

文章编号: 1673 1689(2011)01-0090-05

五味子多糖的提取及分离

丛娟, 宫莉, 闫小娟

(长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012)

摘要: 五味子是 1 种具有广阔开发前景的传统中药材。实验中, 以五味子为原料, 利用水提醇沉法得到了五味子粗多糖。在料液质量体积比为 1 g: 32 mL, 浸提温度 99 °C, 提取时间 4 h 的适宜的提取工艺条件下, 粗多糖的提取率达 5.61%。采用酶法与 Sevag 法联用脱除粗多糖中蛋白质效果较好。利用凝胶色谱柱层析法对多糖半纯品进行分级分离, 得到了两种多糖 I 和 II。经薄层色谱分析, 初步确定了两种多糖的单糖组成, 又通过红外光谱分析, 证明多糖 I 可能为 α -呋喃糖, 多糖 II 可能为 β -吡喃糖。

关键词: 五味子; 多糖; 提取; 分离

中图分类号: O 629. 12

文献标识码: A

Separation and Extraction of Polysaccharide from *Schisandra chinensis*

CONG Juan, GONG Li, YAN Xiaojuan

(School of Chemical & Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

Abstract: In this manuscript, the optimum conditions of polysaccharide purify from *Schisandra*, a kind of broad development prospect of traditional Chinese herbal medicines, were determined. *Schisandra* polysaccharide was extracted by using water extraction and alcohol precipitation and the optimum extraction parameters listed as follows: the ratio of solid-liquid was 1 g: 32 mL, extraction temperature was 99 °C, extraction time was 4 h. With the optimum conditions, the extraction rate of crude polysaccharide could reach at 5.61%. furthermore, the protein of crude polysaccharide was removed by using enzymatic and savage method to eliminate. Semipure polysaccharide was graded and separated by gel column chromatography, two kinds of polysaccharide I and II obtained. After thin layer chromatography analysis, the composition of polysaccharides was preliminary identified, through infrared spectroscopy analysis, polysaccharide I and II were identified as α -Furan sugar and β -pyranose, respectively.

Key words: *Schisandra chinensis*, polysaccharide, extraction, separation

五味子是一种开发前景非常广阔的药食兼用的中药材。以五味子的干燥果实炮制成中药, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心等功效, 用于肺喘虚咳, 心悸失眠诸病^[1]。作为一种传统的中药材, 五

味子应用历史悠久, 历代均有养五脏、除热、补虚劳等记载^[2]。

国内外对五味子的研究多集中在脂溶性成分方面, 从五味子中分离得到的木脂素类单体化合物

收稿日期: 2010-05-04

基金项目: 吉林省科技厅科技发展重大计划项目(20096021)。

作者简介: 丛娟(1962-), 女, 吉林通化人, 实验师, 主要从事细胞生物学研究。Email: congjuan@ccut.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

有近 40 种。五味子多糖是从五味子干燥成熟果实中提取的总多糖,具有保肝、抗疲劳、抗衰老、增强免疫等功效^[3]。但时至今日,五味子多糖的提取与分离纯化技术还很不成熟,结构分析不够细致,生理功能研究也不够深入。

作者针对五味子多糖的提取工艺进行了研究,采用正交实验对提取工艺条件进行了优化,并采用 Sevag 法结合酶法以及柱色谱法分离纯化得到了纯品多糖,并初步解析了其结构。

1 材料与方法

1.1 实验材料、仪器和试剂

实验材料:购自吉林省通化市,产地为长白山地区。

主要仪器:PC202-S 型电子分析天平,RE-52C 型旋转蒸发仪,LGJ-10 型冷冻干燥机,WFZU V-2602 型紫外可见分光光度计,DH P120 型恒温摇床,AVATAR-360 型红外光谱仪等。

主要试剂:乙醇、三氯甲烷、苯酚、硫酸、活性炭等,均为分析纯,木瓜蛋白酶为生化试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 五味子粗多糖的提取

称取一定量五味子干燥果实,粉碎,用无水乙醇索氏回流脱脂,干燥。加入一定量水,在一定温度下进行热水浸提。过滤,提取液减压浓缩,再用体积分数 95%乙醇醇析,离心收集沉淀。沉淀分别用丙酮、乙醚和无水乙醇洗涤,冻干得五味子粗多糖。称重,计算多糖提取率。考查提取工艺条件的改变对多糖提取率的影响,再进行正交实验,优化提取五味子粗多糖的工艺条件。

