

火棘水溶性多糖的提取及分离纯化

张海生, 段玉峰*, 周 芳, 杨锋
(陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘 要: 本文对火棘水溶性多糖的提取工艺、分离纯化以及纯度鉴定作了研究。结果表明: 火棘多糖的最佳提取工艺为 90℃、9h、料液比为 1:10, 火棘多糖的提取率约为 3.5%; 通过分级沉淀、DE-52 柱层析分离得到 PP-A2、PP-A3、PP-A4 和 PP-B1、PP-B2、PP-B3 六种组分; 经 Sephadex G-200 柱层析鉴定, PP-A2、PP-A3、PP-B2 为均一多糖。

关键词: 火棘; 多糖; 提取; 分离纯化

Extraction, Isolation and Purification of Water-soluble Polysaccharides from *Pyracantha fortuneana*

ZHANG Hai-sheng, DUAN Yu-feng*, ZHOU Fang, YANG Feng
(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The extraction, isolation and purification of water-soluble *Pyracantha fortuneana* polysaccharides were studied. The results indicated that the optimal extraction technology of *Pyracantha fortuneana* polysaccharides were 90℃, 9h and 10:1 (W/W) of water to its fruit. Extraction rate of the polysaccharides was 3.5%. Then through isolating it with fractional precipitation and DE-52 column chromatography, six glycoconjugates, PP-A2, PP-A3, PP-A4, PP-B1, PP-B2 and PP-B3, were obtained. Sephadex G-200 gel filtration chromatography showed that PP-A2, PP-A3, PP-B2 were pure.

Key words: *Pyracantha fortuneana* polysaccharides; extraction; isolation and purification

中图分类号 Q948.6

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)01-0157-05

火棘(*Pyracantha fortuneana* (Maxim.) Li) 果实, 又叫赤阳子、救军粮, 主要分布于我国东南和西南部, 也是秦巴山区主要野生植物之一^[1]。火棘始载于《滇南本草》, 其果实性味干酸, 药用具有健脾消积、生津止

渴、清热解毒、活血止血等功效^[2]。近年来的研究表明火棘果实具有很大的药用和食用开发价值^[3]。有报道火棘果实总提取物具有消除自由基、降血脂、增强免疫力、增强体力和促进消化等作用^[4]。

为了进一步开发火棘野生资源, 我们对秦巴山区产火棘果实中水溶性多糖的提取、分离纯化及纯度鉴定等进行了研究, 为进一步阐明火棘多糖的生物活性及化学结构做了前期工作。

收稿日期 2003-12-15

* 通讯作者

作者简介: 张海生(1965-), 男, 在读博士, 主要从事天然活性成分研究与功能食品开发。

温和等特点, 适合用于蜂胶总黄酮的提取。

蜂胶对心血管疾病、肿瘤、糖尿病、肝病、肠胃病等具有十分明显的医疗保健功效, 作为功能食品资源必将具有十分广阔的开发应用前景。

参考文献:

- [1] 王玉芬. 蜂胶的研究进展[J]. 河北医药, 2002, 24(3): 227-228.
- [2] 黄文诚. 蜂胶的化学成分和生物学活性[J]. 蜜蜂杂志,

1998, (6): 9-10.

- [3] 玄红专, 胡福良. 蜂胶在医学上的应用研究进展[J]. 养蜂科技, 2002, (3): 26-29.
- [4] 齐彦, 郭丽新, 刘丽波, 等. 蜂胶黄酮对小鼠肝脏CAT活性的影响[J]. 中医药学报, 1999, (5): 53.
- [5] 吕泽田, 姜德勇, 田惠争. 蜂胶中黄酮类化合物抑制肿瘤作用的试验与应用[J]. 蜜蜂杂志, 1999, (3): 8-10.
- [6] 韩晋, 蔡光明. 紫外分光光度法对蜂胶提取物中总黄酮含量的测定[J]. 中国民间疗法, 1996, (4): 48.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

火棘(*Pyracantha fortuneana*(Maxim.)Li)果实,采自秦巴山区镇巴县;DE-52, Sigma 公司;Sephadex G-200, Pharmacia 公司;LSA 大孔吸附树脂, 西安蓝深交换吸附材料有限公司。

