

大孔吸附树脂纯化吴茱萸果实多糖工艺优化

潘峰¹, 阮国永², 杨建波², 朱欣婷³, 刘云^{1,3*}

(1. 遵义医科大学生命科学研究院, 贵州遵义 563000) (2. 贵州光正制药有限责任公司, 贵州贵阳 550000)
(3. 遵义医科大学基础医学院, 贵州遵义 563000)

摘要: 为得到大孔吸附树脂对吴茱萸果实多糖纯化的最佳工艺, 本研究利用水提醇沉法提取多糖, 考察 7 种不同类型大孔吸附树脂对该多糖的纯化效果, 并利用静态和动态单因素吸附实验及响应面法优化树脂纯化工艺, 最后对吸附前后多糖部分进行表征。结果表明, S-8 树脂对吴茱萸果实多糖具有较好的综合纯化效率; 最佳工艺参数如下: 样品浓度为 4.41 mg/mL, 初始 pH 值为 5, 吸附环境温度 24.30 °C, 流速 2.0 BV/h; 该条件下色素清除率为 49.21%, 蛋白清除率为 68.97%, 多糖保留率为 55.05%。结构表征结果表明, 吸附前后该多糖分子量 (Mw) 分布 (主峰 1 Mw>2.00×10⁵ u, 主峰 2 Mw 约为 2.35×10⁴ u), 红外吸收特征及糖链异头氢吸收信号 (δ 5.04×10⁻⁶ 和 δ 4.42×10⁻⁶) 等均未发生明显改变。综上, S-8 大孔吸附树脂可用于吴茱萸果实多糖的高效纯化, 条件温和环保, 且不会引起多糖链断裂和多糖结构改变。

关键词: 吴茱萸; 大孔吸附树脂; 多糖纯化; 响应面; 优化参数; 结构特征

文章编号: 1673-9078(2021)09-216-225

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.0047

Optimization of the Purification Process for the Polysaccharides from *Tetradium ruticarpum* Fruit Using Macroporous Adsorption Resins

PAN Feng¹, RUAN Guo-yong², YANG Jian-bo², ZHU Xin-ting³, LIU Yun^{1,3*}

(1. Life Sciences Institute, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China) (2. Guizhou Guangzheng Pharmaceutical Co. Ltd., Guiyang 550000, China) (3. School of Basic Medical Science, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract: In order to obtain the best purification process using macroporous resin for the polysaccharides from *Tetradium ruticarpum* fruit (TrPs), water extraction and alcohol precipitation were applied to extract the polysaccharides. The purification performance of seven different types of macroporous adsorption resins was examined by used static and dynamic single factor experiments, and the purification process was optimized by the response surface method. Finally, the polysaccharide structure before and after adsorption was characterized. The results show that the S-8 resin had the highest comprehensive purification efficiency for the crude TrPs, and the optimal purification conditions were: sample concentration, 4.41 mg/mL; initial pH 5; adsorption environment temperature, 24.30 °C; flow rate 2.0 BV/h. Under these conditions, the decolorization rate was 49.21%, deproteinization rate was 68.97% and polysaccharide retention rate was 55.05%. The structural characterization results revealed the molecular weight (Mw) distribution of the polysaccharide before and after adsorption (Mw of peak 1 higher than 2.00×10⁵ u; Mw of peak 2, approximately 2.35×10⁴ u), the infrared absorption characteristics and the sugar chain anomeric hydrogen absorption signal of TrPs (δ 5.04×10⁻⁶ and δ 4.42×10⁻⁶) did not change significantly before and after adsorption. In summary, S-8 macroporous adsorption resin can be used for the high-efficiency purification of TrPs, under mild and environmentally friendly conditions, without causing polysaccharide chain scission and polysaccharide structural changes.

引文格式:

潘峰,阮国永,杨建波,等.大孔吸附树脂纯化吴茱萸果实多糖工艺优化[J].现代食品科技,2021,37(9):216-225,+304

PAN Feng, RUAN Guo-yong, YANG Jian-bo, et al. Optimization of the purification process for the polysaccharides from *Tetradium ruticarpum* fruit using macroporous adsorption resins [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 216-225, +304

收稿日期: 2021-01-12

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科平台人才[2019]-035; 黔科平台人才[2019]-014; 黔科合支撑[2020]4Y154 号); 遵义市科技计划项目青年人才专项 (遵市科合 HZ 字 (2020) 75 号)

作者简介: 潘峰 (1989-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 中药资源开发与利用, E-mail: panfengpf123@126.com

通讯作者: 刘云 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性成分的挖掘与利用, E-mail: liuyunzy@126.com

Key words: *Tetradium ruticarpum*; macroporous adsorption resin; purification of polysaccharide; response surface; optimized parameters; structural characteristics

吴茱萸 (*Tetradium ruticarpum* (A. Juss.) T. G. Hartley) 为芸香科 (Rutaceae) 吴茱萸属 (*Tetradium*) 植物, 始载于《神农本草经》, 也是《中国药典》2020 版 (一部) 吴茱萸药材的主要基原植物。吴茱萸近成熟的果实具有健脾和胃、疏肝下气、散寒止痛、燥湿止泻的功效, 用于咽喉肿痛、口舌生疮、高血压等病症的治疗, 并具有较高的产值^[1,2]。药用植物多糖为药用植物的重要活性成分之一, 表现出众多的生理活性, 如抗肿瘤、抗氧化、增强免疫力、抗菌、抗病毒、降血糖血脂等^[3,4]。吴茱萸多糖作为吴茱萸水煮液中主要成分, 提取率可以达到 21.01%^[5]。但是目前, 制药工业上主要是从吴茱萸中提取吴茱萸生物碱、苦味素、萜类、黄酮等成分^[6,7], 吴茱萸多糖多作为废弃物处理。已有研究表明吴茱萸多糖具有较强的清除羟自由基的作用^[8], 对胃溃疡有治疗作用^[9], 有良好的抑菌、杀菌活性等^[10]。但是由于吴茱萸粗多糖提取物中含有较多的色素、蛋白质等杂质, 对于吴茱萸后续研究和产品开发造成了严重不利影响, 选择合适的除杂工艺对吴茱萸多糖深入研究和工业化生产非常重要。

植物多糖除杂要同时兼顾脱色素和脱蛋白质效率, 也要减少多糖损失, 同时避免剧烈反应给多糖结构等带来影响。双氧水法和活性炭吸附法常用来除色素, 但是前者通过氧化色素实现脱色目的, 不能真正去除色素, 且容易造成多糖降解; 后者对多糖的吸附能力较大, 易造成多糖损失, 其炭粉不易除去, 成本较高。Sevag 法、酶法等多用来除多糖蛋白质等杂质, Sevag 法尽管对多糖结构破坏较小, 但是每一次只能清除少量蛋白, 效率较低, 而酶法清除蛋白对条件要求较高, 会降解糖蛋白部分, 破坏其结构。大孔吸附树脂是近年来发展起来的一种具有较多优点的高分子吸附材料, 不含离子交换基团, 具有大孔网状结构和较大比表面积, 不溶于酸、碱、有机溶剂, 选择性较强, 作用条件温和, 对环境影响小, 可重复利用, 在多糖的纯化过程中越来越多地被选用^[11,12], 在对多糖纯化效率上甚至高于活性炭, 例如廖春燕对车前草多糖的脱色工艺的研究就发现大孔吸附树脂脱色效果优于活性炭脱色效果^[13]。但是大孔吸附树脂种类较多, 吸附特征 (吸附能力, 吸附选择性等) 与植物多糖种类密切相关。开发一种高效、快捷、环保的可工业化生产的大孔树脂对吴茱萸多糖精制工艺具有重要理论和实践价值。

