

文章编号:1000-582X(2006)04-0069-04

## 超滤法分离浮萍多糖的工艺\*

周菁,王伯初,王阳,李知敏

(重庆大学生物工程学院 教育部生物力学及组织工程重点实验室,重庆 400030)

**摘要:**探索超滤法分离浮萍中免疫活性成分浮萍多糖的工艺.通过煎煮、超滤、脱蛋白、乙醇沉淀等步骤对浮萍多糖进行提取分离,硫酸-苯酚法和硫酸-萘酚法测定提取液和样品中的总糖含量,考马斯亮蓝 G250 比色法测定其蛋白质含量.得到浅褐色粉末,纯度 53.5%,蛋白质含量 1.2%,收率 6.43%.该方法可以简单、快速、有效地对浮萍多糖进行分离.

**关键词:**浮萍;多糖;分离;超滤

**中图分类号:**Q539

**文献标识码:**A

浮萍 (*Herba Spirodela seu Lemnae*) 为浮萍科植物紫背浮萍或青萍的全草,在我国各地分布广泛、资源丰富.化学成分研究表明,浮萍含有多种黄酮类化合物及多糖、蛋白质、粘液质、类脂、鞣质、树脂等物质.浮萍多糖是其中重要的生物活性物质,据报道,浮萍多糖具有增强单核-巨噬细胞系统吞噬功能的免疫调节活性<sup>[1]</sup>.经初步药效学试验,笔者发现浮萍多糖能明显改善环磷酰胺致免疫力低下 KM 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的功能,并显著提高健康 KM 小鼠的碳粒廓清能力.

浮萍多糖糖链的主要成分包括 D-半乳糖醛酸(64%)、D-芹菜糖(25%)、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖和吡喃木糖<sup>[2]</sup>,其结构尚未完全探明,浮萍多糖的分离、纯化方法也未成型.传统的植物多糖分离方法周期长、成本高、操作复杂.超滤是 20 世纪 60 年代新兴的一项膜分离技术,在中药产业中具有其独特的作用和较大的开发潜力.笔者以应用超滤系统为主分离浮萍多糖并辅以脱蛋白、乙醇沉淀等方法以建立一种稳定、快速的浮萍多糖提取分离工艺.

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料和主要仪器

浮萍,购自太极集团沙坪大药房,重庆大渡口中药材公司中药饮片厂,产地四川.电子分析天平,上海恒

平科学仪器有限公司;756MC 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;UEOS503 型中空纤维膜组件,天津膜天膜工程技术有限公司;Sorvall RC-28S 型超速冷冻离心机,美国 OU PONT 公司;BT01-100/YZ1515 型蠕动泵,兰格恒流泵有限公司;Flexi-Dry™ MP 冷冻干燥机,美国 FTS SYSTEMS 公司.

#### 1.2 分析方法

总糖测定,采用硫酸-苯酚法<sup>[3-4]</sup>和硫酸-萘酚法<sup>[4]</sup>;蛋白质测定,采用考马斯亮蓝 G250 比色法<sup>[5-7]</sup>.

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 浮萍多糖粗提液的制备

取 300 g 浮萍全草,粉碎,按 1:20 料液比加水,以 10% NaOH 溶液调 pH9,煎煮约 6 h,12 层脱脂纱布过滤,滤液静置过夜后 8 000 r/min 离心 10 min 取上清,即得浮萍多糖粗提液.

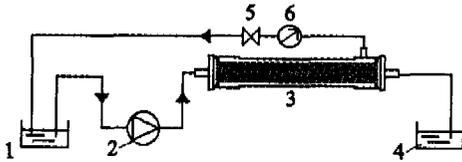
##### 1.3.2 超滤及其预处理

粗提液在超滤前需预处理进一步去除杂质以降低膜的污染.实验采用 0.45 μm 膜微滤除去粗提液中的固形物<sup>[8-9]</sup>.将经过预处理的提取液在 Φ50 mm × 386 mm、截留分子量 6 000、膜面积 1.5 m<sup>2</sup> 的外压型 PS 膜上以 ≤0.1 MPa 的压力,平均流速 1 000 mL/h 进行

\* 收稿日期:2005-12-01

作者简介:周菁(1978-),女,重庆人,重庆大学博士研究生,主要从事天然药物化学方向研究.

