

activity of *Lithospermum erythrorhizon* in vitro [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2007, 25(5): 490-493.

[10] LIU J W. Methodology of Pharmacology Experiment-New Technic and Method(药理学试验方法学——新技术与新方法) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 92-100.

[11] NORUMA T, KIKUCHI M, KAWAKAMI Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [J]. Biochem Mol Biol Int, 1997, 42(2): 361-370.

[12] EMMONS C L, PETERSON D M, PAUL G L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L. extracts) 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(12): 4894-4898.

[13] SHANMUGASUNDARAM P, VENKATARAMAN S. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 104(1/2): 124-128.

收稿日期: 2012-04-03

## 萝藦果壳多糖脱蛋白方法研究

崔璠<sup>1</sup>, 韩冠英<sup>2</sup>, 马寅达<sup>2</sup>, 郭斌<sup>2\*</sup> (1. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121001; 2. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:** 目的 确定萝藦果壳多糖脱蛋白的最优方法。方法 以蛋白脱除率和多糖损失率为指标, 比较氯仿-正丁醇法(Sevag法)、三氯乙酸法(TCA法)、木瓜蛋白酶-Sevag法和木瓜蛋白酶-TCA法。结果 Sevag法、TCA法、木瓜蛋白酶-Sevag法、木瓜蛋白酶-TCA法的蛋白脱除率分别为73.14%, 71.55%, 86.03%, 75.33%, 多糖损失率分别为24.40%, 25.68%, 8.47%, 17.13%。结论 木瓜蛋白酶-Sevag法是除去萝藦果壳多糖中蛋白的最佳方法。

**关键词:** 萝藦果壳; 多糖; 脱蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)08-0856-04

### Study on Deproteinization Methods of Polysaccharide from *Metaplexis Japonica* Nutshell

CUI Zan<sup>1</sup>, HAN Guanying<sup>2</sup>, MA Yinda<sup>2</sup>, GUO Bin<sup>2\*</sup> (1. Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. The No.1 Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To elect the best deproteinization method of polysaccharide from *Metaplexis Japonica* nutshell. **METHODS** The protein was removed by the methods of Sevag, TCA, papain-sevag and papain-TCA. The rate of deproteinization and the loss rate of polysaccharide were detected. **RESULTS** The percentage of deproteinization of Sevag, TCA, papain-Sevag and papain-TCA were 73.14%, 71.55%, 86.03%, 75.33% respectively and the loss rate of polysaccharide were 24.40%, 25.68%, 8.47%, 17.13% respectively. **CONCLUSION** The best deproteinization method of polysaccharide from *Metaplexis Japonica* nutshell was the papain-Sevag method.

**KEY WORDS:** *Metaplexis japonica* nutshell; polysaccharide; deproteinization

萝藦(*Metaplexis japonica*)别名白环藤, 多年生缠绕草本, 有乳汁。《本草汇言》记载:“萝藦, 补虚劳, 益精气之药也。”常以块根、全草和果壳入药, 目前对萝藦藤和萝藦全草研究较多。杨蕾<sup>[1]</sup>对萝藦藤进行了系统实验的研究, 确定萝藦中含有糖类、蛋白质、生物碱类化合物等。贾琳等<sup>[2]</sup>通过对萝藦全草粗多糖研究, 证明萝藦多糖能提高免疫抑制小鼠体质量及免疫器官指数, 促进脾淋巴细胞增殖。但目前国内外尚没有对萝藦果壳多糖进行研究的报道。

植物多糖常混有较多蛋白, 会对多糖的研究产生较大的影响。去除植物多糖中蛋白常用的方

法有 Sevag 法、TCA 法、鞣酸法、及酶法与以上方法结合法<sup>[3-4]</sup>, 此外还有 HCl 法<sup>[5]</sup>、NaCl 法和 CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[6]</sup>。本实验比较 Sevag 法、TCA 法、木瓜蛋白酶-Sevag 法和木瓜蛋白酶-TCA 法对萝藦果壳多糖提取物脱蛋白效果, 以确定最优脱蛋白方法, 为萝藦果壳多糖分离纯化提供依据。

