

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150025

壳聚糖絮凝处理蒲地蓝三味水提液效果及机理

程丽君, 任博平, 王国荣, 陶思佚, 李桂水
(天津科技大学机械工程学院, 天津 300222)

摘要: 为有效地去除中药蒲地蓝三味水提液中的杂质, 保留有效成分, 提高澄清度, 采用天然高分子絮凝剂壳聚糖对水提液进行絮凝处理. 以咖啡酸保留率、蛋白质去除率和浊度为考察指标, 研究了絮凝剂用量、絮凝温度和搅拌速度对絮凝效果的影响, 并结合絮凝现象详细分析了絮凝机理. 结果表明: 壳聚糖用量为 1 g/L、絮凝温度为 40 ℃、搅拌速度为 550 r/min 时, 蛋白质去除率最高约为 67.82%, 浊度约为 6.2 NTU, 此时, 咖啡酸保留率在 80% 以上. 此外, 絮体形态、上清液澄清度可作为絮凝效果好坏的判断依据.

关键词: 蒲地蓝; 壳聚糖; 水提液; 絮凝; 澄清

中图分类号: TQ461; R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)01-0046-05

Flocculation Effect and Mechanism of Using Chitosan to Deal with Chinese Traditional Medicine Pudilan Water Extract

CHENG Lijun, REN Boping, WANG Guorong, TAO Siyi, LI Guishui

(College of Mechanical Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: To remove the impurity, retain the effective ingredients and improve the clarity of Pudilan Sanwei water extract, chitosan, a type of natural polymer flocculant, was used to flocculate the water extract. The influence of flocculant dosage, flocculation temperature and stirring speed on flocculation effect was studied using the effective ingredient retention rate, the impurity removal rate and the supernatant turbidity as indexes. The flocculation mechanism was analyzed in detail based on the flocculation phenomenon. The results showed that when the chitosan dosage is 1 g/L, the flocculation temperature is 40 ℃ and the stirring speed is 550 r/min, the removal rate of protein is the highest, approximately 67.82%, the supernatant turbidity is about 6.2 NTU and the retention rate of caffeic acid maintains above 80%. The morphology of the flocs and the supernatant clarity could be used as the criterion for judging the flocculation effect in practical application.

Key words: Pudilan; chitosan; water extract; flocculation; clarification

作为我国传统治疗和预防疾病的重要手段, 中药在实践中经历和发展了数千年, 并被广泛地传播和应用. 中药提取液成分复杂, 既含有起药理作用具有治疗功效的有效成分, 同时也含有大量没有疗效甚至具有一定毒害作用的杂质. 其中有效成分包括生物碱、黄酮类、氨基酸和多肽蛋白质类、有机酸类、糖苷类等^[1]. 杂质主要包括蛋白质、淀粉、鞣质、纤维素、色素和泥沙等^[2]. 蛋白质等杂质如长时间放置会发生变性导致提取液腐败, 使提取液失效; 同时也变得浑

浊, 影响中药稳定性. 为提高中药的稳定性、疗效并降低中药服用量, 必须提高中药中的有效成分含量, 同时降低杂质含量.

传统的中药提取采用水提醇沉法^[3], 其耗醇量大, 工艺复杂, 成本高, 生产周期长, 且该工艺将水提液中醇不溶性的大分子有效成分作为杂质去除, 可能致使疗效降低, 因此正日益被新的提取方法所替代. 絮凝法是近年来兴起的并且快速发展和应用的一种新的提纯方法. 絮凝技术简单实用, 周期短, 成

收稿日期: 2015-03-05; 修回日期: 2015-07-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21276195)

作者简介: 程丽君(1987—), 女, 山西人, 讲师; 通信作者: 李桂水, 副教授, liguishui@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2015-10-16; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20151016.1453.008.html>.

本低, 除杂效果好, 有效成分保留率高, 被越来越广泛地应用于中药提纯精制^[4-7]。比如, 孙娇等^[4]采用壳聚糖对小儿咳喘灵原药提取液进行絮凝处理, 除杂效果较水提醇沉法有大幅度提升。孙泽沾等^[5]将壳聚糖季铵盐用于止咳定喘口服液原药水提液絮凝除杂, 其有效成分的保留率高于水提醇沉法。

