

肖道安. 肉苁蓉多糖脱蛋白工艺的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 314–315.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.107

# 肉苁蓉多糖脱蛋白工艺的优化

肖道安

(宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000)

**摘要:**优选肉苁蓉多糖的脱蛋白工艺,为肉苁蓉多糖纯化提供试验依据。以脱蛋白率为指标,比较 Sevag 法、酶法及酶-Sevag 联合法对肉苁蓉粗多糖的脱蛋白效果,采用正交试验优选最佳工艺。结果表明,Sevag 法优于酶法和酶-Sevag 联合法,Sevag 法脱蛋白的最佳工艺为:三氯甲烷与正丁醇的体积配合比 4:1,料液体积比 1:3,搅拌 40 min,脱蛋白 4 次。在该工艺下平均脱蛋白率为 87.11%,*RSD* 为 1.34%;平均多糖保留率为 83.05%,*RSD* 为 1.54%。试验证明该工艺稳定可靠,适用于肉苁蓉多糖的纯化。

**关键词:**肉苁蓉多糖;脱蛋白;Sevag 法;酶法;酶-Sevag 联合法;正交试验

**中图分类号:**R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0314-02

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)或管花肉苁蓉[*C. tubulosa* (Schrenk) R. Wight]的干燥带鳞叶的肉质茎,具有补肾阳、益精血、润肠通便和延缓衰老等功效<sup>[1]</sup>。肉苁蓉多糖是肉苁蓉的主要活性成分之一,有研究表明肉苁蓉多糖具有延缓衰老、增强机体免疫功能,促进人体外成纤维细胞的生长及促进创伤愈合等生理活性作用<sup>[2]</sup>。植物多糖通常还有较多的蛋白质,会影响多糖的活性,所以须对多糖进行脱蛋白以达到对纯化多糖的目的。目前,多糖脱蛋白的方法主要有 Sevag 法、三氯乙酸法、酶法等<sup>[3]</sup>。如殷洪梅等采用 Sevag 法对金银花多糖进行脱蛋白研究<sup>[4]</sup>;龚力民等对 Sevag 法、酶法及酶-Sevag 联合法脱五倍子多糖蛋白进行比较<sup>[5]</sup>;蔡彬新等采用三氯乙酸法脱除海地瓜多糖中的蛋白质<sup>[6]</sup>。本试验通过 3 种不同的方法单独或联合对肉苁蓉粗多糖进行脱蛋白研究,并对其脱蛋白工艺进行优化,以期获得高纯度肉苁蓉多糖,为肉苁蓉制剂及其保健品开发提供科学的依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与仪器

肉苁蓉,购自江西诚欣医药有限公司;木瓜蛋白酶(食品级),河南郑州绿源生物科技有限公司;其他化学试剂均为分析纯;试验用水为蒸馏水。

电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用有限责任公司;数显恒温水浴锅,江苏常州国华电器有限公司;Bq5200B 型超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司;SHZ-III B 循环水真空泵,上海仪表集团供销公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 肉苁蓉粗多糖的提取工艺流程 肉苁蓉粗多糖的提

取工艺流程如图 1 所示。

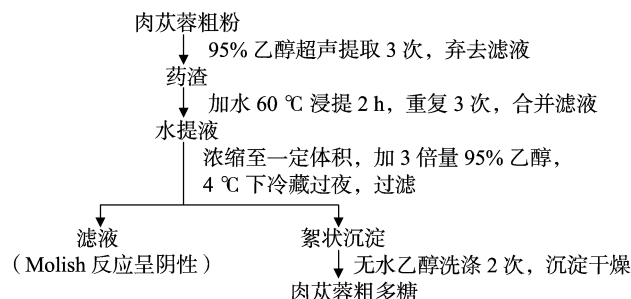


图1 肉苁蓉粗多糖的提取工艺流程

#### 1.2.2 肉苁蓉多糖含量的测定

1.2.2.1 葡萄糖标准曲线方程的建立 以葡萄糖为对照品,采用苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>测定肉苁蓉多糖含量,其标准曲线方程为  $D = 14.017\rho + 0.0002$ ,  $r^2 = 0.9975$ ,  $\rho$  为多糖溶液的质量浓度,线性范围为 0.01~0.05 mg/mL。

