

大孔吸附树脂纯化野菊花多糖工艺

李厚兵¹, 任爱农^{2*}, 邹义芳¹

(1. 江苏大学药学院,江苏 镇江 212013; 2. 江苏省中医药研究院,南京 210028)

[摘要] 目的:研究大孔吸附树脂对野菊花多糖中所含色素和蛋白质的脱除性能。方法:比较 LSA-700B,LSA-21,D101,XDA-8,AB-8,XDA-7 6 种不同型号大孔吸附树脂对野菊花多糖的纯化效果;以脱色率、蛋白质去除率和多糖保留率作为考察指标,探讨温度、多糖质量浓度、pH、转速、流速 5 个因素对其纯化性能的影响。结果:LSA-21 树脂对野菊花多糖的纯化效果较为理想;最佳工艺为温度 40 ℃,多糖质量浓度 7 g·L⁻¹,pH 5,转速 180 r·min⁻¹,流速 3 BV·h⁻¹,径高比 1:8。在此条件下脱色率 80.90%,蛋白质去除率 52.84%,多糖保留率 82.59%。结论:LSA-21 大孔吸附树脂对野菊花多糖可以获得较高的纯化效率和多糖保留率。

[关键词] 大孔吸附树脂;野菊花;多糖;脱色;除蛋白

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)02-0049-05

Purification Technology of Polysaccharide from *Chrysanthemum indicum* by Macroporous Adsorption Resin

LI Hou-bing¹, REN Ai-nong^{2*}, ZOU Yi-fang¹

(1. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;
2. Jiangsu Provincial Insititute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] Objective:To study on elution property of pigment and protein contained in polysaccharide from *Chrysanthemum indicum*. Method:Compared six different types of macroporous resin (LSA-700B,LSA-21,D101,XDA-8,AB-8,XDA-7) for purification effect of polysaccharide from *C. indicum* by selecting three indicators of decoloration rate, deproteinization rate and retained rate of polysaccharide; and investigated influence of temperature, polysaccharide concentration, pH, rotational speed and elution rate on purification property. Result: Optimum purification conditions of resin LSA-21 were as follows: temperature 40 ℃, polysaccharide concentration 7 g·L⁻¹, pH 5, rotational speed 180 r·min⁻¹ elution rate 3 BV·h⁻¹, diameter/height ratio 1:8. In these conditions, decoloration rate was up to 80.90%, deproteinization rate was 52.84% and retained rate of polysaccharide was 82.59%. Conclusion: High purification ratio and retained rate of polysaccharide could be obtained by means of purification with LSA-21 macroporus resin.

[Key words] macroporous adsorption resin; *Chrysanthemum indicum*; polysaccharide; decoloration; deproteinization

野菊花为菊科植物野菊的干燥头状花序,又称
疔疾草、苦蕒、山菊花等,具有清热解毒、疏风平肝之

功效^[1]。具有广谱抗菌、抗炎、解热、抗血小板凝
集、降压、抗氧化的药理作用^[2];野菊花多糖(CIP)
具有增强免疫力、抗衰老和清除活性氧自由基等方
面作用^[3-4]。

目前,野菊花多糖的提取多采用常规的水提醇
沉方法^[5]。该方法得到的多糖产品纯度较低,含有
大量色素、蛋白质等杂质,不仅影响野菊花多糖的
生物活性,也阻碍了对其组成结构与生物活性关系
的深入研究。有关野菊花多糖的纯化研究尚未见报

[收稿日期] 20110410(006)
[第一作者] 李厚兵,硕士研究生,从事天然药物研究工作,
Tel:025-85639647, E-mail: adrance-li@163.com
[通讯作者] *任爱农,研究员,硕士生导师,从事天然药物研
究工作, Tel: 025-85639647, E-mail: lyyy-0 @
126.com

