

生物学通报, 2004, 31(6): 42-47.

- [5] 吴伟, 阙俐, 陈健, 等. 星点设计-效应面法优化苯甲酸利扎曲普坦片的处方[J]. 复旦学报: 医学版, 2003, 30(4): 381-387.
- [6] 崔凤杰, 许泓瑜, 许正宏, 等. 运用多元数学模型优化灰树花发酵培养基组成的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 18-21.
- [7] 陈大为, 张彦青, 邹艳霜, 等. 灯盏花素缓释微丸制备工艺与处方优化的研究[J]. 中草药, 2003, 34(11): 990-993.

无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖的研究

韩永萍^{1,2}, 林强²

(1. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023; 2. 中国矿业大学, 北京 100083)

摘要:目的 研究无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖溶液, 确定操作工艺条件和有效清洗方法。方法 主要考察膜通量和膜通量恢复率。结果 在 60℃, pH 7~8.0, 0.3~0.4 MPa 压差操作条件下微滤虫草粗多糖溶液, 多糖收率较传统醇提工艺高出 30%, 同时可除去大部分不溶固体物和蛋白质胶体等大分子有机物杂质。采用 80℃ 热水与 1% NaOH 溶液交替清洗并伴有间歇、短时反冲洗, 可使膜的清水通量恢复率达到 90% 以上。结论 无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖溶液工艺简单、可行。

关键词: 冬虫夏草; 多糖; 无机陶瓷微滤膜; 膜通量

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)10-1490-04

Purification of rough cordyceps polysaccharides solution by inorganic ceramic micro-filtration membrane

HAN Yong-ping^{1,2}, LIN Qiang²

(1. Bio-chemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China; 2. China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To apply the membrane technology for purifying rough cordyceps polysaccharides solution, the optimal operation condition and effective cleaning method were researched. **Methods** To mainly analyze the flux of membrane and its recovery. **Results** The optimal experiment operation condition obtained is 60℃, pH value 7-8, and pressure 0.3-0.4 MPa, by which the polysaccharides recovery was about 30%, more than by traditional ethanol extraction, and the most impurities as infusibility substance and protein colloid etc. were taken out. Moreover, the flux of membrane recovery can be above 90% after 80℃ water and 1% NaOH solution was alternately used to wash the fouling membrane under intermittent little back-pulsing. **Conclusion** The process of membrane technology purifying rough cordyceps polysaccharides is simple and feasible.

Key words: *Cordyceps*; polysaccharides; inorganic ceramic micro-filtration membrane; membrane flux

冬虫夏草作为我国传统名贵的珍稀药用植物, 是中医药三大补药之一。虫草多糖可活化巨噬细胞, 刺激抗体产生, 具有增强人体免疫力、抗肿瘤及延缓衰老等功效^[1]。采用传统水煎醇沉工艺提取冬虫夏草菌丝体中粗多糖的效率较低, 其中固形物的量接近 70%, 使用前还需要经过脱蛋白和乙醇分级沉淀等工艺进一步纯化^[2]。由于该过程中多糖的回收率直接受乙醇体积分数的影响, 在工艺设计中不仅需要对提取液进行浓缩, 还要考虑乙醇的回收, 因此整体工艺比较复杂, 操作困难, 多糖收率低且生产成本

高, 生产环境较恶劣。微滤-超滤或纳滤组成的膜集成系统具有能耗低、单级分离效率高、工艺简单、可在室温或低温下操作, 产品收率和质量分数均高于传统的提取工艺, 在中药澄清、发酵液纯化等生物产品提取方面有着十分广阔的应用前景。然而, 将该系统用于虫草粗多糖纯化的关键在于有效解决膜的污染和堵塞, 尤其是系统前端微滤膜的污染和清洗^[3,4]。为此, 本实验考察了无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖的过程, 优化运行工艺参数, 确定清洗方案, 预期为该工艺的工业化应用提供参考, 同时也为

收稿日期: 2007-12-04

基金项目: 北京市教委项目(KM200511417005)

