

# 脱蛋白工艺对苦丁茶冬青叶多糖提取率的影响

何玲玲, 王新\* (1. 沈阳化工学院应用化学学院, 辽宁沈阳110142; 2. 辽宁大学制药工程系, 辽宁沈阳110036)

**摘要** 采用乙醇对苦丁茶冬青叶进行脱脂, 水提醇沉方法得到苦丁茶冬青叶粗多糖。采用Sevag法去除多糖中的蛋白质, 研究了除蛋白次数对多糖及蛋白质含量的影响。结果表明, 苦丁茶冬青叶多糖采用Sevag法脱蛋白3次以后再继续脱蛋白意义不大。

**关键词** 脱蛋白; 苦丁茶冬青叶; 多糖

中图分类号 Q53 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)23-6302-01

## Effect of Deprotein Technique on the Extraction of Polysaccharide from the Leaf of *Ilex kudincha* C. J. Tseng

HE Lingling et al (School of Application Chemical, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142)

**Abstract** The leaves of *Ilex kudincha* C. J. Tseng were defatted with 95% EtOH, extracted with water and a crude polysaccharide was obtained. The crude polysaccharide was deproteinized with Sevag method and the effects of deprotein times on the content of polysaccharide and protein in the crude polysaccharide was studied. The results showed that the correct deprotein time from the polysaccharide of the leaf of *Ilex kudincha* C. J. Tseng was three times.

**Key words** Removal of protein; Leaf of *Ilex kudincha* C. J. Tseng; Polysaccharide

苦丁茶冬青(*Ilex kudincha* C. J. Tseng)是冬青科(Aquifoliaceae)冬青属乔木植物,主产于湖南、湖北、广东、广西、海南等省。叶(苦丁茶)苦、甘、凉,清热解毒,祛暑。主要用于治疗头痛、齿痛、目赤、热病烦渴、痢疾等症<sup>[1]</sup>。由苦丁茶冬青叶制成的苦丁茶是民间常用的中草药。近年来,已有人对苦丁茶冬青叶(苦丁茶)的化学成分和药理作用进行了研究<sup>[2]</sup>。笔者从苦丁茶冬青叶中分离提取得到粗多糖<sup>[3]</sup>,并研究了Sevag法脱蛋白次数对苦丁茶冬青叶多糖中糖和蛋白质含量的影响,以期生产及试验提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 苦丁茶冬青叶。**由海南澄迈万昌苦丁茶场提供,经晾干、粉碎后,用水于80℃浸提,提取液经浓缩后喷雾干燥得红棕色粉末,密封保存备用。

**1.1.2 仪器。**紫外-可见吸收光谱仪(UV-2501PC,日本岛津公司);元素分析仪(Vario EL,德国Elementar公司);真空干燥箱(876-4S型,上海锦屏仪器仪表有限公司);低速离心机(CL-12,新专红旗电机厂)。

**1.1.3 试剂。**苯酚(AR,郑州市德众化学试剂厂),使用前重蒸馏;无水乙醇、无水乙醚、95%乙醇、三氯甲烷、正丁醇、硫酸等均为国产分析纯试剂,使用前未处理。

### 1.2 方 法

**1.2.1 粗多糖的提取<sup>[4]</sup>。**称取苦丁茶冬青叶水提物喷雾干燥粉末10g,加入95%乙醇200ml浸泡过夜,抽滤,取滤渣重复以上操作直至乙醇液无色时止。80℃烘干,加入去离子水200ml溶解,过滤除去不溶物质。向滤液中加入95%乙醇至含醇量达到80%,边加边搅拌,得灰白色絮状沉淀。静置6h后进行离心分离沉淀,回收上层乙醇溶液,取固体部分再重复溶解、沉淀、离心分离操作至乙醇液澄清无色为止。固体部分用少量无水乙醇洗涤2次,再用无水乙醚洗涤2次,自然晾干后放入真空干燥箱中干燥4h(50℃, -0.096MPa),得灰褐色固体0.5g,即为苦丁茶冬青叶粗多糖KPS I。

**1.2.2 Sevag法除蛋白研究<sup>[5]</sup>。**取一定量苦丁茶冬青叶粗多糖KPS I用温水溶解,然后将体积比4:1的三氯甲烷-正丁醇混合液等体积加入多糖溶液中,振荡30min后,静置,除去中间层变性蛋白质,并收集上清液,重复以上操作6次去除蛋白。每一步除蛋白后,取少量上清液样品,采用苯酚-硫酸法<sup>[6]</sup>测定溶液中多糖含量,然后加入4倍95%乙醇醇析,水溶后再醇析2次,固体部分用少量无水乙醇洗涤2次,再用无水乙醚洗涤2次,自然晾干后放入真空干燥箱中干燥4h(50℃, -0.096MPa),分别得苦丁茶冬青叶粗多糖KPS I-1~KPS I-6。采用苯酚-硫酸法测定粗多糖中(KPS I-0~KPS I-6)多糖含量,采用元素分析仪测定含氮量,换算得出蛋白质含量(换算因子为6.25),通过分析脱蛋白次数对多糖溶液中多糖含量(C<sub>1</sub>)、粗多糖中多糖含量(C<sub>2</sub>)和蛋白质含量(C<sub>3</sub>)的影响,确定最佳脱蛋白次数。

