

· 中药提取工艺研究 ·

大孔吸附树脂分离纯化毛头牛蒡子多糖的工艺研究

季志红 阻力皮亚·艾山 周晓英

【摘要】 目的 研究大孔吸附树脂分离纯化毛头牛蒡子中多糖的方法。**方法** 比较 4 种不同型号大孔吸附树脂 AB-8、HPD-300、HPD-450、HPD-600 型对毛头牛蒡子多糖的纯化效果;采用分光光度法测定毛头牛蒡子多糖的含量,用静态吸附-解析方法从 4 种大孔吸附树脂中筛选出适宜的树脂,并优化纯化条件。**结果** AB-8 型大孔吸附树脂对毛头牛蒡子提取液中多糖的纯化效果最佳,最佳工艺条件为:上样液浓度 2.8 mg/ml;流速 2 BV/h;最佳洗脱溶剂为 50% 乙醇,洗脱溶剂用量为 2 BV。**结论** AB-8 型大孔吸附树脂能较好的洗脱分离毛头牛蒡子多糖,为毛头牛蒡子的综合开发提供新的思路与方法。

【关键词】 毛头牛蒡子; 多糖; 大孔吸附树脂; 纯化

【中图分类号】 R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.02.001

Purification of polysaccharide from *Arctium tomentosum* Mill seeds by macroporous adsorption resin

Ji Zhi-hong, Zulpiya · hasan, ZHOU Xiao-ying. Xinjiang Cicon Habo Uighur Medicine Ltd. Corporation, Urumqi 830026, China

Corresponding author: ZHOU Xiao-ying, E-mail: zhousiaoying4@163.com

【Abstract】 Objective To study the separation ability of macroporous adsorbing resins in the purification of polysaccharide from *Arctium tomentosum* Mill seeds. **Methods** Compare purify effects for polysaccharide from *Arctium tomentosum* Mill seeds. among four different types of macroporous adsorbing resins (AB-8、HPD-300、HPD-450、HPD-600 types). Apply spectrometry method to determine the content of polysaccharide from *Arctium tomentosum* Mill seeds. Meanwhile, screen out the suitable resin and optimize purification conditions from four different types of macroporous adsorbing resins with the static adsorption-analytical method. **Results** AB-8 macroporous adsorption resin has best purify effect for abstract from *Arctium tomentosum* Mill seeds. The optimum separation conditions were the concentration of polysaccharide was 2.8 mg/ml, a flow rate 2 BV/h and 50% alcohol was used as eluent, elution volume of 2 BV.

Conclusion Purification of *Arctium tomentosum* Mill seeds. can be conducted by AB-8 type of resin.

【Key words】 *Arctium tomentosum* Mill seeds; Polysaccharide; Macroporous adsorption resin; Purification

牛蒡子,来源于菊科两年生草本植物,是牛蒡属牛蒡(*Arctium lappa* L)的干燥成熟果实,为常用中药。同属植物毛头牛蒡(*Arctium tomentosum* Mill)的

干燥成熟果实在新疆有大面积分布^[1]。毛头牛蒡子的化学成分较多,主要含有多糖类、木脂素类、黄酮类物质,挥发油,此外还有酚羟基物质、脂肪酸、生物碱等^[2]。

大孔吸附树脂(macroporous adsorbing resins)是在离子交换树脂的基础上发展起来并于 70 年代末用于中草药有效成分的分离^[3]。近几年,大孔树脂技术逐渐应用于皂苷及多糖类成分研究。本实验以 4 种不同型号大孔吸附树脂对毛头牛蒡子的吸附解析性能,筛选出适宜的大孔吸附树脂,最佳洗脱

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2011211A050)

作者单位:830026 乌鲁木齐,新疆奇康哈博维药有限公司(季志红);新疆医科大学药学院(阻力皮亚·艾山、周晓英)

作者简介:季志红(1962-),女,本科,副主任药师,研究方向:维药新药开发与质量评价。E-mail:2313039112@qq.com

通讯作者:周晓英(1968-),女,硕士,教授,硕士生导师。研究方向:天然药物化学。E-mail:zhousiaoying4@163.com

条件,确定纯化工艺,以期制备高纯度毛头牛蒡子多糖奠定理论基础。

1 材料与仪器

毛头牛蒡子(采自新疆阿勒泰地区,经中医院李永和主任药师鉴定为毛头牛蒡的干燥成熟果实);葡萄糖对照品,乙醇,蒽酮-浓硫酸试剂,石油醚,无水乙醇,丙酮,氯仿,正丁醇均为市售分析纯。

大孔吸附树脂:AB-8(天津南大树脂科技有限公司),HPD-300、HPD-450、HPD-600 型(沧州宝恩吸附材料科技有限公司)

UV-2550(日本岛津),RE-2000A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),S22PC 型可见分光光度计(上海棱光仪器有限公司),AL204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),玻璃色谱柱。

