

壳聚糖絮凝法澄清天麻提取液的工艺优选

田洋¹, 史崇颖¹, 候艳², 穆颖超³, 罗瑜¹, 肖蓉^{1*}

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学 龙润普洱茶学院, 昆明 650201;
3. 云南师范大学 文理学院, 昆明 650201)

[摘要] 目的:优选壳聚糖澄清天麻提取液的工艺条件,为该药材的临床应用提供参考。方法:采用 HPLC 测定天麻素含量,流动相乙腈-水(3:97),检测波长 220 nm。以澄清效果和固形物含量为指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察壳聚糖添加量、药液浓缩比、絮凝温度、静置时间对天麻水提液壳聚糖絮凝工艺条件的影响。结果:最佳工艺条件为壳聚糖添加量 0.15%,药液浓缩比 1:13 g·mL⁻¹,絮凝温度 25 ℃,静置时间 10 h。天麻素质量浓度 65.93 g·L⁻¹,含固量 3.157%。结论:采用壳聚糖絮凝法澄清天麻提取液的方法简单易行、经济实用、澄清效果好,适用于中药水提液的精制。

[关键词] 壳聚糖絮凝法;澄清工艺;天麻提取液;天麻素

[中图分类号] R283.6;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)05-0025-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050025

Optimization of Clarification Process of Gastrodiae Rhizoma Extract with Chitosan Flocculating Method
TIAN Yang¹, SHI Chong-ying¹, HOU Yan², MU Ying-chao³, LUO Yu¹, XIAO Rong^{1*} (1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Longrun Pu-erh Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. The College of Arts and Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650201, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize clarification process of Gastrodiae Rhizoma extract with chitosan flocculating method. **Method:** HPLC was employed to determine the content of gastrodin with mobile phase of acetonitrile-water (3:97) and detection wavelength at 220 nm. Taking clarification effect and solids content as indexes, on the basis of single factor tests, orthogonal design was used to optimize clarification process with the adding amount of chitosan, liquid concentration ratio, flocculation temperature and standing time as factors. **Result:** Optimal clarification procedure was obtained under these conditions: the adding amount of chitosan 0.15%, liquid concentration ratio 1.13 g·mL⁻¹, flocculation temperature at 25 ℃, standing time of 10 h. The concentration of gastrodin was 65.93 g·L⁻¹, solids content was 3.157%. **Conclusion:** This optimized process is feasible and economical with good clarification effect, which is suitable for purification of Chinese medicine extract.

[Key words] chitosan flocculating method; clarification process; Gastrodiae Rhizoma extract; gastrodin

天麻主要用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等^[1],具有增智、健脑、延缓衰老和增强机体免疫力的作用^[2]。其化学成分包括天麻素、天麻苷元、天麻醚苷、派立辛、香草醇、琥珀酸、棕榈酸等,其中天麻素为主要有效成分,含量高达 0.33%~0.67%^[3-4]。随着研究的深入,天麻市

场需求量不断增加,故有必要对其工艺进行优化,使天麻的产品开发由简单的直接粗加工向提取、精制、深加工转化,以提高产品的质量^[5]。

天麻可采用醇提、温水浸提及加压提取法,但得到的天麻提取液经醇沉处理后易导致药液中水溶性成分损失过多^[6]。壳聚糖是从蟹虾外壳提取的一

[收稿日期] 20140508(005)
[基金项目] 云南省自然科学基金项目(2005C0037M)
[第一作者] 田洋,硕士,讲师,从事功能性食品开发与功效评价研究,Tel:0871-65221699,E-mail:tianyang1208@163.com
[通讯作者] *肖蓉,教授,硕士生导师,从事食品安全性和功能性评价研究,Tel:0871-65212533,E-mail:xiaorong91515@163.com

