

九华山黄精多糖的分离纯化及化学表征

张庭廷, 胡 威, 汪好芬, 冉颖霞, 郑春艳

(安徽师范大学生命科学学院, 生物环境与生态安全安徽省高校重点实验室, 安徽 芜湖 241000)

摘 要: 采用传统方法、酶法、超声波提取以及酶法辅助超声等多种手段对九华山多花黄精多糖进行提取, 并用 DEAE-纤维素柱层析与交联葡聚糖分子筛法等对多糖进行纯化、分级以及相对分子质量测定, 采用红外光谱以及气相色谱法等对多糖的构型和组成进行分析。结果表明: 纤维素酶辅以超声提取方法最佳, 多糖得率最高; 多糖为杂多糖, 其相对分子质量为 8912, 其组成为果糖:葡萄糖=8.7:1。

关键词: 黄精多糖; 分离纯化; 化学表征

Separation, Purification and Chemical Characterization of a Polysaccharide Fraction from *Polygonatum cyrtonema* Hua in Jiuhua Mountain

ZHANG Ting-ting, HU Wei, WANG Hao-fen, RAN Ying-xia, ZHENG Chun-yan

(Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui Province, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: The conventional method, enzymolysis, ultrasonic extraction and ultrasonic-assisted enzymolysis were compared for their effectiveness in extracting polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua in Jiuhua Mountain. Ultrasonic-assisted enzymolysis was evaluated as the best method due to the highest polysaccharide yield. The polysaccharide extract obtained by the selected method was a single polysaccharide component according to DEAE-cellulose column chromatographic analysis. Infrared spectral analysis revealed that the polysaccharide fraction was a hetero polysaccharide. Its relative molecular weight was determined by dextran gel filtration method to be 8912. Based on gas chromatographic analysis, its monosaccharide composition was composed of fructose and glucose at a ratio of 8.7:1.

Key words: polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua; separation and purification; chemical characterization

中图分类号: Q539.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)10-0048-04

黄精(*Rhizoma polygonati*)是百合科(Liliaceae)黄精属(*Polygonatum* Mill.)多年生草本植物, 具有补中益气、延年益寿之功效。安徽省九华山地区是黄精的主要分布地之一, 其资源非常丰富。

多糖是所有生命有机体的重要组成部分。中药多糖有很强的生物活性, 具有免疫调节^[1-2]、抗肿瘤^[3-4]、抗氧化^[5]、抗病毒^[6]、保护心肌以及降压^[7-8]等药理作用, 黄精中多糖含量丰富。目前关于黄精多糖的生物活性已有较深入的研究: 黄精多糖可通过升高小鼠脑和性腺组织端粒酶活性而有独特的抗衰老作用^[9]、黄精多糖可降低高血脂模型小鼠的血脂、可增强小鼠免疫功能^[10-11]、对 H₂₂ 实体瘤、S₁₈₀ 腹水瘤具有一定的生长抑制作用等^[12]。然而关于黄精中多糖的含量、种类、组成以及分子量

等则因黄精的产地不同而有明显差异。黄赵刚等^[13]对不同产地黄精中多糖含量进行了比较, 发现产地不同, 其多糖的含量区别很大, 安徽九华山黄精中多糖最高, 甚至达到了河南济源的 4 倍之多; 吴群绒等^[14]报道滇黄精多糖有 3 种, 其中滇黄精多糖 主要是由葡萄糖组成的相对分子质量为 8100 的中性杂多糖; 张晓红等^[15]报道内蒙古野生黄精中的多糖是由单一果糖组成的相对分子质量为 7073 的同多糖。但到目前为止, 关于九华山多花黄精中的多糖种类、组成和分子质量以及其分离提纯方法等尚未见报道。因此本实验对九华山黄精多糖的提取工艺及其理化参数进行较深入研究, 一方面为黄精多糖的开发利用提供新的依据, 同时为多糖等生物活性物质的分离纯化及其表征提供一定的参考。