#### 1 材料、试剂及仪器

萝藦果壳(采集于锦州市周边, 并由锦州市药品检验所翟铁红主任药师鉴定为萝藦科萝藦果壳)。

考马斯亮蓝 G250(批号: 20111006, 天津市光复精细化工研究所); 葡萄糖对照品(批号: C14027000, 上海楚定分析仪器有限公司, 纯度:

作者简介: 崔璠, 男, 硕士生 Tel: 15641659331 E-mail: 1987tiangangbeidou@163.com  
Tel: (0416)4197079 E-mail: jyguobin@126.com

\*通信作者: 郭斌, 男, 教授, 硕士

99.6%), 牛血清蛋白(批号: 110722, 上海蓝技科技发展有限公司); 三氯乙酸(批号: 20120824, 天津市光复精细化工研究所); 重蒸酚(批号: 08310246, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 95%乙醇(批号: 20120905, 盘锦天源药业有限公司); 木瓜蛋白酶 100 万 U·g<sup>-1</sup> (批号: 20120503, 南宁宠博生物工程有限公司); 三氯甲烷(批号: 20120824, 天津市光复精细化工研究所); 正丁醇(批号: 20100908, 天津市天力化学试剂有限公司, 分析纯)。

ASC-D II 三峰牌计重秤(上海乾峰电子仪器有限公司); SHZ-D(III)循环水式真空泵(上海东玺制冷仪器设备有限公司); 旋转蒸发器(上海广英仪器有限公司); 恒温水浴锅(上海广英仪器有限公司); UP3200HE 数控超声波清洗器(南京垒君达超声电子设备有限公司); 电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); LD-2A(II)低速离心机(北京京立离心机有限公司); 真空干燥器(蜀牛); PHS-25 型 pH 计(上海精科); 酒精计(河间市黎民居综合仪表厂); BP211D 电子天平(Saitorius); 752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 萝藦果壳多糖的提取

将干燥后的萝藦果壳粉碎, 40 目筛, 称取 200 g 果壳粉末, 加 12 倍于果壳称取量的蒸馏水, 80 °C 热水浸提 2 次, 每次 2 h。浸提后滤渣过 400 目纱网, 取滤液, 合并两次滤液。将滤液在 60 °C, 25 r·min<sup>-1</sup> 旋转蒸发浓缩至 400 mL, 离心取上清液。上清液加入 95%乙醇, 边加边搅拌, 使乙醇终浓度为 65%, 醇沉两次, 所得固体于真空干燥器中干燥, 得萝藦果壳粗多糖。

### 2.2 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝法<sup>[7]</sup>, 制作蛋白标准曲线。以蛋白浓度 *C* 为横坐标, 以吸光度 *A* 为纵坐标得回归方程  $A=0.0061C+0.013$ ,  $r=0.9998$ , 线性范围: 20~100 μg·mL<sup>-1</sup>。

### 2.3 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法制作多糖含量测定标准曲线, 称取恒重后的葡萄糖 40 mg 置于 500 mL 量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 得到葡萄糖溶液浓度为 80 μg·mL<sup>-1</sup>, 分别精密量取 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL 于试管中, 加蒸馏水补至 1.00 mL, 加 6%苯酚 1 mL, 摇匀, 加入 5 mL 浓硫酸,

迅速摇匀, 冷却至室温, 在 490 nm 处测吸光度。以吸光度 *A* 为纵坐标, 浓度 *C* 为横坐标, 得回归方程  $A=0.0085C+0.0183$ ,  $r=0.9992$ 。线性范围: 8~80 μg·mL<sup>-1</sup>。

