

# 红芪多糖“脱蛋白-大孔吸附树脂”的纯化富集工艺考察

赵沙沙<sup>1,2</sup>, 何海<sup>1,2</sup>, 张小荣<sup>1,2</sup>, 郭玫<sup>1,2,3,4</sup>, 崔治家<sup>1,2</sup>, 邵晶<sup>1,2,3,4</sup>

1. 甘肃中医药大学(兰州 730000)
2. 西北中藏药协同创新中心(兰州 730000)
3. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室(兰州 730000)
4. 甘肃省中药制药工艺工程研究中心(兰州 730000)

**【摘要】目的** 研究红芪多糖(HPS)标准提取物,筛选优化其“脱蛋白-大孔吸附树脂纯化富集”的工艺方法与工艺参数。**方法** 以蛋白脱除率和多糖损失率为指标,比较4种不同方法的脱蛋白效果,并对筛选出的方法进行工艺参数优化;以吸附量和吸附率为指标,考察4种型号大孔吸附树脂(AB-8、D-101、NKA-9、X-5)对HPS的纯化富集效果,并进行相关工艺参数优化;采用苯酚硫酸法和考马斯亮兰法分别测定多糖和蛋白质含量;采用紫外分光光度(UV)和红外光谱(IR)法比较纯化前后多糖的基本特征。**结果** 筛选出的脱蛋白方法为Sevag法,优选的树脂为AB-8大孔吸附树脂。通过工艺参数优选,确定的纯化工艺为:10 mg·mL<sup>-1</sup>粗多糖水溶液,以1/2倍体积氯仿-正丁醇(4:1, v/v)混合试剂进行脱蛋白操作2次;除去残留有机溶剂后,以质量浓度为1.5 mg·mL<sup>-1</sup>的水溶液,上预处理好的AB-8大孔吸附树脂柱[树脂量(g)与上样体积(v)比为1:10],以2.0 mL·min<sup>-1</sup>流速循环上样2次,动态吸附后再静态吸附6~8 h,后以30%乙醇1.0 mL·min<sup>-1</sup>进行洗脱,至洗脱液无明显碱性酒石酸铜反应,收集洗脱液浓缩至与原药1:1,加无水乙醇至含醇量80%,沉淀10 h,抽滤,以无水乙醇、丙酮冲洗沉淀,即得HPS。**结论** 验证试验表明,经本工艺纯化富集后,所得HPS样品纯度提高了1.27倍;UV在260, 280 nm处未见蛋白质吸收峰;IR表现出更突出的多糖结构特征吸收峰,说明纯化过程有效且未对HPS主要结构产生影响。优选出的HPS脱蛋白和大孔树脂纯化工艺稳定可行,重复性较好,使多糖得到较好的纯化富集,为HPS标准提取物的形成以及其能成为制剂科学化原料药提供了研究基础。

**【关键词】** 红芪多糖;脱蛋白;大孔吸附树脂;纯化工艺

## Study on purification and enrichment technology of hedysarum polysaccharide "deproteinization-macroporous adsorption resin"

Sha-Sha ZHAO<sup>1,2</sup>, Hai HE<sup>1,2</sup>, Xiao-Rong ZHANG<sup>1,2</sup>, Mei GUO<sup>1,2,3,4</sup>, Zhi-Jia CUI<sup>1,2</sup>, Jing SHAO<sup>1,2,3,4</sup>

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202306010

基金项目: 甘肃省科技计划自然科学基金项目(17JR5RA163、21JR11RA136); 兰州市城关区科技计划项目(2020-2-2-2); 甘肃省教育厅双一流重大科研项目(GSSYLXM-05); 甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放课题(ZYGY202004); 中药药公共卫生服务补助专项子课题(2305191901)

通信作者: 邵晶, 博士, 教授, 硕士研究生导师, Email: cn221@163.com

<https://ywlxwb.whuzhmedj.com/>

3. Gansu Province Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

4. Research Center of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology and Engineering of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Jing SHAO, Email: cn221@163.com

**【Abstract】** **Objective** To study the standard extract of hedysarum polysaccharide (HPS), and to screen and optimize its "deproteinization-macroporous adsorption resin purification and enrichment" process method and process parameters. **Methods** Taking the protein removal rate and polysaccharide loss rate as indexes, the deproteinization effects of four different methods were compared, and the process parameters of the selected methods were optimized. Taking adsorption capacity and adsorption rate as indicators, the purification and enrichment effects of four types of macroporous adsorption resins (AB-8, D-101, NKA-9, X-5) on HPS were investigated, and the related process parameters were optimized. Phenol sulfuric acid method and Coomassie brilliant blue method were used to determine the content of polysaccharide and protein. The basic characteristics of polysaccharides before and after purification were compared by UV and IR methods. **Results** Sevag method was selected for deproteinization, and AB-8 macroporous adsorption resin was the preferred resin. Through the optimization of process parameters, the purification process was determined as follows: 10 mg·mL<sup>-1</sup> crude polysaccharide aqueous solution, deproteinization twice with 1/2 volume of chloroform-n-butanol (4 : 1, v/v) mixed reagent; after the residual organic solvent was removed, the pretreated AB-8 macroporous adsorption resin column was loaded with 1.5 mg·mL<sup>-1</sup> aqueous solution [the ratio of resin amount (g) to loading volume (v) was 1 : 10], and the sample was loaded twice at a flow rate of 2.0 mL·min<sup>-1</sup>. After dynamic adsorption, static adsorption was carried out for 6–8 h, and then elution was carried out with 1.0 mL·min<sup>-1</sup> of 30% ethanol until the eluate had no obvious basic copper tartrate reaction, the eluate was collected and concentrated to 1 : 1 with the original drug, anhydrous ethanol was added to 80% alcohol content, the precipitate was precipitated for 10 h, then filtrated it and the precipitate was rinsed with anhydrous ethanol and acetone and the HPS was extracted. **Conclusion** The verification experiment showed that the purity of HPS sample was increased by 1.27 times after purification and enrichment by this process. There was no protein absorption peak at 260 nm and 280 nm in UV spectrum. IR spectrum showed more prominent absorption peaks of polysaccharide structure characteristics, which indicated that the purification process was effective and had no influence on the main structure of HPS. The optimized HPS deproteinization and macroporous resin purification process is stable and feasible, with good repeatability, so that the polysaccharide can be purified and enriched, which provides a research foundation for the formation of HPS standard extract and its ability to become a scientific raw material of preparations.

