

Plackett-Burman 试验联合响应面试验优选 XDA-7 型 大孔树脂纯化白子菜总多糖的工艺条件

班书贤¹, 倪艳², 孙迎娜², 郭丁丁², 程玉钊², 李媛媛², 刘聪², 贺石麟^{2*}

(1. 山西中医学院, 太原 030619; 2. 山西省中医药研究院, 太原 030012)

[摘要] 目的: 优选 XDA-7 型大孔吸附树脂纯化白子菜总多糖的条件, 为该有效部分的充分利用提供参考。方法: 采用 Plackett-Burman 试验筛选影响总多糖纯化工艺的显著性因素, 以总多糖保留率及蛋白质去除率为因变量, 上样量、流速、洗脱体积、径高比、上样液质量浓度及 pH 为自变量, 通过响应面试验优选白子菜总多糖的纯化条件。结果: 上样量、流速和洗脱体积为影响总多糖纯化效果的显著性因素, 在上样量 $0.93 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (生药材-树脂), 流速 $1.36 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 洗脱剂用量 4.3 BV 的条件下, 白子菜总多糖保留率 93.08%, 蛋白质去除率 49.13%。二者与预测值的相对误差分别为 3.49%, 2.09%。结论: XDA-7 型大孔吸附树脂能较好地保留总多糖、去除蛋白质, 适用于白子菜总多糖的纯化处理。

[关键词] 白子菜; 总多糖; 蛋白质; 保留率; 去除率; 大孔树脂

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0025-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200025

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150826.1524.004.html>

[网络出版时间] 2015-08-26 15:24

Optimization of Purification Technology of Total Polysaccharides from *Gynura divaricata* Stems and Leaves with XDA-7 Macroporous Resin by Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology

BAN Shu-xian¹, NI Yan², SUN Ying-na², GUO Ding-ding², CHENG Yu-chuan², LI Yuan-yuan², LIU Cong², HE Shi-lin^{2*} (1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Taiyuan 030619, China; 2. Shanxi Institute of TCM, Taiyuan 030012, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total polysaccharides from *Gynura divaricata* stems and leaves by XDA-7 macroporous resin. **Method:** Significant factors affecting purification of total polysaccharides were firstly screened by Plackett-Burman test, taking retention rate of total polysaccharides and removal rate of protein as indexes, response surface analysis was adopted to optimize purification technology of total polysaccharides with flow rate, elution volume, ratio of diameter to height, sample volume, sample liquid concentration and pH as independent variables. **Result:** Sample volume, elution volume and flow rate were significant factors affecting purification effect of total polysaccharides. Optimum technology conditions were as follows: sample volume (*G. divaricata* as crude drug) -resin volume ratio of $0.93 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, washed with 4.3 BV of water as eluant, elution flow rate of $1.36 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Retention rate of total polysaccharides and removal rate of protein were 93.08% and 49.13%, respectively. **Conclusion:** XDA-7 macroporous resin has good effect for retention of total polysaccharides and removing protein, while serving as bleaching effect, which indicates that this method can well purity total polysaccharides in *G. divaricata* stems and leaves.

[Key words] *Gynura divaricata*; total polysaccharides; protein; retention rate; removal rate; macroporous resin

[收稿日期] 20150403(012)

[基金项目] 山西省基础研究项目(2014021041-1)

[第一作者] 班书贤, 在读硕士, 从事中药、天然药物药效物质基础研究, Tel:18435158301, E-mail: iy15831438308@163.com

[通讯作者] *贺石麟, 硕士, 药师, 从事中药化学研究, Tel:0351-4668028, E-mail: shilin.he@foxmail.com

白子菜的野生品种主产于广西、福建、海南等地,目前白子菜的人工培育方法已成熟,在北方地区也可正常生长,并保持其品质和优势特性^[1]。白子菜性寒,味咸、微辛,具有清热、舒筋、止血、祛瘀的功效,主治百日咳、风湿痛、骨折、创伤出血、痈肿疮疖^[2]。在广西、福建民间以白子菜为食用野菜,广泛用于防治高血压病、高脂血症及癌症等,被称为“神仙草”^[3-4]。国内外研究报道白子菜所含多糖类成分是其降血糖作用的物质基础之一^[5-7]。

