

# 桑黄总多糖的提取及其单糖组成分析

牟珍珍<sup>1</sup>, 王明芳<sup>1</sup>, 高雯雯<sup>1</sup>, 张娜<sup>1</sup>, 俞淑文<sup>1,2\*</sup>

(1. 山东大学药学院, 济南 250012; 2. 山东大学附属济南市中心医院, 济南 250013)

**[摘要]** 目的: 优化桑黄子实体总多糖的提取工艺并初步分析其单糖组成。方法: 采用苯酚-硫酸法测定总多糖含量。以总多糖提取率为指标, 通过单因素试验和正交试验考察提取时间、提取次数、料液比对桑黄子实体总多糖微波提取工艺的影响, 利用 TLC 初步确定不同产地和树种桑黄总多糖的单糖组成。结果: 最佳提取条件为加 50 倍量水提取 5 次, 每次 15 min。东北桑树、东北白桦树、甘肃桑树及湖南桑树桑黄中总多糖提取率分别为 5.37%, 2.21%, 3.04%, 3.35%, 均含有半乳糖和葡萄糖; 山东桑树桑黄总多糖提取率 2.77%, 含有木糖、半乳糖、葡萄糖和乳糖; 未知来源桑树桑黄中总多糖提取率 3.58%, 含有葡萄糖。结论: 微波提取法稳定性好、提取率高。东北桑树桑黄中总多糖含量较高, 可初步确定桑黄子实体总多糖中均含有葡萄糖。

**[关键词]** 桑黄总多糖; 薄层色谱法; 单糖组成; 苯酚-硫酸法

**[中图分类号]** R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0013-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180013

## Extraction and Monosaccharide Composition Analysis of Total Polysaccharides from *Phellinus igniarius*

MOU Zhen-zhen<sup>1</sup>, WANG Ming-fang<sup>1</sup>, GAO Wen-wen<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>1</sup>, YU Shu-wen<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China;

2. Ji'nan Central Hospital Affiliated Shandong University, Ji'nan 250013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of total polysaccharides from fruiting body of *Phellinus igniarius* and preliminary analyze its monosaccharide composition. **Method:** The content of total polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid method. With yield of total polysaccharides as index, single factor tests and orthogonal design were adopted to optimize extraction process by taking liquid-solid ratio, extracting time and times as factors, monosaccharide composition of total polysaccharides from different origin and species of *P. igniarius* was determined by TLC. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: extracted 5 times with 50 times the amount of water for 15 minutes each time. Yields of total polysaccharides in *P. igniarius* from Dongbei mulberry, Dongbei birch, Gansu mulberry and Hunan mulberry were 5.37%, 2.21%, 3.04% and 3.35%, they all contained glucose and galactose; yield of total polysaccharides in *P. igniarius* from Shandong mulberry was 2.77%, which contained xylose, galactose, glucose and lactose; yield of total polysaccharides in *P. igniarius* from un-know place was 3.58%, which contained glucose. **Conclusion:** Microwave extraction method is stable with high extraction rate. The content of total polysaccharides in *P. igniarius* from Dongbei mulberry is highest by comparing with other origin and species, TLC can preliminary determine total polysaccharides from fruiting body of *P. igniarius* all contain glucose.

**[Key words]** total polysaccharides from *Phellinus igniarius*; TLC; monosaccharide composition; phenol-sulfuric acid method

**[收稿日期]** 20140113(003)

**[基金项目]** 山东省科技发展计划项目(2012GSF11911); 济南市科技计划项目(201101025)

**[第一作者]** 牟珍珍, 从事药学研究, Tel: 13366106552, E-mail: mouzhenzhen1991@163.com

**[通讯作者]** \* 俞淑文, 副主任药师, 博士, 硕士生导师, 从事药剂学与临床药学研究, Tel: 0531-85695280, E-mail: yushuwen@sdu.edu.cn

桑黄学名裂蹄木层孔菌,是一种名贵的真菌类药材,其子实体具有抗肿瘤<sup>[1-3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抑菌<sup>[5]</sup>等药理活性。现代医学研究表明桑黄子实体提取物具有明显的抗癌作用,对小鼠肉瘤 S<sub>180</sub> 抑制率达 96.7%,同时具有降低肝纤维化和提高机体免疫力等功能<sup>[6-8]</sup>。研究表明桑黄水提取物中主要活性成分为多糖类<sup>[9-10]</sup>,该化合物常选择水为溶剂进行热水浸提<sup>[11]</sup>、深层发酵<sup>[12]</sup>等处理。目前,关于桑黄中多糖类成分的提取研究较少<sup>[11,13]</sup>,且均存在提取时间较长的缺点。本实验拟采用微波提取法,通过单因素试验和正交试验优选提取工艺,分析 6 种不同产地或树种的桑黄子实体中总多糖的单糖组成,为该成分的后续药效试验提供参考。

