

1 000、2 000 μ s 脉冲时间进行电致孔试验 2 min, 60 次/min, 共 120 个脉冲, 10 min 取样, 测定青藤碱的质量浓度, 计算青藤碱的累积透过量, 结果见表 3。可以看出, 电致孔脉冲宽度因素对青藤碱累积透过量亦有影响, 并且电致孔脉冲宽度对累积透过量的影响很大, 500 μ s 条件下 10 min 末的累积透过量为被动扩散 1 h 末累积透过量的 13 倍, 并且随着脉冲宽度的延长, 累积透过量下降很快, 超过 1 ms 以后累积透过量几乎已经不再增加。根据趋势来看, 如果脉冲时间更短, 累积透过量应该还有增大的趋势, 进一步的实验有待于进行。

表 3 不同脉冲宽度 10 min 末累积透过量

Table 3 Accumulative permeation of sinomenine in various pulse widths at 10 min

脉冲宽度/ μ s	累积透过量/ μ g	脉冲宽度/ μ s	累积透过量/ μ g
500	792.250	800	625.522
600	696.575	1 000	33.395
700	698.251	2 000	118.374

2.8 脉冲次数的影响: 固定波形为方波、脉冲宽度 1 ms、电压 200 V, 分别使用 60、120、180、240、300、360、420、480 脉冲次数进行电致孔试验 2 min, 10 min 后取样, 测定青藤碱的质量浓度, 计算青藤碱的累积透过量, 结果见表 4。由结果可知, 电致孔脉冲次数因素对青藤碱累积透过量的影响很大。青藤碱累积透过量没有随着脉冲次数的增加而增加, 而是达到一定的次数之后累积透过量下降。最佳脉冲次数为 240

个脉冲, 该脉冲条件下 10 min 末青藤碱的累积透过量约是被动扩散 1 h 末累积透过量的 91.4 倍。

表 4 不同脉冲次数 10 min 末累积透过量

Table 4 Accumulative permeation of sinomenine in various numbers of pulses at 10 min

脉冲次数/个	累积透过量/ μ g	脉冲次数/个	累积透过量/ μ g
60	1 049.000	300	4 007.115
120	4 700.993	360	3 490.995
180	4 447.515	420	3 000.000
240	5 220.682	480	2 725.236

3 讨论

电致孔条件下的电学参数因素对青藤碱透皮给药量有很大影响, 各种参数影响程度各有不同, 脉冲宽度和脉冲波形影响最大, 脉冲时间和脉冲电压影响次之。本实验初步说明优化的电致孔条件应用于中药透皮给药将会有良好的前景。当然目前只进行了体外实验, 活体动物实验还未进行, 体外实验是否和体内实验密切相关, 还有待于进一步的证实。

References:

- [1] Murthy S N, Sen S A, Hui S. Surfactant-enhanced transdermal delivery by electroporation [J]. *J Controlled Release*, 2004, 98: 307-315.
- [2] Zhang X Z. Penetration of transdermal enhancers on percutaneous permeation of Sinomenine Gels *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10):1115.
- [3] Mao X J. Determination of sinomenine in Bike Granuls by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28 (2): 117.

仙人掌多糖的分离、纯化及性质研究

陶美华^{1,2}, 曾富华^{1,3*}, 章卫民², 梁伊丽¹, 卢向阳³

(1. 湛江师范学院 生物系, 广东 湛江 524048; 2. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070;

3. 湖南农业大学 生物技术系, 湖南 长沙 410128)

摘要:目的 分离、纯化具有降血糖作用的仙人掌多糖组分。方法 经热水提取、乙醇沉淀、DEAE Sepharose fast flow 离子交换色谱和 Sephadex G 系列凝胶过滤色谱纯化得到 5 种仙人掌多糖组分。醋酸纤维薄膜电泳检测多糖纯度, 凝胶色谱测定相对分子质量, 高效液相色谱测定糖的组成。结果 5 种多糖都已达到电泳纯。它们的相对分子质量依次为 2.0×10^3 、 1.0×10^6 、 4.0×10^3 、 9.2×10^5 、 5.0×10^3 。ODP1 由鼠李糖组成, ODP2 可能由鼠李糖和葡萄糖组成, ODP4 可能由鼠李糖和 D-半乳糖组成。ODP3 和 ODP5 分别由鼠李糖和一未知糖组分组成。结论 仙人掌多糖的提取没有必要采用脱蛋白、脱色素步骤, 本实验所提取的仙人掌多糖是均一的。