1 材料与amp;方法

1.1 主要设备和试剂

1.1.1 主要设备

LYOQUEST PLUS-85 真空冷冻干燥机, 西班牙泰事达科技公司; Biometra Tone 96G 梯度 PCR 仪, 德国耶拿分析仪器股份公司; PH700 pH 计, 新加坡优特仪器有限公司; N-1300D-WD 旋转蒸发仪, 日本 EYELA (东京理化) 东京理化器械株式会社; DZKW-S-6 (双列 6 孔) 电热恒温水浴锅, 上海浦东物理光学厂; SB25-12D 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; HDL-40B 台式低速水平离心机, 中国金坛鸿科; I3X 多功能酶标仪, 美国美谷分子仪器有限公司; 905-ULTS 超低温冰箱, 美国 Thermo Fisher; LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本岛津; ELSD 检测器, 美国 Alltech; Agilent-400 MHz 的核磁共振仪, 美国 Agilent; Varian 1000 系列傅立叶变换红外分光光度计, 美国 Scimitar series。

1.1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒购买于北京索莱宝科技有限公司; X-5、AB-8、S-8、D-101、HP-20、DW-301、APD-100 不同型号树脂购买于东鸿化工有限公司; T-系列葡聚糖 (T-1、T-7、T-50、T-100 和 T-200) 购买于 Pharmacia 公司; 重水 (D₂H) 购买于河北百灵威超精细材料有限公司; NaOH、HCl、NaOH、95%乙醇、苯酚、硫酸等为国产分析纯。

1.2 实验材料收集与鉴定

植物材料于 2019 年秋季采自贵州省毕节市野生吴茱萸近成熟果实。45 °C 干燥后取吴茱萸种皮 0.50 g, 用液氮研磨成粉末, 根据索莱宝植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书步骤, 提取吴茱萸 DNA, 用 1% (W/V) 浓度的凝胶电泳检查提取的 DNA, 用通用引物 P1 (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3') 和 P2 (5'-TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG-3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系和条件参考文献^[14]所述。对扩增出来的 PCR 产物进行切胶纯化后送交生工生物工程 (成都) 有限公司正反双向测序, 将所测序列利用 DNAMAN v6.0.3.99 软件进行组装后, 提交到 NCBI Genbank 数据库上进行 BLAST 比对, 根据比对结果选取相似度最大且具有代表性的序列, 利用 MEGA 5.10 软件采用 Neighbor-joining (NJ) 法进行聚类分析。

1.3 粗多糖的提取

首先,将采集到的野生吴茱萸近成熟果实晒干后,置于烘箱 50 °C 干燥至恒重,粉碎后过 40 目筛。吴茱萸粉末置于烧杯中,以料液比 1:10 (g/mL) 加入 95% 乙醇,混匀后在室温下超声辅助提取 2 h,用定性滤纸进行过滤,收集残渣。以相同料液比再向残渣中加 95% 乙醇,并进行超声,以上乙醇脱脂步骤重复 3 次,以充分除去粉末中脂溶性物质,然后收集残渣,50 °C 烘干备用。随后,以料液比 1:30 (g/mL) 向干燥脱脂后的吴茱萸果实残渣中加入 80 °C 预热蒸馏水,放置于 80 °C 恒温水浴锅水浴 2 h,用 8 层纱布对水溶液进行过滤,收集滤液。滤液 50 °C 减压蒸发浓缩至原体积的 1/4,然后,加入 4 倍体积 95% 乙醇,4 °C 静置过夜沉淀,4000 r/min 离心 10 min,收集沉淀。沉淀物于 -80 °C 冷冻 5 h 后,放置在真空冷冻干燥机内冻干,即得到吴茱萸果实热提粗多糖。

1.4 吸附效率评价指标

1.4.1 脱色率测定

吸取待测多糖溶液 100 μL 于 96 孔板,用酶标仪测量其 420 nm 处吸光度,根据如下公式计算脱色率:

$$\text{脱色率}/\% = \frac{OD_{\text{前}} - OD_{\text{后}}}{OD_{\text{前}}} \times 100\%$$

式中: $OD_{\text{前}}$ 为大孔树脂处理前多糖溶液在 420 nm 处的吸光度值; $OD_{\text{后}}$ 为大孔树脂处理后多糖溶液在 420 nm 处的吸光度值。

1.4.2 蛋白质清除率

蛋白质含量采用二喹啉甲酸法 (BCA) [15] 测定,以牛血清蛋白为标准品,确定其线性回归方程和相关系数。为确保结果准确,每测一次都有建立新的标准曲线和回归方程。蛋白清除率使用下面的公式来计算:

$$\text{蛋白质清除率}/\% = \frac{C_{\text{前}} - C_{\text{后}}}{C_{\text{前}}} \times 100\%$$

式中: $C_{\text{前}}$ 为大孔树脂处理前多糖溶液中的蛋白质含量; $C_{\text{后}}$ 为大孔树脂处理后多糖溶液中的蛋白质含量。

1.4.3 糖保留率

多糖含量采用苯酚-硫酸法测定,以葡萄糖为标准品,确定其线性回归方程和相关系数。为确保结果准确,每测一次都有建立新的标准曲线和回归方程。多糖保留率使用下面的公式来计算:

$$\text{多糖保留率}/\% = \frac{M_{\text{后}}}{M_{\text{前}}} \times 100\%$$

式中: $M_{\text{前}}$ 为大孔树脂处理前多糖溶液中的多糖含量; $M_{\text{后}}$ 为大孔树脂处理后多糖溶液中的多糖含量。

1.4.4 综合隶属度

以上三种指标反应的是三个方面的信息,为了对每一种吸附特性进行直接比较,在此引入隶属度函数 [16],具体公式为:

$$Y = \sum_{j=1}^3 \frac{x_j - x_{\min j}}{x_{\max j} - x_{\min j}}, j = 1, 2, 3$$

式中: x , x_{\max} (最大值) 和 x_{\min} (最小值) 属于色素清除率 ($j=1$)、蛋白质清除率 ($j=2$) 和糖保留率值 ($j=3$)。然后将色素清除率隶属度值、蛋白质清除率隶属度值和糖保留率隶属度值求和得到综合隶属度值 (Y),根据其大小判断其综合吸附性能,该值越大表明其综合吸附能力越强。

