

中药现代化技术

碱提白芨粗多糖脱蛋白方法比较及抗氧化活性

陈浩莹, 王斌*, 李金鹏, 曾劲松, 徐峻, 陈克复

(华南理工大学 轻工科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘要: 以碱提白芨粗多糖 (BSP-A) 为对象, 对比三氯乙酸 (TCA) 法、TCA+正丁醇法、大孔树脂 AB-8 吸附法、木瓜蛋白酶法、Sevage 法和三相分离法脱除 BSP-A 蛋白的效果。以 BSP-A 回收率和蛋白脱除率作为重要指标, 并探讨了蛋白脱除方法对 BSP-A 结构和生物活性的影响, 确定更适用于 BSP-A 纯化的方法。结果表明, Sevage 法、木瓜蛋白酶法和三相分离法对 BSP-A 的回收率达到 84% 以上, 反应相对温和; TCA 法、TCA+正丁醇法、大孔树脂 AB-8 吸附法脱蛋白效果最佳, TCA+正丁醇法最高能达到 90.31%。不同的脱蛋白方法对 BSP-A 的重均相对分子质量影响轻微; 而三相分离法和 TCA+正丁醇法影响了样品中 D-甘露糖和 D-葡萄糖的组成比例。6 种方法均对 BSP-A 的 Zeta 电位和 FTIR 谱图的特征峰产生了一定的影响, 其中, 木瓜蛋白酶法和 Sevage 法能较好地保留白芨多糖的抗氧化活性。总的来说, Sevage 法是一种对 BSP-A 结构和活性保留较好的脱蛋白方法, 但脱蛋白效率不佳, 可作为白芨多糖脱除游离蛋白的有效手段之一。

关键词: 白芨; 粗多糖; 脱蛋白方法; 抗氧化; 中药现代化技术

中图分类号: TQ281

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2023) 02-0290-07

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Comparison of deproteinization methods of alkaline-extracted crude polysaccharide from *Bletilla striata* and its antioxidant activity

CHEN Haoying, WANG Bin*, LI Jinpeng, ZENG Jinsong, XU Jun, CHEN Kefu

(School of Light Industry and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong, China)

Abstract: Trichloroacetic acid (TCA) method, TCA+n-butanol method, macroporous resin AB-8 adsorption method, papain method, Sevage method, and three-phase separation method were compared for their efficacy of protein removal from alkaline-extracted *Bletilla Striata* crude polysaccharide (BSP-A). The effects of deproteinization methods on the structure and biological activity of BSP-A were discussed using BSP-A recovery rate and protein removal efficacy as important indicators. Then, a more suitable method for BSP-A purification was determined. The results showed that Sevage method, papain method, and three-phase separation method all had a recovery rate for BSP-A more than 84%, with relatively mild reaction conditions, while TCA method, TCA+n-butanol method, and macroporous resin AB-8 adsorption method displayed better deproteinization results. TCA+n-butanol method could reached up to 90.31%. Different deproteinization methods showed little effect on the weight-average relative molecular mass of BSP-A, however, the three-phase separation method and TCA+n-butanol method affected the ratio of D-mannose to D-glucose in BSP-A. These six methods demonstrated influence on Zeta potential and characteristics peaks of FTIR spectrum of BSP-A. Especially, the papain and Sevage methods better retained the antioxidant activity of polysaccharide from *Bletilla striata*. In general, Sevage method showed good retention of polysaccharide structure and activity though with low deproteinization efficiency, therefore, it could be one of the competing methods for free protein removal from BSP-A.

收稿日期: 2022-07-18; **定用日期:** 2022-08-29; **DOI:** 10.13550/j.jxhg.20220675

基金项目: 国家自然科学基金 (22078113); 国家博士后创新人才支持计划 (BX20200134); 广州市科技计划项目 (202102080416, 202102020713)

作者简介: 陈浩莹 (1996—), 女, 博士生, E-mail: 554505199@qq.com. **联系人:** 王斌 (1985—), 男, 副研究员, 博士, E-mail: febwang@scut.edu.cn.

Key words: *Bletilla striata*; crude polysaccharide; deproteinization methods; antioxidant activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

白芨 (*Bletilla striata*) 是一种具有重要研究意义的收敛止血中药, 应用于治疗恶性溃疡、创伤性出血、吐血、肺纤维化以及外伤性疾病, 在中国已有数千年的历史^[1]。现代药理证实, 白芨多糖 (BSP) 是其主要成分, 同时也是中国传统医药中的有效成分^[2]。BSP 具有广泛的生物活性, 如抗溃疡^[3-4]、止血^[5]、抗炎^[6]、抗氧化^[7]、抗菌^[8]、抗纤维化^[9]和抗衰老^[10]等。此外, 白芨也是中医理论中许多皮肤护理经典配方的主要药物, 并被广泛用于化妆品行业^[11]。

