

以壳聚糖为絮凝剂的消炎退热颗粒原药水提液絮凝效果研究

李桂水, 陶思佚, 程丽君, 李 毅, 王星天

天津科技大学机械工程学院 天津市轻工与食品工程机械装备集成设计与在线监控重点实验室, 天津 300222

摘要: 目的 采用絮凝技术优化消炎退热颗粒原药水提液除杂净化工艺, 保留有效成分的同时去除更多杂质, 提高原药水提液的澄清度。方法 明确消炎退热颗粒原药水提液中杂质的成分后, 通过筛选絮凝剂的实验, 确定了采用壳聚糖絮凝剂对原药水提液进行絮凝除杂。针对以消炎退热颗粒原药水提液中有效成分秦皮乙素的保留率, 杂质成分蛋白质和鞣质的去除率以及絮凝处理后药液上清液的浊度作为研究指标, 分别研究考察了壳聚糖絮凝剂的配比及用量、絮凝温度、絮凝快搅速度及快搅时间对絮凝整体效果的影响。结果 通过实验得出壳聚糖作为絮凝剂用于消炎退热颗粒原药水提液除杂净化的最佳絮凝工艺条件为壳聚糖加入量 1.25 g/L, 絮凝温度为 40 ℃, 快搅速度为 350 r/min, 快搅时间为 3 min。该条件下有效成分秦皮乙素的保留率为 88.92%, 蛋白质和鞣质的去除率分别为 62.96%和 67.19%, 絮凝后药液静置 24 h 后浊度为 5.0 NTU。结论 壳聚糖作为絮凝剂用于消炎退热颗粒原药水提液的除杂净化, 能有效提高药液中杂质的去除率, 同时能提高药液的澄清度。

关键词: 消炎退热颗粒; 絮凝; 壳聚糖; 秦皮乙素; 蛋白质; 鞣质; 浊度

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)23-3507-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.011

Flocculation effect of chitosan flocculant on water-extraction solution of Xiaoyan Tuire Granules Oral Liquid

LI Gui-shui, TAO Si-yi, CHENG Li-jun, LI Yi, WANG Xing-tian

Tianjin Key Laboratory of Integrated Design and On-line Monitoring for Light Industry & Food Machinery and Equipment, College of Mechanical Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China

Abstract: Objective To optimize the purifying process of water-extraction solution of Xiaoyan Tuire Granules Oral Liquid by flocculation clarifying method, reserve more active components while less impurities, and improve the clarity of oral liquid. **Methods** After clearing out the impurities composition of water-extraction solution of Xiaoyan Tuire Granules Oral Liquid, the flocculant of chitosan chosen by screening test was used to analyze the flocculation effect. The retention rate of aesculetin, the removal rate of impurity, and supernatant turbidity were set as mainly indexes to estimate the influence of the dosage of flocculant, temperature, fast mixing speed, and fast mixing time. **Results** The optimal flocculating process conditions which were analyzed by experiments were as follows: the dosage of chitosan was 1.25 g/L, the flocculation temperature was 40 ℃, the fast mixing speed was 350 r/min, and the fast mixing time was 3 min. Under these conditions, the retention rate of aesculetin was 88.92%, the removal rates of protein and tanning were 62.96% and 67.19%, the supernatant turbidity was 5.0 NTU after the oral liquid was flocculated for 24 h. **Conclusion** Using chitosan as flocculant in the water-extraction solution of Xiaoyan Tuire Granules Oral Liquid, it could improve the removal rate of impurities effectively as well as keep higher active components and enhance the clarity of oral liquid.

