

引用:史鑫波,王磊,陈佳昕,等.黄精茎秆中多糖类成分的精制研究[J].现代中医药,2023,43(4):101-104.

黄精茎秆中多糖类成分的精制研究^{*}

史鑫波¹ 王磊¹ 陈佳昕¹ 刘红波¹ 宋忠兴^{1,2**} 李国龙¹ 杜升旗²

(1. 陕西中医药大学/陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心,陕西 咸阳 712083;

2. 陕西兴盛德药业有限责任公司,陕西 铜川 727031)

摘要:目的 精制黄精茎秆中的多糖类成分,为黄精茎秆的资源综合利用提供研究基础。方法 用乙醇沉淀法制备黄精茎秆粗多糖;以多糖脱色率 and 多糖保留率为指标,采用 0.5% 双氧水和 2% 活性炭进行脱色研究;以蛋白质脱除率 and 多糖保留率为指标,采用 Seville 法和三氯乙酸法对脱色后黄精茎秆多糖进行脱蛋白研究。结果 采用乙醇沉淀法制备黄精茎秆粗多糖,粗多糖得率为 2.80%,粗多糖中多糖含量为 11.33%;0.5% 双氧水脱色效果比 2% 活性炭好,其平均脱色率为 78.88%,平均多糖损失率为 7.74%;与 Seville 法相比,三氯乙酸法蛋白脱除率可达 73.12%,多糖损失率 9.34%。结论 双氧水和三氯乙酸法脱色脱蛋白工艺可行,操作简单方便,可为黄精非药用部位的资源利用和开发提供参考。

关键词:黄精茎秆;多糖;精制;除色素;脱蛋白

中图分类号:R282 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2023)04-0101-04

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2023.04.020

Study on Purification of Polysaccharides from the Stem of Huangjing

SHI Xinbo¹ WANG Lei¹ CHEN Jiaxin¹ LIU Hongbo¹

SONG Zhongxing^{1,2} LI Guolong¹ DU Shengqi²

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Province Ministry of Traditional Chinese Medicine

Resources Industrialization Collaborative Innovation Center, Shaanxi Xianyang 712083, China;

2. Shaanxi Xingshengde Pharmaceutical Co., Ltd., Shaanxi Tongchuan 727031, China)

Abstract: **Objective** To refine the polysaccharides in the stem of Huangjing and provide a research basis for the comprehensive utilization of Huangjing stem resources. **Methods** Ethanol precipitation method was used to prepare crude polysaccharides from Huangjing stem; Using the decolorization rate and retention rate of polysaccharides as indicators, 0.5% hydrogen peroxide and 2% activated carbon were used for decolorization research; With the protein removal rate and polysaccharide retention rate as indicators, the deproteinization of polysaccharide from the decolored rhizome of *Polygonatum sibiricum* was studied by using the Seville method and Trichloroacetic acid method. **Results** The results showed that the crude polysaccharide from Huangjing stem was prepared using ethanol precipitation method, with a yield of 2.80% and a polysaccharide content of 11.33% in the crude polysaccharide; The decolorization effect of 0.5% hydrogen peroxide is better than that of 2% activated carbon, with an average decolorization rate of 78.88% and an average polysaccharide loss rate of 7.74%; Compared with the Seville method, the protein removal rate of the Trichloroacetic acid method was 73.12%, and the polysaccharide loss rate was 9.34%. **Conclusion** The decolorization and deproteinization process with hydrogen peroxide and Trichloroacetic acid is feasible, simple and convenient, and can provide a reference for the resource utilization and development of non medicinal parts of Huangjing.

Key words: Huangjing stem; Polysaccharides; Refinement; Depigmentation; Deproteinization

* 基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划项目(2016KTTSSF02-01)

** 通讯作者:宋忠兴,副主任药师。E-mail:szx74816@sina.com

黄精是百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua. 的干燥根茎,为药食两用的中药材,其中含多糖、黄酮、皂苷类等化学成分,具有补气、养阴、健脾、润肺、益肾的作用^[1-2]。黄精中所含的主要成分是多糖,由葡萄糖、甘露糖、半乳糖醛酸等组成^[3],具有抗肿瘤、抗氧化、增强记忆力、降血糖和提高免疫力等药理作用^[4-12]。

中药材资源的可持续性开发和天然含量极低活性成分的获取是目前中医药发展所面临的瓶颈之一^[13]。要应对当今中药资源危机的局面,提高中药资源的利用率愈加迫切,同时进一步挖掘中药材非药用部位的药理作用对缓解中药资源日趋紧张的局面具有重要意义。

