

## 甘蔗渣多糖的纯化工艺

王许聪,刘莉,张璐,翁立冬,孙学刚,刘强\*

(南方医科大学中医药学院中药制剂学教研室,广州 510515)

**[摘要]** 目的:研究甘蔗渣中多糖的最佳纯化工艺。方法:用 Savage 法、TCA 法脱蛋白;用双氧水法、活性炭法脱色;用 AB-8, DB301, D101, MG-1 大孔树脂纯化甘蔗渣多糖,用苯酚-硫酸法测定多糖的含量。结果:最佳工艺为用 Savage 法脱蛋白、活性炭脱色、MG-1 型大孔吸附树脂纯化(上样量为 0.3 g,柱高 35 cm、流速 10 mL/15 min),经富集后甘蔗渣多糖的含量由 51.11% 提高到了 83.57%。结论:本实验为甘蔗渣多糖的分离纯化条件提供了参考,为甘蔗渣的进一步开发研究提供了依据。

**[关键词]** 甘蔗渣多糖;脱蛋白;脱色;大孔吸附树脂;纯化工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0031-04

## Study on Purification Process of Polysaccharides from Sugarcane Biogases

WANG Xu-cong, LIU Li, ZHANG Lu, WENG Li-dong, SUN Xue-gang, LIU Qiang\*

(Department of Traditional Chinese Medicine of Nanfang Hospital,  
Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the optimal purification process of the polysaccharides from sugarcane biogases. **Method:** To explore the optimum technology, we compared Savage method with TCA method for deproteinization and hydrogen peroxide solution method with active carbon method for decoloration. And four common macroporous absorption resins were compared for differences in adsorption and desorption performance. Then phenol-sulfuric acid method was used to determine the content of the polysaccharides from sugarcane biogases. **Result:** The optimum purification technological conditions were determined as following: deproteinization with savage method; discoloration with active carbon method; purification with macroporous absorption resins of MG-1 (the upper sample weight is 0.3 g; the column high is 35 cm and the flow rate is 10 mL/15 min). The polysaccharides of sugarcane biogases improved from 51.11% to 83.57%. **Conclusion:** This experiment provided a reference for the purification of polysaccharides from sugarcane biogases and provided an evidence for the further development of sugarcane biogases.

**[Key words]** polysaccharides from sugarcane biogases; deproteinization; decoloration; macroporous absorption resins; purification process

甘蔗渣是制糖工业的主要副产品,是甘蔗机械

压制收糖后所剩的主要部分,属于农业固体废弃物中的一种。我国有多个省份可以种植甘蔗,每个糖厂都产生大量的甘蔗渣,寻找合适的途径综合利用甘蔗渣具有重要意义。研究表明从甘蔗渣中提取的多糖具有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、降血脂、增强免疫<sup>[1]</sup>等作用,从甘蔗渣中提取多糖进行开发利用是一种有效途径。目前甘蔗渣多糖的提取多用水提醇沉法<sup>[2]</sup>,但得到的多糖含量较低,有待进一步纯化提

**[收稿日期]** 20100627(005)

**[基金项目]** 广东省教育部产学研结合资助项目  
(2009B090300278)

**[第一作者]** 王旭聪,2010 届中药学专业本科

**[通讯作者]** \* 刘强,博士,教授,主要从事中药新制剂和剂型改革研究, Tel: 020-61648264, E-mail: gzljq2002@163.com

高。本文对甘蔗渣多糖进行了纯化工艺研究,为其进一步开发研究提供理论依据。

### 1 材料

**1.1 药品及试剂** 甘蔗渣(甘蔗购于广州市白云农批市场,经南方医科大学中医药学院药用植物与中药鉴定教研室陈兴兴鉴定为甘蔗属禾本科的青皮蔗,用甘蔗榨汁机榨汁后所得固体剩余物为甘蔗渣)、葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110833-200503)、D101 大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司)、DB301 大孔吸附树脂(天津欧瑞生物科技有限公司)、MG-1 大孔吸附树脂(天津欧瑞生物科技有限公司)、AB-8 大孔吸附树脂(南开大学化工厂);三氯乙酸、苯酚等均为分析纯。

