

引用:王结鑫,褚海清,赵雨,潘琼,王渊学,张立明. 枸杞多糖的精制工艺优选[J]. 湖南中医杂志,2021,37(2):150-152,158.

枸杞多糖的精制工艺优选

王结鑫¹,褚海清¹,赵雨¹,潘琼¹,王渊学¹,张立明^{1,2,3}

- (1. 宁夏医科大学药学院,宁夏 银川,750004;
2. 宁夏特色中医药现代化工程技术研究中心,宁夏 银川,750004;
3. 宁夏医科大学回医药现代化教育部重点实验室,宁夏 银川,750004)

[摘要] 目的:优化枸杞多糖(LBP)的精制工艺,为 LBP 的开发提供参考。方法:以多糖提取率为指标,采用正交试验考察提取次数、提取时间、料液比对多糖提取工艺的影响。在单因素试验的基础上,以糖损失率为指标,利用正交试验优化活性炭除色素工艺,以蛋白清除率和糖损失率的综合评分为指标,采用正交试验优化酶-sevag 法脱蛋白工艺。结果:最佳提取工艺为提取次数 2 次、提取时间 30 min、料液比 1:10。最佳除色素工艺为活性炭用量 1.0%、温度 100℃、时间 20 min;糖损失率为 28.6%。最佳除蛋白工艺为酶用量 1.5%、温度 50℃、时间 60 min;蛋白质清除率为 28.2%,糖损失率为 10.9%。结论:优选的 LBP 精制工艺稳定可行,适用于 LBP 产品开发。

[关键词] 枸杞多糖;提取工艺;除色素;脱蛋白

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.02.052

Optimization of the purification process for *Lycium barbarum* polysaccharides

WANG Jiexin¹, CHU Haiqing¹, ZHAO Yu¹, PAN Qiong¹, WANG Yuanxue¹, ZHANG Liming^{1,2,3}

- (1. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China;
2. Ningxia Engineering and Technology Research Center for Modernization of
- Chinese Medicine, Yinchuan 750004, Ningxia, China;
3. Key Laboratory of Hui Ethnic Medicine Modernization, Ministry of Education,
- Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China)

[Abstract] Objective: To optimize the purification process for *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP), and to provide a reference for the development of LBP. Methods: With the extraction rate of polysaccharides as an index, the orthogonal test was used to evaluate the influence of times of extraction, extraction time, and solid-liquid ratio on the extraction process for LBP. On the basis of single-factor experiment, with the loss rate of polysaccharides as an index, the orthogonal test was used to optimize the depigmentation process with activated carbon, and with the comprehensive score of protein clearance rate and polysaccharide loss rate as an index, the orthogonal test was used to optimize the deproteinization process based on the enzyme-Sevag method. Results: The optimal extraction process was extraction twice, an extraction time of 30 minutes, and a solid-liquid ratio of 1:10. The optimal depigmentation process was an amount of activated carbon used of 1.0%, a temperature of 100℃, and a time of 20 minutes; the polysaccharide loss rate was 28.6%. The optimal deproteinization process was an amount of enzyme used of 1.5%, a temperature of 50℃, and a time of 60 minutes; the protein clearance rate was 28.2% and the polysaccharide loss rate was 10.9%. Conclusion: The optimized purification process for LBP is stable, feasible, and suitable for the development of LBP products.

[Keywords] *Lycium barbarum* polysaccharides; extraction process; depigmentation; deproteinization

基金项目:国家自然科学基金项目(81760839);宁夏自治区重点研发项目(2018BEG03014)

第一作者:王结鑫,女,2019 级硕士研究生,研究方向:天然药物与中药活性成分研究

通讯作者:张立明,男,教授,博士研究生导师,研究方向:天然药物研究,E-mail:nyzlm@163.com

枸杞子 (*Lycium chinense* Miller) 属于茄科枸杞属灌木植物,是宁夏的道地药材。《本草纲目》记载枸杞子“久服坚筋骨,轻身不老,耐寒暑。补精气不足,养颜,肌肤变白,明目安神,令人长寿”,功效为补肾、明目、润肺,主要用于肺热咳嗽、烦热消渴、阴虚发热、有汗骨蒸等症^[1],疗效确切,故素有“红宝”之称。现代药理研究表明,枸杞子具有抗氧化、抗肿瘤、保肝、神经保护、保护视力、调节血糖血脂等作用^[2]。枸杞子中化学成分丰富,主要包括多糖、类胡萝卜素、黄酮多酚、生物碱等^[3]。其中枸杞多糖 (LBP) 为枸杞子主要生物活性物质,药理实验表明,LBP 具有抗氧化、降血糖、降血脂、调节机体免疫、抗衰老等作用^[4]。然而多糖在提取过程中一般含有较多水溶性杂质,包括单糖、寡糖、色素、无机盐、高分子蛋白等。为得到纯度较高的多糖,除色素和脱蛋白是多糖纯化必不可少的操作。

