

# 无机絮凝剂纯化杜仲叶水提液条件优化研究

何德飞, 苏印泉\*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**研究无机絮凝剂纯化杜仲叶水提液的优化工艺条件,以总黄酮和桃叶珊瑚甙的含量和质量为检测指标,通过对比3种絮凝剂:七水合硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、聚合硫酸铁(SPFS)、聚合氯化铝铁(PAFC)的絮凝效果,采用单因素试验方法确定最佳纯化条件,以期为杜仲叶有效成分的工业化利用提供理论参考。结果表明,在pH8~9条件下,用0.20%溶液质量分数的七水合硫酸亚铁处理初次浸提液,絮凝效果最好。

**关键词:**杜仲叶;总黄酮;桃叶珊瑚甙;七水合硫酸亚铁;聚合硫酸铁;聚合氯化铝铁

**中图分类号:**S718.43

**文献标志码:**A

**文章编号:**1001-7461(2014)-02-0202-06

## The Optimum Condition in the Purification of Water Extract of *Eucommia ulmoides* Leaves with Inorganic Flocculant

HE De-fei, SU Yin-quan\*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Water extract of *Eucommia ulmoides* leaves were purified with three different inorganic flocculants, including ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), polymeric ferric sulfate, and polyaluminum ferric chloride. The active constituents, such as flavonoids and aucubin were used as criteria to examine the results of purification. Satisfactory flocculation results were achieved by using 0.2%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at pH8-9 to treat the first time extract.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* leaf; total flavonoid; aucubin; ferrous sulfate; polymeric ferric sulfate; polyaluminum ferric chloride

杜仲(*Eucommia ulmoides*)是我国特有的名贵中药材,具有降压、利尿、抗肿瘤、抗菌、抗衰老和增强免疫等药理作用<sup>[1]</sup>。近年来,国内外一些研究者对杜仲所含的化学成分进行了分离纯化,得到了66种化学单体,并对它们的药理作用进行了研究<sup>[2]</sup>。我国、日本与美国等国研究者在杜仲有效成分提取、组织培养物利用和药用研究应用方面取得了许多成果<sup>[3]</sup>。已知杜仲有效成分主要有环烯醚萜类、杜仲胶、木质素类、苯丙素类及黄酮类化合物<sup>[4]</sup>,其中总黄酮与桃叶珊瑚甙是杜仲中含量较高的天然药用成分。杜仲在我国传统以皮入药,但皮的资源有限。研究表明,杜仲叶与皮含有相似的有效成分,而且药理相同。杜仲叶的资源相当丰富,以叶代皮,

扩大药源已经成为可能<sup>[5-6]</sup>。

目前提取杜仲叶活性成分的方法多采用醇沉法除去杂质,虽然得率较高,但该方法存在一些不合理性,某些醇不溶性有效成分,如多糖丢失,降低了药品疗效;有些高分子物质如鞣质因溶于乙醇不能被除去,影响药品的稳定性;耗醇量大、成本高、生产周期长且安全性差。以水代替乙醇作为溶剂,水溶性多糖可以溶解,从而得到保留;鞣质又不溶于水,达到去除目的。絮凝技术广泛应用于澄清中药水提液<sup>[7-9]</sup>,对保留多糖、苷类等水溶性成分有较好效果<sup>[10]</sup>。絮凝技术是一种简单有效的固液两相体系分离方法。絮凝法与传统的水提醇沉法相比较,在有效成分回收率、生产成本等方面存在较大的优势。

收稿日期:2013-05-16 修回日期:2013-10-29

基金项目:国家林业公益性行业科研专项(K313021208)。

作者简介:何德飞,男,硕士研究生,研究方向:植物药用成分提取。E-mail:vs.fly@126.com

\*通信作者:苏印泉,男,教授,研究方向:植物资源利用。E-mail:gyq2001@163.com

一般采用的无机絮凝剂有:氯化铝  $\text{AlCl}_3$ 、七水合硫酸亚铁  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、氯化铁  $\text{FeCl}_3$ 、聚合氯化铝 SPFS、聚合硫酸亚铁 PAFC 等。

本试验以杜仲叶为试材,选用 3 种无机絮凝剂纯化杜仲叶水提液,单次改变 pH 值,溶液浓度,絮凝剂剂量进行单因素试验,通过测定和比较干物质中目标化合物的含量跟质量,探究合适的絮凝剂种类及絮凝条件,以期杜仲叶有效成分提取的工业化生产提供一些参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 试验材料

