

文章编号: 1000-5013(2007)03-0296-04

# 穿山龙多糖的提取与纯化工艺条件优化

王昭晶, 罗巖辉

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 通过单因素法, 研究从穿山龙中提取水溶性多糖的工艺条件, 以及分析原料质量与提取液体积的比(料液比)、浸提温度和提取时间 3 个主要因素对提取量的影响, 并对热水浸提穿山龙多糖的工艺条件进行优化. 实验表明, 水提多糖最佳提取工艺条件: 料液比(g/mL)为 1:4, 浸提温度为 90℃, 浸提时间为 2.5 h. 按最佳工艺条件水煮提, 醇沉干燥得到粗多糖(CP), 经柱层析分离纯化后, 可得组分 CP<sup>+</sup>, CP<sup>-</sup>. 采用柱层析、纸电泳检测组分的纯度, 并利用高效液相色谱法和纸层析法分析组成, 结果表明, CP<sup>+</sup> 为单一多糖, 由鼠李糖(Rha)、果糖(Fru)和葡萄糖(Glu) 3 种单糖组成, 其量比  $n(\text{Rha}) : n(\text{Fru}) : n(\text{Glu})$  为 1 : 1.08 : 48.6.

**关键词:** 多糖; 穿山龙; 浸提; 纯化

**中图分类号:** Q 539; R 284.2; Q 949.71+8.27

**文献标识码:** A

穿山龙为薯蓣科植物穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica* Makino)的根茎<sup>[1-2]</sup>, 有报道称, 穿山龙水提醇沉粗提物具有抗肿瘤的活性<sup>[3]</sup>. 目前, 对于穿山龙多糖的深入研究未见任何报道. 为了合理利用穿山龙资源并寻找新的穿山龙有效成分, 本文对其多糖的提取、分离纯化进行研究, 并进行性质分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

MC99-2 型自动核酸蛋白分离层析仪(上海沪西分析仪器厂), HP 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 穿山龙(市售), DEAE-Sephadex CL-6B、葡聚糖凝胶 G-100(瑞典 Pharmacia 公司), 鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、岩藻糖、果糖、半乳糖醛酸(单糖对照品, 美国 Sigma 公司).

### 1.2 实验方法

**1.2.1 提取和分离纯化** (1) 提取. 称取 200 g 穿山龙, 加入一定量体积分数为 95% 的乙醇, 在 50℃ 水浴中回流提取 6 h, 间隙搅拌. 提取后过滤, 离心得提取液, 残渣再用相同体积的乙醇提取一次, 合并提取液, 离心分离. 上清液回收乙醇, 残渣于烘箱中烘干. 将上述残渣按照单因素和正交实验条件设计实验, 计算多糖提取率. 将水煮提过的滤液于 60℃ 下减压旋转蒸发, 浓缩至小体积后离心, 弃去沉淀物. 上清液用 4 倍体积的无水乙醇进行醇沉, 放置 4℃ 冰箱中醇析过夜. 次日离心 10 min (3 000 r · min<sup>-1</sup>), 取沉淀. 醇沉后的样品常规干燥得粗多糖(CP). (2) 粗多糖的 DEAE-Sephadex CL-6B 柱层析制备. 先后用蒸馏水和 0~2.0 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaCl 进行洗脱, 自动部分收集器收集. 用苯酚-硫酸法<sup>[4]</sup>测定糖的分布情况, 制定洗脱分布图, 按各个波峰范围部分收集洗脱液. 由分离层析仪中的 UV-160A 型紫外光谱仪于 280 nm 下同步检测蛋白质.

**1.2.2 纯度的鉴定** (1) Sephadex G-100 柱层析检测. 取经 DEAE-Sephadex CL-6B 收集并干燥得到的样品约 1~3 mg, 溶于 1 mL 的水中, 用滴管沿柱壁加入, 待其全部吸入柱体后, 以质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液洗脱, 流速为 0.092 mL · min<sup>-1</sup>, 自动部分收集器收集, 用苯酚-硫酸法<sup>[4]</sup>测糖的分布, 根据峰形判断样品纯度. (2) 醋酸纤维素薄膜电泳. 参见文[5-6].

