

树脂吸附对巴戟天多糖脱色脱蛋白的工艺研究

张华林¹, 王冬梅², 杨红艳¹, 周中流¹, 林三清¹, 夏敬民¹

(1. 湛江师范学院化学科学与技术学院, 广东湛江 524048) (2. 中山大学药学院, 广东广州 510006)

摘要: 以脱色率、多糖保留率及脱蛋白率为指标, 筛选合适的树脂对巴戟天多糖脱色脱蛋白, 并进行静态及动态的工艺研究。确定最佳的工艺条件是: 采用 D941 树脂, 室温下 (25 °C), 巴戟天多糖液 pH 值 5.96 (原液), 以流速 2 BV/h 进行动态吸附。在此工艺条件下, 脱色率为 89.87%, 多糖保留率 81.08%, 脱蛋白率 50.75%, 表明 D941 树脂具有良好的脱色效果和一定的脱蛋白能力。

关键词: 巴戟天; 多糖; 树脂; 脱色; 脱蛋白

文章编号: 1673-9078(2012)12-1709-1713

Study on Decolorization and Deproteinization Process of Polysaccharides from *Morinda officinalis* How by Resin Adsorption

ZHANG Hua-lin¹, WANG Dong-mei², YANG Hong-yan¹, ZHOU Zhong-liu¹, LIN San-qing¹, XIA Jing-min¹

(1. Chemistry Science and Technology School, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China)

(2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 5100006, China)

Abstract: Suitable resin was chosen, and static and dynamic adsorption experiments were carried out to investigate the decolorization and deproteinization effects of polysaccharides from *Morinda officinalis* How. using the decolorization rate, polysaccharide retention rate and deproteinization rate as main indexes. The results showed that optimum conditions were as follows: D941 resin, room temperature, pH value of polysaccharide solution 5.96, flow rate 2 BV/h, dynamic adsorption. Under the optimal technique, the decolorization rate, polysaccharide retention rate and deproteinization rate were 89.87%, 81.08% and 50.75%, respectively. In conclusion, D941 resin had good decolorization effect and certain deproteinization effect.

Key words: *Morinda officinalis* How; polysaccharide; resin; decolorization; deproteinization

中药巴戟天为茜草科 (*Rubiaceae*) 植物巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 的干燥根, 列为四大南药之一, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。此外, 巴戟天作为药食同源的高级滋补品在民间广泛使用, 多使用该药材熬汤、炖肉等作为药膳进补, 或者开发成健康食品, 例如巴戟天果脯、巴戟天果酒、巴戟天饮料、巴戟天口服液等。

巴戟天多糖具有促进成骨细胞增殖, 缓解骨质疏松, 增强免疫等药理作用^[1-5]。课题组前期的实验采用经典的小鼠负重游泳模型, 评价了巴戟天多糖抗疲劳活性, 发现巴戟天多糖具有显著的抗疲劳作用^[6]。上述的生物活性提示巴戟天多糖是巴戟天补肾壮阳、强

身健骨的重要功能因子。

然而巴戟天多糖健康产品目前处于研发阶段, 主要原因是巴戟天多糖的提取物除了多糖外, 还有蒽醌、环烯醚萜类成分以及少量的蛋白质, 外观呈深黑色, 需要进一步的脱色脱蛋白处理。文献报道的方法有: 活性炭脱色、Sevage 试剂脱蛋白、三氯乙酸法脱色脱蛋白等^[6-8]。上述传统工艺技术存在明显的缺陷, 一是操作步骤较多、过程繁琐, 二是需要使用大量的氯仿、正丁醇、三氯乙酸等有机溶剂。基于树脂具有吸附容量大、工艺步骤简单、有机溶剂使用量少的优点, 本文通过筛选合适树脂类型, 并研究其关键工艺参数, 建立树脂对巴戟天多糖脱色脱蛋白工艺技术, 为巴戟天多糖的开发提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

巴戟天采购于广东省德庆县, 经中山大学药学院杨得坡教授鉴定为 *Morinda officinalis* How 的干燥根。95%乙醇 (食用), 牛血清白蛋白 BSA 及考马斯亮蓝