道。传统的多糖纯化工艺中除蛋白和脱色素方法主要有 *Sevage* 法,该法除蛋白过程烦琐、时间长、试剂损耗量大;三氯乙酸法虽然效率高,但其酸性环境容易对多糖结构产生破坏作用。活性炭脱色法的多糖解析率差,损失量大^[6-7];双氧水氧化法脱色,会因为双氧水的氧化性对多糖结构产生的破坏,使多糖的生物活性受到影响^[8]。并且在工艺处理过程中,上述的除蛋白和脱色方法均要分步进行,耗时长,工作效率低。本研究利用大孔吸附树脂的多孔结构和选择性吸附功能,探讨纯化多糖时同步去除色素和蛋白质的可行性,提出了大孔吸附树脂纯化野菊花多糖新工艺。

1 仪器与试剂

TC-6K 型电子天平(常熟双杰测试仪器厂),SHZ-ⅢB 型循环水真空泵(上海华琦科学有限公司),贝克曼-DU640 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司),pHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),R-200 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司),HHS-1 型电热恒温水浴锅(上海浦东荣丰科技仪器有限公司),SHZ-82 型恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司),MILLI-Q 型超纯水机(美国 MILLI-Q 公司),玻璃色谱柱(20 mm×280 mm,55 mm×700 mm)。野菊花(江苏南京药业股份有限公司中药饮片厂),经江苏省中医药研究院任爱农教授鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。大孔吸附树脂 LSA-700B,LSA-21,D101,XDA-8,AB-8,XDA-7(西安蓝晓科技有限公司)。牛血清白蛋白(Sigma 公司),葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 08040723)。其他试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 野菊花多糖供试品溶液的制备 取干燥的野菊花药材 500 g,以水为提取溶剂,按料液比 1:32,于 90 ℃ 水浴中浸提 1 h,连续提取 3 次,过滤,合并水提液,将水提液浓缩至原体积的 1/4,加入 5 倍量的 95 % 乙醇静置 24 h。醇沉后的沉淀抽滤后依次用无水乙醇、丙酮、乙醚进行洗涤,干燥后得野菊花粗多糖粉末,加水配制成 7 g·L⁻¹ 的野菊花多糖溶液,作为供试品溶液。

2.2 分析方法

2.2.1 多糖的测定及保留率的计算 采用蒽酮-硫酸法^[9],以葡萄糖为对照品,线性回归方程为 $A = 7.1785C - 0.0203$ ($R^2 = 0.9996$)。式中 A 为吸光

度, C 为以葡萄糖计的多糖质量浓度。

多糖保留率 = $M_2/M_1 \times 100\%$

式中 M_1, M_2 分别为脱色前后的多糖总质量。

2.2.2 色素的测定及脱色率的计算 调节待测多糖溶液至中性,经 4 500 r·min⁻¹ 离心后过滤,然后测定 420 nm 处的吸光度。

脱色率 = $(A_1 - A_2)/A_1 \times 100\%$

式中 A_1 为脱色前吸光度; A_2 为脱色后吸光度。

2.2.3 蛋白质的测定及去除率的计算 蛋白质测定采用考马斯亮蓝 G-250 法测定^[10],以牛血清白蛋白为对照品,线性回归方程为 $A = 8.6297C + 0.02436$ ($r = 0.9990$)。式中 A 为吸光度; C 为蛋白质质量浓度(g·L⁻¹)。

蛋白质去除率 = $(C_1 - C_2)/C_1 \times 100\%$

式中 C_1, C_2 分别为脱色前和脱色后蛋白质的质量浓度。

2.3 树脂静态吸附

2.3.1 大孔吸附树脂型号的筛选 精密称取预处理过的树脂 LSA-700B,LSA-21,D101,XDA-8,AB-8,XDA-7 各 1.0 g,分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中,并分别加入野菊花多糖供试品溶液 40 mL,调 pH 5,密塞,放入振荡器中恒温 40 ℃、转速 180 r·min⁻¹ 振荡 8 h。静置、过滤、离心、取上清液,按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率。结果见表 1,LSA-21 大孔吸附树脂的多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率均较高,故选择 LSA-21 大孔吸附树脂为最佳树脂进行后续试验。

