

北青龙衣总多糖脱蛋白工艺比较

任晓蕾¹, 霍金海¹, 董文婷¹, 张海燕¹, 王伟明^{1,2*}

(1. 黑龙江省中医药科学院 中药研究所, 哈尔滨 150036;

2. 黑龙江省林下经济资源研发与利用协同创新中心, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:优选北青龙衣总多糖的脱蛋白工艺。方法:以蛋白质脱除率和总多糖保留率为指标,通过单因素试验和正交试验比较 Sevage 法、三氯乙酸法(TCA)、木瓜蛋白酶法、酶-Sevage 联用法及酶-TCA 联用法对北青龙衣总多糖的脱蛋白质效果。结果:木瓜蛋白酶-TCA 法除蛋白效果最好,最佳脱蛋白条件为木瓜蛋白酶用量 3%,酶解时间 2 h,酶解温度 60 ℃,pH 6,TCA 质量分数 6%。蛋白质脱除率 84.76%,总多糖保留率 82.48%。结论:不同脱蛋白法对北青龙衣总多糖中蛋白质脱除效果有明显差异,酶-TCA 法效果最佳且操作简便、耗时短。

[关键词] 北青龙衣;总多糖;脱蛋白质工艺;核桃楸

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0016-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100016

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0925.007.html>

[网络出版时间] 2015-04-01 9:25

Comparison of Deproteinization Process for Total Polysaccharides from Exocarp of Unripe Fruits of *Juglans mandshurica*

REN Xiao-lei¹, HUO Jin-hai¹, DONG Wen-ting¹, ZHANG Hai-yan¹, WANG Wei-ming^{1,2*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China; 2. Heilongjiang Collaborative Innovation Center of Development and Utilization of Forest Resources, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize deproteinization process of total polysaccharides from exocarp of unripe fruits of *Juglans mandshurica*. **Method:** With retention rate of total polysaccharides and deproteinized rate as indexes, effects of Sevage, trichloroacetic acid (TCA), papain, enzyme-Sevage and enzyme-TCA on deproteinization of total polysaccharides were compared and optimized by single factor tests and orthogonal test. **Result:** Effect of papain-TCA method to take off protein was the best, optimum conditions were as follows: papain dosage of 3%, hydrolysis temperature of 60 ℃, hydrolysis time of 2 h, pH of 6, the concentration of TCA 6%. Retention rate of total polysaccharides and deproteinized rate were 82.48% and 84.76%, respectively. **Conclusion:** Deproteinized effects on total polysaccharides from exocarp of unripe fruits of *J. mandshurica* have significant difference by different deproteinized methods, enzyme-TCA combination method is easy to operate with optimum deproteinized effect and short time-consuming.

[Key words] exocarp of unripe fruits of *Juglans mandshurica*; total polysaccharides; deproteinization process; *J. mandshurica*

核桃楸集中分布于我国东北的长白山、完达山和小兴安岭海拔 200~1100 m 的山坡或向阳沟谷中。北青龙衣为其未成熟果实的外果皮^[1],秋季采

收,及时晒干而得,在《开宝本草》及《本草纲目》中均有记载^[2],民间一直应用于消化系统癌症的治疗,国内外均有报道。近年由于北青龙衣在抗肿瘤

[收稿日期] 20140814(004)

[基金项目] 哈尔滨市科技局青年科技创新人才项目(2013RFQYJ056);黑龙江省科技攻关项目(GC12C110);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102-138)

[第一作者] 任晓蕾,硕士,助理研究员,从事中药制剂分析研究,Tel:0451-55665478,E-mail:paopao-009@163.com

[通讯作者] *王伟明,博士,研究员,从事中药新产品研发,Tel:0451-55665478,E-mail:zyyjy@163.com

方面具有突出作用,受到了广泛关注^[3-4],已被2012年版《黑龙江省中药饮片炮制规范及标准》收载。

总多糖作为北青龙衣中主要功效成分,目前关于该成分的报道多集中在其能使荷瘤小鼠红细胞膜的流动性、封闭性明显提高,增强红细胞免疫黏附肿瘤细胞的能力^[5-6],有关其提取方法较少提及,仅涉及初步除杂试验^[7],纯化工艺优选未见报道。总多糖结构与功效密切相关,提高总多糖纯度是结构鉴定的基础,水提取总多糖常含有一定量蛋白质,尽量除去蛋白质而保留总多糖是纯化的重要环节,本实验拟优选高效且有效成分损失小的除蛋白方法,对后期总多糖的分离纯化及结构研究提供参考。

