

· 药剂与炮制 ·

六味地黄生物制剂总多糖的精制工艺优选

陈凯, 郭丽冰, 王计长, 刘文秀, 徐文雅, 赵越*

(广东药学院 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**优化六味地黄生物制剂总多糖的精制工艺,为该制剂的开发提供参考。**方法:**以粗多糖质量为指标,采用正交试验考察醇沉浓度、醇沉时间、药液相对密度对总多糖醇沉工艺的影响。在单因素试验基础上,以蛋白质清除率和总多糖保存率的综合评分为指标,采用正交试验优化三氯乙酸(TCA)-正丁醇法脱蛋白工艺。以色素清除率和总多糖保存率的综合评分为指标,利用正交试验优化活性炭除色素工艺。**结果:**最佳醇沉工艺为醇沉浓度85%,醇沉时间6h,药液相对密度1.05;粗多糖质量8.92mg。最佳脱蛋白工艺为粗多糖溶液与TCA-正丁醇体积比1:2,TCA-正丁醇(1:15),振荡时间20min,静置时间0.5h;蛋白质清除率80.23%,总多糖保存率85.45%。最佳除色素工艺为脱色温度40℃,活性炭加入量6%,脱色时间40min;色素清除率74.84%,总多糖保存率78.69%。**结论:**优选的精制工艺稳定可行,适用于六味地黄生物制剂总多糖保健食品的开发。

[关键词] 六味地黄生物制剂; 总多糖; 醇沉工艺; 脱蛋白工艺; 除色素

[中图分类号] R283.6;R284.1;R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015100001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0916.001.html>

[网络出版时间] 2015-04-01 9:16

Optimization of Purification Technology of Total Polysaccharides from Liuwei Dihuang Biological Preparation CHEN Kai, GUO Li-bing, WANG Ji-zhang, LIU Wen-xiu, XU Wen-ya, ZHAO Yue* (*School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China*)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total polysaccharides from Liuwei Dihuang biological preparation. **Method:** With the amount of crude polysaccharides as index, orthogonal test was adopted to optimize alcohol precipitation process. Based on single factor tests, taking composite score of deproteinization rate and retention rate of total polysaccharides as index, orthogonal test was adopted to optimize deproteinization process. With composite score of decolorization rate and retention rate of total polysaccharides as index, orthogonal test was adopted to optimize decolorization process. **Result:** Optimum alcohol precipitation process was as follows: alcohol precipitation concentration of 85%, alcohol sedimentation time for 6 h, relative density of solution concentration of 1.05. Optimum deproteinization process were as follows: volume ratio of total polysaccharide solution to trichloroacetic acid (TCA) of 1:2, volume ratio of TCA-butanol of 1:15, vibration time of 20 min, standing for 0.5 h. Optimum decolorization process was as following: decolorization temperature of 40 °C, the amount of activated carbon 6%, decolorization time of 40 min. Quality of crude polysaccharides was 8.92 mg, deproteinization rate was 80.23%, decolorization rate was 74.84%, retention rate of total polysaccharides was 78.69%. **Conclusion:** These optimized extraction processes are stable and feasible, which are suitable for development of health products of total polysaccharides from Liuwei Dihuang biological preparation.

[收稿日期] 20140824(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374072)

[第一作者] 陈凯,在读硕士,从事中药制剂研究与开发,Tel:13632250239,E-mail:815521080@qq.com

[通讯作者] *赵越,教授,硕士生导师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:020-39352173,E-mail:zybmblyk688@163.com

[Key words] Liuwei Dihuang biological preparation; total polysaccharides; alcohol precipitation process; deproteinization process; depigmentation

六味地黄生物制剂是将光合细菌加至六味地黄汤中,通过光合细菌的代谢作用和自身的营养价值,得到的新型中药生物制剂^[1]。现代药理学研究表明六味地黄汤中 6 味药材含有的多糖类成分是该方发挥免疫调节、抗衰老等作用的重要物质基础^[2]。前期研究发现^[3-5]经光合细菌代谢后,六味地黄生物制剂中多糖类成分含量增加,可提高果蝇的抗衰老作用、生殖能力和体内抗氧化能力。本实验拟通过正交试验优选六味地黄生物制剂总多糖的精制工艺,为该产品的工业化生产提供技术参数。

