

晰的展现出来，为全面控制药用虎杖质量提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] WU X C, LU Y. HPLC analysis of the main anthraquinones in *Polygonum cuspidatum* [J]. Chine Arch Radit Chin Med(中医药学刊), 2005, 23(9): 1644-1645.
- [2] LI D, LU T F, ZHANG C Z. Extraction and separation of the active ingredients in *Polygonum cuspidatum* [J]. J Dalian Ins Light Indust(大连轻工业学院学报), 2005, 24(3): 189-191.
- [3] XIONG Q P, ZHANG Q H, SHI Y Y. Study on pilot tests in multi-stage countercurrent extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(10): 901-905.
- [4] HU Y. Research progress of quality and pharmacology of Rhizoma Polygoni Cuspidati [J]. Sichuan J Physiol Sci(四川生理科学杂志), 2008, 30 (1): 22-24.
- [5] ZHANG M C, PEN X B, MIAO X H. Study of chromatographic fingerprint of *Polygonum* herbs[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(1): 53-55.
- [6] ZHAO X S, WEI J H, GAN B C, et al. Study on the GC fingerprint of volatile oil of *Dalbergia odorifera* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(11): 995-999.
- [7] MA Y T, WAN D G, SONG L K. HPLC fingerprint of Rhizoma Polygoni Cuspidate [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(12): 973-974.
- [8] LI Y X , WANG L, TANG S M. Study on chromatography fingerprint of *Polygonum cuspidate* by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(5): 78-80.
- [9] GONG Y L, WANG H B, JIN H. The effective ingredients and anti-bacterial activity comparison of *Polygonum cuspidatum* from different places [J]. J Qingdao Univ Sci Technol(青岛科技大学学报), 2008, 29(3): 204-205.
- [10] CHEN H G, ZHAO H B, ZHAO C. HPLC fingerprint analysis of the extract from *Polygonum cuspidatum* and associated pharmacodynamics [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(19): 1775-1776.
- [11] LEI H M, BI W, LI Q. Study on chromatography fingerprint of *Polygonum cuspidate* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(7): 1084-1086.
- [12] LI M, LOU Y C, YANG H. Study of fingerprint chromatogram of *Polygonum cuspidate* by HPLC [J]. J Wuhan Botanic Res(武汉植物学研究), 2009, 27(4): 446-450.

收稿日期: 2012-02-28

凹凸棒黏土对甜叶菊水提液吸附絮凝作用研究

吴洁, 熊清平, 石莹莹, 袁雪莉(江苏省凹土资源利用重点实验室, 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏 淮安 223003)

摘要: 目的 研究凹凸棒黏土(凹土)对甜叶菊水提液的吸附絮凝作用。方法 采用单因素和正交实验, 考察了吸附絮凝温度、水提液 pH 值、凹土加入量以及水提液浓度对吸附絮凝效果的影响。结果 凹土吸附絮凝法的最佳吸附条件为在 pH 8 的 30 mL 甜叶菊水提液中加入 0.4 g 凹土于 60 °C 时所得澄清效果最佳, 凹土吸附絮凝法对水提液中菜鲍迪 A 苷(R_A 苷)保留率和固体物保留率分别为 92.2% 和 70.5%, 明显优于化学絮凝法的 62.6%, 57.3%。结论 凹土可以作为一种新型吸附絮凝剂应用于中药提取液的分离纯化。

关键词: 凹凸棒黏土; 甜叶菊; 水提液; 吸附絮凝

中图分类号: R284 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2013)01-0024-05

Adsorption and Flocculation Effect of Attapulgite on Water Extract of Stevia Leaves

WU Jie, XIONG Qingping, SHI Yingying, YUAN Xueli(Key Laboratory for Palygorskite Science and Applied Technology of Jiangsu Province, Department of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the adsorption and flocculation effect of attapulgite(ATP) on water extract of stevia leaves. **METHODS** The factors influencing adsorptive and flocculate properties of ATP such as the temperature, pH value, the concentration of the water extract of stevia leaves and the amount of ATP addition were investigated by single factor experiment and orthogonal experiment. **RESULTS** The optimum condition obtained were 60 °C temperature and pH 8, respectively, and the addition of ATP was 0.4 g for 30 mL water extract. The adsorption method of ATP showed the higher retention rate of rebaudioside A (92.2%) and solids (70.5%) than the chemical ones (62.6% and 57.3%, respectively). **CONCLUSION** ATP can

