

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 1 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	多糖	A 反应温度/	B 氯磺酸与吡啶的体积比	C 反应时间/h	D (误差)	DS/%	糖质量分数/%
1	sEPS ₁	60	1 6	1	1	0.097	31.843
2	sEPS ₂	60	1 8	2	2	0.484	62.474
3	sEPS ₃	60	1 10	3	3	1.120	50.949
4	sEPS ₄	80	1 6	3	2	0.772	49.938
5	sEPS ₅	80	1 8	1	3	0.696	72.380
6	sEPS ₆	80	1 10	2	1	0.834	28.049
7	sEPS ₇	95	1 6	2	3	0.351	21.027
8	sEPS ₈	95	1 8	3	1	0.074	27.699
9	sEPS ₉	95	1 10	1	2	0.089	36.190
DS	K_1	0.567	0.407	0.294	0.335		
	K_2	0.767	0.418	0.556	0.448		
	K_3	0.171	0.681	0.655	0.722		
	R	0.596	0.274	0.361	0.387		
糖质量分数	K_1	48.222	34.269	46.804	29.197		
	K_2	50.122	54.184	37.183	49.534		
	K_3	28.305	38.396	42.729	47.967		
	R	21.817	19.915	9.621	20.337		

升高到95℃时,硫酸基的取代度和糖质量分数明显降低,可能是淫羊藿多糖的结构被破坏,因此反应温度宜控制在80℃。也有认为,提高氯磺酸的比例有利于酯化反应,但实际操作中氯磺酸比例高,会出现板结,搅拌困难,以致反应不均^[6~8]。

参考文献

- [1] Dace R. Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides [J]. *Thrombosis Res*, 1997, 87(1): 113-121.
- [2] Nada Kovačević, Miodrag Čolić, Aleksandar Backović, et al. Immunomodulatory effects of the methanolic extract of *Epimedium alpinum* in vitro [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77: 561-567.
- [3] 胡元亮,孔祥峰,李祥瑞,等. 10种中药成分对CEF的增殖和

抵抗NDV感染的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(3): 301-305.

- [4] Lu Y, Wang D Y, Hu Y L, et al. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of BDV [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71(2): 180-186.
- [5] 李德耀. 淫羊藿多糖的分离纯化、结构分析和免疫活性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2005.
- [6] 陈景耀,吴国荣,王建安,等. 正交试验优选白芨多糖硫酸酯化工艺的研究[J]. *中草药*, 2005, 36(1): 43-46.
- [7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [8] 燕航,钟耀广,王淑琴,等. 硫酸酯化香菇多糖衍生物制备的研究[J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(3): 44-46.
- [9] 刘占峰,孙汉文. 多糖的化学修饰研究进展[J]. *河北大学学报: 自然科学版*, 2005, 25(1): 104-108.

超滤和纳滤分离技术提取纯化地黄低聚糖的研究

董艳¹,高瑞昶^{*},潘勤²,阎晓楠²

(1. 天津大学化工学院,天津 300072; 2. 天津中新药业集团股份有限公司技术中心,天津 300457)

摘要:目的 通过不同截留相对分子质量的超滤膜对地黄多糖分离纯化,再利用纳滤膜对超滤液进行浓缩纯化。方法 采用不同截留相对分子质量超滤再纳滤的工艺流程。结果 两次超滤得到低聚糖,最佳操作条件为:料液质量浓度为13~132 mg/mL,操作压力为0.25~0.275 MPa,温度20~40℃。然后采用纳滤膜对超滤液进行浓缩纯化,适宜工艺条件为:料温为20~40℃,操作压力0.59~0.79 MPa,浓缩倍数可达3倍。应用超滤-纳滤技术,低聚糖得率为46.63%,质量分数达到93.3%,凝胶过滤法验证低聚糖制品的相对分子质量低于6 000。结论 该工艺能有效分离纯化地黄低聚糖,简单可行,操作简便。

关键词:地黄低聚糖;超滤;纳滤;分离;纯化

中图分类号: R 286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0359-05

* 收稿日期: 2007-09-29

作者简介:董艳(1981—),女,河北沧州人,硕士,研究方向为膜分离技术与化学工程。E-mail: yanyan-422@126.com

* 通讯作者 高瑞昶 E-mail: gaoruichang@yahoo.com.cn

Ultrafiltration and nanofiltration membrane separation technology in extracting and purifying oligosaccharides of *Rehmannia glutinosa*

