

壳聚糖用于玉米须水提液的纯化工艺研究

王元清^{1,2}, 严建业², 陈晓莉¹, 陈志文¹, 胡 波¹, 谷阿龙¹

(1. 中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208)

摘 要: 以壳聚糖澄清剂的用量、提取液浓度、温度、pH 值等为影响因素, 在单因素分析的基础上应用正交试验设计优选壳聚糖用于玉米须的最佳澄清工艺。结果表明: 最佳工艺条件为: 提取液浓缩至为 1: 5, 温度 40℃, 絮凝剂用量为 0.7 mL · g⁻¹, pH 为 5.0。

关键词: 玉米须; 壳聚糖; 澄清工艺

中图分类号: S 513. 024 文献标识码: A 文章编号: 1001- 0009(2010) 07- 0040- 03

玉米须(*Stigma Maydis*) 为禾本科玉蜀黍属植物玉米的干燥花柱和柱头, 其性甘、平、无毒, 具有消肿、利尿、平肝、利胆之功效^[1-3], 玉米须中含有多糖、皂苷、挥发油、生物碱、植物甾醇类化合物等, 其中黄酮类化合物和多糖类化合物为主要的活性成分。为降低玉米须水提液的杂质, 选用壳聚糖对其絮凝澄清, 以黄酮含量与多糖含量为主要考察指标, 优选其最佳澄清工艺。

1. 材料与方法

1.1 试验材料

722 型可见分光光度计(上海奥谱勒仪器有限公司); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(常州诺基仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(浙江新丰医疗器械有限公司); TP-1200C 电子天平(厦门索迈电子科技有限公司); 离心沉淀机(上海医用分析仪器厂)

葡萄糖(中国药品生物制品检定所提供, 供含量测定用); 芦丁(中国药品生物制品检定所提供, 供含量测定用); 壳聚糖(上海伟康生物制品有限公司); 玉米须(购于益丰大药房); 浓硫酸、苯酚、乙醇、丙酮、三氯化铝、醋酸均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 多糖含量的测定 标准曲线的制备: 参照文献[4]方法, 浓度为 0.408 mg/mL 葡萄糖标准溶液制备的标准曲线方程: $Y = 0.0274X + 0.0411$ ($r = 0.9961$), 线性范围为 20.4~ 163.2 μg/mL。样品溶液中多糖含量的测定: 精密吸取絮凝澄清后的上清液 0.2 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 然后分别加入 5% 苯酚溶液 0.4 mL, 摇匀, 迅

速加入浓硫酸 2 mL, 振摇 5 min 后置于 40℃水浴中加热 30 min。用分光光度计在波长 490 nm 处测定吸光度 A 值。

1.2.2 黄酮含量的测定 标准曲线的制备: 参照文献[5]方法, 浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁溶液制备的标准曲线为 $Y = 0.0665X - 0.0076$ ($r = 0.9988$), 线性范围为 10~ 50 μg/mL。样品溶液中黄酮含量的测定: 精密吸取絮凝澄清液 0.2 mL 加入到 10 mL 具塞试管, 加入 5 mL 0.1 mol/L 三氯化铝溶液, 再加甲醇定容至刻度, 在 400 nm 处测吸光度

1.2.3 固形物得率的测定 取絮凝处理的样品液 25 mL, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105℃烘箱干燥至恒重, 称重, 与相应的玉米须投料重量作对比, 按下列公式计算出固形物得率。

$$\text{固形物得率}/\% = \frac{\text{絮凝后固形物重}/\text{g}}{\text{玉米须投料重}/\text{g}} \times 100\%。$$

1.3 絮凝澄清工艺

影响壳聚糖絮凝的因素有很多, 选择壳聚糖用量、浓缩比、温度和 pH 值 4 个主要因素进行单因素试验, 根据试验结果, 采用 L₉(3⁴) 正交法设计实验, 筛选最佳的壳聚糖絮凝工艺。壳聚糖溶液的配制: 取壳聚糖适量加 1% 的冰醋酸溶液配置成 1% 的溶液备用(使用临时配置)。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖絮凝剂用量分析

