

透析法制备低相对分子量人参糖肽的工艺及其性质考察

王颖, 陈英红, 罗浩铭, 姜瑞芝*
(吉林省中医药科学院, 长春 130012)

[摘要] 目的: 探讨透析法制备低相对分子量人参糖肽的工艺, 并对其理化性质、纯度与相对分子量分布进行研究。方法: 以理化性质及收率为考察指标, 单因素试验对透析制备低相对分子量人参糖肽的工艺进行考察, 采用 HPLC 及 GPC 软件测定纯度与分子量分布。结果: 制备工艺确定为采用截流相对分子量 1 000 Da 透析袋, 加入 6 L 水透析 4 h。制备的人参糖肽总糖肽质量分数 92.49%, 收率 18.95%, 确定为相对分子量在 300-3 500 Da 的混合物。结论: 采用透析法制备低相对分子量人参糖肽操作简便易行, 总糖肽含量较高, 相对分子量较低。

[关键词] 人参; 糖肽; 透析; 理化性质; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0014-03

Investigation of Preparation Technology and Property for Low Molecular Weight Glycopeptide from *Panax ginseng* by Dialysis Method

WANG Ying, CHEN Ying-hong, LUO Hao-ming, JIANG Rui-zhi*
(Jilin Academy of Chinese Medicine Sciences, Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate preparation process of low molecular weight glycopeptide from *Panax ginseng* by dialysis method, and study on its physical and chemical properties, purity and molecular weight distribution. **Method:** With physical and chemical properties and yield as indexes, preparation technology of low molecular weight glycopeptide from *P. ginseng* by dialysis was investigated by single-factor test, purity and molecular weight distribution were determined by HPLC and GPC software. **Result:** Preparation process was: closure molecular weight of dialysis bag 1 000 Da, added 6 L water and dialysis time 4 h. The content of total glycopeptide from *P. ginseng* was 92.49%, yield was 18.95%, it was a mixture with molecular weight 300-3 500 Da. **Conclusion:** This preparation technology of dialysis was simple, the content of total glycopeptide was high, and molecular weight was low.

[Key words] *Panax ginseng*; glycopeptides; dialysis; physical and chemical properties; HPLC

人参是我国名贵中草药, 临床应用历史悠久, 对神经虚弱、高血压、糖尿病、贫血等很多疾病均有显著疗效^[1]。其有效成分较多, 其中人参糖肽具有降血糖作用^[2], 目前市面已售的人参糖肽注射液分子

量为 6 000 Da, 肽部分由天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸 16 种氨基酸组成, 糖部分结构为(1→4)葡萄糖、(1→4, 6)半乳糖、(1→4)阿拉伯糖、(1→5)阿拉伯糖, 阿拉伯糖和葡萄糖为主要末端, 分枝点在葡萄糖的 6 位与半乳糖的 4 或 6 位^[3]。但对于低相对分子量(< 5 000 Da)人参糖肽的制备研究国内外鲜有报道。本试验通过对透析袋的规格、透析时间及透析外液用水量进行考察, 以理化性质及收率为考察指标, 制备出低相对分子量人参糖肽。

[收稿日期] 20120416(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173532); 吉林省科技发展计划项目(201201086)

[第一作者] 王颖, 博士, 从事天然药物化学研究, Tel: 0431-86058667, E-mail: wangying02231@sina.com

[通讯作者] *姜瑞芝, 学士, 从事中药、天然药物化学研究, Tel: 0431-86058660, E-mail: zhongyanjrz@yahoo.com.cn

1 材料

752型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司产品),中空纤维超滤器(截留相对分子质量3 000 Da,北京旭邦膜设备有限责任公司产品)。截流相对分子质量为100 Da,200 Da和1 000 Da透析袋(西安罗森伯科技有限公司),LC-10AT型高效液相色谱系统(日本岛津),Shodex Ohpak SB-802型色谱柱(日本昭和电工)。

葡萄糖醛酸、牛血清蛋白与标准葡聚糖 Dextran T系列对照品均购自 Sigma公司(批号分别为101K5309,LC143026,428103/1,45044/1),其他试剂均为国产分析纯,人参水提物购自吉林宏久生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 超滤处理与理化性质及纯度与相对分子质量测定 称取人参水提物100 g,加入3 L水,搅拌至完全溶解,通过中空纤维超滤器超滤,浓缩干燥后得34 g相对分子质量<3 000 Da的超滤液(PGD)。分别采用苯酚-硫酸法(以葡萄糖为对照品)^[4-5],Lowry法(以牛血清蛋白为对照品)^[6]、间羟基联苯法(以葡萄糖醛酸为对照品)^[7]测定总糖、蛋白质与糖醛酸含量。

