

阳离子交换树脂去除人参多糖中蛋白质的研究

陈巧巧^{1,3}, 萧伟^{2,3*}, 万琴^{2,3}, 潘迎志^{2,3}, 姜华^{2,3}, 张怡^{2,3}, 朱克近^{2,3}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 优选人参多糖除蛋白的最佳工艺。方法 以蛋白质脱除率及糖醛酸保留率为考察指标, 用静态吸附试验和动态吸附试验研究树脂对蛋白质的最佳吸附条件。结果 采用阳离子交换树脂 JK008 能有效去除人参多糖中的蛋白质, 在比上柱量为 1 g/g (药材-干树脂), 径高比为 1:7, 洗脱剂用量为 3 BV 的工艺条件下, 蛋白脱除率达到 84.38%, 糖醛酸保留率为 84.90%。结论 阳离子交换树脂除蛋白工艺简单可行, 同时还起到较好的脱色作用, 适用于工业生产前期纯化处理。

关键词: 人参多糖; 阳离子交换树脂; 蛋白质; 糖醛酸; 静态吸附; 动态吸附

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0910-05

Studies on protein removal from polysaccharides in *Panax ginseng* by cation exchange resin

CHEN Qiao-qiao^{1,3}, XIAO Wei^{2,3}, WAN Qin^{2,3}, PAN Ying-zhi^{2,3}, JIANG Hua^{2,3}, ZHANG Yi^{2,3}, ZHU Ke-jin^{2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Key words: polysaccharides in *Panax ginseng*; cation exchange resin; protein; aldonic acid; static adsorption; dynamic adsorption

人参多糖是五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的重要生物活性成分之一。大量实验研究表明, 人参多糖具有较强的增强免疫系统功能^[1-2]和辅助抗肿瘤活性^[3-6]。目前多糖的提取分离通常采用水提醇沉的方法, 醇沉过程中蛋白质会与多糖一起沉淀下来, 不仅降低了多糖的质量分数, 而且对多糖成品的安全性存在较大影响, 因此去除多糖中的蛋白质在多糖的分离纯化中尤为重要。目前实验室常用的除去人参多糖中蛋白质的方法是 *Sevage* 法^[7-8], 但该法操作繁琐且成本高, 有机相较难除干净, 在工业生产中的应用受到了较大的限制。本实验采用阳离子交换树脂对人参多糖中蛋白质进行吸附, 初步研究了该树脂的吸附和洗脱条件。研究结果表明, 本方法简单可行, 适用于工业生产前期纯化处理。

1 仪器与材料

生晒参经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主管药师鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根及根茎 (批号 110101, 产地: 吉林抚松)。

UV2550PC 紫外可见分光光度计 (日本岛津); DL-500B 离心机 (上海安亭仪器厂); BP-211D 微量分析天平 (北京赛多利斯天平有限公司)。

AB-8 和 HPD600 型大孔吸附树脂、717 型阴离子交换树脂、732 型阳离子交换树脂 (河北沧州宝恩化工有限公司), JK008 型阳离子交换树脂 (安徽皖东化工有限公司); 牛血清白蛋白 (F20080603)、考马斯亮蓝 G-250 (国药集团化学试剂有限公司); D-半乳糖醛酸 (Fluka, 进口分装); 四硼酸钠 (AR, 中国医药上海化学试剂公司); 间羟联苯 (AR, 梯

收稿日期: 2011-10-25

基金项目: 国家科技部“973 计划”资助项目 (2010CB735604)

作者简介: 陈巧巧 (1987—), 浙江省金华市人, 南京中医药大学 2009 级研究生, 研究方向为创新中药的研究与开发。

Tel: 15062987351 E-mail: chenjiayuning@126.com

*通讯作者 萧伟 E-mail: wzzh-nj@tom.com

希爱上海化成工业发展有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 人参多糖的提取

称取人参粗粉 3 kg, 加入 12 倍量 75%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 药渣挥干乙醇后加入 12 倍量的纯化水, 100 °C 条件下提取 3 次, 每次 2 h, 合并 3 次提取液, 减压浓缩 4 倍, 50 °C 条件下加入 0.3% 的活性炭搅拌脱色 30 min, 离心除去活性炭, 得人参多糖脱色液。