种氨基葡萄糖的直链多聚糖,含有游离氨基,能结合酸分子,是天然多糖中唯一的碱性多糖,与酸性化合物结合后,便成为带阳电荷的聚电解质,能沉淀除去鞣质、胶体、蛋白质等杂质,保留小分子成分及氨基酸、多糖、多肽等,具有优异的絮凝作用^[7-9]。壳聚糖在食品、生物制药、医学上被广泛的应用,曾初欢等^[10]将壳聚糖用于荔枝冰酒澄清工艺中,当壳聚糖用量 0.5 g·L⁻¹时荔枝冰酒的澄清效果最好,透光率达 98.8%。张俊侠等^[11]建立了采用壳聚糖提高小儿解表止咳口服液澄明度的方法,结果发现壳聚糖絮凝法明显优于醇沉法,且提取的盐酸麻黄碱含量无差异。盛华刚^[12]研究了壳聚糖澄清黄芩水提液的纯化效果,发现壳聚糖絮凝沉降法的纯化效果优于乙醇沉淀法和离心沉淀法。但目前尚未见利用壳聚糖絮凝法澄清天麻提取液的研究报道,故本实验以天麻素和可溶性固形物含量为指标,在单因素试验基础上,采用正交试验考察优选天麻提取液的澄清工艺,为天麻在医药领域中的应用提供参考。

1 材料

HP1100 型高效液相色谱仪(美国惠普公司),80-1/2 型低速离心机(常州市华普达教学仪器有限公司),BS210S 型电子天平称(北京赛多利斯天平有限公司)。天麻购自云南省昆明市菊花村中药材批发市场,经山西省农业科学院史清亮研究员鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎;天麻素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110807),壳聚糖(潍坊海之源生物制品有限公司),乙酸为食用级,乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸为优级纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×

150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(3:97),流速 1 mL·min⁻¹,柱温室温,检测波长 220 nm,进样量 20 μL。

2.2 天麻提取液的制备 参照 2010 年版《中国药典》中天麻的提取工艺。精密称取天麻药材粉末(过 80 目筛)10 g,加 10 倍量 50% 乙醇于 70 ℃ 水浴浸提 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,于 70 ℃ 减压浓缩,即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取天麻素对照品 1.8 mg 置于 10 mL 量瓶中,加经超声处理 30 min 的乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97)溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 供试品溶液的制备 精密吸取适量天麻澄清液,于 70 ℃ 减压浓缩成浸膏,加适量乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97)溶解,置于 250 mL 量瓶中,定容,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.5 标准曲线绘制 精密量取天麻素对照品溶液 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加乙腈-0.05% 磷酸(3:97)混合液溶解并定容,摇匀,配制系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,得回归方程 $Y = 3.091X - 0.070$ ($R^2 = 0.9995$),线性范围 1.8 ~ 14.4 μg,最低检测限 2 ng。

2.6 单因素试验考察

2.6.1 壳聚糖用量 以澄清效果和天麻素损失率为评价指标,加 1% 乙酸配制 1% 壳聚糖溶液。取 0.1 g·mL⁻¹天麻浓缩液 100 mL,分别加入 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%, 0.3%, 0.35% 壳聚糖溶液,充分搅拌,25 ℃ 静置 12 h,见表 1,故选择 0.1%, 0.15%, 0.2% 为正交试验中壳聚糖添加量的 3 个水平。

表 1 壳聚糖用量、药液浓缩比、温度和时间对天麻提取液澄清效果的影响

Table 1 Effects of chitosan dosage, liquid concentration ratio, temperature and time on clarification of *Gastrodiae Rhizoma* extract

壳聚糖用量/%	澄清效果	药液浓缩比/g·mL ⁻¹	澄清效果	温度/℃	澄清效果	静置时间/h	澄清效果
0.02	-	1:1	-	20	+	2	-
0.05	-	1:4	-	25	+	4	±
0.10	+	1:7	+	30	+	6	±
0.15	+	1:10	+	35	±	8	+
0.20	+	1:13	+	40	±	10	+
0.25	+	1:16	±	45	-	12	+
0.30	±	1:19	-	55	-	14	+
0.35	±	1:22	-	60	-	16	+

注:“+”澄清,“-”混浊,“±”轻微混浊。表 2 同。

2.6.2 药液浓缩比 取药液浓缩比分别为 1, 0.25,0.143,0.1,0.077,0.062 5,0.052 6,0.045 5 g·mL⁻¹的天麻提取液 100 mL,各加入 0.1%壳聚糖溶液,于 25℃静置 12 h,见表 1,故选择 0.143,0.1,0.077 g·mL⁻¹为正交试验中药液浓缩比的 3 个水平。

