯化处理供试品溶液的质量浓度 0.78 g·mL<sup>-1</sup>,其他药液浓度系加水稀释而成;原药液 pH 约 4,其他药液 pH 用 10% NaOH 溶液调节。

**2.2 葛根芩连汤提取液的制备** 称取葛根 150 g,黄芩 90 g,黄连 90 g,炙甘草 60 g,第 1 次加 10 倍量水浸泡 15 min,葛根先煎 20 min,余药共煎 30 min;第 2 次加 7 倍量水煎煮 30 min,滤过,合并滤液,滤液浓缩,定容至 500 mL。分别量取 0.78 g·mL<sup>-1</sup> 的药液 25 mL,0.39 g·mL<sup>-1</sup> 的药液 50 mL,0.195 g·mL<sup>-1</sup> 的药液 100 mL,加热至 70 ℃,按正交表中设计调节 pH,加相应体积的壳聚糖溶液(壳聚糖加 1% 乙酸溶液溶解,制成 1% 壳聚糖溶液),搅拌 20 min,在室温环境下静置 24 h,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>) 15 min,上清液转移至 250 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。

## 2.3 黄芩苷、葛根素的含量测定

**2.3.1 色谱条件** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填

充剂,流动相水(A)-甲醇(B)-0.5% 乙酸溶液(C)进行梯度洗脱(0~10 min,20% B,20% C;10~30 min,20%~30% B,20%~17.5% C;30~50 min,30%~80% B,17.5%~5% C;50~51 min,80% B,5%~0% C;51~60 min,80%~100% B;60~70 min,100% B),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,葛根素检测波长 250 nm,黄芩苷检测波长 280 nm。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 吸取壳聚糖絮凝沉淀溶液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

## 2.3.3 线性关系考察

**2.3.3.1 葛根素** 精密量取葛根素对照品溶液(85.6 mg·L<sup>-1</sup>) 0.4,0.6,0.8,1.2,1.6,2 mL,分别置 2 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀。进样 20 μL,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程  $Y = 46.674X + 14.105$  ( $r = 0.9998$ ),结果表明葛根素在 17.12~85.6 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**2.3.3.2 黄芩苷** 精密量取黄芩苷对照品溶液(90.4 mg·L<sup>-1</sup>) 0.2,0.4,0.8,1.2,1.6,2 mL,分别置 2 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,进样 20 μL,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定。以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 31.184X + 13.553$  ( $r = 0.9998$ )。结果表明黄芩苷在 9.04~90.4 mg·L<sup>-1</sup> 呈线性关系良好。

**2.3.4 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12,24 h 进样,按 2.3.1 项下方法测定,结果葛根素、黄芩苷在 24 h 内均稳定,峰面积 RSD 分别为 2.29%,2.77%。说明供试品在 24 h 内稳定。

**2.3.5 重复性试验** 精密吸取同一供试品溶液,连续取样 5 次,按 2.3.1 项下方法测定,结果葛根素、黄芩素 RSD 分别为 1.65%,2.54%。

**2.3.6 回收率试验** 采用加样回收率试验,结果葛根素,黄芩苷平均加样回收率分别为 97.5%,98.1%,表明该方法能准确测定样品中 2 种成分的含量。

## 2.4 小檗碱的含量测定

**2.4.1 色谱条件** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,磷酸缓冲盐溶液(A为 0.02 mol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 998.6 mL + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mL,三乙胺调 pH 6.0)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~10 min,90% A;10~25 min,90%~75% A;25~35 min,75%~65% A;35~45 min,

65% ~ 60% A; 45 ~ 50 min, 50% ~ 10% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 ℃, 检测波长 268 nm。

**2.4.2 线性关系考察** 吸取盐酸小檗碱对照品溶液 (89.6 mg·L<sup>-1</sup>) 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。进样 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得回归方程  $Y = 25.184X + 3.164 (r = 0.9998)$ 。结果表明盐酸小檗碱在 3.584 ~ 35.84 mg·L<sup>-1</sup> 呈线性关系良好。

