

壳聚糖复合絮凝剂选择性絮凝双黄连水提取液的工艺研究

白 研, 周婷婷[△], 潘杰谦[△], 陈亮红[△]

广东药学院公共卫生学院, 广东 广州 510310

摘要: 目的 优化壳聚糖复合絮凝剂用于双黄连水提取液选择性絮凝的最佳工艺条件。方法 以绿原酸和黄芩苷保留率、鞣质脱除率为考察指标, 分别考察复合絮凝剂制备工艺、絮凝剂用量、絮凝时间以及壳聚糖性能指标对絮凝效果的影响, 优化选择性絮凝工艺条件。结果 双黄连水提取液絮凝的优化工艺条件: 膨润土经 450 °C 灼烧 4 h 改性后负载壳聚糖制备复合絮凝剂, 絮凝剂用量 60 g/L, 絮凝时间 24 h, 所用壳聚糖最佳性能指标: 脱乙酰度 95%、黏度 60 cps。结论 经高温改性的膨润土负载壳聚糖所制备的复合絮凝剂具有良好的选择性絮凝性能, 絮凝效果显著优于《中国药典》2010 年版方法。

关键词: 壳聚糖; 膨润土; 复合絮凝剂; 双黄连口服液; 绿原酸; 黄芩苷; 鞣质

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2013)13 - 1761 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.012

Selective flocculation processing technology of chitosan complex flocculant on Shuanghuanglian aqueous extract

BAI Yan, ZHOU Ping-ting, PAN Jie-qian, CHEN Liang-hong

School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China

Abstract: Objective To optimize the selective flocculation processing technology of chitosan complex flocculant on Shuanghuanglian aqueous extract. **Methods** The impacts of preparation technology, the dosage of complex flocculant, the time of flocculation, and the performance index of chitosan on the flocculating effect of Shuanghuanglian aqueous extract were examined by using the retention rates of chlorogenic acid and baicalin, as well as the elimination rate of tannin as observation indicators. **Results** The selective flocculation processing technology on Shuanghuanglian aqueous extract was optimized as follows: the bentonite was loaded by chitosan after it was burned for 4 h at 450 °C, the dosage of complex flocculant was 60 g/L, the flocculating time was 24 h, and the best performance index of chitosan is 95% in deacetylation, and 60 cps in viscosity. **Conclusion** The complex flocculant made of high temperature modified bentonite loaded by chitosan shows the good selectivity in flocculation capacity. The flocculating effect of this method on Shuanghuanglian aqueous extract is remarkably better than that in the one documented in *Chinese Pharmacopoeia*.

Key words: chitosan; bentonite; complex flocculant; Shuanghuanglian Oral Liquid; chlorogenic acid; baicalin; tannins

双黄连口服液是由黄芩、金银花和连翘经提取精制而成, 具有辛凉解表、清热解毒的功效, 对于上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、病毒性肺炎等细菌和病毒感染性疾病有一定疗效^[1-2]。按照《中国药典》2010 年版一部的工艺是将双黄连口服液处方中 3 味中药材分成 2 部分水煎提取, 然后分别采用酸沉和醇沉法净化除杂。此工艺过程需耗用大量乙醇和盐酸, 工艺复杂且成本较高。

壳聚糖是天然多糖中唯一的碱性多糖, 由于含

有游离氨基, 能结合酸性分子^[3-4]。壳聚糖与酸或酸性化合物结合后, 便成为带正电荷的聚电解质, 且由于壳聚糖相对分子质量大, 分子链的伸展度大, 能起到很好的吸附架桥作用, 所形成的絮凝体比较强韧, 不易破碎, 显示出优异的絮凝作用。已被广泛应用于食品、化工、环保、医药等工业, 如果汁澄清、废水处理等^[3]。

膨润土是以蒙脱石为主的黏土矿, 蒙脱石晶胞由二层硅氧四面体中间夹一层铝氧八面体构成, 四

收稿日期: 2012-12-31

基金项目: 广东省科技计划项目 (2010B030700074); 广东省中医药局项目 (2009A14); 中山市科技计划项目 (20101H018)

作者简介: 白 研 (1970—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为卫生检验与药物分析。E-mail: angell_bai@163.com

[△]广东药学院公共卫生学院学生

网络出版时间: 2013-05-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130516.1012.005.html>