将 6 份 20 g 投料的玉米须提取液浓缩成料液比 1: 5, 把提取液的 pH 调为 6, 并置于 60℃恒温水浴中, 静置 2 h, 分别加入澄清剂 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 (以 mL/g 投料计), 边加边搅拌, 在 60℃恒温水浴中放置 1 h, 再在室温中静置 12 h, 离心, 将上清液照分光光度法测定其吸光度, 计算多糖含量和黄酮含量。

由表 1 可知, 当用量为 0.8 mL/g 时, 上清液的澄清

第一作者简介: 王元清(1980), 女, 湖南益阳人, 在读博士, 讲师, 现主要从事生物药物的教学和科研工作。

基金项目: 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划资助项目(2009139)。

收稿日期: 2009- 12- 25

效果最好, 多糖与黄酮的含量也比较高, 所以壳聚糖的用量宜选用 0.8 mL/g。

表 1 不同壳聚糖用量的分析结果							
壳聚糖用量/ mL·g ⁻¹	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	
多糖含量/ mg·g ⁻¹	6.7154	6.5569	6.3255	6.1278	5.7849	5.6321	
黄酮含量/ mg·g ⁻¹	210.3678	205.0367	200.5564	198.3021	192.4456	180.8976	
溶液澄清度	-	-	-	-	-	++	

注“-”表示溶液混浊,“+”表示溶液变清,“++”表示溶液透亮,下同。

2.2 提取液浓缩比的分析

将4份20g 投料的提取液进行浓缩, 浓缩比(g/ mL)分别为 1: 4、1: 5、1: 6、1: 7, 调 pH 为 6.0, 在 60℃水浴保温, 边搅拌边加入配置好的壳聚糖絮凝剂 0.8 mL/g, 继续搅拌 15 min 静置 12 h 以上, 4 000 rpm 离心 30 min, 将上清液照分光光度法测定其吸光度, 计算多糖含量和黄酮含量。由表 2 可知, 当浓缩比为 1: 4 时, 上清液的澄清效果最好, 多糖与黄酮的含量也比较高, 所以浓缩比 1: 4 为宜。

表 2 不同浓缩比的分析结果				
浓缩比	1: 4	1: 5	1: 6	1: 7
多糖含量/ mg·g ⁻¹	5.1263	5.2206	6.3814	7.2155
黄酮含量/ mg·g ⁻¹	182.7924	189.4658	192.3678	199.6789
溶液澄清度	++	-	-	-

2.3 不同温度的分析

取浓缩成 1: 4 的 20 g 投料的提取液 3 份, 调 pH 为 6.0, 分别在 40、60、80℃水浴保温下边搅拌边加入配置好的壳聚糖絮凝剂 0.8 mL/g, 继续搅拌 15 min 静置 12 h 以上, 4 000 rpm 离心 30 min, 将上清液按照分光光度法测定其吸光度, 计算多糖含量和黄酮含量。从表 3 可以看出, 在 40℃时, 虽然浓缩液中多糖与黄酮的含量比较高, 但其沉淀效果不理想, 故取 60℃, 澄清效果比较好, 且多糖与黄酮的含量也比较高。

表 3 不同温度的分析结果			
温度/℃	40	60	80
多糖含量/ mg·g ⁻¹	8.3515	5.4065	2.9474
黄酮含量/ mg·g ⁻¹	199.4099	172.2390	105.2598
溶液澄清度	-	+	++

2.4 不同 pH 值的分析

取浓缩成 1: 4 的 20 g 投料的提取液 3 份, 分别调 pH 为 4.0、6.0、8.0, 在 80℃水浴保温下边搅拌边加入配置好的壳聚糖絮凝剂 0.8 mL/g, 继续搅拌 15 min 静置 12 h 以上, 4 000 rpm 离心 30 min, 将上清液照分光光度法测定其吸光度, 计算多糖含量和黄酮含量, 从表 4 可以看出, 在 pH 5 时, 澄清效果较好, 多糖、黄酮的含量也比较高, 故采用 pH 5。