超滤,并适当补充去离子水以降低提取液的浓度.反复进行后得到少量浓缩液和大量超滤液.超滤系统由蠕动泵、超滤器、压力表、调压阀及相应管路等组成,装置的工作流程见图1.



1. 试样; 2. 蠕动泵; 3. 超滤器; 4. 超滤液;  
5. 调压阀; 6. 隔膜压力表

图1 超滤装置工作流程

### 1.3.3 三氯乙酸脱蛋白

将提取液预冷,滴加10%三氯乙酸溶液至pH值为2~3,5~10℃冷藏过夜,8000 r/min离心10 min去沉淀,在上清液中滴加10% NaOH溶液调pH中性.

### 1.3.4 乙醇沉淀

将提取液加入4倍体积无水乙醇中,-20℃冷藏24 h后8000 r/min离心10 min收集沉淀.重复乙醇沉淀操作4~6次后将沉淀溶于水,冷冻干燥得浅褐色粉末.

## 2 结果

### 2.1 浮萍多糖提取分离的实验结果

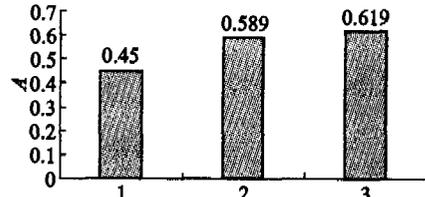
实验通过煎煮提取、超滤、三氯乙酸脱蛋白、乙醇沉淀等步骤分离浮萍多糖,得到纯度即总糖含量为53.5%的多糖提取物.浮萍多糖提取物样品溶液与硫酸-苯酚试剂和硫酸-蒽酮试剂反应呈阳性,与碘反应呈阴性,无紫外吸收.浮萍多糖的提纯步骤及结果见表1.

表1 浮萍多糖的提纯步骤及结果

提纯步骤	总体积 /mL	浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	总糖质量 /mg	收率 /%	蛋白质 含量/%	样品 纯度/%
煎煮提取	1450	2.584	3746.800	100	-	-
超滤	152	14.081	2140.312	57.12	-	-
三氯乙酸脱蛋白	141	8.218	1158.738	30.93	-	-
乙醇沉淀	30	8.031	240.919	6.43	1.2	53.5

### 2.2 乙醇沉淀次数对提取物纯度的影响

实验通过增加乙醇沉淀的次数来观察其对提取物纯度的影响,发现超滤后乙醇沉淀6次可得到纯度较满意的多糖,并且随着醇沉次数的增加,提取物的颜色逐渐由深褐色变为浅褐色.图2显示了硫酸-苯酚法检测分别经1、4、6次醇沉处理的提取物样品的吸光度变化.



1. 乙醇沉淀1次; 2. 乙醇沉淀4次; 3. 乙醇沉淀6次

图2 乙醇沉淀次数对样品吸光度值(A)的影响

## 3 讨论

### 3.1 影响超滤效率的因素

在多糖化学研究中能否分离出均一的多糖非常重要,可是采用水提醇沉的粗制多糖的水溶液大多是胶体溶液,粘度大且其所含组分的分子量差别悬殊.尽管采用溶剂分步沉淀法、季胺盐沉淀法、盐析法和电泳法等可以制备出较均一的多糖,但这些方法的分离量甚少,且不宜进行动态连续处理,有时还会引起多糖的降解;纤维素柱层析法、纤维素阴离子交换柱层析、凝胶柱层析法等可以较好地实现多糖的纯化,但粗多糖样品溶液多含有大量的蛋白质、色素等杂质,严重影响柱材料的再生和使用寿命.超滤技术<sup>[10]</sup>是利用物理筛分的原理,以多孔半透膜(超滤膜)为介质,以错流方式进行过滤,利用膜孔选择性的筛分作用对物质进行截留,使溶剂与低分子物质通过,高分子物质不能通过,从而达到分离纯化和浓缩的目的.中空纤维超滤膜组件具有装填密度大、结构简单、操作方便等特点,分离过程为常温操作,无相态变化,节省能源,并且不产生二次污染.