本实验拟通过正交试验优选 LBP 的精制工艺,以糖损失率、蛋白清除率为指标,通过优化 LBP 的提取、除色素、脱蛋白工艺,进一步为 LBP 的产品开发及研究奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 XL-08B 粉碎机 (广州市旭朗机械设备有限公司);RE-2000A 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂);SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司);DHG-9075A 型电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司);BWSn 电子计重称 (厦门佰伦斯电子科技有限公司);XB 220A 电子分析天平;TDL-40B 离心机 (上海安亭电子仪器厂);UV-2550 紫外分光光度计 (日本岛津);KQ-500B 型超声清洗器 (昆山市超声仪器公司)。

1.2 试剂 枸杞子 (宁夏明德医药有限公司,批号:070101);葡萄糖对照品 (成都曼斯特公司,批号:405A0911);木瓜蛋白酶 (Solarbio 公司,批号:325A026);考马斯亮蓝 G-250 (Roche 公司,批号:416B0312);浓硫酸 (北京化工厂);活性炭粉 (天津大茂试剂厂);重蒸酚 (北京索莱宝公司)。

2 方法与结果

2.1 多糖的含量测定 精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 8mg,加水溶解并定容至 100 ml,摇匀,配制得 80 μg/ml 储备液。6%苯酚溶液现配现用。精密吸取储备液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 ml 置于 5 ml 容量瓶中,加水稀释定容,摇匀,即得对照品溶液^[5]。精密吸取上述系列对照品溶液 2.0 ml,分别加于 10 ml 具塞试管中,加入苯酚 1.0 ml,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0 ml,立即摇匀,放置,冷至室温。另取 2.0 ml 水作空白对照,于 490 nm 波长处测定吸光度 (A),以葡萄糖含量 C (μg/ml) 为横坐标,以 A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0162C + 0.0076$ ($R^2 = 0.9991$),表明葡萄糖含量在 8~48 μg/ml 与 A 呈良好的线性关系。(见图 1)

2.2 LBP 的制备及工艺优化 挑选枸杞子,洗净晾干。将枸杞子置于 65℃ 下真空干燥 24 h,冷却至室温。将烘干后的枸杞子经粉碎机破碎,粉碎后过筛 100 目 (整个过程在常

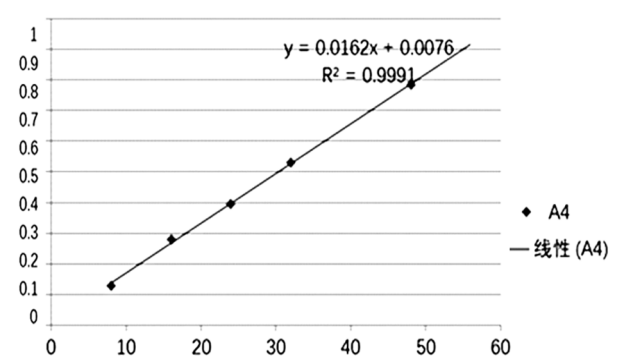


图 1 苯酚硫酸法测定多糖含量

温下进行)。以粗产率为指标,选择提取次数、提取时间、料液比为考察因素,取 13 g 粉末,共 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,试验安排及结果见表 1。超声提取法在 50℃、PH=7 的条件下提取,超声波提取功率为 160W。提取完后抽滤即得粗提取液,然后在旋转蒸发仪中浓缩至 50 ml 左右。用四倍体积的无水乙醇进行醇沉 24 h,将醇沉好的溶液进行抽滤,将滤渣装进蒸发皿 (称量蒸发皿的质量) 中放入烘箱,等其完全烘干后从蒸发皿中取出来称量其净重,并计算其粗产率。由表 1 结果分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $A > B > C$,故最佳提取工艺组合为 A2B2C1,即提取次数 2 次、提取时间 30 min、料液比 1:10。