XU 等^[12] 研究还证实, BSP 对成纤维细胞不仅无毒性作用, 还可以保护其免受 H₂O₂ 引起的损伤。HU 等^[13] 使用 BSP 制备了微针, 并证实由质量浓度为 24 g/L BSP 组成的微针可穿透皮肤, 并将一种药物模型-罗丹明 B (RhB) 送入大鼠皮肤。水提醇沉法是多糖提取的一种常用方法, 利用多糖在水中的溶解性和在乙醇中的不溶性, 以达到对多糖的提取分离。石猛等^[14] 研究表明, 水提醇沉法可以去除水煎液中淀粉、树胶、果胶、黏液质、蛋白质、鞣质、色素、无机盐等水溶性杂质, 在水溶液中醇的体积分数达到 75% 时, 可以除去蛋白质。但目前关于多糖的研究^[15], 植物多糖经初提时仍伴随着蛋白质的溶出, 包括游离蛋白和多糖-蛋白质复合物, 游离蛋白的存在会影响后续多糖的纯化, 不利于对其结构和生物活性的研究。脱蛋白方法作为多糖纯化过程中的重要步骤, 传统和近期研究的方法均见报道^[16], 如 Sevage 法、盐酸法、三氯乙酸法 (TCA)、重复冻融法^[17]、双醛纤维素法 (DAC)^[18] 等。近期研究的 DAC 还没有进行量产, 使用过程繁琐。在评价脱蛋白方法优劣性时, 除了多糖回收率和蛋白脱除率作为重要指标, 脱蛋白处理后的多糖结构和生物活性也应成为方法评价的准则。

基于此, 本研究拟采用前期研究探索的碱辅助方法^[19] 来提取 BSP, 以多糖回收率和蛋白脱除率为基本指标, 辅以多糖初步结构表征和抗氧化活性, 比较不同的脱蛋白方法对 BSP 的影响和效果, 进一步为 BSP 作为化妆品和医药制品原料在工业生产中的开发提供理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

白芨块茎, 广州大参林药店; 无水葡萄糖、无水乙醇、三氯乙酸, AR, 广州芊荃化玻仪器有限公司; 正丁醇 (AR)、叔丁醇 (AR)、考马斯亮蓝 G250、牛血清白蛋白 (生物级)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并

噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) (生物级)、偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH) (生物级)、荧光素钠 (AR)、水溶性维生素 E (Trolox)、木瓜蛋白酶 (生物级), 大孔树脂 AB-8, 上海麦克林生化科技股份有限公司; L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖醛酸 (GalA) 和 D-葡萄糖醛酸 (GlcA) 标准品, 美国 Sigma 公司; 不同重均相对分子质量 (M_w) 的葡聚糖标准品, 国家食品和药品控制研究所 (北京)。

EYELA 旋转蒸发仪, 东京理化公司; HR3050R 台式离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; SZ-100Z 纳米颗粒分析仪, 日本 HORIBA 公司; Agilent 1260 型液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; ICS 3000 型离子色谱仪, 德国 Dionex 公司; Tensor 27 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; UV-2600 型紫外-可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; Synergy Neo2 型酶标仪, 美国 Biotek 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 白芨粗多糖的提取

提取前, 干燥的白芨粉末 (50 目, 100 g) 分别用体积分数为 90% 的乙醇水溶液 2 L 和体积分数为 95% 的石油醚水溶液 1 L 在室温 25 °C 下搅拌 2 h 以清除杂质。抽滤后取滤渣, 室温干燥后, 得到预处理粉末, 置于密封袋中储存备用。碱提取 BSP 按照前期的研究进行^[19]。具体过程如下: 25 g 预处理粉末, 在 55 °C 下用 750 mL 0.01 mol/L NaOH 溶液提取 3 h, 将上清液在 1.0×10^4 r/min 下离心 10 min, 用 0.5 mol/L 盐酸将上清液的 pH 调节到 7.0, 提取过程重复两次。使用旋转蒸发仪将上清液浓缩至初始体积的 1/3, 向浓缩后的提取液中添加 4 倍提取液体积的无水乙醇, 在 4 °C 下静置 24 h。过滤出白色絮状沉淀物, 并用无水乙醇洗涤。溶解后, 以蒸馏水在 25 °C 下用截留相对分子质量 3500 的透析膜透析 48 h, 浓缩后在 -40 °C 下冷冻干燥 48 h, 得到白芨粗多糖 (BSP-A)。

1.2.2 BSP-A 总糖质量分数的测定

样品中 BSP-A 总糖质量分数按照苯酚硫酸法进行测定^[20], 以无水葡萄糖作为标准。得到标准曲线为: $y = 9.3466x + 0.0271$ ($R^2 = 0.9974$), x 为无水葡萄糖质量浓度 (g/L), y 为吸光度, 线性范围 0.01~0.10 g/L。BSP-A 总糖质量分数和回收率分别按式 (1) 和 (2) 计算:

$$w_s / \% = \frac{\rho \times V}{m} \times 100 \quad (1)$$

$$r_s / \% = \frac{w_f}{w_a} \times 100 \quad (2)$$

式中： w_s 为 BSP-A 总糖质量分数，%； ρ 为用吸光度代入到无水葡萄糖标准曲线后，计算得到的 BSP-A 质量浓度，g/L； V 为检测样品的体积，L； m 为样品质量，g； r_s 为回收率，%； w_f 为脱蛋白后样品的 BSP-A 总糖质量分数，%； w_a 为脱蛋白前样品的 BSP-A 总糖质量分数，%。

