

超滤膜分离纯化加纳籽中 5-羟基色氨酸的研究

张勤*, 胡雪松, 秦岭, 寇彦杰

成都华高药业有限公司, 成都 610041

摘要: 研究了超滤膜从加纳籽中分离纯化 5-羟基色氨酸的相关膜工艺条件及参数, 并筛选出适合的聚砜超滤膜。研究结果表明, 截留分子量为 50 K 的超滤膜分离纯化 5-羟基色氨酸的效果要优于截留分子量分别为 10 K 和 100 K 的超滤膜。超滤膜分离纯化 5-羟基色氨酸优化工艺条件: 操作压力 0.10 MPa、操作温度 35 °C、料液质量浓度 1.141 mg/mL、pH 值 7.0, 在此条件下 5-羟基色氨酸转移率为 83.5%, 纯度可达 90.5%。

关键词: 超滤膜; 加纳籽; 5-羟基色氨酸

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Isolation and Purification of 5-Hydroxytryptophan from *Griffonia simplicifolia* by Ultrafiltration Technique

ZHANG Qin*, HU Xue-song, QIN Ling, KOU Yan-jie

ChengDu Wagott Pharmaceutical Co., Ltd, Chengdu 610041, China

Abstract: In this study, ultrafiltration technique was used for purifying 5-hydroxytryptophan (5-HTP) from *Griffonia simplicifolia*. The results showed that the ultrafiltration membrane with cut-off molecular mass of 50K was better than these of 10K and 100 K in separating and purifying 5-HTP. In order to improve 5-HTP purity and transfer ratio, the optimal separation and purification conditions were investigated and obtained as follows: operating pressure was 0.10 MPa, the temperature was 35 °C, the raw concentration of 5-HTP was 1.141 mg/mL, and the pH value was 7.0. Under the optimum conditions, the 5-HTP transfer ratio was 83.5%, and the purity of 5-HTP was 90.5%.

Key words: ultrafiltration; *Griffonia simplicifolia*; 5-hydroxytryptophan

加纳籽, 是热带豆科灌木植物加纳谷 (*Griffonia simplicifolia*) 的干燥种子, 野生于非洲加纳、科特迪瓦和多哥等西非国家。种子呈圆形, 种皮黑色有皱纹, 胚乳呈黄绿色, 略带豆香味。加纳籽中含有大量的 5-羟基色氨酸 (5-Hydroxytryptophan, 简称 5-HTP)。5-HTP 在体内可以通过脱羧作用转化为 5-羟色胺 (5-HT)。5-HT 是一种神经传导物质, 负责细胞间信号的传递, 广泛存在于哺乳动物组织中, 特别在大脑皮层及神经突触内含量很高。5-HT 水平较低的人群更容易发生抑郁、冲动甚至攻击暴力行为。5-HTP 可以帮助人体提高 5-HT 水平, 是重要的神经类药物, 在临床上有重要的意义。现代研究发现 5-HTP 具有: 抗抑郁、中枢镇痛、催眠、抗应激、调控内分泌等生理作用^[1-6]。

从加纳籽中提取分离 5-HTP 的方法在国内外已有很多报道, 但这些方法普遍存在着操作步骤繁

琐、有机溶剂用量大、溶剂和树脂单体残留等缺点。超滤膜分离技术具有操作简单、节能、无污染、可在常温下连续操作等优点, 广泛用于化工、食品、生物、制药等领域, 特别适用于热敏性和生物活性物质的分离纯化^[7]。加纳籽提取液中含有多糖、蛋白质、油脂等大分子物质, 超滤膜可以选择性去除大分子杂质, 保留小分子的 5-HTP。本文探讨超滤膜分离技术分离纯化 5-HTP 的工艺, 筛选不同截留分子量的膜, 优化超滤膜纯化 5-HTP 工艺参数, 为超滤膜应用于 5-HTP 的工业化生产提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 电子天平 (CP2000, 德国 Sartorius 公司); 超声波清洗机 (AS3120); RNF-0460 超滤膜设备 (膜有效过滤面积 0.356 m², 截留分子量分别为 10 K、50 K、100 K 聚砜超滤膜, 厦门世达膜科技有限公司)。