#### 1.2.2.2 多糖保留率的计算

$$\text{多糖保留率} = \rho_2 / \rho_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $\rho_1$  为脱蛋白前粗多糖中肉苁蓉多糖的质量浓度; $\rho_2$  为精制后肉苁蓉多糖的质量浓度。

#### 1.2.3 蛋白质含量测定

1.2.3.1 蛋白质标准曲线方程的建立 以牛血清白蛋白为对照品,采用考马斯亮蓝法<sup>[8]</sup>测定蛋白质含量,其标准曲线方程为  $D = 8.097\rho + 0.0298$ ,  $r^2 = 0.9954$ ,  $\rho$  代表蛋白质溶液的质量浓度,线性范围为 0.02~0.10 mg/mL。

#### 1.2.3.2 蛋白质脱除率的计算

$$\text{蛋白质脱除率} = (\omega_1 - \omega_2) / \omega_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $\omega_1$  为脱蛋白前粗多糖中蛋白质的质量分数; $\omega_2$  为精制后蛋白质的质量分数。

#### 1.2.4 肉苁蓉多糖脱蛋白方法

1.2.4.1 Sevag 法脱蛋白 取“1.2.1”节下制备的粗多糖 2 g 溶于 50 mL 水中,加入 12.5 mL 的 Sevag 试剂( $V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}} = 4:1$ ),磁力搅拌 30 min 后离心 10 min;弃去沉淀,上清液用 3 倍体积分量的 95% 乙醇沉淀,沉淀经洗涤干燥后

收稿日期:2014-07-28

作者简介:肖道安(1980—),男,讲师,主要从事天然药物化学方向的研究。E-mail:xiaodaan2006@163.com。

得精制多糖,测定精制多糖中的多糖含量和蛋白质含量。

1.2.4.2 酶法脱蛋白 取“1.2.1”节下制备的粗多糖 2 g 溶于 50 mL 水中,加入 10 mg 木瓜蛋白酶,于 60 ℃ 下酶解 2 h,离心 10 min;弃去沉淀,上清液用 3 倍体积量的 95% 乙醇沉淀,沉淀经洗涤干燥后得精制多糖,测定精制多糖中的多糖含量和蛋白质含量。

1.2.4.3 酶-Sevag 联合法脱蛋白 按上述酶法制备得到的上清液加入 1/4 量的 Sevag 试剂,再搅拌和离心处理后制备精制多糖,测定精制多糖中的多糖含量和蛋白质含量。

1.2.5 肉苁蓉多糖脱蛋白工艺优化 影响 Sevag 法脱蛋白的因素主要有三氯甲烷与正丁醇的体积比( $V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}}$ )、料液比(Sevag 试剂与多糖溶液体积比)、搅拌时间和脱蛋白次数。选择各因素的 3 个水平值,按 Sevag 法脱蛋白工艺进行  $L_9(3^4)$  正交试验(表 1),试验结果以脱蛋白率为判断依据,以综合评价作为参考。综合评价率采用综合加权评分法,评分公式为:综合评价率=(脱蛋白率+多糖保留率)×50%。

表 1 肉苁蓉多糖 Sevag 法脱蛋白工艺优化因素水平设计

水平	A: $V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}}$	B:料液体积比	C:搅拌时间(min)	D:脱蛋白次数
1	3:1	1:3	20	2
2	4:1	1:4	30	3
3	5:1	1:5	40	4