表 1 6 种树脂的静态吸附				%
树脂种类	脱色率	蛋白质去除率	多糖保留率	
LSA-700B	84.30	57.93	49.01	
LSA-21	80.67	53.60	81.70	
D101	70.51	36.31	59.43	
XDA-8	46.28	40.13	66.49	
AB-8	23.30	39.15	78.36	
XDA-7	59.51	41.20	66.02	

2.3.2 LSA-21 大孔吸附树脂的静态吸附曲线 精密称取 LSA-21 大孔吸附树脂 1.0 g,加入 40 mL,pH 5 的野菊花多糖供试品溶液,密塞,置于振荡器中恒温 40 ℃、转速 180 r·min⁻¹ 振荡 8 h。实验过程中,每隔 1 h 取上清液,按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率,绘制 LSA-21 大孔吸附树脂静态吸附曲线。结果见图 1,4 h 后树脂达到吸附平衡,故后续实验振荡时间定为 4 h。

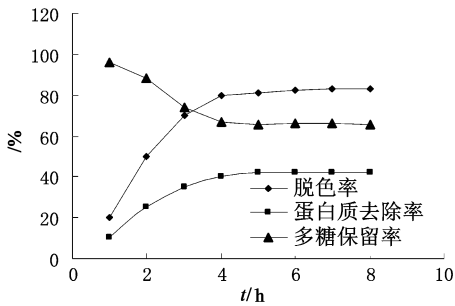


图1 LSA-21树脂的静态吸附曲线

2.3.3 温度对 LSA-21 大孔吸附树脂静态吸附的影响 精密称取 LSA-21 大孔吸附树脂 1.0 g 5 份,各加入 40 mL, pH 5 的野菊花多糖供试品溶液, 密塞, 置于振荡器中, 转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 分别在 20, 30, 40, 50, 60 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 4 h。静置、过滤、离心、取上清液, 按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率。结果见图 2, 40 $^{\circ}\text{C}$ 时脱色率显著高于其他温度, 而蛋白质去除率和多糖保留率无显著变化, 并且鉴于实际生产的可行性, 本研究选择于室温下进行树脂动态吸附试验。

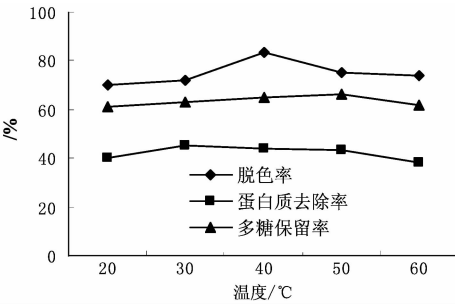


图2 温度对 LSA-21 树脂静态吸附的影响

2.3.4 pH 对 LSA-21 大孔吸附树脂静态吸附的影响 精密称取 LSA-21 大孔吸附树脂 1.0 g 5 份, 各加入 40 mL 野菊花多糖供试品溶液, 分别用盐酸调节 pH 2, 3, 4, 5, 7, 密塞, 放入振荡器中恒温 40 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 4 h。静置、过滤、离心、取上清液, 按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率。结果如图 3 所示, pH 高于 5 时蛋白质去除率显著下降, 多糖的保留率和脱色率仍然处于较高水平, 故选择野菊花多糖溶液的最佳 pH 5。

2.3.5 野菊花多糖溶液质量浓度对 LSA-21 大孔吸附树脂静态吸附的影响 精密称取 LSA-21 大孔吸附树脂 1.0 g 5 份, 分别加入质量浓度为 1, 3, 5, 7, 9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的野菊花多糖溶液 40 mL, 调 pH 5, 密塞, 放入振荡器中, 恒温 40 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 4 h。静置、过滤、离心、取上清液, 按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率。结果如图 4

