

当归多糖磁性超滤膜分级分离

谢慧明, 朱莹莹*, 张仕发, 伍志刚

(合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要: 基膜为 80000 的聚砜超滤膜经原位生成法制备得磁性超滤膜。在压力为 0.2MPa 条件下改变磁场强度, 其截留相对分子质量可调控范围为 31000~73000。利用此膜对纯度为 97.5% 的当归多糖进行连续分级分离, 在不同磁场强度下得到 3 个样品(A、B 和 C)。高效凝胶色谱法测定样品 A、B 以及 C 的重均相对分子质量分别为 86317、19989、62461, 样品 A 中相对分子质量为 70000~100000 的当归多糖占 70% 左右; 样品 B 中相对分子质量为 10000~30000 的当归多糖占 95% 左右; 样品 C 中相对分子质量为 50000~70000 的当归多糖占 80% 左右。

关键词: 当归多糖; 磁性超滤膜; 高效凝胶液相色谱; 连续分离

Use of a Magnetic Ultrafiltration Membrane for the Separation of *Angelica sinensis* Root Polysaccharides

XIE Hui-ming, ZHU Ying-ying*, ZHANG Shi-fa, WU Zhi-gang

(Engineering Research Center of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: A magnetic ultrafiltration membrane whose molecular weight cut-off (MWCO) can be between 31000 and 73000 under 0.2 MPa pressure and varying magnetic field intensity was prepared by *in situ* synthesis on the basis of a polysulfone ultrafiltration membrane with a MWCO of 80000 and used sequentially separate *Angelica sinensis* root polysaccharides with a purity of 97.5%. As a result, three fractions were obtained under various magnetic field intensities and named as A, B and C, respectively. Their respective weight average molecular weights (M_w) were determined by high performance gel permeation chromatography (HPGPC) to be 86317, 19989 and 62461. Polysaccharides with a relative molecular weight ranging from 70000 to 100000 was 70% in fraction A. Roughly 95% of fraction B consisted of polysaccharides with a relative molecular weight between 10000 and 30000. Fraction C contained approximately 80% of polysaccharides whose molecular weight was in the range of 50000—70000.

Key words: polysaccharides from the root of *Angelica sinensis*; magnetic ultrafiltration membrane; high performance gel permeation chromatography (HPGPC); continuous separation

中图分类号: TQ315

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)14-0011-05

当归多糖具有很强的生物活性, 现代药理学研究证明当归多糖可以提高免疫力^[1]、去除自由基^[2]、激活补体活性等功效^[3]、还具有镇痛^[4]、保护胃肠黏膜^[5]的作用, 另外对抗肿瘤^[6]、抗辐射损伤^[7]也均呈现较好疗效。当归多糖的相对分子质量分布广泛, 其生物活性与其相对分子质量范围密切相关的, 多糖相对分子质量太大或太小均会影响其活性, 其中抗补体活性高, 免疫活性强的当归多糖其相对分子质量多在 10000~30000 之间^[8-10], 能保护细胞, 促进细胞增殖反应的当归多糖其相对分子质量多在 50000~70000 之间^[11-12], 而具有抑

制肿瘤作用的当归多糖相对分子质量一般在 70000 以上^[13-14]。目前按相对分子质量分离当归多糖的方法主要有超滤法和凝胶柱层析法, 其中超滤法^[15-16]采用的均是截留相对分子质量不变的膜, 不能实现当归多糖的连续分级分离。本实验拟采用实验室自制的磁性超滤膜, 通过改变磁场强度, 实现相对分子质量在 10000~100000 之间的当归多糖的连续分级分离。根据不同相对分子质量多糖具有不同的侧重功效, 目标多糖分为 3 段不同相对分子质量范围: 10000~30000、50000~70000、70000~100000。

收稿日期: 2010-07-26

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA100404)

作者简介: 谢慧明(1955—), 女, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工及贮藏。E-mail: xiehuiming-6@163.com

* 通信作者: 朱莹莹(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及蛋白质工程加工。

E-mail: zhuyingying0914@gmail.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

当归产于甘肃岷县；葡萄糖(AR) 国药集团化学试剂有限公司；苯酚(重蒸馏；AR)、无水乙醇(AR) 上海中试化工总公司；聚砜超滤膜 安得膜分离技术工程有限公司；右旋糖酐对照品(M_w 分别为 200000、133800、84400、41100、21400、7100、4600) 中国药品生物制品鉴定所； $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (AR) 天津太茂化学试剂厂；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