1.2.2 粗多糖的分离纯化

1) 蛋白质脱除 按文献[4],采用酶法与 Sevag 法联用脱蛋白质。

2) 活性炭脱色 将脱蛋白后的多糖液水浴加热到 80℃,加入已活化的活性炭,搅拌 20 min,过滤,用蒸馏水多次洗涤,滤液浓缩干燥。

3) 凝胶层析柱分离:采用 Sephadex G-75 和 Sephadex G-100 凝胶柱层析。

将除蛋白质并脱色后的多糖溶于蒸馏水中,转入层析柱,用 0.05 mol/L NaCl 溶液洗脱,每一管收集 1 mL 洗脱液。用苯酚-硫酸法检测多糖含量,绘制洗脱曲线。

1.2.3 五味子多糖的检测

1) 多糖质量浓度的测定 采用苯酚-硫酸法测定多糖的质量浓度。

以葡萄糖为标准品,按文献[5]的方法制作标准曲线,绘制的标准曲线如图 1 所示,其回归方程为: $A = -0.01213 + 8.90333C$, $r = 0.99463$ 。

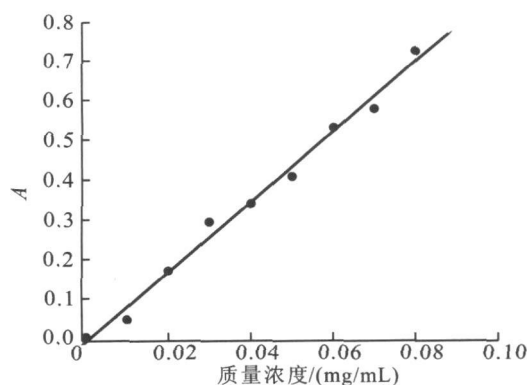


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

准确称取 20.0 mg 多糖粗品溶于水,定容于 250 mL 容量瓶中,按苯酚-硫酸法测吸光度,利用标准曲线按下式计算多糖提取率^[4]。

$$x(\%) = \frac{m_2 \times C \times 250}{20 \times m_1} \times 100$$

x : 多糖提取率(%); m_1 : 称取干燥五味子的质量(g); m_2 : 由 m_1 中提取的多糖粗品质量(g); C : 由回归方程计算所得多糖的质量浓度(mg/mL)。

2) 单糖组分的测定:以 V (氯仿): V (甲醇): V (水) = 16: 9: 2 的混合液为展开剂,苯胺-二苯胺-一磷酸混合液为显色剂,采用硅胶 G 薄板对各种标准单糖溶液和酸解后多糖水解液进行薄板色谱分析,根据标准糖的颜色和 R_f 值鉴定出样品中单糖的种类。

3) 多糖的红外光谱检测:取纯化后的多糖,进行 KBr 压片,用傅立叶变换红外光谱仪测定其红外光谱图。

2 结果与讨论

2.1 物料比对粗多糖提取率的影响

按 1.2.1 的操作,在 90℃ 的浸提条件下,分别以不同的料液质量体积比(详见表 1)浸提 5 h,提取液浓缩至原体积的 1/5,用浓缩液 5 倍体积的体积分数 95%乙醇醇沉,以考察料液质量体积比对提取率的影响,结果见表 1。

植物多糖提取时,若提取溶剂很少,此时在一些多糖尚未溶出便达到溶解平衡。随着溶剂增加,溶出的多糖被溶解,直到大部分多糖被溶出^[6]。所以,随着溶剂相对用量的增加,多糖的溶出率增大。从表 1 可以看出,当料液质量体积比为 1 g: 30 mL 以后,提取率上升的幅度趋缓,这是由于当五味子

中的多糖绝大部分被溶出后, 提取率将达到稳定。

表 1 料液质量体积比对多糖提取率的影响

Tab. 1 Effect of ratio of solid and liquid on polysaccharide extraction rate

料液质量体积比/(g∶ mL)	提取率/ %
1∶ 20	2 20
1∶ 25	3 79
1∶ 30	4 47
1∶ 35	4 65
1∶ 40	4 71
1∶ 45	4 83

2 2 浸提温度对粗多糖提取率的影响

以 1 g∶ 30 mL 的料液质量体积比, 分别在不同的温度(详见表 2) 条件下进行五味子多糖的提取实验(其它条件同 2 1), 以考核浸提温度对提取率的影响, 结果见表 2。