**2.4.3 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按 2.3.1 项下方法测定, 结果峰面积 RSD 2.36%, 说明供试品溶液中小檗碱在 24 h 内稳定。

**2.4.4 重复性试验** 精密吸取同一供试品溶液, 连续取样 5 次, 按 2.3.1 项下方法测定, 结果小檗碱 RSD 1.96%, 说明该方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 结果小檗碱平均回收率 98.6%, RSD 2.45%, 表明该方法稳定可行。

壳聚糖絮凝沉淀液中小檗碱、黄芩苷、葛根素的测定结果见表 2, 方差分析见表 3 ~ 5。

表 2 葛根芩连汤的壳聚糖絮凝沉降工艺正交试验安排 mg·g<sup>-1</sup>

No.	A	B	C	葛根素	黄芩苷	小檗碱
1	1	1	1	18.09	16.08	4.65
2	1	2	2	17.32	15.64	5.81
3	1	3	3	17.04	17.68	6.63
4	2	1	2	18.68	14.64	6.61
5	2	2	3	17.21	14.08	6.72
6	2	3	1	15.36	12.32	6.17
7	3	1	3	15.64	14.16	6.86
8	3	2	1	14.24	11.96	6.56
9	3	3	2	13.56	13.08	6.79
葛根素 K <sub>1</sub>	17.483	17.470	15.897			
K <sub>2</sub>	17.083	16.257	16.520			
K <sub>3</sub>	14.480	15.320	16.630			
R	3.003	2.150	0.733			
黄芩苷 K <sub>1</sub>	16.467	14.960	13.453			
K <sub>2</sub>	13.680	13.893	14.453			
K <sub>3</sub>	13.067	14.360	15.307			
R	3.400	1.067	1.854			
小檗碱 K <sub>1</sub>	5.697	6.040	5.793			
K <sub>2</sub>	6.500	6.363	6.403			
K <sub>3</sub>	6.737	6.530	6.737			
R	1.040	0.490	0.944			

注: 各成分的含量换算成原药材中的含量。

表 3 葛根素方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	15.957	2	34.242	<0.05
B	6.972	2	14.961	>0.05
C	0.938	2	2.013	>0.05
D(误差)	0.47	2		

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$  (表 4, 5 同)。

表 4 黄芩苷方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	19.702	2	25.324	<0.05
B	1.716	2	2.206	>0.05
C	5.163	2	6.636	>0.05
D(误差)	0.78	2		

表 5 小檗碱方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	1.783	2	3.936	>0.05
B	0.372	2	0.821	>0.05
C	1.373	2	3.031	>0.05
D(误差)	0.45	2		

由以上结果可知, 以葛根素为指标, 药液浓度对葛根素有显著的影响, 壳聚糖的加入量亦有较大的影响; 以黄芩苷为指标, 药液浓度有显著的影响; 在设计范围内, 各因素对小檗碱的影响较小。综合各个指标, 确定葛根芩连汤壳聚糖澄清的最佳工艺 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, 即药液质量浓度 0.78 g·mL<sup>-1</sup>, 壳聚糖加入量 10%, 药液 pH 6。

## 2.5 与乙醇沉淀法、滤过法和离心沉降法的比较

### 2.5.1 指标成分测定

**2.5.1.1 乙醇沉淀法** 吸取 0.195 g·mL<sup>-1</sup> 的药液 25 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 放置 24 h, 滤过, 取续滤液, 备用。

**2.5.1.2 滤过法** 将葛根芩连汤提取液 (0.195 g·mL<sup>-1</sup>) 滤过 (双层中速滤纸), 精密吸取续滤液 25 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 备用。

**2.5.1.3 离心沉降法** 将葛根芩连汤提取液 (0.195 g·mL<sup>-1</sup>) 离心 (3 000 r·min<sup>-1</sup>, 20 min), 吸取上清液 25 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 备用。

精密吸取各药液 2 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 按上述含量测定方法测定各个成分。精密吸取各溶液 (0.78 g·mL<sup>-1</sup>) 30 mL, 置于已干燥至恒重

