

六味地黄生物制剂中多糖脱蛋白方法对比

吴思, 丘婷, 陈朋, 李天河, 汤佩莲, 赵越*

(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:对六味地黄生物制剂粗多糖中蛋白质的去除方法进行比较研究,探讨不同方法对多糖的提取率及纯度的影响。**方法:**利用 Sevage 法、TCA-正丁醇沉淀法、鞣酸沉淀法对六味地黄生物制剂脱蛋白,通过蛋白清除率和多糖保存率比较 3 种方法的优劣。**结果:**TCA-正丁醇法脱蛋白时效果最好,最佳条件为 TCA-正丁醇试剂的体积比 1:2, TCA-正丁醇试剂的配比 1:5, 振摇时间 30 min, 静置时间 1.0 h, 多糖脱蛋白效率最高, 多糖保存率最大。**结论:**TCA-正丁醇法是目前六味地黄生物制剂脱蛋白效果最好的工艺。

[关键词] 多糖; 脱蛋白; Sevage 法; TCA-正丁醇法; 鞣酸法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0056-04

Methods Comparative of Removal of Protein for Polysaccharide from Liuwei Dihuang Biological Preparation

WU Si, QIU Ting, CHEN Peng, LI Tian-he, TANG Pei-lian, ZHAO Yue*

(College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To comparative study on removal method of protein for polysaccharide from Liuwei Dihuang biological preparation, and investigate effect on yield and purity of polysaccharide by different methods. **Method:** Sevage method, TCA-butanol precipitation method and tannin acid precipitation method were taken to deproteinized of Liuwei Dihuang biological preparation, and compared effect of three deproteinization methods by deproteinization rate and polysaccharides retention rate. **Result:** Deproteinizationhe effect of TCA-butanol precipitation method was the best, optimum conditions were: volume ratio of TCA-butanol reagent was 1:2, ratio of TCA-butanol reagents was 1:5, vibration time was 30 min, standing for 1.0 h, which showed highest efficient of deproteinization for polysaccharides and higher polysaccharides retention rate. **Conclusion:** TCA-butanol method was optimum technology of removing protein from Liuwei Dihuang biological preparation.

[Key words] polysaccharide; deproteinization; Sevage method; TCA-butanol method; tannin acid method

六味地黄汤出自宋代医学家钱乙的《小儿药证直诀》,由熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、牡丹皮和泽泻 6 味中药组成,每味药材中都含有多糖^[1],六味地

黄方的抗肿瘤、抗病毒、调节造血功能、降血糖、调血脂、抗氧化及抗衰老等作用^[2]大多是通过多糖类活性成分的免疫调节等作用发挥的^[3]。课题组前期研究结果表明,六味地黄汤经光合细菌代谢后的生物制剂多糖含量增加^[4]。在增强免疫、抗衰老等方面的作用增强。但如何除去杂质蛋白质是多糖分离纯化中的一大难题。本文分别采用常规 Sevage 法以及 TCA-正丁醇沉淀法、鞣酸沉淀法进行六味地黄多糖的脱蛋白试验,通过比较除蛋白效果和多糖含量,筛选六味地黄多糖的最佳脱蛋白方法。

1 材料

六味地黄生物制剂(广东药学院中药药剂实验

[收稿日期] 20111009(011)

[基金项目] 广东省自然科学基金重点项目(No. 825022401000006);广州市科技局项目(No. 2008Z1-E381)

[第一作者] 吴思,在读硕士研究生,从事中药新剂型和新技术研究, Tel:13760676016, E-mail:wusi716@163.com

[通讯作者] *赵越,教授,硕士生导师,从事中药新剂型和新技术研究, Tel:020-39352173, E-mail:zybmbylk688@163.com

室代谢制备,批号 20090912),考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),葡萄糖对照品批号(20090820,天津市福晨化学试剂厂),其他试剂为分析纯。

AY120 型电子天平(日本岛津),UV-1800 型紫外分光光度仪(日本岛津),GZX-9070MBE 型电热恒温鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司)。

2 方法

2.1 多糖含量测定方法 精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 75 mg^[5],溶解并定容至 250 mL 量瓶中,摇匀备用。称取苯酚配置成 80 % 的储备液,待用时稀释成 5 % 的苯酚显色液。

