

黄芪多糖的脱蛋白工艺考察

胡媛媛¹, 吕瑞红¹, 纪永升^{1*}, 褚意新¹, 杜志谦^{1,2}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 洛阳正骨医院, 河南省骨科医院, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 优选黄芪多糖的脱蛋白工艺, 提高黄芪多糖的纯度, 为该有效部位的后续药理研究奠定基础。方法: 采用水提醇沉法提取黄芪多糖, 以黄芪多糖的含量和蛋白质的脱除率为考察指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察酶解时间、酶底比、酶解液 pH 和酶解温度对黄芪多糖脱蛋白工艺的影响, 利用酶-Sevage 法除蛋白。结果: 最佳脱蛋白工艺为酶底比 2.0%, pH 5.0, 50 °C 水浴酶解 24 h; 在该工艺条件下, 蛋白脱除率 87.80%, 黄芪多糖质量分数 83.47%。结论: 优选的脱蛋白工艺条件稳定可行, 酶-Sevage 法可显著提高黄芪多糖的纯度。

[关键词] 黄芪; 多糖; 脱蛋白; 酶-Sevage 法; 工艺优化

[中图分类号] R283.6; R945; R284; O629.73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0025-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200025

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1012.006.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:12

Investigation of Deproteinization of Astragalus Polysaccharide

HU Yuan-yuan¹, LYU Rui-hong¹, JI Yong-sheng^{1*}, CHU Yi-xin¹, DU Zhi-qian^{1,2}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Luoyang Orthopedic-traumatological Hospital, Henan Province Orthopedic Hospital, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** Astragalus polysaccharide is an important active ingredient with the immune regulation, anti-oxidation, anti-cancer, anti-atherosclerosis and so on. To remove the proteins from astragalus polysaccharide is a critical procedure, because the content of protein in astragalus polysaccharide was higher than 15%. In this work, the purity would be improved by removing the proteins from astragalus polysaccharide, which can be in favor of the study on pharmacological activity and mechanisms of this effective site. **Method:** Astragalus polysaccharide was prepared by the water-extraction and alcohol-precipitation method, and the proteins in astragalus polysaccharide were removed by enzymatic-Sevage process, then the technology was optimized with orthogonal test and single factor tests, respectively. Optimum technology was selected based on the purity of astragalus polysaccharide and the content of proteins. **Result:** Optimum process of deproteinization was as follows: the enzyme-substrate ratio of 2.0%, pH of 5.0, hydrolysis for 24 h at 50 °C; under these conditions, the removal rate of proteins and the content of astragalus polysaccharide were 87.80% and 83.47%, respectively. **Conclusion:** This optimal technology is stable and feasible, enzymatic-Sevage method can significantly improve the purity of astragalus polysaccharide.

[Key words] Astragali Radix; polysaccharides; removal of protein; enzymatic-Sevage method; process optimization

[收稿日期] 20170419(016)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(21505034); 河南中医学院省属高校科研专项(2014KYYWF-QN15); 郑州市科技攻关项目(20150305); 河南中医学院科技创新人才项目(2016XCXRC02)

[第一作者] 胡媛媛, 在读硕士, 从事中药质量控制研究, Tel:15515889136, E-mail: huyuan26@126.com

[通讯作者] * 纪永升, 博士, 副教授, 从事基于蛋白质组学技术的中药作用机理研究, Tel:13653803873, E-mail: jiysh13@126.com

黄芪味甘,性微温,具有补气升阳、生津养血、利水消肿、固表止汗、行滞通痹等功效^[1]。其主要化学成分包括多糖类、皂苷类、生物碱类、黄酮类及多种矿物质元素^[2]。黄芪多糖是黄芪根的主要活性成分之一,具有各种重要的生物活性,例如免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病、抗病毒、保肝、抗动脉粥样硬化等^[3]。多糖又称多聚糖,是由醛糖或酮糖通过脱水形成糖苷键,再由糖苷键线性或分枝连接而成的链状聚合物^[4]。据报道黄芪多糖中蛋白质质量分数 >15%,所以除去蛋白质是多糖纯化的关键步骤^[5]。为了提高多糖纯度且保持多糖的生物活性,选择合适的脱蛋白方法尤为关键。常用脱蛋白的方法有 Sevage 法、三氯乙酸(TCA)法、盐酸法、酶法、酶-Sevage 法等,见表 1。

