

水飞蓟粗多糖脱蛋白方法的比较

董 英, 张艳芳, 孙艳辉
(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 以蛋白脱除率、多糖损失率和糖液清除 DPPH 能力为指标比较 Sevag 法、三氯乙酸法和盐酸法的水飞蓟多糖脱蛋白效果。结果表明, 盐酸法效果最好, 三氯乙酸法次之, Sevag 法最差。盐酸法调糖液 pH 值为 2 脱蛋白时, 蛋白脱除率为 88.9%、多糖损失率为 14.8%、糖液清除 DPPH 的能力为 45.6%。

关键词: 水飞蓟粗多糖; 脱蛋白; DPPH; 抗氧化

Comparison of Deproteinization Methods for Milk Thistle Crude Polysaccharide

DONG Ying, ZHANG Yan-fang, SUN Yan-hui
(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The deproteinization effects of three methods were compared by the percentage of the deproteinization, polysaccharide loss and capacity of polysaccharide solution scavenging DPPH free radical. The results showed that the effective order of these methods is HCl method, then trichloroacetic acid method, and finally Sevag method. As the pH value of polysaccharide solution is 2 as adjusted by HCl, the results are: the percentage of the deproteinization 88.9%, the percentage of losing polysaccharide 14.8% and the capacity of polysaccharide solution scavenging DPPH free radical 45.6%.

Key words milk thistle crude polysaccharide; deproteinization; DPPH; antioxidative activity

中图分类号: Q513.2 Q503

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0082-03

长期以来, 人们认为糖类在生物体内的作用主要是作为能量资源或作为结构材料, 但大量实验证明, 多糖及其缀合物与细胞各种生命现象的调节有着密切关系, 能提高人体免疫力和治疗人体多种疾病^[1]。在提取多糖的过程中, 常会有大量蛋白一同提取出来, 导致所提取的多糖纯度不高。去除粗多糖中的蛋白一直是多糖分离纯化中的一大难题。国内外对粗多糖脱蛋白方法研究较多, 有 Savag 法、三氯乙酸法、盐酸法、酶法等^[2-7]。这些研究多以蛋白脱除率和多糖损失率为指标进行^[2-7]。马丽等研究了脱蛋白方法对多糖分子量的影响^[7]。但国内外有关脱蛋白方法对多糖活性影响的报道较少。

DPPH 法是一种筛选自由基清除剂、评价抗氧化活性的简便方法。1, 1-二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 若受试物能清除它, 则表明受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧自由基浓度和打断脂质过氧化链反应的作用^[8]。因此可以将 DPPH 法用于评价多糖清除自由基的能力。以 DPPH 法衡量脱蛋白方法对多糖的影响还未见报道。

水飞蓟, 为菊科水飞蓟属一、二年生草本植物, 以瘦果入药。其有效成分水飞蓟素具有抗肝中毒、保

护肝细胞膜、改善肝功能的药理活性, 临床用于治疗肝炎、胆囊炎等^[9]。本实验室利用提取水飞蓟素后剩余的残渣制备水飞蓟多糖。以蛋白脱除率、多糖损失率和糖液清除 DPPH 能力为指标考察脱蛋白方法对水飞蓟粗多糖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

水飞蓟粗多糖: 本实验室利用江苏中兴药业有限公司提供的水飞蓟粕制备, 配制成 1% 的粗糖液。

1, 1-二苯基苦基苯肼(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 美国 Sigma 公司; 其它试剂为国产分析纯。

1.2 仪器

WFJ-72000 可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; BS110S 电子天平 北京赛多利斯仪器系统公司; LD5-2A 离心机 北京医用离心机厂; PHS-3TC pH 计 上海天达仪器有限公司; XH-C 漩涡混和器 江苏省金坛市医疗仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质含量测定

收稿日期: 2006-11-12

作者简介: 董英(1954-), 女, 教授, 研究方向为食品生物技术。

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法^[10],以牛血清白蛋白作标准曲线。牛血清白蛋白浓度 C 与吸光度 A 之间的回归方程为 $A=0.0057C+0.064$, $R^2=0.9991$, 线性范围: $14.1\sim70.5\mu\text{g/ml}$ 。