DONG Yan¹, GAO Rui-chang¹, PAN Q in², YAN Xiao-nan²

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Technical Center of Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Corporation Limited, Tianjin 300457, China)

Abstract: **Objective** Oligosaccharides of *Rehmannia glutinosa* were separated and purified by different molecular weight cut-off ultrafiltration (UF) membranes, and then ultrafiltrate was concentrated and purified by nanofiltration (NF) membrane. **Methods** Different molecular weight cut-off UF unit first and then NF unit were used in process. **Results** Oligosaccharides were separated by twice UF, the optimum separation conditions: the concentration of feed solution was 13—132 mg/mL, the operation pressure was 0.25—0.275 MPa, and the temperature was 20—40 °C. Then ultrafiltrate was concentrated and purified by NF membrane, the optimum separation conditions: the operation pressure was 0.59—0.79 MPa, the temperature was 20—40 °C, and the concentration multiple got to three. Under this condition, the total extraction rate of oligosaccharide products was 46.63% and the purity was above 93.3%, the molecular weights of oligosaccharide products determined by gel filtration were less than 6 000. **Conclusion** The technology is not only simple and feasible but also easy to separate and purify the oligosaccharides of *R. glutinosa* effectively.

Key words: the oligosaccharides of *Rehmannia glutinosa* Libosch; ultrafiltration (UF); nanofiltration (NF); separation; purification

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的块根,为补益中药中常用药物。始载于《神农本草经》,列于上品。具有滋明清热,补血止血等功效^[1]。地黄多糖是地黄的重要活性成分,其相对分子质量仅为1 000~2 000的多糖对小鼠Lewis 肿瘤具有明显的生长抑制作用^[2]。另外,低聚糖,相对分子质量为666的四聚糖对实验性糖尿病与高血糖大鼠糖代谢有调节作用^[3]。地黄粗多糖浸提液中含有蛋白质、色素、无机盐等杂质,影响多糖的生物活性及外观品质。目前适合多糖工业化生产的方法较少,传统提取纯化多糖的方法为水提醇沉工艺,但该法有机溶剂用量大,生产周期长,分离成本高。膜法作为一种新型的分离技术,利用不同的膜孔径,从而截留不同相对分子质量的组分实现对物质分子的分级,目前用于多糖和酶等活性物质的分离与纯化上具有收率高且极少破坏的优点,是当前天然多糖分离研究中十分活跃的领域^[4]。本实验采用超滤结合纳滤,对地黄低聚糖进行分离纯化研究,确定实验操作条件,检验纯化结果,以考察膜分离法用于地黄多糖提取液分离纯化工艺的可行性,为地黄多糖在医药领域和保健品行业的工业化开发提供了参考。

1 材料与仪器

地黄饮片(天津市中药饮片厂提供,经中新药业技术中心王德军高级工程师鉴定为怀庆地黄);无水葡萄糖(分析纯,上海天莲精细化工有限公司);牛血

清白蛋白(天津市川页生化制品有限公司);考马斯亮蓝G-250(联星生物);超滤平板膜(截留相对分子质量分别为 1.5×10^5 和6 000的聚砜膜,厦门三达膜科技有限公司);纳滤卷式膜(截留相对分子质量为200的复合膜,厦门三达膜科技有限公司);Sephadex G-25, Pharmacia 公司;右旋糖苷标准品及蓝色葡聚糖2000(生化试剂,其平均相对分子质量分别为180, 342, 1 000, 5 000, 10 000, 2 000 000, Sigma 公司生产);其他均为分析纯级。

PE Lambda 25 型紫外分光光度计(Perkin Elmer);锯齿平板、管卷并用小试设备(厦门三达膜科技有限公司);A 200S 电子天平(Sartorius analytic)。

2 方法与结果

2.1 地黄低聚糖纯度的测定方法

2.1.1 低聚糖质量浓度的测定采用苯酚-硫酸法^[5]:精密称取105 °干燥至恒重的葡萄糖20.3 mg,置100 mL 量瓶中,加水适量使溶解并稀释至刻度,摇匀。吸取1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL 于25 mL 量瓶中,用水分别稀释至刻度。然后再精密吸取各2.0 mL,分别置于10 mL 具塞试管中,各加苯酚试液1.0 mL,振摇,迅速滴加浓硫酸5.0 mL,充分振摇,于40 °水浴中保温30 min,取出,迅速插入至冰水混合物中,30 min 后在490 nm 处测定吸光度值。另取2 mL 蒸馏水,同法操作,作为空白对照。绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 0.015 X + 0.006$