收稿日期: 2012-07-01

基金项目: 湛江市财政资金科技专项竞争性分配项目 (湛科[2010]174号); 湛江师范学院博士专项项目 (ZL1008)

作者简介: 张华林 (1979-), 男, 博士, 讲师, 研究方向是天然产物的有效成分研究

通讯作者: 王冬梅 (1968-), 女, 博士, 副教授, 研究方向是天然药物化学与中草药质量标准化研究

G-250 (超级纯, 广州微佳科技有限公司), 各种树脂 (山东鲁抗树脂厂), 无水葡萄糖 (AR, 广州新成化工厂), 浓硫酸、苯酚、磷酸等试剂均为分析纯。

1.2 仪器

TU-1810 系列紫外可见分光光度计(北京通用仪器设备公司), AL204 型电子天平 (瑞士 METTLER TOLEDO), SB25-12D 型超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技公司), PHS-3C 型 pH 计(上海精密雷磁公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 巴戟天多糖的提取

巴戟天药材低温干燥, 粉碎, 首先用 95% 乙醇加热回流提取两次, 每次 2 h, 过滤, 弃去滤液。滤渣加蒸馏水煎煮提取 3 次, 每次 2 h, 过滤, 收集滤液, 旋转蒸发器浓缩, 得到巴戟天多糖粗提取液。按照体积比 1:1 的比例, 加入 95% 乙醇, 搅拌醇沉, 4 ℃放置过夜, 离心机离心, 收集沉淀物, 冷冻干燥, 得到巴戟天多糖提取物。

1.3.2 脱色率的测定及计算

1.3.2.1 检测波长的确定

取经过树脂脱色前、后的巴戟天多糖溶液, 采用紫外分光光度法于 200~600 nm 的范围内进行全波长扫描, 选择测定脱色效果的最佳吸收波长。

1.3.2.2 脱色率的测定及计算

采用紫外分光光度法于最佳吸收波长处测定巴戟天多糖溶液脱色前、后的吸光值, 以下列公式计算脱色率:

$$\text{脱色率}(\%) = (A_{\text{脱色前}} - A_{\text{脱色后}}) / A_{\text{脱色前}} \times 100\%$$

1.3.3 多糖保留率的测定及计算^[9]

1.3.3.1 标准曲线的制备

以葡萄糖为对照品, 制备一系列不同浓度的对照品溶液, 采用硫酸-苯酚法显色, 于 490 nm 处测定吸光度, 以葡萄糖的质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.3.2 换算因子的测定

精密称取适量巴戟天多糖, 用蒸馏水定容制备巴戟天多糖溶液, 硫酸-苯酚法显色、测定, 以下列公式计算换算因子 (f):

$$f = m/C \times a$$

注: m : 巴戟天多糖的质量 (mg); C : 根据标准曲线计算巴戟天多糖溶液中葡萄糖的浓度 (mg/mL), a : 巴戟天多糖溶液的稀释体积 (mL)。

1.3.3.3 巴戟天多糖的测定

制备巴戟天多糖溶液, 硫酸-苯酚法染色、测定, 通过标准曲线计算待测液中葡萄糖的质量浓度 X_1 (mg/mL), 以下列公式计算巴戟天多糖的质量 (mg):

$$W = X_1 \times b \times f$$

注: b : 巴戟天多糖溶液的稀释体积 (mL)。

1.3.3.4 多糖保留率的计算

测定巴戟天多糖溶液经树脂脱色前、后的多糖的量, 以下列公式计算多糖保留率 (%)。

$$\text{多糖保留率}(\%) = W_{\text{后}} / W_{\text{前}} \times 100\%$$

注: $W_{\text{前}}$: 脱色前多糖的质量 (mg); $W_{\text{后}}$: 脱色后多糖的质量 (mg)。

1.3.4 脱蛋白率的测定及计算^[7]

1.3.4.1 标准曲线的制备

以牛血清白蛋白为对照品, 制备一系列不同浓度的对照品溶液, 采用考马斯亮蓝法染色, 于 590nm 处测定吸光度, 以牛血清白蛋白的质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.4.2 巴戟天多糖中蛋白的测定