表 1 LBP 提取纯化工艺正交试验

序号	A (次)	B (h)	C	产率 (%)
1	3	1	1:10	2.16
2	1	0.5	1:20	5.24
3	3	0.25	1:20	3.57
4	1	1	1:15	3.26
5	2	1	1:20	8.01
6	3	0.5	1:15	1.64
7	2	0.5	1:10	17.20
8	2	0.25	1:15	1.87
9	1	0.25	1:10	2.76
K ₁	11.26	8.2	22.12	
K ₂	27.08	24.08	6.77	
K ₃	7.37	13.43	16.82	
R	19.71	15.88	15.35	

注:A—提取次数;B—提取时间;C—料液比。

2.3 除色素工艺

2.3.1 单因素试验 以活性炭用量、脱色温度、脱色时间为单因素考察指标进行单因素试验,取 18 份 LBP 提取液。以 6 份提取液加活性炭,用量依次为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%,恒温水浴温度 60℃ 下脱色 40 min,再分别离心 30 min,转速为 4000 r/min,总共离心 2 次,测定脱色后多糖溶液的吸光度;以 6 份提取液加活性炭,用量为 1.0%,脱色温度依次为 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 和 90℃,再离心 30 min,转速为 4000 r/min,总共离心 2 次,测

定脱色后多糖溶液的吸光度;再以 6 份提取液,加入 1.0%活性炭,恒温水浴温度为 90℃,脱色时间分别设为 20、30、40、50、60、70 min,再离心 30 min,转速为 4000 r/min,总共离心 2 次,测定脱色后多糖溶液的吸光度。其结果表明,以多糖损失率为指标,初步确定活性炭用量为 1.0%、脱色温度为 90℃、脱色时间为 30 min。

2.3.2 正交试验优化工艺 在单因素试验的基础上,选择活性炭用量、脱色温度、脱色时间为考察因素,以糖损失率为指标,取多糖提取液 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验^[6],试验安排及结果见表 2。由直观分析可知,各因素对除色素工艺的影响顺序为 $B>C>A$,确定最佳水平组合为 A2B3C1,即活性炭用量为 1.0%、温度为 100℃、时间为 20 min。取多糖提取液 3 份,按优选工艺条件进行验证试验,结果平均糖损失率为 25.1%,表明优选的除色素工艺稳定可行。

表 2 LBP 脱色工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验

序号	A(%)	B(℃)	C(min)	D	吸光度	糖损失率(%)
1	0.5	80	20	1	0.220	40.9
2	0.5	90	30	2	0.211	46.8
3	0.5	100	40	3	0.216	43.5
4	1.0	80	30	3	0.208	48.7
5	1.0	90	40	1	0.205	50.7
6	1.0	100	20	2	0.239	28.6
7	1.5	80	40	2	0.229	35.1
8	1.5	90	20	3	0.220	41.3
9	1.5	100	30	1	0.225	37.6
K_1	43.73	41.57	36.93	43.07		
K_2	42.67	46.27	44.37	36.83		
K_3	38.00	36.57	43.30	44.50		
R	5.73	9.70	7.43	7.67		

注:A—活性炭用量;B—温度;C—时间;D—误差列。

2.4 脱蛋白工艺

2.4.1 单因素试验 以木瓜蛋白酶、脱蛋白温度、脱蛋白时间为单因素考察指标进行单因素试验,取 18 份 LBP 提取液。取 6 份分别加入木瓜蛋白酶 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%,脱蛋白水浴温度 60℃,酶解 40 min 后冷却至室温,离心 60 min,转速为 3000 r/min。取上清液,并加入 1/5 体积的 sevag 试剂,水浴振荡器上振荡 30 min,静置后取上清液反复操作 3 次后,测定吸光度;取 6 份加入木瓜蛋白酶用量 1.5%,脱蛋白温度分别为 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃,酶解 40 min 后冷却至室温,离心 60 min,转速为 3000 r/min。取上清液,并加入 1/5 体积的 sevag 试剂,水浴振荡器上振荡 30 min,静置后取上清液反复操作 3 次后,测定吸光度;取 6 份加入木瓜蛋白酶 1.5%用量,脱蛋白水浴温度为 40℃,酶解时间分别为 20、30、40、50、60、70 min,冷却至室温,再离心 60 min,转速 3000 r/min。取上清后加入 1/5 体积的 sevag 试剂,在水浴振荡器上振荡 30 min,静置后取