## 2.4 脱蛋白方法

**2.4.1 Sevag 法** 取 0.5 g·mL<sup>-1</sup> 的粗多糖溶液 50 mL, 加入多糖溶液 1/4 体积的 Sevag 试剂(氯仿: 正丁醇=4:1), 充分震荡, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min, 溶液分为 3 层, 上层为多糖水溶液, 中间为蛋白, 下层为氯仿-正丁醇, 取上清液。反复处理 9 次, 分别测定蛋白(处理前的测定需稀释 5 倍后测定, 下同)和多糖(多糖处理前后均需稀释 50 倍后测定, 下同)处理前后的含量, 计算蛋白脱除率和多糖损失率。

**2.4.2 TCA 法** 取 0.5 g·mL<sup>-1</sup> 粗多糖溶液 50 mL, 冰浴条件下分别加入不同浓度 TCA, 边加边搅拌, 使 TCA 终浓度为 5%, 10%, 15%。于 4 °C 冰箱中过夜, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液, 用 2 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液中和至中性<sup>[8]</sup>, 分别测定蛋白和多糖处理前后的含量, 计算蛋白脱除率和多糖损失率。

**2.4.3 木瓜蛋白酶-Sevag 法** 木瓜蛋白酶作用于多糖脱蛋白时与[E]/[S]即酶的用量、pH 值、温度、时间四个因素有关<sup>[9]</sup>。本实验进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验后, 离心, 按“2.4.1”项下 Sevag 法处理 5 次, 分别测定蛋白和多糖处理前后的含量, 计算蛋白脱除率和多糖损失率。正交因素水平表见表 1。

表 1 木瓜蛋白酶脱蛋白因素水平

Tab 1 Factors and levels of papain removal of protein

水平	因素			
	酶量(A)/%	pH(B)	温度(C)/°C	时间(D)/h
1	1	5.0	50	1
2	2	5.5	55	2
3	3	6.0	60	4

**2.4.4 木瓜蛋白酶-TCA 法** 取 0.5 g·mL<sup>-1</sup> 的粗多糖溶液 50 mL, 先用“2.4.3”项下确定的酶作用的最佳条件处理多糖溶液, 然后再用“2.4.2”项下确定的 TCA 脱蛋白最佳体积分数处理多糖溶液, 分别测定蛋白和多糖处理前后的含量, 计算蛋白脱除率和多糖损失率。

## 3 结果

### 3.1 Sevag 法脱蛋白结果

多糖溶液经过 Sevag 试剂反复处理 9 次后, 多糖溶液和氯仿-正丁醇间已基本没有蛋白。处理前蛋

白含量为  $145.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 处理后为  $39.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 蛋白脱除率为 73.14%。处理前多糖含量为  $2\ 950.13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 处理后为  $2\ 230.30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 多糖损失率为 24.40%。

### 3.2 TCA 法脱蛋白结果

3 种不同体积分数 TCA 处理多糖溶液后多蛋白脱除率和多糖损失率见表 2。结合蛋白脱除率和

表 2 TCA 法脱蛋白结果

Tab 2 Results of TCA deproteinization

TCA/%	处理前蛋白含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	处理后蛋白含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	蛋白质 脱除率/%	处理前多糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	处理后多糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	多糖 损失率/%
5	145.69	45.86	68.52	2 950.24	2 232.15	24.34
10	145.77	41.47	71.55	2 950.44	2 192.77	25.68
15	145.43	42.06	71.08	2 950.65	2 208.86	25.14

表 3 多糖损失率

Tab 3 The loss rate of polysaccharide

No	A	B	C	D	处理前 多糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	处理后 多糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	多糖损 失率/%
1	1	5.0	50	1	2 950.23	2 682.05	9.09
2	1	5.5	55	2	2 950.16	2 733.32	7.35
3	1	6.0	60	4	2 950.26	2 696.24	8.61
4	2	5.0	55	4	2 950.11	2 701.12	8.44
5	2	5.5	60	1	2 949.98	2 693.92	8.68
6	2	6.0	50	2	2 950.19	2 701.09	8.44
7	3	5.0	60	2	2 950.27	2 709.82	8.15
8	3	5.5	50	4	2 949.99	2 726.38	7.58
9	3	6.0	55	1	2 950.14	2 740.09	7.12
$K_1$	8.35	8.56	8.37	8.30			
$K_2$	8.52	7.87	7.64	7.98			
$K_3$	7.62	8.06	8.48	8.21			
$R$	0.90	0.69	0.84	0.32			