## 2 结果与分析

采用乙醇对原料进行脱脂后,用传统的水提醇沉方法从原料中提取得到苦丁茶冬青叶粗多糖,并反复醇析使其纯化。笔者采用乙醇沉淀多糖,同时也能将蛋白质部分沉淀,因此采用Sevag法对其脱蛋白,其目的是除去多糖样品中的游离蛋白质。Sevag法脱蛋白条件温和,可避免多糖的降解。但其缺点是一次只能除去少量蛋白质,需多次重复进行方能达到满意效果,因此,脱蛋白过程对样品中多糖含量有无影响是该工艺必须考虑的问题<sup>[7]</sup>。脱蛋白次数对多糖溶液中糖含量、多糖样品中(KPS I-0~KPS I-6)糖含量和蛋白质含量的影响结果见表1。由表1可见,随着脱蛋白次数的增加,溶液中的多糖含量逐渐降低,说明脱蛋白过程会造成多糖的损失,且损失量随着脱蛋白次数的增加而增加。

表1 脱蛋白次数对多糖溶液中糖含量(C<sub>1</sub>)、多糖样品中糖含量(C<sub>2</sub>)和蛋白质含量(C<sub>3</sub>)的影响

次数	C <sub>1</sub> mg/ml	C <sub>2</sub> %	C <sub>3</sub> %	C <sub>2</sub> /C <sub>3</sub>
0	8.03	40.77	6.43	6.34
1	6.25	39.47	5.79	6.81
2	5.81	39.21	5.33	7.35
3	5.70	39.10	5.16	7.58
4	5.62	38.59	5.05	7.64
5	5.55	37.84	4.92	7.69
6	5.48	37.62	4.85	7.76

作者简介 何玲玲(1976-),女,辽宁海城人,硕士,讲师,从事天然产物应用研究。\* 通讯作者, E-mail: wangxinlu@yahoo.com.cn。

收稿日期 2006-08-31

(下转第6334页)

(上接第6302页)

由表1 还可知,多糖样品中蛋白质的含量随着脱蛋白次数的增加而减少,但减小幅度不大。经过6 次脱蛋白后,多糖中蛋白质含量减少了24.57%,而且脱蛋白的效果主要在前3 次,其前3 次脱蛋白量占总量的80.38%;随着脱蛋白次数的增加,多糖样品中的多糖含量也逐渐降低,但其多糖含量与蛋白质含量的比值呈逐渐增大趋势,其多糖含量与蛋白质含量比值增大的效果也主要体现在前3 次,其前3 次增大比值量占总增大量的87.32%,随后的增大趋势趋于平缓。说明苦丁茶冬青叶多糖采用 Sevag 法脱蛋白3 次以后再继续脱蛋白意义不大。

### 3 讨论

该试验结果也表明,在 Sevag 法脱蛋白过程中,蛋白质和糖的变化趋势相同。在3 次脱蛋白后继续脱蛋白,多糖样品中多糖与蛋白质的比例变化不大,即每经过1 次 Sevag

法脱蛋白,多糖与蛋白质均以相近的比例被除掉。而且随着脱蛋白次数的增加,脱蛋白效果并不理想,这说明苦丁茶冬青叶中的蛋白质并不全部是以游离的形式存在的,而可能是与多糖以某种方式结合形式存在,这有待于进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 中国药材公司. 中国中药资源志要 M. 北京: 科学出版社,1994:689.
- [2] 王新, 陆慧宁, 林少琨. 苦丁茶冬青叶化学成分与药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(3):366-370.
- [3] 何玲玲, 王新. 苦丁茶冬青叶多糖的提取与鉴定[J]. 沈阳化工学院学报,2006,20(1):12-15.
- [4] TAN F, DENG J. Analysis of the constituents and antiserile function of *Achyranthes lidentata* polysaccharides[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(7): 795-798.
- [5] STAUB A M. Removal of proteins from polysaccharides[J]. *Methods in Carbohydr Chem*,1965,5:5-7.
- [6] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志,1996,31(9):550-553.
- [7] 倪德江, 谭少波. 脱蛋白工艺对茶多糖提取率及蛋白质含量的影响[J]. 中国茶叶,2002,24(4):6-7.