上清液,反复操作 3 次,测定吸光度。其结果表明,以蛋白清除率和糖损失率为考察指标,初步确定木瓜蛋白酶为 1.5%、脱蛋白温度为 40℃、脱蛋白时间为 70 min。

2.4.2 正交试验优化工艺 在单因素试验的基础上,选择木瓜蛋白酶、脱蛋白温度、脱蛋白时间为考察因素,以蛋白清除率与糖损失率为指标,取多糖提取液 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验^[6-7],试验安排及结果见表 3。采用考马斯亮蓝 G-250 试剂盒测定蛋白质含量,静置 10 min,在 595 nm 处使用紫外分光光度计测吸光度。由结果分析可知,各因素对脱蛋白工艺的影响顺序为 $A>C>B$,确定最优水平组合为 A2B3C1,即木瓜蛋白酶用量为 1.5%、脱蛋白温度为 50℃、脱蛋白时间为 60 min。取多糖溶液 3 份,按优选工艺条件进行验证试验,结果平均除蛋白率为 46.3%,平均糖损失率为 29.1%,表明优选的脱蛋白工艺稳定可行。

表 3 脱蛋白工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验

序号	A(%)	B(℃)	C(min)	D	蛋白清除率(%)	糖损失率(%)
1	1.0	30	60	1	14.9	32.1
2	1.0	40	70	2	17.8	46.1
3	1.0	50	80	3	14.6	35.9
4	1.5	30	70	3	12.6	19.1
5	1.5	40	80	1	19.5	20.0
6	1.5	50	60	2	28.2	10.9
7	2.0	30	80	2	33.8	39.4
8	2.0	40	60	3	41.7	16.3
9	2.0	50	70	1	42.6	17.5
K_1	15.8	20.4	28.7	25.7		
K_2	20.1	26.3	24.3	36.6		
K_3	39.4	28.5	22.6	23.0		
R	23.6	8.0	5.6	3.6		
K_4	38.0	30.2	19.8	23.2		
K_5	16.7	27.5	27.6	32.1		
K_6	24.4	21.4	31.8	23.8		
R	21.4	8.8	12.0	8.9		

注:A—木瓜蛋白酶;B—温度;C—时间;D—误差列。

3 讨论

枸杞子中多糖类成分是其主要的活性物质,主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、木糖及鼠李糖等 6 种单糖组成^[8],具有极高的药用价值和保健功能。但由于多糖在醇沉时混入较多水溶性杂质,故优化 LBP 的提取工艺显得极为重要。本研究采用苯酚-硫酸法测定多糖的含量,此方法简单、准确度高、重复性好。

不同的脱色方法都会影响脱色率和糖损失率^[9],而脱色方法主要有:大孔树脂法、双氧水法、活性炭吸附法等。其中大孔树脂法脱色效果较好,但是成本昂贵,耗时较长;双氧水法使多糖损失率较大,且对多糖降解较严重,影响多糖生物活性;而活性炭比表面积大,为多 (下转第 158 页)

表 11 验证性试验结果 (n=3)

批号	山奈酚-3-O-龙胆二糖苷 (mg/g)	岩白菜素 (mg/g)	总含量 (mg/g)	干膏率 (%)	综合评分 (%)	偏差 (%)	RSD (%)
1	0.4298	1.1003	1.5301	19.74	94.08	-2.26	
2	0.4802	1.1567	1.6369	19.85	98.94	2.64	2.53
3	0.3998	1.1827	1.5825	20.58	97.44	1.33	

注:偏差(%)=(实际值-理论值)/理论值×100%。

星点设计-效应面法进行提取工艺的优化,减少了主观干扰,使结果更加精确、预测性更强。同时能够在软件直接显示试验结果,并对最佳工艺条件进行预测,极大地降低了主观因素对结果的影响。其与正交设计试验和均匀设计试验相比较,因素考察范围更加广泛,连续性更强。