**1.2 仪器** UV-2401PC 紫外-可见分光光度仪(岛津)。

### 2 方法及结果

**2.1 甘蔗渣多糖的提取** 称取已烘干的甘蔗渣 500 g,8 倍量水煎煮 2 h,过滤得水提液;滤渣用 6 倍量水煎煮 1 h,过滤得水提液,合并 2 次水提液浓缩至约 300 mL,加 95% 乙醇至乙醇达 85%,静置过夜,抽滤得甘蔗渣多糖滤饼,置 60 °C 烘箱中干燥 24 h,得甘蔗渣粗多糖 9.5 g<sup>[3]</sup>。

**2.2 葡萄糖溶液标准曲线的绘制** 精密量取葡萄糖对照品溶液(0.11 g·L<sup>-1</sup>)0,1,2,3,4,5,6 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加水至刻度摇匀,精密量取上述溶液 2 mL,置具塞试管中,分别加入新鲜配制的 5% 苯酚溶液 1 mL,混匀后迅速加入浓硫酸 7 mL,摇匀,于 40 °C 水浴中保温 30 min,再置冰水溶液中放置 5 min 取出,以第 1 份为空白,用紫外分光光度法测定葡萄糖溶液在不同浓度下的吸光度。以葡萄糖溶液的浓度(A)为横坐标,以最大吸收波长平均值处的吸光度为纵坐标作图,标准曲线方程  $Y = 45.391X + 0.0291$  ( $R^2 = 0.998$ )

### 2.3 甘蔗渣多糖脱蛋白

**2.3.1 Savage 法脱蛋白** 取 1 g·L<sup>-1</sup>甘蔗渣多糖溶液 20 mL 于分液漏斗中,加入 4 mL Savage 试剂在振荡器中震荡 20 min,静置,取上清液 1 mL 于 10 mL 试管中,编号为 1,弃去下层溶液。再加入 4 mL Savage 试剂,相同操作,所取上清液编号为 2,重复相同操作 7 次,得到编号为 1,2,3,4,5,6,7 的 7 个上清液<sup>[4]</sup>,再定容至 10 mL,从 10 mL 中取 2 mL 于具塞试管中,用苯酚-硫酸法测定甘蔗渣多糖的含量,并

测定每支试管中剩余溶液在 260,280 nm 处 A。蛋白质的含量用经验公式  $Y = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$ ,蛋白质的除杂率 = (原甘蔗渣多糖蛋白质含量 - 脱蛋白后蛋白质含量)/原甘蔗渣多糖蛋白质含量。相同操作 2 次,所得数据为 2 次的平均值,见表 1。

表 1 Savage 法脱蛋白所得结果

No.	蛋白质除杂率/%	脱蛋白后多糖含量/%
1	2.928	51.25
2	27.12	50.94
3	27.06	50.80
4	21.39	50.64
5	26.09	47.87
6	27.51	53.74
7	31.29	59.75

**2.3.2 TCA 法脱蛋白** 各取 1 g·L<sup>-1</sup>甘蔗渣多糖溶液 8 mL 于 5 支 10 mL 试管中,再分别向每支试管中加入 2 mL 0.20,0.25,0.30,0.35,0.40 g·L<sup>-1</sup>的 TCA 溶液,使 TCA 溶液在每支试管的多糖溶液分别达到 4%,5%,6%,7%,8%,静置过夜,2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,分别取上层溶液 1 mL 定容到 10 mL 试管中,从 10 mL 溶液中取 2 mL 用苯酚-硫酸法测定甘蔗渣多糖的含量,并测定每支试管中剩余溶液在 200~300 nm A。因套用蛋白质经验公式后所得结果为负值,故直接比较蛋白质的 A 来确定脱蛋白的效果。相同操作 2 次,所得数据为 2 次的平均值。见表 2。

表 2 TCA 法脱蛋白所得结果

TCA/%	A <sub>230-300 nm</sub>	脱蛋白后多糖/%
4	2.595	52.65
5	2.543	49.91
6	2.678	48.76
7	2.656	54.83
8	2.727	51.90

### 2.4 甘蔗渣多糖脱色条件研究

**2.4.1 双氧水脱色** 精密称取 0.800 8 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%),1.600 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%),2.400 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) 均稀释到 20 mL,各取 5 mL 上述稀释液于含 5 mL 甘蔗多糖(4 g·L<sup>-1</sup>)溶液的 10 mL 试管中,使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在甘蔗渣多糖溶液中分别达到 2%,4%,6%,60 °C 保温脱色 30 min,加热驱除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,从每支试管中精密量取 1 mL 定容到 10 mL,测定剩余溶液在 450 nm 处 A,再从每支 10 mL 试管中取 2 mL,用苯酚-硫酸法测定甘蔗渣多糖的含量<sup>[5]</sup>。脱色率 = (原甘蔗渣