表 2 浸提温度对多糖提取率的影响

Tab. 2 Effect of extraction temperature on polysaccharide extraction rate

T/ ℃	提取率/ %
75	1 62
80	2 02
85	3 55
90	4 47
95	5 04
98	5 27

浸提温度对多糖的提取率有着显著的影响, 从表 2 可以看出, 随着浸提温度的上升, 多糖提取率显著增大, 这是由于实验中所提取的多糖是水溶性的, 随着温度升高, 多糖的溶解度也相应增大, 因此多糖的提取率明显增大。还可看出, 在 98 ℃ 时多糖的提取率几乎是 85 ℃ 时的两倍。

2 3 提取时间对粗多糖提取率的影响

以 1 g∶ 30 mL 的料液质量体积比在 98 ℃ 的浸提条件下分别浸提不同时间(其它条件同 2 1), 以考察浸提时间对提取率的影响, 结果见表 3。

随着热浸提时间的增加, 粗多糖提取率也有所增大, 但 4 h 以后增大趋势变缓。

2 4 浓缩比对粗多糖提取率的影响

将以 1 g∶ 30 mL 的料液质量体积比在 98 ℃ 的浸提条件下提取 4 h(其它条件同 2 1), 浸提液分别浓缩为不同的体积, 以考察提取液浓缩比对醇析

得率的影响, 结果见表 4。

表 3 浸提时间对多糖提取率的影响

Tab. 3 Effect of extraction time on extraction polysaccharide rate

t/h	提取率/ %
2	3 18
3	3 86
4	4 98
5	5 27
6	5 30
7	5 32

表 4 浓缩比对多糖提取率的影响

Tab. 4 Effect of ratio of concentration on polysaccharide extraction rate

浓缩比	得率/ %
1∶ 1	4 91
1∶ 2	5 07
1∶ 3	5 25
1∶ 4	5 36
1∶ 5	5 27

由表 4 可以看出, 当在浓缩比为 1∶ 1~ 1∶ 4 时, 随着浓缩体积的减小, 粗多糖醇析得率相应增大, 在 1∶ 4 时达到最高为 5 36%, 再进行浓缩, 粗多糖的醇析得率开始下降。浸提液未经浓缩而直接加乙醇醇析, 势必使乙醇稀释, 多糖在低体积分数乙醇中有微量的溶解, 故所得的沉淀较少; 但当浸提液浓缩至一定程度后, 沉淀物反而减少, 这是由于此时浸提液过于粘稠, 多糖容易与蛋白质等成分形成凝胶物质, 从而妨碍沉淀剂与多糖分子充分接触, 降低了多糖产品的得率^[7]。因此, 浸提液浓缩比以 4∶ 1 为宜。

2 5 正交试验结果分析

根据单因素实验结果, 选择浸提的料液质量体积比、温度和时间为正交试验的 3 个因素, 以多糖提取率为考察指标进行 $L_9(3^3)$ 正交实验(提取液均浓缩到原体积的 1/4), 优化五味子多糖的提取工艺条件。正交实验设计、实验结果及其分析见表 5。

由表 5 的数据分析可知, 对五味子多糖提取率影响最大的因素是浸提温度, 其次是料液质量体积比, 再就是浸提时间。最佳提取工艺条件为 $B_3 A_3 C_2$, 即: 浸提温度为 99 ℃, 提取时间为 4 h, 料液质量体积比为 1 g∶ 32 mL, 此条件下, 五味子多糖的

提取得率达 5 61%。

表 5 热水浸提正交实验结果及分析表
Tab. 5 Result and analysis of orthogonal experiments

列号	因 素			提取率/%
	料液质量 体积比/(g: mL)	T/℃	t/h	
1	1: 28	97	3.5	5.13
2	1: 28	98	4.0	5.23
3	1: 28	99	4.5	5.53
4	1: 30	97	4.0	5.18
5	1: 30	98	4.5	5.29
6	1: 30	99	3.5	5.44
7	1: 32	97	4.5	5.16
8	1: 32	98	3.5	5.37
9	1: 32	99	4.0	5.61
K_1	15.89	15.47	15.94	
K_2	15.91	15.89	16.02	
K_3	16.14	16.58	15.98	
$\bar{X}_1$	5.30	5.16	5.31	
$\bar{X}_2$	5.30	5.30	5.34	
$\bar{X}_3$	5.38	5.53	5.33	
R_i	0.08	0.37	0.03	
优水平	A_3	B_3	C_2	

