

大孔吸附树脂对苦豆子多糖纯化工艺研究

陶遵威, 张 岩, 王文彤

天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘 要: 目的 筛选纯化苦豆子多糖的最佳大孔树脂并确定纯化多糖的最佳工艺条件。方法 采用静态吸附分离法对树脂进行筛选, 并以苦豆子多糖的纯度和回收率为考察指标, 对筛选出的树脂进行工艺优化。结果 AB-8 树脂对苦豆子多糖有较好的吸附纯化性能, 最佳纯化条件为: 上样多糖溶液质量浓度为 5 mg/mL, pH 值为 7.0, 温度为 25 °C, 纯化后的苦豆子多糖的质量分数达到 88.90%, 比纯化前提高了 17.60%, 回收率 90.62%。结论 AB-8 树脂适用于苦豆子多糖的分离纯化, 该方法不仅稳定有效, 而且具有较高的多糖回收率。

关键词: 苦豆子; 多糖; 大孔树脂; 纯化

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)04-0515-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.012

Purification technology of *Sophora alopecuroides* polysaccharides by macroporous adsorption resin

TAO Zun-wei, ZHANG Yan, WANG Wen-tong

Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To optimize the macroporous resin and technological conditions for the purification of *Sophora alopecuroides* polysaccharides. **Methods** The static adsorption and separation method was used in the optimization of macroporous adsorption resin. The technological process was compared and evaluated in terms of the ratio of polysaccharide purity and coefficient of recovery. **Results** The resin AB-8 had the best performance of adsorption and desorption effects and was selected to purify *S. alopecuroides* polysaccharides. The optimum technology parameters were as follows: the sample concentration of 5 mg/mL, pH 7, and 25 °C. The purity of polysaccharides was 88.90%, improved more 17.60% than that of crude polysaccharide, and the coefficient of recovery was 90.62% by using the above technology. **Conclusion** The resin AB-8 is a preferable candidate for the isolation and purification of *S. alopecuroides* polysaccharides, with the better stability and effectiveness and higher recovery.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; polysaccharide; macroporous resin; purification

苦豆子为豆科槐属多年生草本植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 的干燥种子, 广泛分布于我国西北地区^[1-2]。苦豆子多糖的主要成分是半乳甘露聚糖^[3], 具有降血糖、调血脂、减肥等功效, 近年来已引起了国内外研究人员的广泛关注^[4]。目前苦豆子多糖的相关研究已有报道^[5], 但尚未对苦豆子多糖分离纯化方面做出进一步的研究。大孔树脂法作为一种常用的分离纯化方法, 因其具有吸附容量大、吸附速度快、选择性好、再生简便等优点, 因而被广泛用于天然产物的分离纯化^[6-8]。本实验通过

比较 3 种大孔树脂对苦豆子多糖的吸附纯化性能, 寻找对多糖纯化效果良好的树脂, 并对其纯化苦豆子多糖的工艺进行了优化, 为苦豆子多糖的分离纯化和生产控制提供参考。

1 材料与仪器

苦豆子于 2010 年 3 月购自内蒙古磴口县金豆商贸有限公司, 由天津市医药科学研究所天然药化室吴寿金研究员鉴定为豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 的种子; 大孔树脂 (天津南开大学化工厂); 葡萄糖对照品 (中国食品药品检定研究院,

收稿日期: 2013-02-27

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目 (10JCZDJC21000)

作者简介: 陶遵威, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 天然产物的提取分离、天然产物单体的结构改造新药及制剂的研发。

Tel: (022) 27236182 E-mail: taozunwei@yahoo.com.cn

批号 110833-200503); 其余试剂均为分析纯。

LXJ—II B 型低速大容量多管离心机 (北京医用离心机厂); UV—260 型紫外分光光度计 (日本岛津); Labconco 型真空真空冷冻干燥仪 (日本岛津公司); R—202 型旋转蒸发器 (上海申胜生物技术有限公司); AE—240 电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器 (上海) 有限公司]; PHS—25 型 pH 计 (上海虹益仪器仪表有限公司); HH—4 智能数显恒温水浴锅 (巩义市予华仪器有限责任公司); SHZ—D (III) 型循环水式真空泵 (巩义市英峪予华仪器厂); DF—101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限责任公司)。

