

天麻水溶性多糖分离纯化及理化性质研究

明建¹, 桂明英², 孙亚男¹, 陈宗道¹, 赵国华^{1,*}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400716; 2. 昆明食用菌研究所, 云南 昆明 650223)

摘要: 本实验研究云南野生天麻(*Gastrodia elata* Blume)多糖的分离纯化及理化性质, 实验结果表明, 天麻粗多糖提取的最佳工艺条件为温度 50℃、浸提时间 3h、料液比 1:10(W/V), 乙醇浓度 80%。在该条件下天麻粗多糖得率约为 9.67%(干重)。天麻水溶性多糖(WPGB)经 Sevag 法脱蛋白、透析、乙醇沉淀、DEAE-52 纤维素层析及 Sephadex G-100 层析分离纯化得到 WPGB-A-H 和 WPGB-A-L, 经高效液相色谱仪分析证明, WPGB-A-H 为纯品, 且得率为 0.824%(干重), 经过其理化性质鉴定表明, WPGB-A-H 不含蛋白质、核酸、糖醛酸, 为非淀粉类多糖, 其平均分子质量为 28840D。

关键词: 天麻; 活性多糖; 分离纯化; 理化性质

Study on Isolation and Physicochemical Characteristics of Water-soluble Polysaccharides from *Gastrodia elata* Blume

MING Jian¹, GUI Ming-ying², SUN Ya-nan¹, CHEN Zong-dao¹, ZHAO Guo-hua^{1,*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Kunming Institute of Edible Mushroom, Yunnan 650223, China)

Abstract: The experimental results showed that the optimum extraction parameters of water-soluble polysaccharides from *Gastrodia elata* Blume(WPGB) are 50 °C, extraction time 3 h, ratio of solid to liquid 1:10 and ethanol concentration 80%. Under the conditions, the recovery of WPGB is about 9.67% (dry weight). WPGB-A-H and WPGB-A-L were separated from deproteinized WPGB with DEAE-52 column and Sephadex G-100 column, successively. The recovery of WPGB-A-H is up to 0.824% (dry weight) and its purity is high by high-performance liquid chromatography. The identification results of qualitative chemical reaction showed WPGB-A-H is a neutral polysaccharide. It does not contain proteins, nucleic acids, uronic acid and starch. The average molecular weight of WPGB-A-H is proved to be 28,840 D.

Key words: *Gastrodia elata* Blume; polysaccharides; separation and purification; physicochemical properties

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0344-04

天麻(*Tall Gastrodia Tuber*), 为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Blume)的块茎。主产于我国的云南、四川、贵州、湖北、陕西等地。本草纲目记载天麻具有息风定惊、镇静安眠、平肝息风、去湿活血等功效。现代医学研究表明, 天麻可增强视神经的分辨能力, 对增强记忆、延缓衰老均有明显作用^[1-4]。目前, 发现天麻中的主要活性成分是天麻素、天麻甙元等酚类化合物^[5-6]。而最近的研究发现天麻多糖是天麻中又一种重要的活性物质^[7-8]。但有关天麻多糖的分离纯化及化学结构研究还不完善。鉴于此, 本实验对天麻活性多糖

的分离纯化进行了研究, 以期为天麻多糖包括精细化学结构解析、构效关系研究以及生物效应准确评价奠定物质基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

云南产天麻的块茎(干品) 由云南昆明食用菌研究所提供。DEAE-52 纤维素 Whatman 公司; Sephadex G-100 瑞典 Pharmacia 公司; 其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

收稿日期: 2007-11-20

基金项目: 云南省省校省院科技合作支持项目(2005YX24)

作者简介: 明建(1972-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: mingjian1972@tom.com

* 通讯作者: 赵国华(1971-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: zhaoguohua1971@163.com

透析袋 美国 Sigma 公司; 752 紫外光栅分光光度计 上海精密仪器有限公司; RE-86 旋转蒸发器 上海本波仪器有限公司; LD5-2A 型低速离心机 北京医用离心机厂; 高效液相色谱仪、SPD-10A 检测器、IC-10AT 泵 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 天麻水溶性多糖分离纯化工艺流程

材料准备(500g)→前处理(烘干)→破碎(80目)→浸提(50℃, 3h)→离心分离(5000r/min, 10min)→减压浓缩→乙醇沉淀(4倍体积)→离心分离(5000r/min, 10min)→溶剂干燥→天麻水溶性粗多糖(WPGB, 48.35g)→脱蛋白(Sevag法, 39.68g)→透析(截留1000D, 18.85g)→离心分离(5000r/min, 10min)→减压浓缩→乙醇沉淀(4倍体积)→离心分离(5000r/min, 10min)→溶剂抽干→乙醚回流→DEAE-52纤维素柱色谱→Sephadex G-100柱层色谱→纯度鉴定(高效液相色谱法)→天麻多糖纯品(4.12g)。