蒲地蓝中药复方由苦地丁、蒲公英、板蓝根和黄芩四味中药组成, 具有清热解毒、消炎抗肿等作用, 可用于治疗腮腺炎、咽炎、扁桃体炎或疖肿等疾病^[8]。本文以蒲地蓝中药复方中的蒲公英、苦地丁和板蓝根三味水提液为研究对象(黄芩不能与此三味共同熬制, 因此不进行研究), 以其中具有药理作用和疗效的咖啡酸为有效成分、蛋白质为杂质, 研究了壳聚糖絮凝处理三味水提液的工艺条件对絮凝效果的影响, 并结合絮凝现象探讨了壳聚糖对三味水提液的絮凝机理。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

蒲公英(批号 1209038)、苦地丁(批号 1209174)和板蓝根(批号 1212128)均购自天津中药饮片厂。

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$, 批号 HK131122077)购自浙江金壳生物化学有限公司。将壳聚糖加入体积分数为 1% 的冰醋酸溶液中配制成质量浓度为 10 g/L 的壳聚糖醋酸溶液, 搅拌均匀后溶胀 24 h 即得到絮凝剂。

咖啡酸对照品(纯度 $\geq 98\%$, 批号 MUST-12042403)购自北京恒元启天化工技术研究院。

1.2 实验仪器

UV2700 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; WGZ-100 型散射式浊度仪, 上海第三光学仪器厂; TD12001 型分析天平, 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司; pH5-2C 型数字酸度计, 天津市盛邦电器厂; JS94F 型微电泳仪, 上海中晨数字技术设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 蒲地蓝三味水提液的制备

按蒲地蓝中药水提液处方取苦地丁 100 g、板蓝根 150 g、蒲公英 400 g, 按照 2010 版《中华人民共和国药典》(以下简称药典)规定加 10 倍去离子水煎煮 1.5 h, 采用双层纱布过滤得到滤液和药渣。将药渣加 8 倍去离子水煎煮 1.5 h 后过滤得到滤液, 将两次

得到的滤液合并; 然后用去离子水稀释为 6 500 mL, 添加苯甲酸钠防腐剂 19.5 g, 20 ℃ 下贮存备用。

1.3.2 絮凝实验

量取 300 mL 蒲地蓝三味水提液于烧杯中, 当搅拌转速达到 450 r/min 时, 往烧杯中投加已配制好的壳聚糖絮凝剂(初始絮凝剂量为 0.25 g/L), 搅拌 2 min 之后将转速调为 50 r/min, 持续搅拌 10 min, 反应结束后静置 24 h。取适量上清液测量其咖啡酸含量、蛋白质含量及浊度。

1.4 测定及计算方法

1.4.1 咖啡酸含量测定及保留率计算

根据药典, 采用高效液相色谱法测定咖啡酸的含量。选用 C18 色谱柱(10 μm , 4.6 mm $\times$ 200 mm), 检测波长为 323 nm, 按咖啡酸计算理论板数应不低于 3 000。

精密称取咖啡酸对照品 1.5 mg 于 50 mL 的容量瓶中, 加甲醇定容至 30 $\mu\text{g/mL}$, 并分别稀释成质量浓度为 3.0、9.0、15.0、21.0、27.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。分别进样 10 μL 不同质量浓度的咖啡酸对照品溶液, 测定峰面积, 并记录数据和色谱图。以峰面积(y)对进样量(x)进行线性回归, 并绘制标准曲线, 可得回归方程 $y = 3\,925.664x - 22.432\,9$, $R^2 = 0.995\,92$ 。结果表明进样量与峰面积间在咖啡酸 3 ~ 30 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

量取 5 mL 水提液, 精密加 5% 甲酸的甲醇溶液定容至 10 mL, 摇匀, 利用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 0.5 h, 除去气泡, 冷却至室温, 即得待测样品。进样 10 μL , 测定峰面积值, 代入回归方程计算样品中咖啡酸含量。

咖啡酸保留率的计算公式为

咖啡酸保留率 = (絮凝后水提液中咖啡酸质量浓度/原水提液中咖啡酸质量浓度) $\times$ 100%

1.4.2 蛋白质含量测定及去除率计算

采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量。当考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合后会显现深蓝色, 同时其最大吸收峰变为 595 nm。当蛋白质含量在 1 ~ 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内时, 蛋白质-染料复合物在波长 595 nm 处的吸光度与蛋白质含量成正比。

分别吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 质量浓度为 0.1 g/L 的蛋白质对照品溶液于相应试管中, 加去离子水至 1.0 mL; 再向每个试管中加入 5.0 mL 考马斯亮蓝试剂, 快速混匀, 5 min 后, 以去离子水为对照, 在波长 595 nm 处进行比色, 绘制蛋白质标准曲线, 可得到回归方程 $y = 0.006\,88x +$

0.086 37, $R^2 = 0.985\ 9$. 其中 y 为吸光度, x 为蛋白质质量浓度.