1.2.3 BSP-A 蛋白质量分数的测定

采用考马斯亮蓝法^[21]测定样品中的蛋白质量分数，以牛血清白蛋白作为标准。得到标准曲线为： $y = 8.6228x + 0.4023$ ($R^2 = 0.9984$)， x 为牛血清白蛋白质量浓度 (g/L)， y 为吸光度，线性范围 0~1 g/L。按照式 (3) 和 (4) 分别计算 BSP-A 蛋白质量分数和蛋白脱除率：

$$w_p / \% = \frac{\rho_1 \times V_1}{m_1} \times 100 \quad (3)$$

$$r_p / \% = \frac{w_{pa} - w_{pf}}{w_{pa}} \times 100 \quad (4)$$

式中： w_p 为 BSP-A 蛋白质量分数，%； ρ_1 为用吸光度代入到牛血清白蛋白标准曲线后，计算得到的蛋白的质量浓度，g/L； V_1 为检测的样品体积，L； m_1 为样品质量，g； w_{pa} 为脱蛋白前样品的 BSP-A 蛋白质量分数，%； w_{pf} 为脱蛋白后样品的 BSP-A 蛋白质量分数，%。

1.2.4 BSP-A 脱蛋白的方法

配制质量浓度为 10 g/L 的 BSP-A 水溶液。分别用 TCA 法、TCA+正丁醇法、木瓜蛋白酶法、Sevage 法、三相分离法和大孔树脂 AB-8 吸附法脱除 BSP-A 中的蛋白，以多糖回收率和蛋白脱除率来评价其纯化效果，并通过结构检测和抗氧化活性检测来评价其影响。

1.2.4.1 TCA 法

取质量浓度 10 g/L 的 BSP-A 水溶液 50 mL，按体积比 1 : 1 加入质量分数为 15% 的 TCA 水溶液，搅拌 30 min，放入冰箱 4 °C 静置 12 h，取出后离心取上清液。将上清液用蒸馏水在 25 °C 下透析 (透析膜截留相对分子质量 3500，下同) 48 h 后在 -40 °C 下冷冻干燥 48 h，再进行后续实验。

1.2.4.2 TCA+正丁醇法

取质量浓度为 10 g/L 的 BSP-A 水溶液 50 mL，按体积比 1 : 1 : 1 加入质量分数为 15% 的 TCA 水溶液和正丁醇，搅拌 30 min，放入冰箱 4 °C 静置 12 h，取出后离心取水相清液。将水相清液用蒸馏水在 25 °C 下透析 48 h 后在 -40 °C 下冷冻干燥 48 h，再进行后续实验。

1.2.4.3 大孔树脂 AB-8 吸附法

使用体积分数为 95% 的乙醇水溶液浸泡大孔树脂 AB-8 8 h，用蒸馏水洗至无醇味。取质量浓度为 10 g/L 的 BSP-A 水溶液 50 mL，并加入 5 g 预处理后的大孔树脂 AB-8，于 25 °C 下振荡 8 h，振荡后过滤取水相清液。将水相清液用蒸馏水在 25 °C 下透析 48 h 后在 -40 °C 下冷冻干燥 48 h，再进行后续实验。

1.2.4.4 三相分离法

取质量浓度为 10 g/L 的 BSP-A 水溶液 50 mL，向其加入 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，搅拌至完全溶解后，再加入 75 mL 叔丁醇，在 25 °C 下搅拌 30 min，取出后离心取水相清液。将样品用蒸馏水在 25 °C 下透析 48 h 后在 -40 °C 下冷冻干燥 48 h，再进行后续实验。

1.2.4.5 木瓜蛋白酶法

取质量浓度为 10 g/L 的 BSP-A 溶液 50 mL (以 0.01 mol/L，pH=6 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液配制)，向其加入含量 (以 BSP-A 的质量为基准，下同) 为 10 mg/g 的木瓜蛋白酶 (>200 U/mg)，在 50 °C 酶解 2 h，并在中心温度 90 °C 下灭酶 5 min。将样品用蒸馏水在 25 °C 下透析 48 h 后在 -40 °C 下冷冻干燥 48 h，再进行后续实验。

1.2.4.6 Sevage 法

取质量浓度为 10 g/L 的 BSP-A 水溶液 50 mL，加入 12.5 mL Sevage 试剂 [V (三氯甲烷) : V (正丁醇) = 4 : 1]，在 25 °C 下搅拌 30 min，取出后离心取水相清液，此过程重复 5 次。将水相清液用蒸馏水在 25 °C 下透析 48 h 后在 -40 °C 下冷冻干燥 48 h，再进行后续实验。

1.2.5 BSP-A 结构分析

1.2.5.1 BSP-A 单糖含量测定

将经过不同脱蛋白方法处理后的 BSP-A 样品 2 mg 与 4 mL 三氟乙酸水溶液 (2 mol/L) 在 110 °C 下水解 4 h，反应后添加 10 mL 甲醇，在 45 °C 下减压除去三氟乙酸和甲醇。将残留物用超纯水溶解，过 0.22 μm 聚醚砜滤膜。采用离子色谱仪配以 CarboPac PA1 分析柱 (250 mm \times 2 mm) 和 CarboPac PA1 保护柱 (50 mm \times 2 mm) 连接进行测定。使用 L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、GalA 和 GlcA 标准品作为标准。

