

KBT-ZTC 絮凝纯化合欢皮多糖的工艺研究

韩伟, 韩乐, 孙晓海

(华东理工大学 中药现代化工程中心, 上海 200237)

摘要:文章研究了 KBT-ZTC 絮凝剂对合欢皮总多糖的絮凝纯化工艺, 通过单因素和正交实验, 得到优化的工艺条件: KBT-ZTC 的 A、B 组分质量体积比为各 0.40 mL/g, 絮凝温度 35 °C, 絮凝时间 2 h, 药液浓缩比 1:10, 得到多糖保留率、脱蛋白率和纯度分别为 90.81%、52.89% 和 49.65%, 均高于水提醇沉工艺的纯化效果。

关键词:合欢皮; 多糖; 絮凝; 纯化; KBT-ZTC

中图分类号: TQ461 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-358X(2014)01-0001-06

合欢皮(又作合昏皮), 是一味传统中药, 性味甘平、无毒, 具有解郁安神、活血消肿的功效^[1], 而越来越多的研究发现其具有多种现代医学应用, 如抗生育、抗过敏、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫调节以及镇静催眠等作用^[2-8]。近期研究表明, 合欢皮活性成分之一为多糖类物质, 具有抗肿瘤和免疫调节的活性^[9-10], 极具开发利用价值。

絮凝是利用絮凝剂的作用, 使中药水提液中的蛋白质、胶体、鞣质等微粒沉降, 通过过滤实现分离纯化的方法。KBT-ZTC 絮凝剂是一种常用的有机絮凝剂, 包括有 A、B 两种组分, 其中 A 组分能吸附溶液中的杂质, 起主要絮凝作用, B 组分通过再架桥作用辅助絮凝^[11]。近年来, 絮凝剂逐步应用于中药有效成分的分离纯化过程, 但有关合欢皮多糖絮凝纯化的研究尚未见报道。

本文以多糖保留率和脱蛋白率为指标, 考察 KBT-ZTC 絮凝剂对合欢皮总多糖提取液的絮凝纯化效果, 通过数据分析, 优化工艺条件, 并与传统水提醇沉工艺的各项指标进行比较。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV1900PC 紫外—可见分光光度计, 上海亚研电子有限公司; SHB-III 型循环水真空泵, 巩义市英峪予华仪器厂; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市英峪予华仪器厂; AL104 电子天平, METTLER TOLEDO; RE-52C 旋转蒸发器, 上海予华仪器有限公司; RJ-TGL-16C 台式高速离心机, 无锡市瑞江分机仪器有限公司; pH5-3C 型酸度计, 上海理达仪器厂。

无水乙醇、苯酚、硫酸均为分析纯; 葡萄糖为标准品(>95%), 上海天莲精细化工有限公司; 牛血清白蛋白和考马斯亮蓝 G-250 均为分析纯, 上海源聚生物科技有限公司; KBT-ZTC 澄清剂, 上海科立尔生物科技有限公司; 去离子水, 华东理工大学自制; 合欢皮药材, 购于上海虹桥药业有限公司。

1.2 样品制备及分析方法

1.2.1 标准品溶液的制备

1) 葡萄糖标准品的制备

精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖标准品 50 mg, 置于 500 mL 容量瓶中, 加去离子水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.10 mg/mL 葡萄糖溶液。

2) 牛血清白蛋白标准溶液的制备

称取 0.02 g 结晶牛血清白蛋白, 用去离子水溶解稀释并定容至 100 mL, 配制成 0.20 mg/mL 标准蛋白

收稿日期: 2013-12-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(20006003); 国家大学生创新计划项目(111025124)

作者简介: 韩伟(1968—), 男, 江苏宝应人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事天然产物的提取、分离及功能研究。

质溶液.

1.2.2 样品溶液的制备

称取一定量的合欢皮药材,于10倍量95%工业乙醇中回流提取2h,冷却,回收乙醇,残渣挥干溶剂,干燥至恒重.精确称取经预处理后的合欢皮样品50g,加入适量去离子水,加热回流2h,冷却至常温,过滤,滤渣再提取1次,合并两次提取液,减压浓缩,定容备用.

