

# 壳聚糖纯化车前草水提液的研究

廖春燕<sup>1</sup>, 黄敏<sup>2</sup>, 黄瑶<sup>1</sup>, 贲贵妹<sup>1</sup>

(1. 广西工学院 生物与化学工程系, 广西 柳州 545006;

2. 广东轻工职业技术学院 食品与生物工程系, 广东 广州 510300)

**摘要:** 为了优化壳聚糖对车前草水提液的纯化工艺, 以多糖损失率、蛋白质去除率和脱色率为指标, 通过单因素试验和正交试验, 分别考察了壳聚糖用量、溶液 pH 值、絮凝温度、絮凝时间对纯化效果的影响。结果表明, 壳聚糖纯化车前草水提液的优化工艺为: 壳聚糖用量 1.0 mL/g、溶液 pH 值 9.0、絮凝温度 45 ℃、絮凝时间 2.0 h。此工艺条件下多糖损失率为 20.03%、蛋白质去除率为 80.26%、脱色率为 52.67%。

**关键词:** 车前草水提液; 壳聚糖; 多糖; 纯化

**中图分类号:** S567.23+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)12-0123-04

## Purification Process of Water Extract from Plantain with Chitosan

LIAO Chun-yan<sup>1</sup>, HUANG Min<sup>2</sup>, HUANG Yao<sup>1</sup>, BI Gui-mei<sup>1</sup>

(1. Department of biological and chemical Engineering of Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006, China;

2. Department of food bioengineering, Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** The purification process of water extract from plantain using chitosan was optimized. Four factors including the amount of chitosan, pH value, flocculation temperature, and flocculation time were investigated by single factor and orthogonal experiments using polysaccharide loss rate, deproteinization rate, and decolorization rate as indices. The results showed that the optimized conditions was the amount of chitosan of 1.0 mL/g, the flocculation temperature of 45 ℃, the pH value of 9.0, and the flocculation time of 2.0 h. Under the optimal condition, the rate of polysaccharide loss was 20.03%. The deproteinization loss rate and the decolorization rate was 80.26% and 52.67%, respectively. This method serves as a good reference for the purification process of water extract from plantain.

**Key words:** water extract from plantain; chitosan; polysaccharide; purification

车前草又名车前、车轮菜、灰盆草等。车前草为车前科植物车前或平车前的干燥全草。车前以种子和全草入药, 有利水通淋、清肝明目的功效。车前草多糖是车前草中主要的有效成分, 具有缓泻、降血糖、降血脂、抗炎及免疫活性等多种生物活性<sup>[1-3]</sup>。

目前, 国内对中药水提液的纯化多采用醇沉法, 但醇沉法耗醇量大、成本高、醇回收量大、工艺流程长。壳聚糖是甲壳质的脱乙酰化产物, 是一种新型的天然絮凝剂, 其澄清作用机制是利用电荷和大分子的架桥作用, 去除溶液中的不溶性颗粒、鞣质、蛋白质、树脂等杂质, 得到澄清的溶液<sup>[4-9]</sup>。本研究采

用壳聚糖纯化车前草水提液, 对絮凝工艺进行优化, 利用壳聚糖的絮凝作用去除多糖水溶液中的蛋白质及胶体物质等杂质, 从而达到对车前草水提液净化除杂的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

车前草购于柳州市中药材市场; 壳聚糖、考马斯亮蓝、牛血清蛋白、生化试剂 BR 由国药集团化学试剂有限公司生产; 乙醇、磷酸、冰醋酸、硫酸、苯酚、葡萄糖等试剂均为分析纯。

收稿日期: 2012-06-06

作者简介: 廖春燕(1979-), 女, 广西柳州人, 讲师, 硕士, 主要从事药物提取与分离的研究。E-mail: sophie0509@sohu.com

UV-2000 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、HZ-9212 水浴恒温振荡器(太仓市华利达实验设备有限公司)、ZFD-5250 全自动新型鼓风干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)、80-2 离心机(常州国华电器有限公司)、DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市于华仪器有限公司)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 车前草多糖水提液的制备 将车前草洗净, 80 ℃烘干至恒定质量, 粉碎, 过筛(筛孔内径为 380 μm), 得车前草粉末, 待用。称取车前草粉末 20 g, 以蒸馏水为提取剂, 料液比为 1:15(m/V), 80 ℃水浴浸提 3 h, 过滤。滤渣再加入同体积蒸馏水, 80 ℃水浴浸提 2.5 h, 合并 2 次滤液, 蒸发浓缩至每 15 mL 水提液含 1.0 g 生药, 备用。