精密量取试样 2.0 mL, 加入 10.0 mL 考马斯亮蓝试剂, 快速混匀, 5 min 后在波长 595 nm 处测定试样的吸光度, 代入回归方程计算水提液的蛋白质含量.

蛋白质去除率的计算公式为

蛋白质去除率 = $(1 - \text{絮凝后水提液中蛋白质质量浓度} / \text{原水提液中蛋白质质量浓度}) \times 100\%$

1.4.3 浊度的测定

采用散射式光电浊度仪测定水提液的浊度, 以表征水提液的澄清状况.

2 结果与讨论

2.1 水提液的初始性质

经检测, 初始三味水提液的浊度 > 200 NTU, pH 值为 5.08, ζ 电位为 -1.266 mV, 咖啡酸含量为 0.022 g/L, 蛋白质含量为 0.273 g/L.

2.2 絮凝条件对絮凝效果的影响及机理探讨

2.2.1 絮凝剂用量

分别加入 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 g/L 壳聚糖絮凝处理水提液, 温度为 30 °C, 搅拌速度为 450 r/min 时, 三味水提液的咖啡酸保留率、蛋白质去除率及浊度变化见图 1.

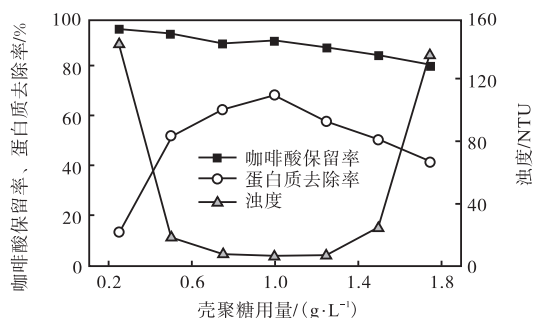


图 1 壳聚糖用量对絮凝效果的影响

Fig. 1 Influence of flocculant dosage on flocculation effect

实验发现: 随着壳聚糖加入量增大, 形成的絮体逐渐增多、厚度逐渐增大. 絮体沉淀物中主要以悬浮杂质为主, 但还包括絮体下沉过程中网捕和卷扫带走的部分有效成分(咖啡酸), 因此, 壳聚糖加入量越多, 形成的絮体越多, 咖啡酸损失越多. 实验结果也证实了这一点. 从图 1 可以看出, 当壳聚糖用量从 0.25 g/L 增大到 1.75 g/L 时, 三味水提液中咖啡酸保留率逐渐减小, 约从 96.29% 降至 81.26%.

