Sevag 法脱鹿药多糖蛋白工艺条件优化

赵淑杰¹, 郑丽宁¹, 路飘飘¹, 洪波¹, 杨利民², 韩忠明²

(1. 吉林农业大学资源与环境学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

[收稿日期] 2016-11-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 04-0025-04 [中图分类号] R284.1

[摘要] 为了优化 Sevag 法脱鹿药粗多糖蛋白工艺条件, 以牛血清白蛋白为标准品测定蛋白质含量, 以葡萄糖为标准品测定多糖含量, 以蛋白质脱除率、多糖保留率及综合评分为指标, 通过正交试验考察氯仿与正丁醇的比例、多糖液与 Sevag 液的比例、振荡时间、洗脱次数四因素对脱蛋白效果的影响, 确定鹿药多糖脱蛋白的最佳工艺条件。结果表明 Sevag 法脱鹿药多糖蛋白的最佳条件为氯仿: 正丁醇=4: 1, 多糖溶液(2 mg/mL): Sevag 试剂=2: 1, 振荡时间 15 min, 洗脱 6 次, 从综合评分来看, 主要的影响因素是脱蛋白次数和振荡时间。Sevag 法脱鹿药多糖蛋白的方法简便, 工艺稳定且可有效提高多糖的纯度。

[关键词] 鹿药; 多糖; Sevag 法; 脱蛋白; 工艺优化

Study on the Orthogonal Experiment Design of Removing Protein from Polysaccharide of *Smilacina japonica*

ZHAO Shu-jie¹, ZHENG Li-ning¹, LU Piao-piao¹,

HONG Bo¹, YANG Li-min², HAN Zhong-ming²

(1. College of Resources and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: To optimize the technology of removing protein from crude polysaccharide of *Smilacina japonica*. The Sevag method was used remove the protein, bovine serum albumin as the standard test protein content, glucose as the standard test polysaccharide content. The effect of removing protein according to the index of the removal protein rate, the polysaccharide retention rate and comprehensive score, through orthogonal experiment study the ratio of chloroform and nbutyl alcohol, the ratio of polysaccharide solution and Sevag solution, oscillation time, elution times and so on. The optimizing parameters for the removing protein of *Smilacina japonica* polysaccharide were chloroform: butanol = 4: 1, polysaccharide solution: Sevag reagent = 2: 1, 6 times, 15 min of each time. According to the comprehensive evaluation, the significant factors are the oscillation time and the frequency. This optimum technology of Sevag method to removing protein is stable, and the method is simple and effective. It can improve the purity of polysaccharide.

Key words: *Smilacina japonica*; polysaccharide; Sevag method; removing protein; process optimization

基金项目: 吉林省自然科学基金(20140101128JC)

作者简介: 赵淑杰, 副教授, 从事天然产物化学方面研究。E-mail: zhsjlong@163.com

多糖为人体必需的生物大分子之一,在细胞识别、生物体受精、生长发育、神经系统和免疫系统稳态的维持等方面都起着重要作用^[1]。由于特殊的结构、理化性质及生物活性,使得多糖在医药领域有着广泛的应用,如疫苗、免疫调节剂、抗肿瘤、抗病毒药物,以及制备药物缓释剂、医用透析膜、人工血液等^[2-4]。多糖的研究已成为生命科学研究中最活跃的领域之一。目前,植物多糖在畜禽业中的应用与理论研究也日益增多^[5-6]。