面体和八面体之间共享氧原子形成高度有序的准二维片层, 具有很大的比表面积, 其层间存在大量可交换的无机阳离子, 因此具有良好的吸附和离子交换性能^[5]。

根据膨润土可以吸附阳离子, 壳聚糖在酸性溶液中带有正电荷的特性, 将壳聚糖负载在膨润土上, 制成壳聚糖复合絮凝剂, 研究表明此复合絮凝剂的絮凝效果明显优于单纯使用壳聚糖絮凝^[6]。本实验以双黄连水提取液中绿原酸、黄芩苷保留率和鞣质脱除率为评价指标, 将膨润土负载壳聚糖的复合絮凝剂用于双黄连水提取液的絮凝澄清工艺研究。将壳聚糖复合絮凝剂分别应用于金银花+连翘的水提取液和黄芩水提取液, 探索不同制备工艺的复合絮凝剂的絮凝效果, 并对壳聚糖的主要性能指标——黏度和脱乙酰度的影响进行研究, 优化工艺条件, 并将絮凝结果与《中国药典》2010年版一部中对应的澄清工艺进行比较。

1 仪器与材料

LC-20A 型高效液相色谱仪 (包括四元梯度泵, DAD 检测器, 柱温箱, 自动进样器, 在线脱气机, 日本岛津公司); SpectrumLab 22PC 可见光分光光度计 (上海棱光技术有限公司); 十万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); SK2510LHC 超声波清洗器 (天津天有利科技有限公司)。

对照品黄芩苷 (批号 110715-201112)、绿原酸 (批号 110753-200413)、没食子酸 (批号 110831-200803) 均购自中国药品生物制品检定所; 壳聚糖 (脱乙酰度 95%, 黏度 60 cps, 批号 091107D3; 脱乙酰度 90%, 黏度 60 cps, 批号 091107D2; 脱乙酰度 85%, 黏度 60 cps, 批号 091107D1; 脱乙酰度 85%, 黏度 95 cps, 批号 091107V1; 脱乙酰度 85%, 黏度 188 cps, 批号 110302A; 脱乙酰度 85%, 黏度 415 cps, 批号 110309V) 山东奥康生物科技有限公司; 甲醇 (色谱纯, 天津市协和昊鹏色谱科技有限公司); 磷酸 (色谱纯)、钨酸钠 (分析纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 膨润土 (上海市四赫维化工有限公司, 批号 070S01); 干酪素 (广州环凯微生物科技有限公司, 批号 200907171); 硫酸锂 (分析纯, 广州化学试剂厂); 钼酸钠 (分析纯, 天津市化学试剂四厂); 溴水 (分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 其他实验用试剂均为分析纯或优级纯, 实验用水为去离子水。实验用药材黄芩 *Scutellariae Radix*、金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 和连翘

Forsythiae Fructus 均购自广州大参林药店, 经广东药学院中药学院刘基柱副教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 双黄连水提液的制备

参照《中国药典》2010年版一部方法。按处方称取中药材黄芩、金银花各 100 g, 连翘 200 g, 根据药材成分的不同特性, 双黄连水提取液分成 2 部分制备。依据主要成分的不同性质, 利用黄芩中黄芩苷在酸性溶液中沉淀的特性, 黄芩单独用水煎煮提取, 后续利用酸沉纯化。金银花和连翘共同用水煎煮提取, 后续利用醇沉法澄清纯化。

2.1.1 黄芩水提液制备 称取黄芩 100 g, 加水 700 mL 煎煮 2 h, 滤过, 再加水适量煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩, 于量瓶中定容到 200 mL。此溶液用于后续的酸沉纯化实验以及壳聚糖复合絮凝剂的絮凝研究, 用 A 组分表示。

2.1.2 金银花和连翘水提液制备 称取金银花 100 g、连翘 200 g, 加水浸 30 min 后, 煎煮 2 次, 每次加水 1 500 mL, 煎煮 1.5 h, 合并煎液, 滤过, 浓缩滤液, 量瓶定容到 200 mL。此溶液用于后续的醇沉澄清实验以及壳聚糖复合絮凝剂的絮凝研究, 用 B 组分表示。

2.2 壳聚糖复合絮凝剂的制备

2.2.1 膨润土负载壳聚糖 称取膨润土 50 g 与 1% 壳聚糖 (1.0 g 壳聚糖溶于 1% 冰醋酸水溶液, 定容至 100 mL) 50 mL 混合, 调成糊状, 使之充分湿润, 将此糊状物置于烘箱中, 60 °C 加热 4 h 烘干, 研细, 即得。

