

# 山茱萸多糖的提取及纯化工艺研究

张彩莹<sup>1</sup>, 张 良<sup>2</sup>

(1. 南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南 南阳

473061; 2. 南阳理工学院, 河南 南阳

473004)

**摘 要:** 本实验对山茱萸中水溶性多糖的提取纯化工艺进行了研究。通过单因素试验和均匀设计试验, 研究了温度、时间、料液比对多糖提取率的影响, 结果显示: 提取温度是影响多糖提取率的主要因素, 最佳提取工艺为料液比 1:36, 温度 100℃, 时间 180min, 在此条件下, 山茱萸多糖提取率为 199.36mg/g。通过乙醇沉淀、透析、DE-52 柱层析对提取的山茱萸粗多糖进行纯化。纯化的山茱萸多糖经紫外光谱分析不含蛋白质和核酸, 琼脂糖凝胶电泳得到单一区带, 表明为分子大小均一的单一组分多糖。

**关键词:** 山茱萸多糖; 均匀设计; 提取; 纯化

Study on Extraction and Purification Technology of Polysaccharide from *Fructus Corni*

ZHANG Cai-ying<sup>1</sup>, ZHANG Liang<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang

473061, China

2. Nanyang Institute of Technology, Nanyang

473004, China)

**Abstract:** The extraction and purification technology of the water-soluble polysaccharide from *Fructus Corni* was studied in this paper. Several factors of affecting extraction rate such as extraction temperature, extraction times and the ratio of sample to water (W:V) were studied. The results showed that the extraction temperature is the major factor to affect the polysaccharide extraction rate. By uniform design test the optimum extraction conditions are as follows: extraction temperature 100 °C, extraction time 180 min and the ratio of sample to water 1:36. The extraction rate reaches 199.36 mg/g under the optimal extraction conditions. The crude polysaccharide was purified by ethanol sedimentation, dialysis, DE-52 chromatography. The purified *Fructus Corni* polysaccharide was examined with ultraviolet spectral analysis without any protein, nuclear acid. It showed that size is obtained homogeneous single composition polysaccharide of molecule by agarose gel electrophoresis shown in the single area.

**Key words** *Fructus Corni* polysaccharide; uniform design; extraction; purification

中图分类号: TS202.3 Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0105-04

多糖在自然界中分布很广, 具有增强免疫功能, 抗辐射、抗肿瘤、抗炎、降血糖等广泛的生物学活性, 近年来越来越受人们的普遍关注。山茱萸(*Fructus Corni*) 为山茱萸科植物山茱萸的干燥果实, 又名山萸肉、药枣、肉枣等。现代医学研究表明, 山茱萸果实含有中糖类、维生素和矿物质等, 有补益肝肾、收敛补血、利尿、降血压、健胃、强力、明目、延年益寿、涩精等功效<sup>[1-2]</sup>。山茱萸是“六、八味地黄产品”的主要原料之一。近来, 对山茱萸多糖的提取已有一些报道<sup>[3]</sup>, 但提取率并不理想。本实验选用河南西峡产的山茱萸为材料, 考查提取温度、提取时间和料液比对山茱萸多糖得率的影响, 采用均匀设计试验<sup>[4]</sup>对山茱萸多糖的提取工艺进行优化。并对提取得到的

山茱萸粗多糖通过 DE-52 柱层析进一步纯化, 对纯化的山茱萸多糖纯度进行初步鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

山茱萸干燥果实产地为西峡县, 购自药店。

D(+)-葡萄糖 Fluka 进口分装上海华硕精细化学有限公司; DE-52 (进口分装 whatman 产品), 国药集团化学试剂有限公司; 重蒸苯酚 北京市双翔达生化试剂; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; 台式离心机 太仓市医疗器械厂;

收稿日期: 2006-07-13

基金项目: 南阳师范学院科研资助项目(nytc 2004 k11)

作者简介: 张彩莹(1970-), 女, 讲师, 主要从事生物化学、酶工程的研究。

数显恒温水浴锅HH-6 国华电器有限公司; 中兴高速万能粉碎机 中兴伟业有限公司; 旋转蒸发器RE-52AA 上海亚荣生化仪器厂; 层析装置 上海沪西分析仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 山茱萸多糖的提取纯化工艺流程

干燥的山茱萸果实粉碎→100目筛筛分→山茱萸粉末→八倍体积95%乙醇回流8h脱脂→冷却抽滤→滤渣晾干→预处理的山茱萸粉末→水浸提→离心→上清液→合并上清液→浓缩→乙醇沉淀→干燥得粗多糖