**【Keywords】** Hedysarum polysaccharide; Deproteinization; Macroporous adsorption resin; Purification process

红芪首次出现于《本草经集注》，已有千年的药用历史，其性温、味甘，具有补气升阳、固表止汗、利水消肿的功效。现代研究<sup>[1]</sup>表明，红芪有多种生物活性化合物成分，包括多糖、黄酮类、苯丙素、三萜类和微量元素、生物碱、有机酸等；其中红芪多糖(hedysarum polysacchcaide, HPS)生物活性显著，越来越多的学者关注其抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病等药理活性作用<sup>[2-3]</sup>。

作为 HPS 中药标准提取物的主要杂质之一，蛋白质会干扰多糖的结构和功能特性的测定<sup>[4]</sup>，影响其功效的发挥，而采用乙醇沉淀多糖时蛋白质也同时沉淀出来，因此纯化多糖时首先要去除蛋白质。本研究以红芪为研究对象，采用水提醇沉法提取粗多糖，对纯化富集的关键因素进行筛选，确定最佳的“脱蛋白-大孔吸附树脂”纯化富集工艺，从而为 HPS 中药标准提取物的开发利用提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

UV-3300 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)；L104 型 FTS-3000 傅立叶变换红外光谱仪(美国赛默飞世尔)；L104 型万分之一分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]；DD-5M 型离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)；SB-5200DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)；ZK-82B 型真空干燥箱(上海市实验仪器厂有限公司)。

### 1.2 试剂

红芪药材购自甘肃省陇南市瑞达中药材专业合作社(产地为甘肃陇南武都柏林乡楼下村)，经甘肃中医药大学崔治家教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 的干燥根，符合中国药典 2020 年版植物来源的规定；D-无水葡萄糖对照品(上海源叶生物科技有限公司，批号：B21882，纯度  $\geq 99\%$ )；牛血清蛋白(上海生工生物工程股份有限公司，批号：20200615)；蒸馏水；氯仿、正丁醇、苯酚、浓硫酸等均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 红芪多糖含量测定方法

采用苯酚-硫酸法<sup>[5]</sup>测定多糖含量：以蒸馏

水配制  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的葡萄糖对照品溶液。分别吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于具塞试管，以蒸馏水补至 2 mL，分别加 5% 苯酚 1 mL 混匀，沿管壁缓慢加入浓硫酸 5 mL，静置 5 min，振荡，沸水浴反应 15 min，迅速冷却至室温；另以蒸馏水加苯酚和硫酸，同上操作为空白对照，在 490 nm 处测定吸光度，以葡萄糖质量为横坐标(X)、吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线，得线性方程： $Y=5.7 \times 10^{-3}X+0.134$ ， $r=0.9968$ 。根据各样品具体情况，分别精密吸取 2~8 mL 加蒸馏水稀释定容至 25 mL 量瓶中，以使测量值达到标准曲线线性范围。量取各样品液 0.2 mL，以蒸馏水补至 2 mL，按标准曲线法测定。计算各多糖含量和损失率。多糖损失率 = (脱蛋白前多糖吸光度值 - 脱蛋白后多糖吸光度值) / 脱蛋白前多糖吸光度值  $\times 100\%$ 。

### 2.2 红芪多糖中蛋白质含量测定方法

采用考马斯亮蓝 G250 染色法<sup>[6]</sup>测定蛋白质含量：以蒸馏水配制浓度为  $240 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  牛血清白蛋白对照品溶液。分别吸取蛋白对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL，以蒸馏水补至 1 mL，向各管加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液，混匀，30℃水浴反应 5 min；以蒸馏水为空白，在 595 nm 处测定吸光度值，以蛋白质质量为横坐标(X)、吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线，得线性方程： $Y=6.9 \times 10^{-3}X-0.0501$ ， $r=0.9947$ ，表明蛋白质在 24~148  $\mu\text{g}$  范围内与吸光度具有良好的线性关系。分取各样液 0.4 mL，以蒸馏水补至 1.0 mL，按标准曲线制备法分别测定。计算蛋白质质量和脱除率。蛋白脱除率 = (脱蛋白前蛋白吸光值 - 脱蛋白后蛋白吸光值) / 脱蛋白前蛋白吸光值  $\times 100\%$ 。

### 2.3 红芪粗多糖制备

红芪药材干燥粗粉 50 g，水煎煮 3 次，每次 1.0 h，首次加水 12 倍，浸泡药材 2 h 后煎煮，第 2、3 次均加水 10 倍量，合并提取液，浓缩至与原料药材 1:1 比例，加无水乙醇至含醇量达 77%，醇沉 10 h，得棕色黏稠状沉淀。沉淀物以 10 倍量热水溶解趁热离心(999  $\times g$ ) 20 min，上清液冷却后加无水乙醇使含醇量达 77%，沉淀 10 h；醇沉物再次以 10 倍量热水溶解，同样方式进行第 3 次醇沉，抽滤，以乙醚、丙酮、无水乙醇冲洗沉淀，得灰白色粉末，即为红芪粗多糖<sup>[7]</sup>。

制备一定浓度 ( $6.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的红芪粗多糖原液。分别采用“2.1”和“2.2”项下方法,测得其中多糖含量为  $3.86 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 占比 59.38%, 蛋白质含量为  $0.279 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 占比 4.29%。