## 1 材料

202-1 型干燥箱(上海市实验仪器总厂),TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),AL104-IC 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

桑黄子实体分别采自东北、山东、甘肃、湖南、未知来源桑树及东北白桦树,经山东中医药大学附属医院药学部孙洪胜主任药师鉴定为真菌类担子菌纲多孔菌目多孔菌科桑黄 *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel. [*Fomes igniarius* L. ex Fr.] 的子实体; L(+)-鼠李糖、D(+)-半乳糖、D-果糖(BR, 国药集团化学试剂有限公司),葡萄糖、乳糖(天津市广成化学试剂有限公司),D-木糖(上海蓝季科技发展有限公司),薄层色谱硅胶 GF254(青岛海洋化工有限公司),水为蒸馏水,试剂为分析纯或化学纯。

## 2 方法与结果

**2.1 子实体干粉的制备** 将 6 种不同产地的桑黄子实体用铁锤碎成小块,放在烘箱中于 60 ℃ 烘烤 24 h,烘干后粉碎成细粉,收集,于干燥处密封保存,备用。

### 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 料液比** 准确称取桑黄子实体粉末 3 份,每份 5 g,设定微波炉为中高火档,分别按料液比 1:30, 1:40, 1:50 加水重复提取 3 次,每次 15 min,抽滤,合并 3 次滤液,减压浓缩至约 20 mL,浓缩液加水定容至 25 mL。精密量取该溶液 1 mL,加水定容至 100 mL,采用苯酚-硫酸法<sup>[14-15]</sup>测定桑黄总多糖提取率分别为 4.56%, 5.25%, 4.49%,故选择料液比 1:40。

**2.2.2 提取次数** 准确称取桑黄子实体粉末 4 份,

每份 5 g,设定微波炉为中高火档,分别加 50 倍量水提取 2, 3, 4, 5 次,每次 15 min,其他处理同 2.2.1 项,结果桑黄总多糖提取率分别为 3.01%, 3.36%, 3.66%, 3.65%,故选择提取数 4 次。

**2.2.3 提取时间** 准确称取桑黄子实体粉末 4 份,每份 5 g,设定微波炉为中高火档,分别加 50 倍量水提取 5, 10, 15, 20 min,重复提取 3 次,其他处理同 2.2.1 项,结果桑黄总多糖提取率分别为 3.34%, 3.9%, 4.33%, 4.04%,故选择提取时间 15 min。

**2.3 正交试验优选** 在单因素试验基础上,选择料液比、提取时间、提取次数为考察因素,以总多糖提取率为评价指标,精密称取桑黄子实体粉末 9 份,每份 5 g,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行提取,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 桑黄子实体中总多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比/g·mL <sup>-1</sup>	B 提取数/次	C 提取时间/min
1	1:30	3	10
2	1:40	4	15
3	1:50	5	20

表 2 桑黄子实体中总多糖提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	总多糖提取率/%
1	1	1	1	3.54
2	1	2	2	3.64
3	1	3	3	4.74
4	2	1	2	3.80
5	2	2	3	3.91
6	2	3	1	5.02
7	3	1	3	4.08
8	3	2	1	3.68
9	3	3	2	5.49
K <sub>1</sub>	3.97	3.81	4.08	
K <sub>2</sub>	4.23	3.74	4.31	
K <sub>3</sub>	4.42	5.08	4.24	
R	0.45	1.34	0.23	

表 3 总多糖提取量方差分析

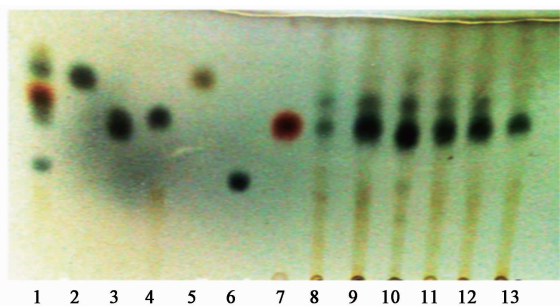
方差来源	SS	F	P
A	0.299	3.250	>0.05
B	3.429	37.272	<0.05
C	0.084	0.913	>0.05
D(误差)	0.092	1	