随着壳聚糖用量增大, 水提液的澄清度先变好再

变差, 当壳聚糖用量为 1.00 g/L 时, 水提液澄清度最好, 相应浊度最低, 而当壳聚糖用量继续增大时, 水提液的浊度开始增大(见图 1 中浊度曲线). 由于水提液中有效成分咖啡酸的含量逐渐降低, 因而其浊度增大主要是由杂质蛋白质等颗粒引起, 当壳聚糖用量从 1.00 g/L 逐渐增大到 1.75 g/L, 水提液中蛋白质含量出现了增大现象, 也就意味着蛋白质的去除率下降了, 这与图 1 实验结果一致. 蛋白质含量随絮凝剂含量变化的原因是: 三味水提液中分布着大量由蛋白质等物质形成的胶体和悬浮物. 蛋白质中的羧基和氨基在水中分别解离为 $-\text{COO}^-$ 和 $-\text{NH}_3^+$, 同时水提液中的其他物质如无机盐、化合物、矿物质和有机物大分子等都会电离或离解出一定的离子. 这些离子吸附在胶体和悬浮颗粒表面, 使其带有一定的电荷. 此外, 由于胶体和悬浮物颗粒表面具有一定的表面自由能, 导致吸附离子的不均衡性, 使其所带的一种电荷多于另一种电荷. 本实验测得水提液的 ζ 电位为 -1.266 mV, 呈酸性(pH 5.08), 由此可知水提液中的胶体和悬浮颗粒表面净电荷为负电荷. 在酸性溶液中, 壳聚糖分子链上的游离氨基易质子化为 $-\text{NH}_3^+$, 使壳聚糖成为阳离子型有机聚电解质. 当将少量壳聚糖加入三味水提液中, 由于正负电荷相互吸引, 壳聚糖带正电荷的活性氨基与水提液中带负电荷的胶体和悬浮颗粒发生电中和反应从而连接在一起. 由于蛋白质分子大, 所带负电荷多, 因此壳聚糖分子会首先与蛋白质分子发生电中和反应, 从而在多个蛋白质分子之间起架桥作用, 将它们连接在一起, 形成大的絮团^[9]. 因此, 当壳聚糖加入量增大时, 三味水提液中的蛋白质含量由于壳聚糖的絮凝作用很快降低. 而咖啡酸分子较小, 所带电荷较少, 被吸框架桥的少, 因此含量变化比较小. 由于蛋白质和其他悬浮颗粒被壳聚糖吸附絮凝形成大的絮团沉淀, 因此水提液逐渐变得澄清, 浊度快速下降. 当壳聚糖加入量达到 1.00 g/L 时, 絮凝作用达到最大. 此时, 壳聚糖带正电荷的活性氨基与带负电荷的蛋白质以及其他颗粒上的官能团达到平衡, 吸附及电中和作用得到充分发挥, 使蛋白质的去除率最高, 水提液的澄清度最好, 浊度最低. 当壳聚糖加入量继续增大, 此时壳聚糖上活性氨基所带正电荷多于悬浮颗粒所带负电荷, 发生电中和之后, 多余的正电荷会使部分颗粒之间相互排斥, 处于游离稳定状态, 阻止架桥结构的形成, 壳聚糖的絮凝效果减弱, 从而使得水提液再次变得浑浊, 浊度开始上升.

通过上述讨论可知: 蛋白质去除率和澄清度呈正相关, 工业生产中可通过观察水提液澄清度来判断蛋白质含量的变化情况, 为最佳絮凝剂用量的确定提供参考和依据; 在此基础上, 结合有效成分的保留情况即可确定絮凝剂的最佳用量。

2.2.2 温度

分别在 10、20、30、40、50、60 °C 下絮凝处理水提液, 絮凝剂用量为 1.00 g/L, 搅拌速度为 450 r/min. 不同温度下壳聚糖絮凝处理蒲地蓝三味水提液形成的絮体变化情况见图 2。

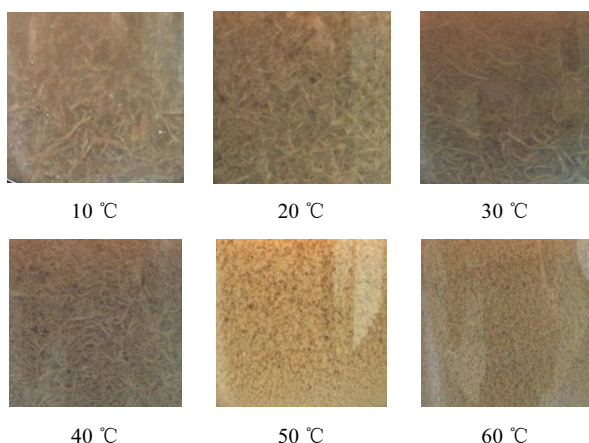


图 2 不同温度下壳聚糖絮凝处理三味水提液的絮体变化
Fig. 2 Flocc change of Sanwei water extract flocculated by chitoson under different temperature

从图 2 可以看出: 温度越高, 形成的絮体越细小, 絮体层也越密实. 在絮凝剂用量相同的情况下, 絮体越细小, 则生成的絮体数目越多. 絮体沉淀物中主要以悬浮杂质为主, 因此絮体越多意味着被除去的杂质也就越多. 但并不是絮体越细、数目越多越好. 当温度从 10 °C 升高至 40 °C 时, 水提液均比较澄清, 而当温度升高至 50 °C 和 60 °C 时, 水提液开始变得浑浊, 从前面的讨论可知, 浊度升高意味着水提液中蛋白质含量升高, 去除率降低, 与图 3 实验结果一致. 这是因为, 当温度从 10 °C 增大到 40 °C 时, 颗粒的布朗运动加剧, 此时杂质颗粒与壳聚糖分子接触机会增大, 电中和及吸附架桥作用增强, 此外, 温度升高使水提液黏度逐渐减小, 壳聚糖在溶液中的分散速度加快, 絮体沉降速度加快, 从而使得蛋白质去除率增大, 澄清度提高. 当温度达到 40 °C 时, 壳聚糖分子与杂质颗粒间的电中和作用得到充分发挥, 同时水提液黏度下降使分子间碰撞频率加大, 使架桥和网捕卷扫反应更加充分彻底, 此时, 蛋白质去除率达到最大值, 水提液浊度也较低. 当温度继续升高超过 40 °C, 由于壳聚糖分子为有机高分子, 对温度有一定的敏感

