

冻融-酶解-膜分离复合技术纯化板蓝根多糖的工艺优选

陈智^{1,2}, 陈凯¹, 田景振^{1*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 济南市第二人民医院, 济南 250001)

[摘要] 目的: 优选冻融-酶解-膜分离复合技术纯化板蓝根多糖的工艺。方法: 以板蓝根多糖和剩余蛋白含量为指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察酶解温度、酶解时间、酶用量对板蓝根多糖纯化工艺的影响。结果: 最佳纯化工艺为板蓝根残渣水提取液反复冻融 3 次, 过滤, 按 $3.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 加入蛋白酶 2, 酶解温度 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 酶解时间 3 h, 酶解后用截留相对分子质量 30 kD 中空纤维组件超滤。结论: 优选的纯化工艺稳定可行, 冻融-酶解-膜分离复合技术可用于板蓝根多糖的纯化。

[关键词] 板蓝根; 多糖; 纯化工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0042-03

[doi] 10.11653/syjf2013140042

Optimization of Purification Technology for Polysaccharides from *Isatis indigotica* by Freezing and Thawing-Enzymolysis-Membrane Separation Composite Technology

CHEN Zhi^{1,2}, CHEN Kai¹, TIAN Jing-zhen^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Second People's Hospital, Ji'nan 250001, China)

[收稿日期] 20121121(004)

[基金项目] 山东省重大创新药物综合平台——中药创新药物平台项目(2009ZX09301-013)

[第一作者] 陈智, 博士, 从事中药制剂研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: chen_zhi6088@163.com

[通讯作者] * 田景振, 博士, 教授, 从事中药制剂研究, Tel: 0531-89628080, E-mail: tianjingzhen@163.com

衡时的相对能态的高低, 过高或过低均不利于微粒的物理稳定性。一般认为, Zeta 电位在 $\pm (20 \sim 25) \text{ mV}$ 内微粒分散体系较稳定。但克疣纳米乳选用吐温 80 为表面活性剂, 其本身不能电离, 故 Zeta 电位较低。

[参考文献]

[1] 蔡有龄, 谭淑珍, 吴燕. 中药“疣毒清”对尖锐湿疣病毒杀灭作用的实验研究[J]. 中国性病艾滋病防治, 2002, 8(2): 108.

[2] 谢敏, 邢建国, 王新春, 等. 天山雪莲透皮微乳制备处方优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 8.

[3] 李西林, 栾晶, 王慧, 等. 高乌甲素微乳体外透皮吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 52.

[4] 张鹏威, 苏文琴, 张莉, 等. 家兔静脉注射辣椒碱纳米乳及溶液的药动学比较研究[J]. 中国实验方剂学杂

志, 2010, 16(18): 106.

[5] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(8): 530.

[6] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学·药学分册, 2000, 27(5): 292.

[7] 谢臻, 陈勇, 曾海生, 等. 星点设计-响应面法优选地桃花中总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 27.

[8] 张囡, 康廷国, 尹海波. 星点设计-响应面法优化穿龙薯蓣多糖提取工艺[J]. 中药材, 2011, 34(1): 123.

[9] 谷丽艳, 李学涛, 唐凌. 星点设计优化长春瑞滨静脉注射乳剂的处方[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 21.

[10] 李天傲, 章晔, 冯璇. 纳洛酮微乳的制备及其透皮吸收作用[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(9): 688.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of polysaccharides from *Isatis indigotica* by freezing and thawing-enzymolysis-membrane separation composite technology. **Method:** With the content of polysaccharides from *I. indigotica* and remaining protein as indexes, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to investigate effect of hydrolysis temperature, reaction time and enzyme dosage on purification technology. **Result:** Optimal purification process was as following: repeated freezing and thawing three times of water extract liquid of polysaccharides from *I. indigotica* residue, filtered, added protease 2 with dosage of 35 000 U·g⁻¹, enzymatic temperature for 35 ℃, hydrolysis time of 3 h, then ultrafiltrated with hollow fiber components of interception molecular mass 30 kD. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, freezing and thawing-enzymolysis-membrane separation composite technology could be used to purify polysaccharides from *I. indigotica*.

