

未检测出 N 元素的存在。

3.3 红外光谱显示 C11 有糖的特征峰,硫酸基特征峰且硫酸根连接在糖的 C2 或 C3 处于平键位置,C11 为以  $\beta$ -糖苷键为主的吡喃糖。此结论与  $^1\text{H-NMR}$  分析结果相符。

3.4 通过薄层色谱法和 GC-MS 法综合分析,多糖样品 C11 的单糖组成及质量分数比为鼠李糖:岩藻糖:木糖:葡萄糖:半乳糖=1.50:570.00:220.00:257.00:8.32。

References:

[1] Ruan Q P, Gao C J, Li H L. Isolation, purification, and physicochemical properties of the polysaccharide FI from

*Aconitum carmichaeli* Debx [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12 (5): 46-49.  
 [2] Zhang W J. *Research Technique of Compound Polysaccharide* (复合多糖生化研究技术) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technique Publishers, 1987.  
 [3] Guo X, Gao X D, Yang X B. Determination of content glucuronic acid and neutral sugar of acidic polysaccharide [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2004, 25 (2): 100-101.  
 [4] Wu J, Zhang C W, Liu Y F. Physicochemical properties and anti-tumor activities of polysaccharides IP I A, IP I B from *Spirulina maxima* [M]. *Chin J Biochem Molec Bio* (中国生物化学与分子生物学报), 1998, 14 (6): 751-755.  
 [5] Li P L, Wu C X, Zhang Y X. Analysis GC of sugar and sugar-alcohol [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1992, 10 (5): 272-276.

## 膜法分级纯化姬松茸子实体多糖的研究

韩永萍, 刘扬平

(北京联合大学生物化工学院, 北京 100023)

**摘要:**目的 通过微滤和超滤对姬松茸子实体粗多糖分级纯化, 获得最佳试验操作条件, 考察各级相对分子质量范围内的多糖分布情况及所得制品的纯度。方法 使用微滤和不同截留相对分子质量的超滤串联工艺。结果 试验按相对分子质量将其分成  $>3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5 \sim 8 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$  以及  $<1 \times 10^4$  4 个级别, 所得多糖质量分布比例约为 5:1:3:1。试验确定操作条件为室温, 操作压力 0.08~0.1 MPa, 微滤和各级超滤分别将各级多糖最高浓缩至 45、35 和 25 g/L。在低温下干燥制备的姬松茸多糖制品, 质量分数高于 70%, 多糖总回收率高达 83.7%。结论 该工艺简单可行, 姬松茸子实体多糖相对分子质量主要分布于  $>3 \times 10^5$  和  $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ 。

**关键词:**姬松茸多糖; 微滤; 超滤

**中图分类号:** R286.02

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0253-2670(2006)03-0365-04

### Application of membrane technique to separating and purifying polysaccharides from fruit bodies of *Agaricus blazei*

HAN Yong-ping, LIU Yang-ping

(School of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

**Key words:** *Agaricus blazei* Murrill polysaccharide; microfiltration (MF); ultrafiltration (UF)

姬松茸 *Agaricus blazei* Murrill 又名巴西蘑菇, 是一种珍稀的药食兼用真菌, 不但味道鲜美, 而且含有丰富的多糖、蛋白质、不饱和脂肪酸、甾醇类以及锌、硒、锗等重要的微量元素, 在预防和抑制肿瘤、降低血脂、血糖以及修复受损肝细胞、促进造血干细胞增殖等方面显示出奇特的功效<sup>[1]</sup>。在日本有“神奇的蘑菇”和“地球上最后的食物”的美誉。多糖的药效活性与其分子结构和相对分子质量水平密切相关。免疫应答对单糖的化学结构是非特异性的, 而是由分子大小决定。国内外大量研究表明, 对肿瘤抑制率超

过 90% 的姬松茸多糖为相对分子量分布在  $2 \times 10^6$  左右的  $\beta$ -半乳糖葡糖、 $\alpha$ -葡聚糖和  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$  处蛋白质葡聚糖、木糖葡聚糖; 另外, 相对分子质量在  $2 \times 10^5$  左右的  $\beta$ -葡聚糖对肿瘤抑制效果也在 70% 以上<sup>[1]</sup>。因此, 将姬松茸多糖分级纯化, 并了解各级相对分子质量的质量分布, 对其大规模开发生产有着非常大的参考价值。