杜仲叶于 2011 年 11 月份采自林学院苗圃杜仲叶林地,晒干,备用。

### 1.2 仪器

RE-52A 型旋转蒸发仪(上海分析仪器厂);722 光栅分光光度计(上海分析仪器厂);AB204-S 电子天平(METTLER TOLEDO);SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司)。

### 1.3 试剂

七水合硫酸亚铁 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯, 西陇化工有限公司);聚合硫酸铁(SPFS);聚合氯化铝铁(PAFC);二甲氨基苯甲醛溶液(Epstahl);氢氧化钠(分析纯, 西陇化工有限公司);1 mol/L 盐酸(西陇化工有限公司);标准 pH 试纸;芦丁标样(上海生化试剂厂);桃叶珊瑚甙标样(购自日本)。

## 2 试验方法

### 2.1 杜仲叶水提液的纯化

称取干燥杜仲叶 1.0 kg,揉碎成絮状,加 16 L 蒸馏水,室温下浸提 24 h,双层纱布过滤,得到初次浸提液,重复上述步骤再浸提 1 次,得到二次浸提液,分别储存,备用。量取 200 mL 杜仲叶水提液于 500 mL 烧杯中,单次改变提取液 pH、提取液浓度、絮凝剂的剂量,絮凝,静置 30 min,经抽滤得滤液,浓缩滤液后,置于烘箱中 105℃ 烘干至恒重,获得各干物质质量数据。进一步通过分光光度法检测干物质中目标化合物(以桃叶珊瑚甙和总黄酮为参照)的含量,其中总黄酮含量测定用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法<sup>[11]</sup>,桃叶珊瑚甙含量测定用改进的二甲氨基苯甲醛法<sup>[12]</sup>。干物质中目标化合物含量的测定:称取待测干物质样品 0.1 g,溶于蒸馏水定容至 10 mL,按上述方法测定样品溶液的吸光度,根据回归方程式计算出目标化合物的含量,再乘以

干物质质量计算获得目标化合物的质量,通过对比目标化合物的含量和质量,以此来考察溶液 pH 值、提取液浓度、絮凝剂剂量 3 种因素对 3 种絮凝剂絮凝效果的影响。

### 2.2 标准曲线绘制

2.2.1 总黄酮标准曲线绘制 芦丁纯品 0.100 0 g,用 50% 的乙醇溶解,摇匀,定容至 100 mL,再取 10 mL 此标准液于 100 mL 容量瓶中,稀释、定容为 0.1 g/L 的芦丁标准品溶液,作为贮备液备用。分别吸取上述芦丁标准液 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 50% 乙醇稀释至 5.00 mL,分别加入 5% (g/L)  $\text{NaNO}_2$  试液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min。再加 5% (g/L)  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  试液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min,再加 4%  $\text{NaOH}$  4 mL,并用 50% 乙醇水溶液定容至刻度,摇匀,静置 12 min。于 504 nm 处测吸光值,以吸光值为纵坐标,以显色液中芦丁的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标,得到芦丁标准曲线:  $y = 0.0106x - 0.0039, R^2 = 0.9998$ 。

2.2.2 桃叶珊瑚甙标准曲线绘制 精确称量 1.1 mg 桃叶珊瑚甙标准品,于 10 mL 容量瓶中定容,分别吸取上述标准液 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,依次加入 3 mL 95% 乙醇、1 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液(Epstahl)、1 mL 20% 盐酸,用蒸馏水定容,摇匀,在 65℃ 水浴锅中加热 8 min,中间摇动 2~3 次,取出试管,室温冷却 15 min,594 nm 处用分光光度计测定溶液吸光值,以吸光值为纵坐标,以显色液中芦丁的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标,得到桃叶珊瑚甙标准曲线为:  $y = 0.0011x + 0.0631, R^2 = 0.9991$ 。

## 3 结果与分析

优化杜仲叶水提液絮凝澄清条件,进行水提液 pH 值、提取液浓度及絮凝剂用量三因素的单因素试验,确定试验各因素的最优条件。以下各图表中绿代表七水合硫酸亚铁、红代表聚合硫酸铁、黄代表聚合氯化铝铁,CK 代表溶液中不加絮凝剂也不调节 pH, pH8-9 代表仅调节 pH8-9 产生的絮凝效果项,HT 代表总黄酮,TS 代表桃叶珊瑚甙。1:1 混合液代表初次浸提液与二次浸提液的等体积混合液。