Key words: Xiaoyan Tuire Granules; flocculation; chitosan; aesculetin; protein; tanning; turbidity

消炎退热颗粒具有清热解毒、凉血消肿之功效, 主要用于风热感冒症见发热、外感热病、上呼吸道感染、热毒壅盛、咽喉肿痛及各种疮疖肿痛等症状。该复方由大青叶、蒲公英、紫花地丁、甘草 4 味中药组成^[1]。由于复方中药水提液是由不同种类中药

混合煎制所得, 煎药所得水提液中会含有大量的蛋白质及鞣质等成分, 而根据相关文献资料研究可知, 鞣质又称单宁, 是一种多酚中高度聚合化合物, 鞣质分子上带有很多强还原性的酚羟基, 极易被氧化, 如遇多糖、生物碱、蛋白质等物质, 会与其生成氢

收稿日期: 2015-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21276195)

作者简介: 李桂水, 男, 硕士, 副教授, 研究方向为固液分离及水处理技术。E-mail: liguishui@tust.edu.cn

键而结合成不溶于水的沉淀,从而使中药水提液浑浊不稳定,蛋白质在药液中也容易腐败变质,影响中药的药性和储藏^[2]。

目前,消炎退热颗粒的生产工艺仍是水提醇沉法^[3],但是经过实验研究表明,对中药水提液进行水提醇沉来分离除杂会造成较多有效成分的流失,在除杂的同时一并去除了很多高分子化合物以及人体新陈代谢所需的微量元素,并且水作为溶剂,溶解范围广,以水为溶剂提取中药,会提取出很多无用的成分,从而使得同等剂量下的中药中的有效成分含量降低,药效下降。加之水提醇沉工艺乙醇用量大,虽可回收乙醇但回收率低,药液生产周期长^[4]。现代中药生产正在探索新的方法来替代水提醇沉工艺。天然高分子絮凝剂壳聚糖作为目前发现的唯一1种天然碱性多糖,应用到中药水提液的分离除杂方面,主要有以下几点优点:(1)壳聚糖的安全性好,生物相容性好,易被生物降解,且壳聚糖降解后无毒副作用;(2)壳聚糖具有增强免疫、调血脂和降血压的作用;(3)壳聚糖及其衍生物对重金属离子的螯合性,具有抗菌抗癌,促进伤口愈合等作用^[1,5-8]。并且由相关资料了解可知,中药水提液中富含大量的糖类、无机盐等较强吸潮性的成分,特别是经过醇沉工艺后的浸膏更加容易吸潮,使得在生产固体或颗粒中药制剂时对制剂成型有所影响,而采用絮凝工艺来除杂净化中药提取液,能很大程度减少此类成分的量,净化后的水提液易干燥,不容易吸潮,对后续固体制剂的加工会有比较好的稳定性^[7]。

基于壳聚糖絮凝剂在絮凝过程中的种种优点以及经过后续的絮凝剂筛选实验的进一步确定,本实验采用壳聚糖作为絮凝剂对消炎退热颗粒中药水提液进行絮凝除杂净化研究,以有效成分秦皮乙素保留率,杂质成分鞣质和蛋白质的去除率以及除杂净化后静置的上清液浊度作为主要考察指标,研究了壳聚糖用于此种复方中药的絮凝除杂效果,确定出壳聚糖絮凝剂对此种复方中药的最佳絮凝工艺。

1 仪器与材料

WH-S 智能型混凝式搅拌机,天津市威华仪器设备有限公司;722 紫外/可见分光光度计,上海菁华仪器有限公司;分析天平 TD12001,奥豪斯国际贸易有限公司;SC-15 高温循环水浴箱,上海比朗仪器有限公司;Agilent1200 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;WGZ-100 散射式光电浊度仪,上

海珊科学仪器厂;DS-3510DT 超声波振荡器,上海生析超声仪器有限公司。

干药材大青叶(批号 140401)为十字花科大青属植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶、蒲公英(批号 140801)为菊科蒲公英属植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草、紫花地丁(批号 141001)为堇菜科植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草、甘草(批号 140201)为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎,均购自河北安国市中天中药饮片有限公司,经安国市中天中药饮片公司药剂师焦玉军鉴定均合格。

壳聚糖,脱乙酰度 90.45%,浙江金壳药业有限公司;秦皮乙素对照品(批号 BW5140-20130416,质量分数≥98%)、蛋白质对照品(批号 BW3627-20141230,质量分数≥98%),北京北化恒信生物技术有限公司;没食子酸对照品(批号 110831-201204,质量分数≥99%),天津市大茂化学试剂厂。实验过程中所用的水均为去离子水,甲醇、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 消炎退热颗粒原药水提液的制备