制备巴戟天多糖溶液, 考马斯亮蓝法染色、测定, 通过标准曲线计算待测液中蛋白的质量浓度 X_2 (mg/mL), 以下列公式计算巴戟天多糖中蛋白的质量 (mg):

$$M = X_2 \times c$$

注: c : 巴戟天多糖的稀释体积 (mL)。

1.3.4.3 脱蛋白率的计算

测定巴戟天多糖溶液经树脂脱色前、后的蛋白的量, 以下列公式计算脱蛋白率:

$$\text{脱蛋白率}(\%) = (M_{\text{前}} - M_{\text{后}}) / M_{\text{前}} \times 100\%$$

注: $M_{\text{前}}$: 脱色前蛋白质的质量 (mg); $M_{\text{后}}$: 脱色后蛋白质的质量 (mg)。

1.3.5 树脂的静态吸附试验

对不同类型树脂的脱色脱蛋白能力进行比较, 筛选出最佳的树脂, 并研究其静态吸附工艺的关键参数, 包括吸附时间、多糖溶液 pH 值、温度、吸附容量。

1.3.6 树脂的动态吸附工艺研究

在静态吸附工艺参数研究的基础上进行动态吸附工艺研究。树脂湿法装柱, 装填高度约为 3/4 的柱高 (树脂用量为 10 g), 分别考察吸附流速、上柱液浓度、上柱液用量对脱色脱蛋白效果的影响, 确定最佳工艺参数, 进行重复性试验。

2 结果与讨论

2.1 脱色率检测波长的确定

巴戟天多糖液含有多种有紫外吸收的物质, 全波长图谱比较复杂, 在 390~800 nm 范围内基线是不平整的, 在 300、394 nm 处有最大吸收峰 (图 1)。经过树脂脱色后, 巴戟天多糖溶液由黑色变成无色, 相应地全波长图谱也发生明显的改变, 390~800 nm 范围内

基线变得平缓,尤其是 394 nm 处的尖峰消失(图 2)。故此选择 394 nm 作为脱色率检测的最佳吸收波长。

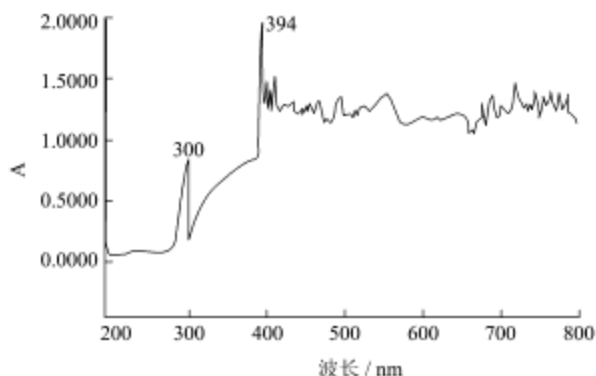


图 1 巴戟天多糖溶液全波长扫描曲线

Fig.1 The scanning curve of polysaccharides solution from *Morinda Officinalis* How by whole wave band

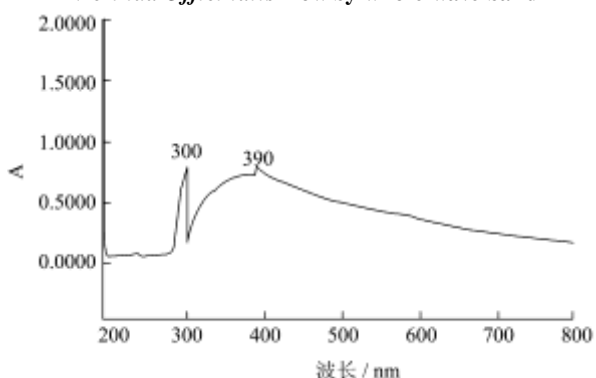


图 2 巴戟天多糖溶液脱色后全波长扫描曲线

Fig.2 The scanning curve of decolorized polysaccharides solution from *Morinda Officinalis* How by whole wave band

2.2 多糖及蛋白质测定的标准曲线

葡萄糖的标准曲线: $y = 8.0982x - 0.0508$, 相关系数 $R^2 = 0.9994$, 线性范围 0.019~0.096 mg/mL。多糖的换算因子 $f = 2.64$ 。

