

掌叶大黄多糖超滤工艺优选

李芸¹, 苗小楼², 魏舒畅^{1*}, 吴平安¹, 刘峰林¹, 李秀娟³

- (1. 甘肃中医学院 甘肃省高校中藏药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000;
2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050; 3. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

[摘要] 目的:探讨超滤膜技术分离纯化掌叶大黄多糖的可行性工艺。方法:采用正交设计法优选超滤前离心条件;以超滤压力、料液温度及料液浓度为考察因素,以粗多糖得率和含量为考核指标,均匀设计优选超滤工艺参数。结果:最佳超滤条件为药液以3 000 r·min⁻¹离心处理12 min,用分子截留量10万的膜,超滤压力为0.05~0.09 MPa,药液温度40℃,药材与提取液质量比1:10~1:30,pH 6.0,超滤膜先用tween-80(5 g·L⁻¹)处理10 min。结论:优化所得超滤工艺与未超滤相比有较高的多糖得率和含量。超滤技术可用于纯化、富集掌叶大黄多糖,具有产业化开发前景。

[关键词] 掌叶大黄多糖;超滤;纯化工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0055-04

Optimization of Ultrafiltration Technology for Polysaccharides from *Rheum palmatum*

LI Yun¹, MIAO Xiao-lou², WEI Shu-chang^{1*}, WU Ping-an¹, LIU Feng-lin¹, LI Xiu-juan³

(1. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of College of Gansu Province, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Lanzhou Institute of Animal & Veterinary Pharmaceuticals Sciences, Chinese Academic of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China; 3. Gansu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To study on separation and purification feasible process of polysaccharides from *R. palmatum* by ultrafiltration. **Method:** Centrifugation conditions were optimized by orthogonal test before

[收稿日期] 20111015(002)

[基金项目] 甘肃省教育厅第二批科研项目(0806B-07)

[第一作者] 李芸,硕士,副教授,从事中药材加工炮制、中药活性成分提取分离和质量标准研究,Tel:13893362959,E-mail:liyunherb@163.com

[通讯作者] *魏舒畅,硕士,教授,硕士生导师,从事中药新剂型与工艺研究,E-mail:wshch006@163.com

为14.02%,13.98%,14.07%,13.95%;盐酸巴马汀质量分数分别为10.74%,10.71%,10.81%,10.95%;盐酸小檗碱质量分数分别为50.42%,50.49%,50.58%,50.51%。可见黄连软化、切制工艺具有良好的稳定性和重复性,适合于工业化大生产。

[参考文献]

- [1] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008.
[2] 张广利,徐杰,徐同印. 喷润法切制黄连小经验[J]. 时

珍国医国药,1999,10(1):39.

[3] 中国药典. 一部[S]. 2010:286.

[4] 张洪利,康大力,黄艳萍,等. 多指标正交试验优化姜黄连炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):14.

[5] 许冬瑾,杨克义,陈华师,等. 清炒关黄柏炮制工艺的优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):28.

[6] 张凡,叶鹏,李峰,等. 黄柏软化和切制的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):21.

[责任编辑 仝燕]

ultrafiltration, ultrafiltration technology parameters were optimized by uniform design with yield and content of polysaccharides as indexes, and ultrafiltration pressure, liquid temperature and liquid concentration were selected as investigated factors. **Result:** Optimum ultra-filtration process was: centrifuged 12 min with $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, membrane with 10^5 molecular interception, ultrafiltration pressure 0.05-0.09 MPa, liquid temperature $40\ ^\circ\text{C}$, ratio of solid-liquid 1:10-1:30, pH 6.0, ultrafiltration membrane was pretreated 10 min with tween-80 ($5\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). **Conclusion:** Optimized ultrafiltration process could obtain higher yield and content of polysaccharides while compared with non-ultrafiltration. Ultrafiltration technology could be used for purification and enrichment of polysaccharides from *R. palmatum* with industrial development prospect.