关键词:仙人掌; 多糖; 纯化; 性质

收稿日期: 2006-03-10

基金项目: 广东省高校自然科学基金资助项目(Z03062); 湛江市科技招标计划项目(湛财企[2004]98号)

作者简介: 陶美华(1978—), 女, 湖南长沙人, 硕士, 从事天然产物开发与利用研究, 现在广东省微生物研究所工作。

Tel: (020)31319860 E-mail: taomeihua@yahoo.com.cn

* 通讯作者 曾富华 Tel: (0759) 3183622 E-mail: zengfuhua@tom.com

中图分类号: 284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)11-1641-05

Isolation and purification of polysaccharides from *Opuntia dillenii* and their properties

TAO Mei-hua^{1,2}, ZENG Fu-hua^{1,3}, ZHANG Wei-min², LIANG Yi-li¹, LU Xiang-yang³

(1. Department of Biology, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang 524048, China; 2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 3. Department of Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: **Objective** To isolate, purify, and identify the *Opuntia dillenii* polysaccharide (ODP). **Methods** Fresh cactus was extracted by hot water, precipitated by ethanol, fractionated by DEAE Sepharose fast flow, separated by Sephadex G series, and treated by freeze-drying. After the above purification, five polysaccharides were obtained. Purity of them was examined by electrophoresis, relative molecular weight of them was measured by gel chromatography, and chemical composition was determined by HPLC. **Results** All of ODP were proved to be homogenous, relative molecular weight of them were 2.0×10^3 , 1.0×10^6 , 4.0×10^3 , 9.2×10^5 , and 5.0×10^3 . ODP1 was composed of rhamnose only, ODP2 was made up of rhamnose and D-glucose, ODP4 contained rhamnose and D-galactose, ODP3 and ODP5 consisted of rhamnose and another unidentified monosaccharide, respectively. **Conclusion** The deproteinized or decolorized procedure is not necessary for the purification of ODP, and all of ODP are identified to be homogenous.

Key words: *Opuntia dillenii* Haw.; polysaccharide; purification; property

仙人掌 *Opuntia dillenii* Haw. 为仙人掌科石竹目双子叶植物, 有抗炎、免疫、降血糖、抗溃疡等作用。仙人掌中的多糖(*Opuntia dillenii* polysaccharide, ODP)是仙人掌具有多种功效的原因之一。关于仙人掌药理作用的报道很多^[1~6], 但鲜有具有药理作用的化学成分分离、纯化的报道^[7~8]。本实验室已从仙人掌中提取出粗多糖, 经动物实验证明其具有降血糖作用^[6]。现对仙人掌粗多糖分离纯化, 拟进一步探讨化学成分与降血糖活性之间的关系。

1 材料和仪器

新鲜仙人掌采自湛江东海岛附近, 经湛江师范学院陈燕鉴定。阿拉伯糖、半乳糖、木糖、鼠李糖、葡萄糖、考马斯亮蓝 G-250、DEAE-Sepharose fast flow、Sephadex G-75、Sephadex G-200、蓝色葡聚糖 Blue Dextran-2000 等为进口或进口分装试剂, 其他试剂均为国产分析纯。KDM 型调温电热套(鄞城华鲁电热仪器有限公司); RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Bio-Rad 低压色谱系统、Labo-conco 冷冻干燥机。

2 方法与结果

2.1 仙人掌粗多糖的提取: 新鲜仙人掌(挖除刺状叶)称质量, 固定捣碎, 浸提, 滤过, 减压浓缩, 以乙醇沉淀, 离心分离, 干燥, 洗涤, 并真空干燥, 称质量, 即得粗多糖。

