

· 工艺与制剂 ·

## 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

楚笑辉,唐路梅,夏新华\*  
(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乙肝宁复方水提液的影响规律。方法:以干膏得率、药液澄明度、糖类及 3 种有效成分含量,浸膏吸湿率为评价指标,对上述 2 种纯化工艺进行对比考察。结果:2 种纯化工艺的干膏得率相近;絮凝澄清工艺浸膏水溶液澄明度及其糖类、芍药苷的转移率均高于醇沉工艺,但其丹酚酸 B 和丹皮酚转移率均低于醇沉工艺。絮凝澄清工艺浸膏的吸湿性低于醇沉工艺浸膏。结论:为进一步研究中草药浸膏固体制剂吸湿性机制与合理选择适宜纯化工艺用于中药制剂生产提供实验依据。

[关键词] 乙肝宁;壳聚糖;絮凝澄清;醇沉;吸湿性

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)21-0001-04

## Comparative on Purifying Aqueous Solution of Yiganning Compound by Chitosan Flocculation Clarification Technology and Alcohol Precipitation Technology

CHU Xiao-hui, TANG Lu-mei, XIA Xin-hua\*  
(School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To explore influence discipline of chitosan flocculation clarification and alcohol precipitation for aqueous solution of Yiganning compound. **Method:** Sample was investigated by multi-indexes to evaluate difference of two purification methods for aqueous solution of Yiganning compound, such as yield of extracts, physic liquor clarity, the content of carbohydrate (polyose, monosaccharide, oligosaccharide) and three active component (peoniflorin, salvianolic acid B and paeonol), moisture absorption ratio. **Result:** Yield of extracts of ethanol precipitation samples was close to chitosan clarification samples. Physic liquor clarity, transfer rate of carbohydrate and paeoniflorin of ethanol precipitation samples was lower than chitosan clarification samples, while transfer rate of salvianolic acid B and paeonol of ethanol precipitation samples are higher than chitosan clarification samples. Extracts hygroscopicity of ethanol precipitation samples are higher than chitosan clarification samples. **Conclusion:** The result provided a feasible method for investigating purification process of herbal extract preparation, and could be used for purification preparation craft optimization of herbal praeparatum.

[Key words] Yiganning; chitosan; flocculation clarification; alcohol precipitation; hygroscopicity

[收稿日期] 20110307(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973955)

[第一作者] 楚笑辉,在读硕士研究生,从事中药新制剂工艺与质量标准的研究,Tel: 15802617470, E-mail: scartf@gmail.com

[通讯作者] \*夏新华,教授,博士生导师,Tel: 0731-88458305, E-mail: xiaxinhua001@163.com

醇沉法存在工艺流程长、成本高、危险等缺点<sup>[1-2]</sup>。壳聚糖絮凝澄清工艺能使体系中粒度较大的颗粒及具有斯托克沉淀趋势的悬浮颗粒絮凝沉淀,能保留绝大多数有效的高分子物质如多糖<sup>[3-6]</sup>。目前将二者结合进行系统对比分析的研究较少,且对中药复方成分含量影响的研究一般只涉及一个或一类化学成分<sup>[7-11]</sup>,故所得结论有一定局限性。

乙肝宁颗粒收载于《中国药典》<sup>[12]</sup>,由黄芪、白芍、茵陈、丹参、金钱草、白花舌蛇草、白术等 13 味中药组成,具有调气健脾、清热利胆、活血化瘀之功效,用于治疗慢性迁延性肝炎等。本文以乙肝宁为模型药物,分别采用醇沉法和壳聚糖絮凝澄清法纯化其水提液对 2 种纯化方法进行较为全面的比较,以探索其影响规律,为进一步选择适宜的方法用于中药提取液的纯化提供依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(G1329A 型自动控温进样器,G1314B 型可变波长检测器,Agilent 公司),800 型离心沉淀器(长沙市科伟仪器厂),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)。

芍药苷(批号 110736-200934)、丹酚酸 B(批号 111562-201009)、丹皮酚(批号 110708-200506)、大黄素(批号 110756-200110)、齐墩果酸(批号 110709-200505)和熊果酸(批号 110742-200517)均购于中国药品生物制品检定所,葡萄糖(批号 F20080402,国药集团化学试剂有限公司),壳聚糖(批号 F20091203,国药集团化学试剂有限公司),甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯(湖南汇虹试剂有限公司),水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

白花蛇舌草、金钱草、党参、蒲公英、制何首乌、牡丹皮、丹参、茯苓、白芍、白术和川楝子均购于北京同仁堂药店,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定。