经水提醇沉法得到的白子菜总多糖中常含有蛋白质、鞣质、色素及小分子物质等杂质,常用的多糖纯化方法有 Sevage 法、酶法等,其中 Sevage 法操作繁琐、多糖保留率低;酶法易破坏多糖结构,影响多糖活性^[8]。目前柱色谱法在多糖的纯化中应用较为广泛,大孔吸附树脂是一种高分子大孔吸附剂,具有物化性能稳定、比表面积大、处理能力强等优点^[9],而采用大孔吸附树脂法纯化白子菜总多糖尚未在国内外研究中报道,前期研究通过静态吸附试验考察了5种型号(AB-8, XDA-7, HPD100, D101, HZ3025)树脂,其中 XDA-7 型树脂对白子菜总多糖纯化效果较好, XDA-7 型树脂是带有季胺基团的强碱性树脂,交联结构均匀、孔径分布范围窄、平均孔径大,适于脱除相对分子质量 200 ~ 10 000 带有负电荷的色素和大分子等有机物。

XDA-7 型大孔树脂纯化白子菜总多糖的各个因素均会影响多糖的纯化效果,通过科学的试验设计能使影响因素最佳化,使多糖纯化效果达到最好,Plackett-Burman 试验是一种两水平的试验,以最少的试验次数精确估计因素的主效果,适用于从众多的考察因素中快速筛选显著影响因素^[10]。响应面法采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,寻求最优工艺参数,解决多变量优化问题^[11]。本实验通过 Plackett-Burman 试验筛选出影响树脂纯化条件的显著因子,采用双指标响应面法优化显著因素的水平,得纯化总多糖的最佳工艺条件,为白子菜总多糖的纯化方法选择提供参考。

1 材料

TU-1910 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。白子菜购自山西普净生物科技有限公司,经山西省中医药研究院倪艳主任药师鉴定为菊科植物白子菜 *Gynura divaricata* 的干燥茎和叶;葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-201205),牛血清白蛋白对照品(国

药集团化学试剂有限公司,批号 F20080603),考马斯亮蓝 G-250(天津市光复精细化工研究所),XDA-7 型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白子菜粗多糖的制备^[5] 称取白子菜粗粉 1 kg,加 80% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 1 h,滤过;药渣挥干乙醇后加水回流提取 3 次,每次 1 h,合并水提液,浓缩至适量,加入乙醇至乙醇体积分数达 80%,静置 12 h,离心(转速 3 000 r·min⁻¹, 15 min,下同),沉淀依次用石油醚,95% 乙醇和无水乙醇洗涤,干燥,得白子菜粗多糖。取粗多糖适量,加 10 倍量水溶解,离心,得白子菜总多糖溶液。

2.2 总多糖的含量测定^[12]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 D-葡萄糖对照品适量,加水制成 102.64 mg·L⁻¹ 对照品溶液。

2.2.2 苯酚试液的制备 取苯酚 100 g,加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g,蒸馏,收集沸腾时馏分。称取 5 g,加水 100 mL 溶解,置棕色瓶内冷藏备用。

2.2.3 线性关系考察 精密量取 D-葡萄糖对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置具塞试管中,各加水至 2.0 mL,各精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀;迅速精密加入硫酸 5 mL,摇匀,放置 10 min,置于 40 °C 水浴中保温 15 min,取出,迅速冷却至室温,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法在 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 $A = 58.967C + 0.000\ 02$ ($r = 0.999\ 4$),线性范围 0 ~ 12.83 mg·L⁻¹。

2.2.4 供试品溶液的制备 取白子菜总多糖溶液 10 mL 至 100 mL 量瓶中,加水稀释并定容至刻度,量取 5 mL 加水定容至 100 mL,即得。

2.3 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质^[13]

2.3.1 对照品溶液的制备 取牛血清白蛋白对照品适量,加水制成 0.4 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.3.2 酸性染色液的制备 精密称取考马斯亮蓝 G-250 0.1 g,加乙醇 50 mL 使溶解,加入磷酸 100 mL,加水稀释至 1 L,混匀,滤过,取滤液,即得。置于棕色瓶内,如有沉淀产生,使用前需滤过。

