

麦冬多糖精制方法的比较

刘吉华, 余伯阳

(中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038)

Comparison of the preparation methods of polysaccharide from *Ophiopogon japonicus* LIU Ji-hua, YU Bo-yang (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(3): 55-57

Abstract: Five preparation methods were used to purify the crude polysaccharide which was the co-products of preparation saponin from *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. The results indicate that the method of enzyme hydrolysis could purify the crude polysaccharide efficiently. The content of polysaccharide is more than 85% and could be used as the foods and medicine raw material. Advanced test showed that the polysaccharide is mainly consist of glucose, fructose, xylose, rhamnose and galactose.

关键词: 麦冬多糖; 制备方法; 精制

Key words: polysaccharide of *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl.; preparation methods; purify

中图分类号: Q539 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)03-0055-03

多糖具有调节免疫功能、抗肿瘤、抗病毒、降低血糖等广泛的生理功能^[1-3]。麦冬 [*Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl.] 是常用滋阴中药, 临床上用于热病伤津、心烦口渴等症, 麦冬多糖和麦冬皂苷是其主要有效成分, 麦冬多糖具有增强免疫、平喘、抗过敏、降血糖等作用^[4-6]。在工厂化提取麦冬皂苷的过程中, 能获得大量的麦冬粗多糖副产品。但在提取麦冬皂苷过程中需要长时间的煮沸处理, 而多糖类物质在煮沸过程中会发生水解、与蛋白质类物质聚合等反应^[7], 使麦冬粗多糖很难进一步精制, 目前多数仍被废弃, 造成资源的极大浪费。本文比较了反复醇沉法、加热沉淀法、三氯醋酸法、Sevage 法和酶解脱蛋白法对麦冬粗多糖的精制效果, 对麦冬的综合利用及资源保护具有一定的意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

麦冬粗多糖为中国药科大学中药复方研究室制备的麦冬皂苷工厂中试副产品; 木瓜蛋白酶: 武汉中健科技发展有限公司产品; 胃蛋白酶为 AMRESCO (1:3 000) 产品; 葡萄糖、果糖、木糖、鼠李糖、半乳糖对照品: SIGMA 公司产品; 重蒸醋苯酚: 南京生兴生物技术有限公司产品; 其余均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的制备和多糖含量测定方法^[8] 精密称取 105℃ 干燥恒重的标准 D-葡萄糖约 50 mg, 加重蒸馏水溶解, 定容至 100 mL, 精密吸取 1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL, 分别定容至 50 mL, 用于制备标准曲线。精密吸取上述溶液各 2.0 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL 混匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 充分混匀, 冰浴 5 min, 然后沸水浴加热 20 min, 流水中冷却至室温, 于 490 nm 处测定其光吸收值, 以重蒸水为空白对照。数据经直线回归分析, 得回归方程 $A = 6.65 \times 10^{-3} B -$

0.002 2, 相关系数 $r = 0.999 0$ 。多糖含量测定参照文献[8]方法进行, 标准曲线随行。

1.2.2 醇沉法 取麦冬总多糖 50 g, 加热溶解于 500 mL 水中, 静置过夜, 离心去沉淀。上清液以不同浓度乙醇沉淀, 静置过夜, 离心获得多糖沉淀。分别以不同浓度乙醇反复沉淀 3 次, 沉淀以 50℃ 的 70% 热乙醇洗涤沉淀去单糖, 再以丙酮洗涤, 减压干燥得麦冬多糖。

1.2.3 加热沉淀法 取麦冬粗多糖 9 份(各 10 g), 分别溶于 100 mL 水中, 各取 3 份分别调节 pH 值为 5.0、7.0 和 9.0, 分别煮沸 20、40 和 60 min, 静置过夜, 离心去沉淀。上清液以 80% 乙醇终浓度醇沉, 沉淀以 50℃ 的 70% 热乙醇洗涤沉淀去单糖, 再以丙酮洗涤, 减压干燥得麦冬多糖。

1.2.4 三氯醋酸法 参照文献[9, 10]并作适当调整。取麦冬多糖 10 g 溶于 100 mL 蒸馏水中, 离心去沉淀, 向多糖液中滴加 10% 的 TCA 至终浓度为 1%, 混匀, 沉淀, 离心去沉淀, 加乙醇至终浓度 80% 沉淀。以 50℃ 的 70% 乙醇洗涤沉淀去单糖, 再以丙酮清洗, 减压干燥得麦冬多糖。

1.2.5 Sevage 法 取麦冬多糖 10 g 溶于 100 mL 蒸馏水中, 离心去沉淀, 按文献[11]方法进行脱蛋白, 反复脱蛋白 3 次。所得沉淀以 50℃ 的 70% 乙醇洗涤沉淀去单糖, 再以丙酮洗涤, 减压干燥得麦冬多糖。

1.2.6 酶解制备法 参照文献[12, 13]并作适当调整。取麦冬总多糖 50 g, 加热溶解于 500 mL 水中, 静置过夜, 离心去沉淀。上清液分别调节 pH 至 2.5 和 5.5, 加入 1% 的胃蛋白酶或 1% 木瓜蛋白酶, 35℃ 水解 2 h, 然后煮沸 5 min, 静置过夜, 离心去沉淀。上清液以终浓度 80% 乙醇沉淀。50℃ 的 70% 乙醇洗涤沉淀去单糖, 再以丙酮洗涤, 减压干燥得麦冬多糖。