收稿日期: 2010-07-22

基金项目: 芜湖市科技开发重点项目(200761); 安徽师范大学重点项目(200918)

作者简介: 张庭廷(1955—), 女, 教授, 博士, 主要从事生物活性物质的开发应用研究。

E-mail: cyhztt@mail.ahnu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

黄精原材料于2008年8月采于安徽省九华山,经安徽师范大学生命科学学院周守标教授鉴定为多花黄精(*Polygonatum cyrtonema* Hua.)。经洗净,50℃烘干粉碎,过筛(60目),备用。

葡萄糖标准品 Sigma公司;DEAE-52干粉 英国Whatman公司;纤维素酶及果胶酶 上海韵涵生物科技有限公司;交联葡聚糖Sephadex G-100、标准品葡聚糖T5、T-10、T-40、T-70 意大利Pharmacia公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

KQ2100E超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;FTS-40傅里叶变换红外光谱仪 美国伯乐公司;FD-1冷冻干燥机 北京博医康公司;层析柱、HL-2恒流泵 上海精密科学仪器有限公司;BSZ-100自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 粗多糖分离提取的工艺流程

黄精干粉 石油醚回流脱脂(80℃,2h) 挥干溶媒 80%乙醇浸提,脱寡糖等(1h) 挥干溶媒 提取多糖 过滤 药渣再重复提取一次 过滤,合并滤液,减压浓缩至一定体积 加入4倍量95%乙醇沉淀过夜 弃上清液,收集沉淀 依次用95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚洗数次 真空干燥得多花黄精粗多糖(*Polygonatum cyrtonema* Hua. Polysaccharides, PCP1)

1.3.2 多糖提取

多糖提取的具体方法与条件见表1。

表1 不同方法提取黄精多糖的条件

Table 1 Conditions for extracting polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua by different extraction methods

方法	固液比	温度/℃	时间/h	备注
水提1	1:15	90	2.0	
水提2	1:20	90	2.0	
加纤维素酶	1:20	50、90	2.0(50、90 各1h)	调至酶的最适pH5.5
加果胶酶	1:20	50、90	2.0(50、90 各1h)	调至酶的最适pH4.0
超声提取1	1:20	50	0.5	频率为28kHz
超声提取2	1:20	50	1.0	频率为28kHz
纤维素酶+超声	1:20	50	1.0	频率为28kHz
果胶酶+超声	1:20	50	1.0	频率为28kHz

注:每种方法平行3次。

1.3.3 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法^[16],以标准葡萄糖溶液浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,通过Excel作图求得回归方程,待测多糖含量可通过回归方程求出。

1.3.4 多糖的纯化及其化学表征

1.3.4.1 蛋白质和小分子杂质的去除

采用体积分数5%三氯乙酸和Sevag(氯仿与正丁醇体积比为4:1)相结合的方法脱蛋白,至多糖相与下层氯仿-正丁醇相中间无变性蛋白为止。将脱蛋白后的多糖装入直径22mm,截留相对分子质量为3500的透析袋中,以除去多糖溶液中的小分子物质,再经脱水干燥,得混合黄精纯多糖PCP2。

取PCP2 5.0mg,溶解于5.0mL蒸馏水中,用紫外分光光度计在波长200~400nm范围作连续扫描,看是否有特征吸收峰,检查多糖的纯度。

1.3.4.2 离子交换柱层析法对多糖进行分级与纯化

DEAE-52干粉经常规处理后装柱。层析柱的直径和高度的比为1:20,上样后,接上洗脱装置,经0.5~2mol/L的NaCl溶液进行梯度洗脱。洗脱液每5.0mL收集1管,每5管用苯酚-硫酸法跟踪检测,依吸光度对洗脱液体积作图,收集单一峰,经减压浓缩、透析去盐、冷冻干燥,得黄精纯多糖PCP3^[17]。