鹿药(*Smilacina japonica* A. Gray)为百合科鹿药属多年生草本植物,据记载,鹿药为鹿常食九草之一而得名。鹿药为药食同源植物,幼嫩茎叶从出苗到开花前均可食用,而根茎及根为民间常用中药“鹿药”,性味“甘、苦、温、无毒”,具有补气益肾、祛风除湿、活血调经功能^[7]。近年来,也有从事鸡、猪等养殖业的农民将鹿药的根茎粉碎后掺入到饲料中,以提高饲养动物的肉质质量和增强免疫力^[8]。现代研究显示鹿药根茎中含有黄酮、皂苷、多糖等活性成分^[9-11],前期研究发现鹿药中多糖含量较高,约占干燥生药的20%^[12],且具有抗氧化和抑制肿瘤细胞增殖的作用。我国野生鹿药资源分布十分广泛,储量巨大,具有较大的开发利用潜力。为确切了解鹿药多糖结构与功能的关系,首先要得到较纯的多糖。因此本研究开展鹿药多糖的分级沉淀及脱蛋白研究,确定了Sevag法(即氯仿-正丁醇脱蛋白的方法)脱鹿药多糖蛋白的最佳工艺,将为鹿药多糖的分离纯化及开发利用提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料 鹿药样品采自吉林省辉南县境内,将根茎及根洗净阴干,粉碎备用。

1.2 仪器与试剂 DL-1000E智能超声波清洗器,上海之信仪器有限公司;ME203E电子天平,METTLER TOLEDO公司;DJ-10A粉碎机,上海隆拓仪器有限公司;高速冷冻离心机,Thermo Fisher Scientific;冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;T6-紫外分光光度计,北京普析通用有限责任公司。葡萄糖、苯酚、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250、无水乙醇、浓硫酸等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 鹿药粗多糖的提取及分级沉淀 采用超声波法提取鹿药粗多糖,按照正交试验确定的最佳工艺^[12],提取3次,合并提取液,将提取液减压浓缩至原体积的1/10,加无水乙醇进行分级沉淀,首先加入无水乙醇至醇含量为70%,有沉淀析出,低温放置24 h后,7000 r/min离心10 min,沉淀用无水乙醇和丙酮反复洗涤至洗液无色,沉淀冷冻干燥得70%乙醇沉淀鹿药多糖(标记为SJP1),按照以上沉淀方法,向离心后的上清液继续加入无水乙醇至醇含量分别达到80%、90%,分别得到80%乙醇沉淀鹿药多糖(标记为SJP2)和90%乙醇沉淀鹿药多糖(标记为SJP3)。

2.2 鹿药多糖的蛋白质含量测定 蛋白质含量测定参照文献^[13],采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为对照品,于波长595 nm处测吸光度,以吸光度值为纵坐标,蛋白质含量(mg)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $y=1.1383x+0.0162$, $r=0.9967$ 。

蛋白质脱除率(%) = $100 \times (m_1 - m_2) \div m_1$, m_1 为脱蛋白前溶液中蛋白质的含量, m_2 为脱蛋白后溶液中蛋白质的含量。

2.3 鹿药多糖的多糖含量测定 鹿药多糖含量测定采用苯酚-硫酸法:精密量取脱蛋白后的上层清液0.1 mL加水定容至5 mL,取2 mL置具塞试管中,加入4%苯酚溶液1.5 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸6.0 mL,摇匀,于40℃水浴中保温30 min,取出,置冰水浴中5 min,取出,以相应试剂为空白,测定490 nm的吸光度,代入葡萄糖标准曲线的回归方程 $y=13.049x+0.0037$ (x :葡萄糖浓度,mg/mL; y 为吸光度; $r=0.9998$),计算多糖的含量。

多糖损失率(%) = $100 \times (M_1 - M_2) \div M_1$, M_1 为脱蛋白质前溶液中多糖的含量; M_2 为脱蛋白质后溶液中多糖的含量。

2.4 鹿药粗多糖脱蛋白工艺正交试验 Sevag法脱蛋白的效果和氯仿与正丁醇的比例、多糖液与Sevag液的比例、振荡时间、洗脱次数等因素有关。前期研究中将SJP2配成2 mg/mL的多糖溶液,单因素试验结果表明:氯仿与正丁醇比例为2:1,多糖