收稿日期: 2003-05-28

作者简介: 刘吉华(1969-), 男, 江苏句容人, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药生物技术研究。

1.2.7 麦冬总多糖单糖组成分析 参照文献[14]进行。称取麦冬总多糖 0.1 g, 加入 1 mol/L 硫酸 15 mL, 100℃水浴回流 10 h, 以碳酸钡调节 pH 至 7.0, 过滤, 减压浓缩至干。样品及多糖对照品(D-葡萄糖、D-果糖、D-木糖、L-鼠李糖和半乳糖)分别以 70% 甲醇溶解。以 $V(\text{丙酮}):V(\text{水})=9:2$ 和 $V(\text{正丁醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{水})=8:1:2$ 作展开剂, 2 次展开, 苯胺-邻苯二甲酸显色或 365 nm 荧光检测。

2 结 果

2.1 醇沉法精制麦冬多糖

对麦冬粗多糖以不同乙醇终浓度反复醇沉 3 次, 所得麦冬多糖含量见表 1。结果表明, 用不同浓度的乙醇反复醇沉难以对麦冬粗多糖进行精制, 其原因可能由于在提取麦冬皂苷的过程中长时间的加热煮沸, 使其中的蛋白质和多糖等物质在高温处理过程中发生聚合作用, 在反复醇沉的过程中蛋白质等杂质始终与多糖共同沉淀, 因此醇沉法不能有效去除多糖中的杂质。

表 1 乙醇浓度对醇沉法精制的麦冬总多糖含量的影响

Table 1 The effect of ethanol concentration on the content of total polysaccharide of *Ophiopogon japonicus* (Thumb.) Ker-Gawl. purified by ethanol precipitation

乙醇终浓度 Finally concentration of ethanol (%)	多糖含量 Content of polysaccharide (%)
50	45.5
60	46.0
70	48.0
80	45.0

2.2 加热沉淀法精制麦冬多糖

用加热沉淀法精制麦冬多糖, 结果见表 2。不同的 pH 条件下加热沉淀去除多糖中的杂质是中药中多糖精制的常用方法之一, 对于经长时间高温处理的麦冬粗多糖, 由于多糖与蛋白质等物质的聚合作用, 在调节 pH 值除去杂质时, 与之聚合的多糖也同时被除去, 因此不能有效精制麦冬多糖。

表 2 不同 pH 值对加热沉淀法精制的麦冬总多糖含量的影响

Table 2 The effect of pH on the content of total polysaccharide of *Ophiopogon japonicus* (Thumb.) Ker-Gawl. purified by boiling

加热时间(min) Boiling time	溶液 pH 值 pH value of solution	多糖含量(%) Content of polysaccharide
20	5.0	46.0
	7.0	38.7
	9.0	47.5
40	5.0	47.3
	7.0	45.3
	9.0	47.5
60	5.0	45.1
	7.0	45.2
	9.0	40.9

2.3 三氯醋酸法精制麦冬多糖

用三氯醋酸法精制的麦冬多糖, 其多糖含量为 64.3%。表明该方法可有效精制麦冬多糖。其原因可能是在酸性条件下, 与麦冬多糖聚合的蛋白质等杂质被部分水解, 三氯醋酸使蛋白类杂质变性而除去, 从而提高多糖含量。

2.4 Sevage 法精制麦冬总多糖

用 Sevage 法精制麦冬总多糖, 其多糖含量为 50.0%。

2.5 酶水解法制备麦冬多糖

分别以胃蛋白酶和木瓜蛋白酶水解蛋白, 精制麦冬总多糖, 经测定多糖含量分别为 86.3% 和 85.5%, 表明酶水解法对麦冬粗多糖具有良好的精制作用。这是由于蛋白酶水解了多糖-蛋白复合物中的蛋白类成分, 除去了粗多糖中的蛋白等杂质, 从而提高了麦冬多糖含量。

2.6 麦冬多糖的主要组成

TLC 检测结果显示, 制备的麦冬总多糖主要由葡萄糖、果糖、木糖、鼠李糖和半乳糖组成, 与文献报道一致^[7]。

3 讨 论

植物多糖的精制一般是通过调节等电点、加热沉淀或反复醇沉等方法去除多糖中的蛋白质等杂质, 来提高产品中多糖的含量^[1,2,7,14]。本研究的结果表明, 对经过长时间高温处理后的麦冬多糖副产品, 由于蛋白质与多糖等物质在高温处理过程中可能产生聚合作用, 通过醇沉淀法和加热沉淀法难以精制。其原因主要为这 2 种多糖精制方法只能除去游离的蛋白质等杂质, 而不能有效除去蛋白质-多糖聚合物中的蛋白质等杂质。