1.2 材料

加纳籽由成都华高药业有限公司从加纳进口。5-羟基色氨酸对照品(纯度>98%,购自于Sigma公司),甲醇为色谱纯,乙酸为分析纯。

1.3 5-HTP 的测定方法

采用高效液相色谱法,色谱条件:色谱柱 E-clipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-0.2%冰乙酸水溶液(体积比为10:90);流速为1.0 mL/min;检测波长275 nm;柱温为室温;进样量:20 μL。

1.4 实验方法

粉碎后的加纳籽加入6倍量的去离子水,80℃保温1h后滤出提取液,重复提取4次,合并4次提取液用微滤膜过滤去除微粒杂质。将料液加入超滤装置储液罐,启动离心泵用量杯收集滤液,检测5-HTP含量。

本研究包含5个单因素试验,分别为:截留分子量为10K、50K、100K的聚砜超滤膜;超滤膜操作压力为0.01、0.05、0.10、0.15 MPa;料液温度为25、35、45℃;料液质量浓度为1.141、1.576、2.025 mg/mL;pH值为4.0、5.0、6.0、7.0。以膜通量、5-HTP的转移率和杂质截留率为考察指标,进行以上5组工艺优化试验。

$$\text{膜通量} = V / (S \cdot T)$$

式中V为超滤膜透过液体积,T为收集超滤膜透过液所需时间,S为超滤膜膜面积。

$$5\text{-HTP的转移率} = (C_A \times V_A) / (C_F \times V_F) \times 100\%$$

式中C_A为超滤膜透过液5-HTP浓度,V_A为超滤膜透过液体积,C_F为料液5-HTP浓度,V_F为料液体积。

$$\text{杂质截留率} = (W_F - W_A) / W_F \times 100\%$$

式中W_F为料液质量,W_A为超滤膜透过液质量。

2 结果与分析

2.1 超滤膜的筛选

实验选用截留分子量为10K、50K、100K的三种聚砜超滤膜。在相同条件下进行超滤,考察3种膜的膜通量,超滤后5-HTP的转移率和对杂质的截留率,结果见图1和表1。

从图1可看出,膜孔径对通量的影响比较大,不

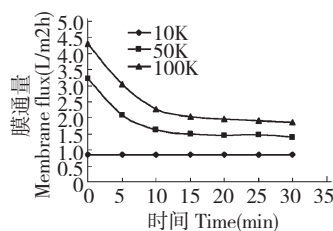


图1 膜孔径对膜通量的影响

Fig. 1 Effect of membrane pore diameter on membrane flux

表1 不同膜孔径下超滤的效果

Table 1 Ultrafiltration results with different membrane pore diameters

	10K	50K	100K
5-HTP 转移率 5-HTP Transfer rate (%)	91.3	78.5	37.6
杂质截留率 Impurity retaining rate (%)	86.7	64.8	45.2

论是起始点还是平衡点,分子量大的膜料液的通量也大。当超滤流速达到平衡后,100K超滤膜通量比50K超滤膜高,10K超滤膜通量不到100K得1/2。由表1可知超滤膜对料液中物质的转移率随孔径的减小而增大。100K超滤膜对蛋白质这类大分子物质的截留率不高仅为45.2%,5-HTP这类小分子物质氨基酸转移率也很低。10K超滤膜5-HTP转移率高达91.3%,对大分子物质的截留率也最高,但是膜通量最低。综合膜通量、5-HTP的转移率和对大分子物质的截留率3个因素,选择50K超滤膜更为合适。

2.2 压力对膜通量的影响

压力是超滤过程的推动力,对膜通量具有重要影响。由图2和图3可知,压差较低时,膜通量受压差的影响较大,与作用在膜表面的压差成正比例关系。一定的压差下能够提高流体流速,流速的升高使流体产生的剪切力急剧上升,它对浓度边界层产生的冲刷作用使浓度边界层的液面更新速度大于溶质在膜面上的沉积速度,而使浓度边界层的厚度变薄,膜面浓度降低。压力如果过大,会使溶质被迅速地压实在膜面上,在膜表面形成极化层,超滤过程中受到传质控制就成了主要因素,从而导致膜通量下降^[8,9]。因此为使超滤系统在较高的通量下运行,提高膜分离效率,减小膜污染,本实验选择超滤的操作压力差为0.10 MPa。