**收稿日期:** 2006-10-11

**作者简介:** 王昭晶(1978-), 女, 讲师, 主要从事多糖生化的研究. E-mail: zhaojingwang@yahoo.com.cn.

**基金项目:** 华侨大学科研基金资助项目(04 HZR03)

1.2.3 成分分析 (1) 高效液相色谱(HPLC)分析.取 20 mg 糖样于具旋塞刻度试管中,加入 2 mL 的 1 mol ·L<sup>-1</sup>硫酸,封管,于 100 ℃ 水解 8 h,然后加入 BaCO<sub>3</sub> 中和,漏斗过滤,浓缩.滤液先后采用 0.4 μm 纤维素膜和 0.2 μm 滤膜过滤,装于 Eppendorf 管中,准备进样.色谱柱是 Zorbax Carbohydrate Analysis(4.6 mm ×250 mm),流动相为 V(乙腈) V(水)=3 1,流速为 1.2 mL ·min<sup>-1</sup>,柱温为 30 ℃,检测器为示差(RID)检测(35 ℃),葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖、岩藻糖、木糖和果糖的准标样品为 3~4 g ·L<sup>-1</sup>. (2) 纸层析分析.参见文[5]. (3) 红外光谱分析.采用 Sepcordir 型红外光谱仪, KBr 压片.

1.2.4 酶降解实验 将糖液置于透析袋内,分别按唾液淀粉酶(可水解 -1,4 糖苷键)和纤维素酶的最适条件加入酶,于 37~40 ℃ 下保温 48 h.以苯酚-硫酸法检测透析袋外溶液有无糖反应,以此鉴定有无连续的 -1,4 糖苷键和 -1,4 糖苷键.

1.2.5 分子量测定 采用 Sephadex G-100 柱(80 cm ×1.3 cm)层析,用质量分数为 0.9 %的 NaCl 水溶液洗脱,分部收集,以苯酚-硫酸法测多糖分布,用美国 Sigma 公司生产标准相对分子质量葡聚糖(Dextran T10, T40, T70, T500)绘制标准曲线,并根据洗脱体积测算样品的相对分子质量  $M_r$ .

2 实验结果

2.1 单因素实验

(1) 料液比.在浸提温度 80 ℃,浸提时间 2 h 的条件下,考察不同料液比( $m/V$ ,原料的质量(g)与提取液的体积(mL)的比)对多糖提取率(%)的影响,如表 1 所示.由表 1 可以看出,在料液比为 1/4 时,粗多糖提取量( $W$ )达到最大值,而提取液的体积的增加,提取量逐渐下降.这是因为水量增加的同时,降低了提取液中固形物的浓度. (2) 提取时间.在料液比为 1/4 和浸提温度 80 ℃ 的条件下,考察提取时间( $t$ )对粗多糖提取量的影响,如表 1 所示.由表 1 可以看出,粗多糖提取量随反应时间的延长而逐渐增加.当提取时间为 2.5 h 时,多糖提取量达到最大. (3) 浸提温度.在料液比为 1/4,提取时间 2.5 h 的条件下,考察浸提温度(℃)对粗多糖提取量的影响,如表 1 所示.由表 1 可以看出,粗多糖提取量随浸提温度的升高而逐渐增加.当反应温度为 80,90,100 ℃ 时,多糖提取量( $W$ )基本达到最大,并且趋于稳定.本实验选取浸提温度为 90 ℃.