1.5 树脂类型的筛选

大孔吸附树脂先用质量分数为 5% 的 HCl 浸泡 6 h,使其充分溶胀,再用蒸馏水冲洗至中性;然后用质量分数为 5% 的 NaOH 浸泡 6 h,再用蒸馏水冲洗至中性;而后用质量分数为 95% 的乙醇浸泡树脂 6 h,最后用蒸馏水洗至无醇味。准确称取大孔吸附树脂 (X-5、AB-8、S-8、D-101、HP-20、DW-301、APD-100) 2.00 g,加入 20 mL 浓度为 5.00 mg/mL 的粗多糖溶液,密封后,37 °C 摇床恒温振荡 40 min,测定并计算不同树脂对样品脱色率、蛋白质去除率及多糖保留率,采用综合隶属度函数确定最佳吸附树脂种类。

1.6 吸附条件优化单因素试验

1.6.1 浓度选择

配制一系列浓度 (1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 和 6.00 mg/mL) 的吴茱萸果实热提粗多糖溶液,取 20 mL 于离心管中,分别加入 2.00 g 经预处理的最佳吸附大孔树脂,37 °C 摇床 150 r/min 恒温振荡 40 min,测定并计算溶液脱色率、蛋白质清除率及多糖保留率,采用综合隶属度函数确定最佳吸附浓度。

1.6.2 pH 值选择

利用 HCl 或 NaOH 调节不同 pH 值水溶液 (pH=4、5、6、7、8、9、10),并分别配制最佳吸附浓度的吴茱萸果实热提粗多糖溶液,取 20 mL 于离心管中,分别加入 2.00 g 经预处理的最佳吸附大孔树脂,37 °C 摇床恒温 150 r/min 振荡 40 min,测定并计算溶液的脱色率、蛋白质清除率及多糖保留率,根据综合隶属度函数值确定最佳 pH 值。

1.6.3 温度选择

选用上述优化后浓度和 pH 基础上,取样品各 20 mL,分别在 20、25、30、35、40 和 45 °C 预热,分别加入 2 g 树脂,在相应的温度下恒温 150 r/min 振荡 40 min,测定并计算溶液的脱色率、蛋白质清除率及多

糖保留率,根据综合隶属度函数值确定最佳吸附温度。

1.7 吸附条件优化响应面实验

以单因素试验为基础,以样品溶液浓度、初始 pH 值和吸附环境温度为考察因素,利用 Design-expert 8.0.6.1 软件的 Box-Behnken 方法优化影响大孔吸附树脂吸附特性的主要因素参数,进行 3 因素 3 水平的试验设计,以综合隶属度值为响应值,分析最佳吸附条件,并验证。试验设计因素及水平如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 设计因素及水平表

Table 1 The coded and actual levels of variables for

水平	因素			
	A 浓度/(mg/mL)	B pH 值	C 温度/°C	
-1	3.00	5	20	
0	4.00	6	25	
1	5.00	7	30	

1.8 柱色谱流速优化

选用经预处理筛选出的最佳吸附大孔树脂,采用湿法装柱(2.90×8.00 cm),依据最佳浓度和 pH 值优化结果配制云实根粗多糖溶液适量,并在优化的温度条件下,以 1.50、2.00、2.50 和 3.00 BV/h 流速过柱,每 10.00 mL 收集一管,共收集 10 管,为排除吸附柱内水分影响,测量第 3~10 管溶液的脱色率、蛋白质清除率及多糖保留率,采用综合隶属度函数确定最佳流速。根据优化得到的条件对多糖进行纯化,并且测定流速优化后色素和蛋白清除率、多糖保留率。

1.9 多糖结构特征分析

1.9.1 分子量分布分析。

取经过优化条件下吸附除杂后多糖和未除杂多糖,利用高效液相凝胶渗透色谱-蒸发光散射检测器(HPGPC-ELSD)法检测吸附前后样品分子量分布。所用设备为日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪系统配以 TSK-gel GMPWxl 凝胶(7.80 mm ID×30.00 cm)色谱柱及 ELSD 检测器。流动相为水,流速 0.70 mL/min; ELSD 检测器参数:以氮气为载气,压力在 350 kPa 左右,漂移管温度 115 °C;样品进样量为 10 μL。取一定量的多糖配成约 1.00 mg/mL 的溶液,再用 0.45 μm 的滤膜过滤进行色谱分析。同时以标准 T-系列葡聚糖(T-1、T-7、T-50、T-100 和 T-200)在相同条件下进行 HPGPC-ELSD 分析,绘制标准曲线,得到线性关系及拟合公式 $\ln(Mw)=-22.04\ln(RT)+64.46$, $R^2=0.9913$,其中 $\ln(Mw)$ 为标准葡聚糖分子量

的自然对数,RT 为其在色谱图上的保留时间。

1.9.2 紫外吸收特征分析

取吴茱萸热提多糖吸附前后的样品适量溶于蒸馏水后配成 1.00 mg/mL 溶液,转入石英 96 孔板,并于 230~700 nm 范围内用 SpectraMax® i3x 多功能酶标仪进行紫外扫描,根据 260 和 280 nm 等处是否有吸收峰判断是否有核酸和蛋白质、多肽等物质。

1.9.3 FT-IR 光谱特征分析

称取吴茱萸热提多糖吸附前后的多糖样品粉末 3 mg 左右,用 KBr 法压片,在 4000~400 cm^{-1} 的红外区间于 Varian 1000 系列傅立叶变换红外分光光度计进行扫描。

1.9.4 ^1H NMR 分析

取吴茱萸热提多糖吸附前后的样品粉末(约 10 mg)溶于 0.80 mL 重水(D_2O)中,在 Agilent-400 MHz 的核磁共振仪上测定其核磁信号。

1.10 数据处理

测试平行 3 次,显著性差异采用 SPSS 19.0 Duncan's multiple range test 分析($p<0.05$);试验结果以平均值±标准差表示。聚类分析在 MEGA 5.10 软件上进行;统计分析作图均在 Office Excel 2016 software 软件上进行;响应面分析在 Design-expert 8.0.6.1 软件上进行; ^1H NMR 数据处理在软件 MestReNova 进行。

2 结果与分析

2.1 样品鉴定

样品经肉眼观察,如图 1a 所示,比对《中国植物志》初步判断为芸香科(Rutaceae)吴茱萸属(*Tetradium*)吴茱萸[*T. ruticarpum* (A. Juss.) T. G. Hartley]植物的果实。随后通过引物扩增并组装后得到其 ITS 序列,利用在线(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>)提交到 NCBI GenBank 数据库上,得到序列编号(Accession No.): MT229431。将其在 NCBI GenBank 数据库数据上进行 Blast 比对后发现其与 *Tetradium ruticarpum* clone YSQ4 (Accession No. EU663536.1) 相似度最大,达到 98.61%。同时,采用 MEGA 5.10 软件用 N-J 构建系统进化树,自展值设为 1000,得到系统发育树如图 1b 所示。根据 Blast 比对结果和系统发育树分析结果,以及其形态特征,鉴定所收集的样品为芸香科(Rutaceae)吴茱萸属(*Tetradium*)吴茱萸(*T. ruticarpum*)植物的果实。