基金项目: 淮安市“533 英才工程”资助项目(141); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(12040)

作者简介: 吴洁, 女, 硕士, 教授 Tel: (0517)83559056 E-mail: wujie1760@126.com

be used as a new flocculant for isolation and purification of Chinese herb extracts.

KEY WORDS: attapulgite; stevia leaves; water extract; adsorption and flocculation

甜叶菊是菊科宿根多年生草本植物，从甜叶菊叶片中提取出来的甜菊糖苷是一类具甜味的萜烯类配糖体，其甜度是蔗糖的200~300倍，热值仅为蔗糖的1/300，具有高甜度、低热能的特点，且对高血压、糖尿病、肥胖症、心脏病、龋齿等病症有一定的辅助疗效，是一种可替代蔗糖的理想天然甜味剂^[1]。从甜叶菊中分离得到的8种不同甜度的糖苷中莱鲍迪A苷(R_A)甜味最接近蔗糖，甜度为蔗糖的450倍，是甜味品质最好的成分^[2]。因此，要想改善现有甜菊苷产品风味，就必须想办法提高甜菊苷产品中R_A苷部分含量。甜叶菊水提液里存在大量蛋白质、有机酸、皂苷、叶绿素、无机盐等杂质，给分离和精制甜菊苷的工作带来很大的困难。传统的分离纯化采用化学絮凝法^[3]，该法除去水提液中无效成分的同时，也造成了甜菊糖苷的损失。吸附絮凝法处理中药水提液比醇沉法具有成本低、有效成分损失小等优点，是一项值得推广的中药提取技术^[4]。凹凸棒黏土(下简称凹土)是一种层链结构的硅酸盐黏土，由于其优越的比表面积、离子交换性能和热稳定性，已成为优秀的吸附材料而广泛应用于分离纯化领域^[5-6]。本研究以R_A苷保留率、固体物保留率、浊度等为指标，考察了凹土对甜叶菊水提液中苷类物质和杂质的吸附作用。

1 仪器与试剂

Waters 2487高效液相色谱仪(美国waters公司)，色谱柱：Inertsil NH₂柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；YZD-1B型液体浊度仪(银川宁加环保仪器制造厂)；PHS-2型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

凹土(80目，盱眙玖川黏土科技发展有限公司)，使用前按水分散法^[7]进行纯化处理，干燥后过120目筛，得纯化凹土；乙腈(色谱纯)；R_A苷对照品(上海源叶生物科技有限公司，批号：YY90137，含量>98%)；甜叶菊(淮安大唐生物有限公司，批号：20100402)经广州中医药大学张丹雁教授鉴定为菊科植物甜叶菊[*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl]的干燥叶；其它试剂均为分析纯；双蒸水。

2 方法与结果

2.1 甜叶菊水提液的制备

称取干燥的甜菊叶100 g，加入10倍量的沸

水软化叶片组织10 min，然后在80 °C浸提2次，每次2 h，合并浸提液，过滤即得甜叶菊水提液。

2.2 絮凝澄清工艺

2.2.1 化学絮凝法 甜叶菊水提液中加入絮凝剂Ca(OH)₂和FeSO₄(质量比为2:1)，总添加量为4.5 g·L⁻¹，在60 °C恒温水浴先快速搅拌10 min，Ca(OH)₂调节溶液pH 10并继续搅拌10 min，60 °C静置2 h，待冷却后离心，取上清液测定各指标值。

2.2.2 凹土吸附絮凝法 在30 mL甜叶菊水提液中加入一定量的凹土，在一定温度、pH值条件下，先快速搅拌30 s(300 r·min⁻¹)，然后缓慢搅拌15 min(60 r·min⁻¹)，静置2 h，待冷却后离心，取上清液测定各指标值。

