

不同方法黄精多糖脱蛋白工艺及其抗氧化性

袁才林

贵州健康职业学院, 贵州 铜仁 554300

摘要 : 文章旨在探索不同方法(超声波辅助碱法、离子交换树脂法、Sevage法)在黄精多糖脱蛋白工艺中的应用,并评估其抗氧化性能。三种方法均成功降低了黄精多糖中的蛋白质含量,保留了多糖的生物活性,脱蛋白后的黄精多糖显示出显著的抗氧化活性,在清除自由基和抑制氧化应激方面表现出良好的潜力。研究表明,超声波辅助碱法能够有效去除黄精多糖中的蛋白质,但对蛋白质脱除率较低,且脱蛋白后黄精多糖的纯度较低;离子交换树脂法能有效脱除黄精粗多糖中的蛋白质,但脱蛋白后黄精多糖的纯度较低;Sevage法对黄精粗多糖中蛋白质有良好的去除效果,且能有效保留黄精粗多糖中的多糖和蛋白质,其纯度分别可达84.33%和14.47%。黄精多糖经3种方法脱蛋白后均具有一定的抗氧化活性,且Sevage法脱蛋白后抗氧化活性最高。

关键词 : 黄精多糖; 脱蛋白; 离子交换树脂法; 超声辅助碱法; 抗氧化性; Sevage法

Deproteinization Of Polyspermous Polysaccharide By Different Methods And Its Antioxidant Activity

Yuan Cailin

Guizhou Health Vocational College, Tongren, Guizhou 554300

Abstract : The purpose of this paper was to explore the application of different methods (ultrasonic assisted alkali method, ion exchange resin method, Sevage method) in the deproteinization process of Polysaccharide and evaluate its antioxidant properties. The three methods successfully reduced the protein content of the polysaccharide and retained the biological activity of the polysaccharide. The deproteinized polysaccharide showed significant antioxidant activity and showed good potential in scavenging free radicals and inhibiting oxidative stress. The results showed that the ultrasonic-assisted alkali method could effectively remove the protein in the polysaccharide, but the protein removal rate was low, and the purity of the polysaccharide was low after deproteinization. The ion exchange resin method can effectively remove the protein from the crude polysaccharide, but the purity of the polysaccharide is low after deproteinization. Sevage method had a good effect on the removal of protein from the crude polysaccharide, and could effectively retain the polysaccharide and protein in the crude polysaccharide, the purity of which could reach 84.33% and 14.47%, respectively. After deproteinization by three methods, the polysaccharide showed certain antioxidant activity, and the antioxidant activity was the highest after deproteinization by Sevage.

Keywords : polygonomous polysaccharide; deproteinization; ion exchange resin method; ultrasound-assisted alkali method; oxidation resistance; Sevage method

引言

黄精,又名山姜、鸡头黄精等,为百合科多年生草本植物,主要分布于我国西部地区,主要生长于海拔400~4500m的山坡林下或林缘以及河谷灌丛。黄精属为我国传统中药材,具有滋阴润燥、益肺补肾等功效^[1]。黄精多糖是其主要活性成分之一,具有抗氧化、抗肿瘤和增强免疫力等作用,目前关于黄精多糖的提取和分离方法已有较多报道,但对其抗氧化性的研究报道较少。目前,黄精多糖的脱蛋白方法主要有化学法、酶法和物理法等。不同的脱蛋白方法对多糖的结构、活性及抗氧化性能有着不同程度的影响^[2]。化学法操作简便,但易引入化学试剂残留,可能对人体健康造成潜在风险;酶法具有专一性高、条件温和等优点,但成本较高,且酶的选择和反应条件控制较为严格;物理法则多依赖于温度、压力等物理条件的变化,对多糖结构的影响相对较小,但操作过程可能较为复杂。因此,如何选择和优化黄精多糖的脱蛋白工艺,以提高其纯度、稳定性和生物活性,是当前研究的热点之一。黄精多糖具有多种生物活性,如抗