多糖溶液  $A_{450\text{ nm}}$  - 脱色后溶液  $A_{450\text{ nm}}$ )/原甘蔗渣多糖溶液  $A_{450\text{ nm}}$ 。相同操作 2 次,所得数据为 2 次的平均值<sup>[6]</sup>。脱色率分别为 48.40% ,53.07% ,56.51% ;脱色后多糖为 59.32% ,55.97% ,57.96% 。

**2.4.2 活性炭脱色** 取  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的甘蔗渣多糖溶液 10 mL 于 3 支试管中,分别向每支试管中加入长度均一的活性炭棒 0.201 0, 0.400 8, 0.600 7 g,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温脱色 3 h,精密量取 1 mL 定容到 10 mL,再从中取 2 mL 用苯酚-硫酸法测定甘蔗渣多糖的含量,并测定剩余 9 mL 多糖溶液在 450 nm 处  $A$ ,脱色率 = (原甘蔗渣多糖溶液 450 nm 处  $A$ -脱色后溶液 450 nm 处  $A$ )/原甘蔗渣多糖溶液 450 nm 处  $A$ 。相同操作 2 次,所得数据为 2 次的平均值<sup>[2]</sup>。脱色率分别为 30.113 6% ,32.128 1% ,44.963 8% ;脱色后多糖为 28.127 8% ,25.451 1% ,23.005 7% 。

## 2.5 甘蔗渣多糖过 4 种不同的大孔吸附树脂柱

**2.5.1 D101, DB301, AB-8, MG-1 4 种大孔吸附树脂的预处理** 分别取适量的大孔吸附树脂,用 95% 乙醇浸泡过夜,湿法装柱,再用 95% 乙醇溶液淋洗至流出液加水不出现白色浑浊为止,然后用蒸馏水洗至无醇味。用 5% HCl 浸泡树脂 2 h 后,以  $4\sim 6\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速淋洗,再用蒸馏水洗至中性,然后用 5% NaOH 溶液浸泡树脂 2 h,以  $4\sim 6\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的淋洗,再用蒸馏水洗至中性备用<sup>[7]</sup>。

**2.5.2 4 种大孔吸附树脂对甘蔗渣多糖纯化效果的比较** 精密称取甘蔗渣多糖 0.500 4, 0.500 7, 0.500 3, 0.500 4 g 溶于适量的蒸馏水中,上样于处理过的相同柱高为 30 cm 的 AB-8 树脂柱、DB301 树脂柱、D101 树脂柱、MG-1 树脂柱,控制流速均为  $1\text{ d}/3\text{ s}$ ,用蒸馏水洗脱,收集适量洗脱液,水浴蒸干,分别精密称取为 0.379 5, 0.431 9, 0.350 6, 0.433 6 g,用蒸馏水溶解并定容至 250 mL,精密量取 1 mL,再定容至 10 mL,再从 10 mL 中取 2 mL,用苯酚-硫酸法测定甘蔗渣多糖的含量。大孔吸附树脂的纯化效果以多糖含量提高率为标准,多糖含量提高率 = (纯化后甘蔗渣多糖-原甘蔗渣多糖)/原甘蔗渣多糖。所得数据为 2 次测定的平均值,4 种树脂纯化甘蔗渣多糖含量提高率分别为 23.94% ,15.90% ,40.49% ,31.60% 。