2.2.2 高温改性膨润土负载壳聚糖 称取膨润土 50 g, 在马弗炉中以 450 °C 灼烧 4 h, 取出冷却后, 与 1% 壳聚糖 50 mL 混合, 调成糊状, 将此糊状物置于烘箱中, 60 °C 加热 4 h 烘干, 研细, 即得。

2.3 不同澄清工艺的制备样品

2.3.1 乙醇澄清样品 准确量取 A 组分 50 mL, 在水浴 80 °C 时加入 2 mol/L 盐酸溶液适量调至 pH 为 1.0~2.0, 保温 1 h, 静置 12 h, 滤过, 沉淀加 6~8 倍量水, 用 40% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 加入等量乙醇, 搅拌使溶解。滤过, 滤液用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 2.0, 60 °C 保温 30 min, 静置 12 h, 滤过。沉淀部分用乙醇洗至 pH 值为 7.0^[3], 乙醇液再用 40% 氢氧化钠调节 pH 值至 7.0, 然后在水浴条件下挥干乙醇, 用去离子水定容至 50 mL, 备测。

准确量取 B 组分 100 mL, 浓缩至相对密度为 1.20~1.25 (70~80 °C) 的清膏。在 40 °C 缓慢加入乙醇, 使含乙醇量达到 75%。充分搅拌, 静置 12 h, 滤取上清液, 残渣加 75%乙醇适量, 搅匀, 静置 12 h, 滤过, 合并乙醇液^[7], 然后在水浴条件下挥干乙醇, 用去离子水定容至 100 mL, 备测。

2.3.2 壳聚糖复合絮凝剂澄清样品 准确吸取 A 组分或 B 组分 10 mL, 加入一定量的壳聚糖复合絮凝剂, 充分搅拌 10 min, 静置一定时间后, 用离心机 3 000 r/min 离心 10 min, 滤过, 滤液转移至 10 mL 比色管中, 以去离子水定容至刻度, 备测。

2.4 绿原酸和黄芩苷的测定

2.4.1 对照品溶液配制 精密称取黄芩苷对照品 10.19 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 超声溶解得质量浓度为 1.019 mg/mL 对照品溶液, 从中吸取 2 mL 至 5 mL 棕色量瓶中, 用 50%甲醇定容至刻度, 超声溶解得质量浓度为 407.6 μg/mL 对

照品溶液。

精密称取绿原酸对照品 9.56 mg 置 10 mL 量瓶中, 用 50%甲醇定容至刻度, 超声溶解得质量浓度为 956 μg/mL 对照品溶液。从中吸取 0.5 mL 置 5 mL 棕色量瓶中, 用 50%甲醇定容至刻度, 超声溶解得质量浓度为 95.6 μg/mL 对照品溶液。

2.4.2 HPLC 法分析条件 由于双黄连水提液中成分较复杂, 黄芩苷、绿原酸的测定条件与出峰时间相差较大, 故本实验采用梯度洗脱的方式分析各测试样品中的黄芩苷或绿原酸的量。色谱条件: 色谱柱为 Diamonsid-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 黄芩苷 274 nm, 绿原酸 324 nm; 进样量 20 μL; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 流动相为甲醇-0.25% H₃PO₄ 水溶液; 梯度洗脱: 0~8 min, 12%甲醇; 8~10 min, 12%~30%甲醇; 10~25 min, 30%~55%甲醇; 25~55 min, 55%甲醇。HPLC 图谱见图 1。

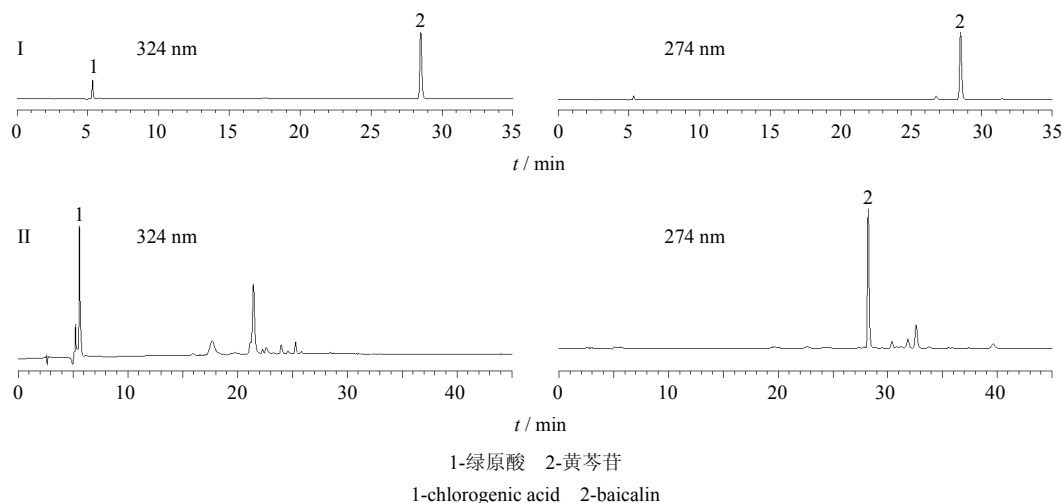


图 1 混合对照品 (I) 和 A、B 组分絮凝澄清后 (II) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (I) and clarified samples of groups A and B (II)