作者简介: 韩永萍(1971-), 女, 山东人, 讲师, 中国矿业大学在读博士, 研究方向为天然产物提取与分离。

Tel: (010) 67377485 E-mail: hypyyt@163.com

各种菌丝胞内外多糖的纯化和提取提供新思路。

1 材料

虫草菌丝体粗多糖由浙江庆源真菌多糖制品有限公司提供,质量分数为30%。

无机陶瓷微滤实验用装置,膜组件为9通道、0.2 μm孔径的α-Al₂O₃陶瓷膜,由上海亚东核级树脂有限公司提供;日本岛津TU—1901紫外可见分光光度计;Lock-Stong离心机(北京路科顺科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 指标的测定

2.1.1 蛋白的测定:采用考马斯亮蓝法^[5]。以牛血清蛋白作标准曲线,得回归方程 $Y = -0.00376X - 0.02364$, $r = -0.9992$ 。

2.1.2 还原糖的测定^[6]:采用3,5-二硝基水杨酸法。用葡萄糖作标准曲线,得回归方程为 $Y = 7.0263X + 0.0088$, $R^2 = 0.9991$ 。

2.1.3 总糖的测定^[6]:采用硫酸-苯酚法。用葡萄糖作标准曲线,得回归方程为 $Y = 0.03939X - 0.01722$, $R^2 = 0.9997$ 。

2.1.4 膜通量恢复率(η_t)的计算: $\eta_t = (J_1/J_0) \times 100\%$,式中 η_t 为膜通量恢复率, J_0 为污染前清水膜通量, J_1 为污染清洗后清水膜通量。

2.1.5 体积浓缩因子(R)的计算: $R = \text{料液的初始体积} / \text{最终截留液的体积}$ 。

2.2 虫草粗多糖溶液的组成分析:采用以上方法测定粗多糖溶液中含多糖8.20 g/L,蛋白质6.32 g/L,不溶固体物5.46 g/L。

2.3 操作条件的确定^[7]:微滤膜通量(J)与操作条件符合 $J = \varepsilon^3 \Delta P / [K t_m u S(1 - \varepsilon)]$,式中 J 为通量; ε 为膜表面的孔隙率,与膜本身结构及膜孔堵塞情况有关; S 为单位膜体积所具有的内表面积; ΔP 为膜两侧的压差,是过程动力; K 为常数; t_m 为膜界面厚度,与膜表面浓差极化程度有关; u 为料液的黏度,与温度和浓度有关。可见,运行过程中操作压差、温度和料液的pH值等运行参数对微滤的运行稳定性影响较大。

2.3.1 操作压差对膜通量的影响:在室温、pH值为中性的条件下分别对去离子水和经过板框压滤预处理后的20 g/L虫草粗多糖溶液进行微滤,运行稳定15 min后测定膜通量。膜通量随运行压差的变化见图1。可以看出,纯水通量随着操作压力增加而增大,而料液的通量在压差达到0.3 MPa后趋于恒定。这是因为纯水操作不存在浓差极化和膜吸附,膜

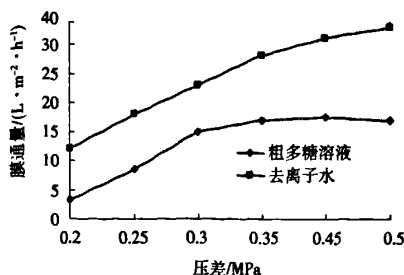


图1 运行压差对膜通量的影响

Fig. 1 Effect of pressure on membrane flux

通量只与压力有关。而对于虫草粗多糖溶液在较低压差下操作时,微滤过程属于压力控制,通量基本上与操作压力呈正比;随着操作压差的增大,膜表面极化层逐渐形成,增大的传质动力很快被加剧的浓差极化作用所抵消,微滤过程也转变为传质控制。继续增大压差不仅不能获得较高的膜通量,还可能导致一些与膜孔径尺寸相近的微粒卡在膜内引起堵塞。因此,从减少动耗和兼顾设备生产能力的角度考虑,操作压力采用0.3~0.4 MPa。