氧化、抗炎、抗肿瘤等，因此在医药、保健品和食品工业等领域具有巨大的应用潜力。然而，黄精多糖中往往含有一定量的蛋白质，这些蛋白质在多糖的提取和纯化过程中可能成为杂质，影响多糖的纯度和生物活性^[3]。因此，研究有效的黄精多糖脱蛋白工艺至关重要。目前，已经有多种脱蛋白方法被应用于黄精多糖的纯化，如离子交换树脂法、超声辅助碱法等，这些方法各有优缺点，需要在深入研究的基础上进一步优化和完善^[4]。另外，随着对黄精多糖生物活性的深入研究，其抗氧化性能逐渐成为研究热点。抗氧化剂能够清除体内产生的自由基，减轻氧化应激对细胞的损伤，从而预防或延缓多种慢性疾病的发生。黄精多糖作为一种天然抗氧化剂，其抗氧化机制和作用效果成为研究的重点^[5]。研究黄精多糖的脱蛋白工艺，可以去除多糖中的杂质，提高其纯度和生物活性，推动黄精多糖在医药、保健品和食品工业等领域的应用。本研究以黄精粗多糖为原料，采用超声波辅助碱法、离子交换树脂法、Sevage法等3种方法对黄精粗多糖进行脱蛋白处理，并对脱蛋白前后多糖的抗氧化性进行比较。

一、材料与方法

（一）材料与仪器设备

黄精粉购自成都市新都区宏华中药材有限公司，经成都中医药大学刘兴江教授鉴定为百合科植物黄精 *Pentapetes roseala* L. 的根茎。NaOH溶液（质量分数为1%）购自重庆科龙试剂厂；Sevage法用 Na_2CO_3 溶液进行脱蛋白，实验用水为蒸馏水。黄精原材料处理采用趁鲜切片炮制工艺，2020版《中国药典》对黄精药材切制饮片炮制加工进行了规定，即黄精药材为“春、秋二季采挖，除去须根，洗净，置沸水中略烫或蒸至透心，干燥”，生黄精饮片的炮制规定为“除去杂质，洗净，略润，切厚片，干燥”；酒黄精饮片的炮制规则为取净黄精，照酒炖法或酒蒸法（通则0213）炖透或蒸透，稍晾，切厚片，干燥。可见，从黄精药材到黄精饮片，需经过2次水处理、2次干燥过程，这将不可避免地导致大黄水溶性成分流失，致使药效下降；本文黄精趁鲜切片炮制，主要是通过生鲜的黄精药材，洗净后及时切片和干燥，该方法简单，可靠，科学合理，炮制的黄精饮片质量好，并且炮制时间缩短为原来三分之二，并可防止有效成分的丢失，保证了药效。

（二）实验方法

1. 超声辅助碱法

在超声辅助碱法脱蛋白过程中，超声波产生的空化作用能够破坏蛋白质的结构，使其易于与多糖分离；同时，碱液的作用下，蛋白质发生变性，进一步促进其与多糖的分离。此外，超声波的机械作用和热作用也有助于提高脱蛋白效率。

黄精多糖超声辅助碱法脱蛋白步骤：将黄精多糖溶解于适量蒸馏水中，搅拌均匀，得到黄精多糖溶液；向黄精多糖溶液中加入适量碱液（如NaOH），调节溶液的pH值至碱性范围（如pH 9-11），以促进蛋白质的变性；将调节好pH值的黄精多糖溶液置于超声波浴中，进行超声波处理，超声波的频率、功率和处理时间可根据实际情况进行调整，以达到最佳脱蛋白效果；超声波处理后，将溶液进行离心分离，去除沉淀的蛋白质；将离心后的上清液进行透析或超滤，进一步去除残余的蛋白质和盐分；收集透析或超滤后的溶液，即得到脱蛋白后的黄精多糖溶液；对收集到的黄精多糖溶液进行浓缩、干燥等后续处理，得到黄精多糖产

品。黄精多糖提取实验中，将黄精粗多糖分别超声处理2min和3min。

2. 离子交换树脂脱蛋白实验

离子交换树脂是一类带有功能基团的高分子化合物，根据功能基团的不同，离子交换树脂可分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂。在黄精多糖脱蛋白过程中，通常选用阴离子交换树脂，当黄精多糖溶液通过阴离子交换树脂时，树脂上的阴离子与溶液中的阳离子（如蛋白质所带的阳离子）发生交换，从而将蛋白质吸附在树脂上，实现蛋白质与多糖的分离。

