

荔枝核多糖脱蛋白工艺考察

刘莉,李泳怡,潘育方*

(广东药学院药科学院,广州 510006)

[摘要] **目的:**优选荔枝核多糖的脱蛋白工艺。**方法:**以多糖保留率和脱蛋白率为综合评价指标,选取酶用量、酶解时间、酶解 pH,酶解温度为影响因素,采用正交试验优选木瓜蛋白酶法对荔枝核多糖的脱蛋白工艺;以多糖保留率和脱蛋白率为指标,比较木瓜蛋白酶法、沙维积法(Sevag 法)、三氯乙酸法、酶-Sevag 联合法、酶-三氯乙酸联合法和三氯乙酸-Sevag 联合法 6 种方法对荔枝核多糖的脱蛋白效果。**结果:**木瓜蛋白酶法脱蛋白最佳工艺条件为酶用量 4%,酶解时间 1 h,pH 6,酶解温度 45℃,脱蛋白率 70.2%,多糖保留率 82.9%;酶-Sevag 联合法的脱蛋白效果最佳,在酶法处理的基础上,Sevag 试剂处理 2 次,脱蛋白率高达 91.45%,多糖保留率 71.42%。**结论:**不同脱蛋白法对荔枝核的脱蛋白效果有明显差异,酶-Sevag 联合法的脱蛋白效果最佳,可推广于大生产使用。

[关键词] 荔枝核;多糖;脱蛋白;酶-Sevag 联合法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0052-04

Investigation of Deproteinized Technology for Polysaccharide from *Litchi chinensis*

LIU Li, LI Yong-yi, PAN Yu-fang*

(College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize deproteinized technology of polysaccharide from *Litchi chinensis*. **Method:** With retention rate and deproteinized rate of polysaccharide as comprehensive evaluation indexes, the amount of enzyme, enzymatic time, pH and temperature were selected as factors, deproteinized technology of polysaccharide from *L. chinensis* was optimized by orthogonal test with papain; With retention rate and deproteinized rate of polysaccharide as index, deproteinized effect of six methods including papain, Sevag, TCA, Enzyme-Sevag, Enzyme-TCA and TCA-Sevag on polysaccharide from *L. chinensis* were compared. **Result:**

[收稿日期] 20120806(006)

[第一作者] 刘莉,硕士,从事药物新剂型的开发与利用研究,Tel:13729881906,E-mail:liuli0706@yahoo.com.cn

[通讯作者] *潘育方,教授,硕士生导师,从事药物新剂型的开发和利用研究,Tel:02039352119,E-mail:p34074683@126.com

确,可靠的控制金莲花分散片的质量。溶出度实验表明,自制的金莲花分散片满足速释的要求。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:828.
 [2] 杨雅信,张贵君.金莲花70%乙醇浸液中黄酮碳苷类成分的研究[J].黑龙江医药,2006,19(4):93.
 [3] 中国药典.二部[S].2010:附录IA.
 [4] 任祥友,蒋瑞芹,崔玉芹.板蓝根分散片制剂工艺研究[J].中国当代医药,2010,17(5):116.
 [5] 陈卫卫,覃洁萍,许晨霞.藤茶素分散片的制备与含量

测定[J].中国新药杂志,2008,17(20):1776.

[6] 叶虹,郑超一,张勇.分散片的处方设计[J].齐鲁药事,2005,24(3):176.
 [7] 刘跃林.中药分散片的研究进展[J].中国医药导报,2009,6(3):160.
 [8] 韩笑,季淑梅.金莲花分散片的制备工艺研究[J].中成药,2008,30(10):1542.
 [9] 陶华明,王隶书,程东岩,等.妇炎康分散片制备工艺研究[J].中国中药杂志,2005,30(22):1742.

[责任编辑 全燕]

Optimum deproteinized technology of papain was: the amount of papain 4%, time 1 h, pH 6, temperature 45 °C, retention rate and deproteinized rate of polysaccharide were 82.9%, 70.2%, respectively; Enzyme-Sevag method had optimum deproteinized effect, basis on enzymatic method, processed 2 times with Sevag, retention rate of polysaccharides was 71.42%, and deproteinized rate was up to 91.45%. **Conclusion:** Deproteinized effect on polysaccharide from *L. chinensis* had significant difference by different deproteinized method, enzyme-Sevag combined method had optimum deproteinized effect, it could be extended to application of large-scale production.