2 方法与结果

2.1 大孔树脂预处理

经过筛选, 分别选取不同极性树脂中纯化效果较好的 3 种具有代表性的大孔树脂, 如弱极性的 AB-8 树脂、非极性的 X-5 树脂和极性的 NKA-II 树脂。3 种树脂分别用无水乙醇浸泡 24 h, 充分溶胀, 再用无水乙醇淋洗至洗出液加适量水无浑浊为止, 用蒸馏水洗至无乙醇味, 滤过, 室温下晾干, 备用^[9]。

2.2 苦豆子粗多糖的制备

苦豆子 400 g 加入 10 倍量的 95%乙醇浸泡 30 min 后回流提取两次, 每次 2 h, 滤过, 除去生物碱后的药渣依次加入 15、10 倍水提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并总提取液, 浓缩至适当体积后, 加入 1/4 倍量的 Seavage 试剂 [氯仿 - 正丁醇 (4:1)] 脱除蛋白, 离心分离, 反复操作至无蛋白层为止, 加入 4 倍量的无水乙醇, 低温沉淀过夜, 离心, 沉淀用无水乙醇和丙酮反复洗涤至上清液无色, 冷冻干燥, 备用。

2.3 分析方法

采用苯酚 - 硫酸比色法测定多糖浓度^[10]。

精密称取 105 °C 干燥至恒质量的葡萄糖对照品 100 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 溶解并稀释至刻度, 配成 1 mg/mL 的对照品贮备液。吸上述贮备液 10 mL 定容至 100 mL, 配成 0.1 mg/mL 对照品溶液。精密移取葡萄糖对照品溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 25 mL 具塞刻度试管中, 加蒸馏水至 1.0 mL, 再各加 6% 苯酚溶液 0.5 mL 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5 mL, 振摇 5 min, 置沸水浴中加热 10 min, 取出冷却至室温。以试剂空白为参比, 在 490 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 质量

浓度为横坐标, 得回归方程 $Y=0.8564X-0.0037$, $R^2=0.9991$, 结果表明在 0~100 μg/mL 呈良好的线性关系。

按照以上方法测定的粗多糖质量分数为 71.30%。

2.4 树脂吸附性能筛选

分别准确称取 5 g 经预处理的大孔树脂置于具塞三角瓶中, 向其中加入 5 mg/mL 苦豆子粗多糖溶液 50 mL, 恒温充分振荡吸附 12 h。静置后取上清液, 测定多糖质量浓度, 计算树脂的吸附量和吸附率。以蒸馏水作为洗脱剂, 将吸附多糖后的 3 种树脂恒温下振荡洗脱 12 h, 对吸附在树脂上的多糖解吸, 测定多糖质量浓度, 计算解吸率、多糖回收率, 对树脂进行筛选。

$$Q=(C_0-C_t) V_0/W$$

$$D_0=(C_0-C_t)/C_0 \times 100\%$$

$$D=[CV/(C_0-C_t) V_0] \times 100\%$$

$$R=[CV/(C_0 V_0)] \times 100\%$$

C_0 为初始质量浓度, C_t 为吸附后质量浓度, C 为解吸液的质量浓度, V_0 为初始溶液体积, V 为解吸液的体积, W 为树脂质量, Q 为吸附量, D_0 为吸附率, D 为解吸率, R 为回收率

3 种大孔树脂对苦豆子多糖的静态吸附和纯化结果见表 1。结果显示, 3 种树脂纯化后的多糖质量分数均较粗多糖的质量分数 71.3% 高, 其中 AB-8 树脂对苦豆子多糖的吸附率、吸附量和解吸率均高于其他树脂, 而且 AB-8 树脂对苦豆子多糖的纯化和回收率也最高, 说明 AB-8 树脂更适用于苦豆子多糖的纯化应用。