2 6 Sephadex G-75 与 Sephadex G-100 柱层析结果分析

脱蛋白后的多糖溶液经紫外可见分光光度计扫描, 在 490 nm 处有最大吸收, 可确定是多糖类物质。脱色后, 进行 Sephadex G-75 和 Sephadex G-100 凝胶柱层析, 其洗脱曲线如图 2 所示。

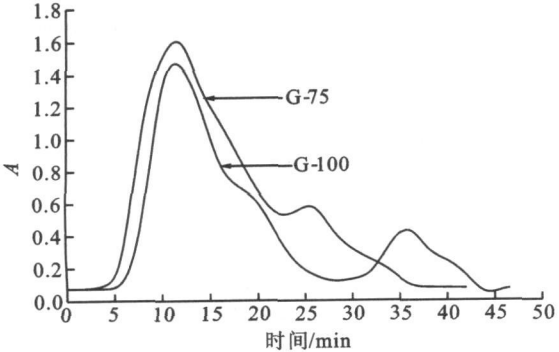


图 2 Sephadex G-75 与 Sephadex G-100 柱层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of Sephadex G-75 and Sephadex G-100 column chromatography

Sephadex G-75 层析洗脱曲线中有两个洗脱峰, 两峰交联, 说明分离不够彻底, 并且两种多糖的相对分子质量范围超出了 3 000~ 80 000。

Sephadex G-100 层析洗脱曲线仍然有两个洗脱峰, 两个洗脱峰完全分离, 说明分离彻底, 且这两种多糖的相对分子质量在 5 000~ 300 000。分别收集两种多糖, 冻干, 得多糖 I 和 II。

2 7 五味子多糖的单糖组分 TLC 分析

纯化的多糖经透析、水解后, 用硅胶 G 板进行薄板层析, 结果如图 3 所示。

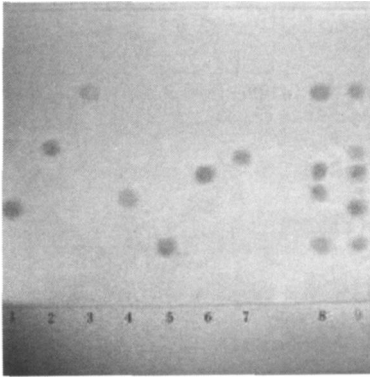


图 3 两种多糖水解的薄板层析图

Fig. 3 Thin layer chromatography analysis of hydrolysates on two kinds of polysaccharide

图 3 中, 1 号为醛酸, 2 号为阿拉伯糖, 3 号为鼠李糖, 4 号为葡萄糖, 5 号为 D-半乳糖, 6 号为 D-甘露糖, 7 号为 D-果糖, 8、9 号分别为多糖 I 和 II。根据 R_f 值和单糖标样颜色可分析出多糖 I 是由葡萄糖、D-甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖等单糖组成; 多糖 II 是由 D-半乳糖、醛酸、D-甘露糖、D-果糖、鼠李糖等单糖组成。

2 8 红外光谱检测结果分析

I、II 号多糖的红外光谱图如图 4 所示。

图 4 中, I、II 号多糖 3 446 34 cm^{-1} 、3 430 91 cm^{-1} 的吸收峰为缔和羟基伸缩振动峰, 且峰面积都较大, 可确定它们为多-OH 化合物; 2 927. 58 cm^{-1} 、2 929. 49 cm^{-1} 为 CH_2 伸缩振动峰; 1 743. 42 cm^{-1} 、1 745. 35 cm^{-1} 为酯的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰。I 号多糖 918. 00 cm^{-1} 处的振动峰可判定它可能含有 α 糖苷键; 在 1 100~ 1 010 cm^{-1} 出现了两个振动峰, 显示它可能存在 α 呋喃糖结构。II 号多糖 761. 78 cm^{-1} 处的振动峰可判定它可能含有 β 糖苷键; 在 1 150~ 1 010 cm^{-1} 出现了 3 个振动峰, 显示它可能存在 β 吡喃糖结构。