### 3.1 pH 对絮凝效果的影响

通过在 pH7~8、8~9、9~10 3 个梯度下,测定 3 种絮凝剂得到干物质质量和其中目标化合物的含量,可以确定溶液 pH 对絮凝效果影响很大, pH 为 8~9 时,絮凝效果最好,在仅调节 pH 为 8~9,而不加絮凝剂的条件下,也有一定絮凝效果。由图 1A 可知,在 pH7~8 与 CK 条件下,干物质质量差别不

大,当 pH 提高到 8~9 时干物质质量明显减少,说明在 pH 较低时,絮凝效果不理想,随着 pH 升高,得到干物质的质量逐渐减少,絮凝效果明显;由图 1B、图 1C 可知,3 种絮凝剂得到的干物质中,总黄酮和桃叶珊瑚甙的含量在 pH8~9 条件下含量均高于其他 pH 条件,其中用聚合硫酸铁絮凝得到的干物质中总黄酮含量最高,用七水合硫酸亚铁絮凝得到的干物质中总黄酮含量稍低,用七水合硫酸亚铁絮凝得到的干物质中桃叶珊瑚甙含量最高。由图 1D、图 1E 可知,3 种絮凝剂在 pH 较低时,总黄酮和桃叶珊瑚甙的质量差异不大,且与 CK 对比损失较小,当 pH 较高时,质量损失严重。