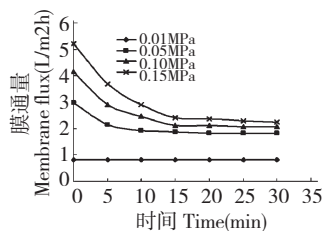


图 2 压力对膜通量的影响

Fig. 2 Effect of membrane pressure on membrane flux

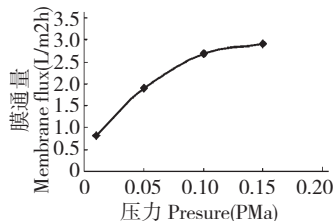


图 3 膜通量与压力的变化关系

Fig. 3 The Relationship between membrane pressure and membrane flux

2.3 操作温度对膜通量的影响

由图 4 和图 5 可知温度对膜通量的影响较明显,膜通量随温度的增加而增加,但当温度达到 35 °C 以后,膜通量增幅变弱。这是由于温度升高会导致料液黏度降低和扩散系数增大,膜通量随之增大;但当温度继续升高后料液中的糖类、蛋白质等物质在高温下会形成较大的分子胶团,在膜表面吸附、沉积、凝胶化,使过滤阻力增大,引起膜通量下降^[9]。

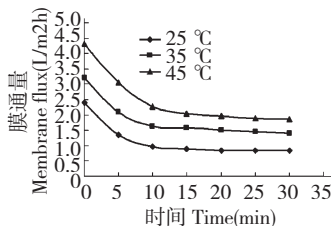


图 4 温度对膜通量的影响

Fig. 4 Effect of temperature on membrane flux

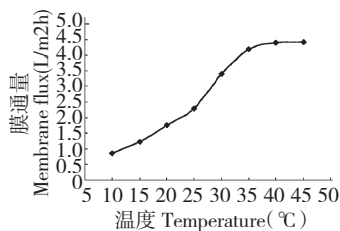


图 5 膜通量与温度的变化关系

Fig. 5 The Relationship between membrane pressure and temperature

同时较高的温度也会造成 5-HTP 发生降解。综合考虑各方面的影响,选取 35 °C 为操作温度。

2.4 料液浓度对膜分离效果的影响

由图 6 可知,随着料液质量浓度的增大,膜通量减小,最后趋于平缓。这是因为加纳籽提取液中含有大量的蛋白质、油脂、多糖和色素等大分子物质,黏度随料液质量浓度增大而增大,导致透过液通过膜界面时受到阻力大,透过通量变小;同时,质量浓度增大,溶质沉积在膜表面阻塞膜孔,增加扩散阻力,造成有效成分转移率和膜通量降低,还会引起不可逆的膜污染,影响膜的使用寿命^[8],所以最终选择料液质量浓度为 1.141 mg/mL。

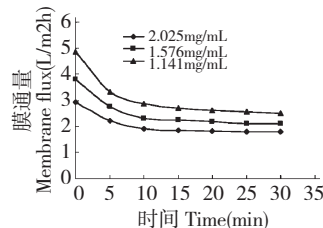


图 6 料液质量浓度对膜通量的影响

Fig. 6 Effect of concentration of solution on membrane flux

2.5 pH 值对膜分离的影响

在强酸性和碱性条件下 5-HTP 易分解,故只考察弱酸性和中性条件下料液的 pH 值对膜通量的影响。由图 7 可知随料液 pH 值的升高膜通量增加。这是由于料液中蛋白质含量较多,其溶解性受 pH 值影响较大,pH 值在 4~6 时改变了蛋白质的带电状态,蛋白质分子的疏水性增强,膜对蛋白质的吸附作用增强,膜的污染加重,使膜的传质阻力增加,膜通量显著下降,反之当蛋白类溶质的溶解度与水的亲和力作用变强时,被膜吸附在表面的量就会减少^[10]。因此料液 pH 值应控制在 7.0 左右较适宜。

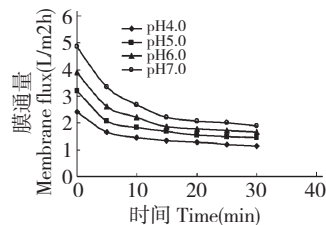


图 7 pH 值对膜通量的影响

Fig. 7 Effect of pH on membrane flux

2.6 最佳工艺条件的确定

综合以上实验结果,筛选出最佳工艺条件如下:

50K 超滤膜、操作压力 0.10 MPa、操作温度 35 °C、料液质量浓度 1.141 mg/mL、料液 pH 值为 7.0。按照此工艺参数和常规工艺(粗结晶需脱色,2 次重结晶)进行了对比试验,数据见下表。