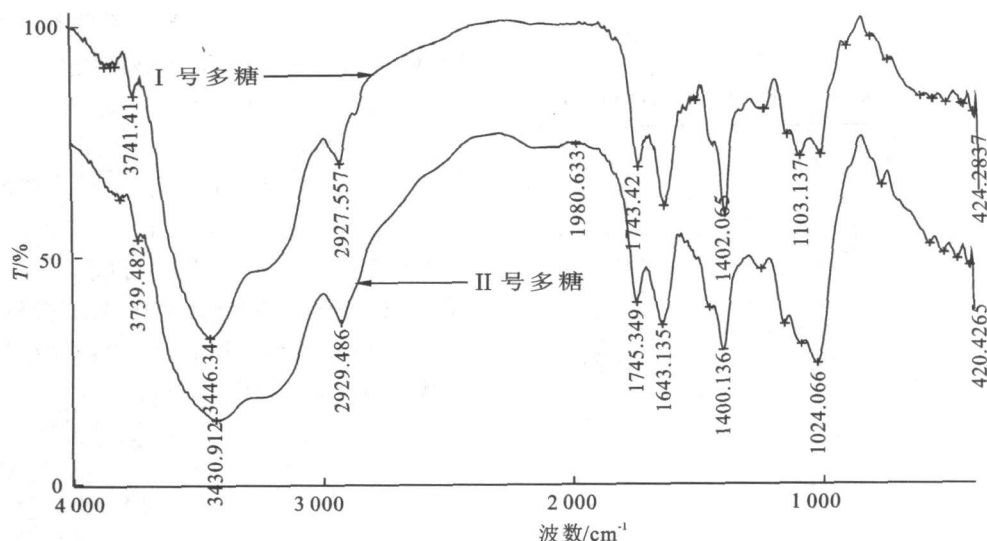


图4 多糖I和II的红外光谱图

Fig. 4 IR of polysaccharide I and II

3 结 语

1) 采用热水浸提法从五味子中提取了粗多糖, 适宜的提取工艺条件为: 料液质量体积比为 1 g: 32 mL, 浸提温度为 99 °C, 提取时间为 4 h, 将浸提液浓缩至原体积的 1/4, 五味子多糖的提取得率达 5.61%。

2) 采用酶法与 Sevag 法联用脱蛋白效果较好。利用 Sephadex G-100 凝胶色谱法对五味子多糖进行了分级分离, 分别得到两种多糖 I 和 II。

3) 利用薄层色谱分析证明, 多糖 I 是由葡萄糖、D-甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖等单糖组成。多糖 II 是由 D-半乳糖、醛酸、D-甘露糖、D-果糖、鼠李糖等单糖组成。红外光谱显示, 多糖 I 可能为 α -呋喃糖; 多糖 II 可能为 β -吡喃糖。

参考文献(References):

- [1] 戴好富, 谭宁华, 周俊, 等. 北五味子中的一个新单萜苷[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(9): 1659-1661.
DAI Haofu, TAN Ninghua, ZHOU Jun, et al. A new monoterpenoid glycoside from schisandra chinensis[J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 2005, 26(9): 1659-1661. (in Chinese)
- [2] 王文燕, 陈建光. 五味子的药理作用及开发研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2007, 8(2): 128-133.
WANG Weiryan, CHEN Jianguang. Pharmacology function of schisandra and its exploitation[J]. **Journal of Beihua University: Natural Science**, 2007, 8(2): 128-133. (in Chinese)
- [3] 陈文静, 季宇彬. 五味子多糖药理作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(12): 66-67.
CHEN Wenjing, JI Yubin. Progress on pharmacological action of fructus schisandrae polysaccharide[J]. **Food and Drug**, 2007, 9(12): 66-67. (in Chinese)
- [4] 李巧云, 居红芳, 翟春, 等. 五味子粗多糖提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 105-109.
LI Qiaoyun, JU Hongfang, ZHAI Chun, et al. Study on the extraction technology of polysaccharide from schisandra[J]. **Food Science**, 2004, 25(5): 105-109. (in Chinese)
- [5] 刘春兰, 邓义红, 杨林, 等. 雪莲水溶性多糖提取工艺的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 38-40.
LIU Chunlan, DENG Yihong, YANG Lin, et al. Study on extraction process of water soluble polysaccharide from saussurea involucrata[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(3): 38-40. (in Chinese)
- [6] ENZO GIANNOCARO, YA JANE WANG and PENG YIN CHEN. Effects of solvent, temperature, time, solvent to sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean[J]. **Journal of Food Science**, 2006, 17(1): 59-64.
- [7] XU Mingzhe, MA Shihong, HU Changqin. Gel filtration chromatography combined with bradford method for determination of total residual protein in ferment antibiotics[J]. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, 2004, 13(4): 262-265.