[**Key words**] polysaccharides from *Rheum palmatum*; ultra-filtration; purification process

掌叶大黄是大黄药材的主流品种,其水溶性成分大黄多糖是主要有效成分之一。药理研究表明大黄多糖具有降血糖、减轻肝损伤、治疗应激性溃疡、抗肿瘤、增强免疫功能、抗衰老、抗血栓和治疗心脑血管疾病等作用^[1]。由于其药理作用广泛,低毒又具有独特的生物活性,开发成药品或保健食品,都具有广阔的应用前景。大黄多糖传统纯化方法主要是水提醇沉法^[2-10],相关报道较多,但未明确大黄的具体种类。本试验采用中空纤维超滤膜对掌叶大黄多糖进行了分离纯化,对超滤前预处理条件、超滤条件进行系统研究,并于传统水提醇沉法比较,寻找有效的掌叶大黄多糖纯化工艺,为多糖产业化生产提供理论依据和技术指导。

1 材料

掌叶大黄(购自甘肃礼县洮坪乡平阳村农户,经魏舒畅教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* 的根及根茎),葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110833-200503),浓硫酸、苯酚、无水乙醇、五氧化二磷均为分析纯,超纯水自制。

超滤膜,中空纤维膜组件(聚砜),MIF503 型截留相对分子质量 100 K 和 VEOS503 型 6 K(外型尺寸 $50\ \text{mm} \times 386\ \text{mm}$,温度 $4 \sim 45\ ^\circ\text{C}$,操作压力 0.1 MPa,天津膜天膜工程技术有限公司),蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司),DD-5 M 型低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),UV-1800PC 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),BS124S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

2 方法与结果

2.1 工艺流程 取大黄药材粗粉 150.0 g,以 16 倍量水回流提取 2 次,每次 3 h,滤过,合并提取液,静置 24 h,提取液离心,经截留相对分子质量为 100 K 的膜超滤,超滤液常压浓缩至稠膏状,真空干燥($80.5\ ^\circ\text{C}$, $0.06 \sim 0.07\ \text{MPa}$),测定多糖得率及含量。

2.2 多糖含量测定方法的建立

2.2.1 绘制标准曲线 精密称取在 $105\ ^\circ\text{C}$ 干燥至恒质量的葡萄糖对照品 25.3 mg,置 100 mL 量瓶中,加水适量使溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL,分别置 10 mL 量瓶中,依次加入 0.9,0.8,0.7,0.6,0.5,0.4,0.3 mL 水至 1.0 mL,加入新制 5% 苯酚溶液 1.5 mL,摇匀,迅速沿瓶壁加入浓硫酸 6.0 mL,摇匀,放凉,加水定容至刻度,置沸水浴中显色 15 min,立即转入冷水浴冷却至室温(放置约 15 min),以 1.0 mL 水按同法显色作为空白,于 485 nm 处测定吸光度,以吸光度(A)对质量浓度(C)进行线性回归,葡萄糖在 $2.53 \sim 25.3\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,回归方程为 $A = 0.049\ 3C - 0.000\ 4$ ($r = 0.997\ 9$)。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取各样品浸膏粉 0.9 g,加水溶解并定容至 20 mL,加乙醇使含醇体积分数达 30%,静置,离心($4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min),取上清液,水浴浓缩至 5 mL,加乙醇使醇体积分数达 80%,离心($10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 3 min),取沉淀,加水转移并定容至 100 mL,过滤,精密吸取续滤液 2 mL,定容至 25 mL,即得。

2.2.3 精密度试验 精密量取同一对照品溶液($10.12\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 mL,按标准曲线方法显色,连续 5 次测定 A, RSD 0.38%。说明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取供试液 0.5 mL,依法显色,分别在 0, 15, 30, 60, 90, 120 min 测定 A, RSD 1.26%。说明供试品溶液于 2 h 内稳定。

2.2.5 回收率试验 精密称取葡萄糖对照品 5 份,分别加入已知含量的总多糖样品液中,按含量测定方法测定,结果平均回收率 98.2%, RSD 1.99%。说明该方法稳定可行。

2.2.6 样品含量测定 精密吸取上述供试品溶液 0.5 mL,加水使至 1.0 mL,按标准曲线同法显色,测定 A,计算多糖含量。

2.3 超滤工艺优选

2.3.1 药液的预处理 为防止超滤膜的堵塞,降低膜的寿命,超滤前采用离心技术对药液进行预处理,选用正交设计确定最佳离心条件。因素水平见表1,正交试验安排及结果见表2,3。