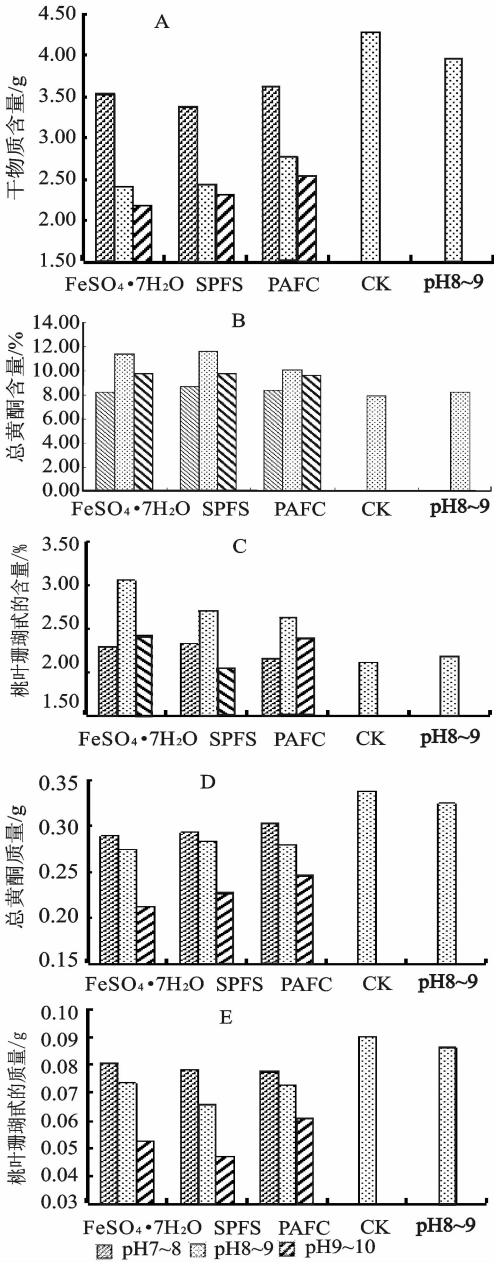


图 1 不同 pH 下 3 种絮凝剂的絮凝效果

Fig. 1 Flocculation effects of three flocculants under different pH

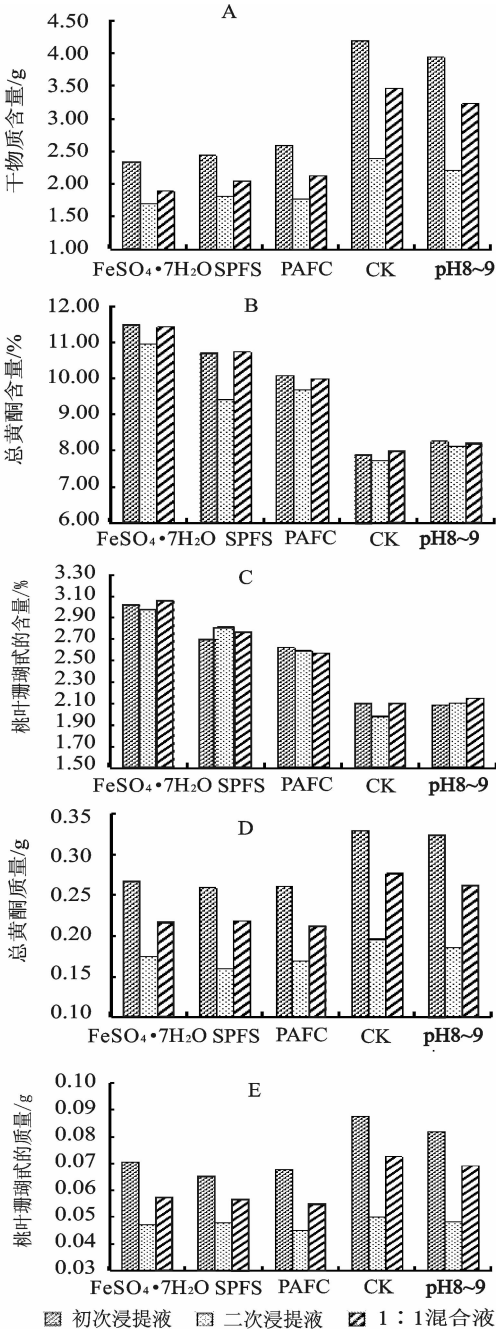


图 2 不同浸提液浓度下 3 种絮凝剂的絮凝效果  
Fig. 2 Flocculation effects of three flocculants to treat extract with different solid concns

3.2 提取液浓度对絮凝效果的影响

通过将 3 种絮凝剂分别加到不同浓度的水提液中,测定得到的干物质质量和其中目标化合物的含量,发现水提液浓度对絮凝效果影响很大,初次浸提液的絮凝效果最好,从经济角度考虑,工业生产中用 1:1 混合液比较合适。由图 2A 可知,3 种絮凝剂得到干物质的质量,在初次浸提液和 1:1 混合液中差异较大,在二次浸提液中差别较小,1:1 混合液得到的干物质质量低于初次浸提液与二次浸提液的平均值,说明 1:1 混合液的浓度较适合絮凝;由图 2B、图 2C 可知,总黄酮含量较高的是初次浸提液和 1:1 混合液,桃叶珊瑚甙的含量由不同絮凝剂的作

用,所以在不同溶度水提液中含量略有差异,其中七水合硫酸亚铁絮凝得到的干物质中,目标化合物的含量最高;初次浸提液与 1 : 1 混合液得到的干物质中,目标化合物的含量较高,七水合硫酸亚铁得到的干物质中目标化合物含量最高;由图 2D、图 2E 可知,初次浸提液得到的目标化合物质量最高,在二次浸提液中,目标化合物的质量差别都不明显,1 : 1 混合液得到的干物质目标化合物质量高于初次浸提液与二次浸提液的平均值,说明 1 : 1 混合液的浓度絮凝效果较好。