表 1 不同大孔树脂静态吸附及解吸和纯化结果

Table 1 Static adsorption-desorption and purification by different macroporous resins

树脂类型	$D_0/\%$	$Q/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$D/\%$	质量分数/%	回收率/%
AB-8	36.18	10.89	86.00	88.55	86.83
X-5	22.82	6.87	79.18	86.92	68.47
NKA II	24.68	7.43	82.33	83.18	74.05

2.5 树脂对苦豆子多糖的纯化工艺考察

取 AB-8 树脂 30 g, 经预处理后分散于去离子水中搅拌, 呈悬浮状并脱气, 然后装柱 (200 mm × 15 mm)。以多糖的质量分数和回收率为指标, 对影响纯化工艺的因素进行考察。

2.5.1 多糖质量浓度对纯化效果的影响 准确称取粗多糖 10、20、30、40、50、60 mg，用蒸馏水溶解并定容至 10 mL，在 pH 7.0、30 ℃ 条件下，分别取上述各质量浓度多糖溶液上样过柱，蒸馏水洗脱，苯酚-硫酸法跟踪检测，从多糖流出开始收集洗脱液，至无糖检出时停止收集，测定多糖质量分数和回收率。结果见图 1。结果显示，多糖质量浓度越高，AB-8 树脂对多糖的纯化效果越好，当质量浓度增加到 5 mg/mL 以上时，多糖质量分数不再增加，回收率逐渐降低。因此，选取上样质量浓度为 5 mg/mL 较为有利。

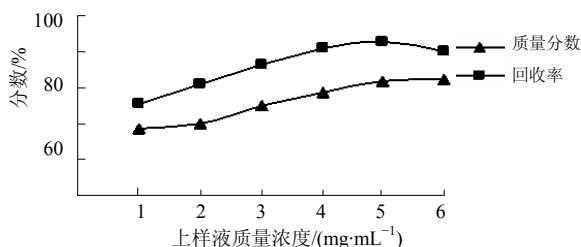


图 1 多糖上样液质量浓度对树脂纯化的影响

Fig. 1 Effects of concentration of polysaccharide samples on purification efficiency

2.5.2 pH 值对纯化效果的影响 取 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液和 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液各适量，用 pH 计测定，配制 pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的缓冲盐溶液。准确称取粗多糖 50 mg 各 5 份，加蒸馏水配制成 5 mg/mL 粗多糖溶液，分别上样至不同 pH 值磷酸盐缓冲液饱和的色谱柱中，30 ℃ 条件下用相应 pH 值的磷酸盐缓冲液洗脱，苯酚-硫酸法跟踪检测，从多糖流出开始收集洗脱液，至无糖检出时停止收集，测定多糖质量分数和回收率，结果见图 2。得出最适宜吸附的 pH 值为 7.0，过酸、过碱均会降低多糖的质量分数和回收率。综合考虑，选取 pH 值为 7.0。

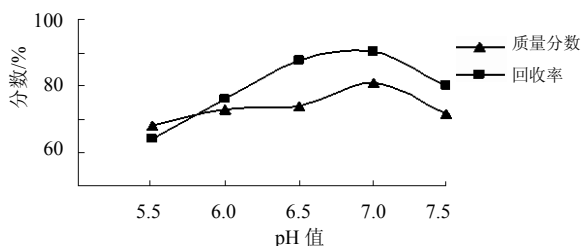


图 2 pH 值对树脂纯化苦豆子多糖的影响

Fig. 2 Effects of pH values on purification efficiency of *S. alopecuroides* polysaccharides