[**Key words**] *Litchi chinensis*; polysaccharide; deproteinized; enzyme-Sevag combined method

荔枝核具有行气散结、祛寒止痛的功效,临床可用于治疗寒疝腹痛、睾丸肿痛^[1],现代研究表明其具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖、保肝等多种药理活性^[2-3]。目前对荔枝核的研究多集中在其含有的黄酮类、皂苷类化合物^[4],对多糖成分研究较少。荔枝核多糖是荔枝核重要的有效成分,含量仅次于黄酮类(2.85%~3.34%)^[5]。研究表明荔枝核多糖提取物对糖尿病模型小鼠具有降血糖、调血脂和保护肝脏、肾脏的作用^[6]。本试验以多糖保留率和脱蛋白率为指标,对荔枝核多糖的脱蛋白工艺进行研究,旨在得到一种荔枝核多糖脱蛋白效率高且有效成分损失小的方法。

1 材料

荔枝核(广州市药材公司中药饮片厂,批号YPA0K0001,经广东药学院中药学院刘基柱副教授鉴定为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子),荔枝核多糖(实验室自制,多糖浓缩液1 mL相当于荔枝核药材50 g),葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号110833-200904),牛血清白蛋白(上海阳美生物科技有限公司),考马斯亮蓝 G-250(上海蓝季科技发展有限公司),木瓜蛋白酶(上海蓝季科技发展有限公司),试剂均为分析纯,721型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),BL-220H型电子天平(日本岛津),PHS-25型pH计(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 荔枝核多糖的制备 称取500 g荔枝核粉末(粉碎,干燥,过60目筛),石油醚回流脱脂溶性成分(50 °C,2次,每次1 h),热水水浴提取(80 °C),过滤,减压浓缩至50 mL,加4倍量95%乙醇沉淀多糖,4 °C冷藏过夜,4 000 r·min⁻¹离心,取沉淀用蒸馏水定容至5 mL,为荔枝核多糖浓缩液。

2.2 含量测定

2.2.1 多糖含量测定^[7] 采用苯酚-硫酸法测定。以葡萄糖对照品制作标准曲线,水为空白对照,于

490 nm处测定吸光度(A)。以葡萄糖治疗浓度为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0194X - 0.2753$ ($r = 0.9991$)。葡萄糖在24~48 mg·L⁻¹呈良好的线性关系。

2.2.2 蛋白质含量测定^[8] 采用考马斯亮蓝 G-250法。以牛血清白蛋白(BSA)制作标准曲线,水为空白对照,在595 nm波长处测定A,以A对蛋白质质量浓度进行回归处理,得回归方程 $A = 0.0089X + 0.0052$ ($r = 0.9990$)。表明蛋白质在4~90 mg·L⁻¹具良好的线性关系。

2.3 荔枝核多糖脱蛋白的工艺考察

2.3.1 酶法脱蛋白工艺的优选 取适量荔枝核多糖浓缩液,稀释100倍,作为多糖样品液。选用木瓜蛋白酶进行酶解,根据酶法脱蛋白的工艺要求,选取酶用量、酶解时间、pH及酶解温度为考察因素,以脱蛋白率和多糖保留率为综合评价指标,按L₉(3⁴)正交表安排试验,采用综合加权评分综合法优选酶法脱蛋白的工艺条件,由于本试验主要目的为脱蛋白工艺优化,故将蛋白脱除率作为主要考察因素,权重系数0.6,多糖保留率作为次要因素,权重系数0.4。因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表1 荔枝核多糖的酶法脱蛋白L₉(3⁴)

正交试验因素水平				
水平	A 酶用量/%	B 酶解时间/h	C pH	D 酶解温度/°C
1	3	0.5	5	35
2	4	1	6	45
3	5	2	7	60

多糖保留率 = 处理后多糖的含量/处理前多糖含量 × 100% ;

蛋白脱除率 = (处理前蛋白含量 - 处理后蛋白含量) / 处理前蛋白含量 × 100% ;

综合评分 = 0.6 × 蛋白脱除率/蛋白脱除率最大值 + 0.4 × 多糖保留率/多糖保留率最大值

表 2 荔枝核多糖的酶法脱蛋白 L₉(3⁴) 正交试验

No.	A	B	C	D	脱蛋白率 /%	多糖保 留率 /%	Y
1	1	1	1	1	25.6	84.2	0.62
2	1	2	2	2	58.2	73.9	0.84
3	1	3	3	3	38.7	69.5	0.66
4	2	1	1	1	32.4	78.6	0.65
5	2	2	2	2	70.2	82.9	0.99
6	2	3	3	3	63.6	81.1	0.92
7	3	1	1	1	47.1	79.3	0.77
8	3	2	2	2	52.7	72.4	0.79
9	3	3	3	3	71.2	67.2	0.92
K ₁	0.707	0.680	0.777	0.843			
K ₂	0.853	0.873	0.803	0.843			
K ₃	0.827	0.833	0.807	0.700			
R	0.146	0.193	0.030	0.143			