2.4.3 线性关系考察 分别吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的黄芩苷 (407.6 μg/mL) 和绿原酸 (95.6 μg/mL) 对照品溶液于 5 mL 量瓶中, 加 50%甲醇稀释定容至刻度。依次进样 20 μL, 每个质量浓度重复测定 2 次以上。以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程: 绿原酸 $Y=64\ 724 X-56\ 786, r=0.999\ 8$; 黄芩苷 $Y=72\ 015 X-4\ 617, r=0.999\ 2$; 结果表明绿原酸在 1.912~19.12 μg/mL, 黄芩苷在 8.152~81.52 μg/mL 与峰面积积分值线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 准确吸取 1 mL 的绿原酸 (95.6

μg/mL) 和黄芩苷 (407.6 μg/mL) 对照品溶液, 置于 5 mL 量瓶中, 用 50%甲醇定容至刻度, 配制成混合对照品溶液。其中绿原酸为 19.12 μg/mL, 黄芩苷为 81.52 μg/mL, 在“2.4.2”项色谱条件下, 连续进样 6 次。分别记录绿原酸和黄芩苷的峰面积, 得 RSD 分别为 0.07%、0.08%, 仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 准确吸取 A 和 B 组分 10 mL, 分别加入 600 mg 壳聚糖复合絮凝剂 (壳聚糖脱乙酰度 95%, 黏度为 60 cps), 充分搅拌 10 min, 静置 24 h 后, 用离心机 3 000 r/min 离心 10 min, 滤过, 滤液转移至 10 mL 比色管中, 以去离子水定容至刻

度, 作为样品中间液。分别准确吸取此样品中间液各 1 mL 置于 50 mL 量瓶中, 以去离子水定容至刻度。再取稀释后的样品液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇定容至刻度, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 待测样。在“2.4.2”项色谱条件下, 分别在 2、4、6、8、10、12 h 进样, 测定黄芩苷和绿原酸色谱峰面积, 得其 RSD 分别为 0.12%、0.25%, 表明供试品室温放置 12 h 内稳定

2.4.6 重复性试验 按照“2.4.5”项制备相同的待测样, A、B 组分各平行 6 份。在“2.4.2”项色谱条件下, 分别进样, 测定黄芩苷和绿原酸色谱峰面积, 得其 RSD 分别为 0.47%、0.57%。

2.4.7 加样回收率试验 准确吸取“2.4.5”项相同的样品中间液各 1 mL 置于 50 mL 量瓶中, 以去离子水定容至刻度。再准确吸取此稀释后的样品液 0.5 mL 置于 5 mL 量瓶中, A、B 组分各平行 6 份, B 组分样品液加入 95.6 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸对照品溶液 0.5 mL, A 组分样品液加入 407.6 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷对照品溶液 0.6 mL, 用 50% 甲醇定容至刻度, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 待测。在“2.4.2”项色谱条件下进样测定, 根据“2.4.6”项待测样中绿原酸和黄芩苷的量, 计算加样回收率, 得绿原酸的平均回收率为 98.62%, RSD 为 0.91%; 黄芩苷的平均回收率为 97.40%, RSD 为 0.83%。

2.4.8 样品中绿原酸和黄芩苷的测定 A 组分和 B 组分水提取液经各种工艺澄清后, 分别吸取澄清后样品 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 以纯水定容至刻度。再取稀释后的样品液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇定容至刻度, 经 0.45 μm 滤膜滤过后在“2.4.2”项色谱条件下进样测定。由于金银花+连翘提取液中连翘苷的量很低, 故在后续筛选絮凝工艺条件时, B 组分选用绿原酸作为评价指标考察各絮凝澄清工艺的有效成分保留率。A 组分和 B 组分絮凝后的 HPLC 色谱图见图 1。

2.5 鞣质的测定^[8]