1 材料

UV-160A型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),BP211D型电子天平(德国Sartorius公司),ATC2-5-U型超纯水机(美国艾科浦国际有限公司)。三氯乙酸(TCA,国药集团化学试剂有限公司),考马斯亮蓝(天津市光复精细化工研究所),牛血清蛋白对照品(上海金穗生物科技有限公司,批号20140519),木瓜蛋白酶(活力单位 $>200\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,北京博奥拓达科技有限公司,批号9001-73-4),葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号110833-201205),水为自制超纯水,试剂均为分析纯。北青龙衣于2013年8月采自哈尔滨市宾县铜矿山区,经黑龙江省中医药科学院初冬君主任药师鉴定为核桃楸 *Juglans mandshurica* 的未成熟果实外果皮。

2 方法与结果

2.1 北青龙衣总多糖制备 在前期试验基础上,称取过60目筛的北青龙衣粉末200g,用石油醚于50℃回流1h以脱除脂溶性成分,滤过,滤渣挥干溶剂,加入75%乙醇1L回流提取1h,过滤,滤渣加水1L煎煮2次,每次1h,合并滤液并减压浓缩至50mL,加入3倍量无水乙醇,置4℃冰箱醇沉过夜,离心($4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,10min,下同),沉淀物依次用4倍量无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,干燥至恒重,即得。

2.2 供试品溶液制备 精密称取总多糖样品1g,置100mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 总多糖的含量测定 量取 $0.2016\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖对照品溶液0.1,0.2,0.3,0.4,0.5mL,分别置于10mL试管中,加入5%苯酚溶液1mL,摇匀,加入浓硫酸溶液5mL,摇匀,置沸水浴保温10min,冷却至室温,以水为空白,于490nm处测定吸光度(A),以A为横坐标,质量为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.0978X + 0.0006$ ($r = 0.9995$),线性范围

0.02016~0.1008mg。

2.4 蛋白质的含量测定 量取 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛血清蛋白对照品溶液0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0mL,分别置于试管中,加水稀释至1mL,以水为空白对照,各试管中加入考马斯亮蓝G-250 4.0mL,混匀,室温放置30min,以水为空白,于595nm处测定A,以A为横坐标,质量浓度(C)为纵坐标,得回归方程 $C = 0.0048A + 0.2703$ ($r = 0.9993$),线性范围20~200 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 北青龙衣总多糖脱蛋白方法考察

2.5.1 Sevage法脱蛋白 取供试品溶液40mL,加入三氯甲烷-正丁醇(4:1)混合液10mL,混合振荡20min,离心分去水相与有机相交界面处的变性蛋白质,反复7次直至无沉淀出现^[8]。将上层溶液加水定容至50mL,计算蛋白质去除率分别为26.58%,41.42%,43.65%,47.68%,49.43%,50.48%,52.87%,总多糖保留率79.65%,75.24%,69.42%,64.64%,59.33%,50.67%,44.35%。

2.5.2 TCA法 取供试品溶液40mL,加入一定量20%TCA溶液,使TCA溶液终质量分数分别为2%,4%,6%,8%,10%,静置12h充分反应,3500 $\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min将沉淀去除^[9],取上清液,计算总多糖保留率分别为82.68%,81.33%,80.75%,70.84%,60.95%,蛋白质脱除率依次为46.65%,67.48%,76.89%,77.22%,77.36%。结果表明随TCA加入量增加,蛋白脱除率逐渐提高,当TCA加入量 $>6\%$ 时蛋白质含量几乎不再降低;整个处理过程中总多糖保留率随TCA质量分数的增加而逐步降低,因为过高的三氯乙酸溶液与蛋白质结合沉淀时会吸附总多糖导致损失增大。

2.5.3 木瓜蛋白酶法 取总多糖溶液40mL,调pH后加入一定量木瓜蛋白酶,水浴酶解,反应完成后沸水浴酶灭活5min^[10],放置室温,离心,取上清液测定蛋白质和总多糖含量。选取酶用量、时间、温度和pH为考察因素,以蛋白质脱除率和总多糖保留率的综合评分为指标,通过采用正交试验优选北青龙衣总多糖的木瓜蛋白酶法脱蛋白的工艺条件,试验安排及结果见表1,方差分析见表2。综合评分=(总多糖保留率/83.65) \times 50+(蛋白质脱除率/71.54) \times 50。由直观分析可知,各因素影响脱蛋白工艺的顺序为 $A > C > D > B$ 。选取极差最小的B因素为误差项进行方差分析,结果发现因素A存在极显著性差异,其他因素则均无显著性影响,确定脱蛋白最佳工艺为 $A_2B_2C_3D_2$,即酶用量3%,酶解时

间 2 h, 酶解温度 60 ℃, pH 6。取总多糖溶液 40 mL, 共 3 份, 按优选的工艺重复 3 次试验, 计算平均蛋白质率脱除率 70.29% (RSD 1.5%), 平均总多糖保留率 84.03% (RSD 1.7%), 表明优选的工艺条件稳定可行。