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.037	2	18.5	
B	0.062	2	31.0	<0.05
C(误差)	0.002	2	1	
D	0.041	2	20.5	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由表 2 可知,各因素的影响主次为 $B > A > D > C$,即酶解时间 > 酶用量 > 酶解温度 > pH,以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果因素 B, D 因素各水平存在显著性差异。确定荔枝核多糖的最佳酶法脱蛋白工艺为 A₂B₂C₂D₂,即酶用量 4%,酶解时间 1 h, pH 6,酶解温度 45 ℃,此时脱蛋白率 70.2%,多糖保留率 82.9%。

2.3.2 沙维积法(Sevag 法)脱蛋白 取多糖浓缩液稀释 100 倍,加入 1/4 体积的正丁醇-三氯甲烷混合液(1:4),高速搅拌 30 min, 3 500 r·min⁻¹离心 20 min,取出上层多糖溶液,弃去下层有机相和蛋白沉淀,重复 6 次操作,测定蛋白脱除率和多糖保留率。见图 1。

由图 1 可知,随 Sevag 法次数增加,脱蛋白率有所增加,最大可达到 67%,但多糖保留率也出现明显的降低。综合考虑,Sevag 法脱蛋白最佳工艺为萃取 3 次,此时脱蛋白率 50.24%,多糖保留率 52.81%。

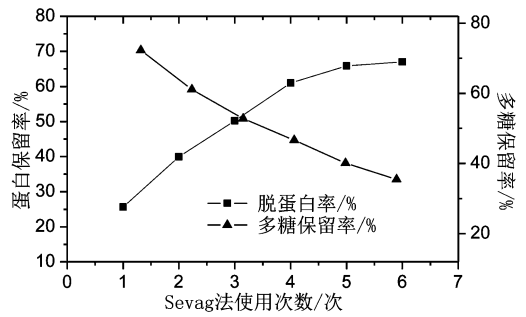


图 1 荔枝核多糖的 Sevag 法脱蛋白效果

2.3.3 三氯乙酸法脱蛋白 取多糖浓缩液稀释 100 倍,加入 5 ~ 90 g·L⁻¹质量浓度不等的三氯乙酸,混匀,于 4 ℃冰箱静置过夜,3 500 r·min⁻¹离心 20 min,取上清液,测定蛋白脱除率和多糖损失率。见图 2。

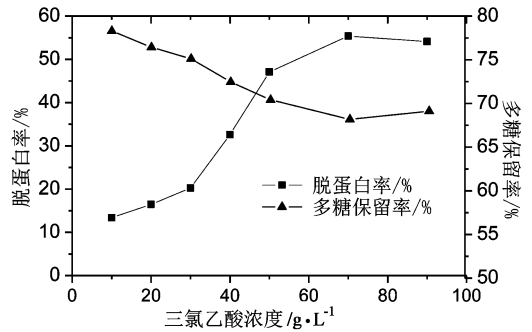


图 2 荔枝核多糖的三氯乙酸法脱蛋白效果

由图 2 可见,三氯乙酸脱蛋白质量浓度在 40 ~ 70 g·L⁻¹时,脱蛋白率明显提高,脱蛋白率最高为 55.38%。综合多糖保留率和脱蛋白率分析,确定三氯乙酸最佳质量浓度 70 g·L⁻¹,此时脱蛋白率 55.38%,多糖保留率 68.17%。

2.3.4 酶-Sevag 联合法脱蛋白 按酶法的最佳工艺与 Sevag 法相结合对荔枝核脱蛋白,测定蛋白脱除率和多糖损失率。见图 3。

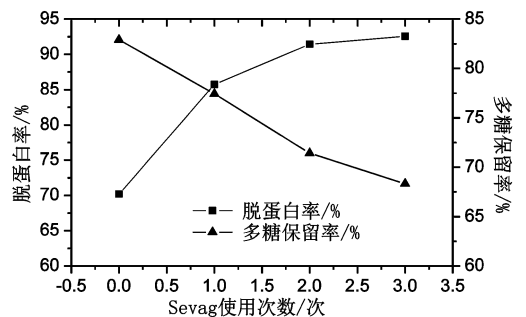


图 3 荔枝核多糖的酶-Sevag 联合法脱蛋白效果

由图3可见,当使用酶法优化条件后,脱蛋白率可达到70%,接着使用2次Sevag法脱蛋白,蛋白沉淀率可达到91%,之后增加萃取次数脱蛋白率增加不明显,同时降低了多糖保留率。故确定酶-Sevag联合法的最优工艺为酶用量4%,酶解时间1h,pH6,酶解温度45℃,Sevag法使用2次,蛋白脱除率可达到91.45%,多糖保留率71.42%。