2.2 仙人掌粗多糖的组成分析: 采用苯酚-硫酸法, 以半乳糖、阿拉伯糖按质量比 3:1 作标准曲线, 测定总糖; DNS 法测定还原糖; 考马斯亮蓝法测定蛋白质; 定磷法测定核酸。结果含多糖、还原糖、蛋白质、核酸的量分别为 48.98%、3.38%、9.86% 和 7.35%。用碘化铋钾试剂、硅钨酸试剂、苦味酸试剂、碘-碘化钾试剂鉴定生物碱, 用醋酐-浓硫酸试剂、三氯化锑试剂、10% 三氯醋酸试剂鉴定甾体类化合物。结果棕色环试验、蒽酮-硫酸法检测呈阳性, 淀粉试验呈阴性, 双缩脲试验稍微变红, 茚三酮试验颜色稍微变化。

2.3 粗多糖的分离纯化

2.3.1 离子交换色谱结果: 采用 DEAE Sepharose fast flow 离子交换柱(30 cm × 2.5 cm)进行色谱分离, 用含有 0.02、0.1、0.3 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0)以 0.6 mL/min 依次洗脱, 6 mL/管分部收集。再采用 Sephadex G 系列凝胶过滤柱(75 cm × 1.5 cm)进行色谱分离, 用 0.05 mol/L NaCl 溶液以 0.15 mL/min 洗脱, 3 mL/管分部收集, 冷冻干燥得多糖样品。

苯酚-硫酸法测定各收集管在 490 nm 处吸光度, 作多糖洗脱曲线, 合并主峰部分; 低压色谱系统紫外检测仪记录 280 nm(蛋白质)紫外吸收曲线。各峰百分比 = 各组分多糖量/各组分多糖量之和 ×

100%，回收率=各组分多糖量之和/进样多糖量×100%。

由图 1 和表 1 可知，仙人掌多糖至少存在 3 个主要组分峰，各组分中都含有少量的蛋白质组分。按出峰顺序，将此 3 个洗脱峰组分分别命名为组分 I、组分 II、组分 III。经计算，离子交换色谱回收率达 85.04%，分离效果好。

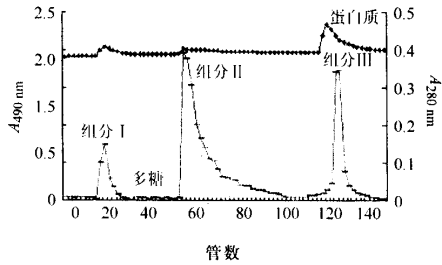


图 1 仙人掌粗多糖过 DEAE Sepharose fast flow 离子交换色谱的洗脱曲线
Fig. 1 Elution profile of ODP on DEAE Sepharose fast flow column ion-exchange chromatography

表 1 仙人掌粗多糖的 DEAE Sepharose fast flow 离子交换色谱

Table 1 DEAE Sepharose fast flow ion-exchange chromatography of ODP		
分析指标	多糖质量/mg	各峰比例
组分 I	10.72	17.24
组分 II	31.03	49.90
组分 III	20.43	32.86

2.3.2 分子筛色谱结果：根据“当被分离物质的 K_{av} 值约为 0.5 时，其凝胶滤过的分离效率最高”^[9] 的原理，来判断分离效果。

(1) Sephadex G-75 分离仙人掌多糖组分 I：通过反复试验，确定采用 Sephadex G-75 对组分 I 洗脱。柱床体积 V_t 为 120 mL，蓝色葡聚糖 Blue Dextran-2000 柱色谱测得 V_0 为 37 mL。从洗脱曲线得知，洗脱到第 28 管出现最高峰，即 V_e 为 84 mL，根据 $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ，计算得 $K_{av} = 0.57$ ，凝胶分离效率高(图 2)。结合蛋白质洗脱曲线可知分离过程除去了微量蛋白质组分。收集多糖峰组分，并命名为 ODP1。

(2) Sephadex G-200 分离仙人掌多糖组分 II：采用 Sephadex G-200 对组分 II 进行洗脱(图 3)。测得 V_0 为 44 mL，柱床体积 V_t 为 125 mL。洗脱过程得到了两个组分峰，按洗脱顺序分别命名为 ODP2、ODP3。第一峰不含有蛋白质组分，洗脱到第 15 管出峰，即 V_{e1} 为 45 mL，第二峰含有蛋白组分，洗脱到第 37 管出峰，即 V_{e2} 为 111 mL，经计算得 $K_{av1} = 0.01$ 、