3.3.2 蛋白脱除率及方差分析 蛋白脱除率见表 4, 由表 4 分析, 从极差  $R$  方面分析, 影响蛋白脱除率因素为:  $A>D>C>B$ , 直观分析脱蛋白最佳条件为:  $A_2B_1C_1D_3$ 。

方差分析结果见表 5, 由结果可知, 酶加入量即  $[E]/[S]$  和时间对蛋白脱除率影响特别显著, 温度对蛋白脱除率影响显著, 而 pH 值在 5~6 之间时对蛋白脱除率无明显影响, 与  $R$  分析结果一致。故木瓜蛋白酶-Sevag 法中酶作用的最佳条件为  $A_2B_1C_1D_3$ 。

### 3.3.3 条件验证

在  $A_2B_1C_1D_3$  条件下, 取同一批供试品进行 3 次实验, 结果见表 6。经验证, 此条件下脱蛋白效果稳定。

多糖损失率两个指标, 采用 10% TCA 脱蛋白效果优于 5% 和 15%。

### 3.3 木瓜蛋白酶-Sevag 法脱蛋白结果

3.3.1 多糖损失率 结果见表 3, 从极差  $R$  分析得知多糖损失条件优先顺序为  $D>B>C>A$ , 但考虑到多糖损失率都不大, 所以酶作用条件对多糖损失影响可以不予考虑, 应以考虑蛋白脱除率为主。

表 4 蛋白脱除率

Tab 4 Percentage of deproteinization

No	A	B	C	D	处理前 蛋白含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	处理后 蛋白含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	蛋白脱 除率/%
1	1	5.0	50	1	145.33	34.37	76.35
2	1	5.5	55	2	145.45	32.89	77.39
3	1	6.0	60	4	145.78	32.39	77.78
4	2	5.0	55	4	145.35	22.41	84.58
5	2	5.5	60	1	145.69	30.38	79.15
6	2	6.0	50	2	145.77	23.47	83.90
7	3	5.0	60	2	145.79	33.79	76.82
8	3	5.5	50	4	145.74	28.20	80.65
9	3	6.0	55	1	145.78	36.24	75.14
$K_1$	77.17	79.25	80.30	76.88			
$K_2$	82.54	79.06	79.04	79.37			
$K_3$	77.54	78.94	77.92	81.00			
$R$	5.37	0.31	2.38	4.12			

表 5 方差分析

Tab 5 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	$F$	显著性
A	54.036	2	369.710	<0.01
C	8.531	2	58.367	<0.05
D	25.870	2	177.001	<0.01
B(误差)	0.146	2		

### 3.4 木瓜蛋白酶-TCA 法脱蛋白结果

采用“3.3.2”中酶作用的最佳条件处理多糖溶液后, 再用 10% TCA 脱蛋白, 处理前蛋白含量为  $145.88 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 处理后为  $35.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 处理前多糖含量为  $2\ 950.16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 处理后为  $2\ 444.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 蛋白脱除率和多糖损失率依次为 75.33% 和 17.13%。

表 6 验证结果

Tab 6 Results of verification

次数	处理前蛋白含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	处理后蛋白含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	蛋白质 脱除率/%	处理前多糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	处理后多糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	多糖 损失率/%
1	145.56	20.68	85.79	2 950.19	2 704.14	8.34
2	145.99	20.39	86.03	2 950.28	2 700.39	8.47
3	145.34	20.52	85.88	2 950.15	2 702.93	8.38

#### 4 讨论

单用 Sevag 法进行脱蛋白处理, 需要反复多次, 多糖损失较多。TCA 法除蛋白较为剧烈, 应注意温度不宜过高, 以免造成多糖结构破坏。TCA 法脱蛋白, TCA 遇到分子量较大且结构复杂的蛋白质时, TCA 可能会进入到蛋白质分子内, 使这类蛋白难以去除。而且以上 2 种脱蛋白方法对游离蛋白质去除效果较好, 但难以除去糖结合蛋白。