粗多糖溶于水→透析→DE-52柱层析纯化→收集部分多糖洗脱液浓缩→乙醇沉淀→冷冻干燥→白色山茱萸多糖

#### 1.3.2 山茱萸多糖的提取方法

称取一定量的预处理的山茱萸粉末, 以不同的料液比、提取温度、提取时间在恒温水浴中保温浸提, 4000r/min离心15min, 合并上清液, 加入三倍体积95%的乙醇, 沉淀24h后离心得淡红色沉淀物, 热水溶解, 定容, 苯酚-硫酸法测定多糖的含量, 计算多糖得率。

#### 1.3.3 均匀设计试验优化山茱萸多糖的提取条件

选择提取温度、提取时间和料液比三个因素, 以山茱萸多糖的提取得率为考察指标进行三因素八水平的均匀设计试验, 对山茱萸多糖提取条件进行优化。

#### 1.3.4 山茱萸多糖的纯化

取少量粗多糖溶于蒸馏水, 离心, 上清液用DE-52柱层析, 用梯度浓度为0~1mol/L NaCl溶液各250ml进行梯度洗脱, 流速2ml/min, 每管收集10ml, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 分部收集洗脱液, 绘制洗脱曲线。合并单一峰部分, 透析, 浓缩, 用乙醇沉淀, 冷冻干燥, 即得山茱萸多糖。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 标准曲线的制作

精确吸取葡萄糖标准液(浓度: 0.1mg/ml)0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7ml于试管中, 加蒸馏水补至1ml, 加入5%苯酚(冰箱中避光保存)1ml, 摇匀, 迅速加入5ml浓硫酸, 混匀, 室温静置30min。在489nm处测其吸光值。得回归方程 $C=0.09328A+0.00054$ , 相关系数 $R^2=0.99984$ 。

#### 1.4.2 山茱萸多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法<sup>[5]</sup>, 以葡萄糖作标准品, 吸取一定体积的多糖提取液, 按标准曲线的方法测定其吸光值, 根据标准曲线计算出多糖的相对含量。

#### 1.4.3 转换系数的测定

精确称取一定的烘干至恒重的白色山茱萸多糖, 热水溶解定容至一定体积, 按苯酚-硫酸法测定其多糖的

相对含量, 按下式计算转换系数:  $f=W/CD$ 。式中,  $W$ 为称取的山茱萸多糖质量(mg);  $C$ 为多糖相对质量(mg);  $D$ 为多糖溶液的稀释倍数, 测得 $f=4.2$ 。

#### 1.4.4 山茱萸多糖得率的计算

$$\text{多糖得率} = \frac{\text{多糖质量}}{\text{原材料质量}}$$

$$\text{多糖质量} = \frac{\text{多糖的相对含量}}{\text{转换系数}}$$

### 1.5 纯度鉴定

#### 1.5.1 琼脂糖凝胶电泳

胶浓度0.6%, 厚3mm; 上样液为多糖溶液20μl (20mg/ml), 加入少量甘油, 用溴酚蓝作指示剂; 电泳缓冲液为0.075mol/L巴比妥缓冲液(pH8.6); 电压为110V, 电泳2h。染色液0.1%甲苯胺蓝; 脱色液为乙醇:水:醋酸=5:5:0.1。

#### 1.5.2 紫外光谱分析

将烘干至恒重的山茱萸多糖配成一定浓度的溶液, 采用TU-1901双光束紫外可见光光度计在200~400nm范围内扫描。

## 2 结果与分析

#### 2.1 提取温度对山茱萸多糖提取得率的影响

按照提取料液比为1:25, 提取时间为90min, 称取一定量的原材料分别在40、50、60、70、80、90、100℃温度下水浴提取, 计算山茱萸多糖得率, 结果所图1, 在提取温度较低时多糖得率随温度的升高而增加, 超过90℃随温度升高对多糖得率影响不大。90℃时山茱萸多糖的得率已接近最大, 达到132.1mg/g。

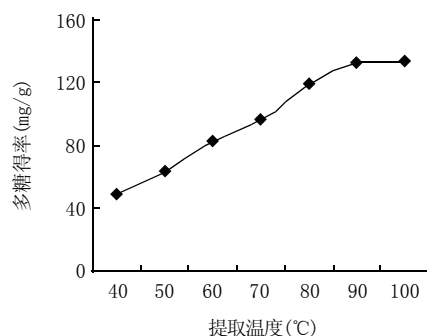


图1 提取温度对山茱萸多糖得率的影响

Fig.1 Effects of temperature on extraction rate of polysaccharides

#### 2.2 提取时间对山茱萸多糖得率的影响

按照提取料液比为1:25, 提取时间为温度为80℃,

称取一定量的原材料分别提取 60、90、120、150、180、210、240min, 计算山茱萸多糖得率, 由图 2 所示, 在提取初期, 随着提取时间的增加山茱萸多糖的得率逐渐提高, 150min 以后多糖得率提高不明显。这可能是由于山茱萸粉碎过细, 多糖很容易提取溶出。