1.2.5.2 BSP-A 重均相对分子质量测定

将经过不同脱蛋白方法处理后的 BSP-A 样品配制成质量分数为 0.5% 的水溶液，过 0.22 μm 聚醚砜滤膜。用配备 TSK-G5000 PWXL (7.8 mm \times 300 mm) 和 TSK-GEL3500K PWXL (7.8 mm \times 300 mm) 串联分析柱的液相色谱仪测定相对分子质量及其分布。在柱温 35 °C 下，用 0.02 mol/L KH_2PO_4 水溶液作流动相，流速为 0.8 mL/min，进样量 10 μL 。使用不同 M_w

(1.305×10^4 、 3.680×10^4 、 6.465×10^4 、 1.335×10^5 、 3.006×10^5 、 6.700×10^5) 的葡聚糖作为标准, 以获得 M_w 的校准曲线。

1.2.5.3 FTIR 测试

称取 5 mg 经过不同脱蛋白方法处理后的 BSP-A 样品置于研钵中, 与干燥的 KBr 粉末研磨和压片。使用傅里叶变换红外光谱仪进行测试, 波数范围为 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 。

1.2.5.4 Zeta 电位测试

配制质量浓度为 2 g/L 的 BSP-A 样品水溶液, 使用纳米颗粒分析仪测定样品的 Zeta 电位。

1.3 体外抗氧化活性检测

1.3.1 ABTS•抑制能力评价

参照 CHEN 等^[19]方法, 测定 BSP-A 清除 ABTS• 的能力。10 mL ABTS 水溶液 (7 mmol/L) 与 10 mL 过硫酸钾水溶液 (2.45 mmol/L) 混合并在黑暗中放置 16 h, 用磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 稀释 30~40 倍, 直到在 734 nm 处的吸光度为 0.70 ± 0.02 , 得到 ABTS• 工作液。然后将 0.4 mL 不同质量浓度 (0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 g/L) 的样品水溶液加入 3 mL ABTS• 工作液。混匀反应试剂后, 在 25 °C 下黑暗培养 30 min, 然后在 734 nm 处测定混合物的吸光度。根据式 (5) 计算 ABTS• 抑制率 (%) :

$$\text{ABTS}\cdot\text{抑制率} / \% = \left(1 - \frac{A_i - A_s}{A_c - A_0} \right) \times 100 \quad (5)$$

式中: A_c 为没有样品的混合物的吸光度; A_i 为实验组的吸光度; A_s 为样品空白 (蒸馏水代替 ABTS 水溶液) 的吸光度; A_0 为没有样品的混合物和 ABTS 水溶液的吸光度。以 BSP-A 质量浓度为自变量, ABTS• 抑制率为因变量作图进行线性拟合, 计算抑制率为 50% 时所需 BSP-A 的浓度 (半抑制浓度) (IC_{50})。

1.3.2 氧自由基吸收能力 (ORAC) 评价

参照陈春^[22]的方法, 所有的试剂和样品溶液都是用磷酸钾缓冲液 (75 mmol/L, pH=7.4) 配制的。在 96 孔板中加入 20 μL 样品溶液或 20 μL 不同浓度的 Trolox 标准液 (TE) (3.125、6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$), 随后加入 200 μL 荧光素钠 (0.0478 $\mu\text{mol/L}$)。设定酶标仪摇动混合物 10 s, 并在 37 °C 下预孵化 10 min。在每个孔中加入 20 μL AAPH (119.4 mmol/L) 后, 使用酶标仪测量荧光强度, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 538 nm, 在 37 °C 下每 1.5 min 测定 1 次。根据不同浓度的 Trolox 标准溶液中的荧光猝灭净面积 (NET AUC) 得到标准曲线。样品的 NET AUC 代入标准曲线计算 ORAC 值 ($\mu\text{mol TE/g}$)^[23]。

1.4 数据统计分析

所有实验重复 3 次, 结果以 “平均值 \pm 标准差”

来表示, 使用 SPSS 24.0 统计软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 碱辅助提取 BSP

经过预处理、稀碱液辅助提取、无水乙醇沉淀、透析以及冷冻干燥获得 BSP-A, 其总糖质量分数为 $94.86\% \pm 0.56\%$, 蛋白质量分数为 $1.91\% \pm 0.24\%$ 。

2.2 脱蛋白方法对 BSP-A 回收率的影响

不同的脱蛋白方法对 BSP-A 回收率的影响如图 1 所示。由图 1 可知, Sevage 法、木瓜蛋白酶法和三相分离法对 BSP-A 回收率达到 84% 以上, 反应相对温和, 没有引起 BSP-A 的损失。大孔树脂 AB-8 是一种吸附型极性树脂, 对溶液中的弱极性有机分子有较好的吸附性, 而 BSP-A 水溶液本身带有一定的极性, 所以部分 BSP-A 被大孔树脂 AB-8 吸附, 损失较高。TCA 法和 TCA+正丁醇是利用酸性条件使蛋白变性, 从而脱去蛋白, TCA 比盐酸温和, 但在本研究中, 其对 BSP-A 的损失影响也较大。脱蛋白处理是为了纯化多糖, 而 BSP-A 的大量损失不符合研究预期, 因此, 认为 Sevage 法、木瓜蛋白酶法和三相分离法更有利于 BSP-A 的保留。