1.3.2 总糖含量测定

总糖含量的测定采用苯酚硫酸法^[11],用葡萄糖作标准曲线(计算多糖含量时乘以校正系数0.9)。总糖浓度 C 与吸光度 A 之间的回归方程为 $A=0.0119C+0.0263$, $R^2=0.9986$, 线性范围: $10\sim60\mu\text{g/ml}$ 。

1.3.3 水飞蓟粗多糖对 DPPH 自由基清除能力的测定

配制 $6.5\times10^{-5}\text{mol/L}$ 的 DPPH 甲醇溶液避光保存。取 1ml 多糖液加入 5ml DPPH 溶液反应 25min 后,在 517nm 处测定吸光度 A_i 。以相同体积的蒸馏水代替试样作为空白对照^[12]。每个试样做三个平行实验,取其平均值。清除 DPPH 自由基活性的计算公式:

$$P=(1-\frac{A_i-A_j}{A_0})\times100\% \quad (1)$$

式中, A_i 为试样的吸光度; A_j 为多糖在 517nm 下的吸光度; A_0 空白的吸光度。

1.3.4 Sevag 法脱蛋白

将 Sevag 试剂[氯仿:正丁醇=4:1(V/V)的混合液]10ml 和粗多糖样品液 50ml 混合,混合物剧烈振摇 20~30min, 4000r/min 离心 10min, 弃去下层有机相以及中间蛋白质与 Sevag 试剂生成的凝聚物,收集上层水相溶液,定容 50ml。测定上层清液的糖含量、蛋白质含量和对 DPPH 自由基的清除能力。取 6 份样品, Sevag 法分别处理 1、2、3、4、5、6 次。按下列公式计算蛋白脱除率和多糖损失率:

$$\text{蛋白脱除率}=\frac{R_i-R_j}{R_i}\times100\% \quad (2)$$

式中, R_i 为原糖液中蛋白质量; R_j 脱蛋白液中蛋白质量。

$$\text{多糖损失率}=\frac{T_i-T_j}{T_i}\times100\% \quad (3)$$

式中, T_i 为原糖液中总糖质量; T_j 为脱蛋白液总糖质量。

1.3.5 三氯乙酸法脱蛋白

粗多糖样品液 50ml 各 6 份, 分别用 10% 三氯乙酸调节 pH 值至 2、2.5、3、3.5、4、4.5, 混匀后静置过夜, 4000r/min 离心 10min, 弃去沉淀收集上清液, 定容 50ml, 测定上清液的糖含量、蛋白质含量和对 DPPH 自由基的清除能力。蛋白脱除率和多糖损失率按公式(2)

和(3)计算。

1.3.6 盐酸法脱蛋白

粗多糖样品液 50ml 各 6 份, 分别用 2mol/L 盐酸调节 pH 值至 2、2.5、3、3.5、4、4.5, 放置过夜, 4000r/min 离心 10min, 弃去沉淀收集上清液, 定容 50ml, 测定上清液的糖含量、蛋白质含量和对 DPPH 自由基的清除能力。蛋白脱除率和多糖损失率按公式(2)和(3)计算。