2.3.5 酶-三氯乙酸联合脱蛋白法脱蛋白 采用酶法最优工艺进行脱蛋白后,再用质量浓度为 $70\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸法对荔枝核多糖继续脱蛋白,结果脱蛋白率74.94%,多糖保留率70.25%。说明荔枝核多糖经酶法处理后,再用三氯乙酸处理,脱蛋白率的提高不太显著,且多糖保留率降低较多。

2.3.6 三氯乙酸-Sevag联合法脱蛋白 采用 $70\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸法脱蛋白后,使用Sevag法脱蛋白数次,测定蛋白脱除率和多糖损失率。见图4。

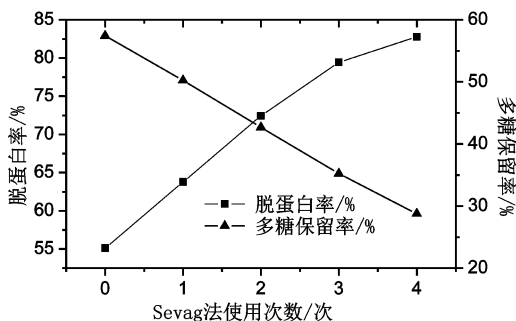


图4 荔枝核多糖的三氯乙酸-Sevag联合法脱蛋白效果

由图4可知,采用 $70\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸法脱蛋白后,使用Sevag法数次,蛋白脱除率可从55.12%增加到82.77%,但这种联合法的反应条件较激烈,多糖损失率较高。综合考虑,三氯乙酸-Sevag联合法脱蛋白最佳工艺为 $70\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三氯乙酸+Sevag法2次,此时脱蛋白率72.44%,多糖保留率42.67%。

3 讨论

由试验结果可知,酶-Sevag联合法的脱蛋白率明显高于其他5种方法,Sevag法的蛋白脱除率最低,酶法的多糖保留率最高,三氯乙酸-Sevag法的多糖保留率最低。目前多糖纯化的重要部分为蛋白质的脱除,常用的有酶法、Sevag法和三氯乙酸法。

Sevag法是去除游离多糖的有效方法,但对部分与蛋白质结合紧密的蛋白聚糖和糖蛋白较难除去,图1表明荔枝核多糖属于与蛋白紧密结合型,用Sevag法的脱除效率不高,且每次除去蛋白质乳胶状物时,都会将少量黏附的多糖一并除去,造成多糖的损失,次数越多,损失越多,导致Sevag法多糖损失最为严重。三氯乙酸法脱蛋白条件剧烈,其原理是与大分子蛋白质结合成不溶性盐,从而使蛋白沉淀下来,三氯乙酸的质量浓度对脱蛋白效率有较大影响,但当蛋白结构较复杂和致密时,三氯乙酸难以渗入内部,使蛋白无法完全沉淀。酶法是去蛋白较温和且高效的方法,有利于保持多糖的活性,但在酶解时产生的多肽会游离于水中,降低酶法的蛋白脱除效率,将酶法与Sevag法结合,由于酶可水解掉蛋白质,使黏附在多糖上的蛋白游离出来,使Sevag法的蛋白沉淀率增大,近年研究表明酶法-Sevag联合法脱蛋白效率高,且多糖损失较小^[9]。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:227.
- [2] 邓志军,郭杰文,潘竞镛.荔枝和荔枝核及其有效部位的药理及药效学作用[J].今日药学,2009,19(5):1673.
- [3] 欧士钰,罗伟生,靳雅玲,等.荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织MMP-2表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):209.
- [4] 王玉芝,于天霞,王嘉滨.荔枝核中总皂苷的提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):48.
- [5] 陆志科,黎深.荔枝核活性成分分析及其提取物抗氧化性能研究[J].食品科学,2009,30(33):110.
- [6] 袁红.荔枝核多糖提取物对四氧嘧啶致糖尿病小鼠降糖作用[J].健康研究,2010,30(4):252.
- [7] 翁雪城,袁红.蒽酮-硫酸法测定荔枝核中可溶性多糖含量[J].杭州师范学院学报:医学版,2007,27(2):107.
- [8] 孔凡利,张名位,于淑娟,等.荔枝粗多糖脱蛋白方法的研究[J].食品科技,2008,10(5):142.
- [9] 刘延吉,祝寰宇.沙棘多糖脱蛋白工艺的优化研究[J].河南农业科学,2008,8(3):83.

[责任编辑 全燕]