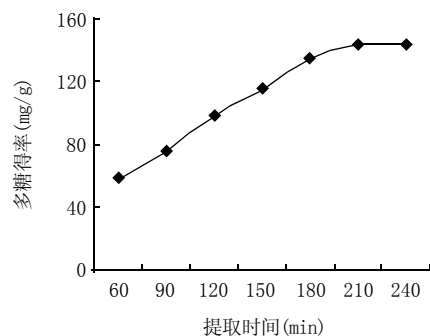


图2 提取时间对山茱萸多糖得率的影响

Fig.2 Effects of time on extraction rate of polysaccharides

### 2.3 料液比对山茱萸多糖提取得率的影响

称取一定量的原材料分别加入 8、16、24、32、40、48 倍体积的蒸馏水, 按照提取温度为 80℃ 提取时间为 90min, 计算山茱萸多糖得率, 由图 3 可以明显看出, 山茱萸多糖得率随水用量增加而增加, 但体积太大时给提取液的浓缩带来麻烦, 所以最佳的料液比是在 1:25 左右。

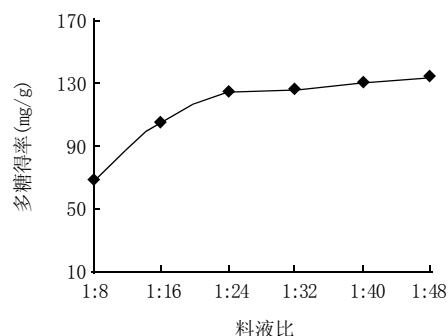


图3 料液比对山茱萸多糖提取得率的影响

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

### 2.4 均匀设计试验

在均匀设计试验中, 考察指标为山茱萸多糖得率, 考查提取温度、提取时间和料液比三个因素, 它们的取值范围分别为: 提取温度  $X_1$ : 40~100℃; 提取时间  $X_2$ : 30~180min; 料液比  $X_3$ : 8~36 倍。根据各因素的取值范围及实验精度要求, 进行三个因素八个水平试验, 设计成水平表 1, 根据  $U_8 \times (8^3)$  均匀设计表设计出试验方案 (见表 2), 采用苯酚-硫酸法测定提取液中多糖的含量, 计算多糖的得率, 结果如表 2。

表1 均匀设计因素水平表

Table 1 Table of uniform design of factors and levels

因素	水平							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$X_1$ (min)	30	50	70	90	110	130	150	180
$X_2$ (°C)	40	48	56	64	72	80	90	100
$X_3$ (次数)	8	12	16	20	24	28	32	36

表2 试验方案及山茱萸多糖的得率

Table 2 Table of test scheme and rate of polysaccharides

处理	因素			
	$X_1$ (min)	$X_2$ (°C)	$X_3$ (次数)	山茱萸多糖得率 (mg/g)
1	30	64	32	86.94
2	50	100	24	129.36
3	70	56	16	52.92
4	90	90	8	68.46
5	110	48	36	100.38
6	130	80	28	136.92
7	150	40	20	65.94
8	180	72	12	93.24

对试验结果利用王玉方的均匀设计软件 2.10, 进行回归分析, 采用后退法 (显著性水平  $\alpha=0.05$ ), 拟建立回归方程:  $y=b(0)+b(1)X(1)+b(2)X(2)+b(3)X(3)$ , 分析结果如下:

回归系数  $b(i)$ :  $b(0)=-98.7$ ;  $b(1)=33.01e-2$ ;  $b(2)=1.37$ ;  $b(3)=2.86$ 。

回归方程对试验进行显著性检验: 样本容量  $N=8$ , 显著性水平  $\alpha=0.05$ , 检验值  $F_t=37.73$ , 临界值  $F(0.05, 3, 4)=6.591$ ,  $F_t > F(0.05, 3, 4)$ , 回归方程显著。

各方方程项对回归的贡献 (按偏回归平方和降序排列):  $U(2)=246$ ,  $U(2)/U=71.7\%$ ;  $U(3)=236$ ,  $U(3)/U=68.7\%$ ;  $U(1)=85.9$ ,  $U(1)/U=25.0\%$ 。

第 1 方程项  $[X(1)]$  对回归的贡献最小, 对其进行显著性检验 检验值  $F(1)=28.32$ , 临界值  $F(0.05, 1, 4)=7.709$ ,  $F(1) > F(0.05, 1, 4)$ , 此方程项显著。