1.2 主要仪器设备

DHL-A 电脑恒流泵 上海沪西分析仪器厂; DBS-100 电脑全自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂; 层析柱(2.5 × 45cm 和 1.1 × 120cm); RE-52A 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 真空冷冻干燥器 南京产 TU-1901 UV-VIS Spectrophotometer 北京普析通用仪器有限公司; DPS 数据处理系统 浙江大学。

1.3 火棘水溶性多糖的提取、分离纯化工艺路线

新鲜火棘果实→60℃烘干→粉碎过筛(40目)→石油醚脱脂两次→热水提取→减压浓缩→脱蛋白→脱色→乙醇分级沉淀→冷冻干燥→火棘粗多糖→DE-52(CI-型)柱层析分离→透析、浓缩→乙醇沉淀→冷冻干燥→火棘多糖组分→纯度鉴定

1.4 试验方法

1.4.1 火棘水溶性多糖的提取

称取火棘粉末,加石油醚(70~90℃)回流脱脂两次,回收石油醚,固形物中加入热水于水浴中浸取,提

取液经减压浓缩、乙醇沉淀、冷冻干燥得火棘粗多糖。

1.4.2 分离纯化

将火棘粗多糖溶解后脱蛋白、脱色、分级沉淀得火棘多糖 PP-A 和 PP-B,对 PP-A、PP-B 进行 DE-52(CI-型)柱层析(2.5 × 45cm),得到不同组分。

1.4.3 纯度鉴定^[5]

采用 Sephadex G-200 凝胶柱层析(1.1 × 120cm)进行纯度鉴定。

1.4.4 多糖含量测定

多糖含量测定采用硫酸-苯酚法^[6]。

2 结果与分析

2.1 火棘水溶性多糖的提取

根据单因素初步试验,影响火棘多糖提取率的主要因素有提取温度、时间、料液比等,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计(表 1),利用 DPS 数据处理系统进行方差分析(表 2),确定最佳的提取工艺。

由表 1 的极差分析结果表明各因素对火棘多糖提取率影响的顺序为:温度 > 时间 > 料液比;表 2 的方差分析结果可见,温度对提取率的影响极显著,其次是时间、料液比。最优水平组合为 $A_3B_3C_2$,即在 90℃,提取 9h,料液比为 1:10,火棘多糖的提取率约为 3.5%。

2.2 分离纯化

表1 火棘多糖最佳提取条件试验设计及结果

Table 1 Result and orthogonal of extract condition of polysaccharides from *Pyracantha fortuneana*

试验号 Experiment No.	因素 Factors				提取率(%) Extraction rate(%)
	温度Temperature(℃)	时间Time(h)	料液比 The ratio of solid to Solution		
	A	B	C	D	
1	1(70)	1(5)	1(1:8)	1	1.82
2	1	2(7)	2(1:10)	2	2.18
3	1	3(9)	3(1:12)	3	2.53
4	2(80)	1	2	3	2.63
5	2	2	3	1	2.92
6	2	3	1	2	2.97
7	3(90)	1	3	2	3.15
8	3	2	1	3	3.25
9	3	3	2	1	3.47
K ₁	6.53	7.60	8.04	8.21	
K ₂	8.52	8.35	8.28	8.30	
K ₃	9.87	8.97	8.60	8.41	
k ₁	2.1767	2.5333	2.6800	2.7367	
k ₂	2.8400	2.7833	2.7600	2.7667	
k ₃	3.2900	2.9900	2.8667	2.8033	
极差 R	1.1133	0.4567	0.1867	0.0667	
调整R'	1.0027	0.4113	0.1681	0.0600	

表2 正交设计方差分析(完全随机模型)
Table 2 Analysis of orthogonal experiment

变异来源 Origin of variance	平方和 Sum of square	自由度 Freedom	均方 Mean Square	F 值 F. value	显著水平 Prominence Level
A	1.8820	2	0.9410	281.3654	0.0035**
B	0.3138	2	0.1569	46.9070	0.0209**
C	0.0526	2	0.0263	7.8671	0.1128
D *	0.0067	2	0.0033		
误差(error)	0.0067	2	0.0033		
总和(Total)	2.2551				

2.2.1 脱蛋白

植物粗多糖中一般都含有蛋白质, 主要以游离态和结合态的形式存在。将粗多糖完全溶解后分别用 Sevag 法、酶法、蛋白酶-Sevag 法进行了脱蛋白试验, 并利用紫外扫描比较了各方法的效果。

