

# 金银花多糖脱蛋白方法的研究

殷洪梅<sup>1</sup>, 尚强<sup>2</sup>, 萧伟<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

**摘要:**目的 优选金银花多糖除蛋白工艺。方法 以多糖损失率和蛋白脱除率为评价指标, 选用了 3 种方法: Sevag 法、酶法和酶-Sevag 法对金银花多糖提取物进行脱蛋白处理。结果 Sevag 法、酶法、酶-Sevag 法的蛋白脱除率分别为 85.72%、73.28%、84.50%, 多糖损失率分别为 56.57%、31.22%、29.35%。结论 酶-Sevag 法是金银花多糖除蛋白有效、可行方法。

**关键词:**金银花; 多糖; 脱蛋白; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.01

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)04-0584-03

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 干燥花蕾或带初开的花<sup>[1]</sup>。具有清热解毒、凉风散热、抗病毒、保肝利胆等功能。金银花化学成分复杂, 目前已鉴别出的主要有挥发油、黄酮类、有机酸类、三萜类<sup>[2]</sup>、环烯醚萜类<sup>[3]</sup>、甾醇与脂肪醇类、多糖<sup>[4]</sup>、微量元素。其中活性成分研究主要集中在有机酸与挥发油等成分, 对金银花多糖报道不多。目前多糖提取方法较多, 但在提取过程中都有蛋白质伴随产生, 所以除去蛋白质是多糖提取纯化的一个关键步骤。文献报道脱蛋白的常用方法为 Sevag 法、TCA 法、酶法、酶法-Sevag 法。其中 Sevag 法较温和, 是多糖脱蛋白的传统方法; TCA 法适用于除去含蛋白质量较高的多糖, 但对多糖的结构破坏较大; 酶法专属性强, 是目前普遍认为较好的脱蛋白方法; 酶法-Sevag 法由于具有试剂用量小、样品损耗少、快速等特点, 应用也较为普遍。本实验结合上述 4 种方法的特点及金银花多糖粗提物中蛋白质量, 采用 Sevag 法、酶法、酶-Sevag 法对提取的金银花多糖进行脱蛋白, 选择最优的脱蛋白方法, 为金银花多糖的进一步分离纯化提供实验依据。

## 1 实验材料、试剂与仪器

金银花购自山东平邑流峪镇, 经南京中医药大学学生药教研室陈建伟教授鉴定, 批号 Y081202。

无水乙醇、丙酮、乙醚、氯仿、正丁醇、苯酚、浓硫酸、乙醇、磷酸均为分析纯、木瓜蛋白酶( $3 \times 10^6$  U/g, 广西杰沃利生物公司)、牛血清白蛋白(美国 Amresco, pH 值为 5.2)、考马斯亮蓝 G250(国药集团化学

试剂有限公司)、D-无水葡萄糖(中国药品生物制品检验所, 批号 110833-200503)。

BP211D 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); pH 计(振源(厦门)工业有限公司); UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津)。

## 2 方法与结果

2.1 金银花多糖的提取<sup>[5]</sup>: 金银花药材 300 g 加入 10 倍量的 95% 乙醇浸泡 30 min 后回流提取两次, 每次 1 h, 滤过, 药渣依次加入 15 倍、10 倍量的水提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 滤液浓缩至适当体积, 加入 95% 乙醇使乙醇体积分数达到 80%, 静置过夜, 离心, 沉淀用有机溶剂洗涤, 得沉淀经干燥得粗多糖。

### 2.2 金银花多糖的量测定<sup>[6,7]</sup>

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取 105 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 1.4 mg 于 25 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 配制成 56  $\mu$ g/mL 的对照品溶液。

2.2.2 标准曲线的制备: 精密移取对照品溶液 0.3、0.6、1.0、1.3、1.7、2.0 mL, 置于具塞试管中, 各以蒸馏水补足至 2.0 mL, 然后加入 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 沸水浴加热 20 min, 冷却至室温, 于 490 nm 测吸光度, 以 2.0 mL 水按同样显色操作作为空白, 以吸光度(Y)对葡萄糖质量(X)作回归处理, 得回归方程:  $Y = 0.00687X - 0.00980$ ,  $r = 0.9996$ 。

2.2.3 样品中多糖测定: 取供试品溶液各 2.0 mL, 同时做 3 个重复, 以空白试剂为参比, 按上述标准曲

收稿日期: 2009-07-03

作者简介: 殷洪梅(1982—)女, 黑龙江省绥化市人, 在读硕士研究生, 研究方向为中药制剂的研发。

Tel: 15062987446 E-mail: yinhongmei\_2008@126.com

\*通讯作者 萧伟 E-mail: wzhzhrnj@tom.com

线的制备法,分别测定其吸光度值,计算样品中多糖量和多糖损失率。

$$\text{多糖损失率} = (T_i - T_j) / T_i \times 100\%$$

公式中  $T_i$  为提取物中多糖的量,  $T_j$  为脱蛋白后多糖的量

### 2.3 金银花多糖中蛋白质的测定<sup>[8,9]</sup>

2.3.1 标准溶液的制备:精确称取牛血清白蛋白 12 mg,置于 50 mL 量瓶中,加水溶解后稀释至刻度制成 240  $\mu\text{g}/\text{mL}$  贮备液。

