

败酱草多糖的脱蛋白研究

王克俊, 王丽琴 (窑街煤电集团公司总医院, 甘肃 兰州 730080)

[摘要] 目的 研究败酱草多糖的脱蛋白工艺。方法 采用 Sevag法、三氯乙酸法、酶法对败酱草多糖进行脱蛋白研究。结果 酶法脱蛋白效果明显好于 Sevag法, 三氯乙酸法的多糖损失较多。在木瓜蛋白酶用量 4% (W/V)、pH 值 6.0 温度 55℃、酶解时间 2.5 h 的条件下, 败酱草多糖的蛋白脱除率为 51.65%, 多糖损失率为 7.93%。结论 用酶法脱蛋白效果较好。

[关键词] 败酱草; 多糖; 脱蛋白

[中图分类号] R28 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)06-0429-03

Removing protein from polysaccharide in *Herba patriniae*

WANG Kejun, WANG Liqin (Yaojie Coal Group General Hospital, Lanzhou 730080, China)

[Abstract] **Objective** To study the technological processing of removing proteins of *Herba patriniae* polysaccharide. **Methods** Sevag, trichloroacetic acid and enzymatic hydrolysis methods were used to remove protein from polysaccharide extract of *Herba patriniae*. **Results** The results showed scheme of enzyme was better than others. When the polysaccharide solution was enzymatic hydrolysis for 2.5 hours in 55 °C water with pH 6.0 by adding 4% papain, 51.65% protein of polysaccharide extract could be removed, the loss rate of polysaccharide was 7.93%. **Conclusion** Enzymatic hydrolysis of removing proteins was better than others.

[Key words] *Herba patriniae*; polysaccharide; removal of protein

败酱草 *Herba patriniae* 为败酱科多年生草本植物白花败酱 *Patrinia villosa* Juss. 黄花败酱 *Patrinia scabra* Fisch. 或其近缘植物的带根全草, 全国大部分地区有分布。其中白花败酱草因其含有各种氨基酸、维生素和矿物质等有益成分而被人们广泛食用^[1]。在临床上, 败酱草具有清热利湿、解毒排脓、活血化瘀、宁心安神、促进肝细胞再生、改善肝功能、增强抑菌和抗病毒等作用^[2]。目前, 国内对败酱草多糖的研究较少, 国外几乎没有, 作为败酱草的主要活性成分之一, 张凤梅等^[3]的研究表明败酱草多糖具有抗病毒、增强免疫力的作用。朱加进等^[4]仅对其提取工艺做了研究, 对其纯化的研究尚不多见。用水提取的多糖, 常含有一定量的蛋白质, 蛋白质的去除是多糖精制的重要步骤, 也是提高产品生物活性的有效方法。因此, 为了提高其活性, 得到纯化多糖, 同时为进一步研究多糖生物活性和结构之间的关系提供物质原料, 本实验分别采用 Sevag法、三氯乙酸法、酶法 3 种方法, 对败酱草多糖中的脱蛋白方法进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 仪器 CR22G II 型离心机 (日本日立); UV-1700 型紫外仪 (日本岛津); LABCONCO 型真空冷

冻干燥仪 (日本岛津); KQ-400DB 型超声清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); RE-52 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 材料 败酱草购于兰州黄河药材市场, 经兰州大学药学院生药研究所马志刚教授鉴定为败酱科白花败酱 *Patrinia villosa* Juss. 带根全草。

1.3 试剂 木瓜蛋白酶 (酶活力 60 万 U)、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G-250 (西安周鼎国生物技术有限责任公司); 葡萄糖对照品 (中国药品生物制品检定所); 其它试剂均为分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 败酱草多糖的提取 称取 100 g 败酱草, 在用 100 °C 水提取 2 次, 料液比为 1:20, 以 4000 r/min 离心 15 min 后, 合并上清液, 加入 3 倍体积的无水乙醇, 于 4 °C 静置过夜, 离心所得沉淀冷冻干燥即为败酱草粗多糖。

1.4.2 多糖含量的测定 准确称取干燥的标准葡萄糖 20 mg 用 100 ml 蒸馏水定容, 分别稀释成浓度为 30、60、90、120、150、190 μg/ml 的溶液, 取该溶液各 0.2 ml 置于 10 ml 试管中, 加入 50 g/L 苯酚溶液 0.4 ml 混合后, 迅速加入 2 ml 浓硫酸, 混合均匀后, 室温放置 30 min, 空白对照以蒸馏水代替糖溶液, 在波长 490 nm 测定吸光度, 以糖浓度和吸光度为坐标, 回归方程: $Y = 6.7226X - 0.0053$ 相关系数: $r = 0.9993$ 。

1.4.3 蛋白质标准曲线的制备 称取牛血清白蛋

[作者简介] 王克俊 (1980-), 男, 本科, 药师. Tel (0931) 6328663, 13619395939, E-mail: wkjhu@163.com.