表 2 超滤和常规工艺的比较

Table 2 Comparison of ultrafiltration and conventional process

	5-HTP 转移率 5-HTP Transfer ratio (%)	5-HTP 纯度 5-HTP Purity (%)
常规工艺 Conventional process	71.2	65.3
超滤 Ultrafiltration	83.5	90.5

3 结论

采用超滤膜分离纯化 5-羟基色氨酸,实验以提高 5-HTP 的纯度和转移率为主要指标进行优化选择,通过对不同截留分子量的超滤膜进行筛选并研究了压力、料液质量浓度、温度、pH 值等不同条件对超滤膜分离纯化 5-HTP 的影响,得到了优化工艺参数:50K 超滤膜、操作压力 0.10 MPa、操作温度 35 °C、料液质量浓度 1.141 mg/mL、料液 pH 值为 7.0,在此操作条件下 5-HTP 的转移率为 83.5%,纯度可达 90.5%,只需要一次重结晶就可以得到纯度大于 99% 的 5-HTP。实验结果表明,在合适的工艺参数下超滤膜可以截留料液中大部分的蛋白质等大分子物质,同时有效成分 5-HTP 得到较大的保留,生产效率得以大幅度提高。由于超滤是在常温下进行没有相变,特别适宜 5-HTP 这类热敏性物质或其他生物活性物质的分离纯化,同时膜分离过程能耗较小,对环境污染小,操作过程相对传统分离方法更简单,且易于工业化,这些都是用膜分离技术分离提纯 5-HTP 的优势。

参考文献

1 Maes M, Gastel AV, Ranjan R, *et al.* Stimulatory effects of L-

5-hydroxytryptophan on postdexamethasone β -endorphin levels in major depression. *Neuropsychopharmacol*, 1996, 15: 340-348.

2 Ahlenius S, Larsson K. Evidence for an involvement of 5-HT_{1B} receptors in the inhibition of male rat ejaculatory behavior produced by 5-HTP. *Psychopharmacology*, 1998, 137: 374-382.

3 Lynn-Bullock CP, Welshans K, Pallas SL, *et al.* The effect of oral 5-HTP administration on 5-HTP and 5-HT immunoreactivity in monoaminergic brain regions of rats. *J Chem Neuroanat*, 2004, 27: 129-138.

4 Smith RL, Kennedy CH. Increases in avoidance responding produced by REM sleep deprivation or serotonin depletion are reversed by administration of 5-hydroxytryptophan. *Behav Brain Res*, 2003, 140: 81-86.

5 Amer A, Breu J, McDermott J, *et al.* 5-Hydroxy-L-tryptophan suppresses food intake in food-deprived and stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 77: 137-143.

6 Wang ZB(王志斌), Yang ZW(杨宗伟), Xing XL(邢晓林), *et al.* Development and application of membrane separation technology. *J Filtr Sep(过滤与分离)*, 2008, 18(2): 19-23.

7 Sargent PA, Quested DJ, Cowen PJ, *et al.* Clomipramine enhances the cortisol response to 5-HTP; implications for the therapeutic role of 5-HT₂ receptors. *Psychopharmacology*, 1998, 140: 120-122.

8 Liu Y(刘洋), Deng YL(邓玉林), Xu ZH(徐志慧), *et al.* Research on the ultrafiltration technology of hollow fiber membranes for the aqueous extract of Thesium Chinese Turcz. *J Func Mater(功能材料)*, 2007, 38: 1887-1889.

9 Zhang TL(张太龙), Zhang ZH(张宗和). Study on preparation of high-purity tannic acid by membrane separation. *Bio-mass Chem Eng(生物质化学工程)*, 2007, 41(4): 1-5.

10 Deng CP(邓成萍), Xue WT(薛文通), Sun XL(孙晓林), *et al.* Application of ultrafiltration on separation and purification of soybean peptides. *Food Sci(食品科学)*, 2006, 27: 192-195.

(上接第 2053 页)

7 Feng BB(冯彬彬), Zhang JH(张建海), Zhang JF(张继芬), *et al.* Comparative study on pharmacokinetics of tetramethylpyrazine, ferulic acid and their compatibility. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2010, 35: 900-903.

8 Feng BB(冯彬彬), Zhang JH(张建海), Zhang JF(张继芬), *et al.* Effect of different compatibility of tetramethylpyrazine on its pharmacokinetics *in vivo*. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2012, 37: 1311-1313.