1.2.2 壳聚糖溶液的制备 用 1% 的醋酸溶液配制 1% 的壳聚糖溶液, 充分溶胀后作为絮凝剂立即使用, 以免在稀酸中缓慢水解而影响絮凝效果。

1.2.3 壳聚糖纯化车前草水提液的单因素试验

1.2.3.1 壳聚糖用量 各取样液 30 mL, 分别按 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 mL/g(壳聚糖溶液体积/生药量)加入壳聚糖溶液, 搅拌 10 min, 45 ℃水浴中放置 1.0 h, 减压抽滤, 滤液在 4 000 r/min 下离心 20 min, 取上清液测定多糖含量、蛋白质含量、色素含量。

1.2.3.2 絮凝温度 各取样液 30 mL, 按 0.75 mL/g 加入壳聚糖溶液, 搅拌 10 min, 分别于 25、35、45、55、65、75 ℃下水浴 1.0 h。减压抽滤, 滤液在 4 000 r/min 下离心 20 min, 取上清液测定各指标。

1.2.3.3 样液 pH 值 各取样液 30 mL, 分别调 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 按 0.75 mL/g 生药量加入壳聚糖溶液, 搅拌 10 min, 于 45 ℃条件下放置 1.0 h 后, 减压抽滤, 滤液离心 20 min(4 000 r/min), 取上清液测定各指标。

1.2.3.4 絮凝时间 各取样液 30 mL, 调节 pH 值为 8.0, 按 0.75 mL/g 加入壳聚糖溶液, 搅拌 10 min, 分别于 45 ℃水浴中放置 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h, 减压抽滤, 滤液在 4 000 r/min 下离心 20 min, 取上清液测定各指标。

1.2.4 壳聚糖纯化车前草水提液的正交试验 在单因素的基础上, 以壳聚糖用量、pH 值、絮凝温度、絮凝时间为考察因素, 以多糖损失率、蛋白质去除率和脱色率为考察指标, 根据正交表  $L_9(3^4)$  进行正交试验(表 1), 优化壳聚糖纯化车前草水提液的工艺条件。

表 1 壳聚糖纯化车前草水提液的正交试验因素水平

水平	因素			
	壳聚糖用量(A)/ (mL/g)	pH 值 (B)	絮凝温度(C) /℃	絮凝时间(D) /h
1	0.50	7.0	25	2.0
2	0.75	8.0	35	3.0
3	1.00	9.0	45	4.0

## 1.3 测定指标和方法

1.3.1 多糖含量的测定 多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法<sup>[10]</sup>, 以葡萄糖为对照品。以吸光度 A 对葡萄糖质量浓度 C(g/L) 绘制标准曲线并作回归处理, 得回归方程:  $A=15.246C-0.1457$ ,  $R^2=0.9902$ 。

准确吸取絮凝后的滤液 2.0 mL 于 10 mL 比色管中, 按苯酚-硫酸法测定多糖含量。多糖损失率计算公式:

$$\text{多糖损失率} = \frac{\text{絮凝前多糖含量} - \text{絮凝后多糖含量}}{\text{絮凝前多糖含量}} \times 100\%$$

1.3.2 脱色率的测定 对车前草多糖提取液在 200~700 nm 进行可见-紫外光谱全波长扫描, 车前草多糖提取液的最大吸收波长为 330 nm。在 330 nm 处测定吸光度, 脱色率计算公式:

$$\text{脱色率} = \frac{\text{絮凝前吸光度} - \text{絮凝后吸光度}}{\text{絮凝前吸光度}} \times 100\%$$