## 2.4 脱蛋白方法的筛选

### 2.4.1 Sevag法

量取粗多糖溶液 25 mL, 加等体积氯仿-正丁醇 (4:1, v/v) 混合试剂, 剧烈振摇 30 min, 分出氯仿层, 将水层和交界处混悬液离心 ( $999 \times g$ ) 20 min, 除去变性蛋白沉淀。上清液浓缩至小体积后以蒸馏水溶解定容至 25 mL 量瓶, 测定多糖及蛋白质含量, 并计算多糖脱蛋白率和多糖损失率<sup>[8-9]</sup>。

### 2.4.2 三氯乙酸 (TCA) 法

量取粗多糖溶液 25 mL, 加原液体积 1/10 的三氯乙酸振摇, 放置 12 h, 离心 ( $999 \times g$ ) 20 min, 取上清液浓缩至小体积后以蒸馏水溶解定容至 25 mL 量瓶中, 测定多糖含量和蛋白质含量, 并计算多糖脱蛋白率和多糖损失率。

### 2.4.3 TCA-正丁醇法

量取粗多糖溶液 25 mL, 加等体积三氯乙酸-正丁醇 (1:10, v/v) 混合试剂, 振摇 10 min, 离心 ( $999 \times g$ ) 20 min, 取上清液浓缩至小体积后以蒸馏水溶解定容至 25 mL 量瓶中, 测定多糖含量和蛋白质含量, 并计算多糖脱蛋白率和多糖损失率。

### 2.4.4 盐酸法

量取粗多糖溶液 25 mL, 以  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸调 pH 至 3, 放置过夜, 离心 ( $999 \times g$ ) 20 min, 取上清液浓缩至小体积后以蒸馏水溶解定容至 25 mL 量瓶中, 测定多糖含量和蛋白质含量, 并计算多糖脱蛋白率和多糖损失率。

### 2.4.5 脱蛋白方法比较结果

4 种不同方法脱蛋白效果比较见图 1-A。结果显示 TCA 法和 TCA-正丁醇法多糖损失较多, 且处理后的多糖复溶性明显减弱, 可能是 TCA 作为变性剂与蛋白质结合形成不溶性盐, 暴露出更多的疏水基团而聚集沉淀, 而蛋白沉淀的同时, 吸

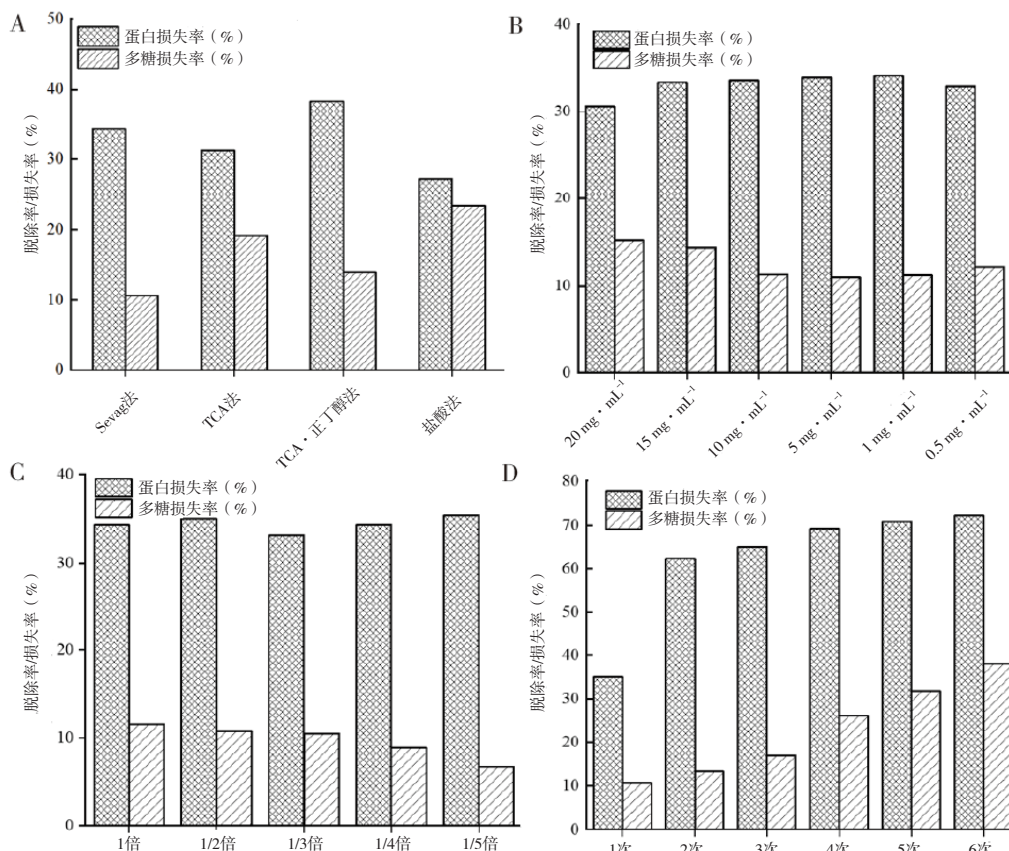


图1 脱蛋白方法的筛选及Sevag法脱蛋白条件的筛选

Figure 1. Screening of deproteinization method and screening of deproteinization conditions by Sevag method

注: A. 脱蛋白方法比较; B. 粗多糖原液浓度的影响; C. 试剂体积比的影响; D. 萃取次数的影响

附了一定量的多糖造成损失。同时高浓度的TCA可以在一定的程度上造成红芪多糖水解,进而引起多糖结构发生变化。盐酸法蛋白脱除率较低,且多糖损失较多,考虑可能是加热去除盐酸时会有部分多糖水解。综合多糖损失率和脱蛋白率考虑,Sevag法脱蛋白效果更佳。文献<sup>[10]</sup>报道Sevag法脱蛋白原理是利用有机溶剂破坏蛋白质的双层结构,打破其在水溶液中的溶解度平衡和稳定性,导致蛋白质沉淀。相比较其他方法,Sevag法作用温和,对红芪多糖结构影响较小。因此后续选用Sevag法进行单因素脱蛋白条件优化筛选。