2.3 R_A苷含量测定

2.3.1 色谱条件 流动相：乙腈-水(80:20)；流速为0.8 mL·min⁻¹，检测波长：210 nm；柱温：30 °C，进样量：10 μL。

2.3.2 供试品溶液的制备 取经吸附絮凝处理后所得样液，以4 000 r·min⁻¹的速度进行离心10 min，取上清液为供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的R_A苷对照品100 mg，用去离子水定容至10 mL。

2.3.4 标准曲线的制备 依次吸取0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL对照品溶液至5 mL量瓶中定容，从中分别吸取10 μL依次进样。按上述色谱条件测定峰面积，以对照品浓度 C(mg·mL⁻¹)对色谱峰面积 A 绘制标准曲线，回归方程为 A=2.034 9C-0.079 2, r=0.998 2，线性范围为1.0~10.0 mg·mL⁻¹。

2.3.5 R_A苷保留率 精密吸取供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图与峰面积。根据所得的峰面积计算R_A苷的浓度，R_A苷保留率^[8]%=供试品溶液中R_A苷的质量(mg)/甜叶菊水提液中R_A苷的质量(mg)×100%。

2.4 固形物保留率

精密吸取所得供试品溶液10 mL，置已干燥至恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，于105 °C干燥1 h，置干燥器中冷却0.5 h，迅速称重，按下式计算固形物保留率：固形物保留率/%=供试品溶液中固形物的质量(g)/甜叶菊水提液中固形物的质量(g)×100%。

2.5 浊度值的测定

取供试品溶液用浊度仪测定，以去离子水作参比溶液，结果用浊度值表示。

2.6 凹土吸附絮凝工艺优化

2.6.1 吸附温度 在 30 mL 提取液中加入 0.5 g 凹土，搅拌后，分别将其放入 40, 50, 60, 70, 80 ℃ 水浴中保温静置 2 h 后离心，取上清液测其浊度值，结果见图 1。凹土对甜叶菊水提液的吸附絮凝作用受温度影响比较大，在 50 ℃ 时水提液澄清度最高，随着温度上升，水提液的浊度增加。

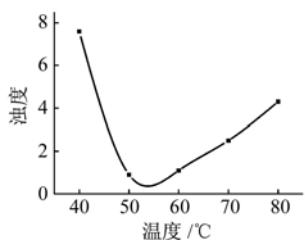


图 1 体系温度对水提液浊度的影响

Fig 1 Effect of temperature on turbidity of the water extract

2.6.2 水提液 pH 值 在 30 mL 水提液中分别用 10% NaOH 调节溶液 pH 值为 7, 8, 9, 10, 11，加入 0.5 g 凹土，搅拌，室温静置 2 h 后离心，取上清液测其浊度值，结果见图 2。由图 2 可知，水提液 pH 9 时，溶液浊度值最低，絮凝澄清效果最好。

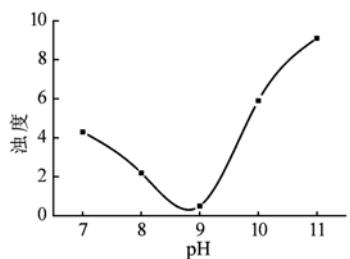


图 2 体系 pH 值对水提液浊度的影响

Fig 2 Effect of pH value of solution on turbidity of the water extract

2.6.3 凹土加入量 在 30 mL 水提液中分别加入 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g 凹土，搅拌，室温静置 2 h 后离心，取上清液测其浊度值，结果见图 3。结果表明，凹土的加入显著降低了水提液的浊度，当添加量为 0.6 g 时，水提液的浊度值由原来的 9.6 降低到 5.2，但继续增加凹土添加量反而导致浊度值的增大。

2.6.4 水提液稀释倍数 取一定量水提液分别稀释 0, 2, 4, 6, 8 倍至 100 mL，各加入 0.5 g 凹土，搅拌，室温静置 2 h 后离心，取上清液测其浊度值，