2 实验方法

2.1 毛头牛蒡子多糖的提取^[4]

粉碎毛头牛蒡子过 40 目筛,按料液比 1:5 加 70% 乙醇 80 ℃ 恒温浸提 3 小时,回收乙醇,再以料液比 1:2 加蒸馏水超声辅助浸提 4 小时,3000 r/min 离心 10 分钟,上清液采用 Sevage 法除去蛋白(Sevage 法:按氯仿-正丁醇体积比 4:1 配制 Sevage 试剂,将 10 ml Sevage 试剂与 50 ml 质量浓度一定的粗多糖样液混合,剧烈振摇 20 分钟,4000 r/min 离心 10 分钟分去下层有机相和中间的变性蛋白,收集上清液。将上述方法反复 4 次),即得毛头牛蒡子多糖粗提液。

2.2 标准曲线的绘制

2.2.1 选择最大吸收波长

精密称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 25.0 mg,至 25 ml 容量瓶中,加蒸馏水溶解并定容,摇匀,制得标准品储备液。取 1.0 ml 标准品储备液置试管中,在另一个试管中取 1.0 ml 样品粗体液,分别在两个试管中加硫酸-蒽酮试剂 4.0 ml,充分振摇,在紫外可见光区(200~800 nm)扫描。在 628 nm 处,标准品和样品都有最大吸收峰,即为最大吸收波长。(见图 1)。

2.2.2 标准曲线的绘制

精密吸取标准品储备液 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 ml, 分别置 10 ml 容量瓶中,用蒸馏水

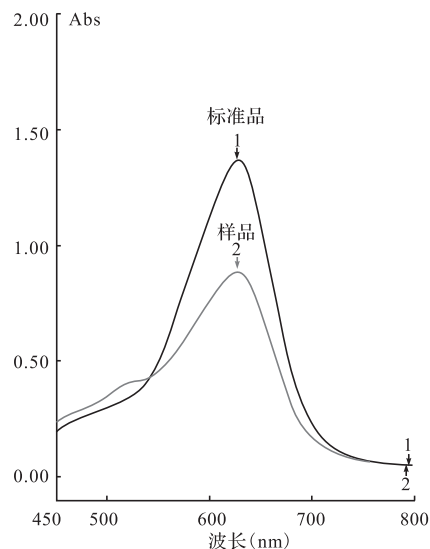


图 1 标准品与样品的吸收曲线

定容。分别精密吸取以上新配制标准溶液各 1.0 ml, 分别加入硫酸-蒽酮试剂 4.0 ml, 摇匀。于沸水浴中加热 10 分钟, 冷却至室温。另取蒸馏水 1.0 ml, 加硫酸-蒽酮试剂 4.0 ml, 同法制成空白对照, 于 628 nm 波长测定吸光度。以吸光度值(A)为纵坐标, 以葡萄糖浓度(C)为横坐标绘制标准曲线, 计算的回归方程, 得: $A = 0.0261C + 0.2453$ ($r = 0.9900$)。

2.3 多糖的测定

精密移取样品溶液 1.0 ml, 按“2.2.2”项下方法操作, 于 628 nm 波长测定吸光度(经测定毛头牛蒡子粗多糖的浓度为 5.6 mg/ml)。

2.4 大孔吸附树脂的预处理^[5]

大孔吸附树脂用水洗去除悬浮物及水溶性杂质, 并洗至无气泡后, 用 95% 乙醇浸泡 24 小时后装柱, 再用 95% 乙醇洗脱至流出液与水不产生混浊, 继续洗, 至流出液无异味, 再用蒸馏水洗, 至流出液无醇味, 既得。

2.5 树脂的筛选

2.5.1 静态吸附研究^[6]

称取 4 种预处理过的大孔吸附树脂(湿重 5 g), 分置 100 ml 锥形瓶中, 各加入毛头牛蒡子多糖样品溶液 5 ml, 每隔 5 分钟振摇 10 秒持续 2 小时, 静置 12 小时, 使其达到饱和吸附, 过滤, 测定毛头牛蒡子多糖浓度, 按下式计算吸附率: 吸附率(%) = $(C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%$ 。式中: C_0 为吸附前液体多糖浓度(mg/ml); C_1 为吸附后液体多糖浓度(mg/ml)。

2.5.2 静态解析研究

对达到饱和的树脂用 5ml, 50% 乙醇解析, 每隔 5 分钟振摇 10 秒持续 5 小时, 过滤, 取溶液定容, 测定滤液中毛头牛蒡子多糖浓度。按下式计算解析率: 解析率(%) = $C_0 / (C_1 - C_2) \times 100\%$ 式中: C_0 为吸附前液体多糖浓度(mg/ml); C_1 为吸附后液体多糖浓度(mg/ml); C_2 为上清液的平衡多糖浓度(mg/ml), 结果 AB-8 型大孔吸附树脂的多糖吸附率, 解析率均较高, 故选用 AB-8 型大孔吸附树脂为最佳树脂进行后续实验。详见表 1。