2.2 考察指标的确定

人参多糖由人参淀粉和人参果胶两部分组成, 药理活性部分主要是人参果胶。人参果胶是由糖醛酸及各种中性糖组成的酸性杂多糖, 研究表明糖醛酸本身或含有糖醛酸结构单元的低聚糖或多糖常显示出十分重要的生物活性^[9], 因此本实验以蛋白去除率及糖醛酸的保留率为指标考察不同树脂对人参多糖除蛋白效果的影响。

$$\text{糖醛酸保留率} = M / M_0$$

$$\text{蛋白质去除率} = 1 - M' / M_0'$$

$$\text{树脂对蛋白的吸附量} = (M_0' - M') / W$$

M_0 、 M 分别为树脂处理前后药液中糖醛酸总量, M_0' 、 M' 分别为树脂处理前后药液中蛋白质的总量, W 为树脂质量

脱色率测定及计算方法^[10]: 调节待测多糖溶液至中性, 经 5 000 r/min 离心后滤过, 然后测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

$$\text{脱色率} = (A_0 - A) / A_0$$

A_0 、 A 分别为树脂处理前后药液的测定值

2.3 间羟联苯法测定糖醛酸^[9]

2.3.1 对照品溶液的制备 准确称取 D -半乳糖醛酸 10.05 mg, 加蒸馏水溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 配成 100.5 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。

2.3.2 线性关系考察 精密量取 D -半乳糖醛酸对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于具塞试管中, 加蒸馏水至 1.0 mL, 在冰浴中预冷后加入 12.5 mmol/L 四硼酸钠硫酸溶液 6 mL, 摇匀, 在沸水浴中煮沸 10 min。取出以冰浴冷却至室温, 分别加入 0.15% 间羟联苯溶液 80 μL , 摇匀室温放置 30 min。以 1.0 mL 蒸馏水同上操作制得空白对照, 于 525 nm 处测定 A 值, 以 D -半乳糖醛酸质量浓度为横坐标 (C), A 值为纵坐标 (A) 进行线性回归, 得回归方程 $A = 0.01085C - 0.00036$, $r = 0.9998$, D -半乳糖醛酸在 10.05~60.30 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

2.3.3 样品中糖醛酸的测定 量取人参多糖溶液 10 mL 至 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释定容至 100 mL, 再从中量取 5 mL 加蒸馏水定容至 100 mL 量瓶中备用。精密量取上述供试品溶液 1 mL, 平行 3 份, 按“2.3.2”项下方法测定溶液中糖醛酸的量。

2.4 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质^[11]

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取牛血清白蛋白 20.09 mg, 加蒸馏水溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 制成 200.9 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。

2.4.2 线性关系考察 精密量取牛血清白蛋白对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于具塞试管中, 加蒸馏水补足至 1.0 mL, 向各管中加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 混合均匀, 放置 10 min 后以蒸馏水为空白, 在 595 nm 处测定 A 值。以牛血清白蛋白质量浓度为横坐标 (C), A 值为纵坐标 (A) 进行线性回归, 得回归方程 $A = 0.01354C + 0.00479$, $r = 0.9994$, 牛血清白蛋白在 40.18~200.9 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.3 样品中蛋白质的测定 量取人参多糖溶液 20 mL 至 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释定容至 100 mL 备用。精密量取上述供试品溶液 1 mL, 平行 3 份, 按“2.4.2”项下方法测定溶液中蛋白质的量。