1.3.2 多糖含量的测定

采用硫酸-蒽酮比色法^[9]。

1.3.3 多糖得率计算方法

每一步分离或纯化后获得的目标产物的重量为 W_x (干重), 起始提取用的天麻原料的重量为 W_0 (干重), 产物的得率(%) = $W_x/W_0 \times 100$ 。

1.3.4 水提天麻多糖的纯化^[10]

1.3.4.1 DEAE-52 纤维素柱层析

洗脱液分别用蒸馏水、0.1mol/L NaOH、0.5mol/L NaOH 分段梯度洗脱, 柱规格为 40mm × 500mm, 柱床高度 350mm, 流速为 3ml/min, 上量为 4ml, 每管收集 8ml。

1.3.4.2 Sephadex G-100 柱层析

将水提 DEAE-52 纤维素柱层析碱洗脱多糖, 用蒸馏水进行洗脱, 柱规格为 16mm × 1000mm, 柱床高度 900mm, 流速 1ml/min, 每管收集 2ml。

1.3.5 水提碱洗脱天麻多糖的纯度鉴定

采用高效液相色谱法^[10], 日本岛津 SPD-10A 检测器 IC-10AT 泵(示差检测), 流动相为纯水, 流速为 0.3ml/min, 常温, 柱的规格为 TSK-GEL G4000。

1.3.6 天麻多糖理化性质的测定

采用斐林试剂反应^[11]、双缩脲反应^[12]、硫酸唑啉反应^[13]、碘反应^[14]、三氯化铁反应^[12]。

1.3.7 数据处理方法

本实验使用 SPSS10.0 及 DPS 分析软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 提取温度对天麻多糖得率的影响

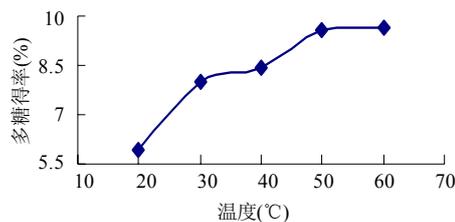


图1 提取温度对天麻多糖得率的影响

Fig.1 Effects of temperature on extraction rate of water-soluble polysaccharides

由图1可知, 在50℃以下时, 随着温度的提高, 天麻粗多糖的得率明显呈上升趋势, 但当温度达到50℃以上, 温度的升高对多糖得率的增加无明显影响。各温度水平间的显著性分析发现, 温度在50℃和60℃下的多糖得率间无显著差异($p > 0.05$); 在20、30、40、50℃(或60℃)下的多糖得率间存在显著性差异($p < 0.05$)。同时, 由于天麻中有一定量的淀粉存在, 为了防止淀粉糊化对多糖提取及后续纯化的影响, 提取温度亦不宜太高(温度 ≤ 60 ℃)。

2.2 提取时间对天麻多糖得率的影响

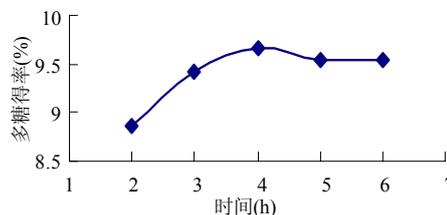


图2 提取时间对天麻多糖得率的影响

Fig.2 Effects of time on extraction rate of water-soluble polysaccharides

由图2可知, 在3h前, 随着提取时间的延长, 水提天麻粗多糖得率较快增大。在3h时, 粗多糖得率达到最大值。再延长提取时间, 水提粗多糖得率不但不再上升反而略有下降, 但下降不具有显著性。提取时间过长导致多糖得率下降的原因可能是长时间的静置使少量可溶性多糖在氢键等作用下被吸附在天麻水不溶物质的表面或使部分可溶性大分子质量多糖沉淀。

2.3 水料比对天麻多糖得率的影响

由图3可知, 水料比对多糖提取得率的影响与提取时间对多糖得率的影响有相同的趋势。当水料比小于10:1时, 随着加水量的增大, 水提天麻粗多糖的得率也随之增加(这可能是由于天麻颗粒与水的接触面积增大, 提取更加充分)。而当水料比为15:1时, 水提天麻粗多糖提取充分, 继续增加水料比时, 水提天麻粗多糖得率略有下降, 但无显著差异。

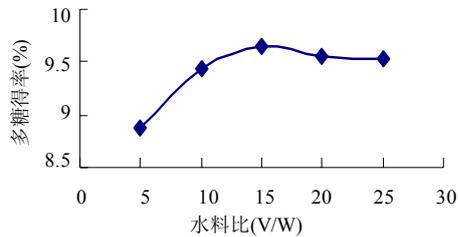


图3 水料比对天麻多糖得率的影响

Fig.3 Effects of ratio of liquid to solid on extraction rate of water-soluble polysaccharides