采用高效液相凝胶色谱分析系统测定纯度,以标准葡聚糖 Dextran T系列制作标准曲线,利用GPC软件计算相对分子质量分布。PGD理化性质测定结果见表1。说明其糖肽纯度偏低,仅47.83%,因此需进一步纯化以提高其纯度。

表1 人参超滤液理化性质测定 %

| 样品 | 总糖质量分数 | 蛋白质质量分数 | 糖醛酸质量分数 | 收率 |
|--------|--------|---------|---------|-------|
| PGD | 18.19 | 17.20 | 2.44 | |
| PGD-1 | 37.34 | 34.22 | 4.00 | 20.32 |
| PGD-2 | 13.70 | 14.04 | 2.59 | 79.23 |
| PGD-3 | 35.98 | 43.03 | 4.32 | 18.00 |
| PGD-4 | 17.44 | 10.65 | 1.80 | 79.82 |
| PGD-5 | 30.88 | 37.16 | 3.21 | 20.03 |
| PGD-6 | 18.26 | 6.67 | 1.61 | 75.31 |
| PGD-7 | 36.08 | 35.67 | 4.76 | 21.70 |
| PGD-8 | 33.52 | 30.61 | 4.18 | 26.97 |
| PGD-9 | 46.38 | 37.92 | 8.19 | 18.95 |
| PGD-10 | 40.58 | 36.02 | 4.38 | 20.55 |

2.2 透析袋规格的考察 分别称取15 g人参超滤

液,溶于20 mL水,采用截流相对分子质量为100,200,1 000 Da的透析袋,透析6 h,透析外液共加入3 L水,分3次更换,得到100 Da透析内液与外液、200 Da透析内液与外液、1000 Da透析内液与外液(分别命名为PGD-1,PGD-2,PGD-3,PGD-4,PGD-5与PGD-6)。对透析后所得6部分的理化性质测定结果见表1。

由表1可知3种透析外液的总糖与蛋白总含量较低(均低于30%),因此透析外液为非糖肽组分,而透析内液总糖与蛋白总含量较高(均高于70%),因此对3种透析内液进行纯度与相对分子质量分布分析(图1A),结果显示其相对分子质量低于5 000 Da,故透析内液为目标糖肽成分,其HPLC图显示为连续的多个峰,因此确定其为混合物。

比较3种透析内液(PGD-1,PGD-3和PGD-5)的总糖含量测定结果,可知PGD-1总糖含量最高,三者HPLC图及收率无明显差异,因此截流相对分子质量1 000 Da的透析袋最适宜制备人参糖肽,此规格透析袋的制备工艺有待于进一步研究。

2.3 透析时间考察 称取15 g人参超滤液,溶于20 mL水,采用截流相对分子质量1 000 Da的透析袋,透析外液共加3 L水,分3次更换,分别透析4,2 h,得到两部分内液与两部分外液,由于透析内液为目标糖肽,因此只对这两部内液(命名为PGD-7与PGD-8)的理化性质及纯度与相对分子质量分布进行测定。PGD-1为同等条件下透析6 h的内液。

HPLC测定结果显示(图1B)随着透析时间的减少,相对分子质量较低的成分含量增多。理化性质测定结果(表1)表明PGD-1与PGD-7的糖肽含量差别较小,分别为75.56%,76.51%,而PGD-8的糖肽质量分数相对较低,仅68.31%。虽然此三部分中,PGD-8的收率最高(26.7%,相对于人参水提物的质量分数),但其糖肽含量较低,因此透析2 h不适宜人参糖肽的制备。PGD-7与PGD-1相比糖肽质量分数与收率均高出1%,因此透析时间确定为4 h。

2.4 透析外液用水量的考察 称取15 g人参超滤液,溶于20 mL水,采用截流相对分子质量为1 000 Da的透析袋,透析4 h,透析外液分别共加入6,1 L水,分3次更换,得到两部分内液与两部分外液,由于透析内液为目标糖肽,因此只对这两部内液(命名为PGD-9与PGD-10)的理化性质及纯度与相对分子质量分布进行测定。PGD-7为同等条件下加入3 L水进行透析的内液。HPLC分析结果显示(图