2.3.3 线性关系考察 精密量取牛血清白蛋白对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于具塞试管中,各加水至 1.0 mL,向各管中加入酸性染色液 5 mL,混匀,放置 10 min,以水为空白,在 595 nm 处测定 A,以 A 为纵坐标,C 为横坐标,得回归方程 $A = 0.027C + 0.009\ 6$ ($r = 0.999\ 7$),线性范

围 0 ~ 66.7 mg·L⁻¹。

2.3.4 供试品溶液的制备 取白子菜总多糖溶液 10 mL 至 100 mL 量瓶中,加水稀释并定容,取 5 mL 加水定容至 100 mL,即得。

2.4 树脂的预处理^[14] XDA-7 型大孔吸附树脂加 3 ~ 4 倍量 95% 乙醇浸泡树脂 2 ~ 3 h,加水洗至无醇味,备用。

2.5 纯化工序的显著性影响因素考察 采用 Plackett-Burman 设计法。取白子菜粗多糖 2 g,共 12 份,分别溶于水中,以白子菜总多糖质量分数为

考察指标,在单因素试验基础上,选择径高比、流速、上样量、上样液质量浓度、洗脱体积及 pH 为影响因素。采用 Minitab 16.0 软件进行试验设计及结果统计分析,选择九因子及试验次数为 12 的试验设计,以因素 C, E, I 为空项以估计试验误差,以因素 A, B, D, E, G, H 分别代表径高比,流速, pH, 洗脱体积,上样液质量浓度,上样量,每个因素取 2 个水平,试验安排及结果见表 1, 2。由偏回归系数及显著性检验可知,影响总多糖质量分数的主要因素依次为上样量、洗脱体积和流速。

表 1 白子菜总多糖纯化工序 Plackett-Burman 试验分析

Table 1 Plackett-Burman experimental analysis of purification technology of total polysaccharides from *Gynura divaricata* stems and leaves

No.	A 径高比	B 流速 /mL·min ⁻¹	C (空白)	D pH	E 洗脱体积 /BV	F (空白)	G 上样液质量浓度 /g·mL ⁻¹	H 上样量 /g·g ⁻¹	I (空白)	总多糖 /%
1	1:8	1	0	6	3	0	1:10	2.0	0	19.3
2	1:8	3	0	8	3	0	1:5	2.0	0	23.3
3	1:4	3	0	8	6	0	1:5	0.5	0	27.7
4	1:8	1	0	8	6	0	1:5	0.5	0	28.3
5	1:8	3	0	8	6	0	1:10	0.5	0	41.0
6	1:8	3	0	6	6	0	1:5	2.0	0	23.2
7	1:4	3	0	8	3	0	1:10	0.5	0	31.0
8	1:4	1	0	8	6	0	1:10	2.0	0	32.4
9	1:4	1	0	8	6	0	1:5	2.0	0	22.2
10	1:8	1	0	6	6	0	1:10	0.5	0	20.7
11	1:4	3	0	6	3	0	1:10	2.0	0	34.7
12	1:4	1	0	6	3	0	1:5	0.5	0	28.7

表 2 Plackett-Burman 试验显著性分析

Table 2 Significance analysis of Plackett-Burman experiment

因素	回归系数	T	P	重要性排序
A	0.017 42	3.04	0.093	4
B	0.009 42	1.64	0.242	3
D	-0.010 08	-1.76	0.221	5
E	-0.021 42	-3.74	0.065	2
G	-0.000 92	-0.16	0.888	6
H	0.035 75	6.24	0.025	1

2.6 响应面法优化白子菜总多糖纯化工序 通过水提醇沉法得到的总多糖常含有蛋白质、色素和小分子物质等,故选择总多糖保留率、蛋白质去除率为指标。分别取白子菜粗多糖 2 g,共 17 份,分别溶于水中,在 Plackett-Burman 试验基础上,共设计 15 个试验点,其中 12 个分析点,3 个零点以估计误差,以上样量、流速、洗脱体积为考察因素,通过响应面分