1.3.3 蛋白质含量的测定 用考马斯亮蓝染色法<sup>[11]</sup>测定蛋白质含量, 以牛血清蛋白为标准品。以吸光度 A 对蛋白质质量浓度 C(g/L) 绘制标准曲线并作回归处理得到回归方程:  $A=6.7467C-0.0123$ ,  $R^2=0.9972$ 。蛋白质去除率计算公式:

$$\text{蛋白质去除率} = \frac{\text{絮凝前的蛋白质含量} - \text{絮凝后蛋白质含量}}{\text{絮凝前的蛋白质含量}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 壳聚糖纯化车前草水提液的单因素试验

2.1.1 壳聚糖用量 由图 1 可以看出, 随着壳聚糖用量的增加, 多糖损失率缓慢上升。在 0.50~0.75 mL/g, 随着壳聚糖用量的增加, 蛋白质去除率和脱色率均有所上升; 当用量大于 0.75 mL/g 时, 蛋白质去除率开始下降, 脱色率基本不变, 而多糖损失率则逐渐增加。这是因为随着壳聚糖用量的增加, 壳聚糖与蛋白质等杂质分子发生吸附架桥和电中和的机会增大, 使得蛋白质等杂质分子被大量絮凝沉淀。但是随着用量的继续增大, 胶体分子表面吸附过量的絮凝剂, 影响颗粒间的架桥作用, 胶粒处于再稳定状态, 造成蛋白质去除率下降。而壳聚糖在吸附色素和絮凝蛋白质的同时, 对多糖也会产生絮凝作用, 造成溶液多糖含量下

降。综合考虑各个指标,壳聚糖用量不宜多大。

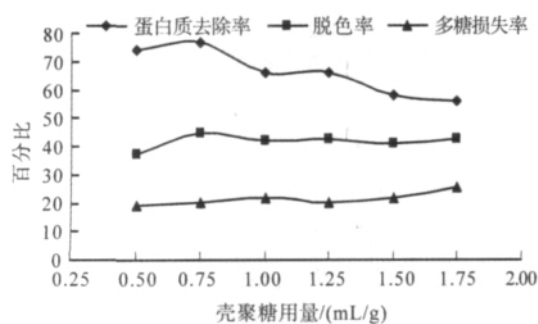


图 1 壳聚糖用量对车前草水提液纯化效果的影响

2.1.2 絮凝温度 由图 2 可以看出,当温度大于 35℃,多糖损失率随温度的升高而上升,而蛋白质去除率和脱色率则随温度的升高而减小。这可能是由于絮凝温度过高,使壳聚糖高分子发生老化,影响絮凝效果,造成蛋白质去除率和脱色率下降,多糖损失率升高。因此絮凝温度不可过高。

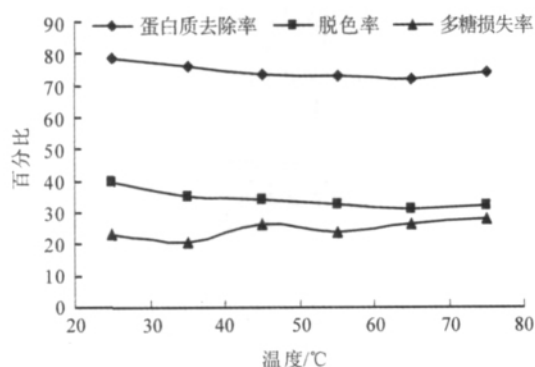


图 2 絮凝温度对车前草水提液纯化效果的影响

2.1.3 pH 值 由图 3 可以看出,当 pH 值<8.0,蛋白质去除率和脱色率随着样液 pH 值的增大而增大,同时多糖损失率明显减少。当 pH 值>8.0 时,蛋白质去除率、脱色率开始下降,同时多糖损失率开始增大。这是由于壳聚糖絮凝剂具有吸附交联和电荷中和的双重作用。pH 值过小或过大,会影响壳聚糖的活性,使絮凝效果下降。且过酸或过碱会破坏多糖的结构,造成多糖损失率升高。