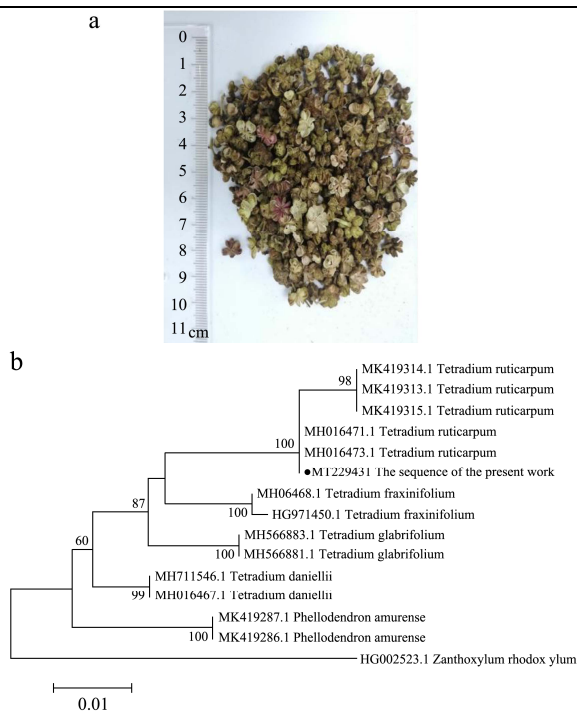


图1 吴茱萸果实形态(a)和其 ITS 区碱基序列构建的 NJ 系统发育树 (bootstrap=1000) (b)

Fig.1 The fruit morphology (a) of *T. ruticarpum* and neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree (b) based on ITS region sequences of *T. ruticarpum* (bootstrap=1000)

注: 节间数字代表 bootstrap 支持值; ●为菌株本研究样品的 ITS 序列, 其余样品序列来自 GenBank。

2.2 树脂类型的筛选

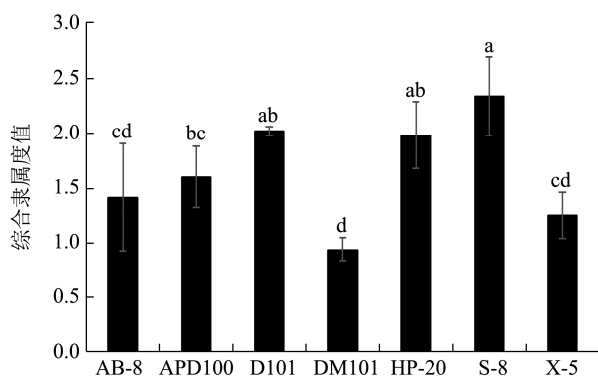


图2 不同树脂静态吸附综合隶属度值 ($p < 0.05$)

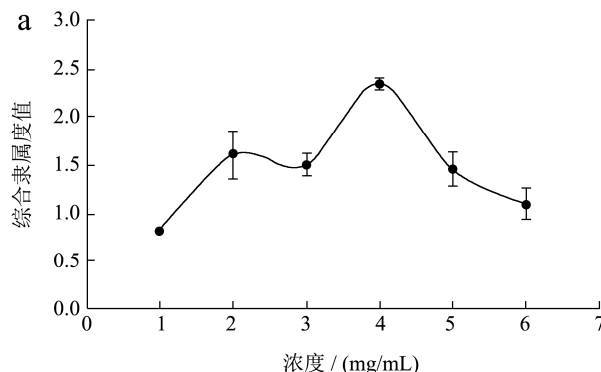
Fig.2 Comprehensive membership values of static adsorption using different macroporous resins ($p < 0.05$)

大孔吸附树脂具有理化性质稳定, 耐强酸强碱, 不溶于水及常见有机溶剂的性质, 可通过树脂表面作用及形成氢键作用选择性吸附。研究表明大孔吸附树脂在其它多糖的除杂过程中表现优异, 如对瓦布贝母内生真菌 WBS020 胞外多糖有很好的纯化效果^[17]。但是大孔吸附树脂类型多样, 具有不同的吸附特征, 其中树脂的结构和极性是影响其吸附效能的关键因素

^[18]。为了得到合适的吸附树脂类型, 选用了市场上较为常见且价格较低的 7 种树脂进行筛选, 其具有不同粒径, 不同极性。进行静态吸附, 并测量其色素和蛋白质的清除效率, 及多糖保留率。由于此三类值具有不同的意义, 反映的是三个方面的指标, 此处引用隶属度函数, 进行归一化, 计算每个测量值在 0~1 的位置, 值越大表示活性越好, 将每一种测量指标归一化处理后, 进行相加得综合隶属度值, 隶属度值越高表示其吸附性能越好^[19]。结果如图 2 所示, 树脂 S-8 表现出最佳的吸附性能, 其综合隶属度显著高于 AB-8、APD100、DM101 和 X-5 ($p < 0.05$), 而与 D101 和 HP-20 相比, 尽管其差异不显著, 但是 S-8 的综合隶属度绝对值仍较高, 为了达到最佳的吸附效率, 后续试验选择 S-8 作为吴茱萸热提粗多糖除杂的最佳树脂。Hu 等^[20]对 *Carex meyeriana* Kunth 多糖研究发现, S-8 和 AB-8 树脂均表现出最佳的多糖纯化效果, 同样, 吴玉和^[21]研究发现, 利用 D301T 和 S-8 纯化后的甘草多糖的蛋白、色素含量显著降低, 透析后多糖纯度可达到 80% 以上。可见 S-8 大孔吸附树脂在多糖的纯化中表现出优异的性能。

2.3 吸附条件优化

树脂的吸附受温度、pH 值, 样品浓度和接触时间的影响。合适的环境温度、pH 值, 样品浓度和流速对提高树脂对多糖的纯化效率非常重要。而且由于树脂种类和多糖类型不同, 最佳的树脂吸附参数也不相同。例如 Shi^[22]在研究利用大孔吸附树脂 D941 除香椿芽多糖杂质时, 对温度、样品浓度、pH 值等影响因素考察发现, 随着温度、初始样品浓度和初始 pH 值的增加其综合吸附效率呈现先上升后下降的趋势, 分别在温度为 45 °C、初始样品浓度为 30 mg/mL 和初始 pH 为 8.50 时达到一个较好的综合吸附效率。刘富岗等^[23]研究了大孔吸附树脂对泽兰多糖除杂工艺, 并发现 HPD-100 树脂在样品浓度为 0.03 g/mL, 洗脱流速为 1.10 mL/min, 洗脱体积为 40 mL 时, 多糖保留率 69.21%, 脱色率 60.24%, 蛋白脱除率 75.67%。