1 材料

UV-2450 型紫外-可见分光光度计和 AY120 型电子分析天平(日本岛津公司),DD5 型低速大容量离心机(湖南赫西仪器装备有限公司)。熟地黄、山茱萸、山药等 6 味药材(均购于广州致信中药饮片有限公司,经广东药学院中药学院刘基柱教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下规定),葡萄糖对照品(广州化学试剂厂,纯度 99.5%,批号 20130201-1),考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20130505),D101 型大孔树脂(南开大学化工厂),活性炭(天津百世化工有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总多糖的含量测定^[6] 精密称取于 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 90 mg,加水溶解并定容至 250 mL,摇匀,得储备液。5% 苯酚溶液现配现用。精密吸取储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,得系列对照品溶液。

精密吸取上述溶液各 2.0 mL,分别置于 10 mL 具塞试管中,加入苯酚 1.0 mL,混匀,迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,振摇 5 min,置沸水中加热 15 min,放入冷水中冷却 15 min。另取水 2.0 mL 作为空白对照,于 490 nm 处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 12.771C - 0.060$ ($R^2 = 0.9996$),表明葡萄糖溶液在 0.007 2 ~ 0.086 4 g·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.2 六味地黄生物制剂的制备^[1] 将熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和茯苓粉碎过 20 目筛,按质量比 8:4:4:3:3:3 配药,加入 8 倍量水,经自然发酵一段时间,滤过,滤液浓缩至 0.5 g·mL⁻¹,加入光

合细菌液,于光照培养箱中培养 15 d,即得。

2.3 醇沉工艺 取一定量六味地黄生物制剂离心(3 000 r·min⁻¹, 5 min),取上清液备用。以粗多糖质量为指标,选择醇沉浓度、醇沉时间、药液相对密度为考察因素。取上清液 15 份,每份 25 mL,通过单因素试验确定各因素的水平^[7]。取上清液 9 份,每份 25 mL,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对醇沉工艺的影响顺序为 A > B > C。方差分析表明因素 A 对醇沉效果具有极显著性影响,因素 B, C 则均无显著性影响。综合考虑,确定最佳醇沉工艺组合 A₃B₁C₁,即醇沉浓度 85%,醇沉时间 6 h,药液相对密度 1.05。取六味地黄生物制剂上清液 3 份,每份 25 mL,按优选的工艺条件进行验证试验,结果粗多糖质量 8.92 mg, RSD 1.0%,表明优选的醇沉工艺稳定可行。

表 1 六味地黄生物制剂醇沉工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of alcohol precipitation process of Liuwei Dihuang biological preparation

No.	A 醇沉浓度/%	B 醇沉时间/h	C 药液相对密度(空白)	D	粗多糖 /mg
1	95	6	1.05	1	6.27
2	95	8	1.08	2	4.91
3	95	12	1.12	3	4.61
4	90	6	1.08	3	5.07
5	90	8	1.12	1	4.85
6	90	12	1.05	2	4.32
7	85	6	1.12	2	8.82
8	85	8	1.05	3	8.56
9	85	12	1.08	1	8.01

表 2 醇沉工艺方差分析

Table 2 Variance analysis of alcohol precipitation process

方差来源	SS	F	P
A	24.321	109.554	<0.01
B	1.740	7.838	>0.05
C	0.243	1.095	>0.05
D(误差)	0.22		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ (表 4, 6 同)。

2.4 脱蛋白工艺 六味地黄生物制剂总多糖经水提醇沉后,还含有大量蛋白质,导致总多糖纯度不高。取醇沉得到的粗多糖 10 g,配成 10 g·L⁻¹ 粗多糖溶液备用。取粗多糖溶液 30 mL,共 3 份,分别采用 Sevag 法[粗多糖溶液与 Sevag 试剂的体积比

2:1, Sevag 试剂配比为三氯甲烷-正丁醇(4:1), 振摇 30 min, 萃取 3 次]、鞣酸沉淀法(粗多糖溶液 pH 3.0, 振摇 20 min, 静置 1 h)和三氯乙酸(TCA)-正丁醇法[粗多糖溶液与 TCA-正丁醇体积比 1:1, TCA-正丁醇(1:10), 振荡时间 30 min, 静置时间 1 h]^[8], 计算蛋白质清除率分别为 65.32%, 61.62%, 74.54%, 总多糖保存率依次为 76.78%, 81.23%, 84.28%, 故选择 TCA-正丁醇法。