表 1 常用的脱蛋白方法比较

Table 1 Comparison of commonly used methods for protein removal

方法	特点
Sevage 法	操作简便、有机溶剂消耗大、耗时且多糖损失较大 ^[6]
三氯乙酸法	操作简单、易破坏多糖结构 ^[7]
盐酸法	操作简单、多糖损失率较高 ^[8]
酶法	安全无毒、除蛋白效率不高 ^[9]
酶-Sevage 法	操作简单、蛋白脱除率高且多糖损失量小 ^[10]

李晋等^[8]分别采用 Sevage 法、乙酸铅法、盐酸法、三氯乙酸法对洋葱粗多糖进行脱蛋白,结果证实 Sevage 法脱蛋白效果优于其他方法,且多糖的蛋白质脱除率达 79.44%。陈桂冰等^[9]比较了 Sevage 法、三氯乙酸法、聚酰胺法、酶法对茶籽多糖的蛋白脱除效果,结果发现酶法蛋白脱除率最高(74.38%)。龚力民等^[11]利用 Sevage 法、酶法、木瓜蛋白酶-Sevage 法对五倍子多糖进行脱蛋白研究,结果发现木瓜蛋白酶-Sevage 法效果最优,且蛋白质脱除率达 82.1%。综上所述,Sevage 法操作简单,但是步骤冗杂且多糖损失量较大。蛋白酶法反应温和、操作简单且对多糖活性影响小,但受限于酶的专一性特性。采用酶-Sevage 法,在酶促的分解作用下,大部分多糖蛋白解离成蛋白片段,再通过 Sevage 试剂除去游离的蛋白质,能更彻底地除去多糖中的蛋白质,得到纯度更高的多糖。本实验拟采用酶-Sevage 联用法,通过单因素试验和正交试验优选黄芪多糖的纯化工艺,利用综合评分法对试验数据进行分析,旨在探究影响多糖纯化的机制并建立黄芪多糖的纯化工艺。

1 材料

FA2004B 型 1/1 万电子天平(上海越平科学仪器有限公司),FW-100 型粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),VIRTIS 型冻干机(上海斯高勒生物科技有限公司),Evolution 260 Bio 型紫外-可见分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],DF-1 型集热式恒温磁力搅拌器(金坛市中大仪器厂),GL-16G-II 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

黄芪药材购买于郑州市张仲景大药房,粉碎过 2 号筛备用,经河南中医药大学谢小龙副教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根;木瓜蛋白酶(上海强耀生物科技有限公司),牛血清蛋白和葡萄糖(Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 V900933,158968),水为双蒸水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪多糖的提取及纯化工艺流程^[12-13] 取黄芪干粉 50 g,按料液比 1:20 加水回流提取,过滤,收集滤液,重复 3 次,合并滤液,离心(4 000 r·min⁻¹, 10 min,下同),将离心后的水提液浓缩至 200 mL,加 4 倍量无水乙醇醇沉 24 h,重复 3 次,过滤,将沉淀水浴挥干,冷冻干燥 24 h,得粗多糖,利用酶-Sevage 法对黄芪多糖提取液进行脱蛋白处理,收集上清液,100 °C 水浴挥干,收集挥干后的黄芪多糖粉末,冷冻干燥,即得黄芪多糖。