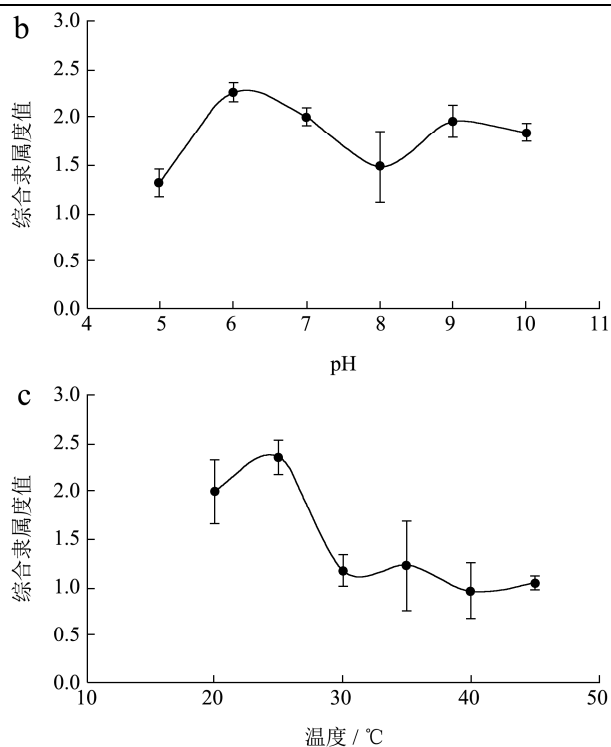


图3 样品浓度 (a)、初始 pH 值 (b) 和温度 (c) 对 S-8 大孔吸附树脂除多糖杂质综合隶属度值的影响

Fig.3 Effect of sample concentration (a), initial pH value (b) and temperature (c) on the comprehensive membership values for removing polysaccharide impurities using S-8 macroporous adsorption resin

2.3.1 静态吸附条件优化

2.3.1.1 单因素实验

如附图 3a 所示,随着粗多糖浓度的增加,综合隶属度值呈现先增多后减少的趋势。表明 S-8 大孔吸附树脂对吴茱萸多糖的吸附综合指数随浓度而变化,在浓度为 4.00 mg/mL 或其附近时,其综合吸附能力最佳。如附图 3b 所示,随着粗多糖浓度的增加,综合隶属度值呈现先增多后减少的趋势。表明 S-8 大孔吸附树脂对吴茱萸多糖的吸附综合指数随 pH 增加而变化,在 pH 为 6 或其上下时,其综合吸附能力最佳。如附图 3c 所示,随着粗多糖环境温度的增加,综合隶属度值也呈现先增多后减少的趋势。表明 S-8 大孔吸附树脂对吴茱萸多糖的吸附综合指数随环境温度变化而变化,在温度为 25 °C 或其上下时,其综合吸附能力最佳。综上,通过单因素实验得到大孔吸附树脂 S-8 对吴茱萸果实热提多糖除杂条件为:多糖浓度 4.00 mg/mL,初始 pH 为 6.0,吸附时环境温度为 25 °C。但是因为单因素实验忽略了因素之间的交互作用,同时无法给出精确的最佳实验参数。例如,刘富岗等^[23]对泽兰多糖大孔吸附树脂除杂工艺的研究发现,通过单因素得到的最佳条件为样品浓度 0.03 g/mL,流速 1

mL/min,洗脱体积为 40 mL,但是通过相应面法优化后发现最佳条件为浓度 0.03 g/mL,流速为 1.06 mL/min,洗脱体积为 40.63 mL,通过比较,发现二者尽管接近,但是仍存在差距,可见仅仅依靠单因素实验并不能最大程度优化纯化工艺参数。

2.3.1.2 响应面法分析

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 The design and results of Box-Behnken test

试验号	A	B	C	Y (综合隶属度值)
1	0	1	1	1.38
2	-1	0	-1	0.93
3	-1	1	0	1.66
4	1	1	0	1.63
5	0	1	-1	1.07
6	-1	0	1	0.82
7	0	0	0	1.91
8	0	0	0	1.99
9	0	-1	1	1.3
10	-1	-1	0	1.52
11	0	0	0	2.2
12	0	0	0	1.96
13	1	0	1	1.66
14	1	0	-1	1.23
15	0	0	0	2.1
16	1	-1	0	1.85
17	0	-1	-1	1.87

采用 BBD 响应面法设计得到 17 组试验,结果见表 2。回归模型方差分析见表 3。利用 Box-Behnken 响应面法设计,得到吴茱萸多糖综合隶属度值 (Y) 与多糖浓度 (A)、溶液 pH 值 (B)、吸附环境温度 (C) 的二元多项回归方程: $Y = -12.2275 + 2.493A - 0.108B + 0.7615C - 0.09AB + 0.027AC + 0.044BC - 0.306A^2 - 0.061B^2 - 0.02264C^2$, $R^2 = 0.9141$ 。由回归模型的方差分析发现,回归项 $p < 0.01$,即回归模型极显著相关;失拟项 $0.0924 > 0.05$,即模型失拟合度检验不显著,模型拟合度较好。此外,方程的相关系数 $R^2 = 0.9141$ 表明, S-8 大孔吸附树脂对吴茱萸果实热提粗多糖的色素和蛋白清除效率以及糖的保留能力综合值有 91.41% 是由所选变量、样品浓度、样品 pH 值、吸附时环境温度所决定。回归模型中 A、 A^2 、BC、 C^2 显著, B、C、AB、AC、 B^2 不显著,说明样品浓度、溶液 pH 值和吸附时环境温度不同对 S-8 大孔吸附树脂吸附吴茱萸果实热提多糖吸附特性的影响存在非线性关系,而各因素之间的交互作用影响程度不同。由此可见,回归模型可以用来分析和预测 S-8 大孔吸附树脂对吴茱萸果实热

提粗多糖的选择性吸附能力。

当固定溶液浓度、溶液初始 pH 值和吸附环境温度中的一个因素，另外两个因素之间的交互作用对综合隶属度值的影响如附图 4 所示，可由相应曲面图和等高线图表示，等高线图越接近于椭圆形表示两因素交互作用越显著。

由回归方程模型和其对应的响应面分析图，并结

合方差分析表可得， $F_A=7.68$ 、 $F_B=2.37$ 、 $F_C=0.13 \times 10^{-1}$ 。由于因素对应的 F 值大小与因素对试验指标的影响程度成正比，因此，影响 S-8 大孔吸附树脂吸附吴茱萸果实热提多糖的吸附性能的顺序为：溶液浓度 (A) > 溶液初始 pH 值 (B) > 吸附环境温度 (C)。根据回归方程模型，得到的最佳方案为：溶液浓度为 4.41 mg/mL，溶液初始 pH 值为 5，吸附环境温度 24.30 °C。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Regression analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	Prob>F
回归模型	2.51	9	0.28	8.28	0.54×10^{-2}	**
A-样品浓度	0.26	1	0.26	7.68	2.76×10^{-2}	*
B-样品 pH 值	0.08	1	0.08	2.37	1.68×10^{-1}	
C-吸附温度	0.45×10^{-3}	1	0.45×10^{-3}	0.13×10^{-1}	9.11×10^{-1}	
AB	0.32×10^{-1}	1	0.32×10^{-1}	0.96	3.60×10^{-1}	
AC	0.73×10^{-1}	1	0.73×10^{-1}	2.16	1.85×10^{-1}	
BC	0.19	1	0.19	5.74	4.78×10^{-2}	*
A ²	0.39	1	0.39	11.69	1.12×10^{-2}	*
B ²	0.16×10^{-1}	1	0.16×10^{-1}	0.46	5.18×10^{-1}	
C ²	1.35	1	1.35	39.99	0.04×10^{-2}	**
残差	0.24	7	0.34×10^{-1}			
失拟项	0.18	3	0.06	4.42	9.24×10^{-2}	ns
纯误差	0.55×10^{-1}	4	0.14×10^{-1}			
总计	2.75	16				

