

脱蛋白方法对蜘蛛香多糖总抗氧化能力的影响

李强^{*}, 丁爱玲, 郑伟, 孙剑
(郧阳医学院, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 研究 3 种脱蛋白方法对蜘蛛香多糖总抗氧化能力的影响。方法: 采用 Sevag 法、三氯乙酸法和盐酸法对蜘蛛香粗多糖脱蛋白, 测定蛋白质脱除率、多糖损失率和总抗氧化能力损失率。结果: 采用 Sevag 法脱蛋白, 多糖总抗氧化能力损失率最小。Sevag 法处理 6 次, 蛋白质脱除率为 41.71%, 多糖损失率为 46.38%, 总抗氧化能力损失率为 11.62%。结论: 蜘蛛香粗多糖适宜用 Sevag 法脱蛋白。

[关键词] 蜘蛛香; 多糖; 脱蛋白; 抗氧化能力

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0018-04

Effect of deproteinization methods on the total antioxidant ability of polysaccharide from *Valeriana jatamansi*

LI Qiang^{*}, DING Ai-ling, ZHENG Wei, SUN Jian
(Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of three different deproteinization methods on the total antioxidant ability(TAA) of polysaccharide from *Valeriana jatamansi*. **Method:** Sevag method, Trichloroacetic acid method and HCl method were used to remove protein from crude polysaccharide of *V. jatamansi* and the percentage of deproteinization, the loss of polysaccharide and the loss of TAA were determined. **Result:** The TAA loss of polysaccharide was minimal by Sevag method. The percentage of deproteinization was 41.71%, the loss of polysaccharide was 46.38%, and the loss of TAA was 11.62%. When the polysaccharide solution was treated for 6 times by Sevag method. **Conclusion:** Sevag method was suitable for the deproteinization of crude polysaccharide from *V. jatamansi*.

[Key words] *Valeriana jatamansi*; polysaccharide; deproteinization; antioxidant ability

蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 又名心叶缬草, 分布于陕西、湖北和四川等地, 具有多种药效^[1]。多糖是机体内重要的生物大分子, 研究表明多糖的抗氧化活性可能是其抗肿瘤、抗衰老、抗感染等功能的作用机制之一^[2]。为深入研究蜘蛛香多糖的抗氧化作用, 须制备高纯度产品。蛋白质是粗多糖的主要杂质之一, 脱蛋白研究对多糖纯化具有重要意义。粗多糖脱蛋白研究中, 一般仅考察蛋白质脱除率和多糖损失率的变化, 而忽视脱蛋白方法对多糖抗氧化活性的影响^[3-6]。本实验以蛋白质脱除率、多糖损

失率和总抗氧化能力损失率为指标, 研究 Sevag 法、三氯乙酸法和盐酸法对蜘蛛香多糖的影响, 为纯化高抗氧化活性蜘蛛香多糖奠定基础。

1 材料

蜘蛛香购于十堰市中药材公司, 产地湖北, 经郧阳医学院基础医学院唐微副教授鉴定; 考马斯亮蓝 G-250(美国 Amresco 公司); 牛血清蛋白(美国 Sigma 公司); 总抗氧化能力测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 其他试剂为国产分析纯。

HH·SY11-Ni 型电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司); RE-52D 型旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂); 722S 型可见光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

[收稿日期] 20100223(006)

[基金项目] 郧阳医学院科研基金资助项目(2006QDJ06)

[通讯作者] 李强, Tel: (0719) 8875313, E-mail: lq99050@

163.com

2 方法

2.1 蜘蛛香粗多糖的制备 药材烘干, 粉碎, 过 40 目筛, 加入 15 倍 85% 乙醇, 回流脱脂 2 h, 抽滤并用 85% 乙醇洗 6 次, 烘干备用。药粉加水(料液比 1:10), 于 100 ℃ 浸提 2 次, 每次 5 h, 提取液浓缩至 1/10 体积, 加入 4 倍 90% 乙醇, 4 ℃ 静置 8 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 沉淀依次用乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 干燥得粗多糖。称取 3.75 g 粗多糖加水溶解并定容至 500 mL, 得蜘蛛香粗多糖溶液。

2.2 蛋白质含量测定 以考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量^[7]。以牛血清蛋白(100 mg·L⁻¹) 作标准曲线, 牛血清蛋白质量分数为横坐标, 595 nm 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $Y=0.007X+0.0086$, $r=0.9992$ 。