#### 2.4.6 单因素试验筛选Sevag法脱蛋白条件

对影响蛋白脱除率及多糖损失率的主要因素(样品溶液浓度、试剂与样品液体积比、萃取次数)进行考察,具体如下<sup>[11-12]</sup>。

红芪粗多糖原液浓度:分别配制20,15,10,5,1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>不同浓度的粗多糖溶液,各取25 mL,加入等体积氯仿-正丁醇(4:1, v/v)混合试剂,剧烈振摇30 min,分出氯仿层,将水层和交界处混悬液离心(999×g)20 min,上清液水浴浓缩至小体积后以蒸馏水溶解定容至25 mL量瓶中,测定多糖含量及蛋白质含量。结果见图1-B,原液浓度为10,5,1 mg·mL<sup>-1</sup>时,蛋白脱除率较好,多糖损失率相对较低,考虑有机溶剂用量及污染问题,选择原溶液浓度为10 mg·mL<sup>-1</sup>。

试剂体积比对Sevag法脱蛋白效果的影响:取浓度为10 mg·mL<sup>-1</sup>粗多糖溶液8份,每份25 mL,分别加入1倍、1/2倍、1/3倍、1/4倍、1/5倍的氯仿-正丁醇(4:1, v/v)混合试剂,剧

烈振摇30 min,分出氯仿层,将水层和交界处的变性蛋白混悬液离心(999×g)20 min,上清液水浴浓缩至小体积后以蒸馏水溶解定容至25 mL量瓶中,测定多糖含量及蛋白质含量。结果见图1-C,随着试剂量的增加,多糖损失率显著增加,但蛋白脱除率变化不明显。1/2倍时,蛋白脱除率相对较好,多糖损失率也相对较低。

萃取次数对Sevag法脱蛋白效果的影响:取浓度为10 mg·mL<sup>-1</sup>粗多糖溶液8份,25 mL/份,加1/2体积的氯仿-正丁醇(4:1, v/v)混合试剂,剧烈振摇30min,分出氯仿层,将水层和交界处的变性蛋白混悬液离心(999×g)20 min,上清液再以等体积氯仿-正丁醇(4:1, v/v)混合试剂重复萃取,8份样品液萃取次数分别为1,2,3,4,5,6,7,8次,上清液均水浴浓缩至小体积后以蒸馏水溶解定容至25 mL量瓶中,测定多糖含量及蛋白质含量。结果见图1-D,随萃取次数增加,蛋白脱除率明显增加,但多糖损失率也增加。相比较,萃取第3次及以后蛋白脱除率的变化趋势趋于平缓,确定萃取次数为2次。

#### 2.4.7 Sevag法脱蛋白验证试验

取10 mg·mL<sup>-1</sup>的粗多糖溶液25 mL共5份,加1/2倍体积的氯仿-正丁醇(4:1, v/v)混合试剂,萃取2次,经透析,冷冻干燥,得到纯化后的红芪多糖干燥粉末,采用苯酚-硫酸法测得多糖含量为6.237 mg·mL<sup>-1</sup>,多糖的含量由原来的59.38%提高到62.37%,纯度得到一定程度提升。表1中结果显示,平均蛋白脱除率为32.483%,RSD值为4.489%,表明该方法重现性良好。

表1 Sevage法脱蛋白的验证性试验(n=5)

Table 1. Confirmatory test of deproteinization by Sevage method (n=5)

溶液浓度 (mg·mL <sup>-1</sup> )	原溶液			脱蛋白后		
	蛋白质含量 (mg·mL <sup>-1</sup> )	蛋白质含量 (mg·mL <sup>-1</sup> )	蛋白脱除率(%)	多糖含量 (mg·mL <sup>-1</sup> )	多糖含量 (mg·mL <sup>-1</sup> )	多糖损失率(%)
10	0.4020	0.2802	30.299	5.9380	5.2350	11.839
10	0.4020	0.2735	31.965	5.9380	5.3000	10.744
10	0.4020	0.2673	33.507	5.9380	5.2530	11.536
10	0.4020	0.2709	32.612	5.9380	5.3120	10.542
10	0.4020	0.2652	34.030	5.9380	5.1980	12.462
平均值			32.483			11.425
RSD (%)			4.489			6.923

## 2.5 大孔树脂富集纯化红芪多糖的工艺参数优选

### 2.5.1 树脂的预处理及树脂型号的筛选

4种型号大孔吸附树脂(AB-8、D-101、NKA-9、X-5)以95%乙醇浸泡24h使充分溶胀,再以95%乙醇反复冲洗,至流出液加蒸馏水无浑浊,再以蒸馏水洗至无醇味<sup>[13-17]</sup>。

精密称取预处理树脂各3份,每份2.0g,置50mL具塞三角瓶;分别加已知浓度的HPS溶液25mL(苯酚-硫酸法测定多糖含量为 $1.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),室温下静态吸附8h,滤过,水浴蒸干,残留物以蒸馏水溶解定容至25mL量瓶,按苯酚-硫酸法测定,计算含量。上述滤出的树脂,加20%乙醇50mL,室温静态解吸24h,滤过,以少量20%乙醇冲洗,洗液并入滤液,水浴蒸干,残留物用蒸馏水溶解定容至25mL量瓶,按苯酚-硫酸法测定,计算含量。按下式计算:

比吸附量( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) =  $(C_0 - C_e) \times V/m$ ; 比解吸量( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) =  $C_1V/m$ ; 解吸率(%) = 比解吸量/比吸附量  $\times 100\%$ 。式中,  $C_0$  为起始浓度,  $C_e$  为平衡浓度,  $V$  为溶液体积,  $m$  为树脂质量,  $C_1$  为解吸液浓度。

