

# 白及多糖的超滤陶瓷膜分离工艺研究<sup>\*</sup>

张丽华<sup>1,2\*\*</sup> 叶世莉<sup>1,2</sup> 刘思美<sup>1,2</sup> 张婷婷<sup>1,2</sup> 郭可<sup>1,2</sup> 付健文<sup>1,2</sup> 赵鹏<sup>1,2\*\*\*</sup>

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:**目的 采用陶瓷膜分离纯化白及多糖。方法 以多糖回收率为指标, 优化膜分离白及多糖的工艺参数, 确定最佳分离工艺。结果 应用响应面分析法优化得到陶瓷膜分离白及多糖的最佳工艺条件, 即温度 47 ℃、料液比 6 mg · mL<sup>-1</sup>、膜压 2 bar, 白及多糖的回收率达 78.44%。结论 应用陶瓷膜分离纯化白及多糖, 有效提高多糖纯度, 为其进一步研究提供基础数据。

**关键词:** 白及多糖; 超滤; 陶瓷膜; 响应面法; 纯化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 2096-1340(2022)06-0034-06

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.06.006

## Study on Separation of Bletilla Polysaccharide by Ultrafiltration Ceramic Membrane

ZHANG Lihua<sup>1,2</sup> YE Shili<sup>1,2</sup> LIU Simei<sup>1,2</sup> ZHANG Tingting<sup>1,2</sup>

GUO Ke<sup>1,2</sup> FU Jianwen<sup>1,2</sup> ZHAO Peng<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmacy of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi Key Laboratory of Basic and New Chinese Drug Research, Shaanxi Xianyang 712046, China)

**Abstract:** **Objective** To isolate and purify Bletilla polysaccharide by ceramic membrane. **Methods** Taking the recovery rate of polysaccharide as the index, optimize the technological parameters of membrane separation of Bletilla polysaccharide, and determine the best separation process. **Results** The optimum conditions of ceramic membrane separation of polysaccharide were obtained by response surface analysis, namely temperature 47 ℃, material to liquid ratio 6 mg · mL<sup>-1</sup>, membrane pressure 2 bar. The recovery rate of polysaccharide was 78.44%. **Conclusion** Porcelain membrane can effectively improve the purity of polysaccharide and provide basic data for its further study.

**Key words:** Bletilla polysaccharide; Ultrafiltration; Ceramic membrane; Response surface method; Purification

白及, 兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎, 气微, 嚼之有黏性。白及在止血消肿方面有一定的作用, 《吉人集验方》中记载, 单味研末, 糯米汤调服。它还可治疗手足皸裂, 研磨成粉后促进伤口的愈合<sup>[1]</sup>。研究发

现<sup>[2-7]</sup>, 白及多糖具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等功效。白及多糖能够收敛止血, 促进上皮组织修复, 帮助伤口愈合等<sup>[8]</sup>, 多作为医药原料、生物医学材料和免疫调节剂<sup>[9]</sup>等。膜分离技术是一种采用选择性渗透膜作为分离媒介, 利用化学位差

\* 基金项目: 陕西省教育厅重点实验室基金(20JS034, 21JS008); 陕西省重点研发计划(2022SF-389)

\*\* 作者简介: 张丽华, 副教授, 研究方向: 天然产物研究。E-mail: hua2003@sntcm.edu.cn

\*\*\* 通讯作者: 赵鹏, 教授。E-mail: zhaopeng65@sina.com

或外部能量作为推动力的分离工艺技术,实现对某一类物质的分离、提纯和浓缩<sup>[10-14]</sup>。膜分离技术能够有效保留功效成分的活性,而且其选择性强,操作过程简单,适用范围广,能耗低,广泛应用于医药生产过程中<sup>[15-17]</sup>。陶瓷薄膜管壁上存在着许多微小的滤孔,在一定的压力下,物质在膜内或膜外流动,小分子或一些液体可以穿过薄膜,而大分子或固体无法穿过薄膜,从而实现对物质的分离、纯化和浓缩<sup>[18-20]</sup>。鉴于此,本研究采用膜分离技术分离纯化白及多糖,降低多糖损失率,得到简单、高效的多糖分离方法,为白及多糖进一步研究提供一定的理论依据。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** FA1004 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);OSB-2100 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型真空泵(西安予辉仪器有限公司);DS5 紫外可见分光光度计(英国爱丁堡仪器公司);DHG-9075 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);HH-S4 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);BSM-CMZ-01G 型陶瓷膜分离设备(上海碧欣生物设备工程有限公司)。