2.3 多糖含量测定 以蒽酮-硫酸法测定多糖含量^[8]。以葡萄糖(100 mg·L⁻¹) 作标准曲线, 葡萄糖质量分数为横坐标, 620 nm 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $Y=0.007X-0.001$, $r=0.9997$ 。

2.4 多糖总抗氧化能力测定 采用铁还原(FRAP)法测定多糖总抗氧化能力。抗氧化物质能使 Fe³⁺ 还原成 Fe²⁺, 后者可与菲啉类物质形成稳定的络合物, 通过比色法可测出其抗氧化能力的高低。

按总抗氧化能力测定试剂盒说明书准备工作液, 按试剂盒操作表(见表 1) 操作, 520 nm 处测定吸光度。在 37 ℃ 时, 每 min 每 mL 样品液使反应体系的吸光度值每增加 0.01, 为一个抗氧化能力单位。

总抗氧化能力(U·mL⁻¹) =

$$\frac{(A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \times \text{反应液总体积} \times \text{样品液稀释倍数}}{0.01 \times 30 \times \text{取样量}}$$

表 1 总抗氧化能力测定试剂盒操作表

试剂	测定管 / mL	对照管 / mL
试剂 1	1	1
样品液	0.1	—
试剂 2	2	2
试剂 3 应用液	0.5	0.5
	混匀, 37 ℃ 水浴 30 min	
试剂 4	0.1	0.1
样品液	—	0.1

2.5 蛋白质脱除率、多糖损失率和多糖总抗氧化能力损失率计算

$$\text{蛋白质脱除率} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100\%$$

$$\text{多糖损失率} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100\%$$

$$\text{总抗氧化能力损失率} = \frac{O_1 - O_2}{O_1} \times 100\%$$

式中, P_1, R_1, O_1 分别为原多糖液蛋白质质量分数、多糖质量分数和总抗氧化能力; P_2, R_2, O_2 分别为脱蛋白后多糖液蛋白质质量分数、多糖质量分数和总抗氧化能力。

2.6 Sevag 法脱蛋白 取粗多糖溶液 75 mL 于 250 mL 锥形瓶中, 加双蒸水稀释至 150 mL, 加入 0.2 倍体积三氯甲烷和 0.04 倍体积正丁醇, 磁力搅拌 30 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取少量上层清液进行测定, 剩余上层清液再加入 0.2 倍体积三氯甲烷和 0.04 倍体积正丁醇, 重复处理数次。

2.7 三氯乙酸法脱蛋白 取粗多糖溶液 10 份各 20 mL 于 50 mL 烧杯中, 以 1:1 体积加入三氯乙酸溶液, 使其质量分数分别为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 搅匀, 4 ℃ 静置 12 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液定容至 50 mL 进行测定。

2.8 盐酸法脱蛋白 取粗多糖溶液 6 份各 20 mL 于 50 mL 烧杯中, 分别加入 20 mL 双蒸水并用 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 至 2, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 混匀, 4 ℃ 静置 12 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液定容至 50 mL 进行测定。

3 结果

3.1 Sevag 法脱蛋白效果 Sevag 法是利用一定比例的三氯甲烷和正丁醇使蛋白质变性乳化, 离心后变性蛋白质处于水相和有机相之间, 可温和地除去蛋白质, 对多糖结构的破坏较小。由图 1 可知, Sevag 法蛋白质脱除率随处理次数增加显著升高, 多糖损失率和总抗氧化能力损失率缓慢升高。Sevag 法处理 6 次后粗多糖蛋白质脱除率达最高为 41.71%, 多糖损失率为 46.38%, 总抗氧化能力损失率为 11.62%, 多糖损失率远高于总抗氧化能力损失率, 说明损失的多糖抗氧化能力较低。

3.2 三氯乙酸法脱蛋白效果 三氯乙酸为有机酸, 可使蛋白质变性并结合生成不溶性的盐类。由图 2 可知, 三氯乙酸法的多糖损失率较低, 三氯乙酸质量分数为 1% 时, 多糖损失率为 2.71%, 质量分数为 6% 时, 多糖损失率达最高为 6.53%。三氯乙酸质量分数对多糖总抗氧化能力影响较大, 质量分数为 1% 时, 总抗氧化能力损失率为 9.96%, 质量分数升