2 结果与分析

2.1 Sevag 法脱蛋白的效果

Sevag 法脱蛋白对蛋白质脱除率、多糖损失率和多糖液清除 DPPH 能力的影响见图 1。

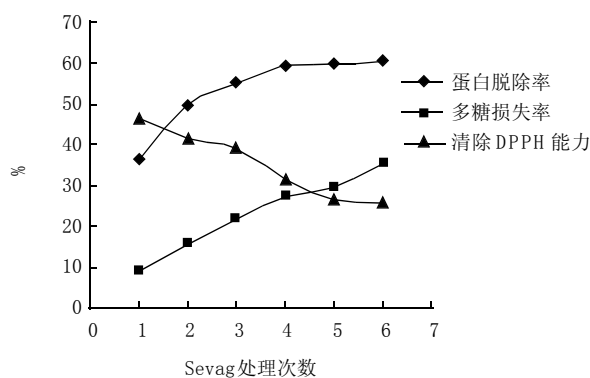


图1 Sevag 法脱蛋白的效果
Fig.1 Protein removal effects of Sevag method

由图 1 可以看出,随着 Sevag 法脱蛋白次数的增加,糖液中蛋白质脱除率逐渐增加。但经过 4 次脱蛋白处理之后增加趋势越来越弱,且此时蛋白质总的脱除率不是很高。本实验进行了 6 次脱蛋白处理,蛋白质脱除率为 60.5%。随着脱蛋白次数的增加,糖液中多糖的损失也增加,6 次脱蛋白处理后糖液中多糖损失率高达 35%。随着 Sevag 法脱蛋白次数的增加,糖液清除 DPPH 的能力逐渐降低,6 次脱蛋白处理后糖液清除 DPPH 的能力降为 25.7%,远低于原粗糖液清除 DPPH 的能力 51.3%。

Sevag 法脱蛋白使用的试剂是氯仿和正丁醇,而氯仿是有毒物质,容易造成多糖活性下降和溶剂残留。另外由于每次脱蛋白处理都会造成一定的糖液损失,所以经过多次脱蛋白处理后多糖的损失较大。由此可知,水飞蓟粗多糖脱蛋白不宜采用 Sevag 法。

2.2 三氯乙酸法脱蛋白的效果

三氯乙酸法脱蛋白对蛋白质脱除率、多糖损失率和多糖液清除 DPPH 能力的影响见图 2。

由图 2 可以看出,随着糖液 pH 值的降低,糖液中蛋白质脱除率逐渐增加然后降低,多糖损失率逐渐增加

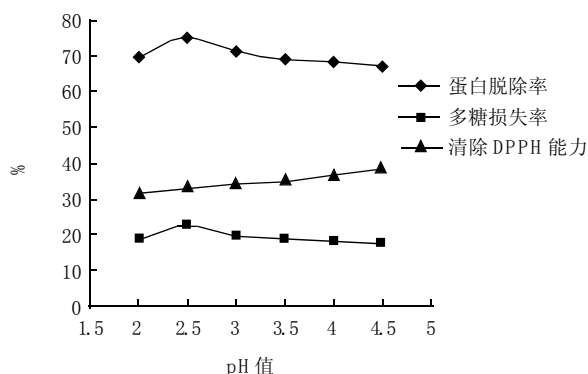


图2 三氯乙酸法脱蛋白的效果

Fig.2 Protein removal effects of trichloroacetic acid method

然后降低,多糖液清除 DPPH 能力逐渐降低。三氯乙酸调节糖液 pH 值为 2.5 时,蛋白质脱除率最高达 75%,此时多糖损失率最高,为 22.6%。这说明 2.5 可能是水飞蓟粗多糖中杂蛋白的等电点,蛋白沉淀的同时也引起了多糖的沉淀。采用三氯乙酸脱蛋白对糖液清除 DPPH 的能力影响很大,三氯乙酸调节糖液 pH 值为 2 时,糖液清除 DPPH 的能力最低为 31.4%;调节糖液 pH 值为 4.5 时清除 DPPH 的能力最高为 38.3%,比原粗糖液清除 DPPH 的能力低了近三分之一。这可能是因为三氯乙酸法脱蛋白时反应较为剧烈,当 TCA 浓度过高时可能会引起多糖结构的破坏,产生不期望的结果。与 Sevag 法相比较,三氯乙酸法的蛋白质脱除率高于 Sevag 法,而多糖损失率较低,糖液清除 DPPH 的能力较高。