2.3.2 温度对膜通量的影响:在0.3 MPa、pH值为中性的条件下分别对去离子水和预处理后的虫草粗多糖溶液进行微滤,运行稳定15 min后测定膜通量。膜通量随温度的变化见图2。结果表明随着温度升高,去离子水的膜通量明显增大;而虫草粗多糖溶液在低温操作时温度对膜通量的影响很小,当温度超过50℃后随着温度升高膜通量明显增大。认为去离子水的黏度随温度升高而减小,而虫草粗多糖溶液的黏度主要取决于蛋白质等有机物的存在状态。尽管随温度升高溶液总体黏度下降,但只有当温度升到使蛋白质发生变性时溶液的流动性才会发生根本性改变。此时溶质扩散系数增大,膜表面浓差极化减弱。因此,应利用无机陶瓷膜耐高温的特性尽量在高温条件下操作。考虑到运行成本、操作方便以及温度过高对蛋白质等大分子有机物截留不利,初步确

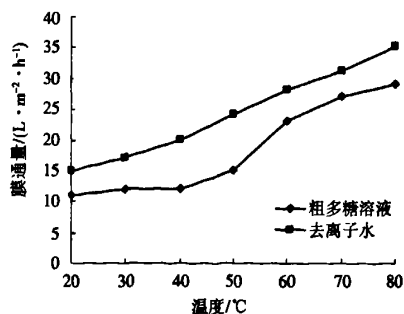


图2 温度对膜通量的影响

Fig. 2 Effect of temperature on membrane flux

定操作温度为 60 ℃。

2.3.3 pH 值对膜通量的影响: 在 60 ℃、0.3 MPa 条件下对预处理后的虫草粗多糖溶液进行微滤, 运行稳定 15 min 后测定膜通量。膜通量随 pH 值的变化见图 3。可以看出, pH 为 5 时, 膜通量出现了最低值; 随着 pH 值远离该点, 通量开始增大。虫草粗多糖溶液中存在蛋白质类有机物, 而蛋白质是由一系列氨基酸通过肽键结合而成的高分子聚合物, 存在等电点。在等电点处, 蛋白质的溶解度最低。多糖溶液在 pH 值为 5 时已经接近于等电点, 此时蛋白质以流动性能较差的胶体状态为微滤膜所截留, 阻碍了微粒或多糖由膜表面向主体溶液的反向扩散, 使膜边界层厚度增大。随着 pH 值远离等电点, 蛋白质溶解度开始增高, 同时因带电荷而产生静电斥力, 不易凝聚。尽管陶瓷膜对碱度的耐受性较强, 但为了防止多糖失活, 料液 pH 值控制在 7~8。

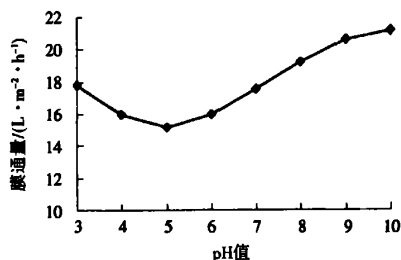


图 3 pH 值对膜通量的影响

Fig. 3 Effect of pH values on membrane flux

2.4 微滤操作方式的研究: 为了减缓膜的污染程度、延长操作周期, 试验中每运行 10 min 通过管路阀门改变连接, 利用透过液进行反向冲洗 2 min。膜通量随时间的变化与无反冲洗的常规操作对比见图 4。可以看出, 在微滤运行过程中, 随着膜污染的逐步加剧, 膜通量呈现缓慢下降趋势。但在相同条件下带有间歇、短时反冲洗操作的膜通量却比较稳定。这是因为错流操作虽然可以对膜面保持高速冲刷, 减缓了凝胶层的形成, 但并不能消除颗粒在膜表面和孔内的沉积。反冲洗的加入不但扰乱液体的流动状态、及时将沉积的颗粒带离膜孔和表面, 而且能破坏膜表面的吸附层, 有效地缓解膜通量的下降。就运行效率而言, 尽管反冲洗使有效滤过时间变短、并且存在反向透过液的消耗, 但是反冲洗带来的膜通量增益却远远超过所造成的损失。因此, 在运行过程中推荐采用带有间歇、短时反冲洗式的操作方式。