精密吸取葡萄糖储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mL 分别置于 50 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度。分别取上述溶液 2.0 mL 置于 20 mL 具塞试管中,加苯酚 1.0 mL,混匀,迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,振摇 5 min,置沸水浴中加热 15 min,再置冷水中冷却,另取蒸馏水 2.0 mL 同上平行操作为空白对照,于 490 nm 处测定吸收度。以吸光度(A)为纵坐标,以葡萄糖标准溶液质量浓度(C)为横坐标,计算出回归方程 $A = 16.929C - 0.0139$ ($R^2 = 0.9995$)。结果表明葡萄糖在 8.56 ~ 38.52 mg·L⁻¹与吸光度呈良好的线性关系。

多糖保存率 = 处理后多糖含量 / 处理前多糖含量 × 100%。

2.2 粗多糖的提取 取一定体积的六味地黄生物制剂离心(3 000 r·min⁻¹ × 5 min),取上清液浓缩,加入 5 倍体积的 95 % 乙醇沉淀静置 24 h。抽滤,丙酮、石油醚、无水乙醇依次洗涤 1 ~ 2 次,沉淀加适量蒸馏水 90 °C 溶解,趁热过滤,滤液再按上法用 95 % 乙醇沉淀抽滤,于 50 °C 烘干即得(六味地黄粗多糖粉末)。配置成 10 mg·L⁻¹的粗多糖试液备用。

2.3 多糖中蛋白质含量测定 多糖中蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝试剂盒测定。

蛋白去除率 = (处理前蛋白含量 - 处理后蛋白含量) / 处理前蛋白含量 × 100%。

2.4 Sevag 法脱蛋白 采用正交试验,对脱蛋白的主要影响因素,试液与试剂的体积比、Sevag 试剂比例、振摇时间、萃取次数 4 个因素,各选 3 个水平,以蛋白清除率和多糖保存率为指标选出最佳脱蛋白工艺。吸取一定体积六味地黄粗多糖试液于分液漏斗中,加入 Sevag 试剂,充分振摇,室温静置,保留上清液,重复操作,测定上清液的蛋白质含量和多糖含量。因素水平表见表 1,结果见表 2。

表 1 六味地黄粗多糖 Sevag 法正交试验因素水平

水平	A 试液- Sevag 试剂	B 三氯甲烷- 正丁醇	C 振摇 时间/min	D 萃取 次数/次
1	3:1	3:1	10	4
2	4:1	4:1	20	5
3	5:1	5:1	30	6

表 2 六味地黄粗多糖 Sevag 法正交试验安排

No.	A	B	C	D	蛋白清除 率/%	多糖保存 率/%
1	1	1	1	1	50.22	73.27
2	1	2	2	2	61.31	78.16
3	1	3	3	3	51.26	71.55
4	2	1	2	3	21.32	61.16
5	2	2	3	1	45.76	69.88
6	2	3	1	2	46.34	66.33
7	3	1	3	2	52.21	68.42
8	3	2	1	3	46.32	55.15
9	3	3	2	1	48.22	51.11
蛋白清除率	K ₁	54.26	41.25	47.63	48.07	
	K ₂	37.81	51.13	43.62	53.29	
	K ₃	48.92	48.61	49.74	39.63	
	R	16.45	9.88	6.12	13.66	
多糖保存率	K ₁	74.33	67.62	64.92	64.75	
	K ₂	65.79	67.73	63.48	70.97	
	K ₃	58.23	63.00	69.95	62.62	
	R	16.10	4.73	6.47	8.35	

由结果可知,影响因素主次分别是萃取次数、生物制剂多糖试液与 Sevag 试剂的体积比、振摇时间、Sevag 试剂配比,Sevag 法脱蛋白的最优水平组合为 A₁B₂C₃D₂,即六味地黄多糖液与 Sevag 试剂的体积比 3:1,Sevag 试剂配比为三素甲烷-正丁醇 4:1,振摇 30 min,萃取 5 次。

2.5 TCA-正丁醇法脱蛋白 采用正交试验选取六味地黄多糖溶液与 TCA-正丁醇的体积比、振摇时间、静置时间 3 个因素,各选 3 个水平,以蛋白清除率和多糖保存率为指标,吸取一定体积六味地黄粗多糖试液,加入 TCA-正丁醇溶液,振摇静置后,离心,除去底部沉淀,收集上层多糖水溶液,取样测其含糖量和蛋白质含量。因素水平表见表 3,结果见表 4。