**2.5.3 MG-1 树脂纯化甘蔗渣多糖最优条件的选择** 最佳上样量的确定:精密称取甘蔗渣多糖 0.307 0, 0.500 8, 0.703 1 g, 溶解于 30 mL 蒸馏水

中,上样于柱高均为 30 cm 的 MG-1 树脂柱中,编号分别为 1-1, 1-2, 1-3, 控制流速均为  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 收集约 200 mL 洗脱液,水浴、烘干。最佳流速的确定:精密称取甘蔗渣多糖 0.502 5, 0.503 0, 0.503 0 g 溶解于 30 mL 蒸馏水中,上样于柱高为 30 cm 的 MG-1 树脂柱中,编号分别为 2-1, 2-2, 2-3, 控制流速,使其流速分别为  $10\text{ mL}/7\text{ min}$ ,  $10\text{ mL}/10\text{ min}$ ,  $10\text{ mL}/15\text{ min}$ , 收集洗脱液约 200 mL,水浴、烘干;最佳柱高的确定:精密称取 0.300 2, 0.300 8, 0.300 5 g 甘蔗渣多糖溶解于 30 mL 蒸馏水中,上样于柱高分别为 25, 30, 35 cm 的 MG-1 树脂柱中,编号分别为 3-1, 3-2, 3-3。9 种 MG-1 树脂纯化甘蔗渣多糖多糖提高率分别为 32.05% ,24.30% ,9.518% ,8.470% ,14.07% ,14.76% ,34.21% ,36.18% ,41.20% 。

**2.6 最佳工艺优化甘蔗渣多糖** 精密称取甘蔗渣多糖 0.300 5 g,用蒸馏水溶解后约 35 mL,过 MG-1 树脂柱,控制流速约为  $10\text{ mL}/15\text{ min}$ ,收集约 200 mL 滤液,水浴至约 40 mL,用 Savage 法脱蛋白 7 次,再加入 0.297 0 g 活性炭,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  脱色 3 h,过滤,收集多糖溶液于蒸发皿中水浴至糖浆状,再于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱烘干,得纯化后的甘蔗渣多糖,用蒸馏水溶解部分甘蔗渣多糖 0.176 0 g,定容至 10 mL,精密量取 1 mL,稀释 100 倍,再精密量取 2 mL,用苯酚-硫酸法测定甘蔗渣多糖的含量,最后纯化后的多糖含量为 83.57%,在相同条件下测定的原甘蔗渣多糖的含量为 51.11% 。

## 3 讨论

本研究结果表明,对于 Savage 试剂脱蛋白,脱蛋白效果及脱蛋白后甘蔗渣多糖含量的变化并不符合一定的规律,第 2 次和第 3 次脱蛋白后蛋白含量和多糖含量几乎没有差异,但是分析数据可得第 7 次脱蛋白后效果较好。对于 TCA 试剂法,各浓度的 TCA 试剂对蛋白质的脱除无较大差异,浓度越小,蛋白质的吸光度越小,但是不同浓度下多糖的含量有较大的差异,7% TCA 脱蛋白后多糖的含量较高。其具体原因尚待进一步研究。

用 AB-8 树脂、DB301 树脂、D101 树脂、MG-1 树脂纯化甘蔗渣多糖,所得数据表明 MG-1 大孔吸附树脂对甘蔗渣多糖有很好的纯化效果。在筛选 MG-1 型大孔吸附树脂最优纯化条件的数据中表明上样量越小,流速越慢,柱高越大,对多糖纯化效果越好。

本研究表明,用 MG-1 大孔吸附树脂纯化甘蔗

渣多糖大大提高了其多糖含量,不同的脱蛋白法和脱色法能降低原甘蔗渣中蛋白和色素的含量,同时也在一定程度上也提高了甘蔗渣多糖的含量。本实验初步确定了纯化甘蔗渣多糖的工艺,使甘蔗渣多糖的含量有了一定的提高,但多糖的纯度提高是否意味着药效提高,尚待后续试验进行探讨。

#### [参考文献]

[1] 刘强,宋雨鸿,李慧,等. 甘蔗渣多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 南方医科大学学报,2008,28(10):1911.  
[2] 刘强,刘莉. 一种从甘蔗渣中提取多糖的方法[P]. CN101171956.

[3] 陈兴兴,梁燕,张璐,等. 超声提取甘蔗渣多糖的工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(8):226.  
[4] 刘芳,朱学慧,刘玫,等. 冬凌草多糖脱蛋白和脱色方法的研究[J]. 中药材,2008,31(5):751.  
[5] 黄纯,马驰,宋慧智,等. 亮菌多糖提取中脱蛋白和脱色方法比较[J]. 药学和临床研究,2007,15(1):45.  
[6] 杨云,冯卫生,雷高明,等. 大枣渣多糖精致纯化工艺的研究[J]. 中药材,2006,29(1):78.  
[7] 黄申,李炳奇,李红,等. 大孔树脂吸附解吸甘草多糖效果的研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2620.

[责任编辑 邹晓翠]

## 欢迎订阅 2011 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”,“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于1995年10月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、药理、临床、综述、经验交流、基层园地、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究成果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16开本,224页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价25元,全年600元。国内外公开发售,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjxzz.com