根据《中国药典》2010 年版消炎退热颗粒处方中的比例^[1](大青叶-蒲公英-紫花地丁-甘草 8:8:3:1)分别称取大青叶 120 g、蒲公英 120 g、紫花地丁 45 g、甘草 15 g,添加去离子水煎煮 2 次。第 1 次添加 10 倍的去离子水即 3 000 mL,煎煮 1 h,双层纱布滤过药液;然后再添加 8 倍的去离子水即 2 400 mL 继续煎煮 1 h,双层纱布滤过;将 2 次所得药液合并并定容至 3 000 mL,得到质量浓度为 0.1 g/L 的药液,按药液体积的 0.3%添加苯甲酸钠防腐剂 9 g,并在 20 ℃以下储藏,备用。

2.2 絮凝剂的制备

准备 1 个 500 mL 量瓶,向其中添加精确称取的 5 g 壳聚糖,并向其中添加质量分数为 1%的冰醋酸溶液 5 mL,然后用去离子水定容至 500 mL,溶胀 24 h,备用。

2.3 有效成分秦皮乙素的测定

根据《中国药典》2010 年版的规定,消炎退热颗粒每袋含紫花地丁以秦皮乙素($C_9H_6O_4$)计,不得少于 0.3 mg^[1]。因此秦皮乙素是衡量消炎退热颗粒药效的 1 个重要指标,通过 HPLC 方法对消炎退热颗粒水提液中秦皮乙素的量进行测定。

2.3.1 色谱条件 C_{18} 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 10 μ m), 以甲醇-水-冰醋酸 (20:80:0.5) 为流动相, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 353 nm, 柱温为室温, 理论板数按秦皮乙素峰值计算应不低于 3 000^[1]。

2.3.2 对照品溶液的制备及标准曲线的绘制 精密称取质量分数为 98% 秦皮乙素对照品 17.9 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 添加甲醇 (色谱纯) 至刻度线, 配得对照品溶液的质量浓度为 175.42 μ g/mL, 分别取 1、2、3、4、5、6 mL 对照品溶液并分别用甲醇定容至 10 mL, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 然后超声震荡 30 min, 分别进样 10 μ L 不同质量浓度的秦皮乙素对照品溶液, 测定峰面积, 记录相关数据和色谱图, 以峰面积对秦皮乙素进样量进行线性回归, 得回归方程为 $Y=40.838\ 11\ X-28.503\ 57$, $r^2=0.999\ 7$, 秦皮乙素在 17.542~105.252 μ g/mL 线性关系良好。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取消炎退热颗粒原药水提液 1 mL 于 10 mL 试管, 用甲醇定容至 10 mL, 然后用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 然后超声震荡 30 min。

2.3.4 样品测定 分别精密量取上述配制的对照品和供试品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪中测定峰面积, 然后从秦皮乙素标准曲线中计算秦皮乙素的量, 按以下公式可以计算出秦皮乙素保留率。

秦皮乙素保留率 = 样品中秦皮乙素的量 / 原药液中秦皮乙素的量

2.4 蛋白质及鞣质量的测定

本研究中采用《中国药典》二部附录 VII M 考马斯亮蓝法 (Bradford 法)^[2] 测定蛋白质的量, 采用考马斯亮蓝 G-250 试剂为蛋白质染色, 以事先配好的空白对照品为对照, 用紫外/可见光光度计在 595 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 然后通过比对蛋白质的量的标准曲线来测定中药水提液中蛋白质的量。蛋白质的去除率可按以下公式进行计算。

蛋白质去除率 = $1 - \text{样品中蛋白质的量} / \text{原药液中蛋白质的量}$

通过对蛋白质标准品的测定, 以 A 值对蛋白质进样量进行线性回归, 回归方程为 $Y=0.003\ 58\ X+0.006\ 72$, $r^2=0.995\ 8$, 蛋白质在 10~80 μ g/mL 线性关系良好。