1.2.3 试剂的配制

1)考马斯亮蓝试剂的制备

称取100mg考马斯亮蓝G-250,溶于50mL95%乙醇中,然后加100mL85%磷酸,用去离子水稀释定容至1000mL,过滤,即得.

2)KBT-ZTC絮凝剂的配制

称取A组分1.25g,加入少量去离子水,搅拌溶解,然后加入需要量的去离子水,溶胀24h,搅拌,配置成5%的溶液备用.称取B组分1.25g,先加入少量去离子水搅拌成糊状,然后加入需要量的去离子水,溶胀24h,搅拌,配置成5%的溶液备用.

1.2.4 分析方法及计算

1)合欢皮总多糖含量的测定

采用苯酚—硫酸法^[12],于485nm处测定不同浓度标准葡萄糖溶液的吸光度,绘制标准曲线,得线性回归方程.准确移取2mL样品溶液,采用苯酚—硫酸法测定吸光度,根据回归方程计算样品溶液中总多糖的质量浓度,合欢皮总多糖的质量为

$$M(\text{mg}) = C \times V.$$

多糖保留率为

$$M_2 / M_1 \times 100\%,$$

式中: C 为样品中总多糖的质量浓度(mg/mL), V 为溶剂体积(mL), M_1 为絮凝前溶液总多糖质量(mg), M_2 为絮凝后溶液总多糖质量(mg).

2)蛋白质的测定

采用考马斯亮蓝G-250染色法^[13],于595nm处测定不同质量浓度牛血清白蛋白标准溶液的吸光度,绘制蛋白质标准曲线,得线性回归方程.取样品溶液1mL,采用考马斯亮蓝G-250染色法测定吸光度,根据回归方程计算样品中的蛋白质质量浓度,蛋白质质量为

$$N(\text{mg}) = C \times V.$$

脱蛋白率为

$$(N_1 - N_2) / N_1 \times 100\%,$$

式中: C 为蛋白质的质量浓度(mg/mL), V 为溶液体积(mL), N_1 为絮凝前溶液蛋白质质量(mg), N_2 为絮凝后溶液蛋白质质量(mg).

3)合欢皮多糖质量分数的计算方法为

$$\frac{C'V'}{M} \times 100\%.$$

式中: C' 为药液中总多糖的质量浓度(mg/mL), V' 为药液体积(mL), M 为药液浓缩后的干膏质量(mg).

1.3 絮凝实验方法

移取经浓缩的药液50mL,在电磁搅拌状态下,缓慢加入一定量的A组分,将样品水浴保温一定时间后,向体系中缓慢加入与A组分等量的B组分,继续水浴保温1h后取出,离心分离,取上清液,用于测定.

2 结果与分析

2.1 标准曲线方程的建立

根据葡萄糖标准曲线得到线性回归方程: $A = 14.2380 C - 0.00086$,该方程在0.0105~0.0735mg/mL范围内 $R^2 = 0.9995$.

根据牛血清白蛋白标准曲线,得线性回归方程: $A = 4.5337 C - 0.0332$, $R^2 = 0.9991$,且在0.02~0.20mg/mL范围内线性关系良好.

2.2 絮凝试验的单因素考察

2.2.1 KBT-ZTC 加入量的考察

合欢皮多糖保留率和脱蛋白率随絮凝剂加入量呈现如图 1 所示的变化趋势. 药液浓缩比 1 : 10, 絮凝温度 50 °C, A、B 组分加入间隔时间 1 h.

当 KBT-ZTC 加入量较少时, KBT-ZTC 分子与胶体颗粒和杂质的碰撞几率较小, 难以发生吸附架桥和电中和作用; 随着絮凝剂加入量的增加, 碰撞几率增大, 絮凝效果加强, 脱蛋白率增加, 多糖保留率降低. 当絮凝剂加入量为 2~4 mL 时, 絮凝作用逐步达到饱和, 脱蛋白率和多糖保留率变化趋缓, 过量的絮凝剂存在易使胶体和蛋白质表面发生二次吸附, 产生絮凝恶化现象, 使脱蛋白率下降. 综合考虑, 选择 A 组分加入量约为 2 mL (即 0.4 mL/g 生药量) 时较为适宜.