分析天平 美国西特公司；多功能膜分离设备 自制；UV-1600 紫外分光光度计 北京奥生源科技有限责任公司；1100 型高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司；Shodex OHPak SB-804HQ 凝胶色谱柱 上海安谱科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 当归多糖的制备

提取工艺：①当归粉碎，3 倍量(mL/g)乙醇浸泡 24h，收集滤渣，烘干备用；②水法浸提当归多糖工艺条件：料液比 1:10(g/mL)，浸提温度 90°C ，浸提时间 3h，浸提 2 次；③过滤，离心，收集滤液减压浓缩，浓缩液经无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤，得当归多糖粗提物备用。

超滤纯化：当归多糖粗提物溶于水中配成溶液，选择截留相对分子质量为 10000 的聚砜超滤膜对其进行超滤分离，得到的截留液再用截留相对分子质量为 100000 的聚砜超滤膜进行超滤分离，收集透过液，得到相对分子质量在 10000~100000 当归多糖溶液，冻干备用。

1.3.2 磁性超滤膜的制备与检测

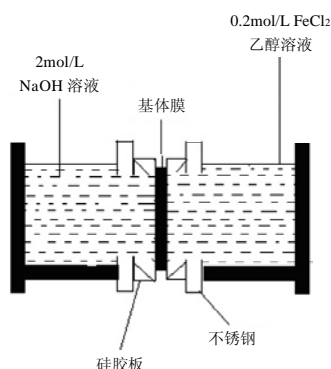


图1 Fe_3O_4 -PSF 磁性复合超滤膜制备示意图

Fig.1 Schematic diagram of the device for the preparation of Fe_3O_4 -PSF magnetic ultrafiltration membrane

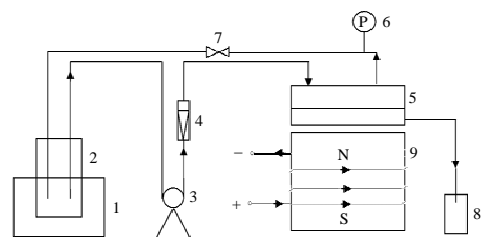
原位生成法制备磁性复合膜^[17]：分别选用截留相对分子质量为 70000、80000、90000 的聚砜超滤膜作为磁性超滤膜的基体膜，无水乙醇浸泡基体膜 10min 后，将

其置于超滤膜制备反应器中，如图 1 所示。反应器两侧加入的溶液分别为 2mol/L NaOH 溶液和 0.2mol/L FeCl_2 乙醇溶液，反应 45min 后将复合膜取出，洗涤、晾干，分别记为膜 1、2、3，保存备用。

截留相对分子质量的检测：采用葡聚糖检测其截留相对分子质量。由于压力过小，自制的磁性超滤膜通量小，过滤的速度比较慢；而压力过大，自制的磁性超滤膜会存在破裂现象，因此选择工作压力 0.2MPa。实验装置示意图见图 2，分别将不同相对分子质量的葡聚糖加入料液瓶中，在磁场强度 0T、压力 0.2MPa 条件下，待流量稳定后收集一定量的截留液和透过液，紫外分光光度计检测其浓度，计算截留率 R ，规定 $R \geq 90\%$ 的截留基准物相对分子质量为膜的截留相对分子质量。

$$R/\% = (1 - C_{\text{透}}/C_{\text{原}}) \times 100$$

式中： R 为截留率/%； $C_{\text{透}}$ 为透过液浓度/(mol/L)； $C_{\text{原}}$ 为原料液浓度/(mol/L)。



1. 恒温槽；2. 料液瓶；3. 进料泵；4. 流量计；5. 板式换热器；6. 压力表；7. 节流阀；8. 收集瓶；9. 通电磁铁。

图2 磁场超滤装置示意图

Fig.2 Schematic diagram of magnetic ultrafiltration device

1.3.3 磁性超滤膜截留相对分子质量可调控范围的测定
在 0.2MPa 条件下，0.2~1.0T 间调节磁场强度，以葡聚糖为基准物，测出不同磁场强度下对不同相对分子质量葡聚糖的截留率，得出磁性超滤膜截留相对分子质量的可调控范围。

1.3.4 当归多糖分级分离

根据 3 张磁性超滤膜截留相对分子质量的调控范围，选取最合适分离目标当归多糖的膜，调节适宜的磁场强度，收集透过液或截留液，冻干称量，高效凝胶液相色谱分析其相对分子质量范围。