4, $r = 0.999 0$ 。

蛋白质量浓度的测定采用考马斯亮蓝 G-250 法^[6]; 色值的测定是在单色光 430 nm 波长下, 用 10 mm 比色皿测定溶液的吸光度, 以蒸馏水作空白^[7]; 盐浓度的测定用硝酸银滴定法^[8]; 灰分的测定用《中国药典》法^[9]。

2.1.2 低聚糖制品相对分子质量的测定: 采用凝胶过滤法。取实验所得的低聚糖制品 5 mg, 溶于 0.1 mol/mL NaCl 溶液 2 mL 中, 加胶预先用 0.1 mol/mL NaCl 溶液平衡好的 Sephadex G-25 柱 (40 cm × 1.0 cm) 上, 再用 0.1 mol/mL NaCl 溶液以 0.5 mL/min 洗脱, 收集洗脱液, 苯酚-硫酸法检测多糖分布, 与葡聚糖标准品的标准曲线比对, 计算主要洗脱峰处相对分子质量。

2.1.3 膜通量^[10]、脱色率、脱盐率、灰分去除率、多糖制品质量分数的计算:

膜通量 = 透过液体积 / (膜的有效面积 × 操作时间)

蛋白去除率 = (超滤前蛋白的量 - 超滤后蛋白的量) / 超滤前蛋白的量 × 100%

脱色率 = (脱色前吸光度值 - 脱色后吸光度值) / 脱色前吸光度值 × 100%

脱盐率 = (1 - 浓缩液含盐量 / 原料液含盐量) × 100% = 透过液含盐量 / 原料液含盐量 × 100%

灰分去除率 = (1 - 炽灼后样品灰分质量 / 炽灼前样品灰分质量) × 100%

多糖制品质量分数 = 浓缩液体积 × 浓缩液中多糖的质量浓度 / 多糖制品的质量 × 100%

2.2 制备工艺流程: 取地黄饮片 300 g, 以 10 倍和 8 倍量水回流提取 2 次, 滤过, 合并得含生药量为 93 mg/mL 的提取液。提取液先经截留相对分子质量为 150 000 的聚砜超滤膜, 其透过液再经截留相对分子质量为 6 000 的聚砜超滤膜, 以截留相对分子质量为 200 的复合纳滤膜浓缩除盐。纳滤浓缩液真空冷冻干燥。超滤及纳滤过程操作条件的优化是制备中的关键工艺。

2.3 超滤工艺影响因素的考察: 在超滤分离过程中, 料液中溶质由于受到膜的截留而在膜面上积累, 使得膜表面溶质浓度逐步高于料液主体浓度, 经过一定时间后膜表面形成浓差极化和凝胶层, 使得膜的渗透通量减小, 滤过时间增长, 造成膜的污染。因此, 为了满足实际生产的需要, 又不会引起膜的不可逆污染, 就要对原料液的质量浓度、操作压力、温度进行考察^[10]。

2.3.1 原料液质量浓度的影响: 分别取含生药量 13、52、132 mg/mL 料液, 在 0.275 MPa 压力和

26 条件下进行超滤, 1 h 内每隔 10 min 测定膜通量, 结果见图 1。可见膜通量从运行开始迅速衰减, 提示料液在膜表面迅速形成浓差极化; 30 min 后膜通量趋于稳定。料液质量浓度不可过大, 过大膜通量越低; 但不可过低, 过低会增加超滤时间^[11]。因此, 从节约操作时间和延长膜寿命考虑, 地黄药液质量浓度控制在 13~132 mg/mL。