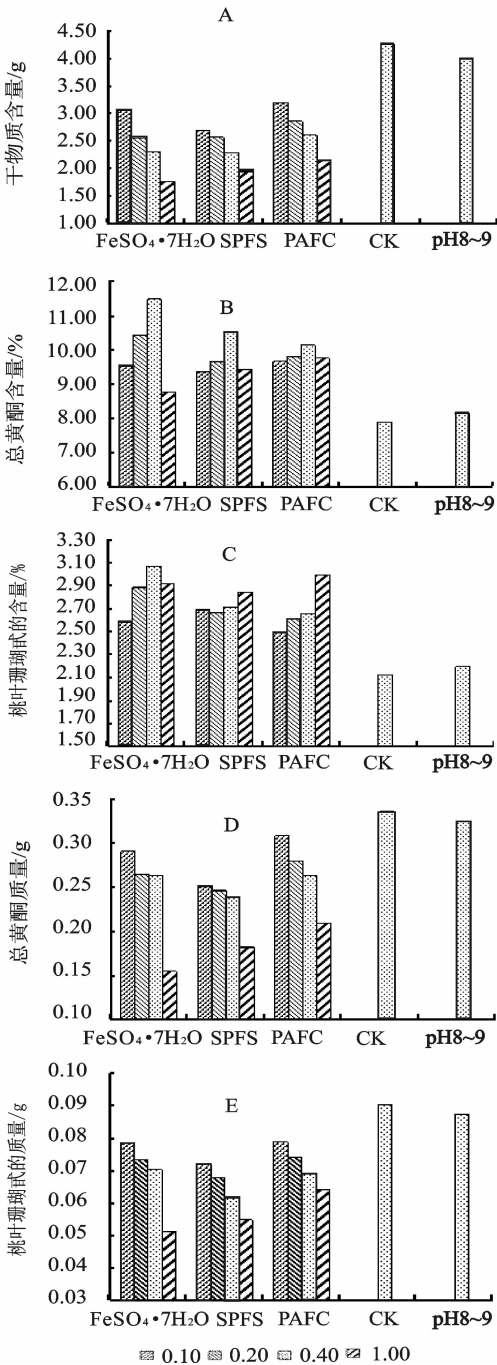


图 3 不同絮凝剂剂量下 3 种絮凝剂的絮凝效果  
Fig. 3 Flocculation effects of three flocculants with different concentrations

### 3.3 絮凝剂的量对絮凝效果的影响

通过加入不同絮凝剂剂量不同剂量(0.05%、0.10%、0.20%、0.50%溶液质量分数),比较絮凝效果差异,可以确定不同剂量间的絮凝效果的影响也较明显,絮凝剂剂量为 0.40 g(0.20%溶液质量分数)效果最好。由图 3A 可知,当剂量较少时,聚合硫酸铁得到的干物质质量较少,随着剂量增加,七水合硫酸亚铁得到的干物质质量最少;由图 3B、图 3C 可知,随着絮凝剂剂量增加,目标化合物含量逐渐升高,当剂量为 0.40 g(0.20%溶液质量分数)时,目标化合物含量最高,继续增加絮凝剂剂量,当增加到 1.0 g(0.50%溶液质量分数)时,总黄酮含量降低,推测絮凝过滤时,部分总黄酮随絮凝团一起被带走,桃叶珊瑚甙的含量除用七水合硫酸亚铁絮凝外,其他絮凝剂均表现为絮凝剂剂量越大,得到干物质中桃叶珊瑚甙含量越高;由图 3D、图 3E 可知,当絮凝剂剂量较低时,目标化合物质量变化不明显,说明絮凝过滤过程中损失小,当剂量加到 1.0 g(0.5%溶液的质量分数)时,目标化合物质量明显减少。

### 3.4 小结

通过比较 3 种絮凝剂在不同 pH 值溶液浓度和絮凝剂剂量下得到的干物质中,总黄酮和桃叶珊瑚甙的含量与质量,结果表明,在 pH8~9 条件下,用 0.20%溶液质量分数的七水合硫酸亚铁 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 处理初次浸提液,絮凝效果最好。

## 4 结论与讨论

溶液的 pH、浓度、以及加入絮凝剂的剂量对杜仲水浸提液中药用成分的絮凝效果影响很大,不同絮凝剂的絮凝能力受上述 3 种条件影响不同,但总体上可以确定,在 pH 弱碱性,溶液浓度较大,少量絮凝剂的条件下可以取得理想的絮凝澄清效果。

七水合硫酸亚铁 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 的絮凝效果受溶液 pH 值和溶液浓度影响较大,在溶液呈碱性,浓度较高,絮凝剂剂量较少时絮凝效果理想。七水合硫酸亚铁 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 的最佳絮凝条件是:pH8~9,初次浸提液,0.20%剂量。

聚合硫酸铁 SPFS 的絮凝效果受溶液 pH 值和溶液浓度影响较大,在溶液呈碱性,浓度适中,絮凝剂剂量较少时絮凝效果理想。聚合硫酸铁 SPFS 的最佳絮凝条件是:pH8~9,1 : 1 混合液,0.20%剂量。

聚合氯化铝铁的絮凝效果受溶液 pH 值、溶液浓度和絮凝剂计量影响较大,在溶液呈碱性,浓度适中,絮凝剂剂量较大时絮凝效果理想。聚合硫酸铁 SPFS 的最佳絮凝条件是:pH8~9,1 : 1 混合液,0.50%剂量。