牛血清白蛋白的标准曲线: $y = 4.3698x + 0.174$, 相关系数 $R^2 = 0.9921$, 线性范围 0.004~0.102 mg/mL。

2.3 树脂的静态吸附试验

2.3.1 树脂筛选

不同种类的树脂 1.0 g 置于三角瓶中,加入 20 mL 浓度为 5 mg/mL 的巴戟天多糖溶液,在室温下置于摇床(100 r·min⁻¹)振荡 12 h,考察不同树脂脱色脱蛋白能力。比较了阴离子交换树脂、阳离子交换树脂及低极性大孔吸附树脂三种树脂类型共 13 种树脂,发现阴离子树脂的脱色率及多糖保留率比较高,阳离子树脂脱蛋白率较高,而大孔吸附树脂脱色率及脱蛋白率都较低,表明巴戟天多糖里的色素容易被阴离子树脂吸附而蛋白质容易被阳离子树脂吸附(表 1)。巴戟天多糖里的杂质主要是色素及少量的蛋白质,综合考虑脱色率、脱蛋白率及多糖保留率这三个指标,确定选用

D941 阴离子树脂做进一步研究。

表 1 不同树脂脱色脱蛋白效果

Table 1 The decoloration and deproteinization effect of different resins

树脂名称	树脂类型	脱色率 /%	脱蛋白率 /%	多糖保留率 /%
D941	阴离子交换树脂	90.48	46.52	80.74
D202	阴离子交换树脂	84.62	40.78	76.44
D261	阴离子交换树脂	82.33	33.08	66.25
D296	阴离子交换树脂	79.67	39.14	68.32
D301	阴离子交换树脂	75.79	37.16	77.14
D152	阳离子交换树脂	10.53	93.79	54.26
D001	阳离子交换树脂	11.86	90.54	50.47
NKA-9	阳离子交换树脂	15.08	86.11	55.39
D61	阳离子交换树脂	13.47	87.98	59.41
HPD417	阳离子交换树脂	14.55	89.62	61.59
HPD826	阳离子交换树脂	12.96	85.06	51.04
D101	非极性大孔吸附树脂	4.31	10.25	93.62
DM130	弱极性大孔吸附树脂	6.75	13.79	95.94

2.3.2 不同吸附时间对脱色脱蛋白效果的影响

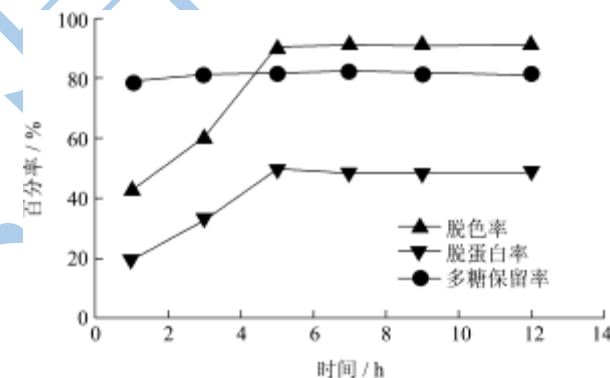


图 3 吸附时间对脱色脱蛋白效果的影响

Fig.3 The effect of adsorption time on decoloration and deproteinization

D941 树脂 2.0 g 置于三角瓶中,加入 20 mL 浓度为 5 mg/mL 的巴戟天多糖溶液,在室温下置于摇床分别振荡 1 h、3 h、5 h、7 h、9 h、12 h,考察不同吸附时间对脱色脱蛋白效果的影响。结果发现脱色率及脱蛋白率在 5 h 的时候达到了最大,而多糖保留率的变化比较平缓(图 3)。确定最佳的吸附时间为 5 h。

2.3.3 不同 pH 值对脱色脱蛋白效果的影响

D941 树脂 2.0 g 置于三角瓶中,加入 20 mL 浓度为 5 mg/mL 的 pH 值为 3、5、6、7、8、9 的巴戟天多糖溶液,在室温下置于摇床分别振荡 5 h,考察不同 pH 值对脱色脱蛋白效果的影响。结果发现脱色率及多糖保留率随 pH 值的增大而呈降低的趋势,其中在酸性条件下变化不大,而在碱性条件下变化明显;脱蛋