利用网格尝试法对试验条件进行优化, 得出试验的优化条件如下: 最佳提取温度为 100℃, 提取时间为 180min, 料液比 1:36, 预期指标最大值为 199.97 ( $\pm 14.28$ ) mg/g。

### 2.5 验证实验

为了验证优化计算结果的可靠性, 我们选择了  $X_1=100^\circ\text{C}$ ,  $X_2=180\text{min}$ ,  $X_3=1:36$  进行验证实验, 平行操做三份, 第一份的得率是 199.96mg/g, 第二份的得率是 199.30mg/g, 第三份的得率是 197.26mg/g, 平均得率是 199.36mg/g, 与预测值相近, 此均匀设计有意义。

### 2.6 纯化

山茱萸多糖 DE-52 柱层析纯化的洗脱曲线如图 4, 收集 12~25 号管, 透析浓缩至 50ml, 加入 3 倍体积 95%

的乙醇, 离心沉淀, 冷冻干燥得白色的山茱萸多糖。

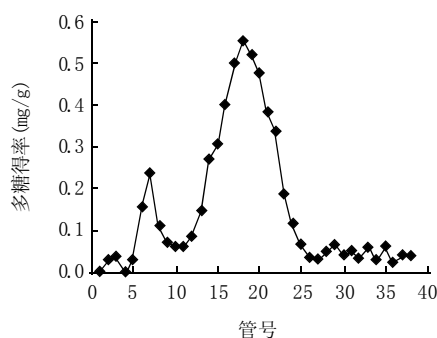


图4 山茱萸多糖 DE-52 洗脱曲线  
Fig.4 Elution curve of *Fructus corni* polysaccharide

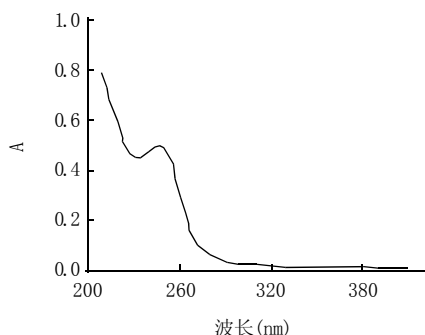


图5 山茱萸多糖的扫描曲线  
Fig.5 Scan curve of *Fructus Corni* polysaccharide in DE-32 chromatography

## 2.7 纯度鉴定

在200~400nm 范围内扫描。结果如图5所示, 在260nm 处、280nm 处无核酸吸收峰和蛋白质吸收峰, 说明其样品中不含核酸和蛋白质。琼脂糖凝胶电泳得到单一区带如图6, 表明纯化的山茱萸多糖为分子大小均一的单一组分多糖。

## 3 结论

### 3.1 通过单因素试验和均匀设计试验对山茱萸多糖的提



图6 山茱萸多糖的琼脂糖凝胶电泳  
Fig.6 Graph of agar gel electrophoresis of *Fructus corni* polysaccharide

取工艺进行研究, 采用均匀设计试验更为合理的对山茱萸中多糖的提取条件进行优化。最佳提取条件为: 料液比为1:36, 提取温度为100℃, 提取时间180min, 山茱萸多糖的得率可达199.36mg/g。

3.2 实验以葡萄糖作为标准品, 采用苯酚-硫酸法测定提取液中多糖的相对含量, 并测定了山茱萸多糖转换系数为4.2。

3.3 利用DE-52 柱层析对山茱萸粗多糖进行纯化, 收集主峰。纯化的山茱萸多糖经紫外光谱分析不含蛋白质和核酸, 琼脂糖凝胶电泳得到单一区带, 表明为分子大小均一的单一组分多糖。为下一步对山茱萸多糖的大规模提取和生物活性研究分析奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] 周京华, 李春生, 李电东. 山茱萸有效化学成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 808-812.
- [2] 杨云, 刘建鑫, 刘翠平, 等. 山茱萸多糖的化学研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(10): 614-616.
- [3] 李平, 王艳辉, 马润宇. 山茱萸多糖提取过程研究[J]. 北京化工大学学报, 2003, 30(1): 13-16.
- [4] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [5] 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, 1999: 11-12.



## 以色列研制新型核果杂种

以色列上加利利地区Ben-Dor水果培育基地于上周研制出两种新型的夏季水果变体——桃杏和红杏(Violet)。

该培育基地称, 这两种新型的栽培变种都是杏树杂种, 表面深红色和独特的香味和味道。桃杏是一种色彩鲜艳的圆形水果, 它的外表有斑点, 肉质曾现黄色, 它是非常多汁的, 并且富含桃和杏两者的香味。

红杏Violet 外表呈现红色, 果肉呈现深红色, 含糖量很高, 品尝起来甜酸适宜。这两种新型水果变体被送到英国的大型连锁店出售, 而且在西欧的其他一些大超市也有出售。