2.2.1.1 Sevag 法^[7]

用 Sevag 法连续操作多次, 直至下层氯仿溶液无混浊出现。然后对多糖溶液进行 200~400nm 紫外扫描, 结果如图 1。可见 260~280nm 处有一小的蛋白特征吸收峰。由于 Sevag 法主要用于植物多糖中游离蛋白的脱除, 而对结合蛋白的脱除效果不理想, 表明火棘粗多糖中含有部分结合蛋白。

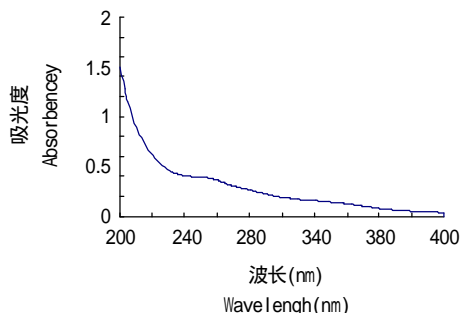


图1 Sevag法脱蛋白后多糖溶液的紫外图谱

Fig.1 UV spectrum of polysaccharide deproteinated with Sevag method

2.2.1.2 酶法脱蛋白

测得多糖溶液的 pH 为 5.6, 故浓缩后选用木瓜蛋白酶 1% (W/V), 60℃ 酶解 3h 后进行紫外扫描(图 2)。图 2 中的 260~280nm 处仍有一蛋白特征吸收峰, 而且较图 1 更为显著, 这是因为火棘果实中蛋白含量本身比较低^[8], 使用酶法脱蛋白的同时, 引入了外来蛋白质—酶, 使得蛋白质含量有一定的增加。

2.2.1.3 蛋白酶-Sevag 法脱除蛋白

先加入 1% 木瓜蛋白酶, 60℃ 酶解 3h 后利用 Sevag 法连续处理至无浑浊出现, 结果见图 3。图 3 中无蛋白质的特征吸收峰, 表明蛋白质已脱除。

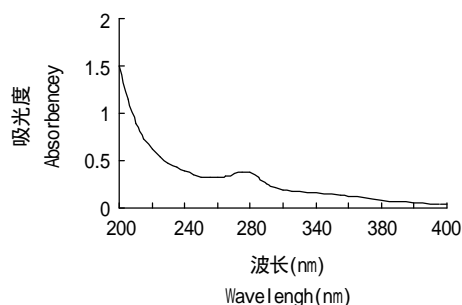


图2 酶法脱蛋白后多糖溶液的紫外图谱

Fig.2 UV spectrum of polysaccharide deproteinated by enzyme

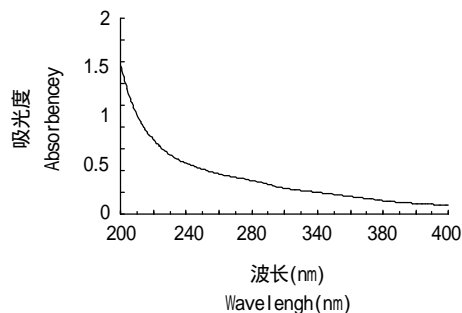


图3 蛋白酶-Sevag法脱蛋白后的紫外图谱

Fig.3 UV spectrum of polysaccharide deproteinated with enzyme-Sevag method

2.2.2 脱色

脱除蛋白质的火棘多糖溶液有较深的颜色, 为了进一步对其进行纯化, 分别用大孔吸附树脂 LSA-8、LSA-800、LSA-800B 进行柱层析(1.0 × 30cm)脱色, 用水、0.1、0.25、0.5、1.0mol/L NaCl 溶液梯度洗脱。结果表明 LSA-8 对火棘多糖具有很好的脱色作用, 其洗脱曲线见图 4。图 4 中的洗脱峰为水洗脱物, 回收洗脱物所得多糖无色, 回收率为 72.3%。可见 LSA-8 对火棘中色素有很好的吸附作用, 而对多糖几乎无吸附作用。