本论文以黄精非药用部位黄精茎秆为研究对象,基于课题组前期研究基础^[14],进一步对黄精茎秆中多糖类成分进行脱色脱蛋白精制研究,以期为黄精茎秆的资源性化学成分综合利用提供研究依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);DL-1005 节能型低温冷却液循环机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HH-2A 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);101 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);PHSJ-4F 实验室 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);BSA224S 万分之一电子天平(奥豪斯仪器有限公司);岛津 UV-2600 紫外分光光度计(岛津公司,日本)。

1.2 试剂 无水葡萄糖对照品(批号:0120-9501)购自中国药品生物制品研究所,蒽酮(上海科丰实业有限公司),甲醇(成都市科隆化学品有限公司),95%乙醇(天津市科密欧化学试剂有限公司)。滇黄精茎秆是采收黄精根茎后剩余的茎秆部分,在九月份采收,购自陕西步长制药股份有限公司,经陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心宋忠兴副主任药师鉴定为百合科植物滇黄精的干燥茎秆。

2 方法与结果

2.1 黄精茎秆粗多糖的制备 根据课题组前期已报道的提取工艺提取获得黄精茎秆提取液^[14],浓缩至 $1\text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,加入 4 倍体积的无水乙醇,4℃下静置过夜,离心所得沉淀用无水乙醇多次洗涤,然后用 60℃水浴挥去乙醇,并在 60℃的烘箱中烘干,得黄精茎秆粗多糖,计算粗多糖得率。按照“2.2”项下方法检测粗多糖中多糖含量,粗多糖得率为 2.80%,粗多糖中多糖含量为 11.33%。

2.2 总多糖含量测定方法^[15-19]

2.2.1 对照品溶液的配制 取经 105℃后烘干至恒重的无水葡萄糖对照品适量,精密称定,置 10 mL 的容量瓶中,加水充分溶解至刻度线,混合均匀,即可得 $0.3\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的无水葡萄糖对照品溶液。

2.2.2 无水葡萄糖标准曲线的制备 精密量取 2.2.1 项下对照品溶液 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL 与 0.6 mL,分别置 10 mL 的具塞试管中,各加水至 2.0 mL,将试管摇匀,后在冰水浴中滴加 0.2% 蒽酮-硫酸溶液至 10 mL,充分混匀,将在冰水浴中的试管冷却后,然后在 100℃的水浴锅中放置 10 min,取出,立即在冰水浴中冷却 10 min,然后取出,以相应的试剂作为空白对照。采用紫外-可见分光光度法,用 582 nm 的波长进行葡萄糖对照品吸光度的测定。以多糖的吸光度(X)为纵坐标,以多糖浓度 Y 为横坐标,然后进行多糖的标准曲线绘制,得到回归方程 $Y = 65.4X + 0.0385$,相关系数: $r = 0.9996$ 。

2.2.3 供试品溶液的制备^[14] 取多糖上清液 1 mL,置于 10 mL 容量瓶,用蒸馏水定容到刻度线,摇匀,精密吸取 1 mL,至 15 mL 离心管中,加 5% 苯酚溶液 1 mL,缓慢加入 5 mL 浓硫酸,摇匀,90℃热水浴 30 min,冷却至室温,蒸馏水做空白对照。按“2.2.2”项下标准曲线计算多糖含量。

2.3 蛋白质含量的测定研究^[20]

2.3.1 显色剂的配制 精密称取 10.0 mg 的考马斯亮蓝 G-250,加入 5.0 mL 乙醇,充分溶解,再精密量取 10.0 mL 体积分数 85% 的磷酸加入,最后加蒸馏水至刻度 100 mL,即为考马斯亮蓝工作液。

2.3.2 考马斯亮蓝标准曲线的绘制 精密称取

牛血清蛋白 10.0 mg,溶于 10.0 mL 的蒸馏水中,可得到溶液的质量浓度为 $1000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,即为对照品溶液。精密移取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 牛血清蛋白对照品溶液,置于 10.0 mL 的具塞试管中,再加入蒸馏水补充至 1.0 mL,充分摇匀。从各试管中精密吸取 0.1 mL,再分别加入 5.0 mL 上述配制好的考马斯亮蓝工作液,充分摇匀,静置 2 min 后,在 595 nm 处测定蛋白质的吸光度(A)。以蛋白质的吸光度 A 值为纵坐标,牛血清蛋白质量的浓度(C)为横坐标,进行蛋白质标准曲线的绘制。得到回归方程: $A = 0.7364C - 0.0524$,相关系数: $r = 0.9997$ 。