2.2.2 絮凝温度的考察

絮凝温度对 KBT-ZTC 絮凝纯化多糖效果的影响见图 2. 药液浓缩比 1 : 10, A、B 组分加入量各 2 mL, 加入间隔时间 1 h.

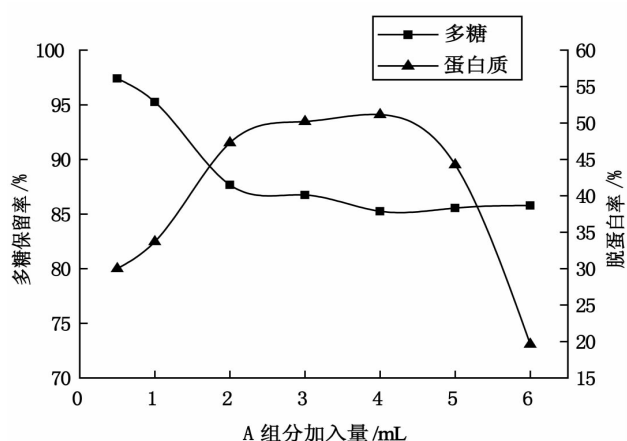


图 1 KBT-ZTC 的加入量对絮凝纯化多糖效果的影响

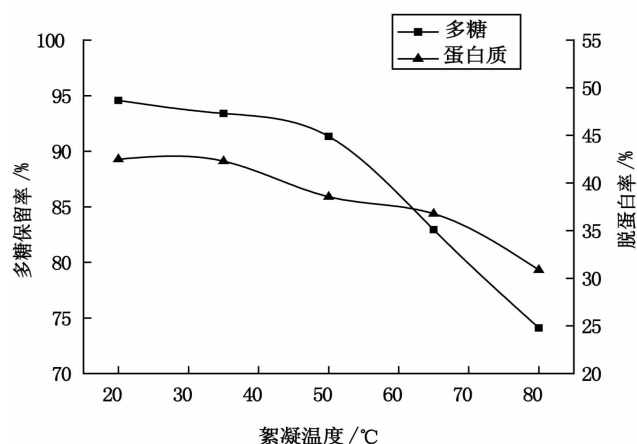


图 2 絮凝温度对 KBT-ZTC 絮凝纯化多糖效果的影响

多糖保留率在 35 °C 之前变化较小, 随着温度的升高, 多糖含量逐渐降低; 而脱蛋白率随温度的升高先缓慢降低, 高于 50 °C 时, 则迅速降低. 这是由于 KBT-ZTC 絮凝剂对温度较敏感, 在较低温度即可实现较好的絮凝作用, 脱蛋白率和多糖保留率均较高; 随温度的升高, 溶液中高分子链收缩, 缩短了架桥长度, 絮凝效果变差, 脱蛋白率下降, 同时, 由于吸附的选择性降低, 使得多糖亦有所损失. 当温度高于 50 °C 时, 易使溶液中 KBT-ZTC 高分子链的结构产生破坏, 絮凝作用减弱. 综上, 絮凝温度选择 35 °C 为宜.

2.2.3 药液浓缩比的考察

药液浓缩比对絮凝纯化多糖效果的影响见图 3. A、B 组分各 2 mL, 加入间隔时间 1 h, 絮凝温度 35 °C.

多糖保留率在浓缩比 (g/mL) 在 1 : 4 到 1 : 10 之间变化不大, 而脱蛋白效果均较差, 浓缩比 (g/mL) 在 1 : 10 左右时, 脱蛋白效果较好. 这是因为当药液浓度过高时, 溶液黏度较大, 分子间距较小, 吸附架桥与电中和作用较难进行, 脱蛋白效果较差, 多糖等有效成分也容易被絮团等粘附而损失; 而药液浓度过低时, KBT-ZTC 的高分子链较为分散, 分子间距大, 与微粒碰撞几率较低, 脱蛋白率降低, 同时多糖损失减少. 因此, 选择药液浓缩比 (g/mL) 为 1 : 10 左右较为适宜.