2 结果与分析

2.1 3 种脱蛋白方法试验结果

表 3 肉苁蓉多糖 Sevag 法脱蛋白优化工艺的正交试验结果

试验号	A	B	C	D	脱蛋白率(%)	多糖保留率(%)	综合评价率(%)
1	1	1	1	1	83.54	82.78	83.16
2	1	2	2	2	84.36	80.52	82.44
3	1	3	3	3	86.39	76.65	81.52
4	2	1	2	3	88.38	76.14	82.26
5	2	2	3	1	89.16	81.24	85.20
6	2	3	1	2	86.53	78.17	82.35
7	3	1	3	2	84.78	80.23	82.50
8	3	2	1	3	82.73	79.78	81.26
9	3	3	2	1	83.66	82.31	82.98
$k_1$	84.76	85.57	84.27	85.45			
$k_2$	88.02	85.42	85.47	85.22			
$k_3$	83.72	85.53	86.78	85.83			
$R$	4.30	0.15	2.51	0.61			

3 结论

Sevag 法适用于肉苁蓉多糖脱蛋白工艺,通过正交试验优选出肉苁蓉脱蛋白的最佳工艺为:三氯甲烷与正丁醇的体积配合比 4:1,料液体积比 1:3,搅拌 40 min,脱蛋白 4 次。在该工艺水平下平均脱蛋白率为 87.11%, $RSD$  为 1.34%;平均多糖保留率为 83.05%, $RSD$  为 1.54%。试验证明该工艺稳定可靠,适用于肉苁蓉多糖的纯化。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:126.  
[2] Schepetkin I A, Quinn M T. Botanical polysaccharides: macrophage

从表 2 可知,Sevag 法和酶-Sevag 联合法脱蛋白的效率相对较高,而酶法多糖的保留率相对较高。这可能是因为肉苁蓉多糖中的蛋白质以游离型居多,结合型较少,Sevag 法能更加有效地除去游离型蛋白质,而酶法主要酶解结合型蛋白质。2 个因素综合考虑,Sevag 法更适合于肉苁蓉多糖的脱蛋白工艺。

表 2 3 种不同方法的脱蛋白结果

方法	脱蛋白率(%)	多糖保留率(%)
Sevag 法	86.46	80.15
酶法	72.52	85.67
酶-Sevag 联合法	83.37	81.71

2.2 Sevag 法正交试验结果

由表 3 的极差分析可知,Sevag 法各因素对肉苁蓉多糖脱蛋白的影响顺序依次为  $A > C > D > B$ ,即三氯甲烷与正丁醇的体积比影响最大,其次为搅拌时间、脱蛋白次数、料液比。Sevag 法脱蛋白的最佳工艺为  $A_2B_1C_3D_3$ ,即三氯甲烷与正丁醇的体积比为 4:1,料液体积比为 1:3,搅拌时间 40 min,脱蛋白次数 4 次。这主要是因为随着搅拌时间的增加,Sevag 试剂与蛋白质结合增多,脱蛋白率提高;脱蛋白次数的增加固然能提高脱蛋白率,但是多糖损失得也会更多,可能会造成综合效果不佳。对上述最佳工艺进行验证,重复操作 3 次,得出该工艺下平均脱蛋白率为 87.11%, $RSD$  为 1.34%;平均多糖保留率为 83.05%, $RSD$  为 1.54%。结果表明该工艺脱蛋白率高,综合效果良好。

immunomodulation and therapeutic potential[J]. International Immunopharmacology,2006,6(3):317-333.

[3] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:298.  
[4] 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.  
[5] 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.  
[6] 蔡彬新,吴成业,刘淑集. 海地瓜多糖提取条件的优化和脱蛋白的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(10):194-196,199.  
[7] 麻景梅,宋新波,张丽娟,等. 肉苁蓉多糖含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(8):100-101.  
[8] 乔茜茜,祁英,孙建忠,等. 啤酒花多糖的提取及脱蛋白工艺研究[J]. 食品工业科技,2012,33(16):251-256.