结果见图 4。结果水提液不经稀释，即在较高药物浓度时，凹土的吸附絮凝效果最佳。

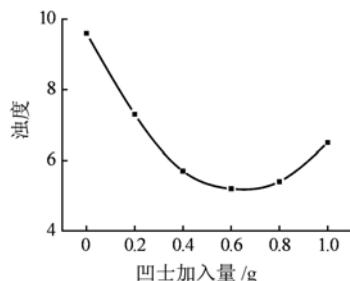


图 3 凹土加入量对水提液浊度的影响

Fig 3 Effect of the content of attapulgite on turbidity of the water extract

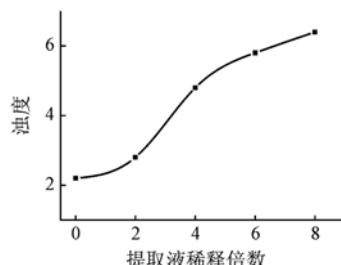


图 4 提取液稀释倍数对水提液浊度的影响

Fig 4 Effect of dilution multiple on turbidity of the water extract

2.6.5 正交实验 在单因素实验的基础上，以 R_A 苷保留率、固体物保留率、浊度值为综合评价指标，选择 $L_9(3^4)$ 正交表，考察了吸附温度、水提液 pH 值、凹土加入量、水提液稀释倍数 4 个因素对吸附絮凝效果的影响。因素水平表如表 1 所示，正交实验表如表 2 所示。

由表 2 中极差 R 可看出， $A > D > B > C$ ，可见影响凹土吸附絮凝效果的因素从大到小依次是：吸附温度、水提液稀释倍数、水提液 pH 值、凹土加入量；由 K 值可知， $A_2B_1C_1D_1$ 为凹土最佳吸附条件，即 0.4 g 凹土加入未经稀释的 pH 8 的 30 mL 甜叶菊水提液于 60 ℃ 进行吸附絮凝，所得澄清效果最佳。

表 1 因素水平表

Tab 1 Factors and levels for orthogonal test

水平	A 温度/℃	B pH 值	C 凹土量/g	D 水提液稀释倍数
1	50	8	0.4	0
2	60	9	0.6	2
3	70	10	0.8	4

2.6.6 验证实验 在上述最佳吸附絮凝条件下进行验证实验，结果 R_A 苷保留率为 92.2%，固体物

保留率为 70.5%，浊度值为 2.2，最终的综合评分为 98.63，高于正交试验的各个实验值。

表 2 正交试验直观分析结果

Tab 2 The results of intuitive analysis for orthogonal test.

序号	因 素				R_A 苷保留率/%	固形物保留率/%	浊度值	综合评分
	A	B	C	D	X_1	X_2	X_3	Y
1	1	1	1	1	45.85	51.28	2.1	66.65
2	1	2	2	2	42.25	56.41	5.4	46.46
3	1	3	3	3	64.63	68.21	8.5	58.30
4	2	1	2	3	91.71	53.33	3.8	83.12
5	2	2	3	1	90.30	66.15	4.1	82.67
6	2	3	1	2	60.25	54.87	2.5	71.49
7	3	1	3	2	29.58	74.87	12.3	34.08
8	3	2	1	3	43.82	52.82	7.4	43.86
9	3	3	2	1	46.48	55.90	8.7	44.85
K1	171.41	183.85	182.00	194.17				
K2	237.28	172.99	174.43	152.03				
K3	122.79	174.64	175.05	185.28				
k1	57.14	61.28	60.67	64.72				
k2	79.09	57.66	58.14	58.08				
k3	40.93	58.21	58.35	61.76				
R	38.16	3.62	2.53	14.04				

注：综合评分=(R_A 苷保留率/最大 R_A 苷保留率)×60+(固形物保留率/最大固形物保留率)×10+(浊度值/最小浊度值)×30

Note: Comprehensive score=retention rate of R_A /maximum R_A retention rate×60+retention rate of solids/maximum solids retention rate×10+turbidity/minimun turbidity×30