表 4 pH 值的分析结果			
pH	5	6	8
多糖含量(mg·g ⁻¹)	3.9843	1.7314	2.2099
黄酮含量(mg·g ⁻¹)	178.2419	182.9810	193.7230
溶液澄清度	++	+	-

2.5 正交设计试验

以玉米须黄酮含量、多糖含量和固形物得率作为考察指标, 按表 5、6 采用 L₉(3⁴) 正交表安排试验, 制定试验方案。数据分析结果见表 7、8、9。

表 5 L ₉ (3 ⁴) 正交设计表的水平与因素			
因素	絮凝剂用量/ mL·g ⁻¹	药液浓缩比例	温度/℃
水平	A	B	C
1 2 3	0.7	1:3	40
	0.8	1:4	50
	0.9	1:5	60

表 6 L ₉ (3 ⁴) 正交试验及结果							
因素 列号	A	B	C	D	试验结果		
	1	2	3	4	多糖含量 / mg·g ⁻¹	黄酮含量 / mg·g ⁻¹	固形物 得率/ %
1	1	1	1	1	3.679	101.217	8.60
2	1	2	2	2	4.361	168.764	11.60
3	1	3	3	3	6.372	263.085	14.60
4	2	1	2	3	2.045	74.206	9.00
5	2	2	3	1	3.065	145.700	10.80
6	2	3	1	2	4.733	212.929	14.75
7	3	1	3	2	1.371	50.984	7.40
8	3	2	1	3	3.536	150.439	12.20
9	3	3	2	1	4.476	156.850	15.00
多糖含量	K ₁	14.412	7.096	11.940	11.220	C= (ΣY) ² /N= 125.7291	
	K ₂	9.844	10.963	10.882	10.466	Qj= (K ₁) ² + (K ₂) ² + (K ₃) ²	
	K ₃	9.383	15.381	10.808	11.953	SSj= Qj/3- C	
	R	5.029	8.485	1.141	1.487		
	SSj	5.152	12.081	0.273	0.369		
黄酮含量	K ₁	533.067	226.408	464.587	408.769	C= (ΣY) ² /N= 194826.7	
	K ₂	482.835	464.908	399.819	432.677	Qj= (K ₁) ² + (K ₂) ² + (K ₃) ²	
	K ₃	358.273	632.864	459.769	487.730	SSj= Qj/3- C	
	R	174.794	406.456	64.768	83.961		
	SSj	5 128.754	27 810.730	868.004	1 212.881		
固形物得率	K ₁	34.8	25	35.55	34.4	C= (ΣY) ² /N= 1200.623	
	K ₂	34.55	34.6	35.6	33.75	Qj= (K ₁) ² + (K ₂) ² + (K ₃) ²	
	K ₃	34.6	44.35	32.8	35.8	SSj= Qj/3- C	
	R	0.25	19.35	2.8	2.05		
	SSj	0.012	62.405	1.712	0.732		

表 7 多糖含量方差分析					
误差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	5.152098	2	2.576049	13.9754	> 0.05
B	12.03081	2	6.015406	32.63437	< 0.05
C	0.271974	2	0.135987	0.737748	> 0.05
误差 E	0.368655	2	0.184327		

注: F_{0.05}(2, 2)= 19.00 F_{0.01}(2, 2)= 99.00, 下同。

对正交试验结果进行处理, 以多糖含量为评价指标

进行直观分析,最佳纯化工艺条件为 A₁B₃C₁,各因素的主次顺序为 B> A> C,其中 B 因素经方差分析表明对多糖含量有显著影响(见表 7)。以黄酮含量为评价指标进行直观分析,最佳纯化工艺条件为 A₁B₃C₁,各因素的主次顺序为 B> A> C,B 因素经方差分析表明对黄酮含量有显著影响(见表 8)。以固形物得率为评价指标进行直观分析,最佳纯化工艺条件为 A₁B₃C₂,其中 C₁ 与 C₂ 比较接近,可选 A₁B₃C₁,各因素的主次顺序为 B> C> A,B 因素经方差分析表明对固形物得率有显著影响(见表 9)。根据多糖含量、黄酮含量、固形物得率优选的纯化工艺以及各指标作用的大小,结合工业化生产实际,选择最佳纯化工艺条件为 A₁B₃C₁,即玉米须料液浓缩比例为 1: 5,温度 40℃,絮凝剂用量为 0.7 mL/ g。