黄精多糖离子交换树脂法脱蛋白步骤：将黄精多糖溶解于适量蒸馏水中，搅拌均匀，得到黄精多糖溶液；根据黄精多糖的性质和脱蛋白要求，选择合适的阴离子交换树脂；将离子交换树脂进行预处理，包括浸泡、洗涤、转型等步骤，以去除树脂中的杂质和残留物；将预处理后的离子交换树脂装入玻璃柱或塑料柱中，形成树脂柱；将黄精多糖溶液通过树脂柱，控制流速，使黄精多糖与树脂充分接触；用适量的蒸馏水或低盐浓度的洗脱液冲洗树脂柱，以去除未被吸附的多糖和其他杂质；用适当浓度的洗脱液（如NaCl溶液）进行洗脱，收集洗脱液，此时，洗脱液中主要含有多糖成分，蛋白质被树脂吸附；用适当浓度的再生液（如NaOH溶液）对树脂进行再生处理，恢复树脂的交换能力；将收集到的洗脱液进行浓缩、纯化等后续处理，得到脱蛋白后的黄精多糖溶液。采用不同型号的树脂对黄精多糖进行脱蛋白，树脂型号分别为：XAD-6、XAD-10。

3. Sevage法

Sevage法是利用蛋白质在氯仿-正丁醇混合有机溶剂中的变性作用，使蛋白质从水相转移到有机相，从而实现蛋白质与多糖的分离。氯仿-正丁醇混合有机溶剂对蛋白质的变性作用较强，而对多糖的影响较小，因此适用于多糖的脱蛋白处理。

黄精多糖Sevage法脱蛋白步骤：将黄精多糖溶解于适量蒸馏水中，搅拌均匀，得到黄精多糖溶液；按照一定比例（如1:4或1:5）向黄精多糖溶液中加入氯仿-正丁醇混合有机溶剂，搅拌均匀；将混合液静置一段时间（如30分钟），使水相和有机相充分分离。此时，蛋白质主要分布于有机相中；小心地将有机相与水相分离，收集水相；根据需要，可重复上述步骤若干次，以提高脱蛋白效果；将最终得到的水相收集，即为脱蛋白后的黄精多糖

溶液；对脱蛋白后的黄精多糖溶液进行浓缩、纯化等后续处理，得到高纯度的黄精多糖。

二、结果与分析

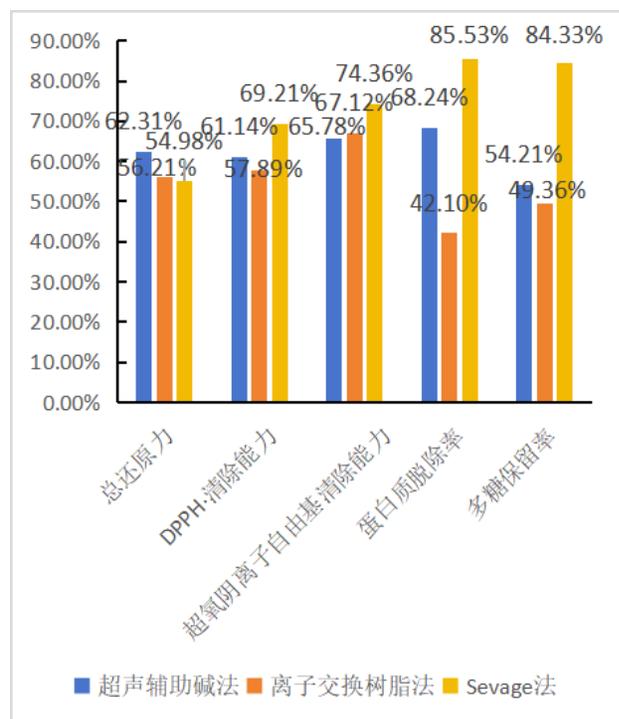


图1 三种不同方法处理黄精结果

黄精多糖溶液经不同方法脱蛋白处理后，总还原力、DPPH·清除能力、超氧阴离子自由基清除能力如图1所示。从图1可以看出，超声波辅助碱法处理的多糖溶液还原力最大，DPPH·清除能力次之，Sevage法处理的多糖溶液还原力最小，但3种方法均可有效去除多糖溶液中的蛋白。超声波辅助碱法对黄精粗多糖蛋白脱除率达68.12%，其原因可能是碱液与多糖结合，导致蛋白多糖脱除效率较低。超声波辅助碱法脱蛋白效果最佳，其原因可能是超声波使蛋白多糖颗粒破碎，蛋白质被迅速去除。Sevage法对黄精粗多糖的脱蛋白效果较好，其原因可能是树脂吸附黄精粗多糖后，蛋白含量降低，且蛋白质与多糖结合后更难被树脂吸附。离子交换树脂法对黄精粗多糖的脱蛋白效果最差，其原因可能是黄精多糖中存在较多的蛋白质分子，不易被树脂吸附。