2.4 乙醇浓度对天麻多糖得率的影响

经一定条件浸泡后获得的多糖提取液, 通过混合乙醇使多糖沉降而获得目标物质。不同浓度乙醇对所提取多糖的沉淀效果如图4所示。乙醇浓度在80%以下时, 增加乙醇的浓度可以明显地提高水提天麻粗多糖的得率。当乙醇浓度达到80%后, 随着乙醇浓度的增加, 天麻粗多糖的得率无明显改变。

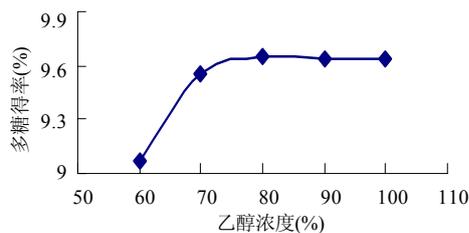


图4 乙醇浓度对天麻多糖得率的影响

Fig.4 Effects of ethanol concentration on extraction rate of water-soluble polysaccharides

2.5 水提天麻多糖的纯化

水提天麻粗多糖连续经过 DEAE-52 纤维素柱层析和 Sephadex G-100 柱层析分离后获得不同的多糖组分。

2.5.1 DEAE-52 纤维素柱层析

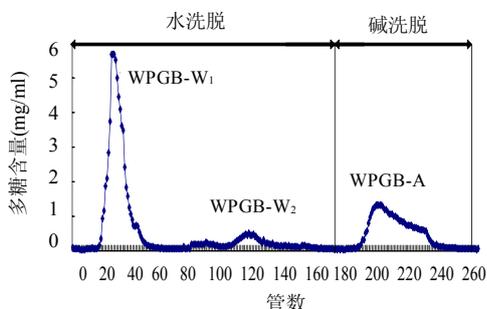


图5 水提天麻粗多糖DE-52 柱层析洗脱曲线图

Fig.5 Elution curve of WPGB on DEAE-52 column

图5是天麻水溶性粗多糖在DEAE-52纤维素柱(40mm × 500mm)上用水和0.1mol/L NaOH洗脱时的洗脱曲线。由图5可知, 用蒸馏水洗脱时, 先后有两个峰出现,

分别收集后获得两个多糖组分 WPGB-W₁(20~40 管)和 WPGB-W₂(110~130 管)。水洗至无多糖流出后用0.1mol/L NaOH继续洗脱, 发现又有一个多糖组分出现, 将其称为水提碱洗脱天麻多糖 WPGB-A(200~220 管)。由于 WPGB-W₂ 含量很低, 很难收集足够的量进行后续研究, 所以通过 DEAE-52 纤维素柱后只收集 WPGB-W₁ 和 WPGB-A 进行下一步的 Sephadex G-100 柱层析分级纯化。从 DEAE-52 纤维素柱洗脱可以判断, WPGB-W₁ 为一中性多糖而 WPGB-A 为酸性多糖。

2.5.2 Sephadex G-100 柱层析

有大量报道认为, 来自植物或真菌中的酸性多糖往往具有非常强大的生物活性。因此, 本研究对酸性多糖 WPGB-A 进一步纯化。将 WPGB-A 用水溶解之后上 Sephadex G-100 柱(16mm × 1000mm)用蒸馏水连续洗脱, 获得如图6洗脱曲线。在65管处左右时出现一个明显的主峰, 但此峰在85管处出现了一个小峰。造成这种现象的原因可能是 WPGB-A 中含有两种分子质量相差不大的组分(WPGB-A-H 和 WPGB-A-L), 它们在凝胶柱上分离效果不好。为了能够得到分子质量较为均一的多糖, 只对55~70管的洗脱液(WPGB-A-H)进行集中收集做后续研究。