白 10 mg 加水定容于 25 ml 容量瓶中。分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml 加水稀释至 1 ml 向各管中加入 5 ml 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 混合均匀后, 静置 5 min 以蒸馏水为空白, 在 595 nm 波长处测定吸光度, 以蛋白质含量和吸光度为坐标, 回归方程: $Y = 1.2039X + 0.1354$ 相关系数: $r = 0.9983$ 。

1.4.4 脱蛋白方法

1.4.4.1 Sevag 法 在粗多糖溶液 (4 g/L) 中加入占该溶液体积的 1/5 倍氯仿和 1/25 倍正丁醇, 反应 30 min, 经离心去除沉淀后, 水相用其 3 倍体积的无水乙醇沉淀, 沉淀冷冻干燥后, 测蛋白质含量和多糖含量。

1.4.4.2 三氯乙酸法 (TCA)^[5] 在与 Sevag 法相同的粗多糖溶液中加入多糖溶液等体积的 5% 三氯乙酸, 低温 (4 °C) 剧烈振摇 30 min, 离心除去沉淀后, 水相用其 3 倍体积的无水乙醇沉淀, 沉淀冷冻干燥后, 测蛋白质含量和多糖含量。

1.4.4.3 酶法 在与 Sevag 法相同的粗多糖溶液中加入木瓜蛋白酶水解, 酶解液用其 3 倍体积的无水乙醇沉淀, 沉淀冷冻干燥后, 测蛋白质含量和多糖含量。

2 结果与分析

2.1 Sevag 法脱蛋白 结果见图 1, 用 Sevag 法脱蛋白 1 次后, 粗多糖中的蛋白质含量下降不明显, 在重复 7 次后, 蛋白脱除率为 53.36%, 而多糖含量变化较大, 损失率为 31.56%。Sevag 法脱蛋白效率不高, 次数多, 有机溶剂的大量使用对环境和人体有一定的损害, 而且相当一部分多糖夹杂在蛋白质中被同时去除。

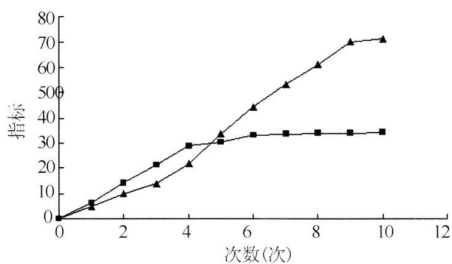


图 1 样品用 Sevag 法处理后结果

—▲—: 蛋白脱除率 (%); —■—: 多糖损失率 (%)

2.2 三氯乙酸法脱蛋白 结果见图 2 三氯乙酸法脱蛋白效果较好, 但多糖损失较多, 在去除蛋白质的过程中, 和蛋白质结合紧密的部分多糖随着蛋白质的沉淀而损失。在重复 2 次后, 蛋白脱除率为

59.89%, 多糖损失率为 16.89%。

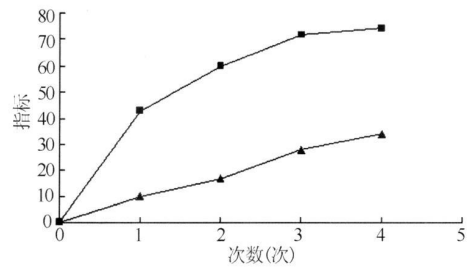


图 2 样品用 TCA 法处理后结果

—▲—: 蛋白脱除率 (%); —■—: 多糖损失率 (%)

2.3 酶法脱蛋白 在单因素试验基础上, 选取温度、时间、酶用量、pH 值 4 个因素的水平见表 1。根据表 1 做 $L_9(3^4)$ 正交试验, 其结果见表 2。试验采用综合加权评分法^[6], 权重系数均为 0.5 分别把 2 项中最大的指标定为 100 分, 其它各号按下式评分: 综合评分 = (蛋白脱除率 / 51.99) × 100 × 0.5 + (多糖损失率 / 7.89) × 100 × 0.5。

综合蛋白脱除率和多糖损失率二方面的因素, 由极差分析可以看出, 酶法脱蛋白的影响因素大小顺序为 B > D > A > C。正交优化条件为 $A_3 B_3 C_1 D_1$, 即酶用量 4%, 温度 55 °C, 时间 2.5 h, pH 值 6.0 此组合正交表中没有, 以此组合做验证试验得蛋白质脱除率为 51.65%, 多糖损失率 7.93%。