**苯酚试液的配制** 取苯酚(批号 20100908,湖南汇虹试剂有限公司)100 g,加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.105 g,蒸馏,收集 182 °C 馏分。称取次馏分 6 g,加 95 mL 水,置棕色瓶中即得。

**1% 壳聚糖溶液的配制** 取壳聚糖 5 g,加 1% 醋酸 500 mL,静置 2 4 h,搅拌均匀即得。

## 2 方法与结果

### 2.1 乙肝宁水提液纯化样品的制备

**2.1.1 乙肝宁水提液的制备** 按乙肝宁颗粒处方

比例称取 200 g 生药,分别加 10 倍量水浸泡 30 min,回流提取 2 h,趁热过滤,滤渣加 8 倍量水回流提取 2 h,趁热过滤,合并滤液,减压浓缩至生药-药液比为 1:3,备用。取适量等分成 3 份,静置 24 h,离心并过滤,收集滤液与滤渣,备用。

**2.1.2 乙肝宁水提液醇沉纯化样品的制备** 取上述 1:3 的乙肝宁复方水提液适量,等分成 3 份,分别加乙醇至含醇量达 50%,冷藏 24 h,离心并过滤,收集滤液与滤渣,备用。

**2.1.3 乙肝宁水提液壳聚糖絮凝澄清纯化样品的制备** 取上述 1:3 的乙肝宁复方水提液适量,加等量水使水提液生药-药液比为 1:6,等分成 3 份,分别于水浴加热至 60 °C,边搅拌边缓缓加入 1% 壳聚糖溶液(每克生药加入 1.5 mL 壳聚糖溶液),继续搅拌 10 min 后,静置 24 h,离心并过滤,收集滤液与滤渣,备用。

### 2.2 样品的测定

**2.2.1 浸膏得率测定** 取上述未纯化、醇沉及絮凝工艺后所得滤液和滤渣,分别经减压浓缩、真空干燥(65 °C)至恒重,计算浸膏得率分别为 31.54%, 27.20%, 28.18%, 滤渣得率分别为 2.19%, 5.71%, 5.67%。结果表明,乙肝宁水提液经 2 种纯化工艺处理后其浸膏得率相对于未纯化的水提液均有一定程度的减少,但 2 种纯化工艺浸膏得率差异不大,滤渣得率亦相近。

**2.2.2 澄明度测定** 精密称取 2.2.1 项下所得 3 种干浸膏样品适量,加蒸馏水超声溶解后,定容至 5 mL,以蒸馏水为空白,于 720 nm 处测定吸光度,计算生药质量浓度为 0.5 g·mL<sup>-1</sup>时,未经纯化滤液浸膏与醇沉、絮凝滤液浸膏的平均吸光度分别为 0.54, 0.47, 0.27,表明壳聚糖絮凝澄清工艺所得浸膏样品溶液的澄明度明显高于醇沉浸膏样品。

**2.2.3 单糖、低聚糖和总多糖的含量测定** 对照品溶液制备与标准曲线绘制:精密称取 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖 20 mg,加适量水溶解制成质量浓度为 0.2 g·L<sup>-1</sup>的葡萄糖对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述不同浓度的对照品溶液 0.2 mL,置于 10 mL 具塞试管中,加水 1.8 mL,6% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸溶液 5 mL,振摇,100 °C 水浴 20 min,然后放入冰水中冷却至室温,以水做空白对照,在 490 nm 处测定吸光度。以

葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为  $Y = 0.0191X + 6 \times 10^{-5}$  ( $r = 0.9996$ ),表明葡萄糖在  $20 \sim 120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  具有良好的线性关系。

**总多糖供试品溶液制备与测定** 精密称取 2.2.1 项下所得 3 种干浸膏和滤渣样品适量,加适量蒸馏水超声溶解后定容至 25 mL,再精密吸取 1 mL 定容至 10 mL,即得总多糖供试品溶液。精密吸取供试品溶液 0.2 mL,按 2.2.3 项下方法测定吸光度。结果表明,壳聚糖絮凝澄清工艺所得浸膏总多糖含量明显高于醇沉工艺,且其滤渣中所含多糖明显低于醇沉滤渣(图 1),经计算醇沉工艺损失总多糖量约为壳聚糖絮凝澄清工艺的 32 倍。