2.5 树脂的预处理

阴离子交换树脂: 用蒸馏水浸泡 24 h, 并用蒸馏水洗至水液澄清, 倾去水后加 1 mol/L HCl 溶液浸泡 24 h, 水洗至中性, 最后加入 1 mol/L NaOH 溶液浸泡 24 h, 并用水洗至中性。

阳离子交换树脂: 用蒸馏水浸泡 24 h, 并用蒸馏水洗至水液澄清, 倾去水后加 1 mol/L NaOH 溶液浸泡 24 h, 水洗至中性, 加入 1 mol/L HCl 溶液浸泡 24 h, 用水洗至中性。

大孔吸附树脂: 95%乙醇浸泡 24 h, 并以 95%乙醇洗至加等量的蒸馏水无气泡产生, 然后用蒸馏水洗至无醇味。

2.6 人参多糖除蛋白工艺研究

2.6.1 树脂的筛选 采用树脂分离人参多糖中的蛋白质, 要求树脂对多糖的吸附量小, 同时对蛋白质的吸附量要大。所以选择树脂类型时既要看树脂的极性大小, 又要看其对多糖和蛋白质吸附量和吸附率的大小。在预试验的基础上, 本实验选择了 717 型阴离子交换树脂、732 及 JK008 型阳离子交换树脂、AB-8 及 HPD600 型大孔吸附树脂 5 种树脂, 按静态吸附试验方法考察各型号树脂对多糖和蛋白质

的静态吸附效果。准确称取 5 种树脂各 10 g, 置于 200 mL 锥形瓶中, 分别加入人参多糖溶液 100 mL, 室温振荡 5 h, 测定糖醛酸保留率、蛋白质去除率及脱色率, 结果见表 1。可以看出 5 种树脂对人参多糖的除蛋白效果依次为 JK008>732>HPD-600>AB-8>717。在除蛋白的同时, 5 种树脂对色素均有一定的吸附作用, 脱色的效果依次为 732>JK008>HPD-600>AB-8>717。结果表明, JK008 对人参多糖中蛋白质的脱除性能最好, 达到 91.93%, 且脱色效果较好, 处理过的多糖杂质少, 质量分数较高, 综合蛋白质去除率、多糖保留率及脱色率 3 个因素考虑, 选用 JK008 型阳离子树脂进行深入研究。

表 1 5 种树脂对人参多糖提取液的静态吸附结果

Table 1 Static adsorption of five resins to ginseng extract in polysaccharide of *P. ginseng*

树脂种类	蛋白去除率 / %	糖醛酸保留率 / %	脱色率 / %
JK008	91.93	82.41	65.67
732	86.76	77.45	70.16
717	12.07	93.36	11.88
HPD-600	82.09	89.25	35.56
AB-8	68.34	89.38	35.42

2.6.2 JK008 树脂对人参多糖中蛋白质及多糖的静态吸附动力学过程 取 JK008 树脂 3 g, 加入人参多糖溶液 60 mL, 平行 9 份, 室温下振荡不同时间后, 取药液测定蛋白质及糖醛酸的量, 绘制 JK008 树脂对人参多糖中蛋白质及糖醛酸的静态吸附动力学过程曲线, 见图 1。从图中可以看出, 随着吸附时间的增加, 树脂吸附量逐渐增加, 在开始阶段吸附量随时间的延长增速较快, 但到 90 min 后, 吸附量增加缓慢, 达到 180 min 后, 吸附量基本不再增加, 此时树脂对蛋白及糖醛酸的吸附与解吸基本达到了动态平衡。说明 JK008 对人参多糖中蛋白质能达到较快的吸附作用, 使用该树脂对人参多糖进行纯化是可行的。

2.6.3 体积流量对蛋白去除率的影响 取 JK008 阳离子树脂 25 g 装柱 (180 mm×15 mm), 按动态吸附试验方法, 上样人参多糖溶液 100 mL, 分别控制体积流量为 1、1.5、2、2.5、3 BV/h, 并用 3 倍柱体积的纯化水进行洗脱, 绘制不同体积流量下蛋白去除率与糖醛酸保留率的曲线, 结果见图 2。结果表明随着试液体积流量的增大, 树脂对蛋白质的吸附量减少, 这是因为体积流量过大, 树脂与蛋白质