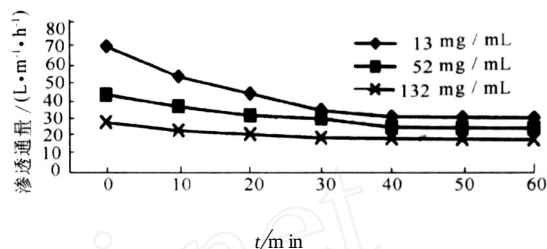


图1 料液浓度对超滤膜的渗透通量的影响

Fig. 1 Effect of solution concentration on osmotic flux of UF membrane

2.3.2 膜操作压力对膜通量的影响: 采用含生药 52 mg/mL 料液, 温度为 26, 分别考察 0.225、0.25、0.275、0.3 MPa 不同操作压力对膜通量的影响, 结果见图 2。可见, 当超滤压力为 0.225 MPa 时膜通量较小, 且随时间而衰减, 10 min 后就达到稳定, 膜通量衰减变化不明显; 当压力为 0.3 MPa 时, 膜初始通量是 52 L/m²·h, 约是 0.225 MPa 初始通量的 2 倍, 但随时间降低幅度大, 60 min 后趋于稳定; 当压力为 0.275、0.25 MPa 时, 膜通量也较大, 且随时间变化幅度降低较小, 30 min 后稳定。结果表明, 压力越高, 膜通量衰减越大, 这是由于过高的压力会造成动力消耗增加; 而压力越低, 虽然膜通量衰减较小, 但较低的膜通量不能满足生产需要。因此, 选取的压力范围为 0.25~0.275 MPa 为宜。

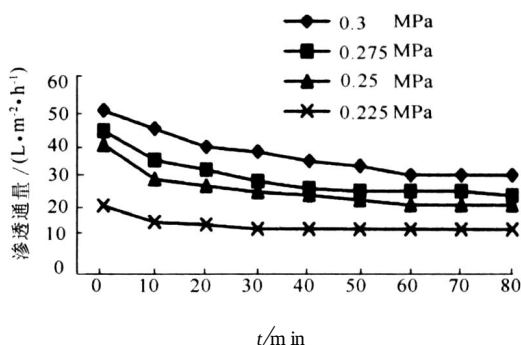


图2 压力对超滤膜的渗透通量的影响

Fig. 2 Effect of pressure on osmotic flux of UF membrane

2.3.3 温度的影响 应综合考虑膜的性能、保养、预期截留率等多种因素。由于聚砜膜的正常适用范围为 10~50, 因此考察了料液在质量浓度为 0.052 g/mL, 膜

操作压力为0.25 MPa, 温度分别为16、26、36、46对膜通量的影响, 结果见图3。可见随着温度的升高, 膜通量增加, 而且温度升高30~45℃时, 渗透通量将加倍。这是由于在一定范围内, 温度升高, 料液黏度下降, 扩散系数、传质系数及多糖溶解度增大, 与水的亲和力也增大, 相应会减少浓差极化。但温度提高导致了截留率的降低, 这是由于温度升高致使截留膜性能和溶液理化性质的改变。综合考虑温度对溶液性质和膜性能的影响及预期截留率, 工业生产成本等因素, 药液温度应控制在20~40℃, 一般取常温下操作。

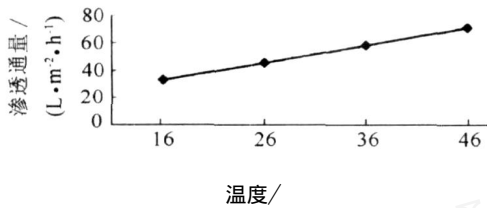


图3 温度对超滤渗透通量的影响

Fig. 3 Effect of temperature on osmotic flux of UF membrane

2.4 纳滤除盐浓缩工艺的考察: 超滤后的地黄低聚糖提取液含低聚糖量低和含盐分高, 因此需进行除盐和低聚糖富集。传统的热蒸发浓缩手段不仅无脱盐能力, 而且易破坏成分的生物活性。纳滤是介于反渗透和超滤之间的一种新型膜分离手段, 操作温度低, 运行成本低。本实验采用不加水循环浓缩除盐的方式, 考察了操作压力、温度、浓缩倍数对纳滤膜通量的影响, 并考察该纳滤膜对低聚糖的保留效果。

2.4.1 操作压力对纳滤的影响: 取20℃的超滤透过液, 分别考察0.49、0.59、0.69、0.79、0.89 MPa不同操作压力对膜通量的影响, 结果见图4。可以看出, 操作压强从0.49 MPa增加到0.79 MPa, 膜的通量也随之增加, 但是逐渐增加的幅度变缓, 最后操作压强在增加, 膜通量几乎不变。当操作压强增大到0.79 MPa, 单纯提高压强已没有意义。因此纳滤适宜的压力范围为0.59~0.79 MPa。