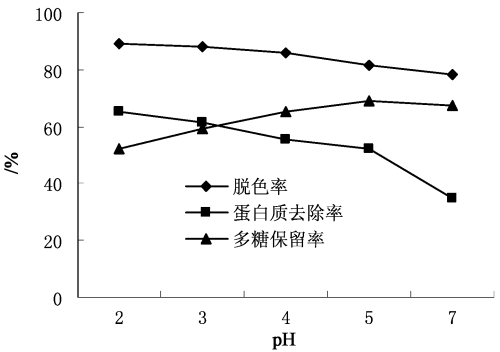


图3 pH 对 LSA-21 树脂静态吸附的影响

所示, 质量浓度 $<7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着质量浓度升高, 脱色率和蛋白质去除率均略有下降, 多糖保留率呈升高趋势; 质量浓度 $>7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脱色率和蛋白质去除率显著下降, 多糖保留率趋于平衡, 故选择野菊花多糖质量浓度为 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

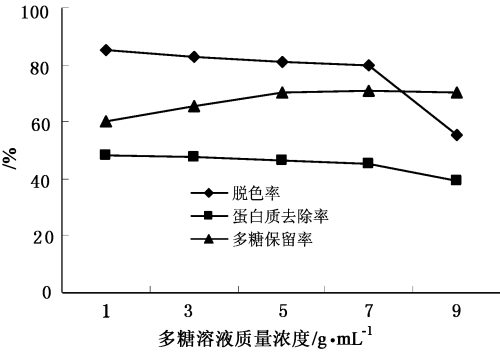


图4 多糖质量浓度对 LSA-21 树脂静态吸附的影响

2.3.6 振荡转速对 LSA-21 大孔吸附树脂静态吸附的影响 精密称取 LSA-21 大孔吸附树脂 1.0 g 6 份, 各加入 40 mL, pH 5 的野菊花多糖供试品溶液, 密塞, 置于振荡器中, 恒温 40 $^{\circ}\text{C}$, 分别在转速 120, 140, 160, 180, 200, 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下振荡 4 h。静置、过滤、离心、取上清液, 按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率。结果见图 5, 转速处于 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 脱色率、蛋白质去除率有增高趋势, 但是, 对多糖保留率影响不显著, 故选择振荡转速为 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.4 树脂动态吸附试验 取 LSA-21 大孔吸附树脂适量, 按一定径高比湿法装柱。取野菊花供试品溶液 40 mL, 调 pH 为 5, 以一定流速通过交换柱, 采用 Molish 反应跟踪检测, 呈阳性时开始接收流出液, 上样完毕后, 以 pH 5 的蒸馏水为洗脱剂进行洗脱, 接受洗脱液至 Molish 反应呈阴性为止。

2.4.1 不同流速对 LSA-21 大孔吸附树脂动态吸附的影响 取 40 mL 野菊花多糖供试品溶液 3 份, 调

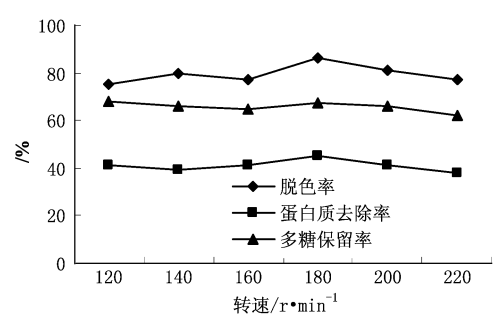


图 5 转速对 LSA-21 树脂静态吸附的影响

pH 5, 分别于 2, 3, 4 BV·h⁻¹ 的流速下进行动态考察。Molish 反应跟踪检测, 接受流出液和洗脱液, 按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率。结果如图 6 所示, 2, 3, 4 BV·h⁻¹ 的流速时多糖保留率无明显区别; 2, 3 BV·h⁻¹ 时, 脱色率相近, 而蛋白质去除率在 3 BV·h⁻¹ 时有下降趋势, 但是, 4 BV·h⁻¹ 时, 脱色率和蛋白质吸附率显著下降, 故选择流速为 3 BV·h⁻¹。