1.3.5 相对分子质量的测定

色谱条件：参照文献[18]的方法。色谱柱：Shodex OHPak SB-804HQ；流动相 0.71% 硫酸钠溶液(内含 0.02% 叠氮化钠)；柱温 35°C ；流速为 0.5mL/min；示差折光检测器。

对照品溶液：精确称取右旋糖酐对照品，流动相配成 3mg/mL 的溶液，用 $0.45\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤。

供试品溶液：精确称取超滤后冻干的当归多糖，

流动相配成 3mg/mL 的溶液, 用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤。

标准曲线的制备: 取重均分子质量为 200000、84400、41100、21400、10000、4600D 的右旋糖苷对照品溶液分别进样测定, 记录峰值保留时间, GPC 软件绘制标准曲线。

样品相对分子质量的测定: 取供试品溶液进样测定, 记录色谱图, 根据峰值保留时间, GPC 软件计算样品的重均相对分子质量和数均相对分子质量以及相对分子质量分布宽度。

2 结果与分析

2.1 当归多糖的制备结果

称取当归多糖粗提物 50g, 配成 10g/L 的溶液, 选择截留相对分子质量为 10000 的聚砜超滤膜进行超滤分离, 得到的截留液再用截留相对分子质量为 100000 的聚砜超滤膜进行超滤分离, 收集透过液, 得到相对分子质量在 10000~100000 当归多糖溶液, 冻干得当归多糖 10.22g, 苯酚-H₂SO₄ 法测得其纯度为 97.5%。

2.2 磁性超滤膜的检测结果

2.2.1 膜截留相对分子质量的测定结果

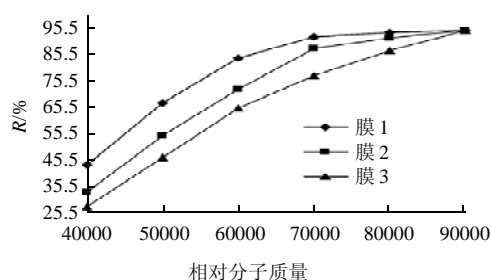


图3 无外加磁场下膜截留相对分子质量的测定

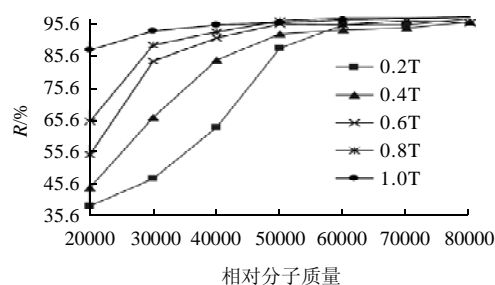
Fig.3 Determination of MWCO of the prepared magnetic composite membrane without additional magnetic field

由图3可知, 膜1、2、3截留率(R)为90%对应的基准物相对分子质量分别为65000、73000、83000。表明在超滤压力0.2MPa、无外加磁场的条件下, 用截留相对分子质量为70000、80000、90000的基体膜制备的磁性复合超滤的截留相对分子质量分别为65000、73000、83000。磁性膜的截留相对分子质量相对基膜减小, 是由于采用原位生成法制备磁性膜时, 生成的纳米Fe₃O₄粒子绝大多数沉积在膜孔道中, 致使膜孔变小, 膜截留相对分子质量降低。

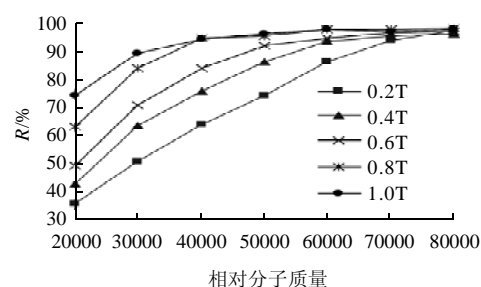
2.2.2 磁性超滤膜截留相对分子质量可调控范围的测定

由图4可知, 0.2MPa条件下, 在0.2~1.0T的范围内改变磁场强度, 磁性超滤膜1~3的截留相对分子质量调控范围分别为25000~51000、31000~63000、42000~