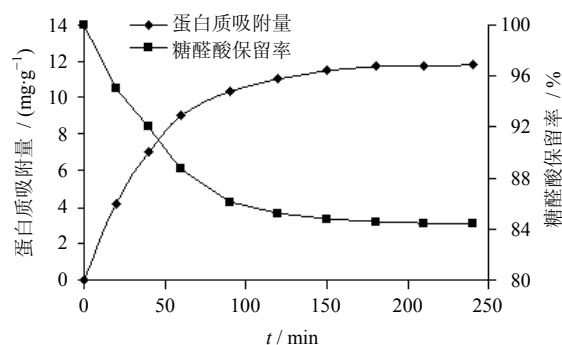


图 1 JK008 树脂对人参多糖中蛋白质及糖醛酸的吸附动力学曲线

Fig. 1 Adsorption kinetics of JK008 on protein and aldonic acid in polysaccharide of *P. ginseng*

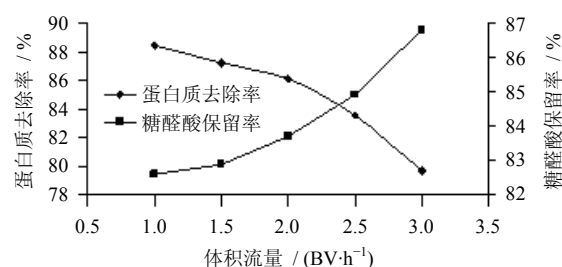


图 2 体积流量对除蛋白效果的影响

Fig. 2 Effect of volume flow on protein removal

分子之间没有足够的接触; 体积流量过小, 有利于吸附, 但会延长吸附时间。因此, 综合考虑糖醛酸保留率、蛋白去除率及大生产的可行性, 选择体积流量为 2 BV/h。

2.6.4 树脂最大上样量的确定 取 JK008 阳离子树脂 25 g 装柱 (15 mm×180 mm), 按动态吸附试验方法, 上人参多糖溶液, 控制体积流量为 2 BV/h, 收集流出液, 5 mL/份, 每隔一份测定蛋白质和糖醛酸的含量, 绘制流出液中蛋白去除率和糖醛酸保留率与上样量的关系曲线, 结果见图 3。随着上样量的增大, 树脂对蛋白质的吸附效率逐渐下降, 相应的糖醛酸保留率上升, 当上样量超过 185 mL 时, 树脂对蛋白的吸附效率下降较为明显。因此在实际操作中, 25 g 树脂的最大上样量为 185 mL, 折合成每克树脂处理的生药量为 1 g。

2.6.5 径高比的确定 取不同量的树脂, 用直径为 15 mm 的玻璃色谱柱装柱, 使径高比分别为 1:5、1:7、1:9, 按最大上样量, 精密吸取多糖样品液, 以 2 BV/h 的体积流量过树脂, 收集流出液, 再分别用 3 倍柱体积的蒸馏水洗脱。合并流出液和水洗液, 测定糖醛酸保留率及蛋白质去除率, 结果见表 2。从实验结果可看出, 随着径高比的增加, 树脂对蛋白

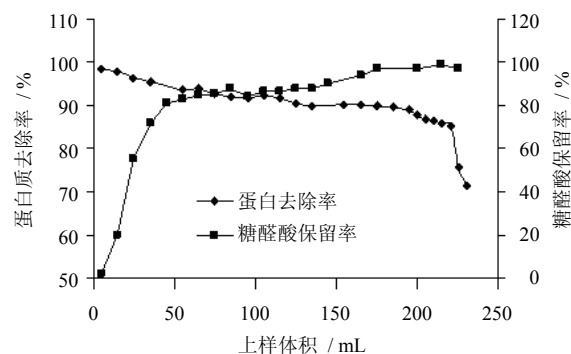


图 3 JK008 吸附容量与上样量的关系

Fig. 3 Relationship between adsorption capacity of JK008 and sample amount

表 2 树脂径高比对除蛋白效果的影响

Table 2 Effect of diameter-height ratio on protein removal

树脂径高比	糖醛酸保留率 / %	蛋白质去除率 / %
1 : 5	85.96	80.36
1 : 7	84.00	86.34
1 : 9	83.07	88.67