析法优选总多糖纯化工序,试验安排及结果见表 3。采用 Design-Expert 8.0 软件对数据进行统计分析,各因素进行二项式拟合,得多糖保留率(Y)及蛋白质去除率(K)的回归模型分别为 $Y = 95.38 - 3.10X_1 - 5.11X_2 + 1.74X_3 + 1.25X_1X_2 - 4.25X_1X_3 + 0.92X_2X_3 - 8.20X_1^2 - 17.23X_2^2 - 4.68X_3^2$, $K = 44.68 - 2.95X_1 - 0.29X_2 + 5.41X_3 - 8.10X_1X_2 - 4.60X_1X_3 - 2.43X_2X_3 + 22.62X_1^2 + 7.20X_2^2 + 10.90X_3^2$,各因变量的方差分析见表 4, 5。

由方差分析可知,二次多项模型具有显著性,失拟项不显著,说明此回归模型比较理想,利用这 2 个方程拟合 3 个因素与总多糖保留率和蛋白质去除率之间的关系可行。总多糖保留率的决定系数 0.971 6,校正决定系数 0.935 1,说明该模型能解释 93.51% 的响应值。蛋白质去除率的决定系数 0.918 4,校正决定系数 0.813 6,说明此模型能解释 81.36% 的响应值。 $X_1, X_2, X_1X_3, X_1^2, X_3^2$ 对总多糖保留率有显著

表 3 白子菜总多糖纯化工艺响应面试验分析

Table 3 Response surface test analysis of purification technology of total polysaccharides from *Gynura divaricata* stems and leaves

No.	X_1 流速 /mL·min ⁻¹	X_2 上样量 /g·g ⁻¹	X_3 洗脱 体积/BV	总多糖 保留率/%	蛋白质 去除率/%
1	1.0	0.5	4	77.4	72.4
2	2.0	0.5	4	68.6	84.8
3	1.0	1.5	4	68.8	80.4
4	2.0	1.5	4	65.0	60.4
5	1.0	1.0	3	78.8	67.8
6	2.0	1.0	3	81.2	69.0
7	1.0	1.0	5	92.3	96.6
8	2.0	1.0	5	77.7	79.4
9	1.5	0.5	3	80.6	55.8
10	1.5	1.5	3	64.4	67.7
11	1.5	0.5	5	80.7	62.7
12	1.5	1.5	5	68.2	64.9
13	1.5	1.0	4	91.3	48.5
14	1.5	1.0	4	96.4	43.3
15	1.5	1.0	4	97.8	48.8
16	1.5	1.0	4	96.1	42.6
17	1.5	1.0	4	95.3	40.2

表 4 总多糖保留率方差分析

Table 4 Variance analysis of retention rate of total polysaccharides

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	2 149.13	9	238.79	26.63	0.000 1
X_1	76.88	1	76.88	8.57	0.022 1
X_2	209.10	1	209.10	23.32	0.001 9
X_3	24.15	1	24.15	2.69	0.144 8
X_1X_2	6.25	1	6.25	0.70	0.431 4
X_1X_3	72.25	1	72.25	8.06	0.025 1
X_2X_3	3.42	1	3.42	0.38	0.556 3
X_1^2	283.29	1	283.29	31.59	0.000 8
X_2^2	1 249.63	1	1 249.63	139.36	<0.000 1
X_3^2	92.12	1	92.12	10.27	0.015 0
残差	62.77	7	8.97		
失拟项	38.70	3	12.90	2.14	0.234 7
纯误差	24.07	4	6.02		
总和	2 211.90	16			