2.5.1 磷钼钨酸试剂的配制 称取钨酸钠 20 g、钼酸钠 5 g, 加水 140 mL 使其溶解, 加盐酸 20 mL、磷酸 10 mL, 加热回流 10 h, 放冷, 再加硫酸锂 30 g、水 10 mL 和溴水 0.2 mL, 煮沸除去残留的溴水(约 15 min), 冷却, 加水稀释至 200 mL, 滤过, 即得。试液应呈黄色, 如放置后变为绿色, 可加溴水 0.2 mL, 放置过夜, 煮沸约 15 min, 除去多余的溴, 再用去离子水定容至原体积。

2.5.2 对照品溶液的配制 精密称取没食子酸对照品 21.96 mg, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。准确量取 10 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得 43.92 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。

2.5.3 线性关系考察 准确量取没食子酸对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别置 25 mL 棕色量瓶中, 各加入磷钼钨酸试液 1.0 mL, 再分别加水 9.5、9.0、8.5、8.0、7.0、6.0、5.0 mL, 再用 20% 碳酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀。放置 30 min, 在 768 nm 波长处以试剂空白为参比测定吸光度 (A) 值, 以 A 值为纵坐标 (Y), 以没食子酸质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.091X+0.0068$, $r=0.9998$, 结果表明没食子酸在 0.878~7.030 mg/L 与 A 值线性关系良好。

2.5.4 样品中鞣质的测定 准确量取“2.3”项各供试水溶液样品 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用去离子水定容至刻度。再从中取 1.0 mL 定容到 50 mL 制成测试液。

总酚测定: 准确量取上述各测试液 2 mL, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加入 1.0 mL 磷钼钨酸溶液, 去离子水 8.0 mL, 再用 20% 碳酸钠溶液稀释至刻度, 在 768 nm 处测定 A 值。

不被吸附的多酚测定: 吸取测试液 25 mL, 加至已盛有干酪素 600 mg 的具塞锥形瓶中, 密塞。置 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱保温 1 h, 振摇, 取出放冷, 摇匀后滤过, 弃去初滤液得续滤液。吸取滤液 2.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加入磷钼钨酸 1.0 mL, 去离子水 8.0 mL, 用 20% 碳酸钠定容至刻度, 在 768 nm 处测定 A 值。

鞣质量 = 总多酚量 - 不被吸附的多酚量

2.5.5 鞣质测定中干酪素的用量 在对供试样品中鞣质的量进行测定时, 需要利用干酪素将样品中的鞣质完全沉淀后测定不被吸附多酚的量。为了评价干酪素对鞣质的沉淀效率, 实验中取多个供试样品, 取样量均为 25 mL, 每个试样取 5 份平行样, 分别向其中加入 200、400、600、700、800 mg 干酪素, 参照“2.5.4”项方法中不被吸附多酚的测定。测定结果发现随着干酪素用量的增加, 不被吸附游离多酚的量逐渐减少, 当达到 600 mg 时, 溶液中的游离多酚的量不再减少, 继续增加干酪素用量, 测试样品 A 值有增加的趋势, 说明鞣质已经被干酪素吸附完全。因此, 在后续测试样品中干酪素加入量均

选择为 600 mg。

2.5.6 干酪素空白 在样品的测定过程中，如果加入的干酪素含有干扰试验的物质，将明显影响“不被吸附多酚”的测定，《中国药典》2010 年版一部规定方法中未考虑干酪素的影响，故样品鞣质的量测定结果存在一定的误差^[9]。且不同生产厂家及批号的干酪素，其空白值有明显的差异，测定中应使用同批次的干酪素。

称取干酪素 600 mg，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入去离子水 25 mL，振荡 1 h，摇匀，滤过，准确量取滤液 2.0 mL，置 25 mL 棕色量瓶中，加入去离子水 8.0 mL，磷钼钨酸 1.0 mL，用 20% 碳酸钠溶液稀释至刻度，于 768 nm 处测定其 A 值。后续测定样品中不被吸附的多酚时，应同时制备此干酪素空白，不被吸附多酚测定的 A 值应扣除空白 A 值再进行计算。

2.6 壳聚糖复合絮凝剂工艺条件的优化

2.6.1 壳聚糖复合絮凝剂的制备工艺及用量 取 2 组 25 mL 比色管，分别准确吸取 B 组分 10 mL，加入不同量膨润土负载壳聚糖复合絮凝剂和经过 450