浮萍多糖粗提液浓度低、体积大,对其进行纯化前常需将粗提液浓缩到适当体积.常规的浓缩方法如减压蒸馏法需在加热条件下进行,应用超滤法则可以在纯化的同时、在室温下对提取液快速大量地浓缩,收率较高且对多糖的结构没有破坏.

粗提液中含有大量的鞣质、蛋白质、树脂等非药用大分子物质,而柱内膜孔很小,不溶性的大分子常堵塞膜孔,形成凝胶层,影响超滤过程.因此在超滤前必须对提取液进行预处理以进一步除掉杂质.常用的预处理方法有离心沉淀法和微滤法,通过比较发现微滤法较离心沉淀法除杂更为彻底,并且多糖的损失较少,处理过程可连续化.文中采用0.45 μm膜微滤进行超滤的预处理.

提取液的浓度对超滤的效率和收率均有影响.超滤进行一段时间后溶液浓度升高,膜内外压力也逐渐升高.可通过调节调压阀使压力保持在较稳定的范围

内,并向溶液中添加去离子水降低提取液浓度使分离纯化的效果更好.超滤过程中的反洗可以缓解膜孔的堵塞并对堆积的多糖大量回收.

温度对PS膜超滤通量和截留率也有一定的影响.同样条件下,提取液温度高时的通量大于温度低时的通量,因为在一定范围内,温度升高使提取液粘度下降,扩散系数和传质系数增大,溶质的溶解度增大,与水的亲合力也增大,相应会减少“浓差极化”,故通量在高温时较大;温度提高导致了截留率的降低,这可能是因为温度升高导致了截留膜性能和溶液理化性质的改变.综合考虑温度对溶液性质和膜性能的影响及预期截留率、工业生产成本等因素,选择室温(约20℃)作为超滤温度.

### 3.2 引入超滤技术对醇沉步骤的影响

乙醇沉淀多糖的主要原理是通过降低水溶液的介电常数使多糖脱水而产生沉淀来分离多糖,几乎适用于所有水溶性多糖.通常的处理方法是使溶液中的含醇量>80%,冷藏静置后离心分离.随着溶解—沉淀次数的增多,提取物样品总糖含量逐渐上升,提取物颜色逐渐变浅,提示乙醇沉淀可以起到一定的脱色作用.

实验曾采用煎煮提取、脱蛋白、醇沉的步骤而不进行超滤,则进行1至4次乙醇沉淀处理后提取物样品的纯度分别为18.6%,19.0%,21.2%,和21.7%,明显低于现工艺53.5%的纯度,可能原因是原工艺考虑到小分子量残留物质的去除,致使样品纯度难以进一步提高.而且可以发现原工艺中,1次醇沉和4次醇沉对提取物纯度的影响并不大.引入了超滤技术后,增加乙醇沉淀次数则明显增大了硫酸—苯酚法检测到的样品吸光度,提示超滤除杂和浓缩对传统乙醇沉淀工艺的效率有促进作用.

### 3.3 脱蛋白方法的比较

实验曾尝试采用Sevag法、三氯乙酸法、恒温水浴法、冻融法除蛋白<sup>[11-13]</sup>.实验结果显示Sevag法处理浮萍多糖提取液5次可以除去42.3%的蛋白质,多糖损失率仅为14.3%.恒温水浴法和冻融法均不会引起多糖的降解,但仅能除去40%左右的蛋白质.三氯乙酸法较剧烈,反应条件控制较严,多糖损失率高达45.8%,但可以除去87.5%的蛋白质.综合对蛋白质含量和提取物纯度的要求,笔者选用了三氯乙酸法作为脱蛋白的方法.考虑到三氯乙酸可降解部分多糖,将脱蛋白该操作放在超滤之后与放在超滤之前相比较可更好地减少多糖的流失.

## 4 结论

文中通过煎煮、超滤、脱蛋白、乙醇沉淀等步骤对浮萍多糖进行提取分离,特点是采用超滤法分离浮萍中的免疫活性成分浮萍多糖,操作简单,工艺稳定,生产周期短,产品纯度较高,适合工业化生产,对多糖类免疫调节剂的开发和产业化生产有较好的推广价值.以0.45 μm膜微滤作为超滤的预处理,超滤膜截留分子量6000,工作压力≤0.1 MPa,平均流速1000 mL/h,温度为室温.脱蛋白采用三氯乙酸法,乙醇沉淀次数为6次.浮萍多糖样品呈浅褐色,纯度53.5%,蛋白质含量1.2%,收率6.43%.实验结果显示超滤法可以简单、快速、有效地对浮萍多糖进行分离.