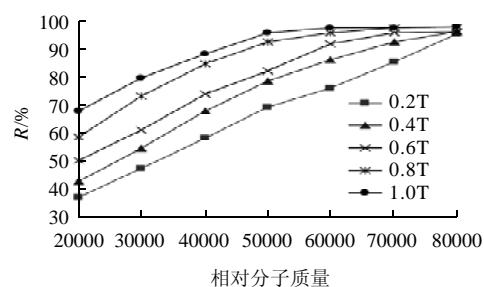
74000。其中不同磁场强度下, 膜的截留相对分子质量如表1所示。



A.磁性超滤膜1



B.磁性超滤膜2



C.磁性超滤膜3

图4 磁性超滤膜截留相对分子质量可调控范围的测定

Fig.4 Determination of MWCO range of the prepared magnetic composite membrane

表1 磁性超滤膜截留相对分子质量可调控范围的测定

Table 1 MWCO range of the prepared magnetic composite membrane under different magnetic field intensities

磁场强度/T	截留相对分子质量		
	膜1	膜2	膜3
0.0	65000	73000	83000
0.2	51000	63000	74000
0.4	47000	55000	65000
0.6	39000	49000	57000
0.8	33000	38000	48000
1.0	25000	31000	42000

根据上述测定结果以及目标多糖的3段不同相对分子质量范围: 10000~30000、50000~70000、70000~100000, 选用膜2进行以后实验较为适宜。

2.3 当归多糖分级分离结果

2.3.1 超滤分级分离

称取冻干后的当归多糖 10.0g, 配成 5g/L 的溶液, 加入到料液瓶中, 在 0T、0.2MPa 条件下收集截留液得样品 A; 再将透过液加入料液瓶中, 保持压力不变, 调节磁场强度至 1.0T 收集透过液得样品 B; 最后调节磁场强度至 0.6T 收集截留液得样品 C, 冻干得到样品 A 3.97g、样品 B 2.86g、样品 C 1.98g。

2.3.2 相对分子质量的测定

2.3.2.1 标准曲线的制作

以标准品的重均相对分子质量 M_w 的对数值为纵坐标, 保留时间 t_R 为横坐标, 用 GPC 软件得到标准回归曲线 $\lg(M_w)=7.319-0.253t_R$ ($r=-0.9931$)。

2.3.2.2 样品相对分子质量的测定

高效凝胶色谱法分别测定其重均相对分子质量、数均相对分子质量和相对分子质量分布如表 2 所示。相对分子质量累积分布曲线如图 5 所示。

表 2 样品的重均相对分子质量、数均相对分子质量和相对分子质量分布宽度测定结果

Table 2 M_w , M_n and M_w/M_n of fractions A, B and C

样品	M_w	M_n	M_w/M_n
A	86317	40375	2.14
B	19989	10359	1.93
C	62461	31267	2.00

注: M_w 为重均相对分子质量; M_n 为数均相对分子质量; M_w/M_n 为分布宽度。

样品 A 中, 重均相对分子质量为 86317, 数均相对分子质量为 40375, 相对分子质量分布宽度为 2.14, 相对分子质量在 70000~100000 的当归多糖占 70% 左右; 样品 B 中, 重均相对分子质量为 19989, 数均相对分子质量为 10359, 相对分子质量分布宽度为 1.93, 相对分子质量在 10000~30000 的当归多糖占 95% 左右; 样品 C 中, 重均相对分子质量为 62461, 数均相对分子质量为 31267, 相对分子质量分布宽度为 2.00, 相对分子质量在 50000~70000 的当归多糖占 80% 左右。

由此得出, 在压力 0.2MPa 条件下, 通过改变磁场强度, 实现了一张膜对不同相对分子质量当归多糖的连续分级分离。

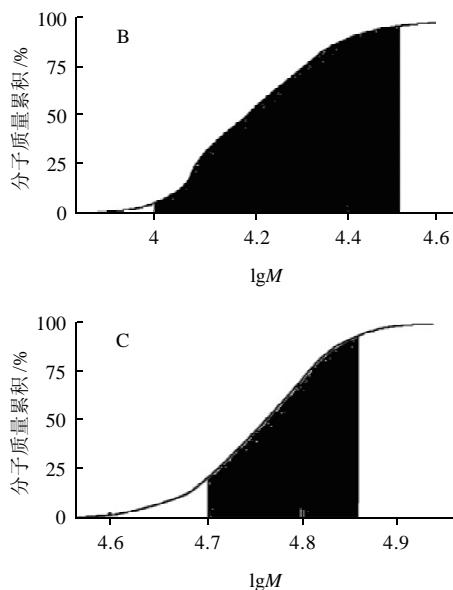
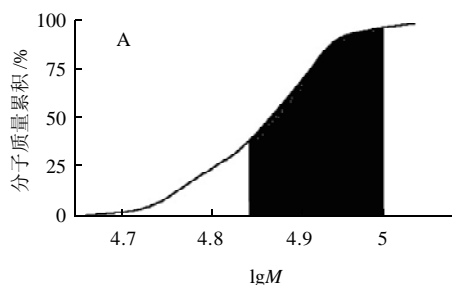