2.6.3 温度 取 0.143 g·mL⁻¹天麻浓缩液 100 mL,添加 0.1%壳聚糖溶液,分别于 20,25,30,35,40,45,55,60℃静置 12 h,结果见表 1。故选择 20,25,30℃为正交试验中温度的 3 个水平。

2.6.4 静止时间 取 0.143 g·mL⁻¹天麻浓缩液 100 mL,添加 0.1%壳聚糖溶液,于 25℃分别静置 2,4,6,8,10,12,14,16 h,见表 1,故选择 8,10,12 h 为正交试验中静置时间的 3 个水平。

2.7 正交试验 在单因素试验基础上,选择壳聚糖用量、药液质量浓度、温度和静置时间为考察因素,以澄清效果和固形物含量为评价指标,取天麻浓缩液 100 mL,共 9 份,通过正交试验优选天麻提取液壳聚糖澄清工艺参数,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 天麻提取液澄清工艺正交试验分析
Table 2 Orthogonal test analysis for clarification process of Gastrodiae Rhizoma extract

No.	A 壳聚糖 用量 /%	B 药液 浓缩比 /g·mL ⁻¹	C 温度 /℃	D 静置 时间 /h	固形物 /%
1	0.1	1:7	20	8	2.847
2	0.1	1:10	25	10	3.083
3	0.1	1:13	30	12	3.127
4	0.15	1:7	30	12	2.983
5	0.15	1:10	20	8	2.961
6	0.15	1:13	25	10	3.157
7	0.2	1:7	25	10	2.717
8	0.2	1:10	30	12	2.883
9	0.2	1:13	20	8	2.852

注:澄清效果均为“+”。

表 3 固形物含量方差分析
Table 3 Variance analysis of solids content

变异来源	SS	F	P
A	0.090	45.0	<0.05
B	0.064	32.0	<0.05
C(误差)	0.002	1.0	
D	0.023	11.5	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

由表 2 可知,9 组天麻提取液经壳聚糖絮凝后均能得到澄清的溶液,各因素对可溶性固形物含量的影响顺序为 $A>B>D>C$ 。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A,B 均具有显著性差异,其他因素则无显著差异。试验组 6 ($A_2B_3C_2D_2$)和试验组 3 ($A_1B_3C_3D_3$)经壳聚糖澄清后所得到的可溶性固形物含量最高。为综合评价澄清后天麻提取液的品质,比较试验组 6 和 3 中天麻素含量,结果分别为 65.93,63.81 g·L⁻¹。故选择 $A_2B_3C_2D_2$ 为最佳试验组合,即壳聚糖添加量 0.15%,药液浓缩比 1:13 g·mL⁻¹,温度 25℃,静置时间 10 h。

3 讨论

壳聚糖絮凝澄清法是在混悬的中药提取液中加入壳聚糖絮凝剂,通过电中和、吸附架桥、基团反应等作用使体系中悬浮物及胶体粒子絮凝沉淀,以达到分离纯化的一种方法^[13]。絮凝剂一般是用水溶解的,但壳聚糖一般用 1%乙酸配制而成,因为壳聚糖为含有胺基的高分子长链化合物,难溶于水,可溶于稀乙酸溶液(与乙酸结合生成水溶性化合物),在酸性条件下,可很好地伸展其长链,充分发挥其作为阳离子絮凝剂的絮凝作用;但 pH 过低时,壳聚糖分子在酸水溶液中由链状变成了球状,使壳聚糖的黏度下降,反而降低了其絮凝性能^[14]。壳聚糖絮凝剂呈粉末状,溶解时宜缓慢加入,不断搅拌,切忌形成疙瘩;但搅拌速度不易太快,一般螺旋桨的搅拌速度约 300 r·min⁻¹,因为高速搅拌能切断聚合物分子,使溶液黏度下降,从而劣化絮凝性能。