为进一步提高纯度,选择采用大孔吸附树脂进行纯化处理,考察了4种型号树脂(AB-8、D-101、NKA-9、X-5)对红芪多糖的吸附量和吸附率,并对筛选出的树脂相关工艺参数进行优化。综合比较4种大孔树脂的吸附率和解吸率,图2-A显示对红芪多糖的比吸附量为AB-8 > NKA-9 > D-101 > X-5;图2-B解吸率为X-5

> AB-8 > D-101 > NKA-9。虽然X-5解吸率较好,但对红芪多糖的吸附效果不佳,相比较AB-8和D-101型树脂对红芪多糖的吸附解吸性能均较好,AB-8效果更突出些,因此选择使用AB-8型大孔树脂,比吸附量为 $8.37\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、吸附率为66.99%,比解吸量为 $7.01\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,解吸率为83.72%。

### 2.5.2 解吸剂的考察

精密称取预处理的AB-8大孔树脂2g于锥形瓶,加粗多糖溶液25mL,室温静态吸附8h,滤过,滤出树脂,分别以50mL的60%,50%,40%,30%,20%,10%乙醇溶液和水作解吸剂,静态解吸8h,滤过,以少量相应解吸剂冲洗树脂,洗液并入滤液,水浴蒸干,残留物用蒸馏水溶解定容至25mL量瓶,按苯酚-硫酸法测定,计算含量及解吸率。图3-A结果显示:10%~30%的乙醇溶液解吸效果较好,解吸率均达80%以上。考虑到尽量减少水溶性杂质的混入,故确定采用30%乙醇作为解吸剂。

### 2.5.3 药液质量浓度对红芪多糖富集影响的考察

精密称取预处理的AB-8树脂8份,各2g/份,分别加入质量浓度为0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 $\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的多糖溶液25mL,静态吸附8h,滤过,水浴蒸干,残渣以蒸馏水溶解定容至25mL量瓶,按苯酚-硫酸法测定,并计算含量及比吸附量( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )。图3-B结果表明,上样液质量浓度为 $1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,比吸附量较好,之后随着上样液质量浓度的增加