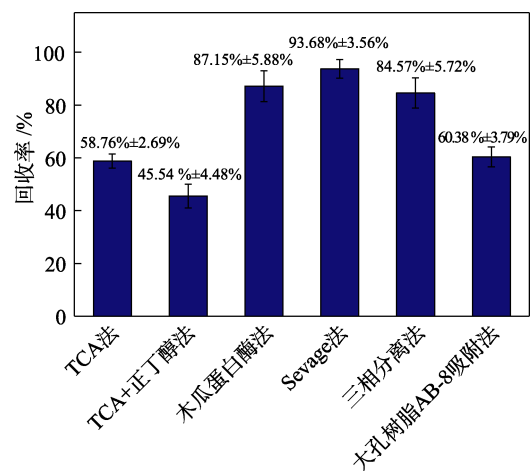


图 1 不同脱蛋白方法对 BSP-A 回收率的影响

Fig. 1 Effect of different deproteinization methods on recovery rate of BSP-A

2.3 脱蛋白方法对蛋白质质量分数的影响

区别于其他多糖^[24-25], 碱提 BSP 的蛋白质质量分数为 $1.91\% \pm 0.24\%$, 在未经过脱蛋白处理的前提下, 其在同类型物质中偏低。图 2 为不同脱蛋白方法对 BSP-A 蛋白质质量分数和蛋白脱除率的影响。

由图 2 可见, TCA+正丁醇法对 BSP-A 的脱蛋白效果最佳, 蛋白脱除率达到了 90.31%, 这可能是由于除了游离蛋白, TCA 和正丁醇的加入还促进了多糖-蛋白复合物的降解^[26]。除此之外, TCA 法和 大孔树脂 AB-8 吸附法也达到了一定的脱蛋白效

果。相对而言,更有利于 BSP-A 回收的 *Sevage* 法、木瓜蛋白酶法和三相分离法,蛋白脱除率均<32%。与于晓红等^[15]的研究结果一致,蛋白酶法和 *Sevage* 法条件温和,除蛋白效率不高。在多糖的功效开发中,多糖水提物中的蛋白、有机杂质以及色素都会在不同程度中影响多糖的纯化鉴定和结构表征。本研究中,以 BSP-A 回收率和蛋白脱除率作为重要指标,对评价脱蛋白方法具有重要意义。除此之外,脱蛋白处理后的多糖结构和生物活性也应该成为方法评价的准则。

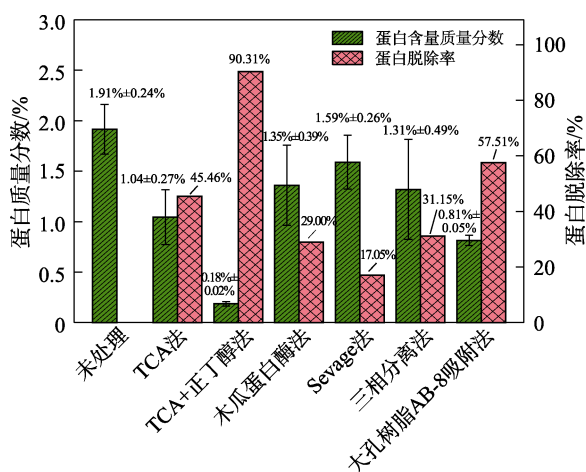


图 2 不同脱蛋白方法对 BSP-A 蛋白质量分数和蛋白脱除率的影响

Fig. 2 Effect of different deproteinization methods on protein mass fraction and protein removal yield of BSP-A

2.4 脱蛋白方法对 BSP-A 结构的影响

2.4.1 单糖组分和 M_w 测定

在前期的研究中指出, BSP 是一种葡甘露聚糖, 主要由 1,4-连接的 D-甘露糖和 1,4-连接的 D-葡萄糖组成(摩尔分数比约为 3 : 1, 仅在一些馏分中发现少量的 D-半乳糖和 L-阿拉伯糖)。表 1 为不同脱蛋白方法处理的 BSP-A 中单糖组分和 M_w 的比较。

表 1 不同脱蛋白方法处理的 BSP-A 中单糖组分含量和 M_w 的比较

Table 1 Comparison of different deproteinization methods on BSP-A monosaccharides components and M_w

脱蛋白方法	摩尔分数/%			$M_w/\times 10^3$
	D-葡萄糖	D-甘露糖	L-阿拉伯糖	
未处理	26.75	71.22	2.03	305.95
TCA 法	28.23	71.40	0.37	337.21
TCA+正丁醇法	8.66	89.03	2.31	347.35
木瓜蛋白酶法	27.04	72.51	0.45	357.42
Sevage 法	27.33	71.63	1.03	247.10
三相分离法	14.36	85.64	—	288.62
大孔树脂 AB-8 吸附法	26.37	72.98	0.65	503.46