在本研究中采用《中国药典》2010 年版附录 XB 鞣质定量测定法规定的磷钼钨酸比色法测定^[1],

以磷钼钨酸为显色剂, 以干酪素作为吸附剂, 以没食子酸为对照品, 用紫外/可见光光度计在 760 nm 波长处以空白为对照测定 A 值, 然后从鞣质标准曲线上反读出鞣质的量。鞣质的去除率可按以下公式进行计算。

鞣质的量 = 总酚的量 - 不被吸附的多酚的量

鞣质去除率 = $1 - \text{样品中鞣质的量} / \text{原药液中鞣质的量}$

通过对鞣质标准品的测定, 以 A 值对没食子酸进样量进行线性回归, 回归方程为 $Y=4.441\ 23\ X+0.055\ 01$, $r^2=0.994\ 0$, 鞣质在 0.025~0.25 mg/mL 线性关系良好。

2.5 浊度的测量

采用散射式光电浊度仪对絮凝后消炎退热颗粒原药水提液的上清液浊度进行测量。

2.6 壳聚糖用于消炎退热颗粒原药水提液絮凝除杂工艺的研究

中药原药水提液絮凝除杂净化的效果主要取决于絮凝剂种类及用量、絮凝反应温度、絮凝搅拌速度及时间。首先对目前 8 种常用的中药絮凝剂 (壳聚糖、壳聚糖季铵盐、壳聚糖盐酸盐、羧甲基壳聚糖、单宁、明胶、卡拉胶、海藻酸钠) 进行了絮凝剂的初选实验。从实验现象的观察来看, 壳聚糖、壳聚糖季铵盐以及壳聚糖盐酸盐较其他絮凝剂均表现出了絮凝反应后产生大量细小的絮体, 药液分层明显, 上清液颜色透亮, 澄清度较高等优点, 再通过对其上清液中有效成分及杂质还有浊度的测定比较后, 尤以壳聚糖以较高的有效成分保留率及较高的杂质去除率及接近纯水的浊度值 (1.0 NTU) 较为突出, 因此本实验采用壳聚糖对消炎退热颗粒原药水提液进行絮凝除杂净化。

2.6.1 絮凝剂用量对中药原药水提液絮凝效果的影响研究 按之前的步骤制备消炎退热颗粒原药水提液, 通过查阅冯颖等^[9]以及刘杰等^[10]对絮凝剂用于中药水提液絮凝除杂研究的文献记载, 在絮凝剂用量、絮凝温度、搅拌速度及搅拌时间的可选范围内, 按表 1 设计絮凝剂用量实验, 絮凝温度初选 30 $^{\circ}$ C、快搅速度 450 r/min、快搅时间 2 min、慢搅速度 50 r/min、慢搅时间 10 min。由表 1 中的数据可以看出, 当絮凝剂添加量很少的时候, 有效成分的保留率很高, 蛋白质及鞣质 2 种杂质的去除率很低, 上清液的浊度值很高; 随着壳聚糖絮凝剂的添加量的增多, 上清液的有效成分秦皮乙素保留率基本呈现出逐渐减小的趋势, 而蛋白质和鞣质的去除率呈现出先增

表1 壳聚糖添加量对中药水提液絮凝效果的影响

Table 1 Effect of chitosan dose on oral liquid flocculation impurity removal indexes

絮凝剂用量/ (g·L ⁻¹)	秦皮乙素 保留率/%	蛋白质去 除率/%	鞣质去 除率/%	浊度/ NTU
0.25	94.24	24.95	18.43	>200.0
0.50	94.84	45.44	32.83	37.0
0.75	89.98	53.65	47.18	10.7
1.00	90.56	58.36	42.80	5.2
1.25	89.17	62.56	50.65	6.7
1.50	80.89	63.71	46.27	22.7
1.75	83.51	56.07	44.40	138.2
2.00	80.23	53.84	40.33	171.8