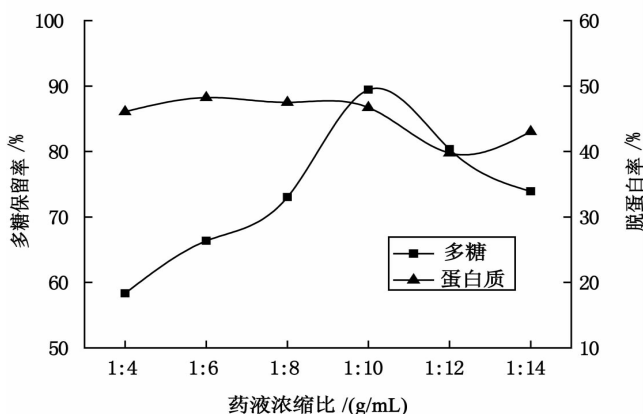


图 3 药液浓缩比对絮凝纯化多糖效果的影响

2.2.4 A、B 组分加入间隔时间的考察

A、B 组分加入间隔时间对絮凝纯化效果的影响如图 4 所示. 药液浓缩比 1 : 10(g/mL), 絮凝温度 35 °C, A、B 组分加入量各 2 mL.

多糖保留率和脱蛋白率开始时较低, 是因为当 KBT-ZTC 两组分同时加入时, A 组分对蛋白质的吸附作用不完全, 但 B 组分的再架桥作用迅速发生, 生成絮体沉淀, 包裹了部分有效成分, 造成多糖保留率和脱蛋白率均较低; 当间隔时间超过 15 min 时, A 组分的吸附作用增强, 除去蛋白质的同时也沉降了药液中的有效成分, 因此脱蛋白率增大, 多糖保留率降低; 随着间隔时间的进一步延长, 絮凝剂选择性提高, 脱蛋白率增加, 多糖保留率逐步上升, 在间隔时间超过 2 h 后, 体系中微粒间的相互作用达到了平衡, 多糖保留率和脱蛋白率变化趋缓. 因此, 选择间隔时间为 2 h 左右.

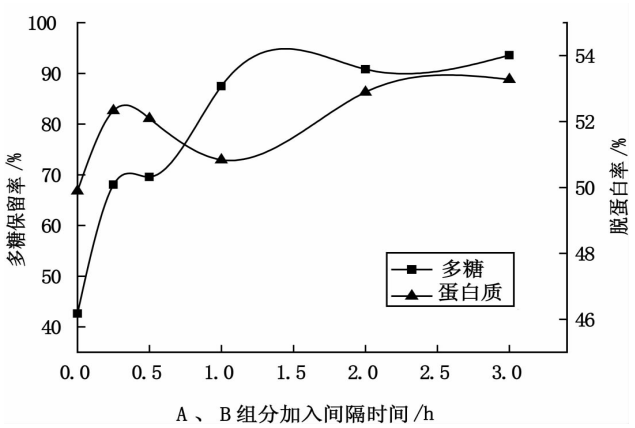


图 4 A、B 组分加入间隔时间对 KBT-ZTC 絮凝纯化多糖效果的影响

2.3 正交试验

1) 正交实验的因素选取

通过单因素实验的考察, 选取 KBT-ZTC 用量、药液浓缩比例与絮凝温度 3 个因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 优化工艺条件. 表 1 为 KBT-ZTC 絮凝纯化因素水平表.

表 1 KBT-ZTC 絮凝纯化 $L_9(3^4)$ 因素水平表

水 平	A	B	C
	KBT-ZTC 用量/(mL/g)	絮凝温度/°C	药液浓缩比/(g/mL)
1	0.5	35	1 : 10
2	1.0	50	1 : 12
3	2.0	65	1 : 14

2) 正交实验的结果分析

以多糖保留率与脱蛋白率为指标, 根据 $L_9(3^4)$ 正交设计安排实验, 实验结果与极差分析见表 2, 多糖保留率、脱蛋白率方差分析分别如表 3 和表 4 所示.