**单糖-低聚糖供试品溶液的制备与测定** 精密称取 2.2.1 项下所得 3 种干浸膏和滤渣样品适量,加 80% 乙醇超声后定容至 10 mL,再精密吸取上清液 1 mL 定容至 25 mL,即得单糖-低聚糖供试品溶液。精密吸取供试品溶液 0.2 mL,按 2.2.3 项下方法测定吸光度。结果表明,壳聚糖絮凝澄清工艺所得浸膏中单糖与低聚糖总量高于醇沉工艺所得浸膏,且其滤渣中所含单糖与低聚糖总量明显低于醇沉滤渣(见图 1),经计算醇沉工艺损失单糖与低聚糖的总量约为壳聚糖絮凝澄清工艺的 12 倍。

**2.2.4 芍药苷、丹酚酸 B 和丹皮酚的含量测定** 色谱条件 Kromasil ODS-1 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)为流动相,流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量 10 μL,柱温 35 °C,梯度洗脱程序和波长切换见表 1。

**混合对照品溶液配制** 分别精密称取芍药苷、丹酚酸 B、丹皮酚对照品适量,用甲醇配制成质量浓度分别为 0.456, 1.920, 0.454  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的贮备液。分

表 1 乙肝宁复方水提液梯度洗脱程序与波长切换

梯度洗脱程序			波长切换	
t/min	流动相 A/%	流动相 B/%	t/min	波长/nm
0 ~ 11	20→35	80→65	0 ~ 13	360
11 ~ 19	35→45	65→55	13 ~ 16	230
19 ~ 37	45→72	55→28	16 ~ 22	360
37 ~ 44.6	72→82	28→18	22 ~ 26	281
44.6 ~ 48.6	82→85	18→15	26 ~ 30	360
48.6 ~ 51.6	85→90	15→10	30 ~ 34	274
51.6 ~ 63.8	90→90	10→10	34 ~ 50	360
			50 ~ 52	254
			52 ~ 60	360

别精密吸取适量,用甲醇配制成质量浓度依次为 138.4, 924.9, 132.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**供试品溶液的制备与测定** 精密称取 2.2.1 项下所得 3 种干浸膏样品适量,用甲醇超声溶解,定容至 2 mL,以 0.45 μm 微孔薄膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。按上述色谱条件,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液适量注入液相色谱仪,测定峰面积积分值,以标准曲线法计算样品溶液中各成分的含量,计算壳聚糖絮凝澄清纯化工艺芍药苷、丹酚酸 B、丹皮酚的转移率分别为 75.77%, 33.74%, 11.87%。醇沉纯化工艺则分别为 71.43%, 99.81%, 88.34%。结果表明,醇沉工艺所得浸膏中丹酚酸 B 和丹皮酚转移率明显高于壳聚糖絮凝澄清工艺,而芍药苷的转移率则低于壳聚糖絮凝澄清工艺。

**2.2.5 吸湿率的测定** 取 2.2.1 项下醇沉与絮凝澄清工艺所得干浸膏样品适量,研成细粉,分别置五氧化二磷干燥器内干燥至恒重。将底部盛有氯化钠过饱和溶液的玻璃干燥器放入 25 °C 的恒温培养箱内恒温 24 h,此时干燥器内的相对湿度为 75%。在

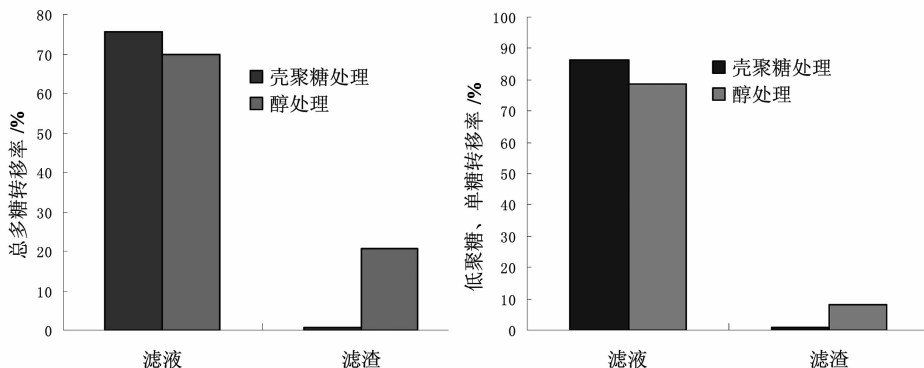


图 1 2 种纯化工艺所得样品低聚糖、单糖和总多糖的转移率

已恒重的称量瓶底部放入厚约 2 mm 的样品粉末,准确称重后置于上述玻璃干燥器内(称量瓶盖打开)于 25 ℃ 保存,定时称量,计算吸湿率,以平均吸湿率为纵坐标,时间为横坐标作图,结果表明壳聚糖絮凝澄清工艺所得干浸膏吸湿性低于醇沉工艺所得干浸膏,见图 2。