2.5 虫草粗多糖溶液的无机陶瓷微滤膜纯化: 按以上确定的操作条件和方式对预处理后 20 g/L 虫草粗多糖溶液进行微滤, 透过液单独收集。在运行过程

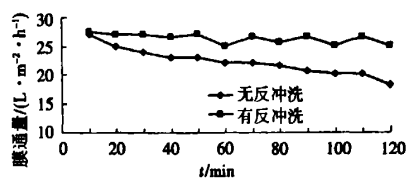


图 4 方式对膜通量的影响

Fig. 4 Effect of modes on membrane flux

中每隔 20 min 向料液中补充 200 mL 去离子水, 直到体积浓缩因子(R)达到 5 时停止运行。虫草粗多糖溶液微滤后透过液明显澄清, 对原料液和最终透过液多糖、蛋白质和不溶固形物分析, 3 次试验结果表明, 多糖平均收率为 75.2%, 蛋白质平均脱出率为 66.4%, 而不溶固形物平均去除率高达 87.6%, RSD 分别为 3.15%、4.42%、5.97%。

为了与传统的热水醇提工艺相比较, 试验对虫草粗多糖溶液进行板框压滤、Savage 法脱蛋白后进行乙醇沉淀提取多糖。乙醇用量为粗多糖溶液体积的 3.5 倍、沉淀时间为 6 h、pH 值为 6.5^[2]。3 次试验的多糖平均收率为 45.31%, RSD 为 1.61%。

可见, 无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖溶液不但运行稳定, 可同时除去大部分不溶固体物和蛋白质胶体等大分子有机物杂质, 为膜集成系统后续的超滤或纳滤处理奠定了基础。与传统提取工艺相比, 不仅操作简单, 多糖回收率也提高了约 30%。

2.6 无机陶瓷微滤膜的清洗研究: 虫草粗多糖溶液中含的较多且可能对微滤膜构成严重污染的成分大致分成 3 类: 蛋白质类有机物、多糖和以菌丝体为主的不溶固体物。试验采用 80 ℃热水、1% NaClO 溶液、1% NaOH 溶液、热水+NaClO 溶液(先用热水清洗 15 min, 再用 1% NaClO 溶液清洗 15 min 交替进行)、热水+NaOH 溶液(先用热水清洗 15 min, 再用 1% NaOH 溶液清洗 15 min 交替进行)分别进行清洗。考虑到料液中高分子物质和不溶固体物较多, 在微滤过程中不可避免地会发生膜孔道内吸附或深层堵塞等不可逆污染。为此, 在清洗试验操作中每运行 10 min 通过管路阀门改变连接进行反向清洗 2 min。清洗效果见表 1。可见热水和清洗剂的交替清洗效果优于单一药剂清洗, 其中热水+NaOH 溶液的清洗效果最好, 膜纯水通量恢复率达到了 92%。为了更好的分析, 对膜表面的污染层结构做如下假设: 膜表面污染层由内向外依次分为以静电力与膜表面相互作用的吸附层、密实的中间层及外侧较松散的黏附层。黏附层可由机械水力冲刷有效地去除, 而中间层和吸附层则需要清洗剂在适

表1 无机陶瓷微滤膜的清洗效果

Table 1 Cleaning effects of inorganic ceramic micro-filtration membrane

清洗方法	膜通量恢复率/%					
	清洗 10 min	清洗 20 min	清洗 30 min	清洗 40 min	清洗 50 min	清洗 60 min
热水	22	35	53	70	78	82
NaClO 溶液	16	24	37	50	56	62
NaOH 溶液	17	23	32	42	48	55
热水+NaClO 溶液	22	33	55	69	80	87
热水+NaOH 溶液	22	34	52	74	88	92