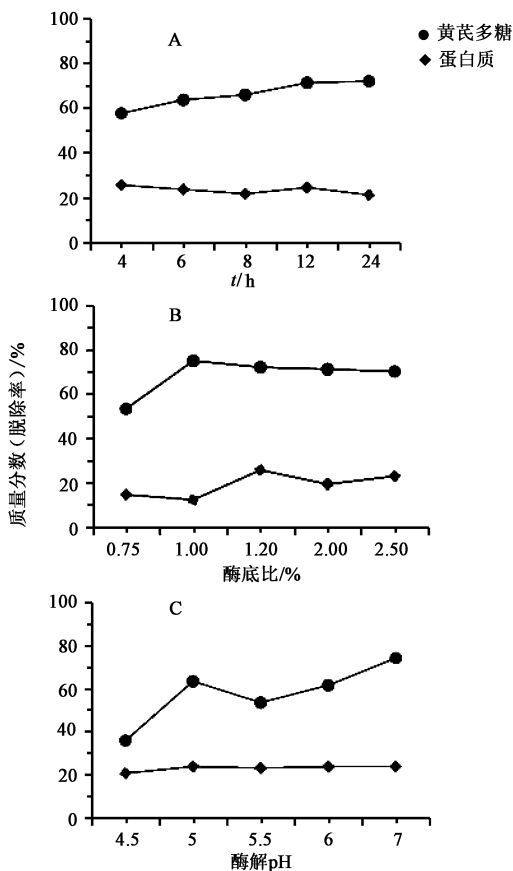
2.2 黄芪多糖的含量测定 采用苯酚-硫酸法,精密称量恒重的葡萄糖,配成 0.1 g·L⁻¹葡萄糖对照品溶液,准确移取该对照品溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加入 6% 苯酚试剂 0.50 mL,浓硫酸 2.50 mL,摇匀后 100 °C 水浴孵育 20 min,待量瓶冷却至室温后,于 490 nm 处测定吸光度 *A*,以葡萄糖质量浓度为横坐标,*A* 为纵坐标,得线性回归方程 $Y = 53.414X + 0.0647$ ($r = 0.9992$),线性范围 5 ~ 25 mg·L⁻¹。

2.3 蛋白质的含量测定 采用考马斯亮蓝法。准确移取 0.1 g·L⁻¹牛血清蛋白对照品溶液 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水补至 5.0 mL,加考马斯亮蓝溶液稀释至刻度,摇匀后静置 5 min,在 595 nm 处测定 *A*,以质量浓度为横坐标,*A* 为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.0526X + 0.491$ ($r = 0.9988$),线性范围 1 ~ 6 mg·L⁻¹。

2.4 黄芪多糖脱蛋白的单因素试验考察 以黄芪多糖含量和蛋白质脱除率为评价指标,分别对酶底比、酶解时间和酶解的 pH 共 3 个因素进行考察。

Sevage 法操作为将 Sevage 试剂 [三氯甲烷-正丁醇 (4:1)] 加入粗多糖酶解溶液中 [黄芪多糖水溶液-Sevage 试剂 (3:1)], 振荡, 置于分液漏斗中, 静置 15 min, 完全分层后除去两相交界处的凝胶状变性蛋白质及下层有机相, 收集上层溶液于 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 除去残留的有机溶剂和不溶物, 重复 2 次, 合并上清液, 水浴挥干, 冷冻干燥后计算黄芪多糖含量及蛋白脱除率。蛋白脱除率 = (粗多糖中蛋白质质量 - 提纯后蛋白质质量) / 粗多糖中蛋白质质量 $\times 100\%$ 。

2.4.1 酶解时间 称取粗多糖样品 200.0 mg, 加水 (pH 7.0, 下同) 超声使溶解, 加入 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 木瓜蛋白酶溶液 2.0 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加水定容, 在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴酶解, 酶解完成后用 Sevage 试剂处理, 收集上清液, 水浴挥干, 冷冻干燥 24 h, 按 2.2 和 2.3 项下方法测定黄芪多糖和蛋白质的含量。对酶解时间进行考察, 分别研究酶解 4, 6, 8, 12, 24 h 对蛋白脱除率及黄芪多糖含量的影响, 每组试验重复 3 次。结果见图 1。