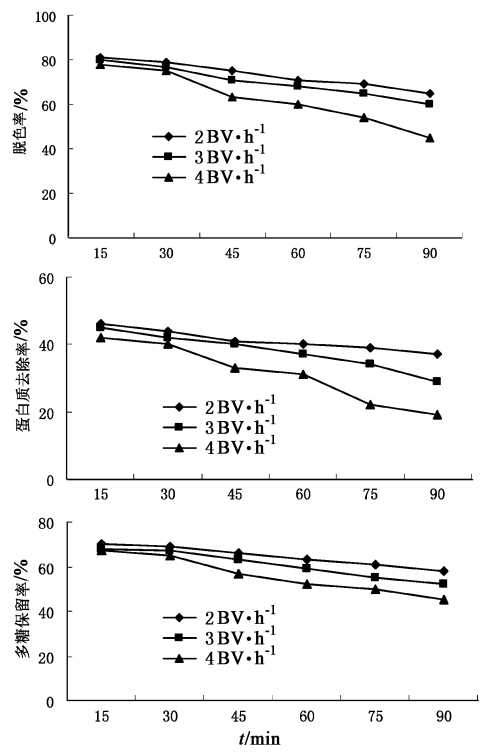


图 6 流速对 LSA-21 树脂动态吸附的影响

2.4.2 不同径高比对 LSA-21 大孔吸附树脂动态吸附的影响 取 40 mL 野菊花多糖供试品溶液 3 份, 调 pH 5, 流速为 3 BV·h⁻¹, 分别于径高比 1:6, 1:8, 1:10 进行考察。Molish 反应跟踪检测, 接受流出液和洗脱液, 按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率。结果见图 7, 径高比 1:8 时的多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率均显著高于 1:6, 1:10, 故选择径高比为 1:8。

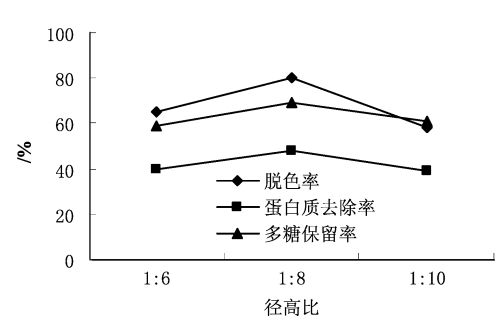


图 7 径高比对 LSA-21 树脂动态吸附的影响

2.5 工艺验证试验 取 500 mL 野菊花多糖供试品溶液 3 份, 按照上述最佳工艺条件进行试验, 并按 2.2 项下方法计算多糖保留率、脱色率和蛋白质去除率的平均值分别为 82.59%, 80.90%, 52.84%。表明在此工艺条件下, LSA-21 大孔吸附树脂纯化野菊花多糖切实可行, 可以获得较高的纯化效率和多糖保留率。

3 讨论

大孔吸附树脂具有吸附容量大, 吸附速度快, 解吸条件温和, 再生处理方便, 使用周期长, 节省费用等诸多优点。采用大孔吸附树脂脱色和去除蛋白质, 与传统的 sewage 法除蛋白质和活性炭脱色方法相比较, 具有可同步去除野菊花多糖中的色素和蛋白质的功能, 纯化效率和多糖保留率都较高, 且其工艺操作简便, 省时省力, 能极大地减少试剂的损耗量, 利于环保。

温度对树脂的吸附有一定的影响, 温度越高, 吸附率越高, 在实际生产中适当升高温度可缩短吸附达到饱和的时间, 提高效率, 但吸附反应又是一放热反应, 温度过高, 解吸速率加大, 反而不利于树脂的吸附^[11], 而实际生产中更要考虑温度控制的可操作性问题, 所以选择吸附温度要适当。

在大孔吸附树脂的吸附过程中, 多糖溶液的 pH 影响也尤为重要。图 3 数据显示, 随着 pH 的升高, 蛋白质去除率呈现明显的下降趋势, 脱色率也有所下降, 而多糖保留率则呈上升趋势, pH 5 时, 多糖保留率较高, 且脱色率和蛋白质去除率相对较高。由此可见, 多糖溶液适宜的 pH, 对提升吸附效率至关重要。