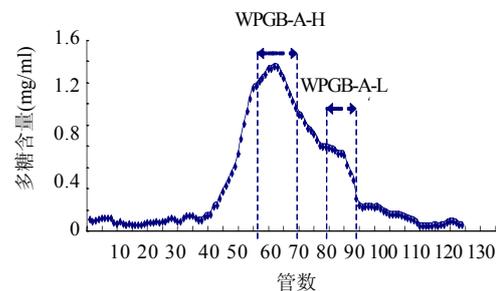


图6 水提天麻多糖 WPGB-A 的 Sephadex G-100 柱层析洗脱曲线图

Fig.6 Elution curve of WPGB-A on Sephadex G-100 column

2.6 天麻多糖 WPGB-A-H 的纯度鉴定

将上述获得的 WPGB-A-H 用水溶解后过滤, 通过高效液相色谱法分析, 发现只有一个很明显的峰(图7)。因此根据多糖纯度的定义可以认为, 本研究通过分离纯化

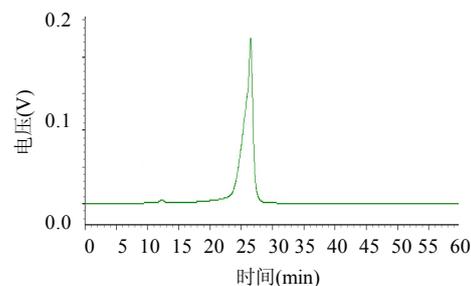


图7 WPGB-A-H 的 HPLC 纯度鉴定

Fig.7 Purity identification of WPGB-A-H by HPLC

得到的水提碱洗脱天麻多糖(WPGB-A-H)样品是均一的纯多糖。

2.7 天麻多糖 WPGB-A-H 的理化性质

表1 天麻多糖(WPGB-A-H)的理化性质
Table 1 Physical and chemical nature of WPGB-A-H

反应类型	反应结果	性质判定
碘反应	—	非淀粉多糖
斐林试剂	—	不含还原糖
硫酸咔唑	—	不含糖醛酸
三氯化铁	—	不含多酚类物质
双缩脲	—	不含多酚类物质
比旋光度 $[\alpha]_D^{220}$	+206.3(C=0.003)	以 α -糖苷键为主
分子质量	28840	

注：“—”表示反应为阴性。

表1鉴定了天麻多糖 WPGB-A-H 的一般理化性质。由表1可知, WPGB-A-H 干品呈白色粉末状, 平均分子质量为 28840D, 易溶于水, 不溶于有机溶剂如高浓度的甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等; 与斐林试剂呈阴性反应, 表明不含游离单糖; 与三氯化铁呈阴性反应, 表明不含多酚类物质; 与双缩脲、硫酸咔唑反应均呈阴性, 表明其不含蛋白质、糖醛酸; 与碘-碘化钾反应呈阴性, 表明其不含淀粉。

3 结论

3.1 水提天麻粗多糖提取的最佳工艺条件为温度 50℃、浸提时间 3h、料液比 1:10(W/V)、乙醇浓度 80%。在该条件下水提天麻粗多糖得率约为 9.67%(干重)。

3.2 水提天麻粗多糖经 Sevag 法脱蛋白、透析、乙醇沉淀 DEAE-纤维素柱色谱 Sephadex G-100 凝胶色谱一系

列过程分离纯化得到的 WPGB-A-H, 经 HPLC 鉴定为纯品, 其得率为 0.824%(干重)。

3.3 WPGB-A-H 干品呈白色粉末状, 易溶于水, 不溶于有机溶剂, 不含蛋白质、核酸、糖醛酸等物质, 为非淀粉类纯粹多糖, 平均分子质量为 28840D, 比旋光度 $[\alpha]_D^{22}$ 为 +206.3(C=0.003, H₂O)。

参考文献:

- [1] 杨世林, 兰进, 徐锦堂. 天麻的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(1): 66-69.
- [2] 周俊, 杨雁宾, 杨崇仁. 天麻的化学研究 I. 天麻化学成分的分离和鉴定[J]. 化学学报, 1979, 37(3): 183-189.
- [3] ZHAO Y K, CAO Q E, XIANG Y Q, et al. Identification and determination of active components in *Gastrodia elata* Bl. by capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 8(4): 277-283.
- [4] 熊建明. 天麻药理学研究进展[J]. 中国药理学报, 1987, 8(1): 57.
- [5] TAGUCHI H, YOSIOKA I, YAMASAKI K, et al. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume[J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(1): 55-62.
- [6] 邓士贤, 莫云强. 天麻的药理研究(一)天麻素及天麻甙元的镇静及抗惊厥作用[J]. 云南植物研究, 1979, 1(2): 66-73.
- [7] 缪化春, 沈业寿. 天麻多糖的降血压作用[J]. 高血压杂志, 2006, 7(14): 531-534.
- [8] 赵国华, 陈宗道, 李志孝, 等. 活性多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 45-48.
- [9] 张翼伸. 食品分析[M]. 北京:轻工业出版社, 1983: 163.
- [10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 浙江: 浙江大学出版社, 1999.
- [11] 吴梧桐, 余品华, 夏尔宁, 等. 银耳孢子多糖 TF-A、TF-B、TF-C 的分离、纯化及组成单糖的鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(4): 393-398.
- [12] 李环, 韦萍, 欧阳平凯. 嗜盐隐杆藻胞外多糖的分离、纯化及理化特性[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(2): 52-55.
- [13] LEI L S. Effect of ganoderma polysaccharides on the cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte responses[J]. Acta Pharmaceutica, 1992, 27(5): 331-335.
- [14] 王顺春, 何巍, 方积年, 等. 一种新葡聚糖化学结构的研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 27(2): 199-201.