三氯醋酸法和 Sevage 法对麦冬粗多糖的精制具有较好的效果, 但是由于三氯醋酸具有很强的腐蚀性, 且难以在产品中彻底去除, 所制备的多糖一般不适于作为食品和制药的原料。而 Sevage 法只适于在实验室中制备少量多糖, 不能用于大规模麦冬总多糖的制备。

胃蛋白酶或木瓜蛋白酶水解法对麦冬粗多糖具有良好的精制效果, 木瓜蛋白酶和胃蛋白酶的来源广泛, 价格低廉, 反应条件温和, 且在生产中使用的多为粗酶制剂, 其生产成本可进一步降低。蛋白酶易于通过加热沉淀去除, 即使有少量残留对人体也是安全的, 精制后的麦冬多糖可以作为多糖类药物和食品的原料。

参考文献:

- [1] 黄芳, 蒙义文. 活性多糖的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 90-98.
- [2] 方积年. 多糖研究的现状[J]. 药学学报, 1986, 21(12): 944-950.
- [3] 周 颀, 蒙义文. 多糖及其衍生物抗病毒作用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(1): 82-90.
- [4] 余伯阳, 殷红霞, 张春红, 等. 麦冬多糖的免疫活性研究[J]. 中

- 国药科大学学报,1991,22(5):286-288.
- [5] 张卫星,王乃华. 麦冬多糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠高血糖的降低作用[J]. 中草药,1993,24(1):30-31.
- [6] 陈卫辉,钱华,王惠中. 麦冬多糖对正常和实验性糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 中国现代应用药学杂志,1998,15(4):21-23.
- [7] 汤军,黄琦,徐志瑛,等. 麦冬多糖的提取分离与初步分析[J]. 浙江中医学院学报,1999,23(1):59-60.
- [8] 张维杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999. 11-12,73-75.
- [9] 盛家荣,曾令辉,翟春,等. 多糖的提取、分离及结构分析[J]. 广西师范学院学报(自然科学版),1999,16(4):49-54.
- [10] 章银良,李红旗,高峻,等. 螺旋藻多糖提取新工艺的研究[J]. 食品与发酵工业,1999,25(2):15-18.
- [11] Whistler R L. *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Vol. 1)[M]. New York and London: Academic Press, 1965. 23.
- [12] 张欣,韩增华,孔祥辉,等. 酶法提取香菇柄多糖[J]. 生物技术,1999,9(1):21-24.
- [13] 徐建祥,晏志云,赵谋明,等. 酶法脱蛋白技术用于螺旋藻多糖提取工艺的研究[J]. 食品与发酵工业,1998,24(3):24-28.
- [14] 陈春英,丁玉强,Elmahadi E A,等. 碱液提取箬叶多糖的纯化及其结构性质的研究[J]. 生物化学与生物物理进展,1999,26(1):51-55.

《林产化学与工业》2004年征订启事

《林产化学与工业》是由中国林学会林产化学化工分会、中国林科院林产化学工业研究所主办,为全国林产化工行业唯一的学术类季刊。报道范围是可再生的木质、非木质森林资源化学与加工利用。主要为木材化学与制浆造纸,松香、松节油化学和利用,生物质原料热解及活性炭,植物纤维原料水解及其产物,植物多酚化学和利用,林产香料、油脂、药物和生物活性物质、树木寄生产物以及其他森林天然产物的化学和加工利用;现代生物技术及其在林产化学与工业中的应用;林产化学工业的环境保护、资源保护和可持续发展、经济和企业管理的发展战略、规划和经验总结等。

本刊自1981年创刊以来即先后被美国《CA》、美国《EI》、英国《CAB Abstracts》、英国《FPA》、俄罗斯《PKJ》、日本《科学技术文献速报》、《中国林业文摘》、“中国期刊网”全文检索数据库、“中国科学引文数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”、“万方数据——数字化期刊群”、中文科技期刊数

据库、中国核心期刊数据库等10多种大型数据库收录。1989年起被中国科技信息研究所列为核心期刊。2001年首批进入“中国期刊方阵”,被评为“双效期刊”;2002年连获江苏省“双十佳期刊”、华东地区优秀期刊和国家林业局优秀期刊二等奖等3项奖。

本刊为季刊,刊号:ISSN 0253-2417, CN32-1149/S;国内外公开发行,国内邮发代号:28-59;国外发行代号:Q5941(国外总发行:中国国际图书贸易总公司,北京399信箱)。季末月底出版,大16开,正文88页,定价:每期8.00元,全年32.00元。也可直接汇款至编辑部订阅。地址:江苏南京市锁金五村16号 林产化工研究所内;邮编:210042;银行信汇:中国林业科学研究院林产化学工业研究所 4301012509001028549 工商银行南京板仓分理处;电话:025-5482493;传真:025-5413445;E-mail: lchx@chinajournal.net.cn; 网址: <http://lchx.chinajournal.net.cn>