由结果可知,影响因素主次分别是生物制剂多糖试液与 TCA-正丁醇试剂的体积比、静置时间、振

摇时间、TCA-正丁醇试剂的配比,最优水平组合为 $A_1B_1C_3D_2$,即六味地黄多糖液与 TCA-正丁醇试剂的体积比 1:2, TCA-正丁醇试剂的配比 1:5,振摇时间 30 min,静置 1.0 h。

表 3 六味地黄粗多糖 TCA-正丁醇法正交试验因素水平

水平	A 试液-TCA-正丁醇	B TCA-正丁醇	C 振摇时间/min	D 静置时间/h
1	1:2	1:5	10	0.5
2	1:1	1:10	20	1.0
3	2:1	1:20	30	1.5

表 4 TCA-正丁醇法脱蛋白正交试验

No.	A	B	C	D	蛋白清除率/%	多糖保存率/%
1	1	1	1	1	41.52	81.22
2	1	2	2	2	47.36	86.34
3	1	3	3	3	53.22	83.57
4	2	1	2	3	73.24	78.99
5	2	2	3	1	71.22	79.31
6	2	3	1	2	75.34	89.57
7	3	1	3	2	88.09	87.32
8	3	2	1	3	89.32	59.73
9	3	3	2	1	83.26	60.12
蛋白清除率 K_1	47.28	67.53	68.64	65.24		
K_2	73.27	69.30	67.95	70.26		
K_3	86.89	70.61	70.84	71.93		
R	39.61	3.08	2.89	6.69		
多糖保存率 K_1	83.71	82.51	76.84	73.55		
K_2	82.62	75.13	75.15	87.74		
K_3	69.06	77.75	83.40	74.10		
R	14.65	7.38	8.25	14.19		

2.6 鞣酸脱蛋白 采用正交试验法选取六味地黄生物制剂多糖溶液与鞣酸的体积比、振摇时间、静置时间 3 个因素,各选 3 个水平,以蛋白清除率和多糖保存率为指标,取一定体积粗多糖试液,加入 5% 的鞣酸调节 pH 至 3.0,4.0,5.0,振摇并静置后,离心 15 min,除去底部沉淀,得到上层多糖水溶液,取样测其糖含量和蛋白质含量。因素水平见表 5,结果见表 6。

表 5 六味地黄粗多糖鞣酸法正交试验因素水平

水平	A pH	B 振摇时间/min	C 静置时间/h
1	3.0	10	0.5
2	4.0	20	1.0
3	5.0	30	1.5

表 6 六味地黄粗多糖鞣酸法正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	蛋白清除率/%	多糖保存率/%
1	1	1	1		53.25	71.21
2	1	2	2		61.32	80.23
3	1	3	3		46.31	81.26
4	2	1	2		41.57	68.33
5	2	2	3		55.51	63.62
6	2	3	1		43.67	72.33
7	3	1	3		37.11	67.76
8	3	2	1		38.35	57.37
9	3	3	2		27.52	65.21
蛋白清除率 K_1	53.63	43.98	45.09	45.43		
K_2	46.92	51.73	43.47	47.37		
K_3	34.33	39.17	46.31	42.08		
R	19.30	12.56	2.84	5.29		
多糖保存率 K_1	77.57	69.10	66.97	66.68		
K_2	68.09	67.07	71.26	73.44		
K_3	63.45	72.93	70.88	68.99		
R	14.12	5.86	4.29	6.76		

由结果可知,影响因素主次分别是溶液 pH、振摇时间、静置时间,最优水平组合为 $A_1B_2C_3$,即溶液 pH 3.0,振摇 20 min,静置 1.5 h。

3 结论

本文分别采用常规 Sevag 法、TCA-正丁醇法、鞣酸沉淀法进行六味地黄生物制剂的脱蛋白实验,并对比此 3 种方法的脱蛋白效果和多糖保存情况。通过数据对比可得知 TCA-正丁醇法脱蛋白效率最高,多糖保存率最大,故 TCA-正丁醇法脱蛋白是最适合六味地黄生物制剂的脱蛋白工艺。