2.2.3 分级沉淀

分别用 1.5 倍、5 倍体积的乙醇沉淀经脱蛋白、脱色的火棘粗多糖溶液, 冷冻干燥得火棘多糖 PP-A、PP-B。

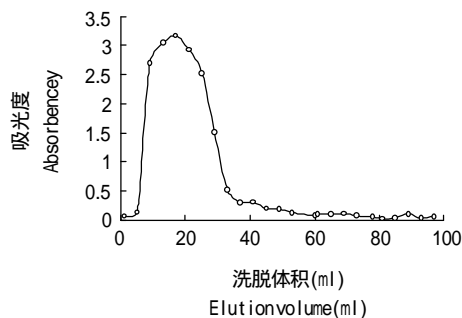


图4 LSA-8层析脱色洗脱曲线

Fig.4 Elution chromatogram of polysaccharide on LSA-8

2.2.4 DE-52 柱层析分离

采用DE-52(CI-型)柱层析(2.5×45cm),对火棘多糖PP-A、PP-B分别进行分离纯化。使用不同浓度的NaCl、Na₂SO₄、NaOH分别进行洗脱试验,结果表明依次使用水、0.2mol/L NaCl、0.4mol/L NaCl、0.5mol/L NaOH溶液洗脱可获得PP-A的分离组分PP-A1(峰I)、PP-A2(峰II)、PP-A3(峰III)、PP-A4(峰IV);依次使用水、0.3mol/L NaCl、0.3mol/L NaOH溶液洗脱可获得PP-B的分离组分PP-B1(峰I)、PP-B2(峰II)、PP-B3(峰III)。分离效果分别见图5和图6。

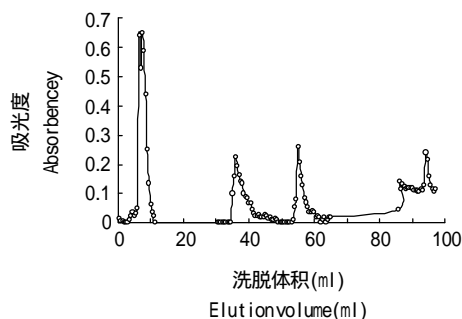


图5 DE-52分离火棘多糖PP-A柱层析图谱

Fig.5 Elution chromatogram of PP-A on DE-52

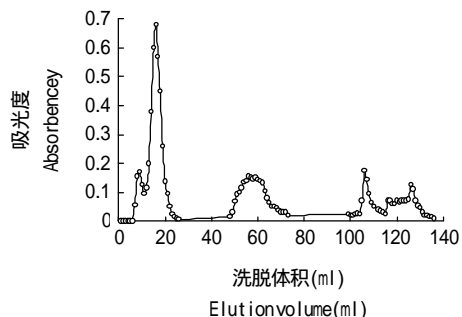


图6 DE-52分离火棘多糖PP-B柱层析图谱

Fig.6 Elution chromatogram of PP-B on DE-52

收集各个分离组分,浓缩、透析、醇沉、冻干得火棘多糖PP-A2、PP-A3、PP-A4、和PP-B1、PP-

B2、PP-B3,而PP-A1经浓缩后,加入乙醇无沉淀生成,表明这部分可能是小分子糖;各组分含量分布为PP-A2:PP-A3:PP-A4为7:8.6:1,PP-B1:PP-B2:PP-B3为1:2.4:2.6。

2.3 纯度鉴定

利用Sephadex G-200凝胶过滤层析(1.1×120cm),以0.1mol/L NaCl为洗脱液,对火棘多糖的DE-52分离组分进行了纯度鉴定。结果PP-A2、PP-A3和PP-B2得到了对称单一峰(图7),表明其为均一多糖。

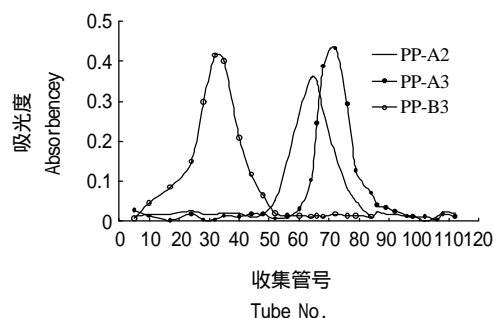


图7 PP-A2、PP-A3、PP-B2在Sephadex G-200柱上的洗脱曲线

Fig.7 Elution curve of PP-A2,PP-A3,PP-B2 on Sephadex G-200

3 结论

通过正交试验获得了火棘水溶性多糖的最佳提取条件是:90℃,9h,料液比为1:10;最佳提取条件下的多糖提取率为3.5%。

最适合火棘多糖脱蛋白的方法是蛋白酶-Sevag法;从三种LSA大孔吸附树脂中选择出了LSA-8作为良好的脱色材料。

为了能更准确判断火棘多糖的纯度,本试验采用了1.1×120cm Sephadex G-200凝胶柱层析,并对其性能作了简单测试:利用0.1mol/L NaCl为洗脱液,流速控制在1ml/6min,可实现Dextran T-40与Dextran T-70的良好分离效果。可见,本文纯度鉴定的结果是可信的。