2.3.2 标准曲线的制备:分别吸取贮备液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,加水稀释至 2.0 mL,向各管中加入 10 mL 考马斯亮蓝 G250 溶液,混合均匀后室温放置 30 min,以蒸馏水为空白,在 595 nm 波长处测定吸光度,得吸光度 ( $Y$ ) 与蛋白质的质量 ( $X$ ) 回归方程为  $Y = 0.00267X + 0.01541$ ,  $r = 0.9995$ 。

2.3.3 样品中蛋白质测定:取供试品溶液各 2.0 mL,同时做 3 个重复,以空白试剂为参比,按上述标准曲线的制备法,分别测定其吸光度值,计算样品中蛋白质量和蛋白质脱除率。

$$\text{蛋白质脱除率} = (R_i - R_j) / R_i \times 100\%$$

公式中  $R_i$  为粗多糖中蛋白质的量,  $R_j$  为脱蛋白后多糖中蛋白质的量

### 2.4 金银花多糖脱蛋白

2.4.1 Sevag 法:精确配制 0.02 g/mL 的多糖溶液,向此溶液中加入其体积 1/5 的氯仿-正丁醇(5:1)溶液,震荡 30 min,经离心去除沉淀后,上清液再加入其体积 1/5 的氯仿-正丁醇溶液,重复多次,直到无明显的沉淀产生为止,结果见图 1。

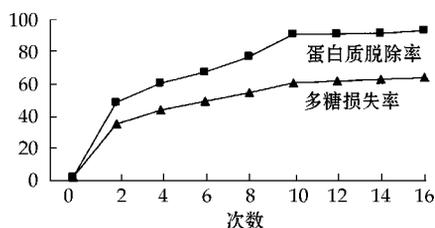


图 1 Sevag 法脱蛋白

Fig 1 Using Sevag method to remove protein

可见经过第 10 次脱蛋白,蛋白质的脱除率与多糖的损失率分别达到 85.72%、56.57%,之后仍能除去少量蛋白,但同时多糖损失率逐渐加大。每次除去蛋白质胶状物时,都会将少量溶于其中的多糖一起除去,部分与蛋白质结合的蛋白聚糖和糖蛋白在处理时也会沉淀下来,造成多糖大量损失。同时在使用氯仿、正丁醇萃取时,对环境污染较大,操作繁琐,试剂的损耗量也较大。

2.4.2 酶法:精确配制 0.02 g/mL 的多糖溶液,依

据正交试验确定的最佳工艺,调 pH 值后加入一定量的木瓜蛋白酶,水浴酶解,反应完后沸水浴灭酶 5 min,离心。

根据文献资料与预实验结果选取酶用量、温度、时间、pH 值 4 个因素,各 3 个水平,以蛋白质的脱除率为指标进行  $L_9(3^4)$  正交试验,因素水平见表 1,结果见表 2、3。

表 1 酶法脱蛋白因素水平

Table 1 Factors and levels of enzymatic removal of protein

水平	因素			
	A 酶量/ %	B 温度/	C 时间/ h	D pH
1	1	40	2	5.0
2	2	50	3	5.5
3	3	60	4	6.0

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

序号	A	B	C	D	蛋白质脱除率/ %
1	1	40	2	5	63.75
2	1	50	3	5.5	62.72
3	1	60	4	6	68.33
4	2	40	3	6	68.89
5	2	50	4	5	70.45
6	2	60	2	5.5	72.01
7	3	40	4	5.5	69.42
8	3	50	2	6	67.33
9	3	60	3	5	68.59
$K_1$	64.933	67.353	67.697	67.597	
$K_2$	70.450	66.833	66.733	68.050	
$K_3$	68.447	69.643	69.400	68.183	
R	5.517	2.810	2.667	0.586	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	46.790	2	82.522		$P < 0.01$
B	13.411	2	23.653	19.000	$P < 0.05$
C	10.940	2	19.295		
D	0.567	2	1.000		
误差	0.57	2			

由表 2 分析可知,以蛋白质的脱除率为评价指标进行判断时,  $A_2 > A_3 > A_1$ 、 $B_3 > B_1 > B_2$ 、 $C_3 > C_1 > C_2$ 、 $D_3 > D_2 > D_1$ ,影响因素为:  $A > B > C > D$ ,故直观分析最佳脱蛋白工艺为:  $A_2B_3C_3D_3$ 。