注：“*”表示显著 ($p < 0.05$)；“**”表示极显著 ($p < 0.01$)；“ns”表示不显著。

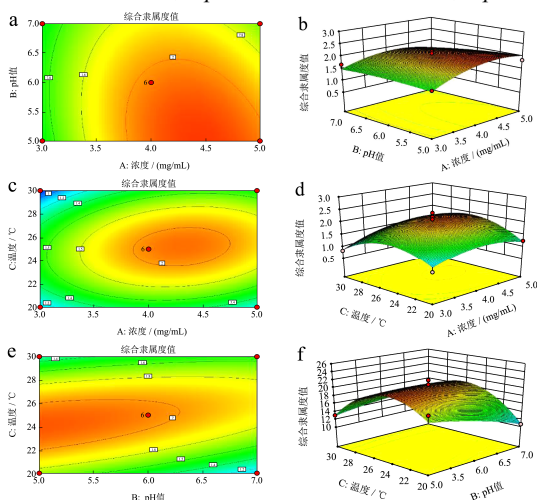


图 4 pH 值 (b)、温度 (c) 与样品浓度 (a) 两两组合对多糖纯化的综合隶属度值的的响应面与等值线
Fig.4 Surface plots (a, c, and e) and contour plots (b, d, and f) showing the interactive effects of pH (b), temperature (c) and sample concentration (a) on the comprehensive membership value of the polysaccharide purification

2.3.1.3 验证试验

根据试验设计中最佳方案，结合到实际情况，修

正试验操作设置的条件：溶液浓度为 4.41 mg/mL，溶液初始 pH 值为 5，吸附环境温度 24.30 °C，4 次重复试验，实得大孔吸附树脂除吴茱萸多糖杂质的综合隶属度为 2.10，近似于 Design-expert 8.0.7.1 Trail 软件计算所得理论值 2.14，在此条件下，色素清除率为 41.89%，蛋白清除率为 57.04%，而多糖保留率为 83.63%，响应面法优化所得的回归方程具指导意义。尽管相较于其它研究，本文所优化吸附条件在色素清除率和蛋白清除率上并不是最高，但是较高多糖保留率可以满足样品重复过柱，从而达到较高的除杂效率。这种重复通过树脂除杂的方法在瓦布贝母多糖的除杂过程也起到了较好的效果^[24]。

2.3.2 动态吸附条件优化

通常，在实验室或工业化生产过程中，为了实现样品的持续纯化，会选用柱色谱的方式进行除杂。样品以动态形式通过树脂过程中，杂质被连续吸附，而多糖成分随着溶剂流出，从而连续得到除杂纯化的多糖。吸附时间可以影响树脂的吸附效率，选择系数等^[22]。在动态吸附过程中，流速过慢，树脂与样品接触时间过长，吸附时间较长，会增加对多糖的吸附，从

而降低多糖保留率；同样，当流速过快，树脂与样品接触时间过短，色素或蛋白等杂质还未完全吸附，就已经流走，不利于色素和蛋白质的清除。因此适当的流速对树脂吸附效率有重要影响。如图5所示，尽管不同洗脱速率洗脱出的样品在不同接收管中存在差异，但是总体而言流速2.00 BV/h时，其洗脱出的样品均具有较高的综合隶属度值，表现出最佳吸附效率。粗多糖以流速2.00 BV/h过柱，收集纯化后样品，测得色素清除率为49.21%，蛋白清除率为68.97%，多糖保留率为55.05%。从图5还可以发现流速过低或者过高均不利于S-8大孔吸附树脂的除杂。同样，Hu等^[20]对*Carex meyeriana* Kunth多糖的AB-8大孔吸附树脂除杂研究发现，在流速1.88 BV/h时，吸附效率最好，而Shi^[22]对流速优化发现，在1.88 BV/h时，D941树脂对香椿芽多糖综合除杂效率最高。可见，流速的大小并不完全一致，受到树脂和多糖类型的影响而具有较大差异。本文所筛得的最佳流速仅适用于S-8大孔吸附树脂对吴茱萸果实热提粗多糖的除杂。

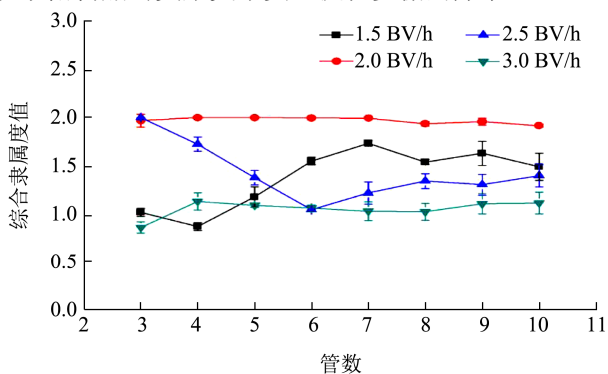


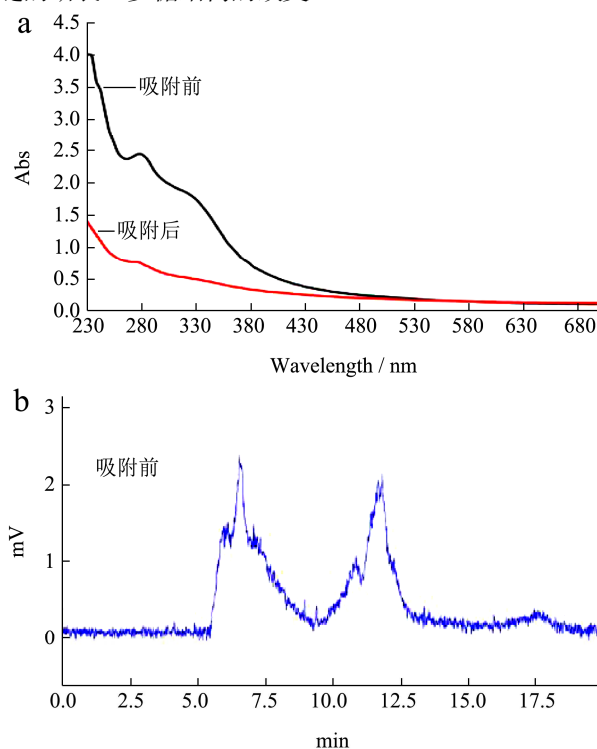
图5 S-8大孔吸附树脂对多糖溶液除杂综合隶属度的动态泄漏曲线

Fig.5 The dynamic leakage curves of the comprehensive membership value for the polysaccharide solution on S-8 resin