A. 酶解时间; B. 酶底比; C. 酶解 pH

图 1 黄芪多糖脱蛋白效果的单因素试验考察

Fig. 1 Single factor tests for deproteinization of astragalus polysaccharide

2.4.2 酶底比 对酶底比进行考察, 研究酶底比为

0.75% ~ 2.50% 时对黄芪多糖的纯化效果。精密称取粗多糖样品 200.0 mg, 用水溶解, 加入适量木瓜蛋白酶, 加水定容于 100 mL 量瓶中, 在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴酶解 8 h, 用 Sevage 法萃取 2 次, 取上层清液水浴挥干, 冷冻干燥 24 h, 按 2.2 和 2.3 项下方法测定黄芪多糖和蛋白质的含量, 每组试验重复 3 次, 结果见图 1。

2.4.3 酶解液 pH 对酶解溶液 pH 进行考察, 分别研究了 pH 为 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 时对黄芪多糖的纯化效果。精密称取粗多糖样品 200.0 mg, 用相应 pH 的水溶液溶解, 加入 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 木瓜蛋白酶溶液 2.0 mL, 加相应 pH 的水溶液定容于 100 mL 量瓶中, 在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴酶解 8 h, 用 Sevage 法萃取 2 次, 取上清液水浴挥干, 冷冻干燥 24 h, 按 2.2 和 2.3 项下方法测定黄芪多糖含量和蛋白质的含量, 每组试验重复 3 次, 结果见图 1。

酶解反应时间、酶底比与酶解液 pH 与蛋白质酶解反应密切相关, 三者对蛋白脱除率及黄芪多糖含量有重要影响。蛋白质酶解反应的完全程度随反应时间的延长而增加。所以酶解时间的增加, 蛋白质含量下降, 黄芪多糖含量上升; 当酶解反应达到一定程度时, 酶解时间的延长并不能增加蛋白的酶解反应程度, 反应时间 $> 12\text{ h}$ 后, 黄芪多糖含量和蛋白质脱除率无明显提高。酶底比显著影响蛋白酶解反应效率, 随着酶底比的升高, 酶解效率增高, 黄芪多糖含量升高, 最后趋于平衡, 而蛋白质含量则有增有减, 可能由以下 2 个方面引起的。①木瓜蛋白酶能将蛋白从多糖蛋白复合物中切除, 酶底比越高蛋白的切除率越高, 而后游离的蛋白质被 Sevage 试剂除去。②木瓜蛋白酶本身也是 1 种蛋白质, 酶底比过高可能会有部分木瓜蛋白酶与多糖形成复合物, 在后续的 Sevage 法除去蛋白的过程中无法完全除去, 从而导致酶底比增加, 蛋白质含量反而增加的结果。蛋白酶解反应过程中, pH 影响了酶的活性, 木瓜蛋白酶在弱酸性^[7]或中性^[14]环境中活性较大, 在不同的 pH 条件下黄芪多糖含量不同, pH 5 ~ 7 时结果较优。

2.5 正交试验考察 由单因素试验结果可知, 不同酶解时间、酶底比和酶解液 pH 对黄芪多糖的纯化均有一定的影响, 综合考虑黄芪多糖含量及蛋白脱除率的结果, 将酶解时间的水平设为 8, 12, 24 h, 酶底比水平设置 0.75%, 1.00%, 2.00%, 将酶解 pH 的水平设定 5.0, 6.0, 7.0, 温度水平设定为 40, 50, 60 $^{\circ}\text{C}$ ^[10, 14], 按相应的条件进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 试

验安排及结果见表 2。准确称量黄芪粗多糖粉末 200 mg, 分别在相对应条件下平行进行 9 组试验, 纯化后黄芪多糖冷冻干燥 24 h, 准确称取冻干的黄芪多糖 10 mg, 加相应 pH 的水溶液定容至 100 mL 量瓶中, 以黄芪多糖的含量和蛋白质的脱除率为考核指标, 两者重要程度相等, 采用综合评分法对 2 种指标的评分进行加和处理, 方差分析见表 3。由直观分析可知, 影响黄芪多糖脱蛋白质效率的各因素主次关系为 $D > C > A > B$ 。以极差最小的 B 因素为