絮凝剂加入量一般为澄清的最低量。一般来说,阴离子或非离子絮凝剂用量为中药水提液体积的 0.05%~0.2%,阳离子絮凝剂为 0.1%~0.3%。若用量过大,不仅浪费药剂,而且絮凝反应速度变慢,分散性差,甚至使溶液由澄清变成混浊。壳聚糖属于阳离子絮凝剂,在澄清天麻提取液时,当壳聚糖添加量<0.1%时,由于壳聚糖添加量过少,不足以和蛋白质等杂质分子发生较强吸附架及和电中和作用后将胶体颗粒充分絮凝,许多大分子粒子仍悬浮在溶液中,致使溶液浑浊^[15];当添加量在 0.1%~0.25%时,药液澄清,这是因为随着壳聚糖加入量的增加,吸附架桥和电中和作用增强,絮凝效果达最佳;当壳聚糖加入量为 0.3%~0.35%时,药液又变得轻微混浊,可能是由于壳聚糖为长链高分子化合物,加入量过高,溶液中微粒被其包围,以致失去其在颗粒间发挥的架桥作用,胶体表面发生二次吸附,

微粒处于再稳定状态,浊度升高。当温度升高时,颗粒能量增加,运动得更快,颗粒间相互碰撞的次数增加,使胶体颗粒结合成絮凝体的机率增多,温度升高可使胶体颗粒产生絮凝沉淀;但温度过高时,絮凝体吸附的颗粒杂质的动能增加,又使杂质能从壳聚糖骨架上脱离。因此温度过高或过低均能降低絮凝效果^[16]。

中药水提液一般宜浓缩后再进行絮凝澄清操作,当水提液质量浓度太低时,颗粒间的碰撞概率低,絮团形成很慢,甚至不能形成絮团,絮凝剂耗用量也大;当水提液质量浓度过高时,壳聚糖在药液中不易分散,壳聚糖分子上的某些基团不能充分吸附在微粒上,达不到很好的澄清效果,可降低絮凝剂溶液的浓度,而不是加水降低水提液浓度。

[参考文献]

[1] 张赫名. 天麻的研究进展[J]. 中药研究与信息, 2005,7(11):19-22.

[2] Ha J H, Lee D U, Lee J T, et al. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* Bl. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain[J]. J Ethnopharmacology, 2000,73(1):329-333.

[3] Zhao Y K, Cao Q E, Xiang Y Q, et al. Identification and determination of active components in *Gastrodia elata* Bl. by capillary electrophoresis[J]. J Chromatography A, 1999,849(1):277-283.

[4] 岑信钊. 天麻的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2005,28(10):958-961.

[5] 孙亚男. 天麻保健功能研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2009,29(4):899-900.

[6] 王伦, 张兴国, 李晓倩. 天麻主要活性成分及其结构修饰研究[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(5):1146-1149.

[7] 乔德亮. 低聚壳聚糖制备及其在功能食品中应用[J]. 食品工业科技, 2007,28(4):228-230.

[8] Percot A, Viton C, Domard A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells[J]. Biomacromolecules, 2003,4(1):12-18.

[9] 覃彩芹, 池伟林, 舒海波. 壳聚糖的体内生物活性功能研究进展[J]. 孝感学院学报, 2004,24(6):5-9.

[10] 曾庆初, 黄星源, 郭正忠, 等. 壳聚糖在荔枝冰酒澄清中的应用研究[J]. 酿酒, 2014,41(3):51-54.

[11] 张俊侠, 魏灿英, 焦小珂, 等. 壳聚糖对小儿解表止咳口服液澄清效果的影响[J]. 中国药房, 2014, 25(15):1389-1391.

[12] 盛华刚. 壳聚糖做澄清剂对黄芩水提液的纯化工艺研究[J]. 食品与药品, 2013,15(4):229-231.

[13] 孙立霞, 常桂娟, 李秋萌, 等. 参玉口服液澄清工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(17):4-7.

[14] 王玲, 唐德强. 壳聚糖澄清龙眼果汁工艺研究[J]. 食品工业, 2004,(2):5-7.

[15] 华平, 郑艺梅, 袁志华. 壳聚糖对梨汁的澄清效果分析[J]. 食品工业科技, 2003,17(2):153-156.

[16] Girard B, Fukumoto L R. Apple juice clarification using microfiltration and ultrafiltration polymeric membranes[J]. LWT-Food Sci Technol, 1999,32(5):290-298.

[责任编辑 刘德文]