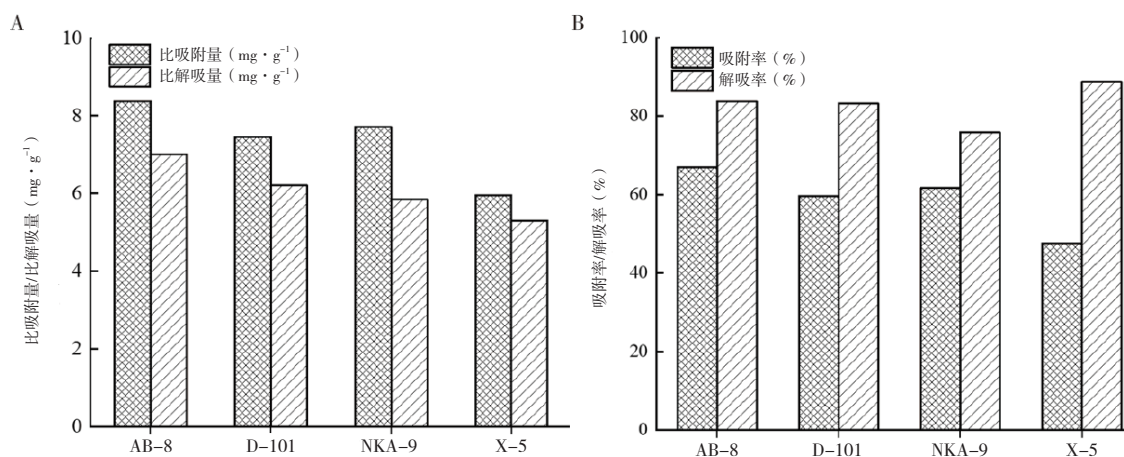


图2 树脂型号对红芪多糖富集的影响

Figure 2. Effect of resin type on polysaccharide enrichment of *Radix Hedysari*

注: A. 对比多糖吸附量/比解吸量的影响; B. 对吸附率/解吸率的影响

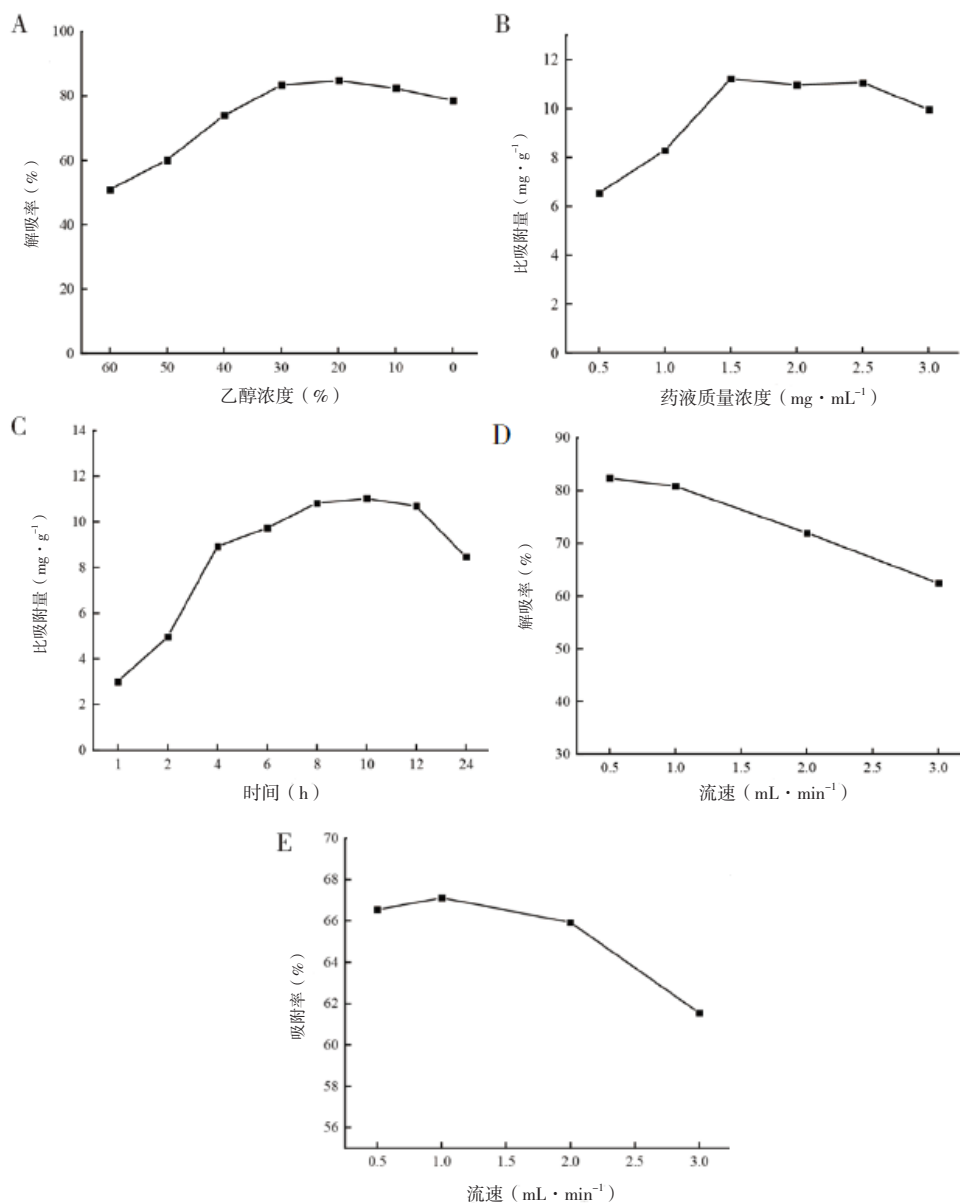


图3 不同工艺参数优选

Figure 3. Different preferable proces parameters

注：A. 解吸剂浓度的影响；B. 药液质量浓度对富集的影响；C. AB-8型大孔吸附树脂的静态吸附动力学曲线；D. 动态吸附上样液流速考察；E. 动态解吸洗脱液流速考察

比吸附量变化不明显，说明此时树脂吸附性能已被充分利用，而上样液过于黏稠，会影响树脂性能，因此选择  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.5.4 静态吸附动力学曲线的制备

精密称取预处理的 AB-8 树脂 5 g，加红芪多糖液 50 mL，室温振荡 24 h 进行吸附，分别在 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 时吸取上清液 2.0 mL，水浴蒸干，残渣以蒸馏水溶解定容至 10 mL，按苯酚-硫酸法测定吸光度，计算含量及比吸附量。以比吸附量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 对时间  $t(\text{h})$  作图，得静态吸附动力学曲线。由图 3-C 可知，

比吸附量在 2~6 h 急剧增加，6 h 后增加缓慢，8 h 后基本平衡，12 h 后下降，尤其 24 h 时比吸附量下降显著，考虑可能是浸泡时间过长，导致已吸附的多糖产生复解吸，选择静态吸附时间为 8 h。

### 2.5.5 动态吸附上样液流速的考察

取预处理的 AB-8 树脂 25 g，湿法装柱 ( $2 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ )。取多糖液 250 mL，分别以  $0.5, 1.0, 2.0, 3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速上样，进行动态吸附，流出液循环吸附 2 次；收集吸附后的流出液，水浴蒸干，残渣以蒸馏水溶解定容至 250 mL，按苯

酚-硫酸法测定, 计算含量及吸附率。图 3-D 结果显示, 上样液流速在  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  以下时, 吸附效果均可达到 60% 以上, 结合静态吸附试验, 确定吸附过程为: 室温下, 上样液以  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  以下流速循环上样, 动态吸附 2 次, 后静态吸附, 动态吸附和静态吸附累计时间不小于 8 h。

### 2.5.6 动态解吸洗脱液流速的考察

取预处理的 AB-8 树脂 25 g, 湿法装柱 ( $2 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ )。取多糖液 250 mL, 以上述方式吸附, 后以总体积 200 mL 的 30% 乙醇分别以 0.5, 1.0, 2.0, 3.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  流速动态解吸, 洗脱液水浴蒸干, 以蒸馏水溶解定容至 250 mL, 按苯酚-硫酸法测定, 计算含量及解吸率。图 3-E 结果显示, 洗脱液流速在  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  以下时,

解吸效果较好。

### 2.5.7 AB-8 大孔吸附树脂纯化工艺的验证试验

取预处理的 AB-8 大孔树脂 25 g 湿法装柱 ( $2 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ )。取 250 mL 多糖样品溶液, 以  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  流速循环上样 2 次, 动态吸附后再静态吸附 6~8 h。后以 30% 乙醇  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  进行洗脱, 洗脱液用量 600 mL, 收集洗脱液并浓缩蒸干, 残渣以蒸馏水溶解定容至 250 mL, 按苯酚-硫酸法测定, 计算含量, 结果见表 2。AB-8 大孔树脂纯化后, 所得样品中多糖含量由 62.37% 提高到 78.97%, 纯度提高了 1.27 倍, 回收率为 69.30%。纯化后的红芪多糖为类白色, 质地细腻。

表2 AB-8大孔树脂纯化红芪多糖的验证试验

Table 2. Validation experiment of purification of *Hedysarum* Polysaccharide by AB-8 macroporous resin

实验号	原液提取物中 多糖含量 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	纯化后溶液中 多糖含量 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率 (%)	原液提取浸膏中 多糖含量 (%)	纯化后浸膏中 多糖含量 (%)	纯化率 (倍)
1	1.5	1.023	68.20	62.37	79.51	1.27
2	1.5	1.083	72.20	62.37	80.59	1.31
3	1.5	1.014	67.60	62.37	76.81	1.23
平均值			69.30		78.97	1.27