白率在 pH 为中性时是最小的, 在酸性及碱性条件时变化不大(图4)。巴戟天多糖溶液的原液 pH 值为 5.96, 偏酸性, 从简化工艺步骤的角度, 应该选择直接使用巴戟天多糖溶液的原液, 即不需要调节其 pH 值。

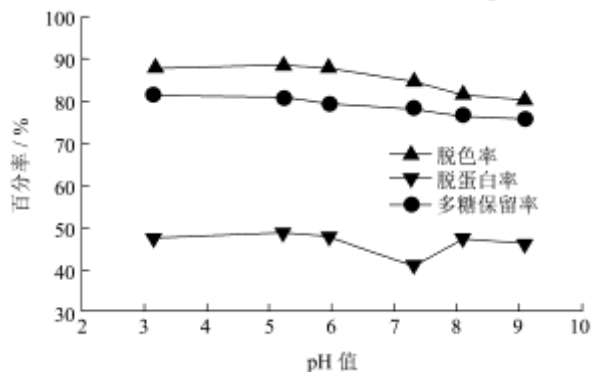


图 4 pH 值对脱色脱蛋白效果的影响

Fig.4 The effect of pH value on decoloration and deproteinization

2.3.4 不同温度对脱色脱蛋白效果的影响

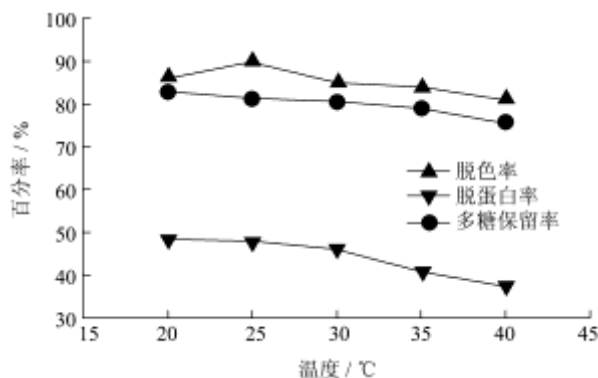


图 5 温度对脱色脱蛋白效果的影响

Fig.5 The effect of temperature on decoloration and deproteinization

D941 树脂 2.0 g 置于三角瓶中, 加入 20 mL 浓度为 5 mg/mL 的巴戟天多糖溶液, 分别置于 20 °C、25 °C (室温)、30 °C、35 °C 和 40 °C 的条件下, 摇床振荡 5 h, 考察不同温度对脱色脱蛋白效果的影响。结果发现脱色率在室温条件时是最高的; 多糖保留率及脱蛋白率随温度的升高而呈降低趋势, 其中在 20~30 °C 范围内变化不大, 在 30~40 °C 范围内变化明显(图 5)。综合三个指标考虑, 应该选择室温条件下进行吸附。

2.3.5 不同多糖溶液用量对脱色脱蛋白效果的影响

D941 树脂 2.0 g 置于三角瓶中, 分别加入 5、10、15、20、30、40 mL 浓度为 5 mg/mL 的巴戟天多糖溶液, 在室温下置于摇床振荡 5 h, 考察不同多糖溶液用量对脱色脱蛋白效果的影响。结果发现随着多糖溶液用量的增加, 脱色率、脱蛋白率在用量为 5~20 mL 区间变化不大, 超过 20 mL 时骤然降低, 说明多糖溶液的用量超出了树脂的处理能力; 而多糖保留率呈平缓

降低趋势(图 6)。20 mL 多糖溶液 (5mg/mL) 应该是 1.0 g 树脂最大处理量。

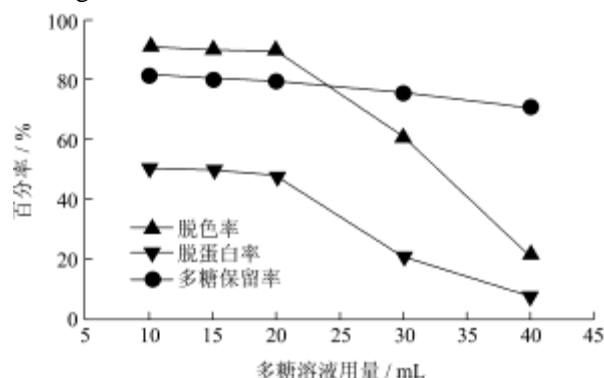


图 6 多糖溶液用量对脱色脱蛋白效果的影响

Fig.6 The effect of polysaccharide solution dosage on decoloration and deproteinization