近年来, 关于姬松茸子实体多糖提取方法的研究已有一些文献报道, 主要为热水浸提法、酸提法、酶提法等。膜法作为一种新型的分离技术, 不但具有

收稿日期: 2005-05-08

作者简介: 韩永萍(1971-), 女, 黑龙江省双鸭山人, 讲师, 工学硕士, 主要从事膜处理技术、饮用水消毒技术方面的教学与研究。  
E-mail: yue-yun-tao@sohu.com

能耗低、单级分离效率高、工艺简单,可在室温或低温下操作,而且用于中药分离、纯化时所得制品收率高、纯度好<sup>[2]</sup>。为此,本实验采用微滤结合不同截留相对分子质量的中空纤维超滤装置对姬松茸子实体多糖进行了分级纯化研究,确定试验操作条件,考察各级相对分子质量范围内的多糖分布情况及所得制品的质量分数,为姬松茸多糖在医药领域和保健品行业的工业化开发提供理论依据和技术指导。

## 1 实验材料、装置与方法

1.1 材料和仪器:姬松茸子实体粗多糖,质量分数为 47.6%,由浙江省庆源真菌多糖制品有限公司提供。Sephadex CL-4B, Sigma 公司产品进口分装。T-系列葡聚糖(生化试剂,Pharmacia 公司生产,北京康达生物技术有限公司分装)。中空纤维超滤器;天津膜天工程公司提供的实验室超滤装置,根据试验需要对膜组件进行更换。其中微滤膜,平均膜孔径 0.2  $\mu\text{m}$ (截留相对分子质量约为  $3 \times 10^5$ );超滤膜,截留相对分子质量为  $8 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$ 。两种组件有效过滤面积均为 0.3  $\text{m}^2$ 。

AB204 型天平,上海第二天平仪器厂;Lock-Stong 离心机,北京路科顺科技有限公司提供。TU-1901 紫外可见分光光度计,日本岛津。冷冻干燥机,北京速原真空技术有限公司提供。

1.2 多糖质量浓度测定:采用苯酚-硫酸法<sup>[3]</sup>。精称 110  $^{\circ}\text{C}$  条件下恒重的葡萄糖 200 mg,溶解、定容于 1 L 量瓶中;分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.80 mL 于 10.0 mL 量瓶中,加 2~3 滴蒸馏水后,再加入 5% 苯酚溶液 1.5 mL 和浓硫酸 5.0 mL(控制在 15~20 s 内加完),最后定容至 10 mL 并摇匀,室温放置 30 min,在 487 nm 处测定吸光度(A),绘制标准曲线。所得标准曲线回归方程为:  $Y = 0.1092 X + 0.0224$ ,  $R^2 = 0.9994$ 。

1.3 多糖相对分子质量的测定:采用凝胶过滤法。将试验所得的多糖制品各取 2 g,溶于 0.2 mol/L NaCl 溶液中,加到预先用 0.2 mol/L NaCl 溶液平衡好的 Sephadex CL-4B 柱(65 cm  $\times$  1.8 cm)上,再用 0.2 mol/L NaCl 溶液以 0.3 mL/min 洗脱,收集洗脱液,苯酚-硫酸法检测多糖分布,与 T-系列葡聚糖做的标准曲线比对,计算出主要洗脱峰处相对分子质量。

1.4 操作工艺:姬松茸粗多糖溶液首先通过离心分离,除去残渣后进行微滤,其透过液进入截留相对分子质量为  $8 \times 10^4$  的超滤 I,超滤 I 的透过液再进入

截留相对分子质量为  $8 \times 10^4$  的超滤 II,超滤 II 的透过液由于体积大、浓度低,需利用反渗透进行必要的浓缩,最后对各组件截留液经循环浓缩后冷冻干燥,即可得到相对分子质量  $> 3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5 \sim 8 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$  和  $< 1 \times 10^4$  4 个级别的多糖制品。

## 1.5 膜通量、多糖收率和多糖制品纯度的计算。

$$\text{膜通量 } J = V / (A \cdot t)$$

式中  $J$ —膜通量,  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ;  $V$ —透过液体积, L;  $A$ —膜的有效面积,  $\text{m}^2$ ;  $t$ —操作时间, h。