火棘多糖经分离纯化获得PP-A2、PP-A3和PP-B2三种均一组分,其它组分尚待进一步纯化。

参考文献:

- [1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志第1卷, 种子植物(第二册)第一版[M]. 北京: 科学出版社, 1974. 495-497.
- [2] HOU J J(侯建军), QIN H B(覃红斌), WEI W K(魏文科). Analysis and evaluation on nutritive composition of Pyracantha fortuneana fruit in different producing areas[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2003, (2): 83-85.
- [3] HOU J J(侯建军), WEI W K(魏文科), ZHANG H(张宏).

滑菇多糖制备的研究

李海平^{1,2}, 王 硕²

(1. 天津科技大学食品与生物工程学院, 天津 300222, China

2. 天津商学院食品科学与生物工程系, 天津 300134, China)

摘 要 本文采用酶法制备滑菇多糖(Pholiot Nameko Polysaccharide, PNP), 确定了制备的最佳工艺。加酶(纤维素酶和中性蛋白酶)酶解后, 热水浸提, 再用 seavage 法除去蛋白, 95% 的乙醇醇析得到滑菇多糖的纯化物。

关键词: 滑菇多糖; 工艺; 测定方法

Research on Preparation of Nameko Polysaccharide

LI Hai-ping^{1,2}, WANG Shuo²

(1. Department of Food and Biological Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China 2. College of Food and Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: This paper mainly investigated the preparation, purification and determination of Pholiot nameko polysaccharide (PNP). The optimum processing of the PNP was introduced. The process was as follows: Neutral proteinase and water were mixed with Pholiot nameko and kept in certain temperature and extracted by hot water. The protein in crude polysaccharide was removed by seavage method and purified with 95% ethanol.

Key words: namko polysaccharide; process; method of determination

中图分类号: Q538

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)01-0161-04

多糖是自然界中含量最丰富的一种生物聚合物, 几乎存在于所有的生物中。具有能量储存、结构支持、防御和抗原决定性等功能。多糖是来自于高等植物、动物细胞膜、微生物细胞壁中的天然大分子物质, 是所有生命体的重要组成成分与维持生命所必须的结构材料^[1]。多糖是一类非特异性的免疫增强剂, 对肿瘤有一定的辅助治疗作用, 可增强免疫活性细胞和杀瘤效应细胞

的活性^[2]。能明显调节 T、B、CTL、NK 和 M ϕ 等细胞的功能, 促进 Ig 类抗体含量提高; 能促进 IL-2 的产生和 IL-2 R 的表达, 诱导 IL-6 和 TNF 的产生^[2~4]。1970 年 Chihara 首先从香菇子实体中浸提出 6 种香菇多糖, 并证明其中一种具有明显的抗肿瘤作用^[1], 从此各国学者开始了从食用菌中寻找抗肿瘤药物的研究。到目前为止, 已有 300 多种多糖类化合物被分离提取出来, 已发现 100 多种具有免疫促进作用^[2]。

滑菇(Pholiota nameko), 又名真珠菇、滑子蘑, 担子菌纲, 散菌目, 盖球菇科, 磷伞属。滑菇因菌盖

收稿日期: 2003-12-03

作者简介: 李海平(1974-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事乳品科学研究。

Advances on the research of *Pyraacantha fortuneana* (Maxim.) Li and its products[J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities (Natural Science Edition), 2002, 20(1): 23-26.

[4] CHAI L (柴立), ZHENG Y Y (郑亚玉), XIE B Z (谢宝忠), et al. Research of nutritive composition and health care effect of *Pyraacantha fortuneana* fruit[J]. JGCTCM, 1988, (1): 39.

[5] 谭仁祥, 等. 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

76-78.

[6] Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and substance[J]. Anal Chem, 1956, 28: 350-356.

[7] Staub A M. Removal of proteins - Sevag method[J]. Methods in Carbohydr Chem, 1965, (5): 5-6.

[8] LI M L (李孟楼), GUO X R (郭新荣), WANG Q (王倩). Analysis of ingredients of *Pyraacantha fortuneana* fruit[J]. Shaanxi Forest Science and Technology, 1998, (1): 9-12.