三、讨论

在本实验中，采用超声波辅助碱法对黄精粗多糖进行脱蛋白处理，结果显示脱蛋白率为68.12%。此外，本实验研究了不同pH值和脱除时间对黄精粗多糖脱蛋白效果的影响，结果表明脱蛋白率随着pH值和脱除时间的增加而增大，但随pH值和脱除时间的增加而减小。结果显示，超声波辅助碱法对黄精粗多糖的脱蛋白效果最好，但超声波对黄精粗多糖的影响并不明显。因此，对于黄精粗多糖的脱蛋白方法的选择可参考超声波辅助碱法。结果表

明，经过离子交换树脂法处理后的黄精粗多糖的抗氧化性明显提高，说明该方法可有效去除黄精多糖中蛋白质，从而提高其抗氧化性。

黄精多糖经3种方法脱蛋白后均具有一定的抗氧化活性，且Sevage法脱蛋白后抗氧化活性最高。其中，超声波辅助碱法脱蛋白率为68.12%，多糖保留率较低；离子交换树脂法脱蛋白率为42.10%，多糖保留率较高；Sevage法脱蛋白率为85.53%，脱蛋白率较高。本研究结果可为黄精多糖的分离纯化及进一步深入研究提供参考，同时也可对黄精多糖抗氧化活性的进一步开发利用提供一定的理论基础，该研究利用超声波辅助碱法对黄精粗多糖进行脱蛋白处理，以去除多糖中蛋白质含量，从而降低黄精多糖的分子量及水溶性。杨朝君试验结果表明^[6]，在超声时间为40min、超声功率为300W、液料比为25mL/g、乙醇浓度为60%时，蛋白去除率可达50.8%；Sevage法对黄精粗多糖的脱蛋白效果优于其他2种方法；Sevage法对黄精粗多糖脱蛋白效果较好的工艺条件为：上样量150mL、吸附时间1.5h、pH值11，在此条件下，黄精多糖的脱蛋白率达到55.8%。

综上所述，超声波辅助碱法能够有效去除黄精多糖中的蛋白质，但对多糖保留率较低，且脱蛋白后黄精多糖的纯度较低；离子交换树脂法能有效脱除黄精粗多糖中的蛋白质，但脱蛋白后黄精多糖的纯度较低；Sevage法对黄精粗多糖中蛋白质有良好的去除效果，且能有效保留黄精粗多糖中的多糖和蛋白质，其纯度分别可达84.33%和14.47%。

未来进一步研究和优化离子交换树脂法、超声波辅助碱法以及其他新兴脱蛋白方法的具体操作参数，如树脂类型、超声波频率、碱液种类和浓度等，以实现更高的脱蛋白效率和更好的多糖活性保留。继续发掘和研究新型的脱蛋白技术，如酶法脱蛋白、膜分离技术等，以期在保持多糖生物活性的同时，进一步提高脱蛋白的效率和纯度。深入研究黄精多糖的抗氧化机制，明确其清除自由基、抑制氧化应激的具体途径和关键活性成分，为开发新型抗氧化药物或保健品提供理论基础。探讨黄精多糖的分子结构与其抗氧化性能之间的关系，揭示结构对功能的影响，为多糖的结构修饰和功能优化提供指导。

参考文献：

- [1] 施伽, 杨浩, 杨思文, 等. 三氯乙酸法脱除黄精多糖中蛋白的工艺优化[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(6): 29-31.
- [2] 李诗萌, 舒孝银, 彭孝敏, 等. 黄精多糖提取纯化工艺的研究[J]. 现代盐化工, 2020, 47(2): 50-52.
- [3] 史鑫波, 王磊, 陈佳昕, 等. 黄精茎秆中多糖类成分的精制研究[J]. 现代中医药, 2023, 43(4): 101-104.
- [4] 汪兴平, 莫开菊, 周大寨, 等. 黄精含硒多糖的分离提取及含硒量分析技术研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 119-122.
- [5] 朱成香. 黄精多糖抗铅-镉复合重金属致肝损伤药效学评价及作用机制研究[D]. 贵州: 贵州师范大学, 2021.
- [6] 杨朝君. 黄精叶多糖的提取、分离纯化及结构分析研究[D]. 四川: 四川大学, 2021.