大后减小的趋势，上清液的浊度值呈现出先迅速减小，然后逐步增大的趋势。

由于壳聚糖是一种天然碱性多糖，呈弱碱性，其分子链上含有大量的游离羟基及氨基活性官能团，而在本实验中配制壳聚糖絮凝剂时添加 1%冰醋酸溶液，其分子链上的活性官能团氨基会被质子化为-NH₃⁺，使得壳聚糖成为一种可溶性的阳离子有机聚电解质^[10-11]。因此向原药水提液中添加壳聚糖絮凝剂会与药液中带负电荷的杂质分子发生电中和反应^[3]，同时壳聚糖的线状分子与杂质微粒间实现多点架桥吸附作用^[11]，从而使得杂质分子絮凝成大絮团而依靠重力沉降下来，从而起到絮凝澄清的效果。最开始絮凝剂的添加量很少，絮凝剂分子与杂质颗粒的碰撞结合几率很小，因此药液中的大部分悬浮微粒及胶体颗粒不能有效的电中和及吸附架桥反应，药液整体呈现出较浑浊的状态；随着絮凝剂用量的增加，大量絮凝剂分子同杂质分子进行电中和和网捕卷扫吸附结合，大块絮团开始明显的产生，通过重力沉降使药液的澄清度明显提高；但随着絮凝剂用量的过度添加，药液的澄清度大幅度下降。综合实验研究可以得出，壳聚糖用于消炎退热颗粒的原药水提液的最佳絮凝剂添加量为 0.75~1.50 g/L，其中 1.25 g/L 的絮凝剂添加量效果比较好。

2.6.2 絮凝温度对絮凝效果的影响 在确定了絮凝剂添加量为 1.25 g/L 的情况下，进一步考察温度对原药水提液絮凝效果的影响。按相同的步骤制备消炎退热颗粒原药水提液，絮凝剂添加量选择 1.25 g/L，按表 2 设计絮凝温度实验，快搅速度 450 r/min，快搅时间 2 min，慢搅速度 50 r/min，慢搅时间 10

min。由表 2 中的数据可以看出，随着温度的逐渐升高，有效成分的保留率基本没有太大的波动变化，蛋白质及鞣质的去除率有逐渐升高的趋势，药液的浊度值逐渐降低，药液澄清度有所提高；但是随着絮凝温度的过度升高，药液的有效成分秦皮乙素保留率总体上有所提高，蛋白质及鞣质的去除率有比较明显的下降，药液的浊度值也大幅提升，药液澄清度明显下降。

表2 絮凝温度对中药水提液絮凝效果的影响

Table 2 Effect of flocculating temperature on oral liquid flocculation impurity removal indexes

絮凝温度/ ℃	秦皮乙素 保留率/%	蛋白质去 除率/%	鞣质去 除率/%	浊度/ NTU
20	90.55	62.90	51.43	8.5
25	89.83	63.03	52.30	6.0
30	90.76	64.04	50.84	3.7
35	88.23	62.77	53.45	3.5
40	90.31	61.94	60.93	2.0
45	89.96	59.17	56.89	6.8
50	90.70	57.21	58.91	24.9
55	88.65	56.83	53.73	25.7
60	95.33	55.37	43.67	31.2

随着温度的增加，颗粒间的布朗运动逐渐变得剧烈起来，絮凝剂分子与药液中的颗粒间碰撞的几率变大，使得颗粒间发生电中和及吸附架桥的作用增强，因此蛋白质及鞣质的去除率得以提升；同时随着温度的升高，药液的黏度逐渐降低，颗粒沉降所受的阻力逐渐减小，颗粒相互吸附后能迅速沉降，因此能很明显的看到药液的澄清度大幅提升。但是过高的温度会使得絮凝剂分子失活老化甚至变性丧失絮凝效果，从而使得絮凝过程无法继续进行。同时由于高温使得药液的黏度变得很低，降低了絮体与颗粒的碰撞几率。因此，综合比较药液中有效成分的保留率及杂质的去除率以及药液浊度后，壳聚糖用于消炎退热颗粒原药水提液的最佳絮凝温度为 30~45 ℃，其中 40 ℃ 的絮凝温度效果比较好。

2.6.3 快搅速度对絮凝效果的影响 由于絮凝效果的好坏直接取决于絮凝剂分子与水提液中杂质分子之间的吸附架桥网捕卷扫的程度，而良好的水利条件对絮凝反应过程中吸附架桥网捕卷扫反应起着至关重要的作用。在中药水提液絮凝除杂的过程中，慢搅过程主要是使得已产生的絮体稳定沉降的过