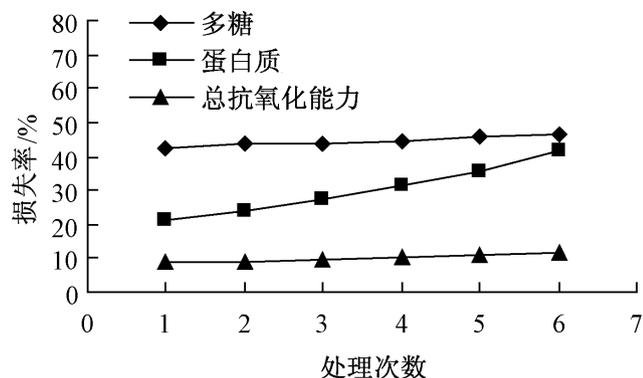


图 1 Sevag 法脱蛋白结果

至 10% 时, 总抗氧化能力损失率达最高为 64.73%, 说明高质量分数三氯乙酸对多糖活性结构破坏严重。三氯乙酸质量分数为 7% 时, 蛋白质脱除率达最高为 48.84%, 多糖损失率为 4.72%, 总抗氧化能力损失率为 58.09%。

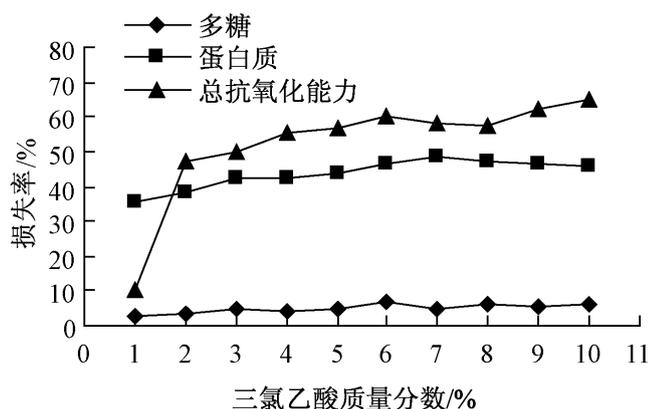


图 2 三氯乙酸法脱蛋白结果

3.3 盐酸法脱蛋白效果 由图 3 可知, 用盐酸调节多糖溶液 pH 值, 随着 pH 值降低, 蛋白质脱除率逐渐升高, 多糖损失率变化不大, 总抗氧化能力损失率逐渐增高。pH 值为 2 时, 蛋白质脱除率达最高为 45.38%, 多糖损失率为 6.73%, 总抗氧化能力损失率为 20.75%。

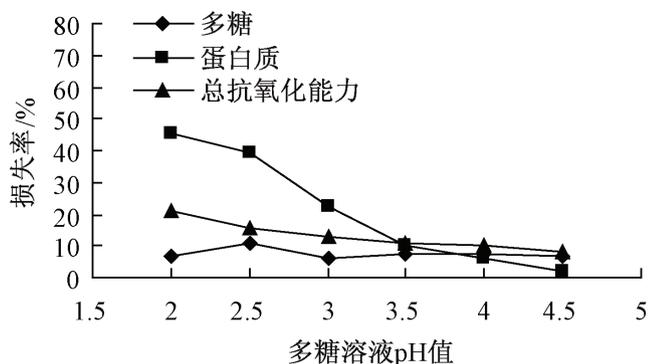


图 3 盐酸法脱蛋白结果

3.4 3 种方法结果比较 由图 4 可知, 若仅考虑蛋白质脱除率和多糖损失率, 三氯乙酸法明显优于 Sevag 法和盐酸法, 但其总抗氧化能力损失率最高, 抗氧化多糖的结构被严重破坏, 对后期的多糖活性研究十分不利。综合考虑蛋白质脱除率、多糖损失率和总抗氧化能力损失率, 虽然 Sevag 法蛋白质脱除率较低, 且多糖损失率最高, 但总抗氧化能力损失率最小, 说明其对抗氧化多糖破坏最小, 并可除去部