在考虑生产成本及产品要求不高时,可仅调节 pH8~9 产生絮凝除去部分杂质,小幅提高有效成分的含量。

综合比较,用以 0.20%剂量的七水合硫酸亚铁  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH8~9 条件下的初次浸提液中,整体效果最好。若考虑经济效益,可以用 1:1 混合液代替初次浸提液。本文目的在于纯化杜仲叶水提液中有效成分,得到有效成分纯度较高的粗提物,絮凝过程有效成分难免有损失,如何控制有效成分的损失,得到纯度更高的物质,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 臧友维. 杜仲化学成分研究进展[J]. 中草药, 1989, 20(4): 42-44.  
ZANG Y W, Advances in research of chemical component in *Eucommia Ulmoides* Oliver[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1989, 20(4): 42-44. (in Chinese)

[2] 李家实. 杜仲皮与叶化学成分的初步研究[J]. 中药通报, 1986, 11(8): 41-42.  
LI J S. The preliminary research of chemical component in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves and barks[J]. Bulletin of Chinese Materia Medical, 1986, 11(8): 41-42. (in Chinese)

[3] 朱丽青. 杜仲叶与杜仲皮的药理实验[J]. 中草药, 1986, 17(12): 15.  
ZHU L Q. Pharmacology experiment on *Eucommia ulmoides* Oliver leaves and barks [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1986, 17(12): 15. (in Chinese)

[4] TAKESHI D, TAKAKO I, SHIZUKE K. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliver II. isolation and structures of three new lignan glycosides[J]. Chem. Pharm. Bull., 1985, 33(9): 3651-3657.

[5] DEYAMA T, NISHIBE S, NAKAZAWA Y. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and siberian ginseng[J]. Acta. Pharmacol Sin., 2001, 22(12): 1057-1070.

[6] 唐建军, 张禄源, 何鸣篋. 杜仲的研究与应用进展[J]. 植物学通报, 1998, 15(6): 47-51.

TANG J J, ZHANG L Y, HE M X. Advances in research of *Eucommia ulmoides* Oliver and its utilization[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1998, 15(6): 47-51. (in Chinese)

[7] 张忠国, 康勇, 冯颖, 等. 絮凝技术在中药提纯中的应用[J]. 化学工业与工程, 2003, 6(20): 377-386.  
ZHANG Z G, KANG Y, FENG Y, et al. Application of flocculation technology in the purification of Chinese traditional medicine[J]. Chemical Industry and Engineering, 2003, 6(20): 377-386. (in Chinese)

[8] 秦雪梅, 漆小梅, 秦霞, 等. 中药水提液絮凝澄清工艺的合理性考查[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(10): 721-723.  
QIN X M, QI X M, QIN X, et al. Study on cleaning technology of water extracts of traditional Chinese medicine by flocculating agents[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 1999, 19(10): 721-723. (in Chinese)

[9] 张建伟, 王中原, 范红伟. 中药水提液的絮凝和选择性絮凝[J]. 中草药, 2006, 8(37): 1271-1275.  
ZHANG J W, WANG Z Y, FAN H W. Flocculation and selective flocculation for water-extraction of Chinese materia medica[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 8(37): 1271-1275. (in Chinese)

[10] 张彤, 张青华. 壳聚糖用于大青叶等中药浸提液澄清效果的研究[J]. 中成药, 1998, 20(10): 7-10.  
ZHANG T, ZHANG Q H. The study on the clarification effect of chitosan on *Salvia miltiorrhiza* extracts [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 1998, 20(10): 7-10. (in Chinese)

[11] 李有忠, 宋晓斌, 张学武. 猕猴桃细菌性溃疡病发生规律研究[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(2): 53-56.  
LI Y Z, SONG X B, ZHANG X W. Studies on laws of occurrence of bacterial canker in Kiwi fruit[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2000, 15(2): 53-56. (in Chinese)

[12] 张学武, 宋晓斌, 马松涛. 猕猴桃细菌性溃疡病防治技术研究[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(4): 67-71.  
ZHANG X W, SONG X B, MA S T. Techniques of controlling bacterial canker disease in Kiwi fruit[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2000, 15(4): 67-71. (in Chinese)