误差项, 结果发现因素 D 具有显著性影响, 因素 A , C 则无显著性影响, 确定脱蛋白的最佳组合为 $A_3B_3C_2D_1$, 即酶底比 2.0%, 酶解液 pH 5.0, 50 °C 水浴酶解 24 h; 黄芪多糖的蛋白脱除率 89.82%, 黄芪多糖质量分数 83.48%。取 3 份黄芪粗多糖粉末, 每份 200 mg, 按最佳脱蛋白工艺进行验证试验, 结果黄芪多糖质量分数分别为 85.29%, 81.33% 和 83.80%, 蛋白质脱除率为 90.37%, 85.55% 和 87.48%, 表明优选的工艺条件稳定可行。

表 2 黄芪多糖脱蛋白工艺的正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of deproteinization of astragalus polysaccharide

No.	A 酶解时间/h	B 酶底比/%	C 温度/°C	D 酶解液 pH	黄芪多糖质量分数/%	蛋白质脱除率/%	综合评分
1	8	0.75	40	5	74.83	91.19	166.02
2	8	1.00	50	6	75.10	92.57	167.67
3	8	2.00	60	7	77.32	81.83	159.15
4	12	0.75	50	7	77.90	83.62	161.52
5	12	1.00	60	5	82.80	82.52	165.32
6	12	2.00	40	6	77.15	86.38	163.53
7	24	0.75	60	6	76.49	87.20	163.69
8	24	1.00	40	7	70.80	88.72	159.52
9	24	2.00	50	5	83.48	89.82	173.30

表 3 综合评分的方差分析

Table 3 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	6.363	3.182	1.580	>0.05
B(误差)	4.027	2.013		
C	42.919	21.460	10.658	>0.05
D	100.995	50.498	25.080	<0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

3 讨论

本实验分别采用苯酚-硫酸法和考马斯亮蓝法测黄芪多糖和蛋白质的含量。苯酚-硫酸法具备灵敏度高、稳定性好等优点, 为了保证本实验结果的准确性, 需保证葡萄糖对照品恒重。考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合反应十分迅速而稳定, 静置 5 min 后即可进行测定, 该法灵敏度高、操作简单、显色剂易配制且显色稳定, 是目前较好的测量蛋白质含量的方法。

单因素试验考察是在其他条件不变的前提下进行的, 这并不能全面反应各因素之间的相关性。故本实验在单因素试验结果的基础上, 分别选出了 3 个较优水平进行正交试验, 使结果更能接近真实值。

正交试验以黄芪多糖的含量和蛋白质的脱除率为评价指标, 采用综合评分法对 2 种指标进行评分。结果发现酶解时间和酶底比对指标项影响程度均较低。比较不同水平的 K 值发现, 随着反应时间的增加, 不同水平的指标有增有减, 除了与黄芪多糖干燥程度有关, 与其本身存在大量的结合糖蛋白也有关。由于酶在一定的温度范围内有良好活性, 所以随着温度的增加, 不同水平的指标有增有减。正交试验由较优组合得到黄芪多糖质量分数 83.48%, 蛋白质脱除率 89.82%, 与文献中蛋白质脱除率 91.20% 和多糖损失率 14.45% 的结果相当^[13], 优于酶法^[15] (多糖质量分数 75.6%, 蛋白质脱除率 89.1%) 和 Seavage 法^[16] (蛋白质质量分数下降 70.80%, 即为蛋白质脱除率) 结果好。文献[5]运用 732 型树脂静态吸附法对黄芪多糖进行脱蛋白试验, 得到黄芪多糖质量分数 88.6%, 蛋白质脱除率 86.7%, 结果与本实验相当, 但树脂法周期长且操作冗杂。