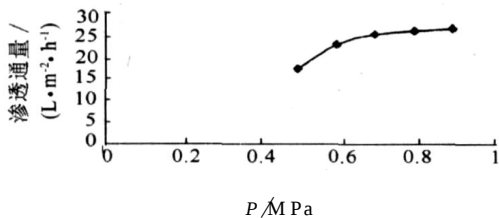


图4 压力对纳滤渗透通量的影响

Fig. 4 Effect of pressure on osmotic flux of NF membrane

2.4.2 操作温度对纳滤的影响: 在0.6 MPa下, 对

温度分别为20、30、40℃的超滤液进行纳滤, 测定纳滤的渗透通量, 其渗透通量与温度的关系见图5。可以看出, 提高操作温度可使渗透通量显著增大。因此, 在不影响料液物化性质的前提下, 在膜耐受温度范围内, 应尽量提高料液的温度。由于纳滤膜正常操作温度是10~40℃, 因此纳滤操作温度范围取20~40℃。

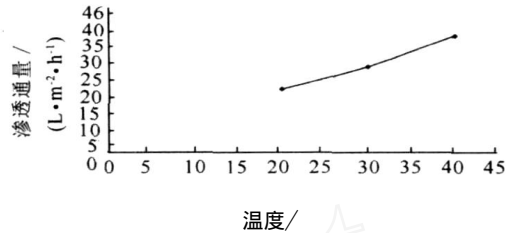


图5 操作温度与渗透通量的关系

Fig. 5 Relationship between processing temperature and osmotic flux

2.4.3 浓缩倍数与膜性能的关系: 在0.6 MPa、20℃下, 对超滤透过液进行纳滤浓缩, 考察浓缩倍数与膜的渗透通量的关系, 结果见表1。

表1 浓缩倍数与渗透通量的关系

Table 1 Relationship between concentration multiple and osmotic flux

浓缩倍数	渗透通量/(L·m ⁻² ·h ⁻¹)
0	31
1	26
3	20
6	17

可以看出, 在纳滤刚开始时, 渗透通量较大。而随着浓缩倍数的增加, 料液质量浓度增大, 黏度上升, 浓差极化加剧, 使得渗透通量迅速衰减。当浓缩倍数大于3后, 由于膜表面逐渐形成溶质凝胶层, 浓差极化和溶质反向扩散速度趋于平衡, 凝胶二次阻力基本不变, 渗透通量也逐渐稳定。为了保持较大的渗透通量, 料液浓缩倍数一般为3倍。实际生产中若使低聚糖浓缩液的盐分进一步降低, 可加入去离子水继续除盐浓缩, 直至低聚糖浓缩液的含盐量符合要求为止^[12]。

2.4.4 纳滤对二糖的分离效果: 用截留相对分子质量为200的纳滤膜目的是除去葡萄糖、果糖等单糖而保留多糖。为了考察该纳滤膜对二糖以上的多糖的保留效果, 实验针对不同操作压强、操作温度和料液质量浓度的蔗糖水溶液, 研究纳滤膜对蔗糖的分离效果。

对20℃、质量浓度为0.5 g/mL蔗糖水溶液, 分别在0.49、0.59、0.69 MPa下进行纳滤实验。在0.59 MPa, 温度分别为20、30、40℃时, 对质量浓度为0.5 g/mL蔗糖水溶液进行纳滤实验。在0.59 MPa、

20 下,对质量浓度分别为0.3 0.5 0.8 g/mL 蔗糖水溶液进行纳滤实验。所有的透过液中多糖量为0,即未检出蔗糖存在。说明此纳滤膜对二糖以上的截留率为100%,并且不受操作压力、温度和质量浓度的影响,能够确保低聚糖的全部截留。

2.5 地黄低聚糖的制备工艺优化结果:地黄饮片以10倍和8倍量水回流提取2次,滤过,滤过液分别经过截留相对分子质量为150 000和6 000的聚砜超滤膜,其中料液质量浓度在0.013~0.132 g/mL,操作压力:0.25~0.275 MPa,常温下操作;超滤透过液再用纳滤进行浓缩3倍,料温为20~40,操作压力0.59~0.79 MPa;最后对纳滤截留液进行真空冷冻干燥,得到的地黄低聚糖得率为46.63%,蛋白去除率达到94.15%,脱色率达到92.31%,脱盐率达72.8%,灰分脱除率在88.7%左右,低聚糖制品的质量分数为93.3%。