的蒸发皿中,按 2010 年版《中国药典》一部附录 XA 浸出物测定法测定浸膏量,计算浸膏率<sup>[7]</sup>,结果见表 6。

表 6 不同处理方法中小檠碱、黄芩苷、葛根素的测定

样品	葛根素	黄芩苷	小檠碱	浸膏率
	/mg·g <sup>-1</sup>	/mg·g <sup>-1</sup>	/mg·g <sup>-1</sup>	/%
原药液	21.78	20.31	10.83	51.36
壳聚糖絮凝沉淀法	17.02	15.91	6.20	21.58
乙醇沉淀法	13.70	14.75	6.18	31.38
滤过法	18.63	17.61	8.94	42.16
离心沉降法	18.27	17.59	8.66	41.59

2.5.2 色谱图比较及相似度分析 分别用测定葛根素、黄芩苷和小檠碱的方法测定不同方法处理的葛根芩连汤药液的液相图谱,并进行相似度比较,结果见图 1~3 和表 7。

表 7 不同处理方法中小檠碱、黄芩苷、葛根素指纹图谱的相似度比较

样品	葛根素	黄芩苷	小檠碱
原药液	1.000	1.000	1.000
壳聚糖絮凝沉淀法	0.972	0.966	0.944
乙醇沉淀法	0.951	0.959	0.937
滤过法	0.939	0.948	0.935
离心沉降法	0.956	0.954	0.939

由以上结果可知,无论是壳聚糖絮凝沉降法还是乙醇沉淀法,均能造成成分的损失。相对于传统的乙醇沉淀法,壳聚糖絮凝沉降法对黄酮类成分能较好的保留,而对生物碱类成分小檠碱则与乙醇沉淀法无明显的差异。壳聚糖絮凝沉降的浸膏率比乙醇沉淀法明显减小,说明壳聚糖絮凝沉降在降低浸膏率的同时能保证最大限度的保留有效成分。

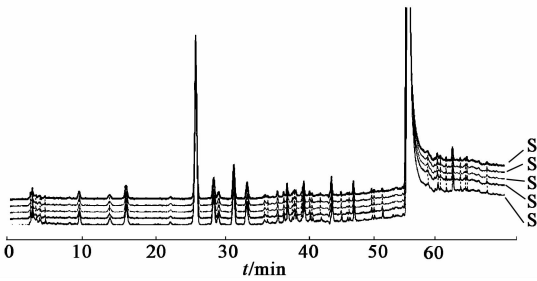
从成分损失比率角度考察,壳聚糖絮凝沉降法和乙醇沉淀法均能造成小檠碱成分有较大的损失量,乙醇沉淀法对葛根素造成的损失量也较大。与原药液比较,2 种方法由于对不同成分保留率不同而改变药液中有效成分之间的组成比例。相对于其他处理方法,滤过法造成的各类成分的损失率相差不大,而保证了药液中成分之间的组成比例与原药液相近。

由图 1~3 和表 7 可知,由各种方法 HPLC 与原药液 HPLC 的相似度比较来看,壳聚糖絮凝沉降法与原药液最为相似。

### 3 讨论

壳聚糖以其成本低,具有良好的生物学可溶性,又能保留有效成分等特点,被广泛应用于中药药液的精制。壳聚糖沉淀法和乙醇沉淀法能有效降低浸膏率,减小制剂的服用剂量。而壳聚糖沉降法相对于乙醇沉淀法既能较好的保留有效成分,又能更明显的降低浸膏率,并且壳聚糖絮凝沉降法的 HPLC 与原药液 HPLC 的相似度最为接近,因此可作为生产中优先考虑的精制手段。

壳聚糖絮凝沉淀法和乙醇沉淀法均对黄酮类和生物碱类成分造成的损失率不同,小檠碱的损失量几乎是黄酮类损失量的 2 倍。因此改变了药液中成分的组成比例,理论上讲应改变药液的药效性质。而滤过法和离心沉降法药液中的成分组成比例与原药液比较相差较小,因此使用乙醇沉淀法和壳聚糖絮凝沉降法均应该慎重。



S1. 原药液;S2. 滤过法;S3. 离心沉降法;  
S4. 乙醇沉淀法;S5. 壳聚糖絮凝沉淀法(图 2,3 同)