### 参考文献:

- [1] OVODOVA R G, GOLOVECHENKO V V, SHASHKOV A S, et al. Structure and Physiological Activity of Lemnan, Lemna Minor L. Pectin [J]. Bioorg Khim, October 1, 2000, 26(10): 743-751.
- [2] POPOV S V, POPOVA G Y, OVODOVA R G, et al. Modulation of Phagocytic Function by Plant Polysaccharides [J]. J Chemotherapy, 2000, 12(6): 147.
- [3] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [4] 吴平. 食品分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1983.
- [5] 郭敏亮, 姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 558-561.
- [6] 王多宁, 赵雁武, 田芙蓉. 考马斯亮蓝微盘比色法测定蛋白质含量[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(6): 528-530.
- [7] 曹稳根, 焦庆才, 刘茜, 等. 考马斯亮蓝显色剂变色反应机理的研究[J]. 化学学报, 2002, 60: 1656-1661.
- [8] 王厚廷, 乔善义, 杨明, 等. 超滤法提取六味地黄汤活性多糖的工艺研究[J]. 解放军药学学报, 17(20): 69-71.
- [9] 郑宗坤, 许贤华, 陈志行, 等. 超滤提取香菇多糖的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(2): 73-75.
- [10] 李津, 俞泳霞, 董德祥, 等. 生物制药设备和分离纯化技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [11] 吴寿金, 赵泰, 秦永琪. 现代中草药成分化学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- [12] 谭仁祥. 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 刘莉, 王志鹏, 梅其炳, 等. 大黄多糖提取工艺对糖含量和糖醛酸含量的影响[J]. 中国药学杂志, 2003, 10: 748-749.

## Technologic Study on the Isolation of Polysaccharides from *Herba Spirodela* seu *Lemnae* by Ultrafiltration

ZHOU Jing, WANG Bo-chu, WANG Yang, LI Zhi-min

(Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering Under the State Ministry of Education,  
College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** The aim of the paper is to investigate the technics of isolating the immune-active polysaccharides from *Herba Spirodela* seu *Lemnae* (PHS) by ultrafiltration. PHS were extracted and isolated through decoction, ultrafiltration, removal of protein and ethanol precipitation et al. The total contents of saccharides in the extraction and sample were determined by the methods of sulphuric acid phenol and sulphuric acid anthrone. The protein contents were determined by colorimetric method of coomassie brilliant blue G 250. Some hazel powder was gained. The purity, the contents of protein, and the recovery are 53.5%, 1.2%, and 6.43%, respectively. Ultrafiltration is a kind of method, which can isolate PHS simply, quickly and effectively.

**Key words:** *Herba Spirodela* seu *Lemnae*; polysaccharides; isolate; ultrafiltration

(编辑 陈移峰)

(上接第 64 页)

## Realization of Flash Stimulation with PWM in the Extraction of Visual Evoked Potential

WU Xi<sup>1</sup>, JI Zhong<sup>2</sup>, QIN Yi<sup>2</sup>, CAI Shao-xi<sup>1</sup>

(1. College of Biomedical Engineering;

2. Test Center, College of Mechanical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** Evoked EEG signal can be obtained by flash stimulation in the extraction of flash visual evoked potential (FVEP). Experiments show that the width, frequency and flash times of flash pulses will play key role for extracting FVEP. Aims at the feature of VEP extraction and its correlation factors, the flash stimulation method with pulse width modulation (PWM) technology has been discussed, and the realization methods based on hardware and software are studied, then the output of precise PWM with special integrated circuit is realized. So the parameters of flash stimulation can be adjusted based on the material conditions of FVEP extraction, then VEP can be extracted effectively. Experiments show that it is of better effectiveness for FVEP extraction by using the method based on the output of precise PWM to control the flashing stimulation.

**Key words:** visual evoked potential; flash stimulation; pulse width modulation

(编辑 李胜春)