多糖溶液在通过大孔吸附树脂柱时, 流速慢, 有利于上柱时多糖溶液中色素和蛋白质分子与树脂表面充分进行粒扩散和膜扩散, 使色素和蛋白质分子充分被树脂吸附; 相反, 流速过快, 液膜阻力降低, 使树脂交换容量降低, 从而降低树脂柱的纯化效率, 所以, 流速也是影响吸附的重要因素之一。

超声法提取远志中细叶远志皂苷的工艺优选

孙于杰,王莹,侯林,丁嘉信,霍雨佳,田景振*
(山东中医药大学 药学院,济南 250355)

[摘要] 目的:优选细叶远志皂苷超声提取工艺。方法:以细叶远志皂苷提取率为指标,在单因素试验的基础上,采用正交实验设计分别对提取溶剂、提取时间、料液比进行考察。结果:超声法提取细叶远志皂苷的最佳提取工艺为 90% 乙醇提取 40 min,料液比 1:10。结论:提取工艺较稳定可行,超声提取法节约时间、能源。
[关键词] 细叶远志皂苷; 超声法; 正交设计
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2012)02-0053-03

远志为常见中药,始载于《神农本草经》,列为上品。具有安神益智、祛痰、消肿功效,用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚、咳痰不爽、疮疡肿毒、乳房肿痛等^[1]。远志的主要成分为皂苷、寡糖酯、Xanthone 以及少量生物碱等,而皂苷类成分是远志的主要活性成分^[2-4]。对于远志皂苷的提取及含量测定方法主要有香草醛-高氯酸比色法^[5],超声提取-紫外分光光度法^[6],乙醇回流提取以远志酸为对照品 HPLC 法^[7]。由于远志总皂苷所含皂苷种类较多,且尚有多种皂苷类成分结构尚不明确,故之前的提取工艺及含量测定方法均不具有

普遍代表性。而细叶远志皂苷是远志总皂苷类碱水解的共同产物。因此,优选细叶远志皂苷的提取工艺对于远志总皂苷的进一步研究具有意义深远。

1 材料

日立 L-2000 型高效液相色谱仪(日本日立),BS110S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司)。

远志购自安国东方药城,经本校生药教研室周凤琴教授鉴定为远志科植物远志 *Polygalae tenuifolia* Wild. 的干燥根,细叶远志皂苷购自成都曼思特生物科技有限公司(批号 20100913)。甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 细叶远志皂苷含量测定

2.1.1 色谱条件 Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.05% 磷酸水溶液(60:40),柱温 25 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm。

2.1.2 供试品溶液的制备^[1]取本品粉末(过三号

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:295.
[2] 高学敏,钟赣生.实用中药学[M].北京:中国中医药出版社,2006:190.
[3] 李贵荣.野菊花多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J].中国公共卫生,2002,18(3):269.
[4] Hisashi Matsuda. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity[J]. Chem Pharm Bull,2002,50(6):788.
[5] 房海灵,郭巧生,申海进.响应面法优化野菊花多糖含量测定的前处理条件[J].中国中药杂志,2009,34(13):1665.
[6] 和殿峰,李跟区,陈爱娜.正交试验优选鱼腥草多糖

活性炭脱色工艺[J].中国药房,2009,20(6):434.
[7] 孙明礼,付会鹏,张静.半枝莲多糖脱色及清除羟基自由基作用的研究[J].离子交换与吸附,2008,24(4):305.
[8] 张锦雀,黄丽英,苏聪枚.中草药多糖提取分离纯化研究进展[J].中药材,2008,31(11):1760.
[9] 林颖,吴毓敏,吴雯.天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究[J].天然产物研究与开发,1996,8(3):5.
[10] 谢红旗,周春山.香菇多糖脱色工艺研究[J].离子交换与吸附,2007,23(2):158.
[11] 黄贱苟,徐满才,李海涛.D301树脂对酚类的吸附热力学研究[J].离子交换与吸附,2003,19(1):37.

[责任编辑 仝燕]