2.3.3 供试品溶液的制备 取多糖上清液 1 mL,用蒸馏水定容到 10 mL,摇匀,精密吸取 1 mL 至 10.0 mL 的具塞试管中,再分别加入 5.0 mL 上述配制好的考马斯亮蓝工作液,充分摇匀,2 min 后,在 595 nm 处测定蛋白质的吸光度,蒸馏水做空白对照。按“2.3.2”项下标准曲线计算蛋白质含量。

2.4 黄精茎秆粗多糖的脱色^[21] 取“2.1”项下所得黄精茎秆粗多糖 0.25 g 至 50 mL 的容量瓶,充分溶解,加水定容至刻度线。然后分别用移液管移取 10 mL 的黄精茎秆多糖溶液放置于三角瓶中,将第一组作为空白对照组(不加任何试剂),第二组中加入 30% 的双氧水,使黄精茎秆多糖溶液中双氧水的最终浓度为 0.5%,第三组加入 2% 活性炭。将三组样品在 60 ℃ 的水浴中加热 2 h,第二组中加入适量的亚硫酸钠除去溶液中的双氧水(去除其多余的氧化性),第三组过滤除去活性炭。计算脱色率,所得脱色后样品溶液的多糖含量按“2.2”项下测定多糖含量,并计算多糖损失率,结果见表 1。

表 1 不同脱色剂的脱色率和多糖损失率($n = 3$)

脱色剂	脱色率(%)	多糖损失率(%)
0.5% 双氧水	78.88	7.74
2% 活性炭	69.83	11.50

由表 1 可知,0.5% 的双氧水法脱色率强于活性炭法脱色。对比多糖损失率,可知 0.5% 双氧水法效果较好,因此选用 0.5% 的双氧水进行脱色。

2.5 黄精茎秆多糖的脱蛋白^[22-23]

2.5.1 Sevage 法脱蛋白 取 0.5% 双氧水脱色后

的黄精茎秆多糖溶液 20 mL,加入 Sevage 试剂,快速搅拌 20 min 后,离心机以 $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 10 min,将分离开的溶液上层进行收集,连续重复脱蛋白 3 次,分别用“2.2”和“2.3”项下方法测定溶液的多糖和蛋白质含量,并计算蛋白脱除率和多糖损失率,结果见表 2。随着 Sevage 法脱蛋白次数的增加,蛋白质脱除率逐渐增大,但多糖损失率亦逐渐增大;当脱蛋白次数为 3 次时,蛋白脱除率为 68.47%,而多糖损失率高达 42.38%。

表 2 Sevage 法脱蛋白实验结果

脱蛋白次数(次)	蛋白脱除率(%)	多糖损失率(%)
1	13.92	23.32
2	44.21	36.46
3	68.47	42.38

2.5.2 三氯乙酸脱蛋白法 取脱色后的黄精茎秆多糖水溶液 20 mL 置容量瓶中加入相同体积的 6% 的三氯乙酸溶液,充分摇匀至溶液呈无絮状液体,然后置 4℃ 的冰箱过夜,抽滤,取抽滤之后的黄精茎秆多糖溶液重复以上操作 2 次,分别用“2.2”和“2.3”项下方法测定黄精茎秆多糖溶液的多糖和蛋白质含量,并计算每次蛋白脱除率和多糖损失率,其测定结果如下表 3。随着三氯乙酸法脱蛋白次数的增加,蛋白质脱除率逐渐减少,而多糖损失率逐渐增大。综合考虑蛋白质脱除率和多糖损失率,根据 Sevage 法和三氯乙酸法脱蛋白的实验结果,选择三氯乙酸法(脱蛋白次数为 1 次)作为适宜的脱蛋白方法。

表 3 三氯乙酸法脱蛋白实验结果

脱蛋白次数(次)	蛋白脱除率(%)	多糖损失率(%)
1	73.12	9.34
2	54.63	19.44
3	23.35	47.61

3 讨论

本论文以黄精茎秆多糖为研究对象,对黄精茎秆粗多糖进行了脱色和脱蛋白的研究。对于黄精茎秆粗多糖脱色工艺,经过考察选择 0.5% 的双氧水法进行脱色。对于蛋白的脱除,选择三氯乙酸法(三氯乙酸浓度为 6%,脱蛋白次数为 1 次)作为的脱蛋白方法。期望研究结果可以为黄精茎秆多糖的开发和利用提供参考。