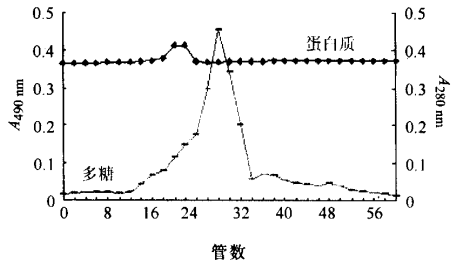


图 2 仙人掌多糖组分 I 的 Sephadex G-75 洗脱曲线
Fig. 2 Elution profile of ODP part I on Sephadex G-75 column

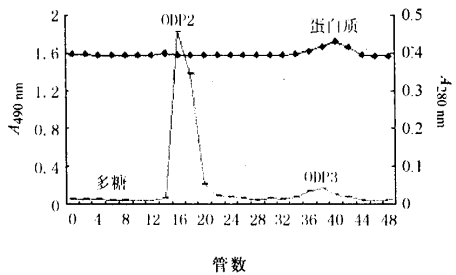


图 3 仙人掌多糖组分 II Sephadex G-200 洗脱曲线
Fig. 3 Elution profile of ODP part II on Sephadex G-200 column

$K_{av2} = 0.83$ ，两个峰组分的分离效率都不高。ODP3 在收集后采用孔径更小的凝胶进一步分离，发现它仍为单一组分(实验结果未列出)。

(3) Sephadex G-200 分离仙人掌多糖组分 III：采用 Sephadex G-200 对组分 III 洗脱(图 4)。测得 V_0 为 40 mL，柱床体积 V_t 为 125 mL。第一峰为洗脱到第 15 管出峰，即 V_{e1} 为 45 mL，第二峰为洗脱到第 29 管出峰，即 V_{e2} 为 87 mL，经计算得 $K_{av1} = 0.06$ 、 $K_{av2} = 0.55$ ，第二峰分离效率高。但组分 III 的第一峰和第二峰有重叠，总分离效率不高。结合蛋白质洗脱曲线可知，第一峰、第二峰为多糖峰，在第二峰洗脱出来后约 120 min，分离除去一微量蛋白质峰。收集多糖峰组分，按洗脱顺序，分别命名为 ODP4、ODP5。

通过上述分析和实验结果分析(表 2)可知，离子交换色谱所得组分 I、组分 II、组分 III 经浓缩处理后，上柱 Sephadex G-75、Sephadex G-200、Sephadex G-200，分离得到 ODP1、ODP2 和 ODP3、ODP4 和 ODP5，其回收率分别为 93.25%、88.30%、78.90%，分离效果较好。

2.4 仙人掌多糖的纯度鉴定：采用醋酸纤维薄膜电泳法。电极液为 0.05 mol/L、pH 8.0 硼砂缓冲液，电压 110 V，电流 11 mA/cm²，时间 30 min，1% 甲苯

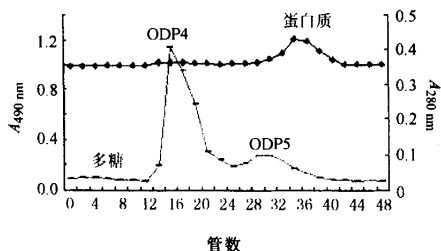


图 4 仙人掌多糖组分Ⅲ Sephadex G-200 洗脱曲线

Fig. 4 Elution profile of ODP part III on Sephadex G-200 column

表 2 Sephadex G 系列分子筛色谱洗脱结果

Table 2 Result of Sephadex G series molecular sieve chromatography

分析指标	多糖质量/mg	各组分多糖之合/mg	进样量/mg	各峰比例/%	回收率/%
ODP1	2.90	2.90	3.11	100	93.25
ODP2	3.13			81.30	
ODP3	0.72	3.85	4.36	18.70	88.30
ODP4	3.15	4.30	5.45	73.26	
ODP5	1.15			26.74	78.90