脱蛋白过程中使蛋白质沉淀的机制可能是造成多糖损失的主要原因,Sevag 法是有有机溶剂使蛋白变性,鞣酸是酸性物质,能使蛋白质带正电荷与三氯乙酸或鞣酸的负离子结合成不溶性盐类,并伴随发生蛋白质分子变性,TCA-正丁醇法则兼具了 2 种方法的优点,利用了酸性物质和有机试剂的双重特点脱蛋白。因此所研究的 3 种蛋白方法中,无论是脱蛋白效果,还是多糖保存率,TCA-正丁醇法都是最佳方法。

[参考文献]

[1] 武华,吴强东.六味地黄汤的研究进展[J].新疆中医药,2003,21(5):64.

龙柴方中黄芩、垂盆草总黄酮的提取纯化工艺

裴丹^{1,2}, 赵明^{1,2}, 欧阳臻^{1*}, 曹旭¹, 杨锡辉¹, 刘月琴¹

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学附属医院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的: 优选龙柴方中黄芩、垂盆草总黄酮的提取纯化工艺。方法: 以总黄酮含量为指标, 采用正交试验法优选总黄酮提取纯化工艺条件。大孔树脂纯化总黄酮, 以静态吸附及解析试验筛选树脂型号; 通过动态吸附相关指标考察最佳洗脱条件。结果: 最佳提取工艺为 15 倍量 60% 乙醇, 85 °C 水浴回流提取 2 次, 每次 2 h。最佳纯化工艺条件为采用 AB-8 型大孔树脂, 上样浓度为 0.11 g·mL⁻¹, 吸附速度 3 BV·h⁻¹, 5 BV 水洗除杂, 8 BV 70% 乙醇洗脱。结论: 优选工艺得到的总黄酮含量较高, 工艺简单, 适宜工业化生产。

[关键词] 龙柴方; 总黄酮; 正交设计; 大孔树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0059-05

Extraction and Purification Technology of Total Flavonoids for *Scutellaria baicalensis* and *Sedum sarmentosum* from Longchaifang

PEI Dan¹, ZHAO Ming^{1,2}, OUYANG Zhen^{1*}, CAO Xu¹, YANG Xi-hui¹, LIU Yue-qin¹

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification technology of total flavonoids for *S. baicalensis* and *S. sarmentosum* from Longchaifang. **Method:** The content of total flavonoids were selected as index, extraction and purification technology condition of total flavonoids was optimized by orthogonal test. Total flavonoids was purified by macroporous resin, screened optimum purification macroporous resin by static adsorption and desorption test; Optimum elution condition was examined by related indicators of dynamic adsorption. **Result:** Optimum extraction process was as follows: reflux extracted 2 times with 15 times the amount of 60% ethanol at 85 °C, 2 h each time. Optimum purification technology was as follows: AB-8 macroporous resin was adopted,

[收稿日期] 20111019(011)

[基金项目] 江苏省“科技基础实施建设计划”专项项目(BM2009903, BM2009903-KF22); 2010年江苏省高等学校大学生实践创新训练计划立项项目(529)

[第一作者] 裴丹, 硕士研究生, 从事中药活性成分研究与新药研发, E-mail: vickypeidan@sina.com

[通讯作者] * 欧阳臻, 教授, 博导, 从事中药活性成分研究与新药研发, Tel: 0511-88791564, E-mail: zhenouyang@ujs.edu.cn

[2] 沈烈行, 徐瑞军, 岳峰梅. 六味地黄丸药效学和临床应用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2002, 2(5): 309.

[3] 朱清, 李保双. 六味地黄丸临床应用举验[J]. 中国中医药信息, 2005, 12(6): 83.

[4] 杨苑芬, 曾长青, 冯俊卿, 等. 六味地黄汤经光合细菌作用后多糖含量的变化[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(3): 263.

[5] 汪显阳, 姚春艳. 苯酚-硫酸法测定六味地黄丸中多糖

含量[J]. 中医药研究, 2000, 16(4): 43.

[6] 余华. 海带多糖中蛋白质去除方法的对比研究[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2005, 24(4): 265.

[7] 王许聪, 刘莉, 张璐, 等. 甘蔗渣多糖的纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 31.

[8] 张璐, 翁立冬, 刘莉, 等. 苯酚-硫酸法测定乌梅多糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 107.

[责任编辑 仝燕]