## 2.6 纯化处理前后多糖样品的光谱比较分析

### 2.6.1 紫外光谱分析

将纯化前后的多糖溶液均稀释 10 倍, 用紫外分光光度计于 200~800 nm 进行光谱扫描。结果见图 4。以 Sevag 法脱蛋白, 并经 AB-8 大孔树脂纯化处理后的多糖样品水溶液在 280 nm 波长处没有吸收峰, 核酸和蛋白被清除, 可见纯化效果较明显。

### 2.6.2 傅里叶红外光谱分析

取纯化前后的 HPS 样品粉末 1.50 mg, 与 200 mg 色谱纯溴化钾充分混合, 用玛瑙研钵研磨。以红外分光光度计在  $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$  区扫描, 共扫描 64 次, 分辨率  $2 \text{ cm}^{-1}$ 。以纯溴化钾的红外光谱图作为背景。红外结果见图 5。多糖的特征吸收峰  $3392.1 \text{ cm}^{-1}$  附近的宽吸收峰是由 -OH 的伸缩振动引起的;  $2923.4 \text{ cm}^{-1}$  和  $1427.6 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是由 C-H 键伸缩振动引起的;  $1664.4 \text{ cm}^{-1}$  左右的吸收峰是由羧基的 C=O 对称伸缩振动所引起的;  $1054.1 \text{ cm}^{-1}$  左右的强吸收峰是糖苷键 C-O-C 的非对称振动峰, 为吡喃糖的特征吸收峰;

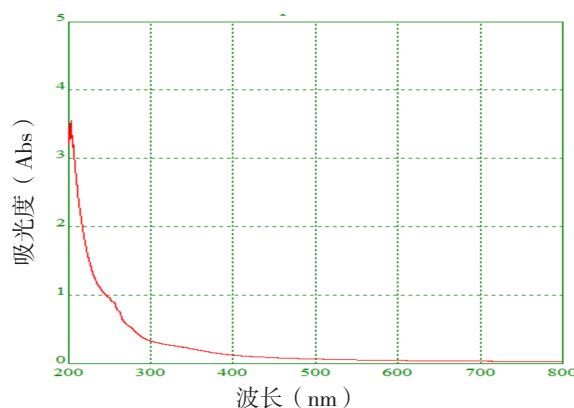


图4 纯化后红芪多糖紫外光谱

Figure 4. UV spectrum of purified *Radix Hedysari* polysaccharide

通过对比脱蛋白前后 HPS 的红外光谱, 可知经大孔树脂脱蛋白后,  $15483 \text{ cm}^{-1}$  宽吸收峰 (蛋白质分子中 N-H 变角振动) 消失, 证明蛋白质被成功清除。同时, 因消除了蛋白质对多糖特征吸收峰强度的干扰,  $3392.1 \text{ cm}^{-1}$  和  $1664.4 \text{ cm}^{-1}$  两处的吸收峰强度有所加强, 并且纯化后多糖结构特征的指纹区吸收峰表现的更加显著<sup>[18]</sup>。



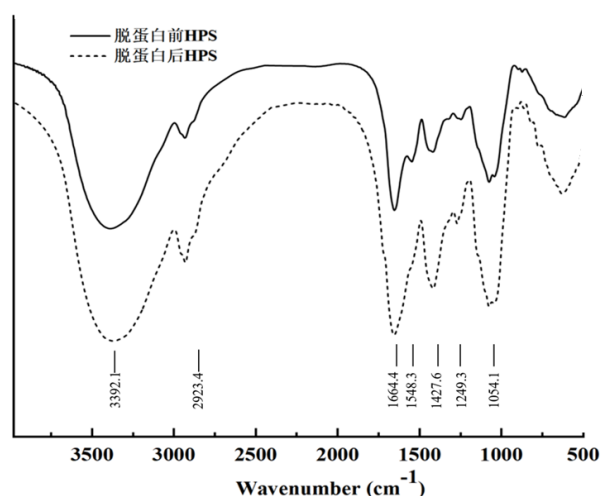


图5 脱蛋白前、后HPS的IR光谱  
Figure 5. IR spectra of HPS before and after deproteinization

### 3 讨论

中药标准提取物是在体现中医临床用药整体观、系统论和辨证论治的优势和特色基础上提出的，在疾病预防及保健品开发方面有广阔的应用前景<sup>[19]</sup>。本研究以HPS标准提取物为目标，根据多糖的理化性质，采用脱蛋白、大孔树脂等技术方法对红芪多糖进行纯化富集，对关键参数进行筛选确定，所得样品多糖含量由原来62.37%提高到78.97%，纯度提高了1.27倍；并对多糖样品进行了光谱比较。结果显示，经纯化处理后的多糖UV光谱在280 nm波长处没有蛋白质吸收峰；且纯化后样品的IR光谱表现出更为突出的多糖结构特征吸收峰。结果表明，优选出的HPS脱蛋白和大孔树脂纯化工艺稳定可行，重复性较好，使多糖得到较好的富集，为HPS标准提取物的形成以及其能成为制剂科学化原料药提供了研究基础。

#### 参考文献

- 1 贾妙婷, 李成义, 孙天雄, 等. 红芪多糖药理作用研究新进展[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 235-239. [Jia MT, Li CY, Sun TX, et al. Recent progress in the study on pharmacological action of hedysarum polysaccharide[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2020, 36(6): 235-239.] DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.20200924.004.
- 2 何流, 金智生, 张磊, 等. 红芪多糖防治糖尿病及