表 1 单因素对粗多糖提取量的影响  
Tab.1 Effect of single factor on polysauharide yields

$m/V/g \cdot mL$	$W/mg$	$/(\%)$	$t/h$	$W/mg$	$/(\%)$	$/(\%)$	$W/mg$	$/(\%)$
1/2	63.00	1.26	1.0	84.04	1.68	60	193.80	3.87
1/4	151.50	3.03	1.5	131.03	2.62	70	194.40	3.88
1/6	113.79	2.28	2.0	150.51	3.01	80	202.20	4.04
1/8	90.01	1.80	2.5	203.02	4.06	90	205.40	4.11
1/10	86.05	1.72	3.0	160.51	3.21	100	202.50	4.05
1/12	82.04	1.64						

2.2 正交实验

参照单因素实验结果,以影响穿山龙多糖提取量的料液比、提取时间和反应温度为 3 个影响因素,取其各自不同的水平进行正交实验,结果如表 2 所示.由表 2 的级差结果可以得知,影响穿山龙水溶性多糖提取量的因素主次:提取时间>浸提温度>料液比;最佳工艺:料液比为 1/4,提取时间为 2.5 h,浸提温度为 90 ℃.在基本条件不变的情况下,将影响生产周期的浸提次数由 2 次变为 1 次,进行重复实验,获得多糖的提取量基本一致,说明该多糖水溶性较好.另外,通过  $R$  值的比较可以看出,提取时间对穿山龙水溶性多糖提取量的影响非常显著,故在工业化实际生产中,推荐在料液比为 1/4 的溶液中,于 90 ℃ 下浸提一次 2.5 h,这样既可使多糖充分被充分提取出来,又可缩短生产周期,降低成本.

实验称取穿山龙 200 g,经预处理后,采用最佳提取工艺提取水溶性粗多糖,将上清液各取出 40 mL,分别以浓缩倍数为 2,3,4,5,6 的体积分数为 80 %的无水乙醇进行醇析实验.实验结果显示,浸提液浓缩倍数在 4 倍以上时,沉淀量基本一致且达到最大量.

2.3 多糖的分离纯化

1 g 的粗多糖溶于 10 mL 的蒸馏水中,在 DEAE-Sepharose CL-6B 柱上先用蒸馏水洗脱,流速为 40 mL · h<sup>-1</sup>,自动部分收集器收集,每 6 min 收集 4 mL 为 1 管,如图 1(a)所示.从水洗脱的糖分布曲线可以看出,波峰对称性较好,说明所洗脱的成分比较单一,可以进行收集,命名 CP-I.再用 0 ~ 2 mol · L<sup>-1</sup> NaCl 各 400 mL 进行直线梯度洗脱,流速 45 mL · h<sup>-1</sup>,自动部分收集器收集,每 12 min 收集 8 mL 为 1 管.用苯酚-硫酸法测定糖的分布情况,记录仪记录紫外光谱检测到的蛋白质,结果如图 1(b)所示.从图 1(b)可以看出,有两个糖峰,第 1 个峰糖的量多且峰形较对称单一,因此收集 33 ~ 44 管作为研究对象,命名为 CP-.从梯度洗脱结果来看,虽有蛋白质出现,但此蛋白质可以与 CP- 分开,故不影响 CP- 的纯度.将收集到的样品流水透析 24 h,蒸馏水透析 24 h 后浓缩,醇沉,离心,沉淀,并常规干燥.后部分由于量非常少且含有较多蛋白质,暂且不做分析.

2.4 CP- 的纯度鉴定

(1) Sephadex G100 柱层析.称取干燥的 CP- 约 4.0 mg,完全溶于 1.0 mL 蒸馏水后上样.采用质量分数

表 2 正交实验表及结果

Tab. 2 Table and results of orthogonal						
编号	m	V/ g	mL	t/ h	/ ( )	/ ( %)
1	1	4	1.5	70	1.48	
2	1	4	2.0	80	3.05	
3	1	4	2.5	90	4.73	
4	1	6	1.5	80	1.76	
5	1	6	2.0	90	2.80	
6	1	6	2.5	70	3.72	
7	1	8	1.5	90	2.60	
8	1	8	2.0	80	1.69	
9	1	8	2.5	80	3.62	
K <sub>1</sub>	9.26	5.84	6.89			
K <sub>2</sub>	8.28	7.54	8.43			
K <sub>3</sub>	7.91	12.70	10.13			
k <sub>1</sub>	3.09	1.95	2.30			
k <sub>2</sub>	2.76	2.51	2.81			
k <sub>3</sub>	2.63	4.23	3.38			
R	0.46	2.28	1.08			