℃ 灼烧改性膨润土负载壳聚糖的复合絮凝剂，充分搅拌 10 min，静置 24 h 后用离心机 3 000 r/min 离心 10 min，滤过，滤液转移至 10 mL 比色管中，以去离子水定容至刻度。分别测定各滤液样品中鞣质和绿原酸的量，根据 B 组分中鞣质和绿原酸的量计算鞣质脱除率和绿原酸保留率，结果见表 1。可见，考察绿原酸保留率和鞣质脱除率 2 个指标，高温改性后的膨润土负载壳聚糖制得复合絮凝剂性能均较优。随着壳聚糖复合絮凝剂加入量的增加，鞣质脱除率逐渐增加，绿原酸保留率有一定的下降。当增加到 60 g/L 时，再增加絮凝剂用量，鞣质脱除增加不明显，但絮凝后澄清液的产率下降，绿原酸的量也降低。

$$\text{鞣质脱出率} = 1 - \frac{10 \text{ mL B 组分经絮凝后鞣质的量}}{10 \text{ mL B 组分鞣质总量}}$$

$$\text{绿原酸保留率} = \frac{10 \text{ mL B 组分经絮凝后绿原酸的量}}{10 \text{ mL B 组分绿原酸总量}}$$

对 A 组分进行同等的试验考察，同样得出经高温改性的膨润土负载壳聚糖制备的复合絮凝剂絮凝效果较好，絮凝剂的最佳用量也基本同于 B 组分。

表 1 壳聚糖复合絮凝剂用量对 B 组分絮凝效果的影响

Table 1 Effect of dosage of chitosan complex flocculant on flocculation effect of group B

絮凝剂用量 / (g·L ⁻¹)	鞣质脱除率 / %		绿原酸保留率 / %	
	膨润土负载壳聚糖	高温改性膨润土负载壳聚糖	膨润土负载壳聚糖	高温改性膨润土负载壳聚糖
20	51.93	55.12	67.85	71.84
40	52.51	64.80	63.10	68.64
50	56.62	65.47	62.46	67.56
60	69.90	79.88	60.13	66.44
70	70.36	81.10	59.78	65.54

综合以上各因素，后续试验均选取经高温改性膨润土制备的复合絮凝剂，用量为 60 g/L。

2.6.2 壳聚糖性能指标 对于 A、B 组分水提取液，期望通过壳聚糖复合絮凝剂絮凝后有效成分保留率和鞣质脱除率均越高越好。在壳聚糖复合絮凝剂的应用过程中，壳聚糖的主要性能指标，包括黏度和脱乙酰度，均对复合絮凝剂的絮凝效果产生直接影响。为了尽量客观反映 2 种性能指标对絮凝澄清效果的影响，实验中分别选取了相同脱乙酰度 (85%)，不同黏度壳聚糖系列；相同黏度 (60 cps)，不同脱乙酰度的壳聚糖系列。分别负载在高温改性膨润土上制备不同的复合絮凝剂，在固定絮凝剂用量为 60 g/L，絮凝时间为 24 h 的条件下，按照“2.4”项和

“2.5”项方法测定絮凝后澄清液中有效成分和鞣质的量。并以各絮凝工艺后有效成分保留率和鞣质脱除率为评价指标，采用综合加权评分法 (overall desirability, OD)^[10-12] 综合筛选壳聚糖最佳性能指标。综合加权评分法将有效成分绿原酸或黄芩苷保留率赋予系数 a，鞣质脱除率赋予系数 b，根据两者的相对重要程度，将绿原酸或黄芩苷保留率赋予权重系数为 0.6，鞣质脱除率赋予权重系数为 0.4，计算加权评分值，即：OD = (0.6 × a_i / a_{max} + 0.4 × b_i / b_{max}) × 100，a_{max} 和 b_{max} 选取壳聚糖性能指标试验的最大测定值。其中以 B 组分水提取液考察壳聚糖性能指标时，绿原酸保留率测定值最大为 66.44%，鞣质脱除率测定值最大为 79.88%；以 A 组分水提取

液考察壳聚糖性能指标时, 黄芩苷保留率测定值最大为 84.57%, 鞣质脱除率测定值最大为 65.86%。结果见表 2 和表 3。

由表 2 结果得出, 壳聚糖在相同脱乙酰度和黏度不太高 (≤ 188 cps) 的情况下, 随着黏度的增加, 鞣质脱除率逐渐下降, 绿原酸和黄芩苷保留率逐渐增加, 此种趋势与减少絮凝剂用量相同。可能是由于膨润土空隙结构疏松, 吸附性能较强, 在壳聚糖