胺蓝染色,90%乙醇脱色,冰醋酸-乙醇(15:85)混合液透明,观察电泳区带。5 种多糖样品电泳结果都为单一区带,表明它们为电泳纯。

2.5 多糖的相对分子质量测定:采用 Sephadex G-200 凝胶色谱柱,用不同相对分子质量的标准葡聚糖洗脱体积对其相对分子质量对数作回归分析,制作回归直线及方程,将 ODP1、ODP2、ODP3、ODP4、ODP5 5 种多糖组分的洗脱体积代入方程,求得 5 种多糖组分的相对分子质量分别为 2.0×10^3 、 1.0×10^6 、 4.0×10^3 、 9.2×10^5 、 5.0×10^3 。

2.6 多糖的组成分析:取样品多糖 40 mg,加入 4 mol/L H_2SO_4 4 mL,安瓿管封管,100℃水解 8 h,冷却;用 $BaCO_3$ 中和,滤过得上清液,于 45℃下减压浓缩至干,加入双蒸水定容至 1.0 mL。再将 20 mg/mL 单糖对照品和仙人掌多糖酸水解样品进行高效液相色谱分析单糖组成。高效液相色谱条件为:30℃柱温的 Agilent carbohydrate 柱,体积流量 1.5 mL/min,乙腈-水(75:25)的流动相,示差折光检测器检测。

对单糖对照品在 HPLC 上的保留时间和仙人掌多糖酸水解样品在 HPLC 上的保留时间比较(表 3),考虑到实验误差,认为 ODP1 由鼠李糖组成,ODP2 可能由鼠李糖和葡萄糖组成,ODP4 可能由鼠李糖和 D-半乳糖组成,ODP3 和 ODP5 组成成分中含有鼠李糖,但由于缺少单糖对照品,它们的第二峰都不能确定是何种糖类。其具体组成有待进一步

表 3 多糖的组成分析

Tab 3 Analysis of polysaccharides

单糖名称	保留时间/min	多糖样品名称	保留时间 1/min	保留时间 2/min
鼠李糖	4.333	ODP1	4.211	
D-木糖	5.549	ODP2	4.256	8.122
L-阿拉伯糖	6.237	ODP3	4.333	9.167
D-果糖	7.534	ODP4	4.348	8.755
D-葡萄糖	8.195	ODP5	4.297	9.315
D-半乳糖	8.6613			

研究。

3 讨论

考虑到工业化大规模生产需要,仙人掌多糖的分离纯化采用了廉价的水提-醇沉法。虽然此法所需的乙醇较多,但可以对旋转蒸发出来的废液重蒸,回收乙醇,工艺总成本低。

实验中未采用脱蛋白、脱色素步骤,既减少了仙人掌多糖提取工艺所需消耗的时间,也有利于对仙人掌多糖进行药理学实验研究。从实验结果可以看出,利用物质之间的物理吸附、离子交换力和相对分子质量的不同,可以将多糖和未与多糖结合的蛋白质分离开来。如在组分 I、组分Ⅲ的分子筛柱色谱过程中,各自分离出一个蛋白质组分。

本实验发现仙人掌 5 种多糖样品中都含有鼠李糖组分,据文献报道^[10~12],仙人掌粘液质是一种阿拉伯半乳糖,主链为(1→4)连接的半乳糖。本实验结果和文献报道不一致。分析原因,可能与多糖的分离纯化工艺不同有关,亦可能是发现了仙人掌多糖新的化学成分,这有待进一步证实。

笔者发现,仙人掌多糖对糖尿病小鼠模型有明显的降血糖作用,推测可能与调节免疫功能有关^[6]。但是,分离所得的 5 种仙人掌多糖与仙人掌降血糖作用的关系,还有待进一步研究。

致谢:高效液相色谱实验得到了余炳生教授的大力帮助。

References:

- [1] Laurenz J C, Collier C C, Kuti J O. Hypoglycaemic effect of *Opuntia lindheimeri* Englem in a diabetic pig model [J]. *Phytother Res*, 2003,17(1): 26-29.
- [2] Alarcon-Aguilar F J, Valdes-Arzate A, Xolalpa-Molina S, et al. Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha* [J]. *Proceedi Western Pharmacol Soc*, 2003, 46:139-142.
- [3] Qiu Y, Chen Y. Constituents with radical scavenging effect from *Opuntia dillenii*; structures of new alpha-pyrones and flavonol glycoside [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2002,50 (11): 1507-1510.
- [4] Wolfram R M, Kritiz H, Efthimiou Y, et al. Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia-a pilot study [J]. *Wien Klin*