表 1 北青龙衣总多糖的木瓜蛋白酶法脱蛋白工艺正交试验分析
Table 1 Orthogonal test analysis of deproteinization process of total polysaccharides from exocarp of unripe fruits of *Juglans mandshurica* by papain

No.	A 酶用量/%	B 酶解时间/h	C 酶解温度/℃	D pH	总多糖保留率/%	蛋白质脱除率/%	综合评分/分
1	2	1	40	5	72.45	43.26	73.54
2	2	2	50	6	78.66	51.64	83.11
3	2	3	60	7	79.71	52.95	84.65
4	3	1	50	7	81.22	63.34	92.82
5	3	2	60	5	80.56	71.54	98.15
6	3	3	40	6	83.65	66.51	96.48
7	4	1	60	6	69.33	52.74	78.30
8	4	2	40	7	60.85	46.42	68.82
9	4	3	50	5	63.98	43.45	68.61

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	F	P
A	880.823	143.363	<0.01
B(误差)	6.144	1.000	
C	89.137	14.508	>0.05
D	53.316	8.678	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

2.5.4 木瓜蛋白酶-Sevage 法 取总多糖溶液 40 mL, 按 2.5.3 项下优选的工艺脱蛋白, 蛋白质脱除率 71.05%, 采用 Sevage 法继续处理上清液, 结果发现随 Sevage 法处理次数增加, 蛋白质脱除率无明显变化。经 3 次 Sevage 法脱蛋白处理后总多糖保留率由 85.02% 下降至 66.65%, 说明木瓜蛋白酶-Sevage 法未能显著提高蛋白质脱除率, 反而由于有机层包裹使总多糖保留率下降。

2.5.5 木瓜蛋白酶-TCA 法 取总多糖溶液 40 mL, 按 2.5.3 项下优选的工艺脱蛋白, 结果蛋白质脱除率 71.78%, 取上清液加入 TCA 溶液使其终质量分数为 6%, 静置 12 h, 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min 去除沉淀, 蛋白质脱除率提高至 84.76%, 总多糖保留率 82.48%。说明北青龙衣总多糖经酶处理后联合 TCA 法, 蛋白质脱除率显著提高, 同时总多糖保留率稍有下降。

3 讨论

Sevage 法是经典的脱蛋白方法, 由于青龙衣总多糖含糖肽类结构, 在脱除游离蛋白质的同时会除掉和蛋白质结合的总多糖, 处理次数越多, 总多糖损失就越大。TCA 法脱蛋白效果取决于其溶液浓度, 当 TCA 质量分数为 6% 时蛋白质脱除率最高。酶法脱蛋白质的反应条件温和, 可避免总多糖大量降解。酶-Sevage 法联用未能明显提高蛋白脱除率, 同时由于有机层的包裹使总多糖保留率显著降低。酶-TCA 法联用, 酶法水解糖蛋白, 联合 TCA 法使水解后游离蛋白质沉淀, 蛋白质脱除率达到理想状态且总多糖保留率较高。预试验尝试了木瓜蛋白酶、胰蛋白酶等多种酶解法, 发现以木瓜蛋白酶脱蛋白效果最好。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1544.

[2] 周媛媛, 王栋. 青龙衣中二萜基庚烷类成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 92-93.

[3] 李金凤, 施勃, 杜瑞娟, 等. 不同方法提取核桃楸皮挥发油的气质联用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 62-65.

[4] 流传谁, 太志刚, 冯四金, 等. 核桃种皮的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1417-1421.

[5] Zhang W, Liu A H, Li Y, et al. Anticancer activity and mechanism of juglone on human cervical carcinoma HeLa cells[J]. Can J Physiol Pharm, 2012, 90(11): 1553-1558.

[6] Zhang Y L, Cui Y Q, Zhu J Y, et al. The anti-tumor effect and biological activities of the extract JMM6 from the stem-barks of the Chinese *Juglans mandshurica* Maxim on human hepatoma cell line del-7402[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(2): 258-269.

[7] 季宇彬, 陈海继, 汲晨锋. 青龙衣多糖的提取及单糖组分和质量分数测定[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2006, 22(4): 1-4.

[8] 刘莉, 李泳怡, 潘育方. 荔枝核多糖脱蛋白工艺考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 52-55.

[9] Xie L Y, Peng W H, Gan B C. Optimization of protein removal method and condition of polysaccharide from *Phellinus linteus* [J]. Agr Sci Tech, 2011, 12(9): 1249-1251.

[10] 殷洪梅, 尚强, 萧伟. 金银花多糖脱蛋白方法的研究[J]. 中草药, 2010, 41(4): 584-586.

[责任编辑 刘德文]