多糖收率 = 浓缩液中多糖质量(g)/料液总多糖的质量(g)  $\times 100\%$

多糖制品纯度 = [浓缩液体积(L)  $\times$  浓缩液多糖质量浓度(g/L)] / 多糖制品质量(g)  $\times 100\%$

## 2 结果与讨论

2.1 微滤和超滤试验操作条件确定:由于膜分离过程中不可避免地在膜表面形成的浓差极化和凝胶层<sup>[4]</sup>,表现为膜通量下降,滤过时间增长,甚至影响膜的结构和性能,因此必须确定合适的操作条件,即要保证膜通量满足实际生产需要,又不会引起膜的“坏死性”污染。试验主要对滤过料液质量浓度、操作压力、温度等操作条件进行研究。

2.1.1 多糖质量浓度的影响:采用不同多糖质量浓度的料液,在 0.06 MPa 压力和 20  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行微滤和超滤,运行稳定 15 min 后测定膜通量,结果见图 1。

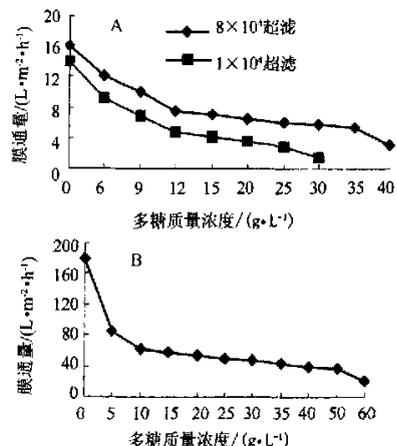


图 1 多糖质量浓度对超滤(A)和微滤(B)时膜通量的影响

Fig. 1 Effect of polysaccharides concentration on membrane flux of UF (A) and MF (B)

可以看出,尽管微滤因膜孔径大,通量约为超滤的 6~7 倍,但料液中多糖质量浓度对它们的通量影响规律基本一致。膜通量衰减可分为 3 个阶段:运行

初期当多糖质量浓度小于 10 g/L,膜通量下降较为迅速,原因是膜对多糖以及溶液中游离蛋白分子的吸附造成的;当多糖质量浓度持续加大时,膜的吸附很快达到饱和,随着料液质量浓度增大,其黏度增加、流动性能变差,在膜的工作界面开始出现浓差极化,并逐步形成“二层膜”<sup>[5]</sup>,此时膜通量的衰减较为平缓;当多糖质量浓度突破某一个值时,膜表面截留的大分子多糖会因为黏浓度过大而析出形成凝胶层,并随着运行迅速加厚,膜通量再次表现为迅速衰减。如果持续运行将会引起膜的严重污染。由此可见,从节约操作时间和延长膜的使用寿命考虑,当膜通量衰减到一定值后,必须停止运行,进行清洗。由膜通量曲线确定,在微滤操作过程中多糖质量浓度最高应浓缩至 50 g/L 左右,而截留相对分子量为  $8 \times 10^4$  和  $1 \times 10^4$  的超滤组件分别为 35 和 25 g/L 左右。

2.1.2 膜进出口压差对膜通量的影响:采用 15 g/L 料液,温度为 20 ℃,不同压差对膜通量的影响结果见图 2。

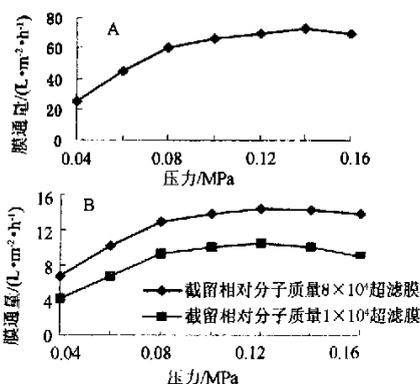


图 2 压力对微滤(A)和超滤(B)的影响  
 Fig. 2 Effect of pressure on membrane flux of MF (A) and UF (B)

结果表明,膜的初始通量随着操作压力增加而增大,当压力达到 0.08 MPa 后趋于恒定,当压力增加到 0.12 或 0.14 MPa 后开始下降。这是因为微滤和超滤过程都是以压力为驱动力,其大小直接影响膜通量<sup>[6]</sup>。在运行中,随着浓差极化加剧,开始形成凝胶层,膜通量基本达到极限值,不再依赖于压力。随着凝胶层的加厚,膜的通量开始下降。而且压差越大,凝胶层形成速度越快,膜通量的衰差速度越快,运行周期变短。甚至会因为操作压差过高,膜被压实而形成严重污染。较低的压力尽管能减轻膜污染,但膜通量过小会影响实际生产。由此确定操作压力为: 0.08~0.1 MPa。