液与 Sevag 试剂比例为 4 : 1, 振荡 30 min, 洗脱 5 次分别为单因素试验设计中蛋白脱除率达到最高。基于单因素试验结果, 本研究对四个因素通过正交试验进一步优化, 以确定 Sevag 法脱鹿药多糖蛋白的工艺, 因素水平设计见表 1。

选用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 以蛋白质脱除率、多糖保留率, 及综合评分 (综合评分 = 蛋白质脱除率 $\times$ 50% + 多糖保留率 $\times$ 50%) 为考察指标进行工艺优化, 结果见表 2。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A 多糖 : Sevag / (V/V)	B 氯仿 : 正丁醇 / (V/V)	C 次数	D 振荡时间/min
1	2 : 1	3 : 1	4	15
2	3 : 1	4 : 1	5	25
3	4 : 1	5 : 1	6	35

表 2 正交试验结果

试验号	因素				蛋白脱除率/%	多糖保留率/%	综合评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	88.54	67.73	78.01
2	1	2	2	2	38.53	76.76	55.89
3	1	3	3	3	78.13	79.95	77.55
4	2	1	2	3	14.88	91.78	51.34
5	2	2	3	1	81.00	92.71	86.59
6	2	3	1	2	29.17	94.34	61.69
7	3	1	3	2	38.69	95.81	66.68
8	3	2	1	3	45.38	95.89	66.67
9	3	3	2	1	11.23	93.79	53.27
蛋白脱除率极差分析	k_1	74.25	50.73	54.35	60.18		
	k_2	45.37	58.06	23.54	38.62		
	k_3	34.46	41.99	71.45	49.20		
	R	39.76	16.50	48.07	26.30		
多糖保留率极差分析	k_1	81.58	86.06	95.75	84.98		
	k_2	97.66	97.24	93.89	90.13		
	k_3	104.96	99.23	90.26	91.38		
	R	21.43	4.54	2.30	6.51		
总体评分极差分析	k_1	72.36	67.63	70.35	76.39		
	k_2	70.43	73.54	53.77	64.02		
	k_3	62.45	67.07	79.42	66.26		
	R	8.11	6.32	24.04	12.17		

由蛋白质脱除率来看, 各因素的影响大小顺序为 $C>A>D>B$, 即脱蛋白次数影响最大, 其次是多糖溶液与 Sevag 试剂比例, 再次是振荡时间, 这三个因素对蛋白脱除率的影响均达到差异

极显著水平 ($P<0.01$); 最后是氯仿与正丁醇比例, 在试验所选的比例对脱除率的影响差异不显著 ($P>0.05$)。按照极差分析各水平间的最佳效果是 $C_3A_1D_1B_2$ 。

由多糖保留率来看,各因素的影响顺序为 A>D>B>C,总体趋势是脱蛋白率高,多糖保留率低,也即多糖损失的多。所以要从蛋白质脱除率和多糖保留率综合来分析更为合理些。

从总体评分来看,各因素的影响顺序为 C>D>A>B,即脱蛋白次数>振荡时间>多糖溶液与 Sevag 试剂比例>氯仿与正丁醇比例。极差分析各因素水平间的最佳效果是 C₃D₁A₁B₂,与蛋

白质脱除率的影响基本一致,由此确定鹿药多糖脱蛋白的最佳工艺为多糖溶液(2 mg/mL)与 Sevag 试剂的体积比为 2:1,氯仿与正丁醇体积比为 4:1,脱蛋白 6 次,每次振荡 15 min。

2.5 样品测定 按照脱蛋白最佳工艺条件对鹿药分级沉淀所得的 70%、80%、90% 乙醇沉淀多糖进行脱蛋白处理,测定脱蛋白前、后多糖的蛋白质含量和多糖含量,结果见表 3。

表 3 样品脱蛋白测定

分级沉淀多糖	原多糖含量/%	蛋白质脱除率/%	多糖保留率/%
SJP-1	91.12	73.03	97.91
SJP-2	97.37	88.54	95.56
SJP-3	66.64	72.38	89.78