在单因素试验基础上, 选择振荡时间、静置时间、粗多糖溶液与 TCA-正丁醇体积比及 TCA 与正丁醇的体积比为考察因素, 以蛋白质清除率和总多糖保存率的综合评分为指标^[9], 综合评分 = 60 × 蛋白质清除率/蛋白质清除率最大值 + 40 × 总多糖保存率/总多糖保存率最大值。取粗多糖溶液 9 份, 每份 30 mL, 按 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 试验安排及结

果见表 3, 方差分析见表 4。采用考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白质含量, 测试过程中样品混匀后静置 10 min, 加水调零后于 595 nm 处测定吸光度(A), 蛋白质质量浓度 = (A_{测定管} - A_{空白管}) / (A_{标准管} - A_{空白管}) × 0.563。由直观分析可知, 各因素对脱蛋白工艺的影响顺序为 A > B > C > D。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 结果表明因素 A, B 对脱蛋白效果具有显著性影响, 因素 C 则无显著性影响。确定最优水平组合为 A₁B₃C₁D₁, 即粗多糖溶液与 TCA-正丁醇体积比 1:2, TCA-正丁醇(1:15), 振荡时间 20 min, 静置时间 0.5 h。取粗多糖溶液 3 份, 每份 30 mL, 按优选的工艺条件进行验证试验, 结果蛋白质平均清除率 80.23%, 总多糖平均保存率 85.45%, 综合评分平均值 92.96 分, RSD 1.5%, 表明优选的脱蛋白工艺稳定可行。

表 3 六味地黄生物制剂脱蛋白工艺正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis of deproteinization process of Liuwei Dihuang biological preparation

No.	A 试液与 TCA-正丁醇的体积比	B TCA-正丁醇	C 振荡时间 /min	D 静置时间 /h	蛋白质清除率 /%	总多糖保存率 /%	综合评分 /分
1	1:2	1:5	20	0.5	68.21	85.33	84.87
2	1:2	1:10	30	1.0	69.71	77.89	82.47
3	1:2	1:15	40	1.5	76.73	87.32	91.22
4	1:1	1:5	30	1.5	78.97	55.60	78.47
5	1:1	1:10	40	0.5	80.53	58.31	80.76
6	1:1	1:15	20	1.0	83.20	70.90	88.33
7	2:1	1:5	40	1.0	89.01	32.92	74.82
8	2:1	1:10	20	1.5	89.39	30.15	73.81
9	2:1	1:15	30	0.5	86.61	37.92	75.50

表 4 脱蛋白工艺方差分析

Table 4 Variance analysis of deproteinization process

方差来源	SS	F	P
A	206.154	61.30	<0.05
B	67.876	20.18	<0.05
C	24.344	7.24	>0.05
D(误差)	3.363	1.00	

2.5 除色素工艺 六味地黄生物制剂总多糖经醇沉、脱蛋白后, 仍存在色素, 不利于多糖类成分的分离、鉴定和产品研发。取脱蛋白后的总多糖 5 g, 配成 5 g·L⁻¹ 总多糖溶液, 备用。取总多糖溶液 20 mL, 共 3 份, 分别采用 D101 型大孔树脂、双氧水法(温度 60 ℃, 双氧水加入量 20%, 反应时间 1.5 h)和活性炭吸附脱色法(温度 40 ℃, 活性炭加入量 5%, 脱色时间 1 h)脱色, 结果色素清除率分别为 82.13%, 85.62%, 72.63%, 总多糖保存率依次为 80.25%, 45.48%, 75.86%, 故采用活性炭脱色法。在单因素

试验基础上, 选择脱色温度、活性炭加入量、脱色时间为考察因素^[10], 以脱色率和总多糖保存率的综合评分^[11](综合评分 = 60 × 脱色率/脱色率最大值 + 40 × 总多糖保存率/总多糖保存率最大值)为指标, 根据互补色原理选择 450 nm 处吸光度(A)计算脱色率, 脱色率 = (A_{脱色前} - A_{脱色后}) / A_{脱色前} × 100%。取总多糖溶液 9 份, 每份 20 mL, 按 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 试验安排及结果见表 5, 方差分析见表 6。

由直观分析可知, 各因素对除色素工艺的影响顺序为 B > C > A。方差分析表明因素 B 对脱色效果具有显著性影响, 因素 A, C 则均无显著性影响。确定最优水平组合为 A₁B₃C₃, 即脱色温度 40 ℃, 活性炭加入量 6%, 脱色时间 40 min。取总多糖溶液 3 份, 每份 20 mL, 按优选工艺条件进行验证试验, 结果色素平均清除率 74.84%, 总多糖平均保存率 78.69%, 平均综合评分 91.38 分, RSD 1.0%, 表明优选的脱色素工艺稳定可行。