和糖醛酸的吸附率均有所增大,树脂径高比从 1 : 5 增大到 1 : 7 时,蛋白去除率明显增大,但从 1 : 7 增大到 1 : 9 时,蛋白去除率增大不明显,综合考虑糖醛酸的保留率及工业生产的可行性,选择树脂径高比为 1 : 7。

2.6.6 洗脱剂用量的确定 取阳离子交换树脂 JK008 湿法装柱 (15 mm×105 mm),按动态吸附试验方法,上多糖样品溶液 10 mL,用蒸馏水洗脱,每 5 mL 收集 1 份,测定每份中的糖醛酸及蛋白质的量,绘制洗脱曲线,结果见图 4。当洗脱剂用量达到 3 倍柱体积时,对人参多糖的洗脱基本完全,达到 84.43%,且蛋白去除率达到 85.75%。因此实际操作中,洗脱体积控制在 3 倍柱体积即可。

经上述研究,确定去除人参多糖中蛋白质的最佳工艺为将药液以 2 BV/h 的体积流量通过径高比为 1 : 7 的 JK008 阳离子交换树脂,收集过柱液后用 3 倍柱体积的蒸馏水洗脱,收集洗脱液,合并过

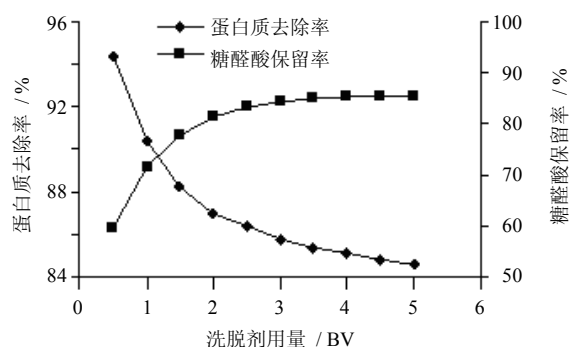


图 4 洗脱剂用量对多糖洗脱效果的影响

Fig. 4 Effect of eluant volume on elution of polysaccharide

柱液和水洗液即得,其中比上柱量 1 g/g (生药材干树脂)。

2.7 工艺的验证

按实验确定的方案,取阳离子交换树脂 JK008 约 15 g 装柱 (15 mm×105 mm),上人参多糖提取液 105 mL (相当于原生药 15 g),收集过柱液,然后用 3 倍柱体积的蒸馏水洗脱,控制体积流量为 2 BV/h。合并过柱液和水洗液,测定样品处理前后糖醛酸和蛋白质的量,结果见表 3。从结果可看出,优选出的工艺除蛋白效果较稳定,蛋白去除率均值达到 85.98%,糖醛酸保留率均值为 84.82%,与单因素实验中结果较一致,说明该工艺稳定可行。

2.8 工艺放大试验

按实验确定的方案,取阳离子交换树脂 JK008 约 210 g 装柱 (35 mm×250 mm),按预处理方法处理备用。取人参多糖提取液 1400 mL (相当于原生药 207 g),上树脂柱,收集过柱液,然后用 3 倍柱体积的蒸馏水洗脱,控制体积流量为 2 BV/h。合并过柱液和水洗液,减压浓缩至药液相对密度为 1.1 (50 ℃),醇沉真空干燥后得脱蛋白的人参多糖样品,测定样品处理前后糖醛酸和蛋白质含量,结果见表 4。从实验结果可看出,上述优选出的工艺条件应用于放大试验时,蛋白去除率达到 84.38%,比小试略有降低,但降低不明显,说明该工艺适用于工业生产前期纯化处理。