注：“—”为未检出。

如表 1 所示,未进行脱蛋白处理的 BSP-A 主要由 D-甘露糖和 D-葡萄糖组成,并伴有少量的 L-阿拉伯糖。摩尔分数比为 71.22 : 26.75 : 2.03, 其中 L-阿拉伯糖是较少检测到的成分^[27-28]。TCA 法、木瓜蛋白酶法、*Sevage* 法和大孔树脂 AB-8 吸附法都较好地保留了与未处理时相似的单糖组成,没有对单糖成分造成影响。而三相分离法和 TCA+正丁醇法都对 BSP-A 的单糖组分造成了影响,使 D-甘露糖和 D-葡萄糖的比例发生了改变,减少了 D-葡萄糖的占比。与水提取相比,碱辅助提取的 BSP 的 M_w 更高,可能是由于碱性条件更有利于高 M_w 多糖的提取。结果表明,不同的脱蛋白方法对 BSP-A 的 M_w 影响轻微。

2.4.2 Zeta 电位的测定

在水相溶液中,Zeta 电位反映了粒子表面离子的解离,可以表征分散体系的稳定性。通过透析处理,可以排除溶液中盐离子对 Zeta 电位的影响。在前期的研究中发现, BSP 溶液带负电,Zeta 电位绝对值<10 mV,被认为是相对不稳定的分散体系。图 3 为不同脱蛋白方法对 BSP-A 的 Zeta 电位的影响。

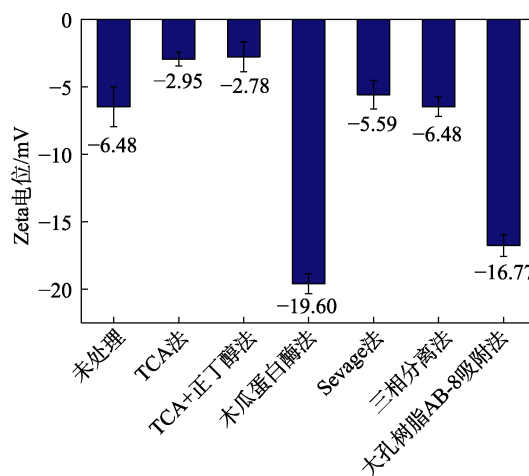


图 3 不同脱蛋白方法对 BSP-A Zeta 电位的影响

Fig. 3 Effect of different deproteinization methods on Zeta potential of BSP-A

从图 3 可知, *Sevage* 法和三相分离法对 BSP-A 溶液的 Zeta 电位结果影响较小,而 TCA 法和 TCA+正丁醇法由于加入了 H^+ ,可能使 BSP-A 分子暴露的羟基减少,影响了 Zeta 电位,使其绝对值变小。木瓜蛋白酶和大孔树脂 AB-8 与 BSP-A 溶液的反应对 BSP-A 溶液的 Zeta 电位产生了影响,可能在 BSP-A 链上引入了负电荷基团,使 BSP-A 的聚集效应减弱。

2.4.3 FTIR 分析

BSP-A 的 FTIR 谱图如图 4 所示。由图 4 可知,不同脱蛋白方法对 BSP-A 的 FTIR 谱图没有明显影响,FTIR 谱图中呈现的吸收峰都表明, BSP-A 表现

出 BSP 的典型结构特征。3346 和 2927 cm^{-1} 处的吸收峰分别为 O—H 和 C—H 键的拉伸振动^[29]。1480~1350 cm^{-1} 处的吸收峰为—CH(O—CH₂)单键弯曲振动^[30], 而 1151 和 1060 cm^{-1} 处的吸收峰为吡喃糖中的 C—O—C 键不对称拉伸振动。在 900~800 cm^{-1} 的范围内观察到的小峰意味着 α -构型和 β -构型的存在^[31], 812 和 876 cm^{-1} 处的吸收峰分别为 D-甘露糖和 D-葡萄糖残基^[4,32]。经 TCA 法和 TCA+正丁醇法处理的样品在 616 cm^{-1} 处都出现了明显的吸收峰, 归属于 C—Cl 键的伸缩振动, 表明 TCA 可能残留在 BSP-A 样品中。结果表明, 用不同脱蛋白方法对 BSP-A 进行处理对所得样品的特征峰型有一定的影响, 但 BSP 典型特征峰没有消失。

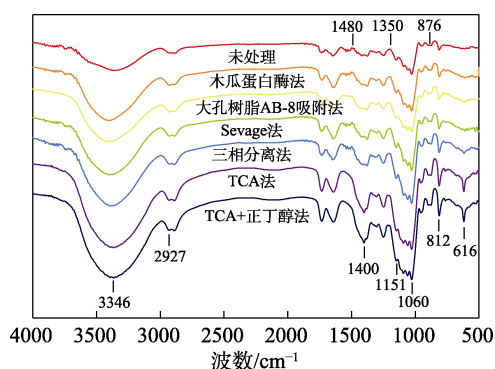


图 4 BSP-A 的 FTIR 谱图
Fig. 4 FTIR spectra of BSP-A

2.5 脱蛋白方法对 BSP-A 体外抗氧化活性的影响

根据现有清除自由基的机理, 体外抗氧化能力是通过单电子转移 (SET) 或氢原子转移 (HAT) 来测定的^[33]。典型的涉及电子捐赠的抗氧化检测是 ABTS•抑制活性, 而涉及 HAT 清除自由基的是 ORAC。不同脱蛋白方法对 BSP-A 体外抗氧化活性的影响如图 5 所示。