2.6.7 对比实验 用传统的化学絮凝法对甜叶菊水提液进行吸附絮凝实验，所得结果与凹土吸附法进行对比，结果见表 3。可见，两种工艺在对甜叶菊水提液浊度方面的处理效果相当，但在 R_A 苷保留率和固形物保留率方面，凹土吸附絮凝工艺明显优于化学絮凝法，说明凹土对甜叶菊水提液中大分子杂质具有一定的吸附絮凝作用，而对活性成分的影响很小，具有一定的吸附选择性。

表 3 化学絮凝工艺与凹土吸附工艺的结果比较表

Tab 3 Comparasion results of chemical flocculation and attapulgite adsorption method

絮凝工艺	R_A 苷保留率/%	固形物保留率/%	浊度值
化学絮凝	62.6	57.3	2.1
凹土吸附	92.2	70.5	2.2

3 讨论

吸附絮凝法是近年来用于中药精制工艺的一项高新技术，其基本工作原理是只除去水提液中较大的、具有斯托克沉淀趋势的悬浮颗粒，而保留了高分子物质、多糖等天然亲水胶体。凹土是

一种具有一维纳米棒晶结构的天然硅酸盐黏土，虽内部多孔道，但当其处于水溶液中时，因优先吸附水而使孔道中充满水，其他物质很难再进入孔道替代水分子。因而，在水溶液中凹土的吸附主要是外表面吸附，并且属于胶体吸附和离子交换吸附^[9]。这些特点使得凹土能够利用范德华力絮凝吸附中药水提液中的大分子杂质，而由于静电作用不吸附小分子的有效成分，从而达到选择性絮凝中药水提液的目的^[10]。

在影响凹土吸附絮凝的各因素中，温度对其絮凝效果影响最大，这是由于温度升高可增大水提液中胶体颗粒与凹土粒子相互碰撞次数，增大颗粒结合成吸附体的几率，因此加速了吸附，提高了药液的澄清度，但温度过高时，形成的吸附体细小，含水量高，难于处理，反而影响澄清效果。水提液的浓度也对凹土吸附絮凝效果影响较大，由于吸附剂的量与溶液中固含量密切相关，当药液浓度较高时，提取液中的固含量较高，颗粒间距小，相互碰撞频繁，吸附团形成速度快，吸附团量多且较大，吸附效果好^[11]；而较低的药液浓度不但不利于吸附团的形成，还有可能使其中较少的颗粒处于悬浮状态，不易沉降而直接影响吸附效果。但药液浓度也不能过高，否则吸附剂在悬浮液中分布不均，甚至被包裹在杂质中，也会影响吸附效果。

实验结果表明，凹土对甜叶菊水提液中杂质和活性成分具有较好的吸附选择性，与化学絮凝法相比，凹土吸附絮凝法在 R_A 苷保留率和固形物保留率方面表现出明显的优势，可作为一种新型吸附絮凝剂用于中药水提液的分离纯化中。

REFERENCES

- ZHANG X Y, XU Z W, ZHAN Y, et al. Study on flocculation extraction technique of *Stevia rebaudiana* Bertoni [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2007, 28(2): 15-17.
- SUN C F, LI J W. Research progress on steviosides [J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31(9): 338-340.
- ZHANG L N, YU T, GAO L. Reaserch on extraction and purification of stevioside from stevia leaves [J]. China Condiment(中国调味品), 2008(1): 58-60.
- XIE J, LIU X J, ZHU X Y, et al. Application of chitosan flocculation method in clarification of water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and flocculation mechanism analysis [J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32(20): 1-6.
- LI P, GUO Y Y, SHI J C. Adsorptive effect of attapulgite on baicalin [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2008, 28(6): 455-458.
- HUANG J H, LIU Y F, WANG X G, et al. Selective