**1.2 试剂** 白及粗多糖为实验室自制,苯酚-硫酸法测定多糖含量为 60%。无水乙醇(安徽安特食品股份有限公司,分析纯);苯酚(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,分析纯);浓硫酸(天津科密欧化学试剂有限公司,分析纯)。

## 2 方法

**2.1 原料预处理** 取实验室自制的白及多糖提取物,在 40 ℃ 水浴下配制相应浓度的白及多糖溶液,用定性滤纸和布氏漏斗抽滤不溶物。

查阅众多文献可知,白及多糖的分子量存在多样性,主要分子量分布在  $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  之间,本研究选用 50 kD 的陶瓷膜进行多糖分离工艺研究<sup>[21]</sup>。

### 2.2 多糖含量的测定

**2.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制** 采用苯酚-硫酸法测定葡萄糖标准曲线:取经 105 ℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 50 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准母液。在每次测量前,都要先

用蒸馏水把母液稀释成  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液,精密吸取 0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL 的葡萄糖标准溶液,分别置于 10 mL 的具塞试管中,用蒸馏水补足至 1 mL,依次加入 5% 的苯酚 1 mL,5 mL 的浓硫酸,摇匀,显色反应 15 min 后,在 490 nm 处测定吸光度值<sup>[22]</sup>。以未加入葡萄糖溶液的样品作为空白,以溶液中葡萄糖的质量浓度( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为横坐标,吸光度为纵坐标,得到葡萄糖标准曲线回归方程为: $Y = 9.0458X - 0.0084 (r = 0.9996)$ ,葡萄糖在  $0.02 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内呈良好线性关系。

**2.2.2 多糖的含量测定** 应用苯酚-硫酸法:精密吸取相应浓度的多糖溶液 1 mL,置于 10 mL 的具塞试管中,用蒸馏水补加至 1 mL,然后再依次加入 5% 的苯酚溶液 1 mL 和 5 mL 的浓硫酸,摇匀,显色反应 15 min 后,测量在 490 nm 处的吸光度值,并计算出多糖的含量。

白及多糖回收率计算公式为:

$$\text{多糖回收率}^{[23]}(\%) = \frac{C \cdot V}{m} \times 100\%$$

注: $C$  为白及多糖滤液的浓度( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); $V$  为白及多糖滤液的体积(mL); $m$  为预处理前的白及粗多糖质量(g)。

**2.3 膜分离实验方法** 用陶瓷膜分离设备(陶瓷膜分离流程示意图见图 1)分别过滤各多糖溶液。

### 2.3.1 单因素实验

**2.3.1.1 温度对多糖回收率的影响** 先取备用液料液比为  $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的多糖溶液,再设定陶瓷膜分离设备膜压为 2.0 bar,冲洗次数为 5 次,分别在温度为 30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃ 和 50 ℃ 下,分离多糖溶液,收集滤液,采用苯酚-硫酸法测量多糖的回收率。

**2.3.1.2 料液比对多糖回收率的影响** 设定陶瓷膜分离设备膜压为 2.0 bar,温度 45 ℃,冲洗 5 次,分别在料液比为 2,4,6,8 和  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  下,分离多糖溶液,收集滤液,采用苯酚-硫酸法测量多糖的回收率。

**2.3.1.3 膜压对多糖回收率的影响** 先取备用液料液比为  $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的多糖溶液,温度 45 ℃,冲洗 5 次,再分别设定陶瓷膜分离设备膜压为

1.0,1.5,2.0,2.5 和 3.0 bar,分离多糖溶液,收集滤液,采用苯酚-硫酸法测量多糖的回收率。

**2.3.1.4 冲洗次数对多糖回收率的影响** 先取备用液料液比为  $6\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的多糖溶液,设定膜压 2.0 bar,温度  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,冲洗次数分别为 1、2、3、4、5,分离多糖溶液,收集滤液,采用苯酚-硫酸法测量多糖的回收率。