性, 温度过高时, 线形长链状的高分子会发生卷曲、缩团等现象, 极大地影响了壳聚糖分子的性能, 从而使壳聚糖分子的吸附和架桥性能降低, 同时, 温度过高, 水提液黏度下降程度过大, 絮体沉降速度过快, 使一部分絮体在沉降过程中来不及捕获悬浮颗粒, 网捕作用得不到充分发挥, 导致杂质去除率下降.

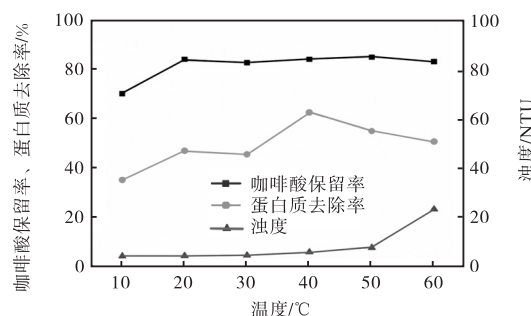


图 3 温度对絮凝效果的影响

Fig. 3 Influence of temperature on flocculation effect

此外, 咖啡酸分子微溶于冷水, 而易溶于热水, 当温度慢慢升高时, 咖啡酸在水中的溶解度增大, 与壳聚糖分子接触几率降低, 因此, 被吸附和网捕卷扫走的咖啡酸减少, 从而使咖啡酸保留率增大.

可见, 絮凝过程存在最佳絮凝温度, 此时絮凝剂分散状态、形成的絮体数目和絮体大小都较为理想, 絮体对杂质有较好的网捕、卷扫作用, 从而使杂质去除率较高, 上清液澄清透明, 有效成分保留率也较高. 在实际应用中, 可根据絮体数目和细小程度并结合上清液澄清度确定合适的絮凝温度.

2.2.3 搅拌速度

分别在 150、250、350、450、550、650 r/min 的搅拌速度下絮凝处理水提液, 絮凝剂用量为 1.00 g/L, 温度为 40 °C, 图 4 显示了不同搅拌速度下形成的絮体的形貌.

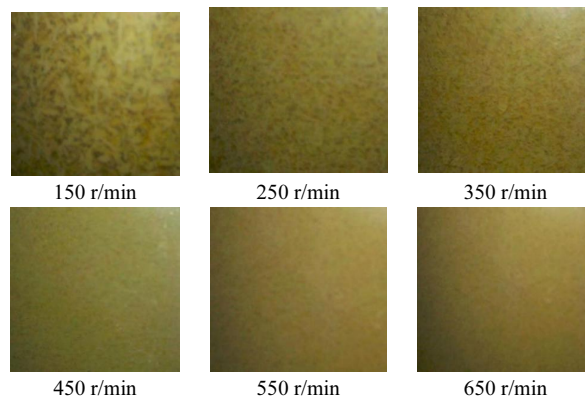


图 4 不同搅拌速度下壳聚糖絮凝处理三味水提液的絮体变化

Fig. 4 Flocc change of Sanwei water extract flocculated by chitoson under different stirring speed

从图 4 中可以看出:随着搅拌速度增大,形成的絮体越来越细小,当搅拌速度达到 650 r/min 时,基本看不出单个絮体的形状.这是由于过大的剪切速度导致絮体被破坏,致使絮体十分细小,絮体无法快速沉降,导致上清液中蛋白质含量和浊度出现增大趋势(见图 5).搅拌是为了增大水提液中胶体颗粒和悬浮颗粒的动能,使颗粒的运动程度更加剧烈,同时增大壳聚糖分子的分散程度以及壳聚糖分子与胶体颗粒和悬浮颗粒的碰撞频率,使得絮凝更加充分.随着搅拌速度增加,絮凝剂在水提液中的分散程度增大,壳聚糖与颗粒的碰撞几率增大,生成的絮体数量增多,蛋白质的去除率增大,水提液的浊度较低,基本在 10 NTU 以下.当搅拌速度达到 550 r/min 时,此时水提液中的蛋白质颗粒在搅拌的作用下能够最大程度地克服颗粒表面电荷之间的排斥能,从而很好地与壳聚糖分子接触发生反应,蛋白质去除率达到最大值.当搅拌速度继续增大时,过大的搅拌速度将产生过大的剪切力作用,这种剪切力会使已经形成的絮体破碎分散在水提液中,使水提液中蛋白质去除率降低^[10],水提液的浊度也有一定程度增大,见图 5.