表 2 KBT-ZTC 絮凝纯化实验结果与分析表

No.	水 平				实 验 值	
	A	B	C	D	多糖保留率/%	脱蛋白率/%
1	1	1	1	1	87.27	43.53
2	1	2	2	2	85.96	37.51
3	1	3	3	3	91.09	32.38
4	2	1	2	3	83.49	42.54
5	2	2	3	1	96.78	36.88
6	2	3	1	2	87.96	43.92
7	3	1	3	2	92.16	41.12
8	3	2	1	3	95.95	48.55
9	3	3	2	1	91.80	41.50
多 糖 保 留 率	K_1	88.11	87.64	90.39	91.95	
	K_2	89.41	92.90	87.08	88.69	
	K_3	93.30	90.28	93.35	90.18	
	R	5.19	5.26	6.27	3.26	

续表 2

No.	水平				实验值	
	A	B	C	D	多糖保留率/%	脱蛋白率/%
脱蛋白率	K_1	37.81	42.39	45.33	40.67	
	K_2	41.11	40.98	40.54	40.85	
	K_3	43.75	39.29	36.79	41.16	
	R	5.94	3.10	8.55	0.49	

表 3 多糖保留率方差分析表

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	43.8316	2	21.9158	2.7492	0.2667
B	41.4529	2	20.7265	2.6000	0.2778
C	58.8572	2	29.4286	3.6916	0.2131
误差	15.9434	2	7.9717		

表 4 脱蛋白率方差分析表

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	53.2321	2	26.6160	148.1038	0.0067
B	14.4689	2	7.2344	40.2557	0.0242
C	109.8931	2	54.9466	305.7479	0.0033
误差	0.3594	2	0.1797		

以表 2 中的多糖保留率为评价指标,3 因素对纯化工艺的影响作用依次为:C(药液浓缩比)>B(絮凝温度)>A(KBT-ZTC 用量),最佳工艺条件为 $A_3B_2C_3$,但由表 3 可知,各因素对多糖保留率均无显著性影响。

以表 2 中的脱蛋白率为评价指标,3 因素对纯化工艺的影响作用依次为:C(药液浓缩比)>A(KBT-ZTC 用量)>B(絮凝温度),最佳工艺条件为 $A_3B_1C_1$,表 4 中 $P_A < 0.05, P_B < 0.05, P_C < 0.05$,即 KBT-ZTC 用量、絮凝温度、药液浓缩比例 3 个因素对于脱蛋白率的影响有统计学意义。

综合考虑,本实验选择优化的工艺条件为 $A_3B_1C_1$,与絮凝时间单因素考察中第五组的实验条件相符(KBT-ZTC 用量 A、B 组份各为 0.40 mL/g 生药量,絮凝温度 35 ℃,药液浓缩比 1:10),此时,脱蛋白率为 52.89%,多糖保留率为 90.81%。

2.4 与传统水提醇沉工艺的比较

絮凝纯化:根据上述优化后的工艺条件,对合欢皮总多糖提取液进行絮凝纯化,取上清液,进行测定,并减压浓缩至浸膏状,真空干燥,称定重量,根据公式计算总多糖的纯度。

水提醇沉:向浓缩后的合欢皮总多糖提取液中加入适量无水乙醇,直至乙醇体积分数达到 80%左右,放置冰箱醇沉 24 h,离心取沉淀。将沉淀用无水乙醇、丙酮洗涤数次后,真空干燥,得粗多糖,称定重量。将粗多糖用去离子水溶解,定容,测定多糖浓度,计算总多糖的纯度。

絮凝纯化工艺与水提醇沉法的各项指标比较结果如表 5。

表 5 不同纯化工艺的比较

纯化工艺	指 标	%		
		脱蛋白率	多糖保留率	纯度
KBT-ZTC 絮凝		52.89	90.81	49.65
水提醇沉		31.07	35.81	23.79