性影响。 X_1^2, X_3^2 对蛋白质去除率有显著性影响。固定 3 个自变量之一为中心点值, 绘制各指标与其他 2 个自变量的三维曲面图, 见图 1。

2.7 模型验证 通过 Design-Expert 8.0 软件, 按照

表 5 蛋白质去除率方差分析

Table 5 Variance analysis of removal rate of protein

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	3 794.69	9	421.63	8.76	0.004 0
X_1	69.62	1	69.62	1.45	0.268 2
X_2	0.66	1	0.66	0.014	0.910 0
X_3	234.36	1	234.36	4.87	0.063 1
X_1X_2	262.44	1	262.44	5.45	0.052 2
X_1X_3	84.64	1	84.64	1.76	0.226 5
X_2X_3	23.52	1	23.52	0.49	0.507 1
X_1^2	2 154.85	1	2 154.85	44.76	0.000 3
X_2^2	218.12	1	218.12	4.53	0.070 8
X_3^2	500.02	1	500.02	10.39	0.014 6
残差	336.97	7	48.14		
失拟项	279.10	3	93.03	6.43	0.052 0
纯误差	57.87	4	14.47		
总和	4 131.66	16			

优化目标, 得最优工艺条件为流速 1.36 mL·min⁻¹, 上样量 0.93 g·g⁻¹, 水洗脱体积 4.3 BV, 此时总多糖保留率预测值 96.45%, 蛋白质去除率 50.18%。分别取白子菜粗多糖 2 g, 共 3 份, 分别溶于水中, 按最佳工艺条件重复 3 次试验, 计算总多糖保留率平均值 93.08%, 蛋白质去除率 49.13%, 二者与预测值的相对误差分别为 3.49%, 2.09%, 实际值与预测值接近, 说明采用响应面法优化白子菜总多糖的纯化条件稳定可行。

3 讨论

白子菜总多糖具有降血糖、增强机体免疫力、抗肿瘤和耐缺氧等生物活性^[3], 而纯度是研究白子菜总多糖生物活性的首要前提。目前文献报道多集中于白子菜总多糖的生物活性研究, 而关于白子菜总多糖纯化工艺的研究较少。本文采用 Plackett-Burman 试验从影响大孔吸附树脂纯化白子菜总多糖的 6 个因素中筛选出 3 个显著性影响因素, 分别为上样量、洗脱体积和流速。上样液要保持澄清, 在上样之前, 白子菜总多糖溶液须预先经离心后弃去沉淀。如果处理不当, 总多糖溶液中残留的杂质颗粒不仅会吸附于树脂的表面干扰成分的吸附, 还易堵塞树脂床而不利于吸附液的流动。上样量对树脂的吸附有显著性影响, 上样量越大, 树脂对蛋白质的吸附下降, 推测是由于 XDA-7 型树脂已经处于过饱和状态, 不再吸附蛋白质, 导致蛋白质随总多糖溶液直接流出, 起不到去除蛋白质的作用。