当的条件下渗入容胀并破坏静电作用和化学键,再通过水流冲刷去除。热水与清洗剂的交替清洗较好地破坏了中间层和吸附层的结构,使清水通量在很大程度上得以恢复。此外,在高温下 NaClO 的氧化性可能受到了某些限制,致使其清洗效果较热水+NaOH 低。因此,确定微滤膜的清洗方法为热水与 1%NaOH 溶液交替清洗并伴有间歇、短时反向清洗。

3 讨论

采用无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖溶液,工艺可行、操作稳定。由试验确定微滤的操作条件为:

料液的 pH 值在 7~8、温度为 60 ℃,操作压差为 0.3~0.4 MPa。在该条件下微滤处理虫草粗多糖溶液,多糖收率较传统的醇提工艺高约 30%,同时可除去大部分不溶固体物和蛋白质胶体等大分子有机物杂质。清洗结果表明,在伴有间歇、短时反冲洗的操作方式下,采用 80 ℃热水与 1%NaOH 溶液交替对污染后的微滤膜进行清洗,可使膜的清水通量恢复率达到 90%以上。另外,微滤清洗和运行过程中均建议采用带间歇、短时反冲洗式的操作方式。

参考文献:

- [1] 陈红霞,贾晓斌.冬虫夏草多糖的药理学研究进展[J].江苏大学学报,2005,15(1):74-78.
- [2] 余晓斌,罗长才,缪静.冬虫夏草多糖提取工艺的优化[J].中草药,2002,33(12):1086-1087.
- [3] Burrell K J, Gill C, McKechnie M T, et al. Advance in separation technology for the brewer: ceramic cross-flow micro-filtration of rough beer [J]. *MBAA Technic Quart*, 1994,31(2):42-50.
- [4] Ma H, Hakim L F, Bowman C N, et al. Factors affecting membrane fouling reduction by surface modification and backpulsing [J]. *J Membr Sci*, 2001,189:255-270.
- [5] 曲春香,沈颂东,王雪峰,等.用考马斯亮蓝测定植物粗提液中可溶性蛋白质含量方法的研究[J].苏州大学学报,2006,22(2):82-85.
- [6] 林颖,吴敏敏,吴雯,等.天然产物中的多糖含量测定方法正确性研究[J].天然产物研究与开发,1996,8(3):5-8.
- [7] 许振良.膜法水处理技术[M].北京:化学工业出版社,2001.

HPLC 法测定小鼠血浆中杠柳毒苷的血药浓度

阙红玉,谢跃生,王跃飞,戚爱禄*,潘桂湘,刘虹

(天津中医药大学中医药研究院 教育部部共建方剂学重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 建立小鼠血浆中杠柳毒苷的 HPLC 测定方法,对其药动学进行研究。方法 血浆样品中加入内标地高辛,用甲醇沉淀蛋白-C₁₈固相萃取处理,氮气吹干后流动相复溶进样。色谱条件:色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)和保护柱 Agilent Zorbax C₁₈柱(12.5 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(25:75);体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;检测波长:220 nm;进样量:20 μL。结果 此法空白血浆中无内源性物质干扰样品测定,血药浓度线性范围为 0.02~2.0 mg/L($r=0.9998$),最低定量限为 0.02 mg/L,平均提取回收率大于 81.8%,批内、批间精密性 RSD 均小于 4.64%,准确度试验的结果在 101.3%~111.7%。结论 本方法简便,准确,灵敏度高,并用于小鼠尾静脉注射杠柳毒苷的药时曲线研究。

关键词:杠柳毒苷;血药浓度;药动学;HPLC

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1493-04

Determination of periplocin concentration in mouse plasma by HPLC

KAN Hong-yu, XIE Yue-sheng, WANG Yue-fei, QI Ai-di, PAN Gui-xiang, LIU Hong

(Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education Research Center of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

收稿日期:2007-12-10

基金项目:天津市科技发展计划项目(05YFZJC01102);天津市高等学校科技发展基金资助项目(20050310);天津市卫生局中医、中西医结合科研基金资助项目(2005072);天津市科委应用基础研究计划项目(07JCYBJC01800)