黏度不太大, 即壳聚糖相对分子质量较低时, 与膨润土复合时占据更多的层间结构, 使得膨润土的吸附性能下降, 当黏度增加时, 壳聚糖分子数量减少, 壳聚糖的架桥功能未能得到体现, 复合絮凝剂的絮凝性能有所下降。当壳聚糖的黏度继续增大时, 壳聚糖的分子链增长, 架桥性能大大增强, 鞣质脱除效果提升。

由表 3 结果得出, 壳聚糖在相同黏度的情况下,

表 2 壳聚糖黏度 (85%脱乙酰度) 对双黄连水提液絮凝效果的影响

Table 2 Effect of viscosity of chitosan (85% deacetylation) on flocculation effect of Shuanghuanglian aqueous extract

黏度 / cps	A 组分		B 组分		OD	
	鞣质脱除率 / %	黄芩苷保留率 / %	鞣质脱除率 / %	绿原酸保留率 / %	A 组分	B 组分
60	57.71	76.41	65.44	66.09	89.26	84.64
95	56.32	77.20	59.71	71.93	88.98	86.36
188	50.43	79.86	42.32	75.62	87.29	80.55
415	61.25	76.59	74.10	65.74	91.54	88.71

表 3 壳聚糖脱乙酰度 (黏度 60 cps) 对双黄连水提液絮凝效果的影响

Table 3 Effect of deacetylation of chitosan (viscosity of 60 cps) on flocculation effect of Shuanghuanglian aqueous extract

脱乙酰度 / %	A 组分		B 组分		OD	
	鞣质脱除率 / %	黄芩苷保留率 / %	鞣质脱除率 / %	绿原酸保留率 / %	A 组分	B 组分
85	57.71	76.41	65.44	66.09	89.26	92.45
90	62.53	81.22	67.46	66.18	95.60	93.54
95	65.86	84.57	79.88	66.44	100.00	100.00

随着脱乙酰度的增加鞣质脱除率和绿原酸、黄芩苷保留率均有提升, 反映出高脱乙酰度的壳聚糖性能较优。

由以上实验结果得出, 膨润土经过高温改性后, 吸附性能得到很大改善, 负载壳聚糖制得的复合絮凝剂具有更好的选择性絮凝效果。所负载的壳聚糖在高脱乙酰度、高黏度时具有优良的絮凝性能。对现有购得的几种壳聚糖考察得出最佳性能参数为 95%脱乙酰度、黏度为 60 cps。

2.6.3 絮凝时间的影响 取一组 25mL 比色管, 分别准确吸取 B 组分 10 mL, 然后分别加入经过 450 °C 灼烧改性膨润土负载壳聚糖的复合絮凝剂 600 mg, 此壳聚糖性能指标为脱乙酰度 95%, 黏度 60 cps。充分搅拌 10 min, 静置不同时间后用离心机 3 000 r/min 离心 10 min, 滤过, 滤液转移至 10 mL 比色管, 以去离子水定容至刻度。测定各滤液样品中鞣质和绿原酸的量, 同时, 测定 B 组分中鞣质和绿原酸的量, 计算鞣质脱除率和绿原酸保留率, 结果见表 4。由表 4 结果得出, 随着时间的延长鞣质

表 4 壳聚糖复合絮凝剂絮凝时间的影响

Table 4 Effect of flocculating time of chitosan complex flocculant

絮凝时间 / h	鞣质脱除率 / %	绿原酸保留率 / %
0.5	62.86	64.26
2	67.47	64.09
4	75.20	63.22
6	78.84	61.66
8	78.82	61.05
12	78.89	63.08
16	79.01	65.89
20	79.16	66.15
24	79.88	66.44

脱除率逐渐增加, 绿原酸保留率随着时间的延长会稍有降低, 但是在放置 8 h 后, 会有一部分再次回到溶液中, 保留率有所升高, 可能是由于绿原酸被复合絮凝剂的吸附和溶液的溶解存在动态平衡, 在放置 24 h 时达到最佳值。另取一组 25 mL 比色管, 分别准确吸取 A 组分 10 mL, 同等絮凝条件下, 以

黄芩苷保留率和鞣质脱除率为评价指标,对絮凝时间的影响进行考察。试验结果发现絮凝时间的影响趋势与B组分结果相似。

结合鞣质脱除和有效成分的保留情况,选取絮凝时间为24 h。

综合前述实验结果,复合絮凝剂最佳处理工艺:壳聚糖的最佳性能指标为95%脱乙酰度、黏度60 cps;膨润土经450℃灼烧改性后负载壳聚糖;复合絮凝剂用量为60 g/L;絮凝时间24 h。