程,快搅过程的水利条件相较于慢搅过程对整个絮凝反应的效果起着更加至关重要的作用。因此在确定了絮凝剂添加量为 1.25 g/L,絮凝反应的温度为 40 ℃的情况下,进一步考察快搅速度对原药水提液絮凝效果的影响。按相同的步骤制备消炎退热颗粒原药水提液,絮凝剂添加量选择 1.25 g/L,絮凝温度为 40 ℃,按表 3 设计絮凝快搅速度实验,快搅时间 2 min,慢搅速度 50 r/min,慢搅时间 10 min。

由表 3 中的数据可以看出,随着快搅速度的逐渐升高,有效成分秦皮乙素的保留率呈现比较明显的降低趋势,蛋白质及鞣质的去除率呈现先逐渐升高再降低的趋势,药液的浊度值呈现先降低后升高,药液由浑浊到澄清再到浑浊。

表 3 快搅速度对中药水提液絮凝效果的影响

Table 3 Effect of fast mixing speed on oral liquid flocculation impurity removal indexes

絮凝快搅速度/(r·min ⁻¹)	秦皮乙素保留率/%	蛋白质去除率/%	鞣质去除率/%	浊度/NTU
150	88.34	56.70	52.53	21.6
250	86.82	57.52	50.15	18.0
350	85.41	59.68	50.15	13.7
450	86.82	62.29	61.20	6.2
550	81.66	60.00	61.79	8.3
650	82.22	58.79	52.82	14.4

由实验数据分析可知,随着快搅速度的提高,絮凝剂的分散会比较均匀,比较有利于强度大体相同的絮体的产生,絮凝效果比较好;当快搅速度过快的时候,刚刚产生的不稳定絮体在高速叶片产生的强力剪切力作用下会被再次撕裂,从而变成细小的悬浮絮体,这些絮体难以克服自身的重力而沉降,从而导致在搅拌结束后药液静置数小时都不能使得药液上清液澄清。综合比较药液中有效成分的保留率及杂质的去除率以及药液浊度后,壳聚糖用于消炎退热颗粒的原药水提液的最佳絮凝快搅速度为 350~450 r/min,其中 450 r/min 的快搅速度絮凝效果比较好。

2.6.4 快搅时间对絮凝效果的影响 快搅过程的水利条件对整个絮凝过程的絮凝效果好坏有着至关重要的影响,而水利条件除了搅拌速度以外,搅拌的时间也是很重要的一个因素。因此在确定了絮凝剂添加量为 1.25 g/L,絮凝反应的温度为 40 ℃,快搅速度为 450 r/min 的情况下,进一步考察快搅时间对

原药水提液絮凝效果的影响。按相同的步骤制备消炎退热颗粒原药水提液,絮凝剂添加量选择 1.25 g/L,絮凝温度为 40 ℃,快搅速度为 450 r/min,按表 4 设计絮凝快搅时间实验,慢搅速度 50 r/min,慢搅时间 10 min。

由表 4 中的数据可以看出,随着快搅时间的逐渐升高,有效成分的保留率呈现逐渐降低的趋势之后随着搅拌时间的延长,形成的絮体在外力的作用下再次破碎,使得药液中的有效成分有略微的提升,蛋白质及鞣质的去除率呈现先升高再降低的趋势,药液的浊度值在快搅时间为 2 min 的时候呈现明显的降低趋势,药液澄清度大幅提高,之后的变化不是很明显。

表 4 快搅时间对中药水提液絮凝效果的影响

Table 4 Effect of fast mixing time on oral liquid flocculation impurity removal indexes

絮凝快搅时间/min	秦皮乙素保留率/%	蛋白质去除率/%	鞣质去除率/%	浊度/NTU
1	91.71	55.55	57.62	11.3
2	92.38	60.46	60.82	2.4
3	88.40	57.77	57.31	1.4
4	92.32	56.69	50.90	1.2
5	95.89	54.94	41.83	1.1
6	92.96	57.36	47.39	0.7