表1 大黄多糖超滤工艺正交试验因素水平

水平	A 转速/ $r \cdot \min^{-1}$	B 时间/min
1	3 000	16
2	4 000	12
3	5 000	8

表2 大黄多糖超滤工艺正交试验安排

No.	A	B	AB	误差	多糖含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药	药液澄明 度/分
1	1	1	1	1	124.98	6
2	1	2	2	2	126.67	7
3	1	3	3	3	121.53	5
4	2	1	2	3	119.93	8
5	2	2	3	1	118.84	7
6	2	3	1	2	116.44	7
7	3	1	3	2	119.02	8
8	3	2	1	3	120.02	9
9	3	3	2	1	132.89	8
多糖含量	K_1	373.18	363.93	361.44	376.71	
	K_2	355.21	365.53	379.49	362.13	
	K_3	371.93	370.86	359.39	361.48	
	R	17.97	6.93	20.01	15.23	
药液澄明度	K_1	18	22	22	21	
	K_2	22	23	23	22	
	K_3	25	20	20	22	
	R	7	3	3	1	

注:药液澄明度满分为10分。药液透明、无可见悬浮物者为10分;药液不透明、有多量可见悬浮物者为1分;每个试验号重复3次(偏差 $<3\%$),取平均值。

由表3结果可知,对于多糖含量,因素A,B均无统计学意义,表明因素A,B对结果影响不大,任一水平优化即可;对于药液澄明度,离心转速是主要影响因素,提高转速可提高药液澄明度,但本试验所用最高转速为 $5\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,使用时有严重发热现象。故最终确定选 A_1B_2 ,即 $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心12 min。此工艺条件下,多糖损失较小,且药液澄明度较好。按所选最佳条件对药液进行预处理,进行3批验证试验,结果每克生药中平均含多糖284.97

表3 超滤工艺方差分析

项目	方差来源	SS	f	MS	F	P
多糖含量	A	67.116	2	33.558	1.358	
	B	8.777	2	4.389	0.178	
	AB	81.557	2	40.779	1.650	
	误差	49.439	2	24.720		
药液澄明度	A	8.222	2	4.111	37.000	<0.05
	B	1.556	2	0.778	7.000	
	AB	1.556	2	0.778	7.000	
	误差	0.222	2	0.111		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

mg,药液澄明度评分平均8.67。说明离心工艺稳定可行。

2.3.2 超滤膜的选择 参照文献[4-7],唐古特大黄多糖相对分子质量分布为 $6 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$, $5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$, $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$, $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$,小于 2×10^5 ,其中分布在 $1.17 \times 10^4 \sim 1.31 \times 10^4$ 较多,同科植物应有相似性,故选择截留相对分子质量100 K膜。

2.3.3 超滤膜表面的动态改性 采用tween-80($5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)处理超滤膜表面5,10,15 min,在室温、压力0 MPa条件下测定超滤前后膜通量下降率,优选膜使用前的动态改性方法,用tween-80($5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)处理膜表面10 min即可获得较理想效果。

本文采用tween-80($5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)处理膜表面10 min,可避免部分大分子亲水物质以及无机离子产生死吸附,对膜造成不可逆的污染,有效降低超滤膜的通量下降率、延长膜使用寿命。

2.3.4 超滤工艺参数均匀设计优化 在预实验的基础上,选用截留相对分子质量100 K超滤膜,以料液温度、压力、料液浓度为考察因素,以多糖得率、多糖含量为考察指标,因素水平设置见表4,均匀设计试验安排见表5。

表4 大黄多糖超滤工艺均匀设计试验因素水平

水平	A 压力 /MPa	B 温度 / $^{\circ}\text{C}$	C 浓缩程度/药材 与提取液质量比
1	0.09	40	1:30
2	0.08	35	1:25
3	0.07	30	1:20
4	0.06	25	1:15
5	0.05	20	1:10

分别以多糖含量、多糖得率为因变量(\hat{y}),压力

表 5 大黄多糖超滤工艺均匀设计试验方案

No.	A	B	C	干膏得率 /%	多糖含量 /mg·g ⁻¹ 干膏
1	1	2	4	22.07	277.40
2	2	4	3	19.25	262.20
3	3	1	2	30.02	307.60
4	4	3	1	24.25	295.80
5	5	5	5	17.17	231.10

(A)、超滤温度(B)、料液浓度(C)为自变量,利用 SPSS 13.0 统计软件,分别以 Backward(向后剔除法)、forward(向前引入法)、stepwise(逐步引入-剔除法)等多种方式进行多元线性回归分析,结果多糖含量和得率分别得到相同的回归方程和方差分析结果。多糖含量的回归方程 $\hat{y} = 173.9 + 3.364B$ ($F = 11.125, P = 0.045$); 多糖得率的回归方程 $\hat{y} = 5.440 + 0.570B$ ($F = 14.011, P = 0.033$)。由两方程可知,超滤温度对结果影响显著,取值越大, \hat{y} 越大,故本试验选用 40 ℃(超滤膜最高允许温度为 45 ℃)。根据试验结果,最佳超滤工艺条件应为药液温度 40 ℃,压力 0.05 ~ 0.09 mPa,药液浓缩程度 1:10 ~ 1:30, pH 6.0。