总多糖溶液经 XDA-7 型大孔吸附树脂吸附后,

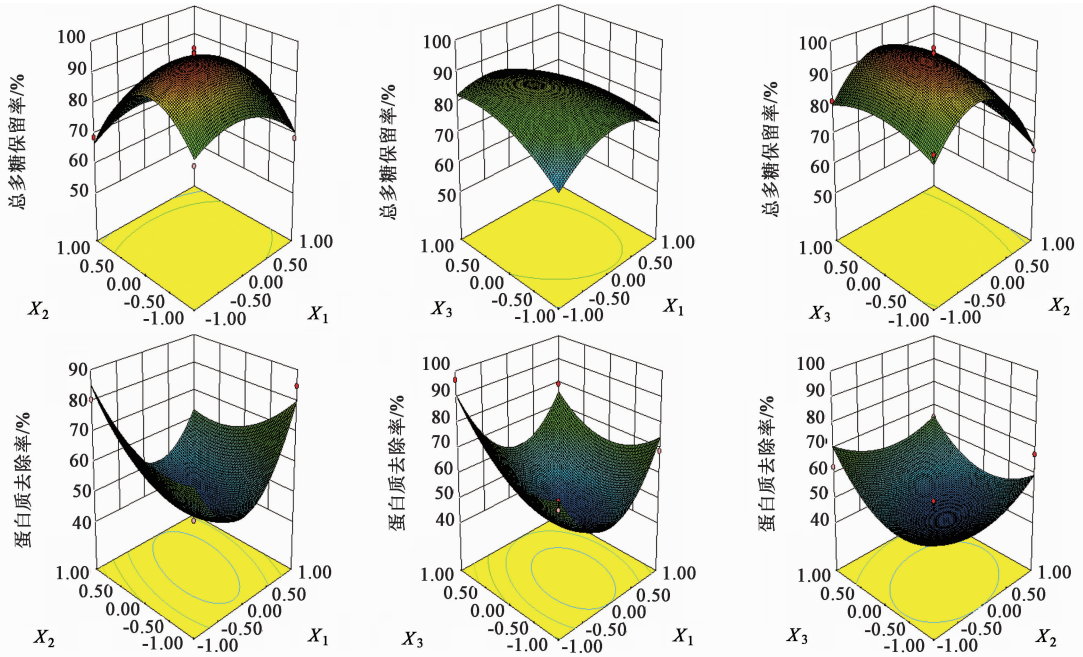


图 1 流速、上样量及洗脱体积对白子菜总多糖纯化工艺影响的响应面

Fig.1 Response surface plot for effects of flow rate, sample volume and elution volume on purification technology of total polysaccharides from *Gynura divaricata* stems and leaves

加水洗脱,如果洗脱体积小,则留在树脂表面和内部的非吸附性杂质成分不能完全去除,影响总多糖的纯度;相反,洗脱体积过大,会使一些吸附较弱的组份一同洗脱掉,使总多糖含量降低,纯化效果下降。此外,总多糖溶液在通过 XDA-7 型树脂时,流速慢,液膜阻力增加,可使总多糖溶液中的蛋白质充分扩散,与树脂上的基团结合从而被吸附,如果流速过快^[15],则液膜阻力降低,总多糖溶液中物质还未扩散到树脂的内表面被其吸附,就已经进入另一个吸附单元,最终化合物还未完全被吸附,溶液就已流过树脂床,降低树脂柱的纯化效率。响应面试验研究影响因素与响应值之间、影响因素之间的相互关系,本文采用 Plackett-Burman 试验和响应面试验,不仅能提高试验精度,还能提高试验结果的预测性,所得试验结果可靠、工艺可行,为白子菜总多糖的纯化工艺研究提供数据支持,具有一定的应用价值。

[参考文献]

[1] 高俊宪. 白子菜的人工培育方法: 中国, ZL201110114588. X[P]. 2011-10-26.
 [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 749.
 [3] 胡勇, 李维林, 林厚文, 等. 白背三七地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 156-158.
 [4] 洗寒梅, 周蓉, 刘雯, 等. 白子菜不同药用部位挥发油的含量测定及其气相色谱-质谱联用分析[J]. 时珍

国医国药, 2008, 19(4): 858-859.
 [5] 张钱钱. 白子草多糖的分离纯化及其降血糖作用研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2014.
 [6] 柯小温. 白子草有效部位的提取纯化及其胶囊的制备[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
 [7] 刘微微. 白背三七多糖的分离表征及 α-葡萄糖苷酶抑制活性研究[D]. 北京: 北京工商大学, 2012.
 [8] 贺石麟, 李肃, 李小贝, 等. 还阳参多糖分离纯化及其单糖组成分析[C]. 烟台: 中国药学会大会暨第 11 届中国药师周论文集, 2011.
 [9] 罗玺, 唐庆九, 张劲松, 等. 灵芝多糖树脂法脱色工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 5-10.
 [10] 杨冀艳, 胡磊, 许杨. Plackett-Burman 设计和响应面法优化荷叶总黄酮的提取工艺[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 29-33.
 [11] 田洪源, 李瑞芳. 响应面法在生物过程优化中的应用[J]. 食品工程, 2010(2): 8-12.
 [12] 盛云杰, 张永生. 基于均匀设计的白术总多糖提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 20-22.
 [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 54.
 [14] 陈巧巧, 萧伟, 万琴, 等. 阳离子交换树脂去除人参多糖中蛋白质的研究[J]. 中草药, 2012, 43(5): 910-914.
 [15] 李厚兵, 任爱农, 邹义芳. 大孔吸附树脂纯化野菊花多糖工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 49-53.

[责任编辑 刘德文]