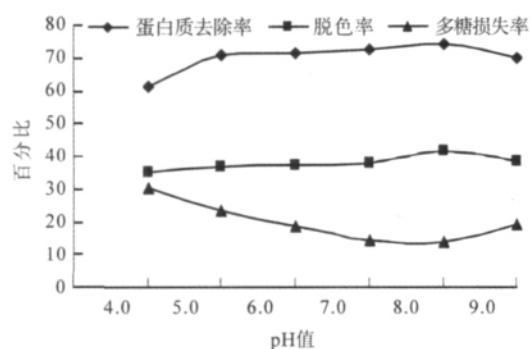


图 3 pH 值对车前草水提液纯化效果的影响

2.1.4 絮凝时间 由图 4 可以看出,随着絮凝时间的延长,蛋白质去除率和脱色率先增加后降低,多糖损失率则先降低后增加。这是由于随着絮凝时间的延长,壳聚糖与水提液中的胶体颗粒、蛋白质等杂质的作用时间延长,壳聚糖的絮凝作用较充分,但当絮凝时间超过 3.0 h 时,蛋白质去除率基本没有变化,多糖损失率增加,可能是因为壳聚糖絮凝作用已经达到最大,再延长絮凝时间对杂质的去除作用不大,反而随着絮凝时间的延长,多糖大分子被吸附,因而多糖损失率增大。因此絮凝时间不宜太长。

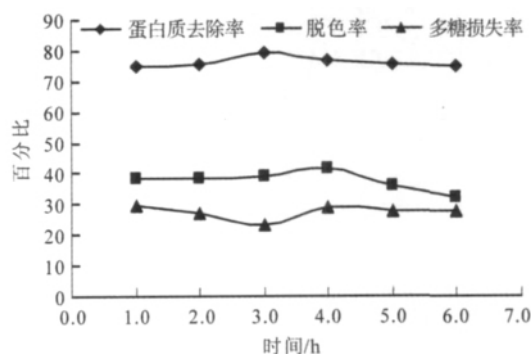


图 4 絮凝时间对车前草水提液纯化效果的影响

## 2.2 壳聚糖纯化车前草水提液的正交试验

方差分析结果表明,对于多糖损失率,因素 C 的  $F$  值为 48.31,  $F_{0.05}(2,2)=19.00 < F < F_{0.01}(2,2)=99$ ,故 C 对结果影响显著;A、B、D 因素的  $F$  值分别为 5.99、15.88 和 1.00,均小于  $F_{0.05}(2,2)$ ,故 A、B、D 对结果无显著影响。从极差分析结果(表 2)可以看出,对于多糖损失率最佳组合为  $A_3B_2C_3D_1$ ,各因素的主次顺序为  $C>B>A>D$ 。对于蛋白质去除率,因素 A、B、C、D 的  $F$  值分别为 5.95、1.00、7.73 和 1.91,均小于  $F_{0.05}(2,2)$ ,故 4 个因素对结果均无显著影响,最佳组合为  $A_3B_3C_1D_2$ ,各因素的主次顺序为  $C>A>D>B$ 。对于脱色率,B 因素的  $F$  值=21.24 $>F_{0.05}(2,2)$ ,故 B 对结果有显著影响;A、C、D 的  $F$  值分别为 1、2.97 和 2.49,均小于  $F_{0.05}(2,2)$ ,故 A、C、D 对结果均无显著影响,最佳组合为  $A_3B_3C_1D_1$ ,各因素的主次顺序为  $B>C>D>A$ 。

采用综合平衡法分析各因素的最佳水平。多糖损失率指标值越小越好,蛋白质去除率和色素去除率 2 个指标值越大越好。对于多糖损失率、蛋白质去除率和色素去除率 3 个指标均取  $A_3$  好,故 A 取  $A_3$ 。对于脱色率,B 是主要因素,取  $B_3$  好;对于多糖损失率,B 是次要因素,取  $B_2$  好;对于蛋白质去除率,B 是次要因素,B 取  $B_3$  好。综合考虑,B 取  $B_3$ 。

对于多糖损失率, C 为主要因素, 取  $C_3$  好, C 取  $C_1$  比  $C_3$  增加了 26.5%。对于蛋白质去除率, C 为主要因素, C 取  $C_1$  比取  $C_3$  增加了 6.5%。对于脱色率, C 是次要因素, C 取  $C_1$  与取  $C_3$  相差不大。综合考虑, C 取  $C_3$ 。因素 D 对于 3 个指标均为次要因素, 综合考虑, D 取  $D_1$ 。因此最优方案为  $A_3B_3C_3D_1$ , 即壳聚糖用量为 1.0 mL/g、溶液 pH 值为 9.0、絮凝温度为 45 ℃、絮凝时间为 2.0 h。