- 其并发症的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, (9): 1164-1168. [He L, Jin ZS, Zhang L, et al. Research progress in prevention and treatment of diabetes mellitus and its complications with hedysarum polybotrys polysacchcaide[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2020, (9): 1164-1168.] DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.09.032.
- 3 史生辉, 董得喜, 李生有, 等. 红芪多糖与黄芪多糖对大鼠抗衰老作用的比较研究[J]. 中国现代应用学, 2019, 36(16): 2024-2028. [Shi SH, Dong DX, Li SY, et al. Comparative study on anti-aging effect between hedysari radix polysaccharides and astragali radix polysaccharides in rats[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2019, 36(16): 2024-2028.] DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.16.008.
- 4 Zeng X, Li P, Chen X, et al. Effects of deproteinization methods on primary structure and antioxidant activity of Ganoderma lucidum polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126: 867-876. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.222.
- 5 高美凤, 俞婷婷. 黄芪多糖中脱蛋白方法的研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 614-615. [Gao MF, Yu TT. Study methods for removing protein from the astragalus polysaccharides extract[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2008, 26(3): 614-615.] DOI: 10.3969/j.issn.1673-7717.2008.03.067.
- 6 赵海运, 王庆奎, 邢克智, 等. 黄芪多糖除蛋白质方法与条件优化[J]. 天津农学院学报, 2009, 16(4): 5-8. [Zhao HY, Wang QK, Xing KZ, et al. Protein removing method and condition optimization of polysaccharide extraction from astragalus[J]. Journal of Tianjin Agricultural College, 2009, 16(4): 5-8.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-5394.2009.04.002.
- 7 周尚儒, 郭玫, 王君梅, 等. 红芪多糖的制备、结构表征及对1,1-二苯基-2-苦基苯肼自由基清除能力的影响[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(4): 1-6. [Zhou SR, Guo M, Wang JM, et al. Preparation and structural characteristics of Hedysari radix polysaccharides and its effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging ability[J]. Journal of Gansu University of Chinese Medicine, 2021, 38(4): 1-6.] DOI: 10.16841/j.issn1003-8450.2021.04.01.
- 8 李知敏, 王伯初, 周菁. 植物多糖提取液的几种脱蛋

- 白方法的比较分析[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2004, 27(8): 57-59. [Li ZM, Wang BC, Zhou J. Comparison of three methods of removing protein from polysaccharide extract in the plant[J]. Journal of Chongqing University (Natural Science Edition), 2004, 27(8): 57-59.] DOI: 10.3969/j.issn.1000-582X.2004.08.014.
- 9 文静熊, 陈翔, 汤俊, 等. 川紫菀多糖脱色工艺研究[J]. 中国药师, 2022, 25(3): 395-400. [Wen JX, Chen X, Tang J, et al. Optimization of decolorizing conditions for ligularia hodgsonii polysaccharides[J]. China Pharmacist, 2022, 25(3): 395-400.] DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.03.002.
  - 10 周鸿立, 杨晓虹. 玉米须多糖中蛋白质脱除的 Sevag 与酶法联用工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 129-132. [Zhou HL, Yang XH. Removal of proteins from corn silk polysaccharide by a combined enzymatic-Sevag method[J]. Food Science, 2011, 32(8): 129-132.] DOI: CNKI:SUN:SPKX.0.2011-08-029.
  - 11 孙晓雪, 孙卫东, 史德芳, 等. 仙人掌多糖提取过程中脱蛋白方法的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 117-119, 122. [Sun XX, Sun WD, Shi DF, et al. Protein removal from polysaccharide extract of cactus[J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19(1): 117-119, 122.] DOI: 10.16333/j.1001-6880.2007.01.030.
  - 12 苗慧琴, 霍秀文, 王阳, 等. 山药多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品科技, 2014, 39(1): 210-214. [Miao HQ, Huo XW, Wang Y, et al. Deproteinization from Chinese yam polysaccharide[J]. Food Science and Technology, 2014, 39(1): 210-214.] DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2014.01.044.
  - 13 蔡小辉, 叶财发, 刘晓玲, 等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 响应面法优选镰形棘豆总多糖纯化工艺[J]. 中国药师, 2020, 23(8): 1631-1636. [Cai XH, Ye CF, Liu XL, et al. Purification process optimization of total polysaccharides from oxytropis falcata bunge based on plackett-burman design combined with box-behnken response surface methodology[J]. China Pharmacist, 2020, 23(8): 1631-1636.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2020.08.039.
  - 14 邵晶, 郭玫, 任远, 等. 大孔树脂富集纯化牛蒡子中木脂素的工艺研究[J]. 中药材, 2016, 39(10): 2306-2309. [Shao J, Guo M, Ren Y, et al. Study on the enrichment and purification of lignans from Fructus Arctii by macroporous resin[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(10): 2306-2309.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.10.037.
  - 15 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. [Ren HW, Chen HX, Tang XH, et al. Purification of polysaccharide from Coix lacryma-jobi L. by macroporous adsorption resin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(3): 249-254.] DOI: CNKI:SUN:SPKJ.0.2012-03-060.
  - 16 聂倩, 张直峰, 吕建平, 等. 大孔吸附树脂分离纯化小蓟多糖的工艺研究[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(19): 4661-4665. [Nie Q, Zhang ZF, Lyu JP, et al. Isolation and purification of polysaccharide from cirsium setosum by macroporous resin[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(19): 4661-4665.] DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2014.19.041.
  - 17 杨波, 韩凤波. AB-8 和 D-101 大孔吸附树脂分离纯化玉竹多糖[J]. 食品研究与开发, 2014, (23): 67-70. [Yang B, Han FB. Isolation & purification of polysaccharide from polygonatum odoratum by AB-8 and D-101 macroporous adsorption resins[J]. Food Research and Development, 2014, (23): 67-70.] DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2014.23.018.
  - 18 Xu Y, Guo Y, Duan S, et al. Effects of ultrasound irradiation on the characterization and bioactivities of the polysaccharide from blackcurrant fruits[J]. Ultrason Sonochem, 2018, 49: 206-214. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2018.08.005.
  - 19 王超楠, 高军, 王隶书, 等. 中药党参药效活性成分的质量控制研究进展[J]. 中国药师, 2021, 24(1): 127-132. [Wang CN, Gao J, Wang LS, et al. Research Progress in quality control of active components in codonopsis pilosula[J]. China Pharmacist, 2021, 24(1): 127-132.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2021.01.027.

收稿日期: 2022 年 11 月 01 日 修回日期: 2023 年 02 月 26 日  
 本文编辑: 周璐敏 钟巧妮