由实验数据分析可知,快搅时间过短或过长都会对絮凝反应的效果有很明显的影响。快搅搅拌时间太短,不利于絮凝剂在药液当中的分散,使得絮凝反应进行的不充分,絮凝效果不理想;快搅搅拌时间过长,刚刚形成的不稳定絮体在长时间的搅拌剪切力作用下会被扯裂破碎,使得絮凝效果变差。因此综合比较药液中有效成分的保留率及杂质的去除率以及药液浊度后,壳聚糖用于消炎退热颗粒的原药水提液的最佳絮凝快搅时间为 1~3 min,其中 2 min 的快搅时间絮凝效果比较好。

2.6.5 正交试验 通过之前实验研究的几个对絮凝过程影响产生比较关键性作用的因素后,确定出絮凝剂用量(A)、絮凝温度(B)、快搅速度(C)、快搅时间(D)4个因素是影响壳聚糖絮凝效果的主要因素,然后进行正交试验来确定这4个因素的最优组合。实验过程中慢搅速度均设定为 50 r/min,慢搅时间均设定为 10 min。设计正交试验,结果见表 5~7。

表5 正交试验设计与结果

Table 5 Design and results of orthogonal test

序号	A/(g·L ⁻¹)	B/℃	C/(r·min ⁻¹)	D/min	秦皮乙素保留率/%	蛋白质去除率/%	鞣质去除率/%	浊度/NTU
1	0.75 (1)	30 (1)	350 (1)	1 (1)	90.81	52.94	44.80	13.9
2	0.75 (1)	40 (2)	450 (2)	2 (2)	98.14	50.15	50.63	21.3
3	0.75 (1)	45 (3)	550 (3)	3 (3)	96.65	50.47	59.84	25.7
4	1.00 (2)	30 (1)	450 (2)	3 (3)	93.67	58.96	58.28	0.7
5	1.00 (2)	40 (2)	550 (3)	1 (1)	90.44	58.33	60.74	5.5
6	1.00 (2)	45 (3)	350 (1)	2 (2)	92.11	60.42	62.29	4.6
7	1.25 (3)	30 (1)	550 (3)	2 (2)	89.32	62.58	63.49	1.9
8	1.25 (3)	40 (2)	350 (1)	3 (3)	88.92	62.96	67.19	5.0
9	1.25 (3)	45 (3)	450 (2)	1 (1)	89.32	62.58	66.27	20.7

表6 直观分析

Table 6 Intuitive analysis

水平	秦皮乙素保留率				蛋白质去除率				鞣质去除率				浊度			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁	285.60	273.80	271.84	270.57	153.56	174.48	176.32	173.85	155.27	166.57	174.28	171.81	60.9	16.5	23.5	40.1
K ₂	276.22	277.50	281.13	279.57	177.71	171.44	171.69	173.15	181.31	178.56	175.18	176.41	10.8	31.8	42.7	27.8
K ₃	267.56	278.08	276.41	279.24	188.12	173.47	171.38	172.39	196.95	188.40	184.07	185.31	27.6	51.0	33.1	31.4
R	18.04	4.28	9.29	9.00	34.56	3.04	4.94	1.46	41.68	21.83	9.79	13.50	50.1	34.5	19.2	12.3

表7 方差分析

Table 7 Variance analysis

方差来源	自由度	秦皮乙素保留率		蛋白质去除率		鞣质去除率		浊度	
		离差平方和	F 值	离差平方和	F 值	离差平方和	F 值	离差平方和	F 值
A	2	54.269	15.100	209.554	590.293	295.546	15.140	433.460	16.259
B	2	3.594	1.000	1.598	4.501	79.682	4.082	199.220	7.473
C	2	14.385	4.003	5.104	14.377	19.521	1.000	61.440	2.305
D	2	17.364	4.831	0.355	1.000	31.402	1.609	26.660	1.000