本实验在单因素试验考察因素范围的基础之上采用星点设计-效应面法对壮药盘龙止咳颗粒提取工艺进行优选,实验结果显示,理论预测综合评分值为 96.39%,实际测得综合评分值为 93.62%,计算偏差率为-2.87%。结果表明实际值与预测值偏差在合理范围内,表明该数学模型预测的结果真实可靠。根据实际生产要求,综合考虑经济成本,确定了最佳提取工艺:乙醇浓度 50%、溶剂倍量 12 倍、提取时间 50 min。

随着壮医药的迅速发展,壮药在国内以及国际的使用越来越广泛,需求量也日渐增大,壮药对于许多疾病的治疗有其特殊的优势,期待壮药被更多人接受与认可,更好地预防和治疗疾病。

参考文献

[1] 李军. 常见呼吸系统疾病的预防措施研究[J]. 全科口腔医学电子杂志,2019,6(6):123-124.
[2] 钟鸣,黄瑞松,梁启成. 中国壮药学[M]. 南宁:广西民族出版社,2016:54-55.
[3] 林慧,林斌. 龙利叶抗过敏作用的实验研究[J]. 海峡药学,

(上接第 152 页)孔性颗粒,无臭无味,且对水溶性色素脱色较好,因此本实验采用了活性炭脱色法。Sevag 法脱蛋白方法需重复多次操作,且耗时耗力,有机溶剂用量较大,而单独使用木瓜蛋白酶效果不佳,故本研究采用了将二者结合的方法进行脱蛋白。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:104.
[2] 王莎莎,张钊,陈乃宏. 枸杞子主要活性成分及药理作用研究进展[J]. 神经药理学报,2018,8(6):53.
[3] 魏雪松,王海洋,孙智轩,等. 宁夏枸杞化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中成药,2018,40(11):2513-2520.
[4] 孟姣,吕振宇,孙传鑫,等. 枸杞多糖药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2018,29(10):2489-2493.

2011,23(4):23-24.

[4] 张国熙,叶锡洪,林胜英,等. 千龙合剂对小鼠肺炎双球菌的药效学研究[J]. 新中医,2000,32(4):35-36.
[5] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准(第一卷 2008 年版)[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2008:63-69.
[6] 宿树兰,李永辉,欧阳臻. 紫金牛蒡三萜皂苷研究进展[J]. 中药材,2003,26(2):144.
[7] 广西中医药研究所. 广西药用植物名录[M]. 南宁:广西人民出版社,1986:348.
[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:208-209.
[9] 李松林,宋景政,徐宏喜. 中药配方颗粒研究浅析[J]. 中草药,2009,40(增刊):1-7.
[10] 吴琳,彭欣,孙芳,等. 星点设计-效应面优化法与中药学实验研究[J]. 山东中医药大学学报,2014,38(6):582-585.
[11] 韩伟,刘微霞,成悦,等. 星点设计-效应面优化法在中药提取中的应用[J]. 机电信息,2013(26):1-5,12.
[12] 何鹏,王国才,李药兰,等. 高效液相色谱法测定龙胆叶中山奈酚-3-O-龙胆二糖苷的含量[J]. 中南药学,2014,12(8):811-813.
[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:374-377.
[14] 刘灵杰,何炜玲,莫丽萍,等. 星点设计-效应面法优选复方清肝无糖颗粒的提取工艺研究[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(12):2600-2603.
[15] 易春梅. 综合评分法中评标基准价的设定[J]. 中国招标,2018,1381(37):24-25.
[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:361.

(收稿日期:2020-07-03)

[5] 杨勤,谷文超,周浓,等. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究[J]. 食品科技,2020,45(1):343-350.
[6] 唐甜甜,吴迪,魏晴,等. 红禾麻多糖除蛋白除色素方法研究[J]. 广州化工,2020,48(7):86-88,131.
[7] 郭思维,刘胜姿,李威,等. 人工冬虫夏草多糖脱色脱蛋白工艺研究[J]. 食品科技,2013,38(5):207-210.
[8] 李文德,陈尚卫,杨浩,等. 基于柱前衍生化反相色谱分析的枸杞多糖产品的掺杂检测[J]. 中国食品添加剂,2019,30(12):181-188.
[9] SHAO LIJUN,SUN YUE,LIANG JIN,et al. Decolorization affects the structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharides from Thesium Chinense Turcz.;comparison of activated carbon and hydrogen peroxide decolorization[J]. Pubmed,2020(155):1084-1091.

(收稿日期:2020-07-14)