2.1.3 温度的影响:温度决定了多糖的黏度。温度

高,循环液黏度下降,扩散系数和传质系数以及多糖的溶解度均增大,相应会减弱浓差极化,膜的通量增大;另一方面,当温度升高时,加速了膜组成聚合物的微观布朗运动,使单位时间单位体积形成的小孔机率增加,从而影响膜的截留性能,造成截留率有所下降。因此,从膜的性能和料液稳定性以及操作方便考虑,采用室温 20 ℃。

2.2 膜分级纯化姬松茸子实体多糖:将 3 L 10.09 g/L 粗多糖料液经过离心预处理后,在确定的试验条件下进行微滤和各级超滤处理,并将各级浓缩液真空冷冻干燥获得多糖制品。结果见表 1。

表 1 子实体姬松茸粗多糖的分级提纯  
 Table 1 Separating and purifying polysaccharide from fruit bodies of *A. blazei*

溶液	相对分子质量范围	多糖质量浓度 / (g·L <sup>-1</sup> )	体积 / mL	多糖制品质量 / g	收率 / %	纯度 / %
微滤截留液	>3×10 <sup>5</sup>	45.66	270	17.33	44.03	71.13
8×10 <sup>4</sup> 超滤截留液	3×10 <sup>5</sup> ~8×10 <sup>4</sup>	6.92	250	3.20	5.72	83.30
1×10 <sup>4</sup> 超滤截留液	8×10 <sup>4</sup> ~1×10 <sup>4</sup>	26.48	275	7.85	24.05	92.59
反渗透滤液	<1×10 <sup>4</sup>	10.20	200	3.30	6.74	94.14

可见,姬松茸子实体粗多糖溶液经过微滤和超滤处理后,各相对分子质量级别的多糖明显被浓缩。这大大方便了后续的干燥处理工艺。且因为工艺中无其他杂质引入或发生相变化,所得制品纯度高于 70%。这将大大减少保健品食用量或药用剂量。另外,微滤膜对杂质有明显的截留,致使后续超滤多糖制品纯度较其高出约 10%。

各级组件截留液和透过液的多糖收率在数值上大体上相当于各段相对分子质量范围内的多糖质量分布。由此可见,姬松茸子实体粗多糖主要分布于大相对分子质量处,相对分子质量 >3×10<sup>4</sup> 质量约占一半;而在 3×10<sup>5</sup>~8×10<sup>4</sup> 和相对分子质量 <1×10<sup>4</sup> 的多糖较少,约为大相对分子质量多糖的 1/5; 8×10<sup>4</sup>~1×10<sup>4</sup> 多糖居中,约占 3/10。4 个级别多糖制品的质量分布比例大致为 5:1:3:1。由于多糖分子与膜之间有较强的吸附性,由此造成的损失约占 19.46%。多糖的总回收率为 80.54%。而传统方法提取姬松茸多糖制品的纯度和回收率一般都低于 60%<sup>[6]</sup>。试验中发现,8×10<sup>4</sup> 超滤组件对微滤的透过液截留不明显,所得的试验结果也表明 3×10<sup>5</sup>~8×10<sup>4</sup> 的多糖质量分布较低,仅有 6% 左右。因此,可省去 8×10<sup>4</sup> 超滤组件,直接采用微滤与 1×10<sup>4</sup> 超滤组件串联进行分级纯化,这样即降低了运行成本,又可减少膜对多糖的吸附损失。

2.3 多糖制品相对分子质量分析:为了对膜法分级

制备姬松茸多糖制品做进一步评估,将试验获得的多糖制品用 SeparoesCL-4B 凝胶过滤法检测,结果微滤截留液、 $8 \times 10^4$  超滤截留液、 $1 \times 10^4$  超滤截留液和反渗透浓缩液的主要洗脱峰值处平均相对分子质量分别为  $5.553 \times 10^5$ 、 $2.342 \times 10^5$ 、 $5.46 \times 10^4$ 、 $8.6 \times 10^3$ 。由测得的平均相对分子质量来看,多糖制品的相对分子质量分级较为理想。这再次证实了膜用于多糖的分级纯化是可行的。