1.3.4.3 交联葡聚糖对多糖进行纯化与相对分子质量测定

Sephadex G-100干粉3.0g经常规处理后装柱(层析柱直径与柱高比为1:30)、去离子水平衡、1.0mg/mL细胞色素c溶液2.0mL过柱,观察色带下移情况以鉴定新装柱的质量。依次将已知分子质量的标准葡聚糖T-5、T-10、T-40、T-70及待测的黄精多糖PCP3上柱,用去离子水洗脱,流速3.0mL/h,每管3.0mL分部收集。用硫酸-苯酚法跟踪检测,以标准葡聚糖分子质量的对数(lgM_r)对洗脱体积(V_e)作图,得直线回归方程,待测黄精多糖可依其洗脱体积通过回归方程求出其相对分子质量^[18]。

1.3.4.4 多糖分子构型分析

多糖分子构型测定采用KBr压片法,通过红外光谱分析。取1.0mg黄精多糖PCP3样品,加入150.0mg干燥的KBr粉末,在玛瑙钵中研磨均匀,再经压片机压成薄片,随即上机于4000~400cm⁻¹进行红外扫描。

1.3.4.5 多糖的单糖组成分析

按文献^[17]制备糖腈乙酰酯化样品溶液,再进行糖腈乙酰酯化单糖对照品溶液的制备。取各单糖(甘露糖、葡萄糖、半乳糖、果糖)对照品溶液2μL注入气相色谱仪,确定各单糖的保留时间。然后取样品PCP3溶液2μL注入色谱仪,记录色谱图^[17,19]。

2 结果与分析

2.1 各种提取方法对黄精粗多糖得率的影响

不同提取方法和提取条件对黄精粗多糖得率的影响,结果见表2。

由表2可知,固液比1:20明显好于1:15,经配对t检验,P < 0.05,所以在本研究的各种方法中采取的固

表2 不同提取方法和提取条件对黄精粗多糖得率的影响

Table 2 Effects of different extraction methods and conditions on extraction rate of polysaccharides

提取方法	水提(1:15)	水提(1:20)	加纤维素酶	加果胶酶	超声提取(0.5h)	超声提取(1.0h)	纤维素酶+超声	果胶酶+超声
得率/%	12.3 ± 1.7*	15.1 ± 2.4	17.9 ± 1.8	16.4 ± 2.3	8.7 ± 1.1*	17.2 ± 1.6	20.6 ± 2.4*	18.6 ± 2.7*

注：*与水提(1:20)组相比差异显著， $P < 0.05$ 。

液比均为 1:20；而超声 1h 的多糖得率几乎是 0.5h 的两倍，提取时间不同，差异显著，两组同样经配对 t 检验， $P < 0.05$ ，因此在有辅助超声时采用的时间均为 1h；而在所有提取方法中，以纤维素酶辅助超声提取得率最高，为 20.6%，与单纯水提时固液比 1:20 组相比，具有显著性差异， $P < 0.05$ ；果胶酶辅助超声得率虽不及纤维素酶辅助超声得率高，但仅次于后者，两组相比，没有显著性差异。

2.2 葡萄糖标准曲线回归方程

不同质量浓度标准葡萄糖与吸光度的回归方程为：

$y = 0.0082x - 0.0256$ ， $R^2 = 0.9991$ ，线性关系良好。

2.3 多糖纯度测定结果

2.3.1 脱蛋白以及透析后的 PCP2 纯度

脱蛋白以及透析后的 PCP2 经测定其纯度达到 91.8%，紫外分光光度计在波长 200 ~ 400nm 处作连续扫描，在 260nm 与 280nm 波长处未发现有明显吸收峰，见图 1，说明多糖中已基本不含蛋白质、多肽与核酸。