2.4 树脂的动态吸附工艺研究

2.4.1 不同流速对脱色脱蛋白效果的影响

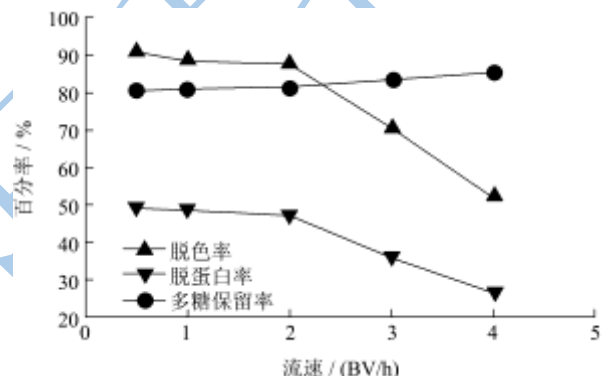


图 7 流速对脱色脱蛋白效果的影响

Fig.7 The effect of flow speed on decoloration and deproteinization

浓度为 5 mg/mL 巴戟天多糖溶液 150 mL, 分别以流速为 0.5 BV/h、1 BV/h、2 BV/h、3 BV/h、4 BV/h 进行吸附, 考察流速对脱色脱蛋白效果的影响。结果发现随着流速的增加, 脱色率、脱蛋白率在流速为 0.5~2 BV/h 区间变化不大, 超过 2 BV/h 时骤然降低, 说明流速过快, 色素及蛋白质来不及被树脂吸附; 而多糖保留率呈平缓升高的趋势(图 7)。从缩短操作时间的角度, 应该选择流速 2 BV/h。

2.4.2 不同多糖溶液浓度对脱色效果的影响

不同浓度的巴戟天多糖溶液 (2.5、5、10、15 mg/mL) 150 mL, 以流速为 2 BV/h 进行吸附, 考察多糖溶液浓度对脱色脱蛋白效果的影响。结果发现脱色率、脱蛋白率及多糖保留率在浓度为 2.5~5 mg/mL 区间变化不大, 超过 5 mg/mL 时骤然降低(图 8)。确定多糖溶液浓度为 5 mg/mL。

2.4.3 多糖溶液用量对脱色脱蛋白效果的影响

5 mg/mL 巴戟天多糖溶液 200 mL, 以流速为 2

BV/h 进行吸附, 每 0.5 BV 流出液收集一次, 考察多糖溶液用量对脱色脱蛋白效果的影响。结果发现当收集到第六试管 (3 BV, 150 mL) 时, 脱色率、脱蛋白率及多糖保留率均开始明显的降低, 说明超过了树脂的处理能力 (图 9)。150 mL 多糖溶液 (5 mg/mL) 应该是树脂最大处理量。