[Key words] *Isatis indigotica*; polysaccharides; purification technology

板蓝根具有清热解毒、凉血利咽的作用。板蓝根多糖能增加正常小鼠脾质量、白细胞总数及淋巴细胞数^[1]。板蓝根属于根类药材,影响板蓝根多糖纯度的杂质主要为一些蛋白类及多糖提取过程中氧化所产生的色素类物质。本实验首次采用反复冻融-酶解-膜分离复合技术纯化板蓝根多糖,将蛋白类杂质降解成为氨基酸和小肽类物质,进一步通过膜分离的手段将降解后的氨基酸、小肽及提取液中色素类成分去除,从而富集板蓝根多糖。

1 材料

LD4-2A 型低速离心机(北京医用离心机厂),UV 210 型紫外分光光度计(日立公司),101-1 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器总厂),SYC-15 型超级恒温水浴锅(南京桑力电子设备厂)。

蛋白酶 1,2,3(山东安克生物工程有限公司),NUF 中空纤维超滤柱(无锡市超滤设备厂),截留相对分子质量 10,30,50 kD 的中空纤维超滤组件(北京旭邦膜设备有限公司),板蓝根(济南建联中药店,经山东中医药大学药学教研室李峰教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 板蓝根多糖的提取 称取适量板蓝根最粗粉,加 15 倍量 80% 乙醇浸泡 36 h,于径高比 1:7 渗漉提取,渗漉流速 2.4 BV·h⁻¹;将醇渗漉得到的药渣加 16,14 倍量水回流提取 2 次,每次提取 1.5 h,离心,收集上清液,浓缩,定容,即得。

2.2 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝法测定^[2-3]。

2.3 板蓝根多糖纯化工艺优选

2.3.1 反复冻融方法考察 精密量取 2.1 项下水提取液适量,测定多糖含量,置于冰箱中低温冷冻,

冷冻后置于 40 ℃ 水浴中融化,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,用少量水小心洗涤沉淀,分别收集沉淀和上清液(合并水洗液)。将沉淀置于 105 ℃ 烘箱中烘干至恒重,称重,测定上清液中多糖含量。如此反复 4 次,以每次冻融后得到的累计沉淀量及过滤后澄清液体中多糖含量为指标,考察反复冻融次数。结果发现,当反复冻融第 3 次时,2 个考察指标均出现拐点,为缩短生产周期和节省成本,选取反复冻融 3 次。

2.3.2 蛋白酶解工艺优选

2.3.2.1 蛋白酶种类选择 称取经醇渗漉后挥干溶剂得到的板蓝根残渣 30 g,加水提取,反复冻融处理 3 次,将处理后的滤液平均分成 3 份样品,备用。向 3 份样品中均按 1 万 U·g⁻¹ 加入蛋白酶 1、蛋白酶 2、蛋白酶 3,置于各自适宜条件下酶解 2 h,酶解后 85 ℃ 灭活 30 min,过滤,滤液适当稀释后用截留相对分子质量 1 kD 的超滤柱过滤,收集浓缩液,定容,得待测液,测得剩余蛋白含量分别为 20.839,17.581,21.590 mg/20 g 生药,故选择蛋白酶 2。

2.3.2.2 酶解时间考察 称取板蓝根醇渗漉后药渣 40 g,用水提取,反复冻融处理 3 次,将处理后滤液平均分成 4 份,向每份样品中均按 1 万 U·g⁻¹ 加入蛋白酶 2,于 40 ℃ 下分别酶解 1,2,3,4 h,结果显示酶解 3 h 后出现拐点。

2.3.2.3 蛋白酶用量考察 称取板蓝根醇渗漉后药渣 40 g,加水提取,反复冻融处理 3 次,将处理后滤液平均分成 4 份,向每份样品溶液中分别按 1,2,3,4 万 U·g⁻¹ 加入蛋白酶 2,于 40 ℃ 分别酶解 3 h,结果显示加酶量 3 万 U·g⁻¹ 时,剩余蛋白量出现拐点。

2.3.2.4 正交试验优选 称取板蓝根醇渗漉后药渣 90 g,加水提取,反复冻融处理 3 次,将处理后滤液平均分成 9 份,备用。在单因素试验基础上,选定

蛋白酶种类为蛋白酶 2, 选取酶解温度(厂家提供的蛋白酶 2 的酶解温度 35 ~ 45 ℃)、酶解时间、酶用量为考察因素, 每个因素设 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 以剩余蛋白含量为指标进行分析。因素水平表见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 板蓝根多糖酶解工艺优选正交试验因素水平