有些多糖提取物中会含有糖结合蛋白和结构复杂的大分子蛋白, 这就需要先用酶法在适宜条件下先将这类蛋白水解, 然后再用以上方法中的某种方法处理。先用酶法处理多糖溶液, 将大分子蛋白和糖结合蛋白酶解成小分子蛋白, 再采用合适的方法除去, 可以提高蛋白脱除率。本实验表明酶解后减少了 Sevag 法处理次数, 降低了多糖损失, 去除蛋白效果最佳, 至于溶液中残留的 Sevag 试剂可以用透析法除掉<sup>[10]</sup>。木瓜蛋白酶还具有把蛋白水解物合成类蛋白的作用, 这可能是酶-TCA 法去除蛋白效率未明显提高的原因。

#### REFERENCES

[1] YANG L. Separation and analysis of *Metaplexis japonica*'s chemical composition [D]. Shanghai: East China University of

Science and Technology, 2012.

- [2] JIA L, GUO B. A preliminary study of the effects of the extracts of *Metaplexis japonica* polysaccharides on the immune suppression of the immune organs and the lymphocyte proliferation of mice [J]. J Liaoning Med Univ(辽宁医学院学报), 2011, 32(5): 400-402.
- [3] BAN H M, SHANG Q, XIAO W. Study on deproteinization of polysaccharide from *Flos Lonicerae* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2010, 41(4): 584-586.
- [4] ZHOU B Z, XIAO Y P. Deproteinization in preparation of *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharide and determination of polysaccharide molecular weight [J]. J Shaanxi Norm Univ (Nat Sci Ed), 2012, 40(1): 63-66.
- [5] HUANG G L, SHU S Q, CAI T T, et al. Preparation and deproteinization of garlic polysaccharide [J]. Int J Food Sci Nutr, 2012, 63(6): 739-741.
- [6] HUANG G L, CHEN Y, WANG X Q. Extraction and deproteinization of pumpkin polysaccharide [J]. Int J Food Sci Nutr, 2011, 62(6): 568-571.
- [7] TAN M. Investigate the extraction, separation, purification and composition of active polysaccharides in *Atractylodes macrocephala* Koidz [D]. Hu'nan: Hu'nan Normal University, 2010.
- [8] LIANG J, XIA Y G, YANG B Y, et al. Determinate ephedra polysaccharide protein content and compare the methods of removing protein [J]. Acta Chin Med Pharm(中医学报), 2011, 39(2): 73-75.
- [9] CHEN Z K, WANG S M, GAO S, et al. Study on deproteinization of polysaccharide from *Polygoni Multiflori Radix Preparata* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(4): 41-43.
- [10] TIAN C Y. Isolation and biological activities of polysaccharide from sweet potato [D]. Liaoning: Dalian University of Technology, 2011.

收稿日期: 2013-01-21

## 中药药性间的相关性研究

王哲, 张佩江(河南中医学院, 郑州 450000)

**摘要:** 目的 采用数据挖掘技术研究分析中药药性与其功能主治间的关系规律。方法 以中国药典、《中药学》、《中华本草精选本》、《中药药理学》和《新编中药志》等书籍记载为数据来源, 结合临床用药经验及相关规范用语, 创建了中药药性理论及其功能主治等相关属性的中药数据库, 首先建立相关的数据模型, 然后针对中药的药性、药味、归经、功能及主治进行数据统计分析, 最后针对分析结果再进行关联挖掘。结果 建立了中药药性-药味-归经、药性-药味-归经-功能以及药性-药味-归经-功能-主治间较密切的频繁项目集, 并计算出相关支持度及支持率。结论 开展中药药性间相关性研究, 为中医药研究提供参考。

作者简介: 王哲, 女, 讲师 Tel: (0371)60985611 E-mail: wzhe-wz@126.com