2.6 低聚糖的相对分子质量分析:为了评估制备的低聚糖制品的相对分子质量的情况,对所得多糖制品进行凝胶滤过。多糖在Sephadex G-25凝胶柱上用0.1 mol/mL NaCl溶液洗脱,每管收集3 mL,硫酸-苯酚法逐管检测,结果发现所得制品有两个洗脱峰,洗脱曲线见图6,说明经获得的多糖相对分子质量集中在两个成分上。用蓝色葡聚糖测得凝胶柱的外水体积(V_0)为29 mL,5种标准相对分子质量的葡聚糖的洗脱体积分别为56 53 44 32 29 mL,按 $V_e/V_0 - \lg M_r$ 得相对分子质量测定标准工作曲线,标准曲线方程为 $Y = -0.5613X + 3.2149$, $r = 0.9969$ 。由此得出两个洗脱峰平均相对分子质量是692(图中以15号管为峰最高点)和5 777(图中以10号管为峰最高点),这与文献报道的地黄低分子多糖集中在相对分子质量为1 000左右的低聚糖和相对分子质量为5 800的低分子多糖相一致^[3]。由测得的平均相对分子质量来看,低聚糖制品的相对分子质量分级较为理想。

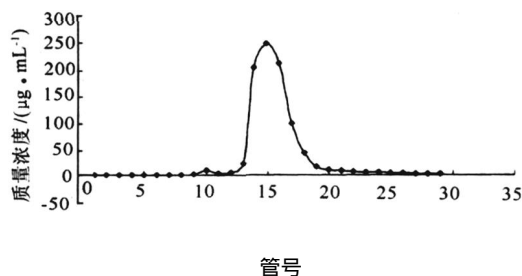


图6 Sephadex G-25柱洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of Sephadex G-25 column

3 讨论

本实验表明采用截留相对分子质量为150 000和6 000的超滤膜不仅提取了地黄低聚糖溶液,还可以有效的降低无效多糖和蛋白的量及其他杂质;截留相对分子质量为200的纳滤膜可对分离蛋白后的低聚糖提取液进行脱水除盐浓缩,达到富集低聚糖的目的。结果表明,采用两次超滤结合纳滤的工艺对地黄多糖进行分离浓缩,工艺简单可行,节约能耗,有效多糖纯度好,为工业生产上分离分析打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] 倪慕云,边宝林.地黄化学成分的研究概况[J].中国中药杂志,1989,14(7):41-43.
- [2] 魏小龙,茹祥斌.低分子质量地黄多糖体外对Lewis肺癌细胞p53基因表达的影响[J].中国药理学通报,1998,14(3):245-248.
- [3] 崔瑛.地黄多糖药理研究进展[J].中国自然医学杂志,2000,2(3):186-188.
- [4] Kim K H. Recovery enzyme from plant [J]. Food Technol, 1994(2): 412-423.
- [5] 李红霞,许 闯,孟 江,等.怀地黄多糖的含量测定[J].河南科学,2002,(2):144-146.
- [6] 陈钧辉.生物化学实验[M].北京:科学出版社,2003.
- [7] 李亚娜,林永成,余志刚.用超滤过程浓缩纯化羊栖菜粗多糖浸提液[J].化工进展,2004,23(11):1243-1247.
- [8] 过 菲,许时婴,林之川.超滤技术在羊栖菜粗多糖提取工艺中的应用[J].食品工业科技,2002,23(10):50-51.
- [9] 中国药典[S].一部.2005.
- [10] 张玉忠.液体分离膜技术及应用[M].北京:化工出版社,2004.
- [11] 中华人民共和国国家发展和改革委员会.现代中药制剂新技术[M].北京:化工出版社,2004.
- [12] 陈正行.膜分离技术提取米糠脂多糖的研究[J].水处理技术,2000,26(6):333-335.

《中草药》重要启事

从2008年第1期开始本刊所刊用文章文后的参考文献使用原语种撰写,按照国家标准《文后参考文献著录规则》(GB/T 7714-2005)书写。具体参考文献书写示范例见本刊2008年第39卷第1期上刊登的“《中草药》杂志2008年投稿须知”。