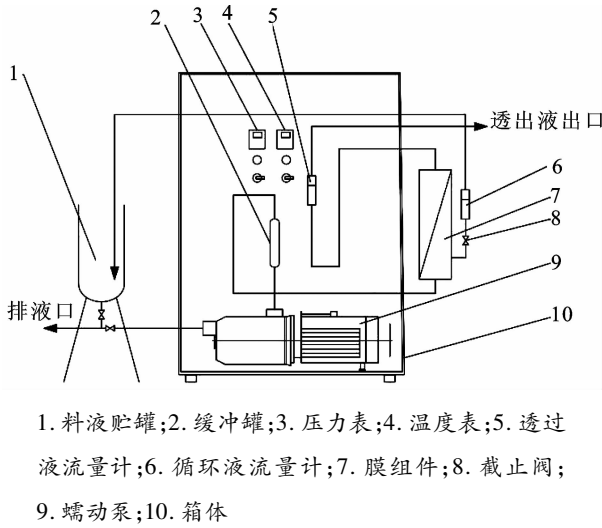


图 1 陶瓷膜分离流程示意图

**2.3.2 响应面实验设计** 在单因素试验结果的基础上,以多糖回收率为考察指标,并利用 Box-Behnken<sup>[24]</sup>的基本原理,筛选出三个对多糖回收率有重要影响的因素:料液比(A)、温度(B)、膜压(C),进行实验,确定膜分离白及多糖的最佳工艺,因素水平见表 1。

表 1 响应面因素水平设计表

因素		水平		
		-1	0	1
液料比( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	A	4	6	8
温度( $^{\circ}\text{C}$ )	B	40	45	50
膜压(bar)	C	1.5	2.0	2.5

3 实验结果与分析

3.1 单因素试验结果

**3.1.1 温度对多糖回收率的影响** 多糖回收率与温度的变化关系如图 2 所示,曲线从  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  到  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  时一直呈上升趋势, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  后略微下降。当溶液温度为  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,多糖回收率达到最大,然而当温度超过  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,多糖回收率逐渐减小。过高的温度不仅会对白及多糖的稳定性产生影响,还会影

响膜装置的使用寿命,所以溶液温度为  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  左右较为理想,此时多糖回收率最大。

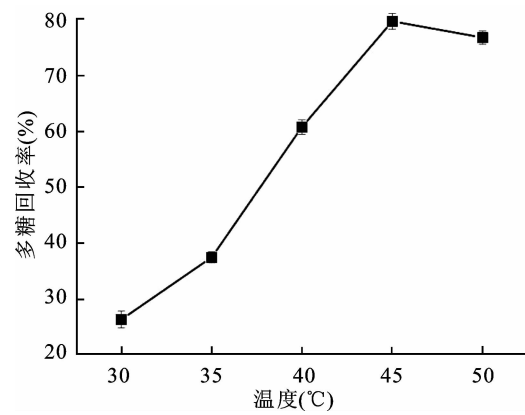


图 2 温度的影响

**3.1.2 料液比对多糖回收率的影响** 多糖回收率与料液比的变化关系如图 3 所示,曲线从开始一直呈上升趋势,当料液比为  $6\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,白及多糖回收率达到最大, $6\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  后呈缓慢下降趋势。这主要是由于随着料液比的增大,膜的表面的凝胶层及流动边界层厚度减小,而浓差极化作用减弱,从而提高了多糖回收率。当料液比增加到  $6\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  后,多糖回收率基本趋于稳定。然而当物质-液体的比率持续增加时,溶液的黏度也会增大,阻力也在增加,因为一些溶质沉积在膜的表面,很容易堵塞膜孔,膜孔堵塞就使液体难以通过膜,增大了溶液通过膜界面的阻力,从而导致多糖回收率下降。因此,选择料液比为  $6\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  左右较为合适。