2.6.4 壳聚糖复合絮凝剂工艺与《中国药典》2010年版方法结果比较 将以上优化絮凝条件应用于B组分的絮凝,并将结果与《中国药典》2010年版一部的醇沉工艺方法相比较,结果见表5。

将此最佳絮凝条件用于黄芩水提取液A组分的絮凝澄清,并将结果与《中国药典》2010年版一部的酸沉纯化工艺进行比较。此组对比试验中, a_{max} 为84.57%, b_{max} 为78.41%,结果见表6。

表5 金银花十连翘水提取液2种澄清工艺比较

Table 5 Comparison on two flocculation processes of aqueous extract of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus*

工艺方法	鞣质脱除率 / %	绿原酸保留率 / %	OD
醇沉工艺 ^[7]	24.50	61.43	67.74
壳聚糖复合絮凝剂絮凝	79.88	66.44	100.00

表6 黄芩水提取液2种澄清工艺比较

Table 6 Comparison on two flocculation processes of aqueous extract of *Scutellariae Radix*

工艺方法	鞣质脱除率 / %	黄芩苷保留率 / %	OD
酸沉工艺 ^[7]	78.41	50.92	76.12
壳聚糖复合絮凝剂絮凝	65.86	84.57	93.60

由表5、6的结果可以得出,采用壳聚糖复合絮凝剂对双黄连水提取液进行絮凝澄清,综合鞣质脱除率和有效成分保留率比《中国药典》2010年版方法有明显的优势。

3 讨论

壳聚糖复合絮凝剂能选择性地除去双黄连水提取液中鞣质、胶质、蛋白质等杂质,本实验选择鞣

质作为评价除杂效果的指标,同时,为了减少有效成分的损失,又选取有效成分绿原酸和黄芩苷保留率作为另一指标进行综合评价,根据两者的重要程度分别给定一个权重系数,引入了OD这一概念,这样方便地将不同的考察对象转变成1个数值,可以在优化选择性絮凝工艺条件时得出更为客观合理的结论。

本实验考察了壳聚糖的脱乙酰度和黏度对复合絮凝剂絮凝效果的影响,得出高脱乙酰度时复合絮凝剂体现出优良的选择性絮凝效果,有效成分保留率高,鞣质脱除率也高。壳聚糖黏度的影响较为复杂,从综合评分来看,当壳聚糖黏度高,即壳聚糖相对分子质量足够高时,选择性絮凝效果可能更佳,由于实验过程中未购得脱乙酰度为95%的高黏度的壳聚糖,所以,以上结果还有待进一步验证。

参考文献

- [1] 杜英峰,张兰桐,靳怡然,等.多波长RP-HPLC法定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸和连翘苷[J].中成药,2009,31(9):1368-1371.
- [2] 周雪梦,陆春妮,元文宝,等.清开灵和双黄连口服液体内抗禽流感病毒作用[J].中草药,2011,42(7):1351-1356.
- [3] 苏广宇,刘四新,李从发.甲壳素/壳聚糖的研究与应用概况[J].广东农业科学,2008(2):107-109.
- [4] 周闻舞,顾海铮.壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究[J].药物评价研究,2010,33(4):290-295.
- [5] 陈天明,王世和,许琦,等.膨润土负载壳聚糖吸附剂对苯酚的吸附性能研究[J].化工时刊,2006,20(7):1-3.
- [6] 白研,李静,苏政权.壳聚糖复合絮凝剂处理玉屏风口口服液的工艺研究[J].时珍国医国药,2012,23(12):3058-3060.
- [7] 中国药典[S].一部.2010.
- [8] 曾莹,吴峰,周本宏.磷钼钨酸-干酪素法测定石榴皮中总鞣质含量[J].中国药师,2010,13(12):1775-1776.
- [9] 谢道刚,宋光志,刘静.鞣质含量测定法(中国药典2005年版第一部附录XB)方法学验证[J].世界科学技术—中医药现代化,2006,8(6):51-53.
- [10] 王冰,宋崎,周小初,等.综合加权评分法优化山萸肉蒸制工艺[J].中成药,2008,30(10):1486-1488.
- [11] 陈敬,温庆果,刘韶,等.正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究[J].中草药,2012,43(11):2183-2188.
- [12] 王冬梅,吕振江,王永红,等.多指标综合评价玉竹蜜蒸炮制工艺研究[J].中草药,2012,43(10):1934-1938.