2.3 盐酸法脱蛋白的效果

盐酸法脱蛋白对蛋白质脱除率、多糖损失率和多糖液清除 DPPH 能力的影响见图 3。

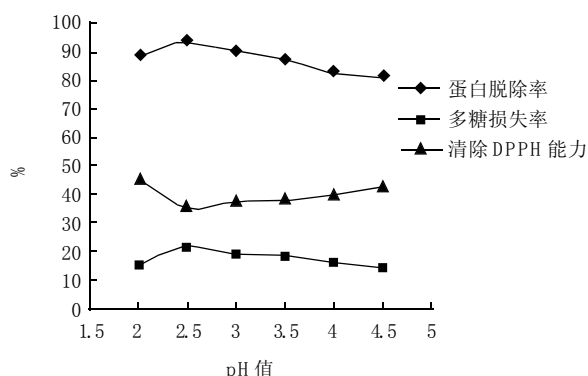


图3 盐酸法脱蛋白的效果

Fig.3 Protein removal effects of hydrochloric acid method

由图 3 可以看出,随着糖液 pH 值的降低,糖液中蛋白质脱除率逐渐增加然后降低,多糖损失率逐渐增加然后降低,多糖液清除 DPPH 能力逐渐降低然后增加。盐酸调节糖液 pH 值为 2.5 时,蛋白质脱除率最高

达 93.6%,此时多糖损失率最高为 21.1%、清除 DPPH 的能力最低为 35.4%。这个结果和三氯乙酸调糖液 pH 值 2.5 脱蛋白结果一致,证明 2.5 是水飞蓟粗多糖中杂蛋白的等电点。

采用盐酸法脱蛋白对糖液清除 DPPH 的能力影响不是很大,盐酸调节糖液 pH 值为 2.5 时,糖液清除 DPPH 的能力最低为 35.4%;调节糖液 pH 值为 2 时清除 DPPH 的能力最高为 45.6%,稍低于原粗糖液清除 DPPH 的能力 51.3%。这可能是因为盐酸法脱蛋白时反应较为温和,对多糖结构的破坏较小。

与 Sevag 法、三氯乙酸法相比较,盐酸法的蛋白质脱除率最高,而多糖损失率最低,糖液清除 DPPH 的能力最高。综合考虑蛋白质脱除率、多糖损失率以及糖液清除 DPPH 的能力,选择盐酸法脱蛋白,糖液 pH 值调节为 2,处理结果为蛋白脱除率为 88.9%、多糖损失率为 14.8%、糖液清除 DPPH 的能力为 45.6%。

3 结 论

Sevag 法脱蛋白,效率低,而且损耗样品;三氯乙酸法效果稍好,但对糖液清除 DPPH 的能力影响较大;盐酸法的蛋白质脱除率最高,而多糖损失率最低,糖液清除 DPPH 的能力最高。选择盐酸法脱蛋白,糖液 pH 值调节为 2。

参考文献:

- [1] 王健,龚新国. 多糖的抗肿瘤及免疫调节研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(1): 52-54.
- [2] 李瑞军,李德耀,张现峰,等. 大孔吸附树脂法去除淫羊藿多糖中蛋白的研究[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(7): 67-70.
- [3] 李峰,刘延吉,宗绪岩,等. 草本刺嫩芽根多糖脱蛋白方法研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(1): 9-10.
- [4] 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, 24(4): 265-268.
- [5] 阎巧娟,等. 酶法脱除黄芩多糖中的蛋白质[J]. 食品科技, 2004, 23(6): 23-26.
- [6] 刘成梅,万茵,涂宗财,等. 百合多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 89-90.
- [7] 马丽,覃小林,刘雄民,等. 不同的脱蛋白方法用于螺旋藻多糖提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 116-119.
- [8] SUN T, HO C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 743-749.
- [9] 闫玉峰,于健东. 水飞蓟的化学成分及药理研究进展[J]. 中国药事, 2000, 14(5): 335-337.
- [10] 王多宁,赵雁武,田芙蓉. 考马斯亮蓝微盘比色法测定蛋白质含量[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(6): 528-529.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [12] JUNG C H, SEO G H M, CHOI I W, et al. antioxidant activities of cultivated and wild Korean ginseng leaves[J]. Food Chemistry, 2005, 92(3): 535-540.