图 1 葛根素 HPLC 比较

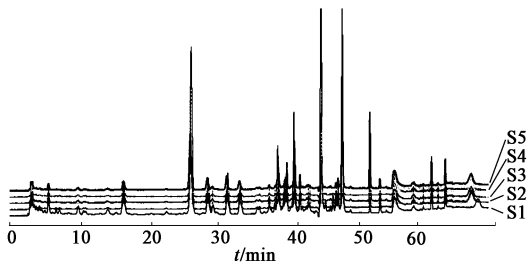


图 2 黄芩苷 HPLC 比较

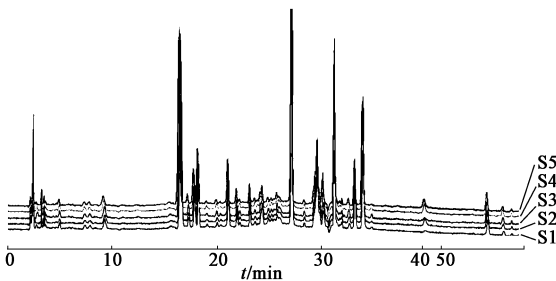


图 3 小檠碱 HPLC 比较

## 变温压差脆化破壁灵芝孢子技术考察

周萍\*, 安东, 王朝川, 冯建华, 李新胜

(中华全国供销合作总社济南果品研究院, 济南 250014)

**[摘要]** 目的:研究灵芝孢子破壁的工艺,提高灵芝孢子粉破壁率。方法:以灵芝孢子粉的含水量和影响破壁的硬度为指标,选取脆化温度、抽空干燥温度、抽空干燥时间为考察因素,采用  $L_9(3^4)$  正交设计优选变温压差脆化条件;制得的脆化样品与超微粉碎进行破壁率比较。结果:最佳脆化条件为脆化温度 100 ℃,抽空干燥温度 80 ℃,抽空干燥时间 1 h。在此条件下,灵芝孢子粉含水量 3.0%,破壁硬度 3.7 kg。脆化、干燥后的灵芝孢子粉经超微粉碎 50 min,破壁率可达 99.5%。结论:变温压差脆化结合超微粉碎技术可提高灵芝孢子破壁率。

**[关键词]** 灵芝孢子;脆化;破壁;超微粉碎;正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0016-04

## Investigation of Wall-broken Technology for *Ganoderma lucidum* by Embrittlement with Difference Temperature and Pressure

ZHOU Ping\*, AN Dong, WANG Chao-chuan, FENG Jian-hua, LI Xin-sheng

(Jinan Fruit Research Institute, China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Ji'nan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on wall-broken technology of *Ganoderma lucidum* and increase broken rate of *G. lucidum* powder. **Method:** According to index of moisture content and breaking hardness of *G. lucidum* powder, effect of embrittlement temperature, vacuum drying temperature and vacuum drying time on embrittlement conditions with different temperature and pressure were studied by  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment. And embrittlement ratio of prepared embrittlement sample and superfine grinding sample were compared. **Result:** It was found that optimum embrittlement conditions were: embrittlement temperature, vacuum drying temperature and vacuum drying time were 100 ℃, 80 ℃ and 1 h, respectively. Under these conditions, the moisture content and breaking hardness were 3.0% and 3.7 kg. After embrittled and dried, *G. lucidum* powder was broken 50 min,

**[收稿日期]** 20120529(003)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2008BADA1B06)

**[通讯作者]** \*周萍,硕士,实习研究员,从事食药菌的制剂工艺与活性研究, Tel:0531-88923142, E-mail:zhoupingg@126.com

### [参考文献]

- [1] 刘益,王玉蓉,许文博.壳聚糖絮凝沉淀法在牛膝纯化工艺中的应用性研究[J].中国中药杂志,2008,33(7):825.
- [2] 高燕,林桂涛,盛华刚.壳聚糖絮凝沉淀法精制抗疲劳颗粒的研究[J].山东中医药大学学报,2011,35(6):545.
- [3] 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.

- [4] 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.
- [5] 王海宁,谢印芝,樊飞跃.壳聚糖及 ZTC1+1-II 澄清剂对大青叶提取液的澄清工艺研究[J].中国药房,2008,19(21):1625.
- [6] 任红莉,阿依努尔,宋达.壳聚糖用于银杏叶提取液澄清工艺的研究[J].西北药学杂志,2009,24(1):25.
- [7] 中国药典.一部[S].2010:附录 62.

[责任编辑 全燕]