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

根据秦皮乙素保留率的直观分析及方差分析可知, 各因素对其影响均不具有显著性, 各因素对其影响程度为 A>C>D>B, 最佳搭配为 A₁B₃C₂D₂; 根据蛋白质去除率的直观分析及方差分析可知, A 因素对其影响具有极显著性, 其余因素均不具有显著性, 各因素对其影响程度为 A>C>B>D, 最佳搭配为 A₃B₁C₁D₁; 根据鞣质去除率的直观分析及方差分析可知, 各因素对其影响均不具有显著性, 各因素对其影响程度为 A>B>D>C, 最佳搭配为 A₃B₃C₃D₃; 根据上清液浊度的直观分析及方差分析可知, 各因素对其影响均不具有显著性, 各因素对其影响程度为 A>B>C>D, 最佳搭配为 A₂B₁C₁D₂。

综合 A、B、C、D 4 个因素对絮凝实验效果的影响, 正交试验的第 8 组絮凝参数, 即壳聚糖添加量为 1.25 g/L, 絮凝反应温度为 40 ℃, 快搅速度为 350 r/min, 快搅时间为 3 min, 慢搅速度为 50 r/min, 慢搅时间为 10 min 时絮凝效果最好。在该条件下处理后的药液秦皮乙素保留率高达 88.92%, 蛋白质去除率高达 62.96%, 鞣质的去除率高达 67.19%, 药液的浊度为 5.0 NTU。在此最佳絮凝工艺参数下, 分别在相同的实验条件下进行了 3 个批次的重复性验证实验, 结果见表 8。

3 讨论

通过絮凝工艺对消炎退热颗粒原药水提液除杂纯化的研究中发现, 采用壳聚糖作为絮凝剂在絮凝

表8 验证试验

Table 8 Validation test

批次	秦皮乙素/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		秦皮乙素 保留率/%	蛋白质/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		蛋白质去 除率/%	鞣质/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		鞣质去除 率/%	浊度/NTU	
	水提液	纯化后		水提液	纯化后		水提液	纯化后		水提液	纯化后
第1批	78.873 3	69.862 1	88.58	440.581 0	164.603 4	62.64	367.0	122.7	66.57	>200	5.8
第2批	77.840 9	70.009 0	89.94	438.882 7	166.279 3	62.11	377.1	123.8	67.17	>200	6.2
第3批	78.204 7	69.690 7	89.11	439.463 7	167.396 6	61.91	364.3	135.1	62.92	>200	7.1

剂添加量为 1.25 g/L, 絮凝温度为 40 °C, 快搅速度为 350 r/min, 快搅时间为 3 min 的絮凝条件下, 分离纯化后的药液中有有效成分秦皮乙素的保留率为 88.92%, 蛋白质和鞣质的去除率分别为 62.96% 和 67.19%, 絮凝后药液静置 24 h 后浊度为 5.0 NTU, 在药液有效成分保留率较高的情况下, 较大程度的去除了影响药液品质的杂质成分, 药液的澄清度以及稳定性有明显的提升。因此采用壳聚糖作为絮凝剂分离纯化消炎退热颗粒原药水提液具有较好效果, 处理后的药液中有有效成分保留率、杂质成分去除率以及药液澄清度均表现出较佳的除杂效果, 提高了原药液的利用率。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 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.
- [3] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 1991.
- [4] 张忠国, 康 勇, 冯 颖. 絮凝技术在中药提纯中的应用 [J]. 化学工业与工程, 2003, 20(6): 377-386.
- [5] 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.
- [6] 王龙虎, 吴国良, 程翼宇. 壳聚糖及其衍生物在中药制药工业中的应用 [J]. 2004, 29(4): 289-291.
- [7] 倪天庆, 胡思源. 甲壳素及其衍生物壳聚糖的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(3): 313-316.
- [8] 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.
- [9] 冯 颖, 张天阳. 壳聚糖絮凝中药水提液的温度效应 [J]. 沈阳化工大学学报, 2012, 26(3): 206-209.
- [10] 刘 杰, 孙 娇. 复配絮凝剂用于小儿咳喘灵原药水提液絮凝效果研究 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2246-2251.
- [11] 谢 安, 周文龙, 杨顺龙. 驴胶补血颗粒的壳聚糖纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 906-908.