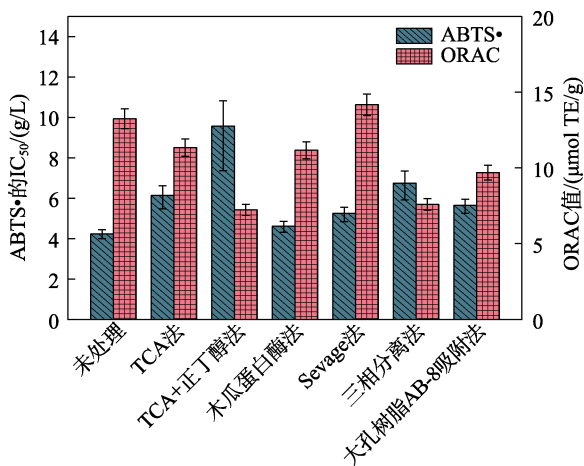


图 5 不同脱蛋白方法对 BSP-A 体外抗氧化活性的影响
Fig. 5 Effect of deproteinization methods on *in vitro* antioxidant activity of BSP-A

由图 5 可知, 未进行脱蛋白处理的 BSP-A 对 ABTS•的 IC₅₀ 为 4.236 g/L, ORAC 值为 13.24 $\mu\text{mol TE/g}$, 体现了 BSP-A 样品优良的抗氧化活性。与未进行脱蛋白处理的 BSP-A 相比, 经过脱蛋白处理的 BSP-A 样品抗氧化活性均有一定的下降, 主要是因为多糖的纯化过程中, 非多糖的抗氧化物质如多肽、多酚和黄酮等可能被除去, 使抗氧化活性降低。但多糖本身纯度的提高, 也有利于基团的暴露, 促进电子和氢原子的转移。从图 5 可知, TCA+正丁醇法对 BSP-A 的 ABTS•抑制活性和氧自由基吸收能力的影响比较大, IC₅₀ 上升为 9.562 g/L, ORAC 值下降为 7.23 $\mu\text{mol TE/g}$, 这主要是因为多糖的损失以及单糖结构的变化, 使 BSP-A 的抗氧化活性降低; 木瓜蛋白酶法和 Sevage 法则能较好地保留 BSP-A 的抗氧化活性。

3 结论

通过水提醇沉法提取的 BSP-A 总糖质量分数达到 94.86%±0.56%, 蛋白质量分数为 1.91%±0.24%。本文采用 6 种方法对 BSP-A 进行脱蛋白处理, 其中, Sevage 法、木瓜蛋白酶法和三相分离法对 BSP-A 的回收率达到 84%以上, 反应相对温和, BSP-A 的损失较低; 但蛋白脱除率都<32%; TCA+正丁醇法对 BSP-A 的脱蛋白效果最佳, 蛋白脱除率达到了 90.31%, 但除了 BSP-A 回收率低, 还改变了单糖组成、Zeta 电位和抗氧化活性等。木瓜蛋白酶法和 Sevage 法则能较好地保留 BSP 的抗氧化活性。相对来说, Sevage 法是一种对 BSP-A 结构和活性保留较好的脱蛋白方法, 但脱蛋白效率不佳, 这主要因为本研究的碱提 BSP-A 中结合态蛋白较多。高效、环保且保护性强的新型脱蛋白方法仍然需要持续研究。

参考文献:

- [1] JIANG S, WANG M Y, JIANG L, *et al.* The medicinal uses of the genus *Bletilla* in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 280: 114263.
- [2] LIU S, LYU D H, LU C, *et al.* *Tulasnella* can contribute to breakthrough in germination of the medicinal orchid *Bletilla striata* via producing plant hormones[J]. *Rhizosphere*, 2022, 22: 100527.
- [3] MORITA H, KOYAMA K, SUGIMOTO Y, *et al.* Antimitotic activity and reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by stilbenoids from *Bletilla striata*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(4): 1051-1054.
- [4] ZHANG C, GAO F, GAN S, *et al.* Chemical characterization and gastroprotective effect of an isolated polysaccharide fraction from *Bletilla striata* against ethanol-induced acute gastric ulcer[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 131: 110539.
- [5] WANG W, MENG H. Cytotoxic, anti-inflammatory and hemostatic spirostane-steroidal saponins from the ethanol extract of the roots of