表 1 4 种树脂的静态吸附-解析率

树脂种类	吸附率(%)	解析率(%)
AB-8	73.5	53.7
HPD-300	69.9	37.5
HPD-450	64.3	48.0
HPD-600	57.1	21.2

2.6 上样液浓度的确定

用不同浓度的毛头牛蒡子提取液进行吸附实验, 浓度高于或低于 2.8 mg/ml 时吸附率明显降低, 不利于上样, 因此上样液浓度以 2.8 mg/ml 为宜。

2.7 洗脱溶剂浓度的确定^[7]

依次用水、30%、50%、70% 乙醇, 用 2 BV/h 的流速, 对已装好一定浓度的样品水溶液的大孔树脂柱进行洗脱, 测定洗脱液中毛头牛蒡子浓度。结果 50% 乙醇洗脱液中毛头牛蒡子多糖含量最高。所以确定洗脱剂乙醇浓度 50% 为最佳。

2.8 洗脱剂用量的确定

选用 AB-8 型大孔吸附树脂, 按“2.4”项下处理, 上样液浓度 2.8 mg/ml, 进行上柱, 吸附。用 50% 乙醇洗脱, 分段收集 50% 乙醇洗脱液。每个树脂体积收集洗脱液, 每次用 Molish 试剂验证有无多糖洗出, 洗至无多糖洗出。2 BV 的洗脱溶剂把毛头牛蒡子中多糖已洗脱完全。故确定洗脱剂用量为 2 倍树脂体积。

2.9 重复性实验

选用 AB-8 型大孔吸附树脂, 按“2.4”项下处理, 精密吸取 3 份样品溶液(浓度 2.8 mg/ml), 分别进行上柱, 吸附。用 50% 乙醇洗脱, 洗脱速度 2 BV/h, 收集洗脱液, 测定毛头牛蒡子多糖含量, 结果表明实验方法可靠稳定, 见表 2。

表 2 重复性实验结果

编号	毛头牛蒡子多糖浓度(mg/ml)	毛头牛蒡子多糖含量(mg/g)	相对标准偏差(%)
1	0.185	9.25	
2	0.186	9.30	
3	0.180	9.00	
平均	0.183	9.18	1.75

3. 讨论

(1) 上样液浓度是影响树脂吸附性能的重要因素之一, 浓度低, 树脂未被饱和, 浓度高则不能被完全洗脱, 导致最终结果不准确。(2) 确定洗脱溶剂用量可以使多糖完全的洗脱, 还可以避免溶剂的消耗。(3) 洗脱流速会影响测定结果, 流速太低, 多糖流出速度慢, 消耗时间较长; 流速过快, 大孔吸附树脂对多糖的吸附量减少, 不能发挥出树脂的吸附功能。所以应选出最佳流速。(4) 本实验对比考察 4 种树脂的吸附, 解析能力, AB-8 型大孔吸附树脂表现出对毛头牛蒡子中多糖分离纯化的最优能力, 确定上样液浓度以 2.8 mg/ml 为宜, 洗脱剂乙醇浓度 50% 为最佳, 洗脱剂用量为 2 倍树脂体积, 用 2 BV/h 的流速, 可很好的将毛头牛蒡子多糖进行洗脱富集, 为毛头牛蒡子的综合开发提供新的思路和方法。大孔吸附树脂具有良好的吸附解析能力, 在天然产物的分离纯化方面表现出很好的优越性, 可广泛用于各类中草药有效成分的现代化研究。

参 考 文 献

- [1] 韩潇, 赵艳龙. 毛头牛蒡子中总黄酮最佳提取工艺研究[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(8): 34-35.
- [2] 于宏. 牛蒡的化学成分与生物活性[J]. 国外医药·植物药分册, 2007, 22(6): 244-246.
- [3] 李崇明, 熊富良, 黄志军, 等. 新药研究中大孔树脂型号与规格的选择应用[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1208.
- [4] 任海伟, 陈海秀, 唐学慧, 等. 大孔吸附树脂纯化薏苡多糖的研究[J]. 食品工业技术, 2012, 33(3): 249-254.
- [5] 吕新建, 廉宜君, 刘红, 等. ISA-5B 型大孔树脂纯化沙枣多糖的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2785-2786.
- [6] 汤伟, 彭求贤, 严愉妙, 等. 大孔吸附树脂法及分离交换层析柱法精制纯化丹参多糖的研究[J]. 中药材, 2010, 33(12): 1937-1941.
- [7] 刘霞, 岐琳. 大孔吸附树脂纯化鹿药总皂苷和总黄酮的研究[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(6): 516-519.

(收稿日期: 2013-01-08)

(本文编辑: 黄凡)