分抗氧化活性低的多糖, 有利于抗氧化多糖的纯化, 所以选择 Sevag 法脱蛋白更合适。

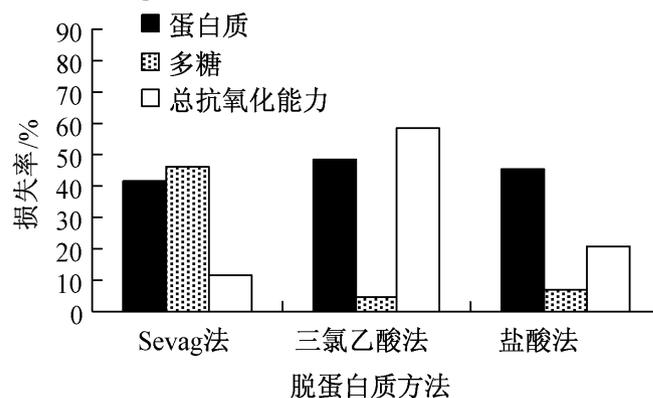


图 4 3 种方法结果柱状图

4 讨论

多糖组成复杂, 种类繁多, 生物学活性差异较大, 如何分离纯化得到高纯度、高活性的多糖是多糖研究的难题。李贵荣研究发现纯化后的枸杞多糖清除活性自由基能力低于粗多糖^[9]。许多多糖产品仅仅停留在保健品阶段, 未能开发成药物, 主要原因是多糖的分离纯化困难, 国内一度出现了“多糖越纯, 活性越小”的论点, 这是因为用了错误的分离方法^[10]。脱蛋白为多糖纯化的重要环节, 若仅以蛋白质脱除率和多糖损失率为指标选择脱蛋白方法难以获得高活性多糖。

本实验以蛋白质脱除率、多糖损失率和总抗氧化能力损失率综合考察常用的 3 种脱蛋白质方法对蜘蛛香多糖的影响, 发现三氯乙酸法和盐酸法的蛋白质脱除率和多糖损失率指标均优于 Sevag 法, 但这两种方法导致多糖总抗氧化能力损失较大, 可能在酸性条件下抗氧化多糖结构易被破坏; Sevag 法对蜘蛛香多糖总抗氧化能力影响最小, 不仅脱除蛋白质也能去除一些抗氧化活性较低的多糖, 利于蜘蛛香抗氧化多糖的纯化, 但其蛋白质脱除率仅为 41.71%, 要进一步脱除蛋白质其工艺还需优化。

中药成分抗氧化活性评价的方法有二苯代苦味酰基自由基 (DPPH) 法、硫代巴比妥酸 (TBA) 法、FRAP 法和生物发光法等^[11]。本实验采用简单的 FRAP 法评价多糖的抗氧化能力, 以期简便地筛选出合适的脱蛋白方法, 为高抗氧化活性多糖的纯化提供新的思路。

[参考文献]

[1] 黄宝康, 郑汉臣, 秦路平, 等. 国产缬草属药用植物资源调查[J]. 中药材, 2004, 27(9): 632.
[2] 冉靛, 杨小生, 王伯初, 等. 抗氧化多糖的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 494.

- [3] 秦卫东, 马利华, 陈学红, 等. 生姜多糖的提取及脱蛋白研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4) : 218.
- [4] 刘凤, 陶慧卿, 何培民. 条斑紫菜多糖脱蛋白方法与条件优化[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(2) : 140.
- [5] 张慧玲, 任秀莲, 魏琦峰, 等. 海带多糖的脱蛋白研究[J]. 中成药, 2008, 30(9) : 1370.
- [6] 毛英丽, 王忠民, 李瑾瑜, 等. 葡萄多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(4) : 42.
- [7] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 182.
- [8] 王宪泽. 生物化学实验技术原理和方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 52.
- [9] 李贵荣. 枸杞多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(2) : 94.
- [10] 方积年, 丁侃. 天然药物——多糖的主要生物活性及分离纯化方法[J]. 中国天然药物, 2007, 5(5) : 338.
- [11] 李秋红, 李廷利, 黄莉莉, 等. 中药抗氧化的作用机理及评价方法研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5) : 1257.

[责任编辑 仝燕]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿, 请登录本刊网站 [www. syfjxzz. com](http://www.syfjxzz.com) 注册会员, 登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后, 如录用, 请按通知要求交纳论文发表费。(见本刊稿约 7 投稿及缴费)