随着人民生活水平逐步提高,健康观念深入人心。人们对“药食两用”类中药的需求不断升高^[24]。黄精作为传统药食两用的中药已有几千年的历史,因此在“健康中国”的战略背景下,黄精受到了越来越多的人的关注。黄精作为一种药食同源的植物,其具有诸多的药理活性,现已广泛应用于食品、药品、化妆品等领域。目前已开发出黄精饮片、黄精饮料、黄精速溶粉、黄精酒、黄精口服液等产品^[25],国内的黄精需求大量增加,国内产量已经不足以支撑需求^[26],因此黄精的非药用部位的相关研究变得更加有必要。

参考文献

- [1]焦劼,陈黎明,孙瑞泽,等.不同产地黄精主要化学成分比较及主成分分析[J].中药材,2016,39(3):519-522.
- [2]李晓明.黄精化学成分及药理作用的研究[J].生物化工,2018,4(2):138-139,145.
- [3]李亚霖,周芳,曾婷,等.药用黄精化学成分与活性研究进展[J].中医药导报,2019,25(5):86-89.
- [4]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,2007,2(21):95-96.
- [5]段华,王保奇,张跃文.黄精多糖对肝癌 H22 移植瘤小鼠的抑瘤作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2014,25(1):5-7.
- [6]Zhang H,Cai XT,Tian QH,et al. Microwave-assisted degradation of polysaccharide from Polygonatum sibiricum and antioxidant activity[J]. Journal of Food Science,2019,84(4):754-761.
- [7]Li L,Thakur K,Liao BY,et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from Polygonatum cyrtonema Hua[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2018,114:317-323.
- [8]贺维涛,年婧,赵重博.不同产地黄精多糖含量、多糖红外光谱及抗氧化活性研究[J].现代中医药,2022,42(6):51-55.
- [9]Zheng SY. Protective effect of Polygonatum sibiricum Polysaccharide on D-galactose-induced aging rats model[J]. Scientific Reports,2020,10:2246.
- [10]王艺,彭国庆,江新泉,等.黄精多糖对糖尿病大鼠模型的保护机制研究[J].中医药导报,2017,23(2):8-16.
- [11]陆建美,闫鸿丽,王艳芳,等.滇黄精及其活性成分群

- 对 α -糖苷酶活性抑制作用研究[J].中国现代中药,2015,17(3):200-203.
- [12]Liu N,Dong ZH,Zhu XS,et al. Characterization and protective effect of Polygonatum sibiricum polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2018,107:796-802.
- [13]宋丽艳,谷建梅,刘秀波.中药资源开发利用现状及可持续发展对策[J].中华中医药学刊,2009,27(1):86-87.
- [14]张丽,常青,王艳,等.响应面法优化提取黄精茎秆中总多糖、总皂苷、总黄酮的工艺研究[J].中医药导报,2019,25(8):64-67.
- [15]王结鑫,褚海清,赵雨,等.枸杞多糖的精制工艺优选[J].湖南中医杂志,2021,37(2):150-152,158.
- [16]童红,申刚.黄精药材中黄精多糖的含量测定[J].中国药业,2007,16(9):20-21.
- [17]屈小娟,田元,于吉臣,等.舒悠颗粒质量控制研究[J].现代中医药,2022,42(5):39-46.
- [18]贺维涛,赵重博,年婧.纤维素酶辅助提取陕产珠子参多糖工艺及抗氧化活性研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(6):40-44.
- [19]张丽华,叶世莉,刘思美,等.白及多糖的超滤陶瓷膜分离工艺研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(6):34-39.
- [20]李国龙,唐志书,宋忠兴,等.无机陶瓷膜微滤精制山茱萸水提液的实验研究[J].西北药学杂志,2015,30(3):224-227.
- [21]陈存武,张莉,王玉领,等.黄精多糖提取液的活性炭脱色研究[J].中国林副特产,2008(3):1-3.
- [22]梁引库,吴三桥.黄精多糖脱色和脱蛋白工艺研究[J].食品科技,2012,37(12):166-169.
- [23]贺立虎,周济铭,高鹏.黄精多糖脱蛋白工艺的研究[J].陕西农业科学,2008,54(3):53-55.
- [24]苑翼楠,周威.“药食同源”类食品国内外研究现状及展望[J].现代食品,2021(14):118-121.
- [25]杨冰峰,胥峰,李淑立,等.黄精化学成分·生理功能及产业发展研究进展[J].安徽农业科学,2021,49(11):8-12.
- [26]张从敬,陈子怡,牟欣尚,等.黄精产业发展现状与趋势[J].农业科技通讯,2021(3):10-12.

(修回日期:2023-05-29 编辑:崔春利)