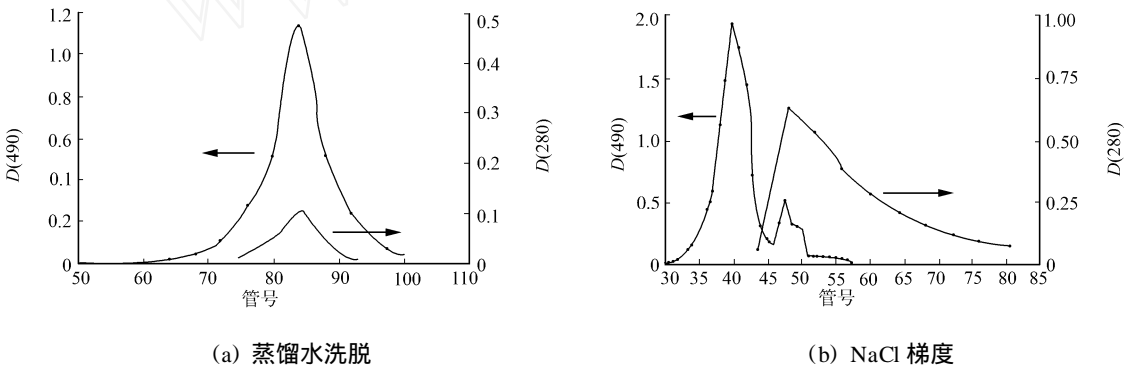


图 1 多糖的洗脱曲线

Tab. 1 Chromatogram of polysaccharide

为 0.9 %的 NaCl 为洗脱液,每 12 min 收集 1.5 mL 为 1 管.用苯酚-硫酸法测定糖的分布情况,记录仪记录紫外光谱检测蛋白质,如图 2 所示.从图 2 可以看出,CP- 洗脱曲线趋势明显,峰的对称性好,紫外光谱在 280 nm 处未检测到蛋白质的吸收峰,说明 CP- 不含蛋白质杂质,初步鉴定为成分单一的某种多糖.(2) CP- 的醋酸纤维素薄膜电泳. CP- 在醋酸纤维素薄膜上跑出了一条区带,再次验证 CP- 为成分单一的某种多糖.

2.5 CP- 的组成分析

(1) 1.5 g 的 CP 经 DEAE-Sepharose CL-6B 柱分离纯化后,得到约 0.279 g 的 CP-,可分别测得 CP- 的糖和蛋白质的质量分数为 98.9 %和 0 %,其相对分子量为 3.8 × 10<sup>4</sup>. (2) 按实验方法中的 HPLC 分析条件,将 CP- 完全酸水解后进行 Zorbax Carbohydrate 柱分析,如图 3 所示.对照单糖标准品各自色谱出峰时间表明,CP- 可能是由鼠李糖(Rha)、果糖(Fru)和葡萄糖(Glu)3 种单糖组成,其量比 n(Rha) : n(Fru) : n(Glu)为 1 : 1.08 : 48.6. (3) 红外光谱分析表明,CP- 在 3 600 ~ 3 200 cm 处有 - OH 吸收峰,在 2 923 cm 左右有一强的吸收峰,为 - CH<sub>3</sub>, - CH<sub>2</sub>的共振吸收峰,在 1 635 cm 处的峰是多糖的水合振动峰. (4) 纸层析结果进一步显示,CP- 单糖组成中含有葡萄糖,只能隐约地观察到鼠李糖和果糖的斑点,这可能由于其含量较少的缘故. (5) 称取一定量干燥的 CP-,溶于 10 mL 的蒸馏水中,装入透析袋内,加入唾液淀粉酶和纤维素酶,于 37 °C 保温 48 h 后检测透析袋中溶液有酚-硫

酸现象,初步说明 CP<sup>-</sup> 中可能含有连续的 -1,4 糖苷键和 -1,4 糖苷键.