2.4 吸附前后结构变化

利用UV扫描分析发现，如图6a所示，未除杂多糖在430 nm以下具有较强的吸收，且在280 nm处有一个较强的吸收峰，表明粗多糖样品中不仅含有较多色素，而且也存在大量蛋白质等杂质，吸附后，430 nm以下波长的吸收强度明显降低，280 nm处吸收峰也明显减小，表明经过S-8大孔吸附树脂吸附后，色素和蛋白质已经被大量清除。由图6b、c所示，树脂吸附前粗多糖HPGPC色谱图上有两个峰，且峰形较宽，主峰中伴有裂分，这可能是由于较多杂质造成。而经过树脂吸附后同样出现两个主峰，保留时间与吸附前样品的主峰基本一致。两主峰的RT分别约为6.80和11.80 min，由公式及所选标准葡聚糖分子量范围可以推测，第一个峰的相对分子质

量大于 2.00×10^5 u，第二个峰相对分子量约为 2.35×10^4 u。以上结果表明经过树脂吸附没有发生切断糖链的情况，吸附过程温和。此外，吸附后峰的分布范围变窄，表明具有分子量较一致的多糖在柱色谱分离过程中受到的干扰较少，树脂可以有效的清除大部分杂质，纯化多糖。吴茱萸热提多糖S-8树脂吸附前后的FT-IR光谱图如图6d所示。在 3410 cm^{-1} 处的强吸收为羟基的伸缩振动。在 2930 cm^{-1} 处为 $-\text{CH}_2$ 基团的C-H的伸缩振动吸收峰^[25]。 1645 cm^{-1} 处可能为C=O的不对称伸缩振动导致的吸收峰^[26]，表明多糖中可能存在-COOH基团。 1405 cm^{-1} 处的吸收峰归因于C-H面内的弯曲振动^[27]。在 1100 cm^{-1} 附件较宽的吸收峰归因于C-O官能团的弯曲或拉伸振动。这些都是多糖的特征吸收峰，从图6d吸附前后多糖的FT-IT吸收光谱上可以判断，以上特征吸收信号均一致，表明吸附前后吴茱萸果实热提多糖主要官能团结构未发生改变。但是吸附后样品的吸收信号更强，受干扰较小，也说明大孔吸附树脂具有较好的清除杂质作用。对样品进行¹H NMR分析，如图6e、f所示，在吸附前后样品的¹H NMR图谱指纹区，均有2个主要的异头氢信号，分别是 $\delta 5.04 \times 10^{-6}$ 和 $\delta 4.42 \times 10^{-6}$ 。化学位移在 $\delta 4.4 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-6}$ 范围为 β -糖苷异头氢构型，而 $\delta 5.00 \times 10^{-6} \sim 5.40 \times 10^{-6}$ 范围为 α -糖苷异头氢构型^[28]，可见吴茱萸热提多糖存在 β -或 α -糖苷异头氢构型，而这个结构特征在吸附前后未发生改变。综上，利用大孔吸附树脂S-8对吴茱萸果实热提多糖进行吸附除杂，不仅能明显清除其中的色素和蛋白质等杂质，而且不会引起多糖链的断裂，多糖结构的改变。



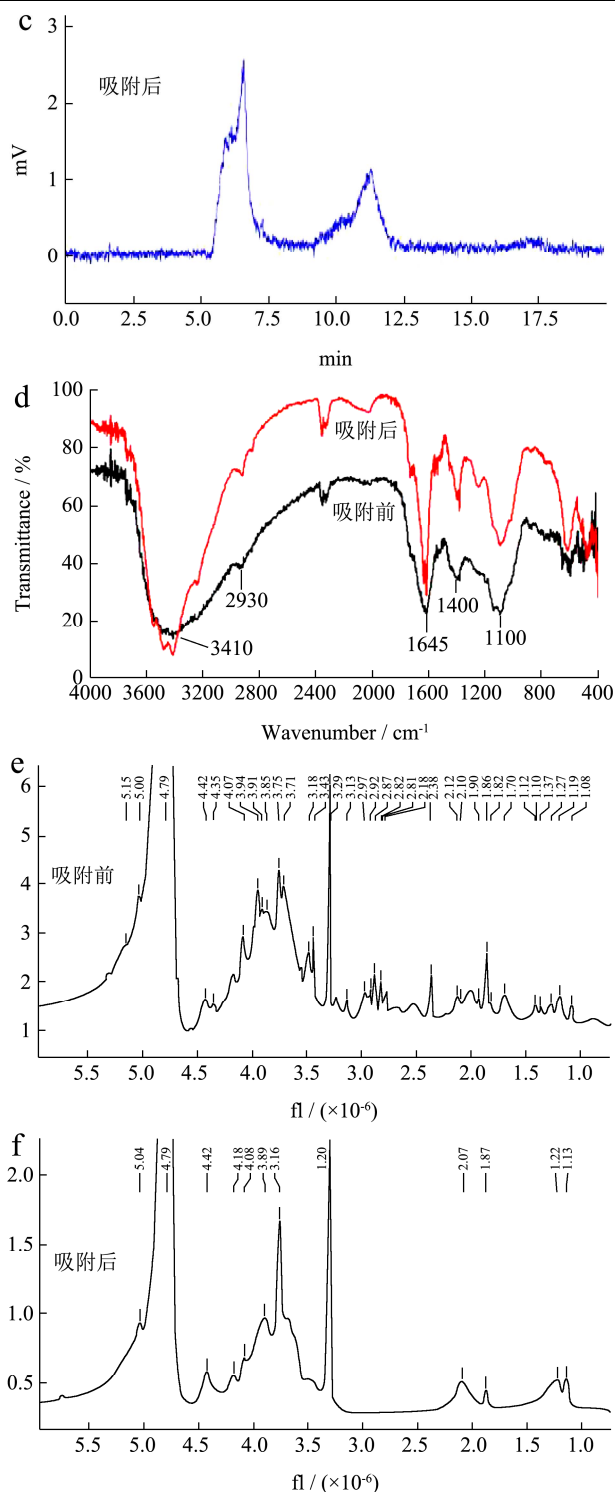


图 6 S-8 大孔吸附树脂吸附前后多糖的紫外吸收谱 (a)、HPGPC 色谱图 (b、c)、FT-IR 吸收谱图 (d) 和 ¹H NMR 谱图 (e、f)

Fig. 6 UV-vis spectrogram (a), HPGPC chromatogram (b, c), FT-IR spectrogram (d) and ¹H NMR spectrum (e, f) of the polysaccharide solutions before and after absorption by resin S-8