2.5.3 温度对脱色效果的影响 准确量取 5 mg/mL 粗多糖溶液 10 mL，于不同温度下上柱，蒸馏水洗脱，苯酚-硫酸法跟踪检测，从多糖流出开始收集洗脱液，至无糖检出时停止收集，测定多糖质量分数和回收率，结果见图 3。结果显示 AB-8 树脂对苦豆子多糖的吸附温度为 25 ℃ 时，纯化效果最好，既不影响多糖的回收率，又能有效地提高多糖的质量分数。

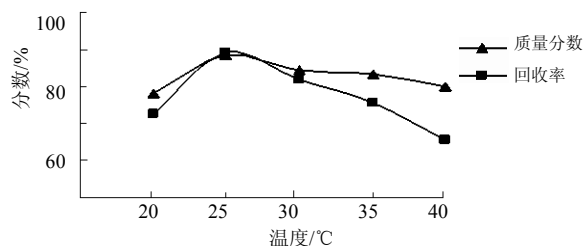


图 3 温度对树脂纯化苦豆子多糖的影响

Fig. 3 Effect of temperature on purification efficiency of *S. alopecuroides* polysaccharides

2.5.4 体积流量对脱色效果的影响 准确量取 5 mg/mL 粗多糖溶液 10 mL，于一定条件下上样，进行柱色谱分离，用蒸馏水选择体积流量分别为 0.2、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 mL/min 洗脱，苯酚-硫酸法跟踪检测，从多糖流出开始收集洗脱液，至无糖检出时停止收集，测定多糖质量分数和回收率，结果见图 4。结果显示，不同体积流量下，多糖质量分数、回收率相近，说明体积流量对纯化效果无显著影响。

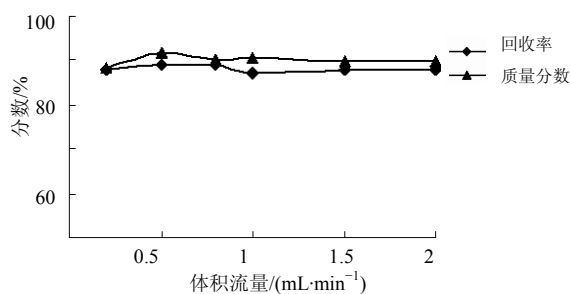


图 4 体积流量对树脂纯化苦豆子多糖的影响

Fig. 4 Effects of flow rate on purification efficiency of *S. alopecuroides* polysaccharides

2.6 多糖动态吸附与解吸

用 5 mg/mL 粗多糖溶液通过装有 AB-8 树脂柱，控制体积流量为 0.5 mL/min，苯酚-硫酸法测定流出液质量浓度，10 min 测定一次，得穿透曲线，见图 5。

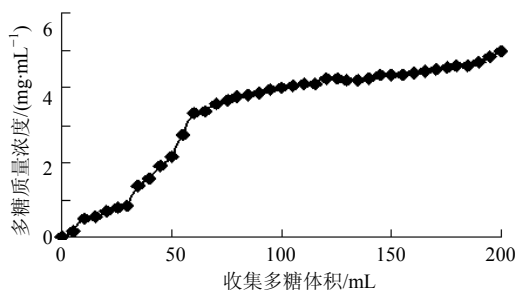


图 5 多糖吸附穿透曲线

Fig. 5 Breakthrough curve of polysaccharides

可见多糖质量浓度随着收集体积的增大而升高, 体积达到 70 mL 以上, 斜率变小, 质量浓度趋于平衡, 穿透能力减弱。

用蒸馏水以 0.5 mL/min 的体积流量洗脱, 苯酚-硫酸法测定流出液质量浓度, 10 mL 收集一管, 绘制洗脱曲线, 见图 6。可见所得产品为单一对称峰, 说明多糖质量分数较高。收集洗脱液, 冷冻干燥, 测定多糖质量分数为 87.13%, 多糖洗脱率为 89.52%。