### 3 结论

研究表明,采用微滤串联不同截留相对分子质量的超滤对姬松茸多糖分级纯化,工艺简单可行、多糖得率高、产品纯度好。实验粗略确定的相对分子质量  $> 3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5 \sim 8 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$  和  $< 1 \times 10^4$  4 个级别的多糖质量分布比例约为 5 : 1 : 3 : 1。获得的多糖制品质量分数高于 70%,多糖总回收率高达 80.54%,两者均高于传统的提纯工艺。

试验确定操作条件为:室温,操作压力 0.08 ~

0.1 MPa,微滤多糖质量浓度最高可浓缩至 45 g/L,而截留相对分子质量  $8 \times 10^4$  和  $1 \times 10^4$  的超滤最高质量浓度分别浓缩至 35 g/L 和 25 g/L 左右。建议实际生活中采用微滤与  $1 \times 10^4$  截留相对分子质量超滤串联工艺进行分级纯化。

### References:

- [1] Huan L N. *Agaricus blazei* Murrill and medicine function [J]. *Edible Fungi Jiangsu* (江苏食用菌), 1994, 15 (4): 30-31.
- [2] Tan Z J, Xie D P. Research advancements of polysaccharides [J]. *Food Sci Tech* (食品科技), 2002, (3): 10-12.
- [3] Fang J H, Gu S M, Zhou G H, et al. Analysis on polysaccharides of *Agaricus blazei* Murril [J]. *Food Sci* (食品科学), 2004, 25 (7): 142-144.
- [4] Xu Z L. *Water Treatment Membrane Technology* (水处理膜技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.
- [5] Deng L, Wang Y. Solute adsorption as an important source of foul in ultrafiltration [J]. *Proce Separa* (过程与分离), 1997 (4): 13-17.
- [6] Yang M, Zhou X L, Si Q Q. Studies on the extraction methods of polysaccharides from *Agaricus blazei* [J]. *J Fujian Teachers Univ, Nat Sci* (福建师范大学学报:自然科学版), 1998, 14 (1): 85-89.

## 超临界流体萃取广西莪术挥发油中 $\beta$ -榄香烯

吴琳华, 杜 霞, 刘红梅

(哈尔滨医科大学附属第二医院 药学部, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**目的 采用超临界流体萃取广西莪术挥发油中的  $\beta$ -榄香烯。方法 采用正交试验设计对萃取条件进行了优化。结果 确定了最佳萃取条件:萃取压力为 25 MPa、萃取温度 60  $^{\circ}$ C、 $\text{CO}_2$  流量 8 L/h、萃取时间 90 min;并用 GC/MS 测定了各试验条件下  $\beta$ -榄香烯。结论 与水蒸汽蒸馏法相比较,超临界萃取法具有萃取率高、耗时少等优点。

**关键词:**广西莪术;  $\beta$ -榄香烯; 超临界流体萃取; 气相色谱-质谱法

**中图分类号:** R284.6; R286.02 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2670(2006)03-0368-03

### $\beta$ -Elemene from volatile oil of *Curcuma kwangsiensis* by supercritical fluid extraction

WU Lin-hua, DU Xia, LIU Hong-mei

(Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

**Key words:** *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang;  $\beta$ -elemene; supercritical fluid extraction; GC/MS spectrometry

莪术是姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Valeton、广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 和温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎。从莪术根茎中提取的莪术油及其单体  $\beta$ -榄香烯均为良好的抗肿瘤药物,不仅能

直接作用于肿瘤细胞核中的 DNA,起抑制或杀伤肿瘤的作用,而且能提高肿瘤细胞的免疫原性,增强机体对其的杀伤活性<sup>[1,2]</sup>。莪术挥发油的提取方式基本是采用传统方法水蒸气蒸馏法。文献报道了采用超临界萃取技术对蓬莪术挥发性成分进行研究,结果

收稿日期:2005-05-18

**作者简介:**吴琳华(1958-),女,吉林扶余人,博士,教授,硕士生导师,1982年毕业于黑龙江商学院制药工程系,1997年获哈尔滨医科大学药理学硕士学位,2004年获黑龙江中医药大学中药学博士学位,研究方向为药物新剂型与新制剂。

Tel: (0451) 86605581 Fax: (0451) 86665559 E-mail: wlh@pharm-hrbmush.com