由表5可知,KBT-ZTC絮凝纯化合欢皮多糖后的多糖保留率、脱蛋白率和多糖纯度分别为水提醇沉工艺结果的2.54倍、1.71倍和2.09倍。

3 结论

1)采用KBT-ZTC絮凝剂对合欢皮多糖提取液进行絮凝纯化处理,通过单因素和正交实验研究,确定了优化的工艺条件:A、B组分加入量各为0.40 mL/g生药量,絮凝温度35℃,药液浓缩比1:10(g/mL),A、B组分加入间隔时间2 h,此时多糖保留率高达90.81%、脱蛋白率高达52.89%。

2)通过与传统醇沉工艺纯化效果的各项指标进行比较可以得出,水提醇沉工艺虽然脱蛋白效果较好,但多糖损失严重,而KBT-ZTC絮凝纯化工艺的有效成分保留率和纯度均较高,纯化效果较好,且实验周期短,操作简便,明显优于传统的醇沉工艺,可以作为现代中药制药工艺改革的方向。

参考文献:

- [1] 郑虎占. 中药临床应用备要之二十四[J]. 中国临床医生, 2012, 40(12): 67-69.
- [2] 马锦媚, 孙秀义, 毛福祥, 等. 合欢总甙抗早孕作用的机理研究[J]. 中国药学杂志, 1995, 30(2): 111.
- [3] 乔善义, 蔚冬红, 郭继芬, 等. 合欢皮抗炎活性部位的LC-MS分析[J]. 分析测试学报, 2005, 24: 19-23.
- [4] 刘玲艳. 合欢皮不同提取组分抗肿瘤新生血管作用的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [5] Jung M J, Chung H Y, Kang S S, et al. Antioxidant activity from the stem bark of albizzia julibrissin[J]. Archives of Pharmacal Research, 2003, 26(6): 458-462.
- [6] 李浩飞, 方明月. 五种养心安神中药的抗惊厥作用初探[J]. 中国医学导报, 2008, 5(28): 19-20.
- [7] 霍长虹, 郝存淑, 李作平, 等. 合欢皮水煎剂催眠作用的药理实验研究[J]. 河北医科大学学报, 2002, 23(4): 216-217.
- [8] Tsuyoshi I, Junei K, Toshihiro N, et al. Structures of julibrosides in albiziae cortex and synthesis of neosaponins by chemical trans-glycosylation[J]. Tennen Yuki Kagob-Iltsu Toronkai Koen Yoshishu, 1997, 39: 169-174.
- [9] 韩莉, 崔景荣. 合欢皮多糖对S180荷瘤小鼠的抑瘤及免疫调节作用的研究[J]. 实用医学进修杂志, 2000, 28(3): 144-146.
- [10] 田维毅, 武孔云, 白惠卿. 合欢皮红细胞免疫活性成分及其机制的研究[J]. 四川中医, 2003, 21(10): 17-19.
- [11] 张三平. 吸附澄清剂在中药制剂中的应用研究[J]. 中国药房, 2008, 19(6): 461-464.
- [12] 黎晶晶, 徐格非. 苯酚-硫酸法测定灵芝多糖含量的研究[J]. 杭州化工, 2008, 38(1): 23-26.
- [13] 南亚, 李宏高. 考马斯亮蓝G-250法快速测定牛乳中的蛋白质[J]. 饮料工业, 2007, 10(12): 41-42.

Study on the Process of Flocculating Purification of Total Polysaccharides from Albizzia Julibrissin Durazz by KBT-ZTC Flocculant

HAN Wei, HAN Le, SUN Xiao-hai

(Engineering Center for Traditional Chinese Medicine Modernization,
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The essay is aimed at studying the flocculating purification of total polysaccharides from Albizzia julibrissin Durazz by using KBT-ZTC. Through single factor and orthogonal experiment, the optimum conditions were obtained as follows; the dosage of KBT-ZTC's component A and B were 0.4 mL/g respectively, temperature was 35℃, flocculation time was 2 h, drug density was 1:10. Under the optimum conditions, the polysaccharide retention rate, protein removal rate and the purity of polysaccharide were 90.81%, 52.89%, 49.65% respectively, which is superior to that of the traditional method of extracting with water and depositing with alcohol.

Key words: Albizzia julibrissin Durazz; polysaccharide; flocculate; purification; KBT-ZTC flocculant

(编辑 崔思荣)