由表 3 方差分析结果可知,酶的用量对蛋白去除率的影响特别显著,温度对蛋白去除率的影响较显著,时间对蛋白去除率有一定的影响,而 pH 值的影响不大,这与极差分析结果一致。在 pH 5~6 时对蛋白的去除率几乎没有影响,故选用  $D_3$  或  $D_2$  几乎不影响蛋白去除率。所以酶法脱蛋白的最佳工艺为  $A_2B_3C_3D_3$  即:酶用量 2%,温度 60,时间 4 h, pH 值为 6。

2.4.3 酶-Sevag 法:精确配制 0.02 g/mL 的多糖溶液,酶法水解后高温灭活,离心,上清液再采用 Sevag 法,重复多次,直到无变性蛋白产生为止。结果见图 2。

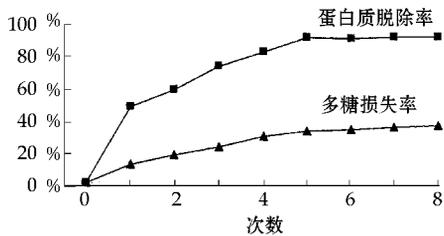


图 2 酶法-Sevag 法除蛋白

Fig 2 Using enzyme-Sevag method to remove protein

经过 5 次萃取后蛋白的脱除率与多糖损失率分别为 84.50%、29.35%,随着萃取次数的增加两相指标变化不大,蛋白质几乎全部除去。

### 3 讨论

3 种除蛋白方法都能在一定程度上脱除金银花多糖中的蛋白质。除蛋白目的在于为金银花多糖分离纯化与理化性质研究提供实验依据,故在兼顾多糖损失的同时尽可能除去其中的蛋白质。从表 4 获知,采用 Sevag 法脱蛋白,蛋白质的脱除率最高,但同时多糖损失率也最高;采用酶法脱蛋白,蛋白的脱除率最低;酶-Sevag 法脱蛋白,蛋白质的脱除率与 Sevag 法接近,但多糖损失率仅为 Sevag 法的 1/2。

酶-Sevag 法是利用木瓜蛋白酶来酶解蛋白,使其成为相对分子质量较小多肽或者更为彻底的氨基

表 4 3 种脱蛋白方法结果比较

Table 4 Comparison of three kinds of method for protein removal

除蛋白方法	多糖损失率/ %	蛋白质脱除率/ %
Sevag 法	56.57	85.72
酶法	31.22	73.28
酶-Sevag 法	29.35	84.50

酸,再进行醇沉,则大分子的多糖绝大多数得到沉淀,而相对分子质量较小的多肽和氨基酸大部分保留在溶液中,再结合 Sevag 法经过 5 次萃取后多糖中蛋白质的脱除率达到 84.50%,由于萃取次数与单纯的 Sevag 法相比大大减少,多糖损失率仅为 29.35%,进而证明酶-Sevag 法是金银花多糖脱蛋白可行的方法。

### 参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] Kwak W J, Hart C K, Chang H W, et al. Loniceroside C, antiinflammatory saponin from *Lonicera japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(3): 333-335.
- [3] 毕跃峰,田野,裴姗姗,等. 金银花中裂环环醚萜苷类化学成分研究[J]. *中草药*, 2008, 39(1): 18-21.
- [4] 王琦. 金银花的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2008.
- [5] 邓庆华. 用正交试验法优化金银花多糖提取工艺[D]. 长春:东北师范大学, 2008.
- [6] 司梁宏,谈恒山. 苯酚-硫酸显色法测定枸杞益肾胶囊中多糖含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(6): 836-837.
- [7] 张维杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1987.
- [8] 李建武,陈丽荣,袁明秀. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社, 1994.
- [9] 史德芳,韩淑琴. 仙人掌多糖提取过程中三种脱蛋白方法的比较研究[J]. *现代食品科学*, 2006, 22(4): 93-95.

## 降脂灵分散片溶出度的研究

楼超群<sup>1</sup>,戴德雄<sup>2</sup>,朱莹<sup>2\*</sup>

(1. 湖州市安吉县中医院,浙江 湖州 313300; 2. 浙江维康药业有限公司,浙江 丽水 323000)

摘要:目的 建立降脂灵分散片溶出度的测定方法。方法 以水作为溶出介质,采用浆法,100 r/min,以高效液相色谱法测定累积溶出率,绘制降脂灵分散片的累积溶出曲线,并进行样品的溶出度测定。结果 二苯乙烯苷在 0.057 2~0.572 μg 时进样量与峰面积呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ );对 3 批降脂灵分散片进行溶出度测定,二苯乙烯苷 15 min 的溶出量均达 70%以上。结论 所用方法具有灵敏、准确、快速的优点,适用于降脂灵分散片的质量控制。

关键词:降脂灵分散片;二苯乙烯苷;溶出度;高效液相色谱

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)04-0586-02

降脂灵分散片处方来源于部颁标准降脂灵片(WS3-B-3260-98),由何首乌、枸杞子、黄精、山楂、

决明子 5 味中药组成,以何首乌为主药,可用于肝肾阴虚,头晕,目昏,须发早白,高血脂等症。该制剂中