表 5 六味地黄生物制剂脱色素工艺正交试验分析

Table 5 Orthogonal test analysis of decolorization process of Liuwei Dihuang biological preparation

No.	A 脱色温度/℃	B 活性炭加入量/%	C 脱色时间/h	D (空白)	色素清除率 /%	多糖保存率 /%	综合评分 /分
1	40	2	20	1	61.35	61.16	72.98
2	40	4	30	2	65.71	66.33	78.59
3	40	6	40	3	74.72	78.16	90.76
4	60	2	30	3	62.64	55.15	70.78
5	60	4	40	1	88.32	58.37	89.87
6	60	6	20	2	75.87	71.55	88.16
7	80	2	40	2	69.49	69.88	82.97
8	80	4	20	3	69.95	68.42	82.54
9	80	6	30	1	77.90	72.24	89.89

表 6 脱色素工艺方差分析

Table 6 Variance analysis of decolorization process

方差来源	SS	F	P
A	28.47	2.21	>0.05
B	297.44	23.09	<0.05
C	112.09	8.70	>0.05
D(误差)	12.88		

3 讨论

六味地黄生物制剂中每味药材均含有多糖类成分,经代谢后总多糖含量有所增加,这类成分是该制剂发挥抗衰老等作用的重要物质基础,故最大程度提取出溶液中多糖类成分已成为醇沉工艺的目标。乙醇是最常用的沉降溶剂,其体积分数是总多糖沉降的关键因素。体积分数过低,总多糖不能完全沉淀;体积分数过高,其他成分一起沉淀,影响总多糖纯度。本文采用硫酸苯酚法测定总多糖含量,该方法简便、重复性好、准确度高。

Sevag 法脱蛋白原理是利用有机溶剂使蛋白质变性而沉淀;鞣酸是酸性物质,能使带正电荷的蛋白质与鞣酸结合形成不溶性盐类,使蛋白质发生变性而沉淀。TCA-正丁醇法兼备了上述 2 种方法的优点,利用酸性物质和有机试剂的双重特点使脱蛋白质沉淀,该方法简单快速、总多糖保存率和蛋白质清除率高。

双氧水脱色反应剧烈,可能会影响多糖类成分的生物活性,同时总多糖损失率较大。大孔树脂脱色效果好,但价格较贵、上样量少、脱色周期长。活性炭为黑色多孔颗粒,具有巨大的比表面积,无臭、无味、无毒,脱色成本低,对水溶性色素具有稳定、可靠的脱色效果,还有较高的总多糖保留率,适用于规模化生产。

[参考文献]

[1] 赵越. 六味地黄汤的中药生物制剂及制备方法: 中国, ZL2006101238686[P]. 2007-05-30.

[2] 齐春会, 张永祥, 沈倍奋. 六味地黄方现代药理学研究新进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(1): 57-61.

[3] 杨苑芬, 曾长青, 冯俊卿, 等. 六味地黄汤经光合细菌作用后多糖含量的变化[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(3): 263-264.

[4] 丘婷, 吴思, 陈朋, 等. 六味地黄生物制剂多糖对果蝇抗氧化作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 215-218.

[5] 陈朋, 吴思, 李天河, 等. 六味地黄生物制剂多糖对果蝇寿命及繁殖力的影响[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(4): 427-429.

[6] 汪显阳, 姚春艳. 苯酚-硫酸法测定六味地黄丸中多糖的含量[J]. 黑龙江医药科学, 2000, 23(5): 15-16.

[7] 刘志刚, 颜仁梁, 罗佳波. 白花蛇舌草多糖提取醇沉工艺研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(7): 1584-1585.

[8] 张善玉. 天然产物多糖脱蛋白方法的研究[J]. 中国药房, 2009, 20(33): 2633-2635.

[9] 刘莉, 李泳怡, 潘育方. 荔枝核多糖脱蛋白工艺考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 52-55.

[10] 綦菲, 王昶, 李轶, 等. 单因素考察活性炭脱除麦冬多糖色素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 38-40.

[11] 周统武, 梁志坚, 吴天秀, 等. 熟地多糖活性炭脱色工艺的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(7): 972-975, 994.

[责任编辑 刘德文]