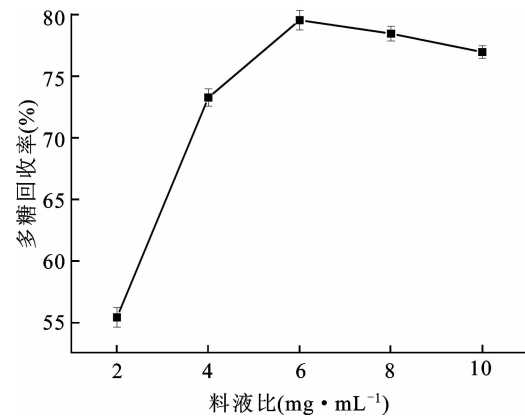


图 3 料液比的影响

**3.1.3 膜压对多糖回收率的影响** 多糖回收率与膜压的变化关系如图 4 所示,从 1.0 bar 膜压增大,曲线呈明显上升趋势,当膜压为 2.0 bar 时,多糖回收率达到最大,之后趋于平缓。这主要是因

为膜的压力增大,膜分离的推动力增强,多糖就比较容易透过膜。随着压力的升高,造成了许多大分子溶质的吸附和积聚,膜的表面堆积了许多难以让溶液持续透过的物质,使得凝胶层的厚度和密度增加,膜被压密,从而使传质阻力增加,影响了多糖的回收率。因此,膜压为 2.0 bar 左右较合适。

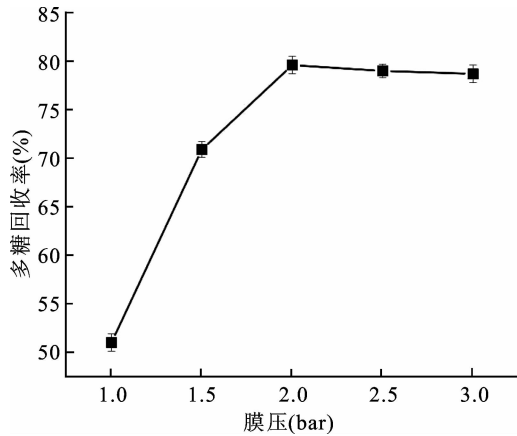


图 4 膜压的影响

**3.1.4 冲洗次数对多糖回收率的影响** 多糖回收率和冲洗次数的变化关系如图 5 所示,随着冲洗次数的增加,多糖回收率呈上升趋势,当冲洗次数达到 5 次时,多糖回收率达到了 82.5%。这是因为膜在使用过程中,凝胶极化使胶体层的厚度增加,同时,溶质在膜的表面形成了吸附层而堵塞膜孔,所以多次冲洗膜表面对于清理膜孔有着十分重要的作用,膜孔疏通才有利于提高多糖的回收率。

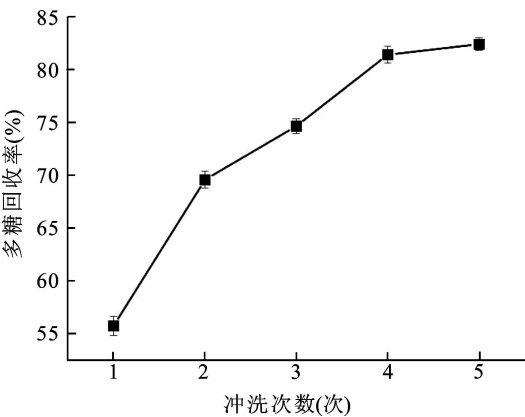


图 5 冲洗次数的影响

3.2 响应面优化试验结果与分析

**3.2.1 响应面试验设计结果** 根据上述单因素试验的结果,按照 Box-behnken<sup>[24]</sup>方法设计的原

理,主要考察的因素为液料比(A)、温度(B)、膜压(C),多糖回收率为响应值,试验中的设计和结果如表 2 所示。

表 2 响应面实验方案设计与结果

试验序号	A (mg · mL <sup>-1</sup> )	B (℃)	C (bar)	多糖回收率 (%)
1	4	40	2.0	59.3
2	8	40	2.0	60.6
3	4	50	2.0	71
4	8	50	2.0	62.9
5	4	45	1.5	61.5
6	8	45	1.5	65.1
7	4	45	2.5	65.4
8	8	45	2.5	61.4
9	6	40	1.5	61.3
10	6	50	1.5	65.2
11	6	40	2.5	63.4
12	6	50	2.5	72.7
13	6	45	2.0	78.5
14	6	45	2.0	78.3
15	6	45	2.0	80.1
16	6	45	2.0	79.3
17	6	45	2.0	76

应用 Design-Expert 12.0.3 软件进行了数据的分析,响应变量为液料比(A)、温度(B)、膜压(C),响应值为多糖回收率(Y),按照所设计的响应面方案进行试验,并对所得到的试验结果通过回归拟合分析后得到方程为:

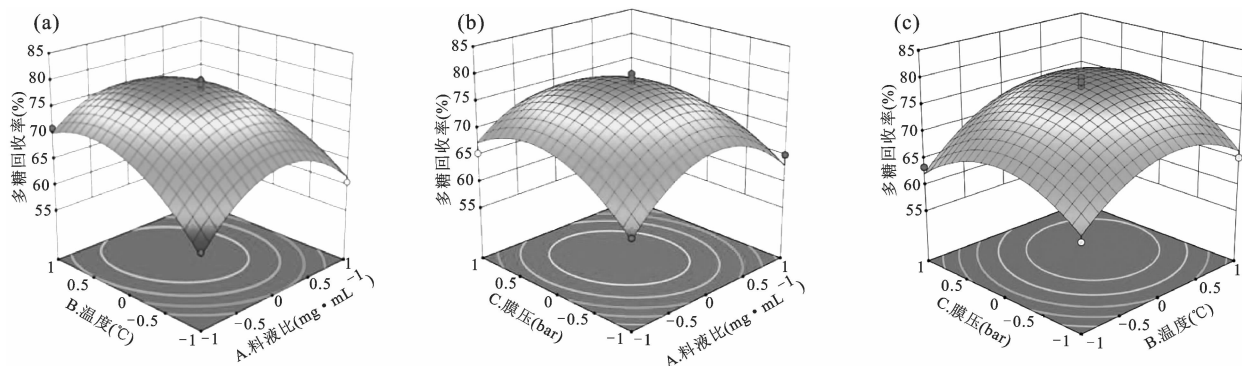
$$Y = 78.44 - 0.900A + 3.4B + 1.23C - 2.35AB - 1.90AC + 1.35BC - 8.65A^2 - 6.34B^2 - 6.44C$$

通过上表可以看出,回归模型显著( $P < 0.05$ )失拟误差的值为 0.2206,是不显著因素,方程中的  $A^2$  的影响结果为极显著,B 和 AB 的影响结果为显著。结果表明模型  $r = 0.9858$ ,  $r_{adj} = 0.9673$ ,均接近 1.0,这说明该回归模型线性关系良好,与实际结果具有高度相关性,可准确反映各因素与响应值之间的关系,其可信度较好;而它的变异系数  $CV = 2.80\% < 5.0\%$ ,由此可以看出,模型外因素对响应值的影响不明显,可以考虑将该模型用在对实际实验结果的预测上。

**3.2.2 响应曲面分析** 料液比和温度、料液比和膜压、温度和膜压这几个因素交互影响的显著差

异如图6所示。由响应面图可得,膜压和温度以及料液比各单因素之间交互影响,存在显著性差异,当得到的响应面图倾斜程度越低,坡度较缓,等高线越趋于圆形时,则两个单因素交互影响越小;反

之,则两个单因素间的交互影响显著。由图6可看出,这三个单因素之间的交互影响均较大,三个因素对应的曲线当中,变化最大的、最陡峭的是温度的变化曲线,膜压次之,料液比最小。



(a) 料液比、温度的影响 (b) 料液比、膜压的影响 (c) 温度、膜压的影响

图6 各因素交互影响的响应面分析图

对回归方程求一阶偏导,由此可得白及多糖的膜分离最佳工艺条件为:温度 $46.519^{\circ}\text{C}$ 、料液比 $5.781\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、膜压 $2.072\text{ bar}$ ,白及多糖的回收率达 $79.092\%$ 。综合考虑预测的实验结果和实际操作工艺条件,微调工艺参数为温度为 $47^{\circ}\text{C}$ 、料液比 $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、膜压 $2\text{ bar}$ ,在此工艺条件下重复操作三次,得到的多糖回收率平均都在 $78.44\%$ ,这说明可以用此模型来分析和预测白及多糖的膜分离工艺。

#### 4 总结与讨论

本研究以白及多糖为原料,以白及多糖的回收率为指标,采用膜分离纯化白及多糖,在单因素实验基础上,选择响应面法进行进一步优化,得到的最优工艺参数为:温度 $47^{\circ}\text{C}$ 、料液比 $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、膜压 $2\text{ bar}$ ,白及多糖的回收率达 $78.44\%$ 。本研究对白及多糖的分离纯化起到了较好的效果,为白及多糖的进一步研究奠定了一定的基础。