水平	A 酶用量/万 $U \cdot g^{-1}$	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h
1	2.5	35	2.5
2	3.0	40	3
3	3.5	45	3.5

表 2 板蓝根多糖酶解工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	剩余蛋白/ $mg \cdot g^{-1}$
1	1	1	1	1	17.857
2	1	2	2	2	16.784
3	1	3	3	3	16.227
4	2	1	2	3	15.544
5	2	2	3	1	15.223
6	2	3	1	2	15.647
7	3	1	3	2	13.587
8	3	2	1	3	14.302
9	3	3	2	1	14.028
K_1	16.957	15.663	15.937	15.703	
K_2	15.470	15.433	15.450	15.340	
K_3	13.973	15.303	15.013	15.357	
R	2.984	0.360	0.924	0.363	

表 3 酶解工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	13.350	2	52.976	<0.05
B	0.199	2	0.790	>0.05
C	1.280	2	5.079	>0.05
D(误差)	0.25	2		

由直观分析可知, 各因素影响酶解效果作用主次为 $A > C > B$; 方差分析表明因素 A 对酶解效果具有显著性意义, 其他因素则无显著性影响, 结合生产实际考虑, 确定最佳酶解工艺 $A_3B_1C_2$, 即酶用量 3.5 万 $U \cdot g^{-1}$, 酶解温度 35 ℃, 酶解时间 3 h。

2.3.3 超滤膜纯化酶解后的水提液 称取醇渗漉后板蓝根残渣 80 g, 加水提取, 反复冻融处理 3 次, 按最佳酶解工艺进行酶解, 得酶解后样品溶液, 等分成 4 份, 备用。取出 3 份, 均适当稀释相等倍数, 分别用截留相对分子质量为 10, 30, 50 kD 的中空纤维

超滤柱进行滤过, 控制相同流速, 富集纯化多糖。结果多糖纯度分别为 46.63%, 60.72%, 65.38%, 多糖回收率分别为 70.85%, 64.34%, 50.37%, 故选择截留相对分子质量 30 kD 的中空纤维超滤组件。

2.4 验证试验 精密量取醇渗漉后板蓝根残渣 80 g, 按优选的纯化工艺进行 3 次验证试验, 结果多糖纯度均 > 60% (RSD 4.35%), 多糖回收率均 > 60% (RSD 3.31%), 说明该工艺稳定可靠。

3 讨论

目前对板蓝根多糖的研究还不是很深入, 多糖中相应药理活性的靶物质还不清楚, 本试验纯化板蓝根多糖的目的并不是期望得到某一或某些单一组分的多糖, 而是尽可能将杂质去除以得到纯度较高的多组分构成的板蓝根多糖。蛋白质含量测定时, 选取优于其他几种方法的考马斯亮蓝法^[2-7], 以避免由于标准曲线斜率不同而产生的主客观误差^[8], 并且该方法操作较为简单、灵敏度较高。采用冻融-酶解-膜分离复合技术纯化板蓝根多糖, 具有可避免在除蛋白环节中采用有机试剂、减少在多糖富集过程中乙醇用量、减少后续工作中回收溶剂的耗能, 既能更好地保证生产安全性, 又能更充分节约生产成本。

[参考文献]

- [1] 马莉, 冯少华, 唐健元, 等. 不同制备工艺板蓝根多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响[J]. 中国药房, 2007, 18(3): 169.
- [2] 李彬, 陈万生, 赵阳, 等. 四倍体板蓝根中的苯丙素类成分[J]. 中草药, 2005, 36(3): 326.
- [3] 何轶, 鲁静, 林瑞超. 板蓝根化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(9): 377.
- [4] 梁军, 夏永刚, 杨炳友, 等. 麻黄多糖中蛋白含量测定及脱蛋白方法的比较[J]. 中医药学报, 2011, 39(2): 73.
- [5] 何黎黎, 杨立开, 邓黎, 等. S9 代谢活化酶系统制备及蛋白含量的测定[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2010, 36(2): 243.
- [6] 周东凯, 富雪, 菲吴刚, 等. 一种蛋白质含量测定方法的改进研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(18): 44.
- [7] 李丽. 妊高征血浆纤维结合蛋白含量测定及其临床意义[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(10): 79.
- [8] 柏健, 肖慧, 何结炜, 等. 板蓝根化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 271.

[责任编辑 全燕]