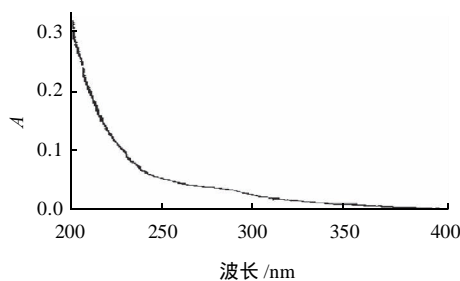


图1 粗多糖的紫外吸收光谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of polysaccharide extract from *Polygonatum cyrtonema* Hua

2.3.2 DEAE-52 柱层析后多糖分级及纯度

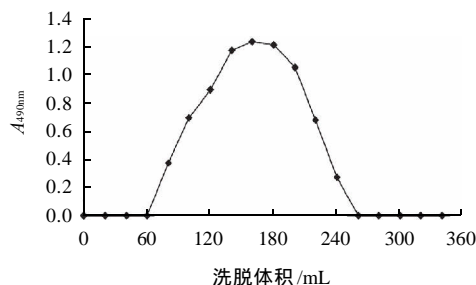


图2 DEAE-52 柱层析的洗脱曲线

Fig.2 DEAE-cellulose column chromatographic elution profile of polysaccharide extract from *Polygonatum cyrtonema* Hua

多糖 PCP2 再经 DEAE-52 柱层析的结果表明，黄精多糖经不同浓度梯度 NaCl 洗脱，只得到一个很大的单一峰(图 2)，表明九华山多花黄精中的多糖仅为一种。

对层析以及透析后的多糖纯度测定表明此时的黄精多糖纯度已达到了 94.7%。

2.4 多糖的相对分子质量及分子筛后多糖的纯度

4 种标准葡聚糖相对分子质量的对数($\lg M_r$)对其洗脱体积 V_e 作线性回归，得到回归方程 $y = -0.0611x + 11.452$ ， $R^2 = 0.9949$ 。根据回归方程及 PCP 的洗脱体积计算出 PCP 的相对分子质量为 8912。

葡聚糖凝胶过滤法除可将不同分子大小的多糖分开，也是纯化多糖的最好方法，经凝胶分子筛过滤的多糖经鉴定其纯度高达 96.8%，是目前文献报道中纯度较高的多糖。

2.5 黄精多糖的红外光谱分析

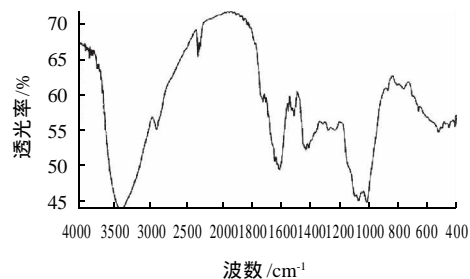


图3 黄精多糖的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum of polysaccharide extract from *Polygonatum cyrtonema* Hua

图 3 表明：在 2925、1240 cm^{-1} 处有两组特征峰，它们分别代表了糖类 C - H 的伸缩振动与变角振动，因而明确了该物质是糖类化合物；在 887 cm^{-1} 处的吸收峰，代表了吡喃糖 - 端基差向异构的 C - H 变角振动，在 2930 cm^{-1} 附近，中等强度的吸收峰，是由 C - H 键伸展振动引起，证明了 PCP2 有吡喃糖的 - 糖苷键结构；875、815 cm^{-1} 为果聚糖相关吸收峰，综合红外光谱特征吸收峰，可以认为黄精多糖可能为果糖和葡萄糖组成的杂多糖。

2.6 多糖的组成

由图 4 可知，黄精多糖是由果糖和葡萄糖组成的杂多糖，该结果与红外光谱图分析结果一致，通过外标法测得组成单糖的物质质量比为果糖:葡萄糖=8.7:1。

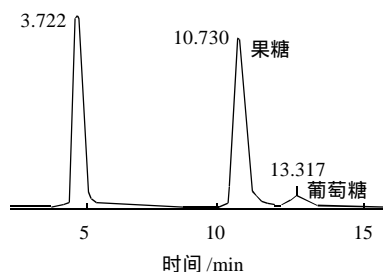


图4 黄精多糖单糖组成的GC图

Fig.4 GC chromatographic separation of monosaccharides in polysaccharide extract from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua

3 结论

九华山黄精多糖提取的工艺以纤维素酶法辅助超声最佳,该多糖为单一的杂多糖,相对分子质量为8912,其组成为果糖:葡萄糖=8.7:1,多糖经DEAE-52柱层析以及交联葡聚糖的凝胶过滤,最终纯度达到96.8%。

参考文献:

- [1] YU Mengyao, XU Xiaoyan, QING Yuan, et al. Isolation of an anti-tumor polysaccharide from *Auricularia polytricha* and its effects on macrophage activation[J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, 228(3): 477-485.
- [2] JIA Xiaoning, DONG Wei, LU Weidong, et al. In vivo immuno-stimulatory and tumor-inhibitory activities of polysaccharides isolated from solid-state-cultured *Trametes robiniophila* Murrill[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25(11): 2057-2063.
- [3] LIANG Hui, ZHANG Shicui. Roles of polysaccharide from *Branchiostoma belcheri* in anti-DNA oxidation and anti-tumor activity in S180 mice[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(4): 845-850.
- [4] CHEN Haixia, WANG Zhaoshuai, QU Zhishuang, et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of a polysaccharide isolated from oolong tea[J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, 229(4): 629-635.
- [5] LU Yu, WANG Deyun, HU Yuanliang. Sulfated modification of Epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71(2): 180-186.
- [6] WANG Hui, OOL E V, Jr ANG P O. Antiviral polysaccharides isolated from Hong Kong brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*[J]. *Science in China Series C*, 2007, 50(5): 611-618.
- [7] ZOU Xiang, GUO Xia, SUN Min. pH control strategy in a shaken minibioreactor for polysaccharide production by medicinal mushroom *Phellinus linteus* and its anti-hyperlipemia activity[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, 32(2): 277-281.
- [8] CHEN Wei, YU Mao Hua, LI Yi Ming, et al. Beneficial effects of *Astragalus* polysaccharides treatment on cardiac chymase activities and cardiomyopathy in diabetic hamsters[J]. *Acta Diabetol*, 2009, 47(Suppl 1): 35-46.
- [9] 李友元, 邓洪波, 王蓉, 等. 衰老小鼠组织端粒酶活性变化及黄精多糖的干预作用[J]. *医学临床*, 2005, 22(7): 894-895.
- [10] 张庭廷, 夏晓凯, 聂刘旺, 等. 黄精多糖的生物活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(7): 42-45.
- [11] 吴焱荣, 李友元, 肖洒. 黄精多糖调脂作用的实验研究[J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(2): 108-110.
- [12] 张峰, 高群, 孔令雷, 等. 黄精多糖抗肿瘤作用的实验研究[J]. *中国实用医药*, 2007, 21(2): 95-96.
- [13] 黄赵刚, 刘志荣, 夏泉, 等. 不同产地黄精中多糖含量的比较[J]. *时珍国医国药*, 2003, 14(9): 536-527.
- [14] 吴群绒, 胡盛, 杨光忠, 等. 滇黄精多糖I的分离纯化及结构研究[J]. *林产化学与工业*, 2005, 25(2): 80-85.
- [15] 张晓红, 博·格日勒图, 昭日格图, 等. 高效液相色谱法对黄精多糖相对分子质量及组成的测定[J]. *色谱*, 2005, 23(4): 394-396.
- [16] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2003.
- [17] 张庭廷, 李蜀萍, 聂刘旺, 等. 金樱子多糖的分离纯化及组成分析[J]. *生物学杂志*, 2002, 19(3): 32-34.
- [18] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(上册)[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 297-298.
- [19] 李浩春, 卢湖章. 气相色谱法[M]. 北京: 科学出版社, 1997.