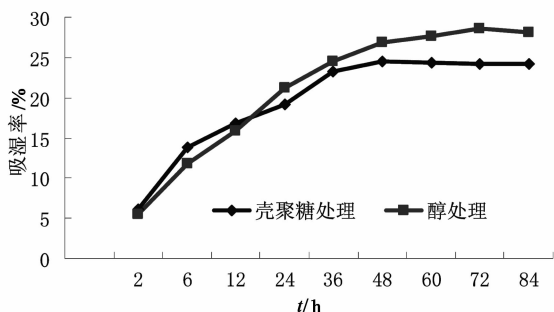


图 2 乙肝宁复方水提液经 2 种纯化工艺所得浸膏吸湿曲线

### 3 讨论

本研究发现壳聚糖絮凝澄清工艺所得浸膏多糖类含量高于醇沉工艺所得浸膏,而其吸湿性低于醇沉工艺所得浸膏,这可能与絮凝澄清工艺能更好保留水提液多糖类成分有关。另外,有研究认为糖类对吸湿性有极大影响<sup>[13]</sup>,因此有待进一步研究探索。

2 种纯化工艺对乙肝宁复方水提液中有效成分的影响,早期曾以芍药苷单一成分为指标进行考察,认为壳聚糖絮凝澄清工艺比醇沉工艺更有利于乙肝宁复方中有效成分的保留<sup>[14]</sup>。本试验同时采用了芍药苷、丹酚酸 B 和丹皮酚 3 个不同化学成分作为评价指标,用 HPLC 法同时测定 2 种纯化工艺所得浸膏中上述 3 种有效成分的含量。采用单一成分指标对中药复方制剂制备工艺与质量进行评价具有较大的局限性,应尽可能应用多成分指标。

对乙肝宁复方水提液浸膏得率的影响,本试验研究未见 2 种纯化方法有明显差异,与早期的研究结果(醇沉法浸膏得率低于絮凝澄清法)不一致<sup>[5,15]</sup>,经分析认为主要是由于本次实验醇沉前药液的浓度比早期的低所致。这表明对于试验结果的影响,除了试验方法本身的因素外,还与试验方法的

具体条件等因素有关,在试验研究中应予以注意。澄明度测定显示絮凝澄清工艺浸膏水溶液澄明度明显优于醇沉工艺,表明其浸膏具有较好的水溶性。醇沉工艺浸膏水溶液的澄明度,则可能因其浸膏中保留有较多水溶性低的醇溶成分而受到影响。

### [参考文献]

- [1] 石猛,莫尚志,周文政.醇沉法存在的问题及解决办法[J].中药材,1999,22(6):313.
- [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] 龚慕辛,贾春伶.天然澄清剂在中药提取液精制中的应用[J].北京中医,2001,20(6):43.
- [4] 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.
- [5] 颜红.天然澄清剂在中药水提液澄清工艺中的应用[J].中医药导报,2005,11(1):80.
- [6] 祝连彩,王伯初.壳聚糖在中药药液澄清中的应用[J].重庆大学学报:自然科学版,2003,26(12):55.
- [7] 任荣军,夏新华,严建业.壳聚糖用于驴胶补血颗粒的絮凝工艺研究[J].湖南中医药大学学报,2007,27(2):9.
- [8] 王曙东,宋炳生.壳聚糖处理含生物碱类成分中药浸提液应用研究[J].时珍国医国药,1999,10(7):488.
- [9] 张彤,徐莲英.壳聚糖用于部分单味中药浸提液澄清效果的研究[J].中草药,1999,30(10):744.
- [10] 吕定刚.玉屏风口服液澄清工艺的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(3):1.
- [11] 吴巧凤,楼小红.壳聚糖澄清法代替醇沉法制备复方参苓口服液[J].中国中医药科技,2000,7(5):313.
- [12] 中国药典.一部[S].2005:290.
- [13] M Schiller, Von Der Heydt, H M Rz F, et al. Quantification of sugars and organic acids in hygroscopic pharmaceutical herbal dry extracts [J]. J Chromatography A,2002,968(1/2):101.
- [14] 颜红,夏新华,严建业,等.乙肝宁颗粒絮凝澄清工艺与醇沉工艺的比较研究[J].中成药,2009,31(2):221.
- [15] 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.

[责任编辑 全燕]