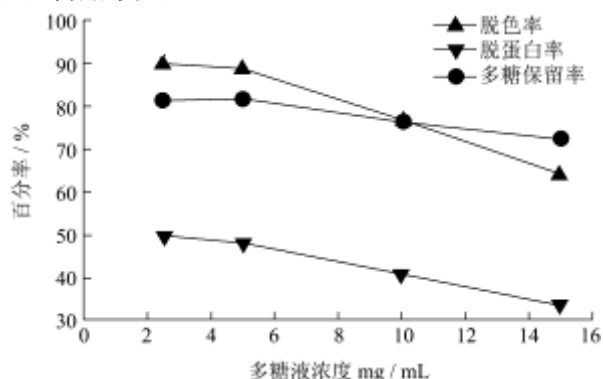


图 8 多糖溶液浓度对脱色脱蛋白效果的影响

Fig.8 The effect of polysaccharide solution concentration on

decoloration and deproteinization

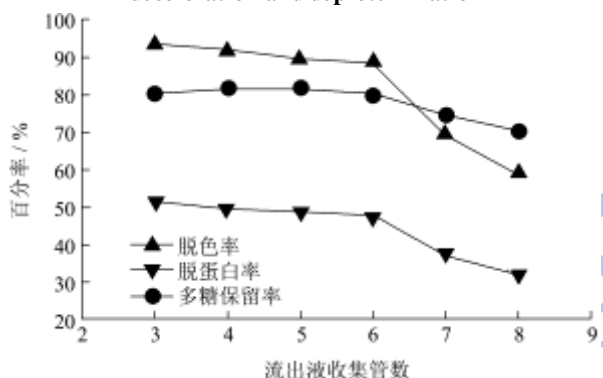


图 9 多糖溶液用量对脱色脱蛋白效果的影响

Fig.9 The effect of polysaccharide solution dosage on

decoloration and deproteinization

2.4.4 重复性实验

按照上述实验确定的最佳工艺参数: 室温下, 浓度为 5 mg/mL 的巴戟天多糖溶液 (不需调节 pH 值) 150 mL, 以流速为 2 BV/h 进行吸附, 重复三次实验。结果平均脱色率为 89.87±1.01%, 脱蛋白率为 50.75±0.80%, 多糖保留率为 81.08±1.53%, 工艺重复性良好。

3 结论

通过静态工艺研究, 筛选出最佳的树脂类型为 D941 阴离子交换树脂, 并确定最佳的工艺参数条件: 室温 (25 °C) 下, 5 mg/mL 的巴戟天多糖液 (不需要

调节 pH 值) 20 mL 静态吸附 5 h。在此基础上进行动态工艺研究, 发现其最佳的工艺条件: 5 mg/mL 巴戟天多糖溶液 150 mL, 以流速为 2 BV/h 进行吸附。静态工艺是 2 g 树脂 5 h 内处理 5 mg/mL 的巴戟天多糖液 20 mL, 而动态工艺是 10 g 树脂 1.5 h 内处理同样浓度的巴戟天多糖液 150 mL。因此动态工艺的处理容量大、处理时间短, 优于静态工艺。在其最佳工艺条件下, 脱色率及多糖的保留率在 80% 以上, 具有良好的脱色效果且多糖损失不大, 脱蛋白率达到 50%, 也具有较好的脱蛋白能力, 表明 D941 树脂可应用于巴戟天多糖的脱色脱蛋白处理。

参考文献

- [1] Zhu MengYong, Wang CaiJiao, Wang Xi, et al. Extraction of polysaccharides from *Morinda officinalis* by response surface methodology and effect of the polysaccharides on bone-related genes [J]. *Carbohydrate Polymers*. 2011, 85(1): 23-28
- [2] Wang ZongBao, Lu QingYou, Lu HaiYan, et al. Protective effect of *Morinda officinalis* polysaccharides on bone degeneration in the aged rats [J]. *International Journal of the Physical Sciences*. 2011, 6(1): 112-115
- [3] Zhu MengYong, Wang CaiJiaob, Zhang HuSheng, et al. Protective effect of polysaccharides from *morinda officinalis* on bone loss in ovariectomized rats [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008, 43(3): 276-278
- [4] 李楠, 王和鸣, 郭素华, 等. 巴戟天多糖含药血清对体外培养成骨细胞凋亡的保护作用观察 [J]. *中国骨伤*, 2008, 21(1): 39-41
- [5] 黄涛, 李楠, 王和鸣. 巴戟天多糖对体外培养兔软骨细胞增殖的影响 [J]. *北京体育大学学报*, 2007, 30(9): 1216-1218
- [6] Hua-lin Zhang, Jun Li, George Li, et al. Structural characterization and anti-fatigue activity of polysaccharides from the roots of *Morinda officinalis*. *International Journal of Biological Macromolecules* [J]. 2009, 44(3): 257-261.
- [7] 何传波, 陈玲, 李琳, 等. 巴戟天多糖脱蛋白方法的研究 [J]. *食品科技*, 2005, 6: 25-27
- [8] 何传波, 李琳, 汤凤霞, 等. 巴戟天中一种多糖的分离与结构表征 [J]. *高等学校化学学报*, 2005, 30(12): 2391-2395
- [9] 吕永磊, 王丹, 李向日, 等. 附子多糖的含量测定 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(5): 835-838