- Bletilla striata*[J]. *Fitoterapia*, 2015, 101: 12-18.
- [6] YUE L, WANG W, WANG Y, *et al.* *Bletilla striata* polysaccharide inhibits angiotensin II-induced ROS and inflammation via NOX4 and TLR2 pathways[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89: 376-388.
- [7] WANG B L, XU Y, CHEN L J, *et al.* Optimizing the extraction of polysaccharides from *Bletilla ochracea* Schltr. using response surface methodology (RSM) and evaluating their antioxidant activity[J]. *Processes*, 2020, 8(3): 341.
- [8] GUO J J, DAI B L, CHEN N P, *et al.* The anti-*Staphylococcus aureus* activity of the phenanthrene fraction from fibrous roots of *Bletilla striata*[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16(1): 1-7.
- [9] WANG Y, LIU D, CHEN S J, *et al.* A new glucomannan from *Bletilla striata*: Structural and anti-fibrosis effects[J]. *Fitoterapia*, 2014, 92: 72-78.
- [10] ZHANG Y S, LYU T, LI M, *et al.* Anti-aging effect of polysaccharide from *Bletilla striata* on nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11(43): 449-454.
- [11] ZHANG N, XUE L P, YOUNAS A, *et al.* Co-delivery of triamcinolone acetonide and verapamil for synergistic treatment of hypertrophic scars via carboxymethyl chitosan and *Bletilla striata* polysaccharide-based microneedles[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 284: 119219.
- [12] XU J, CHEN Z Y, LIU P H, *et al.* Structural characterization of a pure polysaccharide from *Bletilla striata* tubers and its protective effect against H₂O₂-induced injury fibroblast cells[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193: 2281-2289.
- [13] HU L L, LIAO Z C, HU Q Q, *et al.* Novel *Bletilla striata* polysaccharide microneedles: Fabrication, characterization, and *in vitro* transcutaneous drug delivery[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 928-936.
- [14] SHI M (石猛), MO S Z (莫尚志), ZHOU W Z (周文政). Problems and solutions of alcohol precipitation method[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials (中草药)*, 1999, (6): 313-314.
- [15] YU X H (于晓红), WU X L (吴宪玲), FU W (付薇), *et al.* Decoloration and deproteinization of polysaccharides from American *Ginseng*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报)*, 2017, 17(11): 145-149.
- [16] HE M J (何美佳), LIU X (刘晓), TANG C C (唐翠翠), *et al.* Research progress on the methods for deproteinization of polysaccharide[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs (中国海洋药物)*, 2019, 38(3): 82-86.
- [17] XIONG Q P, HUANG S, CHEN J H, *et al.* A novel green method for deproteinization of polysaccharide from *Cipangopaludina chinensis* by freeze-thaw treatment[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 142: 3409-3418.
- [18] ZHANG L M, ZHANG, Q, ZHENG Y Q, *et al.* Study of Schiff base formation between dialdehyde cellulose and proteins, and its application for the deproteinization of crude polysaccharide extracts[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 112: 532-540.
- [19] CHEN H Y, ZENG J S, WANG B, *et al.* Structural characterization and antioxidant activities of *Bletilla striata* polysaccharide extracted by different methods[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 266: 118149.
- [20] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [21] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(12): 248-254.
- [22] CHEN C (陈春). Structural identification, biological activities evaluation, digestion and fermentation *in vitro* of polysaccharides from *Fructus Mori*[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2018.
- [23] TRISTÁN A I, ABREU A C, AGUILERA-SÁEZ L M, *et al.* Evaluation of ORAC, IR and NMR metabolomics for predicting ripening stage and variety in melon (*Cucumis melo* L.)[J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131263.
- [24] TENG C, QIN P Y, SHI Z X, *et al.* Structural characterization and antioxidant activity of alkali-extracted polysaccharides from quinoa[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106392.
- [25] YU J, DONG X D, JIAO J S, *et al.* Extraction, purification, and biological activities *in vivo* of a novel fructose-rich polysaccharide from *Codonopsis pilosula*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 176: 114309.
- [26] HU H G (胡会刚), ZHAO Q L (赵巧丽), PANG Z C (庞振才). Study on deproteinization and decoloration of polysaccharides from *Pineapple Pomace* and its antioxidant activity[J]. *Food Research and Development (食品研究与开发)*, 2018, 39(24): 12-20.
- [27] CHEN Z Y, CHENG L Z, HE Y C, *et al.* Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of *Bletilla striata* polysaccharide: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 2076-2085.
- [28] JI X L, YIN M S, NIE H, *et al.* A review of isolation, chemical properties, and bioactivities of polysaccharides from *Bletilla striata*[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 5391379.
- [29] TAN J Q, CUI P S, GE S Q, *et al.* Ultrasound assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Cornus officinalis* fruit: Modeling, optimization, purification, and characterization[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 84: 105966.
- [30] ZHANG Z F, LYU G Y, HE W Q, *et al.* Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(2): 1524-1531.
- [31] CHEN R Z, LUO S J, WANG C X, *et al.* Effects of ultra-high pressure enzyme extraction on characteristics and functional properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel pectic polysaccharides[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 121: 107016.
- [32] LAI Y L, LIN Y Y, SADHASIVAM S, *et al.* Efficacy of *Bletilla striata* polysaccharide on hydrogen peroxide-induced apoptosis of osteoarthritic chondrocytes[J]. *Journal of Polymer Research*, 2018, 25(2): 1-10.
- [33] YARLEY O P N, KOJO A B, ZHOU C S, *et al.* Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 183: 2262-2271.