- adsorption of tannin from flavonoids by organically modified attapulgite clay [J]. J Hazard Mater, 2008, 160(2/3): 382-389.
- [7] JIN Y L, CHEN J, QIAN Y H, et al. Deposition and dispersion of attapulgite clay [J]. J Nanjing Univ(Nat Sci)(南京大学学报自然科学版), 2005, 41(4): 429-434.
- [8] ZHANG J W, YUAN Y, WANG C Y. Purification of water-extraction solution of mulberry root bark with chitosan [J]. J Chem Eng Chin Univ(高校化学工程学报), 2010, 24(2): 346-349.
- [9] CHEN T H. Study on restriction factors of adsorptivity of palygorskite [J]. Geol Anhui(安徽地质), 1999, 9(3): 199-203.
- [10] ZHANG J W, WANG Z Y, XIAO B. Study on the purification effect of bentonite on *S. baicalensis* water extract [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(12): 1802-1805.
- [11] ZHANG W Q, LING H J, JIN X R, et al. Study on the chitosan flocculating of tannic acid [J]. J Func Polym(功能高分子学报), 1998, 11(3): 375-378.

收稿日期: 2012-03-27

知母的 UPLC 指纹图谱及聚类分析

罗洁^a, 范旭航^a, 崔思娇^a, 石绍淮^a, 毕开顺^b, 贾英^{a*}(沈阳药科大学, a.中药学院; b.药学院, 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立知母的超高效液相指纹图谱。方法 采用 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱; 流动相为乙腈-0.03%磷酸, 梯度洗脱, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 210 nm。结果 建立了知母的 UPLC 指纹图谱共有模式, 标定了 12 个共有峰, 并指认了 6 个主要色谱峰, 各色谱峰有较好的分离。根据聚类分析结果, 可将所收集的知母样品分为两类。结论 本方法快速、高效, 可用于知母的质量评价。

关键词: 知母; 指纹图谱; 超高效液相色谱法; 聚类分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)01-0028-04

UPLC Fingerprint of *Anemarrhenae Rhizoma* and Its Hierarchical Cluster Analysis

LUO Jie^a, FAN Xuhang^a, CUI Sijiao^a, SHI Shaohuai^a, BI Kaishun^b, JIA Ying^{a*}(Shenyang Pharmaceutical University, a.School of Traditional Chinese Materia Medica; b.School of Pharmacy, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish fingerprint of *Anemarrhenae Rhizoma* UPLC. **METHODS** The UPLC fingerprint of *Anemarrhenae Rhizoma* were determined on an HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) eluted with the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.03% phosphoric acid in gradient mode; flow rate: 0.5 mL·min⁻¹; column temperature: 30 °C and the detection wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** The common mode of the UPLC fingerprint was set up under the established condition. There were 12 common peaks in the fingerprint of 16 samples, six of which were identified. The *Anemarrhenae Rhizoma* from 16 different areas could be divided into 2 grades through the results of hierarchical cluster analysis. **CONCLUSION** The method was fast and accurate. The chromatographic profile of *Anemarrhenae Rhizoma* with high specificity can be used to control the quality of *Anemarrhenae Rhizoma*.

KEY WORDS: *Anemarrhenae Rhizoma*; fingerprint; UPLC; hierarchical cluster analysis

知母为百合科植物知母(*Anemarrhenae asphodeloides* Bge.)的干燥根茎, 具有清热泻火、滋阴润燥的功效, 用于外感热病, 高热烦渴, 肺热咳嗽, 骨蒸潮热, 内热消渴, 肠燥便秘^[1]。知母中富含皂苷、黄酮、双苯吡酮、木质素等多种化学成分。现代药理学研究表明, 知母具有抗病原微生物、抗血小板聚集、降血糖、解热、抗炎、降低转氨酶等多种药理活性。目前知母的质量评价主要以

芒果苷和知母皂苷为考察指标^[1-4], 中药指纹图谱研究对药材的全面控制具有重要作用。本实验建立了 10 min 内快速鉴别知母的 UPLC 指纹图谱方法, 为有效控制和科学评价知母的质量提供了依据。

1 仪器与试药

ACQUITY UPLC(美国 Waters 公司, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2011412004); 辽宁省教育厅创新团队项目(2009T097)

作者简介: 罗洁, 女, 硕士生 Tel: 18809897448 E-mail: luo.jie66@163.com *通信作者: 贾英, 女, 博士, 副教授 Tel: (024)23986259420 E-mail: jiayingsyphu@yahoo.com.cn