从植物中提取的多糖大多数含有大量蛋白质, 所以除去多糖中的蛋白质是多糖纯化的重要步骤。Seavage 法^[6]只能除去水溶性的蛋白质, 步骤冗杂、有机试剂的消耗量大, 且多糖损失量大。TCA 法^[7]

操作较简便,但除蛋白时反应较剧烈,易造成多糖降解而结构破坏。三氟三氯乙烷法^[17]的酸性作用也易影响多糖的活性,并且三氟三氯乙烷易挥发,不宜在工业生产中大量使用。盐酸法^[17]操作简单,蛋白脱除彻底,但多糖损失率较高。以上方法都使用了大量有机试剂,易造成有机残留,不宜大规模使用。盐析法^[18]操作简单,蛋白脱除彻底,多糖损失率较低,主要用于多糖的粗提。阴离子交换树脂法^[17]条件比较温和、成本低、可循环利用且不会改变多糖的性质,但除蛋白效率较差,需重复操作多次。蛋白酶法^[9]安全、无毒害残留,但受限于酶的专一性,除蛋白的效率不高。采用酶-Sevage法^[10]时,多糖蛋白经过酶解处理后,蛋白质与糖链解离,且被酶解成蛋白质片段,有利于 Sevage 试剂沉淀除去蛋白质,联用法不仅可以提高蛋白脱除率,不会破坏多糖的结构,并且减少了有机试剂的用量。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:302-303.
[2] 李钦,胡继宏,高博,等. 黄芪多糖在免疫调节方面的最新研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):199-206.
[3] 杜晋平,肖立新,罗静波. 黄芪多糖作用研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2013,34(4):39-41.
[4] 邱飞,王晓,刁勇,等. 麦冬多糖的结构研究进展[J]. 海峡药学,2015,27(5):8-11.
[5] 高美风,俞婷婷. 黄芪多糖中脱蛋白方法的研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(3):614-615.

[6] 张英洁,耿岩玲,王晓,等. 铁皮石斛原球茎多糖提取及脱蛋白工艺研究[J]. 山东科学,2016,29(3):7-12.
[7] 张慧玲,任秀莲,魏琦峰,等. 海带多糖的脱蛋白研究[J]. 中成药,2008,30(9):1370-1373.
[8] 李晋,齐红志,夏河山,等. 洋葱粗多糖脱蛋白质方法比较[J]. 河南农业科学,2015,44(4):164-168.
[9] 陈桂冰,孙培冬,季晓彤,等. 茶籽多糖的提取及脱蛋白工艺研究[J]. 中国油脂,2016,41(8):74-77.
[10] 王光宁,麦咏相,李炳锋. 蛋白酶-Sevage法去除木瓜总多糖中蛋白质的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):49-53.
[11] 龚力民,刘伟,张楚晗,等. 五倍子多糖脱蛋白方法的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2013,33(3):44-46.
[12] 王瑞遵. 黄芪多糖的分离纯化及体外抗氧化活性研究[D]. 郑州:郑州大学,2010.
[13] 樊志强. 黄芪多糖提取纯化工艺研究进展[J]. 农业科技与装备,2016(9):39-44.
[14] 刘小攀,田启建,田春莲. 黄精多糖酶法脱蛋白的工艺研究[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):238-242.
[15] 闫巧娟,韩鲁佳,江正强. 酶法脱除黄芪多糖中的蛋白质[J]. 食品科技,2004,29(6):23-26.
[16] 夏泉,刘钢,葛朝亮,等. Sevage法去除黄芪粗多糖中蛋白质成分的研究[J]. 安徽医药,2007,11(12):1069-1071.
[17] 王珊,黄胜阳. 植物多糖提取液脱蛋白方法的研究进展[J]. 食品科技,2012,37(9):188-191.
[18] 傅冰,季秀玲,俞汇颖,等. 盐析法快速分离鸡蛋清卵白蛋白[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):229-230.

[责任编辑 刘德文]