3 结束语

为除去穿山龙中皂甙、单糖、双糖、低聚糖、苷类、生物碱、茶多酚、氨基酸、醇溶性蛋白质物质,我们用质量分数为 95 %乙醇回流对穿山龙进行预处理,得到的残渣烘干后用水煮提取.在提取过程中,通过单因素法和正交实验设计方法,对热水浸提穿山龙多糖的工艺条件进行了优化.本课题还对 CP<sup>-</sup> 的理化性质和结构进行初步分析,包括物理性质、糖含量、蛋白质含量和可能含有的键型等.

参考文献:

[1] 王岳宝. 福建省中药炮制规范[J]. 福州:福建科学出版社,1988:330.

[2] 郑永进,郑爱群. 穿山龙与南蛇藤根的鉴别[J]. 实用中医药杂志,2002,18(11):53.

[3] 刘江涛,陈信义,王玉芝. 穿山龙粗提物抗肿瘤体外实验研究[J]. 中国中医药信息杂志,2002,11(3):206-207.

[4] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[J]. 上海:上海科学技术出版社,1987:6-7.

[5] WANG Zhao-jing, LUO Dian-hui, LIANG Zhong-yuan. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers[J]. Carbohydrate Polymer, 2004, (57):241-247.

[6] 王昭晶,梁忠岩,罗巅辉. 小刺猴头菌子实体水溶性多糖 HPI 的结构研究[J]. 高等学校化学学报,2004, (25):1474-1476.

The Isolation , Separation , Purification and Property Research of Polysaccharide Extracted from *Dioscorea nipponica* Makino

WANG Zhao-jing , LUO Dian-hui

(College of Material Science and Engineering , Huaqiao University , Quanzhou 362021 , China)

**Abstract :** This paper studies the process of extracting polysaccharides from *Dioscorea nipponica* Makino. During the extracting process , three main factors including ratio of solid to liquid , exacting time and temperature were studied by using single factor analysis method. On basis of above , the optimal process conditions of hot water extraction of polysaccharides were obtained by orthogonal as follows: ratio of solid to liquid 1 : 4 ( g : mL ) , extracting duration 2.5 hours , and extracting temperature 90 ℃ . A water-soluble crude polysaccharide (CP) was obtained after extracting with the optimal extracting conditions. Coarse amylose had to be purified , and two water-soluble polysaccharides named CP<sup>-</sup> and CP<sup>0</sup> were obtained. It was indicated that CP<sup>-</sup> was homogeneous by gel filtration chromatography and cellulose acetate pellicle electrophoresis. The monosaccharides of CP<sup>-</sup> were analyzed by using high performance liquid chromatography (HPLC) and paper chromatography (PC) . The result showed that CP<sup>-</sup> was mainly composed of Rha , Fru and Glu , in the molar ratio of 1 : 1.08 : 48.6.

**Key words :** polysaccharide ; *Dioscorea nipponica* Makino ;extration ; purification

(责任编辑: 黄仲一)

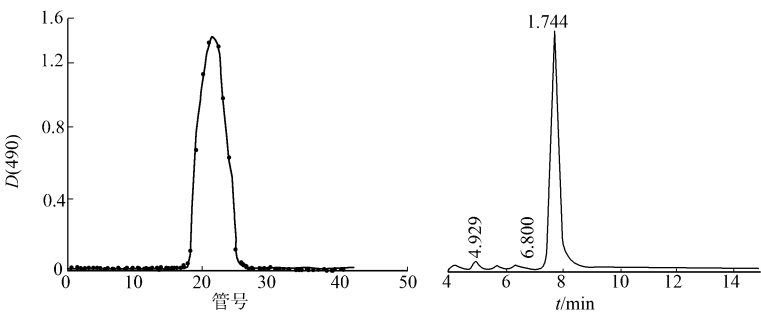


图 2 CP<sup>-</sup> 的 Sephadex G100 柱层析洗脱曲线

Tab.2 Sephadex G100 column chromatogram of CP<sup>-</sup>

图 3 CP<sup>-</sup> 酸水解产物的 HPLC 图

Tab.3 HPLC of CP<sup>-</sup> hydrolyzed