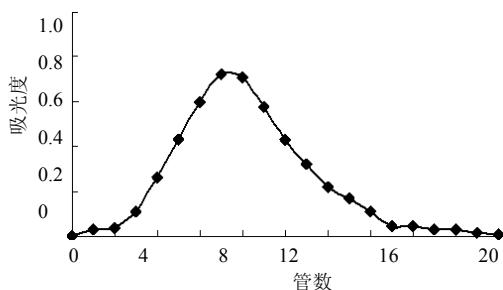


图 6 多糖洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of polysaccharides

2.7 验证试验

综合多方面因素, 选择 AB-8 树脂作为最佳纯化树脂, 并研究其对苦豆子多糖的纯化工艺, 得到最佳纯化条件为: 上样多糖溶液质量浓度为 5 mg/mL, 上样 10 mL, pH 值为 7.0, 温度为 25 ℃。

在最佳纯化条件下进行 3 次验证试验, 得到多糖质量分数分别为 89.72%、88.90%、88.08%, 均值为 88.90%, 比纯化前提高了 17.6%; 回收率分别为 88.22%、92.02%、91.62%, 均值为 90.62%, 说明该方法稳定有效, 重现性良好, 适于苦豆子多糖的吸附纯化。

3 讨论

长期以来, 对多糖类有效成分重视不够, 不仅

是因为对多糖在生命过程中的重要作用缺乏认识, 多糖的分离纯化比较困难也是一重要原因。大孔吸附树脂对苦豆子多糖的纯化能有效除去苦豆子多糖中可能含有的生物碱、皂苷、黄酮等弱极性的杂质物质, 选择性地保留有效成分。本实验发现 AB-8 树脂对苦豆子多糖的分离纯化最好, 纯化能力强, 回收率高, 使多糖质量分数由原来的 71.30% 提高到 88.90%, 对获得苦豆子多糖是相当必要的, 它为苦豆子多糖的结构测定和构效关系研究提供了原料, 为获得高纯度苦豆子多糖, 提高苦豆子多糖的利用度和新药开发提供了依据。

实验选用先除蛋白后醇沉的方法得到苦豆子粗多糖, 与先醇沉后脱蛋白再醇沉的方法相比, 省去了二次醇沉和多糖再溶解的步骤, 不仅简化了方法, 而且提高了得率, 并且经考察两者对苦豆子多糖质量分数并无显著影响, 因此选择了将水提后的多糖液体直接进行脱蛋白, 再醇沉、冻干得到脱蛋白粗多糖的方法。

参考文献

- [1] 祁燕蓉, 何生虎, 史光亮. 苦豆子的研究进展 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2008(6): 36-38.
- [2] 王 进, 罗光宏, 颜 霞, 等. 干旱胁迫对苦豆子种子吸胀萌发和幼苗生长的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1807-1811.
- [3] 杨永利, 郭守军, 罗军德, 等. 苦豆子胶多糖组分气相色谱与薄层色谱分析 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 159-162.
- [4] 蒋建新, 张卫明, 朱莉伟, 等. 半乳甘露聚糖型植物胶的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(4): 1-5.
- [5] 艾连中. 响应面分析法优化苦豆子多糖提取工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31(12): 141-143.
- [6] 任晓峰, 余婷婷, 陈 钧. 大孔吸附树脂分离纯化黄连、关黄柏中季铵总碱的工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 49-51.
- [7] 徐晓宏, 张铁军, 廖茂梁, 等. 大孔吸附树脂分离纯化黄连总生物碱的工艺研究 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1167-1170.
- [8] 麻明友, 麻成金, 吴竹青. 大孔树脂吸附分离番茄红色素的研究 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(6): 189-191.
- [9] 张若洁, 徐永霞, 王鲁峰, 等. 大孔树脂纯化芦笋总皂苷的工艺研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1097-1100.
- [10] 刘 娅, 戴升健, 鲁松涛, 等. 无花果多糖超声提取技术的研究 [J]. 食品科技, 2006(9): 87-89.