表 1 败酱草多糖酶法脱蛋白正交试验因素水平表

水平	A 因素 酶用 (%)	B 因素 温度 (°C)	C 因素 时间 (h)	D 因素 pH 值
1	2	45	2.0	6.0
2	3	50	2.5	6.5
3	4	55	3.0	7.0

3 讨论

3.1 本实验比较了酶法、Sevag 法和三氯乙酸法 3 种方法对败酱草多糖脱蛋白的效果, 酶法脱蛋白效果明显优于 Sevag 法和三氯乙酸法, 除次数少, 效率高, 多糖回收率也高, 一次处理后蛋白脱除率为 51.65%, 多糖损失率为 7.93%, 这可能是由于酶能与蛋白质特异性的结合, 使与糖结合的化学键断裂, 将糖释放出来, 从而提高了蛋白的脱除率, 减少了多糖的损失。对于 Sevag 法, 在重复 7 次后, 蛋白脱除率为 53.36%, 多糖损失率为 31.56%, 增加脱除次数是造成多糖与蛋白质凝聚共沉淀而部分损失的原

(下转第 480 页)

15. 药品分装可能会带来哪些问题 (多选)

- A. 使原包装标签的防伪措施失效 B. 为过期药品、假药、伪药进入药品分销系统提供方便
C. 缩短药品有效期 D. 使药品名称无法识别 E. 增加销售成本

16. 药房采购人员及药师在获得药品过程中可采取哪些措施来控制获得假劣药品的风险 (多选)

- A. 确认供货批发商的合法性
B. 对未有过业务往来的二级批发商保持警惕
C. 对供应紧缺药品或超低价药品的批发商保持警惕
D. 严格执行医院药品采购规定
E. 经常学习医院药物与治疗学委员会制定的药品获得政策。

17. 当患者出现哪些情况时, 药师需要进行调查, 以确定是否是假药或有缺陷药品所致 (多选)

- A. 非典型的不良反应 B. 异常副作用 C. 无法解释的治疗失败
D. 用药剂量需要不断加大 E. 患者不愿继续治疗

18. 患者的哪些反馈有助于发现药品销售系统中的假药 (多选)

- A. 药品标识发生变化 B. 药品效果有变化 C. 口服药的口味有变化
D. 注射剂注射时有疼痛感 E. 药品价格发生变化

(上接第 430 页)

因, 而且有机溶剂对人体和环境都有一定的损伤。对三氯乙酸法, 一次处理能达到较好的脱蛋白效果, 脱除率为 44.54%, 但因其酸性较强, 会破坏多糖的结构, 而且与蛋白质结合紧密的部分多糖会随着蛋

白质的沉淀而损失。

3.2 3 种方法脱蛋白后仍含少量蛋白质, 可能是部分蛋白质与多糖结合形成了糖复合物, 如需要获得纯多糖制品, 还需要经过其它一系列提纯工序。

表 2 败酱草多糖正交试验结果

实验号	A	B	C	D	蛋白脱除率 (%)	多糖损失率 (%)	综合评分
1	1	1	1	1	49.08	6.13	86.05
2	1	2	2	2	50.89	6.33	89.05
3	1	3	3	2	50.62	6.89	92.34
4	2	1	2	3	50.88	5.45	83.46
5	2	2	3	1	51.99	6.56	91.57
6	2	3	1	2	51.12	7.02	93.64
7	3	1	3	2	49.56	6.03	85.87
8	3	2	1	3	49.89	6.89	91.64
9	3	3	2	1	50.15	7.89	98.23
k ₁	267.44	255.38	271.33	275.85			
k ₂	268.67	272.26	270.44	268.56			
k ₃	275.74	284.21	269.78	267.44			
k ₁	89.15	85.13	90.44	91.95			
k ₂	89.56	90.75	90.15	89.52			
k ₃	91.91	94.74	89.93	89.15			
R	2.76	9.61	0.51	2.80			
优方案	A ₃	B ₃	C ₁	D ₁			

【参考文献】

- [1] 彭金咏, 范国荣, 吴玉田. 白花败酱草化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 药学学报, 2006, 41(3): 236.
[2] 杨丁友. 败酱草善治白塞病 [J]. 中医杂志, 2003, 44(1): 12
[3] 张凤梅, 刘璐, 李鑫, 等. 败酱草多糖提取、纯化、鉴定及其体外抗 RSV 作用研究 [J]. 中药材, 2008, 31(12): 1879.

- [4] 朱加进. 苦菜中可溶性多糖提取工艺研究 [J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 138.
[5] 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(122): 117.
[6] 贾淑珍, 王成忠, 于功明. 香菇多糖脱蛋白工艺的研究 [J]. 中国酿造, 2008, 5: 24.

[收稿日期] 2009-11-04

[修回日期] 2009-11-24