多糖的分离方法有多种,本研究采用膜分离工艺,具有以下优势:操作简便、分离效率高、环境污染小、能耗低、节约资源等。在实际生产中,膜分离根据分离物质的孔径进行分离,具有较强的选择滤过性,同时分离过程中会造成有效物质有一定的损失,需要根据不同的情况对工艺进行合理的选择。随着制剂工艺的发展,对多糖分离的效率和品质有了更高的要求,我们也要与时俱进,

不断创新,引入新技术新方法充实该领域,探索出更加稳定高效的多糖分离方法。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版[S]. 一部:北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 代建丽,周斯荻,刘铭轩,等. 白芨多糖的抑菌作用研究[J]. 安徽农学通报,2015,21(19):19-21.
- [3] 刘长命,沙银花. 不同产地野生白芨中白芨胶含量及抑菌活性比较分析[J]. 陕西农业科学,2017,63(4):17-20.
- [4] Li Q, Li K, Huang SS, et al. Optimization of Extraction Process and Antibacterial Activity of Bletilla striata Polysaccharides[J]. Asian Journal of Chemistry: An International Quarterly Research Journal of Chemistry, 2014, 26(12):3574-3580.
- [5] 孙爱静,庞素秋,王国权. 白芨化学成分与抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志,2016,51(2):101-104.
- [6] Chen ZY, Cheng LZ, He YC, et al. Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of Bletilla striata polysaccharide: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120(Pt B):2076-2085.
- [7] 黄龙. 载 EGF 与氧化锆白芨多糖/PLGA 核壳纤维支架的构建及促伤口愈合作用研究[D]. 长春:吉林大学,2021.
- [8] 王瑶. 中药白芨在胃 ESD 术后人工溃疡中的治疗作

- 用[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2021.
- [9]陈正坤,王嘉兴,林平,等. 白芨多糖在药剂领域的应用[J]. 中南药学,2019,17(1):74-77.
- [10]Yang LN,Wu XH,Zhao L,et al. The emulsifying stability of soy hull polysaccharides with different molecular weight obtained from membrane-separation technology[J]. International Journal of Food Engineering,2021,17(9):693-701.
- [11]刘靖宇. 膜分离技术在工业污水处理中的应用[J]. 江西建材,2021(12):308-310.
- [12]王轶文,单衍雪,刘丙萍. 膜分离技术研究进展[J]. 山东化工,2021,50(24):62-63,66.
- [13]Xu JY,Wu HY,Wang Z,et al. Recent advances on the membrane processes for CO<sub>2</sub> separation [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering,2018,26(11):2280-2291.
- [14]Demirel SE,Li JP,Hasan MMF. Membrane separation process design and intensification[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research,2021,60(19):7197-7217.
- [15]葛雯,陈宏降,罗益远,等. 白芨及多糖的研究进展[J]. 人参研究,2021,33(3):55-59.
- [16]TangW,Liu CC,Liu JJ,et al. Purification of polysaccharide from Lentinus edodes water extract by membrane separation and its chemical composition and structure characterization [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105851.
- [17]刘金金,黄晓君,聂少平. 膜分离技术在猴头菇多糖分离纯化中的应用[C]//中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集,2018:757-758.
- [18]杜成兴,冯发进,杨熟英,等. 膜分离技术应用于黄柏多糖纯化工工艺的研究[J]. 中医药导报,2019,25(21):52-56.
- [19]滕春丽,颜蜜,向瑞琪,等. 红托竹荪多糖的提取优化及膜分级分离的研究[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(12):4984-4990.
- [20]谢慧荣,罗忠圣,钱余,等. 膜分离技术在天然产物中的应用[J]. 食品科技,2021,46(5):104-107.
- [21]陈姿燕. 白芨源多糖的分离纯化、结构解析以及抗氧化活性研究[D]. 上海:上海交通大学,2020.
- [22]蔡红梅,田子玉. 苯酚-硫酸法测定草莓中总糖含量[J]. 吉林农业,2019,31(4):46.
- [23]单联刚. 香菇多糖无机陶瓷膜超滤法提纯工艺优化研究[J]. 吉林农业,2016,28(3):85.
- [24]Wang BL,Xu Y,Chen LJ,et al. Optimizing the extraction of polysaccharides from Bletilla ochracea schltr. using response surface methodology (RSM) and evaluating their antioxidant activity[J]. Processes,2020,8(3):341.
- (修回日期:2022-07-15 编辑:崔春利)