按优化条件进行试验,结果干膏平均得率为 30.57%,每克干膏中多糖平均含量为 275.84 mg。3 批试验的多糖含量和得率与预测值均很接近,表明该超滤工艺条件稳定。

2.4 传统水提醇沉 取大黄药材粗粉 150.0 g,以 16 倍量水回流提取 2 次,每次 3 h,滤过,合并提取液,放置过夜后,取上清液,浓缩至料液比 1:3,乙醇体积分数 85%,静置过夜,抽滤,沉淀干燥得多糖粗品,计算粗多糖平均得率 14.75%,多糖平均含量 112.38 mg·g⁻¹干膏。

3 讨论

试验在最初设计时,曾考虑对经预处理的药液先经截留相对分子质量 100 K 膜超滤,除去相对分子质量 > 10 万的大分子杂质,超滤液继续用截留相对分子质量 6 K 膜超滤,除去小分子杂质,使大黄多糖得到进一步纯化。但预实验发现,用 6 K 膜超滤时,超滤膜通量下降很快,超滤速度很慢,且无法通过调节转速(300 ~ 530 r·min⁻¹),来改进,这与文献[9]报道的超滤时间控制在 80 min 有很大出入。可能原因是大黄多糖与色素结合紧密,并含有少量黏

性物质,易吸附、沉淀在膜表面,造成膜孔堵塞,导致膜通量急剧下降,因此用截留相对分子质量 6 K 膜的超滤,滤速太慢,耗时太长,不适合产业化生产。

大黄水提液黏度较大,为提高超滤效率,必须进行药液预处理。试验采用多糖保留率和澄明度作为评价指标,可防止离心时除去絮状悬浮物而损失大分子多糖。为了避免实验中淀粉等对多糖含量测定造成干扰,本试验采用两步醇沉法^[11],先将提取液醇沉,使乙醇终浓度达 30%,去除一些大分子杂质,再第二次醇沉,使乙醇终浓度达 80%,使多糖沉淀,取沉淀物测定多糖含量,可以避免此弊。但由于未除蛋白等进一步纯化处理,因此,所得多糖含量均较低。

超滤法所得粗多糖得率和含量均高于传统水提醇沉。该研究表明,用超滤膜纯化技术可以纯化、富集掌叶大黄多糖,具有工艺简单,所得制品收率高、纯度好,具有产业化的开发前景。

[参考文献]

- [1] 谢燕,李国文,马越鸣. 大黄多糖研究进展[J]. 中国新药杂志,2010,19(9):755.
- [2] 纪耀华,马爱民,孙莹,等. 大黄多糖传统水提法最佳工艺优化研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(3):634.
- [3] 孙莹,纪跃芝,马爱民,等. 水提-醇沉法提取大黄多糖工艺优化研究[J]. 中国实用医药,2010,5(18):6.
- [4] 刘莉,王志鹏,梅其炳,等. 大黄多糖提取工艺对糖含量和糖醛酸含量的影响[J]. 中国药理学杂志,2003,38(10):748.
- [5] 董艳,高瑞昶,潘勤,等. 超滤和纳滤分离技术提取纯化地黄低聚糖的研究[J]. 中草药,2008,39(3):359.
- [6] 陈彦,贾晓斌,范晨怡,等. 注射用红参多糖的提取纯化工艺研究[J]. 中成药,2006,28(5):645.
- [7] 魏舒畅,余琰,王志旺,等. 补阳还五汤超滤工艺优选条件的评价与优化[J]. 中成药,2009,31(2):304.
- [8] 魏舒畅,冯晓莉,张英明,等. 元胡提取液 3 种纯化方法的对比研究[J]. 中国药房,2010,21(39):3691.
- [9] 李淑莉,刘振丽,宋志前. 超滤膜截留分子量对双黄连口服液超滤效果的影响及与醇沉法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(5):3.
- [10] 孙瑜,周永传,陈德勳. 超滤法纯化大黄多糖[J]. 中国中药杂志,2009,34(2):165.
- [11] 李芸,苗小楼,魏舒畅,等. 掌叶大黄多糖提取工艺及定量方法优化研究[J]. 中成药,2011,33(11):2011

[责任编辑 仝燕]