可见,Sevag 法脱蛋白后 SJP1 和 SJP2 的多糖保留率大于 95%,SJP3 的接近 90%;蛋白质脱除率都在 72%以上,说明本实验确定的 Sevag 法脱蛋白工艺适合于鹿药粗多糖的纯化。

3 讨论

水的溶解范围广泛,水提多糖,溶液中除多糖外,还含有蛋白质、无机盐等多种成分。水提后采用醇沉法可去除一些小分子量的物质而得到较纯的多糖,本实验中采用乙醇分级沉淀鹿药多糖,所得 70%、80%和 90%乙醇沉淀多糖的多糖含量分别为 91.12%、97.37%、66.64%,三者有明显差别,也说明三者的不同,所以采用水提,乙醇分级沉淀法,不仅可富集得到鹿药多糖,并且也实现了鹿药粗多糖的初步分离。

目前植物多糖除蛋白质的常用方法有:Sevag 法、三氯乙酸法、天然澄清剂法、蛋白酶法、透析法、树脂法、反复冻融法等^[14-15],以及几种方法联用。其中 Sevag 法是实验室中普遍采用的方法。本研究通过单因素及多因素正交试验确立了 Sevag 法去除鹿药粗多糖蛋白质的优化工艺为:多糖溶液(2 mg/mL)与 Sevage 试剂的体积比为 2:1,三氯甲烷与正丁醇体积比为 4:1,脱蛋白 6 次,每次振荡 15 min,其中脱蛋白次数和振荡时间是主要影响因素。本研究所确定的最佳工艺与文献确定的最佳工艺基本一致^[16],由此可见,采用 Sevag 法脱除植物多糖中的蛋白质不仅简便易行,且从方法学角度来看是稳定性、重复性、再现性都比较好的方法,不失为多糖脱蛋白的常用方法。

目前,在天然产物化学研究领域里对多糖的提取分离、药理、药效等方面的研究比较广泛,如同 Sevag 法脱多糖蛋白已经成型一样,各种研究日臻成熟,但是由于多糖结构的复杂性使得多糖结构分析、构效关系、生物学功能及机理等方面还存在许多问题需要去解决,期待未来研究多糖可以象研究蛋白质、核酸那样,更好的实现研究的自动化。

参考文献:

- [1] 金征宇,顾正彪,童群义,等.碳水化合物化学——原理与应用[M].北京:化学工业出版社,2008.
- [2] 董群,方积年.多糖在医药领域中的应用[J].中国药学杂志,2001,36(10):649-652.
- [3] Leung M Y K, Liu C, Koon J C M, et al. Polysaccharide biological response modifiers[J]. Immunology letters, 2006, 105(2): 101-114.
- [4] 王小红,余新民,沈祝莘,等.香菇多糖联合化疗对晚期结肠癌患者的临床疗效[J].中国医药导报,2014,11(17):65-69.
- [5] 张英楠,杨树宝,单春兰,等.刺五加多糖对雏鸡脾脏中 T、B 淋巴细胞定位分布的影响[J].中国兽药杂志,2016,50(4):35-40.
- [6] 石铁男,杨绒娟,扈妍妍,等.党参多糖可溶性粉对肉仔鸡血清 ND 抗体水平、IgG 及肠道 SIgA 含量的影响[J].中国兽药杂志,2016,50(9):47-52.
- [7] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2008:2235-2236.
- [8] 安晓云,慈嘉,申琼.鹿药组织培养的研究[J].中国园艺文摘,2010,26(10):13-15.
- [9] 赵淑杰,韩梅,韩忠明,等.高速逆流色谱分离与鉴定鹿药中黄酮类化合物[J].分析化学,2009,37(9):1354-1358.
- [10] Liu X,Zhang H,Niu X F, et al. Steroidal saponins from *Smilacina japonica*[J]. Fitoterapia,2012,83(4):812-816.