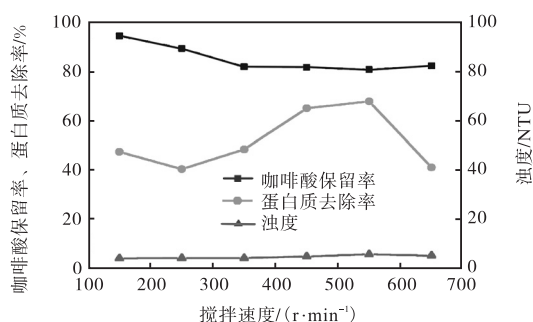


图 5 搅拌速度对絮凝效果的影响

Fig. 5 Influence of stirring speed on flocculation effect

此外,随着搅拌速度增大,水提液中咖啡酸含量逐渐降低,当搅拌速度达到 350 r/min 时,咖啡酸含量逐渐趋于稳定,直到搅拌速度达到 650 r/min,咖啡酸保留率仍保持在 80% 以上.搅拌速度增大使咖啡酸分子与壳聚糖分子接触机会增大,从而使更多的咖啡酸分子被吸附絮凝,导致咖啡酸含量随搅拌速度增大出现一定程度降低.

絮凝过程中絮体的产生主要发生在快速搅拌阶段,这个阶段直接决定着絮体数量及其细密程度.絮凝过程存在最佳搅拌速度,此时絮体大小和数量都较合适,杂质去除率较高,上清液浊度较低,同时有效成分保留率也较好.

3 结 论

壳聚糖对蒲地蓝三味水提液具有很好的絮凝效果.絮体形貌和水提液澄清度可以作为判断絮凝效果好坏最直接的依据.絮凝剂用量、絮凝温度和搅拌速度对絮凝效果有很大影响.杂质去除率随絮凝剂用量、絮凝温度和搅拌速度增大先提高后降低;水提液浊度随絮凝剂用量增大先下降后升高,当温度不超过 40 ℃ 时,水提液浊度基本在 10 NTU 以下,超过 40 ℃ 后,浊度出现增大趋势;有效成分保留率随絮凝剂用量和搅拌速度增大而逐渐降低,随温度升高逐渐升高.经研究认为,壳聚糖主要通过带正电荷的活性氨基与水提液中带负电荷的胶体和悬浮颗粒发生吸附架桥作用使颗粒连接在一起形成絮团,并在絮团沉降过程中对部分颗粒起网捕卷扫作用,从而除去水提液中的杂质,提高水提液澄清度.

参考文献:

- [1] 郭维图. 中药提取新老工艺技术浅谈[J]. 医药工程设计, 2005, 26(1): 41-47.
- [2] 吴英, 侯丽光. 中药澄清技术在中药制剂过程中的应用[J]. 牡丹江医学院学报, 2004, 25(4): 51-53.
- [3] 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): 154-157.
- [4] 孙娇, 秦莉, 李桂水, 等. 壳聚糖对小儿咳喘灵原药提取液絮凝除杂效果研究[J]. 中草药, 2013, 44(2): 174-179.
- [5] 孙泽沾, 孙娇, 秦莉, 等. 壳聚糖季铵盐用于止咳定喘口服液原药水提液絮凝工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1212-1218.
- [6] 孙娇, 孙泽沾, 康勇, 等. ZTC 1+1 用于养阴清肺糖浆水提液的絮凝工艺研究[J]. 中草药, 2011, 42(3): 478-483.
- [7] 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, 37(8): 1271-1275.
- [8] 蒋磊, 孟祥松, 李军, 等. 蒲地蓝消炎口服液质量控制方法的研究[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(2): 75-77.
- [9] Hsiao Y C, Chen C N, Chen Y T, et al. Controlling branching structure formation of the salivary gland by the degree of chitosan deacetylation[J]. Acta Biomaterialia, 2013, 9(9): 8214-8223.
- [10] Sun J, Qin L, Li G S, et al. Effect of hydraulic conditions on flocculation performances and floc characteristics in Chinese herbal extracts by chitosan and chitosan hydrochloride[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 225: 641-649.

责任编辑: 常涛