- Wochenschr, 2002, 114(19-20): 840-846.
- [5] Budinsky A, Wolfram R, Oguogho A, et al. Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury [J]. *Prostag Leukotr Essent Fat Acids*, 2001, 65(1): 45-50.
- [6] Tao M H. Hyperglycemic and immune activity of *Opuntia dillenii* Haw. crude polysaccharide in diabetic mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(Suppl): 144-147.
- [7] Gou L. The purification and preliminary analysis on polysaccharides of *Opuntia vulgaris* Mill. [J]. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 1997, 15(2): 163-165.
- [8] Karsten, Kenneth Abraham S. Afr. S. Cactus extract for treatment of diabetes [P]. ZA: 9304, 523 (Cl. A61K), 1994-01-27.
- [9] Marshak D R. *Strategies for Protein Purification and Characterization: a Laboratory Course Manual* (蛋白纯化策略及特征: 实验室教程手册) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [10] Ge W, Huang Y L. Study of the separating water-soluble polysaccharide from cactus [J]. *J Jiangxi Inst Edu* (江西教育学院学报), 2002, 23(3): 34-35.
- [11] Jin D H, Ji Y H, Cui Y H, et al. Extraction of crude polysaccharide from stem of *Opuntia dillenii* Haw. and determination of polysaccharide content [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(3): 199-200.
- [12] He H C, Zheng R Z. Extraction of polysaccharide from *Opuntia dillenii* Haw. [J]. *Chin J Tropical Agric* (热带农业科学), 2000, (4): 34-38.

苦荞茎叶粉中总黄酮酶法提取工艺研究

王 敏¹, 高锦明², 王 军¹, 王丽云¹

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:目的 研究苦荞茎叶粉中总黄酮酶法提取工艺。方法 苦荞茎叶粉经纤维素酶处理后用水提取总黄酮, 研究酶加酶量、解温度、酶解时间和 pH 值对总黄酮得率的影响。结果 酶法提取的最佳工艺条件为: 酶解温度 55℃, 加酶量 3.0 μL, pH 值 6.5, 酶解 90 min, 再在 90℃下提取 3 次, 每次 30 min, 总黄酮得率可达 1.47%。结论 纤维素酶适用于苦荞茎叶粉中总黄酮的辅助提取。

关键词:苦荞茎叶粉; 总黄酮; 纤维素酶; 正交试验

中图分类号:R284.2; R284.06

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)11-1645-04

Extracting technology of total flavones in powder of *Fagopyrum tataricum* stem and leaf by enzymatic treatment

WANG Min¹, GAO Jin-ming², WANG Jun¹, WANG Li-yun¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China; 2. College of Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract; Objective To optimize the extracting technology of total flavones in powder of *Fagopyrum tataricum* stem and leaf by enzymatic treatment. **Methods** The powder was treated by cellulase before extracted using water, the effects of enzyme dosage, treatment temperature, treatment time, and pH value on the extract rate of total flavones were studied. **Results** The optimum extracting technology was as follows: enzymatic treatment temperature: 55℃, enzyme dosage: 3.0 μL, pH value: 6.5, treatment time: 90 min, extracting 3 times at: 90℃ for 30 min once. The extract rate of total flavones was 1.47% by this technology. **Conclusion** Cellulase could be applied in the assistant extraction of total flavones in powder of *F. tataricum* stem and leaf.

Key words: the powder of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaerth stem and leaf; total flavones; cellulase; orthogonal test

荞麦为蓼科双子叶药食兼用植物, 主要有两个栽培种: 一是鞑靼荞麦 *Fagopyrum tataricum* (L.)

Gaertn., 也称为苦荞 (tartary buckwheat), 一是普通荞麦 *F. esculentum* Moench, 也称为甜荞 (buck-

收稿日期: 2006-03-17

基金项目: 科技部攻关计划重大项目 (2003BA901A19); 西安市 2003 年农业科技攻关计划项目 (NG200317)

作者简介: 王 敏 (1967-), 女, 河南堰城人, 副教授, 博士, 主要从事食品营养与功能食品研究。

Tel: (029) 87092816 E-mail: wangmin 20050606@163.com