表 8 黄酮含量方差分析					
误差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	5 128.754	2	2 564.377	4.228571	> 0.05
B	27 810.73	2	13 905.37	22.92948	< 0.05
C	868.0042	2	434.0021	0.715655	> 0.05
误差 E	1 212.881	2	606.4405		

表 9 固形物得率方差分析					
误差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	0.011667	2	0.005833	0.015945	> 0.05
B	62.405	2	31.2025	85.29157	< 0.05
C	1.711667	2	0.855833	2.339408	> 0.05
误差 E	0.731667	2	0.365833		

2.6 验证试验

取 20 g 投料/份提取液 3 份,均浓缩到 120 mL,调 pH 为 8.0,在 60℃水浴保温下边搅拌边加入配置好的壳聚糖絮凝剂 10 mL,继续搅拌 15 min 静置 12 h 以上,4 000 rpm 离心 30 min,将上清液测定多糖含量、黄酮含

量、固形物得率。

表 10 验证试验结果		多糖含量	黄酮含量	固形物得率
纯化方案	溶液澄清度	/ mg · g ⁻¹	/ mg · g ⁻¹	/ %
A ₁ B ₃ C ₁	++	6.45	268.12	22.11
A ₁ B ₃ C ₁	++	6.49	267.89	21.98
A ₁ B ₃ C ₁	++	6.41	267.95	22.15

由表 10 可知,A₁B₃C₁ 的纯化方案所得的上清液的较透明,多糖含量、黄酮含量较高,固形物得率也较高,证明正交试验优选出来的 A₂B₁C₃ 的纯化方案为最佳纯化方案。

3 结论

中药提取液的精制方法很多,该试验首次采用絮凝澄清技术应用于玉米须水提液的工艺研究,使玉米须水提液尽可能多地保持有效成分,又尽可能使提取液澄清除杂。

通过单因素试验和正交试验,获得了壳聚糖精制玉米须水提液的最佳澄清工艺为:玉米须料液浓缩比例为 1: 5,pH 为 5.0,温度 40℃,絮凝剂用量为 0.7 mL/ g。该工艺获得了验证,为玉米须水提液的纯化提供了新的方法,为玉米须相关产品开发利用的前处理工作提供了一定的工艺依据。

参考文献

[1] 张育光.玉米须化学成分、药理作用及其应用研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2007,5(2): 34-35.
[2] 王英平,李向高.玉米须化学成分和药理作用研究进展[J].特产研究,2004,4(2):42-47.
[3] 范晓艳,吕冬霞,金岳雷,等.玉米须多糖对人肝癌 SMMC-7721 细胞 Caspase-3 和 p53 表达的影响[J].黑龙江医药科学,2007,30(6): 3-4.
[4] 王元清,严建业,喻林华,等.壳聚糖精制山楂水提液的工艺研究[J].食品科技,2009,34(6): 170-174.
[5] 任顺成,丁霄霖.不同品种玉米须黄酮类含量测定[J].玉米科学,2007,15(6): 135-137.

Study on the Optimum Purification Conditions of Stigma Maydis with Chitosan

WANG Yuan-qing^{1,2}, YAN Jian-ye², CHEN Xiao-li¹, CHEN Zhi-wen¹, HU Bo¹, GU A-long¹

(1. The College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004; 2. College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208)

Abstract: On the basis of the effects of some factors such as the amount of chitosan, the concentration of the extracting solution, the temperature and pH etc, the orthogonal design was selected to choose the best clarification process of chitosan used on stigma maydis. The results showed that the optimal process conditions were merging the extract solution condense to 1: 5(hurb: the hurb solution), the flocculation temperature was 40℃, the optimum amount of chitosan was 0.7 mL/g, the pH was 5.0.

Key words: stigma maydis; chitosan; purification process