表 3 3 批样品树脂处理前后蛋白质及糖醛酸测定结果

Table 3 Determination of protein and aldonic acid in three batches of samples before and after resin treatment

样 品	蛋白质总量 / mg	糖醛酸总量 / mg	蛋白去除率 / %	糖醛酸保留率 / %
树脂处理前样品	68.48	877.38	—	—
除蛋白样品 1	9.39	739.90	86.29	84.33
除蛋白样品 2	9.77	745.08	85.75	84.92
除蛋白样品 3	9.64	747.54	85.92	85.20

表 4 3 批放大样品树脂处理前后蛋白质及糖醛酸测定结果

Table 4 Determination of protein and aldonic acid in three batches of amplified samples before and after resin treatment

样 品	蛋白质量分数 / %	糖醛酸质量分数 / %	除蛋白率 / %	糖醛酸保留率 / %
树脂处理前样品	2.50	25.69	—	—
除蛋白样品 1	0.42	29.15	83.29	84.75
除蛋白样品 2	0.38	29.64	84.64	84.74
除蛋白样品 3	0.37	29.22	85.20	85.20
除蛋白样品平均值	0.39	29.33	84.38	84.90

3 讨论

通过预试验发现,静态吸附筛选树脂实验中,振荡吸附 5 h 与 12 h,树脂对人参多糖溶液中的蛋白和多糖的吸附无明显差异,且放置时间过长,药液易变质,影响实验结果,因此本实验采用振荡时间为 5 h。

静态吸附试验中,JK008、732 阳离子大孔树脂对人参多糖中蛋白质的吸附性能均较其他树脂好,而 717 型阴离子大孔树脂对蛋白质的吸附性能最差,推测原因可能是人参多糖中蛋白质在多糖溶液中(pH 6.3~6.8)大部分带正电荷,易被吸附在阳离子交换树脂上。

文献报道阳离子交换树脂对蛋白质及色素的吸附效果随 pH 值的变化有所不同,实验中发现,随着 pH 值的变化,多糖的溶解度也有所不同,当 pH 值较低(3.5 左右)时,人参多糖沉淀析出,考虑到树脂在样品的原始 pH 值时,即可达到较好的除蛋白效果,因此纯化过程中不调节样品的 pH 值。

参考文献

[1] Lee Y S, Chung I S, Lee I R, *et al.* Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng* [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(1A):

323-331.

- [2] Lim T S, Na K, Choi E M, *et al.* Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Panax ginseng* [J]. *J Med Food*, 2004, 7(1): 1-6.
- [3] 倪维华. 人参多糖免疫活性及抗肿瘤作用 [D]. 长春: 东北师范大学, 2010.
- [4] Yun Y S, Lee Y S, Jo S K, *et al.* Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from *Panax ginseng* as an immunomodulator [J]. *Planta Med*, 1993, 59(6): 521-524.
- [5] 高文芹, 贾 力, 赵余庆. 人参的抗癌作用及其机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(1): 53-58.
- [6] 李建平, 何 轩, 姜 蓉, 等. 人参多糖对 K562 细胞基因表达谱的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 940-943.
- [7] 张 旭. 人参多糖的系统分析及其免疫活性研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2009.
- [8] 李先华. 人参多糖的分离、纯化及结构研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2007.
- [9] 俞 丹, 马 龙, 赵 军, 等. 琐琐葡萄多糖中糖醛酸含量的测定 [J]. *新疆医科大学学报*, 2009, 32(5): 533-535.
- [10] 和殿峰, 李跟区, 陈爱娜. 正交试验优选鱼腥草多糖活性炭脱色工艺 [J]. *中国药房*, 2009, 20(6): 434-435.
- [11] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.