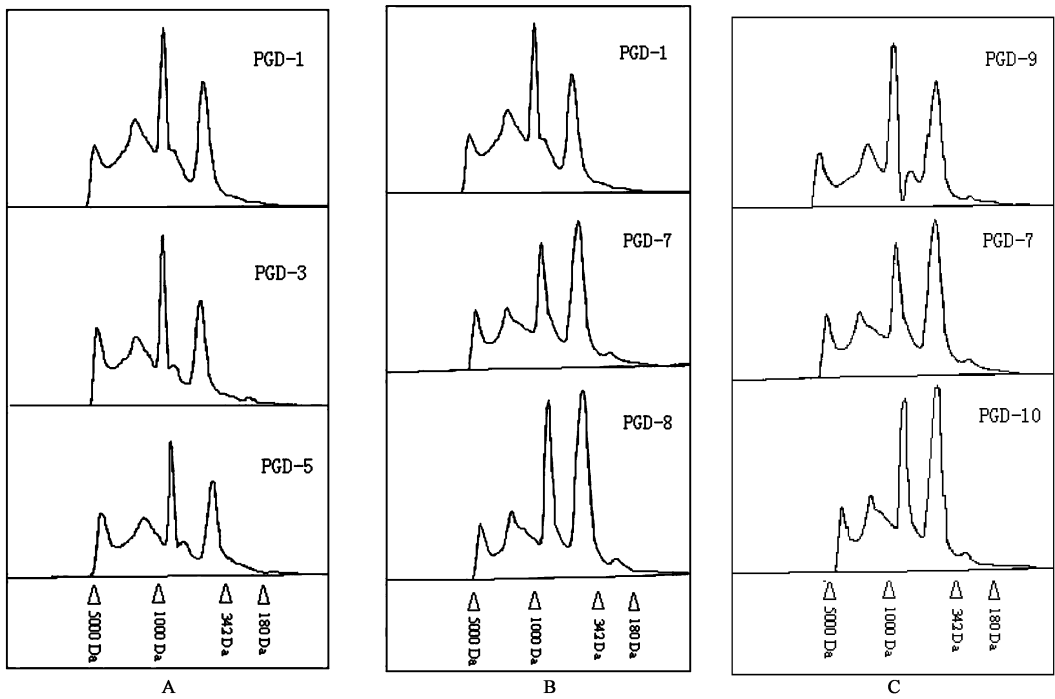


图 1 人参超滤液纯度 HPLC 与相对分子质量分布分析

1C), 随透析外液用水量的减少, 相对分子质量较低的成分含量增多。理化性质测定结果(表 1)表明 PGD-9 的糖肽质量分数最高(92.49%), 虽其收率最低, 但与 PGD-7 与 PGD-10 相差 <3%。

综上所述, 确定制备工艺为采用截流相对分子质量 1 000 Da 的透析袋, 加入 6 L 水透析 4 h。制备出的人参糖肽总糖质量分数 46.38%, 肽质量分数 37.92%, 糖醛酸质量分数 8.19%, 收率 18.95%, 纯度与相对分子质量分布测定结果表明其为相对分子质量 300 ~ 3 500 Da 的混合物。说明通过透析法制备低相对分子质量人参糖肽是可行的。

3 讨论

本研究首次采用透析法制备小分子人参糖肽, 突破了制备含量高并相对分子量较低的糖肽类的难题, 为研究开发人参糖肽新的活性与应用提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] 王本祥. 人参的研究 [M]. 天津: 天津科技出版社, 1985: 129.
- [2] Wang B X, Zhou Q L, Yang M, et al. Hypoglycemic activity of ginseng glycopeptide [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(1): 50.
- [3] 杨明, 赵全成, 冯辉. 人参糖肽的制备方法、药物制剂及医药用途: 中国, CN1931874B [P]. 2007-03-21.
- [4] 李晓坤, 董晶晶, 贺海花, 等. 黄精中小分子糖提取工艺优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 27.
- [5] 张伟杰, 王鹏, 林茜, 等. 3 种中药多糖的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 19.
- [6] 李建武, 萧能康, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 160.
- [7] Nelly B K, Gustar A H. New Method for quantitative determination of uronic acid [J]. Anal Biochem, 1973, (54): 484.

[责任编辑 仝燕]