作者简介:阙红玉(1982-),女,河北人,天津中医药大学 2006 级硕士研究生,研究方向为药物分析。E-mail: khy820527@sina.com

*通讯作者 戚爱禄 Tel:13803009082 E-mail: qiaidi@tjtcu.edu.cn

无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖的研究

作者：[韩永萍](#)，[林强](#)，[HAN Yong-ping](#)，[LIN Qiang](#)
作者单位：[韩永萍, HAN Yong-ping \(北京联合大学生物化学工程学院, 北京, 100023; 中国矿业大学, 北京, 100083\)](#)，[林强, LIN Qiang \(中国矿业大学, 北京, 100083\)](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(10)
被引用次数：4次

参考文献(7条)

1. [陈红霞;贾晓斌](#) [冬虫夏草多糖的药理学研究进展](#)[期刊论文]-[江苏大学学报](#) 2005(01)
2. [余晓斌;罗长才;缪静](#) [冬虫夏草多糖提取工艺的优化](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2002(12)
3. [Burrell K J;Gill C;Mckechnie M T](#) [Advance in sepa-ration technology for the brewer:ceramic cross-flow micro-filtration of rough beer](#) 1994(02)
4. [Ma H;Hakim L F;Bowman C N](#) [Factors affecting membrane fouling reduction by surface modification and backpulsing](#)[外文期刊] 2001(2)
5. [曲春香;沈颂东;王雪峰](#) [用考马斯亮蓝测定植物粗提液中可溶性蛋白质含量方法的研究](#)[期刊论文]-[苏州大学学报\(自然科学版\)](#) 2006(02)
6. [林颖;吴簌敏;吴雯](#) [天然产物中的多糖含量测定方法正确性研究](#) 1996(03)
7. [许振良](#) [膜法水处理技术](#) 2001

本文读者也读过(10条)

1. [李鑫](#) [无氢非晶金刚石纳米线阵列膜制备及性能研究](#)[学位论文]2004
2. [赵宜江. 张艳. 嵇鸣. 钟慧](#) [陶瓷微滤膜精制菜籽油的工艺研究](#)[期刊论文]-[膜科学与技术](#)2003, 23(6)
3. [赵宜江. 嵇鸣. 张艳](#) [陶瓷微滤膜澄清中药提取液的研究](#)[期刊论文]-[水处理技术](#)1999(4)
4. [崇二敏](#) [铜掺杂类金刚石纳米尖点阵列研究](#)[学位论文]2007
5. [蔺雷亭](#) [陶瓷微滤膜在碳化硼超微粉生产中的应用](#)[会议论文]-2008
6. [张爱娟. 李健生. 孙秀云. 王连军](#) [陶瓷微滤膜涂膜液的分散性能研究](#)[期刊论文]-[水处理技术](#)2003, 29(4)
7. [张萍. 魏晓伟. ZHANG Ping. WEI Xiao-Wei](#) [陶瓷微滤膜在液相领域的分离机理和控制分析](#)[期刊论文]-[光谱实验室](#) 2006, 23(4)
8. [张爱娟](#) [无机陶瓷微滤膜的制备与表征研究](#)[学位论文]2002
9. [高俊永](#) [磁化微滤技术澄清甘蔗混合汁的初步研究](#)[学位论文]2009
10. [车振明. 王燕. 周黎黎](#) [人工蛹虫草子实体多糖分离最佳工艺研究](#)[期刊论文]-[食品研究与开发](#)2004, 25(5)

引证文献(4条)

1. [冯敬文. 王四元. 龙晓英. 沈雪梅](#) [膜分离技术应用于小儿清热利肺口服液的可性评价](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2011(5)
2. [冯敬文. 王四元. 龙晓英. 沈雪梅](#) [膜分离技术应用于小儿清热利肺口服液的可性评价](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2011(5)
3. [陈彦佐. 冯怡. 徐德生. 郑琴](#) [膜技术在多糖分离应用中存在问题探讨](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2009(6)
4. [张来华. 王博. 朱盛山](#) [中药水提液纯化技术研究进展](#)[期刊论文]-[亚太传统医药](#) 2009(7)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200810016.aspx