表 2 壳聚糖纯化车前草水提液的正交试验设计及结果

试验 编号	因素				多糖损 失率/ %	蛋白质 去除率/ %	脱色率 /%
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	23.00	79.74	46.98
2	1	2	2	2	23.02	75.39	48.36
3	1	3	3	3	20.82	74.54	49.67
4	2	1	2	3	24.08	68.56	42.67
5	2	2	3	1	17.91	72.68	49.22
6	2	3	1	2	26.86	78.87	53.56
7	3	1	3	2	17.54	77.09	46.19
8	3	2	1	3	21.32	80.26	50.19
9	3	3	2	1	24.04	78.45	52.60
多糖 损失 率/ %	$k_1$	22.28	21.54	23.73	21.65		
	$k_2$	22.95	20.75	23.71	22.47		
	$k_3$	20.97	23.91	18.76	22.07		
	R	1.98	3.16	4.97	0.82		
蛋白 质 去 除 率/ %	$k_1$	76.56	75.13	79.62	76.96		
	$k_2$	73.37	76.11	74.13	77.12		
	$k_3$	78.60	77.29	74.77	74.45		
	R	5.23	2.16	5.49	2.66		
脱色 率/ %	$k_1$	48.34	45.28	50.24	49.60		
	$k_2$	48.48	49.26	47.88	49.37		
	$k_3$	49.66	51.94	48.36	47.51		
	R	1.32	6.66	2.37	2.09		

### 2.3 验证试验

按正交试验得到的最佳工艺条件平行 3 次进行验证试验, 测得多糖损失率为 20.03%, 蛋白质去除率为 80.26%, 脱色率为 52.67%。结果表明, 试验所确定的工艺条件为最佳工艺条件。

## 3 讨论

壳聚糖对车前草水提液中的杂质具有良好的去除效果。采用壳聚糖纯化车前草水提液, 操作方便, 设备要求不高, 成本较低。

壳聚糖对车前草水提液的纯化效果主要体现在其去除蛋白质杂质的能力较高, 对色素的去除率也较好。与其他中药药液去除蛋白质的方法如 Sevage 法、酶法-Sevage 法联用等相比, 此法不使用有机溶剂, 不污染环境, 成本较低。同时, 壳聚糖还具有对中药液中多糖、可溶性膳食纤维等药用成分的保留效果较好、无毒性、用量少等优点。

### 参考文献:

- [1] 刘贤旺, 张寿文. 车前研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(8): 612-615.
- [2] 张彤, 柳淑玉, 柳晨. 车前草的药理作用及临床应用进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(1): 67.
- [3] 季大洪. 中药车前研究与应用概况[J]. 药学实践杂志, 2001, 19(6): 361-362.
- [4] 任荣军, 夏新华, 严建业. 壳聚糖用于驴胶补血颗粒的絮凝工艺研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 9-14.
- [5] 陈英, 李永吉, 程淑云, 等. 壳聚糖絮凝法精制红花水提液工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1167-1168.
- [6] 贺培益, 王米, 孟新宇, 等. 壳聚糖絮凝法澄清复方黄芩水提液的工艺研究[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3): 173-175.
- [7] 李艳欢. 壳聚糖的生物活性及其在保健食品中的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(4): 186-189.
- [8] 王富花, 刘中阳, 张占军. 壳聚糖的研究进展及其在食品医药工业中的应用[J]. 广州化工, 2010, 38(10): 46-48.
- [9] 刘永录, 张国祖, 樊克锋, 等. 黄芪多糖的提取和纯化方法研究[J]. 河南农业科学, 2010(6): 141-143.
- [10] 杨勇杰, 姜瑞芝. 苯酚-硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. 中成药, 2005, 27(6): 706-708.
- [11] 袁玉荪, 朱婉华, 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992: 69-70.