图 5 样品 A、B、C 相对分子质量累积分布曲线

Fig.5 Cumulative weight distribution curve of molecular weight for fractions A, B and C

3 结论

水法浸提得到的当归多糖粗提物, 经截留相对分子质量为 10000 和 100000 的聚砜超滤膜纯化后, 得纯度为 97.5% 的白色当归多糖。

采用原位生成法, 以截留相对分子质量为 80000 的聚砜超滤膜作为基膜制备得到磁性超滤膜。以葡聚糖为基准物, 测定此膜在 0.2MPa、0.0~1.0T 条件下的截留相对分子质量可调控范围为 31000~73000。

用此磁性超滤膜对纯化后当归多糖进行分级分离, 不同磁场强度下收集截留液或透过液, 冻干得到 3 个样品, 高效凝胶色谱对样品进行测定。其中 A 样品质量 3.97g、 M_w 为 86317、相对分子质量在 70000~100000 的当归多糖占 70% 左右; B 样品质量 2.86g、 M_w 为 19989、相对分子质量在 10000~30000 的当归多糖占 95% 左右; C 样品质量 1.98g、 M_w 为 62461、相对分子质量在 50000~70000 的当归多糖占 80% 左右。

参考文献:

- [1] 杨铁虹, 卢保华, 贾敏, 等. 当归多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2003, 31(4): 37-40.
- [2] YANG Xingbin, ZHAO Yan, ZHAO Youlv. In vivo macrophage activation and physicochemical property of the different polysaccharide fractions purified from *Angelica sinensis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(3): 372-379.
- [3] ZHANG Yongwen, KIYOHARA H, SAKURAI M H, et al. Complement activation galactan chains in a pectic arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa[J]. Carbohydrate Polymer, 1996, 31(3): 149-156.

- [4] 乐江, 彭仁, 孔锐, 等. 当归粗多糖镇痛作用的实验研究[J]. 中国药杂志, 2002, 37(10): 746-748.
- [5] HUI M K C, WU W K K, SHIN V Y, et al. Polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* protect bone marrow and gastrointestinal tissues against the cytotoxicity of cyclophosphamide in mice[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2006, 3(1): 1-6.
- [6] 商澎, 杨铁虹, 贾敏, 等. 当归多糖 AP-0 对小鼠移植性肿瘤的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(11): 1299-1302.
- [7] 洪艳, 刘君炎, 王红玲, 等. 当归多糖对放射损伤小鼠细胞免疫的调节作用[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2001, 21(4): 305-306.
- [8] 王晓娟, 魏传晚, 徐淑永, 等. 生物活性多糖结构与功效关系的研究进展[J]. 广州化工, 2004, 32(1): 6-10.
- [9] 洪艳, 刘君炎. 当归多糖对加60Co照射小鼠免疫功能影响的研究[J]. 华中医学杂志, 2000, 24(6): 291-292.
- [10] 单俊杰, 王易. 当归多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱导 IFN- γ 的影响[J]. 药学报, 2002, 37(7): 497-500.
- [11] 杨铁红, 贾敏, 梅其炳. 当归多糖组分促进淋巴细胞增殖及对 IL-2 和 IFN- γ 的诱导作用[J]. 中药材, 2008, 28(5): 405-407.
- [12] 杨铁红, 贾敏, 梅其炳, 等. 当归多糖组分 AP-3 对不同淋巴细胞亚群的作用[J]. 中国生化药杂志, 2005, 26(6): 344-346.
- [13] 曹蔚, 李小强, 侯颖, 等. 当归多糖 APS-2a 的结构分析及抗肿瘤作用研究[J]. 中药材, 2008, 31(2): 261-266.
- [14] 林玉露. 多糖的化学结构及构效关系研究[J]. 武汉教育学院学报, 2000, 19(6): 34-37.
- [15] 樊秦, 李应东, 赵文君, 等. 超滤膜纯化当归多糖的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(8): 54-55.
- [16] 刘新友, 周四元, 程建峰, 等. 超滤对当归多糖组分总糖含量和蛋白含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 2895-2897.
- [17] 潘见, 晋明会, 赵金龙, 等. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PSF}$ 磁性复合超滤膜的制备、表征及应用[J]. 膜科学与技术, 2009, 29(5): 39-43.
- [18] 国家药典委员会. 中国药典: 二部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 VH.