3 结论

相较于 X-5、AB-8、D-101、HP-20、DW-301、

APD-100 大孔吸附树脂, S-8 大孔吸附树脂对吴茱萸果实多糖具有较好的综合纯化效率, 在样品浓度为 4.41 mg/mL, 初始 pH 值为 5, 吸附环境温度 24.30 °C, 流速 2.0 BV/h 的条件下具有最佳纯化效率, 该条件下色素清除率为 49.21%, 蛋白清除率为 68.97%, 多糖保留率为 55.05%。且利用 S-8 大孔吸附树脂纯化过程中, 多糖的分子量分布, 红外吸收特征及糖链异头氢吸收信号等均未发生明显改变。本文表明利用 S-8 大孔吸附树脂可以有效地清除多糖色素和蛋白质等杂质, 同时不会造成较多的多糖损失, 而且整个吸附过程不需要高温高压, 强酸或强碱, 不涉及有机试剂, 对环境几乎无污染, 满足食品药品工业的需求, 通过对比吸附前后多糖结构特征, 发现大孔吸附树脂在除杂的同时并不会对多糖造成结构上的改变, 这对纯多糖制备和后续深入研究具有重要意义。

参考文献

[1] 王岩,和会静,郭峰.吴茱萸常用的中药方及其配伍增效减毒研究[J].临床医药文献电子杂志,2019,6(19):161
WANG Yan, HE Hui-jin, GUO Feng. Study on *Euodia rutaecarpa* (Juss) Benth commonly used traditional Chinese medicine prescriptions and their compatibility [J]. Journal of Clinical Medical, 2019, 6(19): 161

[2] 言议超.平衡施肥对吴茱萸林土壤酶活性及植株生长的影响研究[D].南昌:江西农业大学,2012
YAN Yi-chao. Study on the impact of balanced fertilization on the *Evodia* forest soil enzyme activities and plant growth [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2012

[3] Zhang M Z, He C M, Wang H B, et al. Advances in active polysaccharides in medicinal plants of *Orchidaceae* [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2019, 27(5): 611-622

[4] Xie J, Jin M L, Morris G A, et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(sup1): S60-S84

[5] 徐澜,张鹏飞,雷丽霞,等.响应面法优化微波辅助提取吴茱萸多糖工艺[J].中国农业科技导报,2016,18(4):174-180
XU Lan, ZHANG Peng-fei, LEI Li-xia, et al. A microwave-assisted procedure for the extraction polysaccharide from *Evodia rutaecarpa* using response surface methodology [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(4): 174-180

[6] 王晓霞,高慧媛,姜勇,等.吴茱萸化学成分研究[J].中草药, 2013,44(10):1241-1244
WANG Xiao-xia, GAO Hui-yuan, JIANG Yong, et al.

- Chemical constituents from fruits of *Euodia rutaecarpa* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(10): 1241-1244
- [7] Zhao Z, He X, Han W, et al. Genus *Tetradium* L.: a comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 231: 337-354
- [8] 甄攀,王治宝,张万明,等.吴茱萸多糖的提取及其抗氧化作用研究[J].中成药,2005,27:491-2
ZHENG Pan, WANG Zhi-bao, ZHANG Wan-ming, et al. Study on extraction of *Evodia fructus* polysaccharide and its antioxidant effect [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 27(4): 491-492
- [9] 赵娟娟,任燕,史亚楠,等.吴茱萸多糖的含量测定及其抗胃溃疡作用的研究[J].时珍国医国药,2016,27(10):2384-2386
ZHAO Juan-juan, REN Yan, SHI Ya-nan, et al. Study on the content and anti-gastric ulcer effect of *Evodiae* polysaccharide [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2016, 27(10): 2384-2386
- [10] 付娟,边静静,赵桦.密棘和吴茱萸果实多糖的体外抗氧化和抑菌活性研究[J].食品科学,2010,31(11):69-72
FU Juan, BIAN Jing-jing, ZHAO Hua. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of polysaccharides extracted from the fruits of *Evodia lenticellata* Huang and *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Beth. [J]. Food Science, 2010, 31(11): 69-72
- [11] Liu Y, Hu C, Feng X, et al. Isolation, characterization and antioxidant of polysaccharides from *Stropharia rugosoannulata* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 883-889
- [12] Duan S, Huang Q, Shen X, et al. Deproteinization of four macroporous resins for rapeseed meal polysaccharides [J]. Food Science and Nutrition, 2020, 8(1): 322-331
- [13] 廖春燕,黄敏,黄瑶,等.车前草多糖的脱色工艺研究[J].现代食品科技,2012,28:1028-1030
LIAO Chun-yan, HUANG Min, HUANG Yao, et al. Decoloring process of polysaccharide extracted from *Plantago asiatica* L [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28: 1028-1030
- [14] Pan F, Hou K, Gao F, et al. Peimisine and peiminine production by endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabensis* [J]. Phytomedicine, 2014, 21(8-9): 1104-1109
- [15] Walker J M. The bichinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation [J]. Methods in Molecular Biology, 1994, 32: 5-8
- [16] Chen S H. Ranking fuzzy numbers with maximizing set and minimizing set [J]. Fuzzy Sets and Systems, 1985, 17: 113-129
- [17] 潘峰,张慧慧,许晓燕,等.瓦布贝母内生真菌 WBS020 多糖理化性质和抗氧化活性[J].食品与生物技术学报,2019,38(6):144-152
PAN Feng, ZHANG Hui-hui, XU Xiao-yan, et al. Preliminary physicochemical characterization and antioxidant activity of polysaccharide fraction from endophytic fungal WBS020 originated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(6): 144-152
- [18] Wang T, Lu S, Xia Q, et al. Separation and purification of amygdalin from thinned bayberry kernels by macroporous adsorption resins [J]. Journal of Chromatography B, 2015, 975: 52-58
- [19] Pan F, Su T J, Cai S M, et al. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: diversity, antioxidant capacities *in vitro* and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42008
- [20] Hu Z, Zhou H, Li Y, et al. Optimized purification process of polysaccharides from *Carex meyeriana* Kunth by macroporous resin, its characterization and immunomodulatory activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 76-86
- [21] 吴玉和.大孔树脂对中药多糖的分离纯化[D].天津:天津大学,2009
WU Yu-he. Application of macroporous resins on separation and purification of traditional Chinese medicine polysaccharide [D]. Tianjin: Tianjin University, 2009
- [22] Shi Y, Liu T, Han Y, et al. An efficient method for decoloration of polysaccharides - from the sprouts of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem by anion exchange macroporous resins [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 461-468
- [23] 刘富岗,李汉伟,郑群杰,等.响应面法优选泽兰多糖的大孔吸附树脂纯化工艺[J].暨南大学学报(自然科学与医学版), 2019,40:1-9
LIU Fu-gang, LI Han-wei, ZHENG Qun-jie, et al. Optimization of purification process of *Lycopus lucidus* polysaccharide with macroporous adsorption resins by response surface method [J]. Journal of Jinan University (Natural Science and Medicine Edition), 2019, 40: 1-9

(下转第 304 页)