注: F<sub>0.05</sub>(2, 2) = 19。

由直观分析可知,各因素对总多糖提取率的影响顺序为  $B > A > C$ 。方差分析表明因素  $B$  对总多糖提取工艺的影响显著,其他因素则影响不显著,确定最佳提取工艺为料液比 1:50,提取数 5 次,提取时间 15 min。

**2.4 总多糖的提取** 精密称取不同产地(东北、山东、甘肃、湖南、未知来源桑树及东北白桦树)桑黄子实体粉末各 3 份,每份 5 g,按优选的工艺条件提取,结果总多糖提取率( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )分别为  $(5.372 \pm 0.078)\%$ ,  $(2.776 \pm 0.027)\%$ ,  $(3.041 \pm 0.033)\%$ ,  $(3.352 \pm 0.012)\%$ ,  $(3.583 \pm 0.021)\%$ ,  $(2.214 \pm 0.021)\%$ 。

**2.5 单糖组成分析** 分别称取 6 种不同产地的桑黄子实体总多糖样品 20 mg 置安瓿中,加水 1 mL 使溶解,各加入  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  三氟乙酸 1 mL,充入氮气,熔焊机封口,摇匀,于  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴 4 h,冷却,打开安瓿,吸取上清液于  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  旋转蒸发,加甲醇 4 mL 复溶,旋转蒸发至干,重复操作 3 次,充分除去三氟乙酸。产物加水  $500 \text{ } \mu\text{L}$  使溶解,得桑黄子实体总多糖水解样品。将各水解样品、6 种标准单糖(葡萄糖、乳糖、 $L(+)$ -鼠李糖、 $D(+)$ -半乳糖、 $D$ -木糖、 $D$ -果糖)及这 6 种标准单糖的混合液一起点样<sup>[16]</sup>,以乙酸乙酯-乙酸-甲醇-水(10:2:3:2)为展开剂展开,苯胺丙酮-二苯胺丙酮-磷酸(5:5:1)为显色剂,在干燥箱中  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  显色 10 min,见图 1。结果显示东北桑树、东北白桦树、甘肃桑树和湖南桑树桑黄总多糖中均含有半乳糖与葡萄糖;山东桑树桑黄总多糖含有木糖、半乳糖、葡萄糖和乳糖;未知来源桑树桑黄总多糖含葡萄糖。



1. 混合单糖;2. 木糖;3. 半乳糖;4. 葡萄糖;5. 鼠李糖;  
6. 乳糖;7. 果糖;8. 东北桑树;9. 东北白桦树;10. 山东桑树;  
11. 甘肃桑树;12. 湖南桑树;13. 未知来源桑树

图 1 不同产地桑黄总多糖水解样品 TLC

### 3 讨论

采用微波提取法提取多糖类成分的操作条件温和,与热水浸提法相比提取时间大大缩短<sup>[11]</sup>,适合

桑黄总多糖的提取。文献报道桑黄子实体采用水提醇沉法处理时总多糖提取率  $1\% \sim 3\%$ <sup>[17]</sup>,而采用微波提取时提取率  $2.21\% \sim 5.37\%$ ,说明后者优于前者。不同产地及同一产地不同树种桑黄中总多糖含量及单糖组成各不相同,其抗肿瘤活性亦可能存在差异,需生物活性筛选试验确认。

### [参考文献]

- [1] Li Y G, Ji D F, Zhong S, et al. Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/Akt signaling pathway in colorectal carcinoma[J]. Int J Biol Macromol, 2011, 48(3):511.
- [2] Huang H Y, Chieh S Y, Tso T K, et al. Orally administered mycelial culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(2):460.
- [3] Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, et al. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*[J]. Gann, 1968, 59(9):155.
- [4] Lee Y S, Kim Y H, Shin E K, et al. Anti-angiogenic activity of methanol extract of *Phellinus linteus* and its fractions[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(1):56.
- [5] 刘凡, 庞道睿, 游庭活, 等. 桑黄液体发酵菌丝体提取物抑菌活性研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(18):69.
- [6] Wang H, Wu G, Park H J, et al. Protective effect of *Phellinus linteus* polysaccharide extracts against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: a proteomics analysis[J]. Chin Med, 2012, 7(1):23.
- [7] Chen L, Pan J Z, Li X, et al. Endo-polysaccharide of *Phellinus igniarius* exhibited antitumor effect through enhancement of cell mediated immunity [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(2):255.
- [8] Jeon T, Hwang S, Jung Y H, et al. Inhibitory effect of oral administration of sangwhang mushroom (*Phellinus linteus*) grown on germinated brown rice on experimental lung metastasis and tumor growth in mice[J]. Food Sci Biotechnol, 2011, 20(1):209.
- [9] Wu S J, Liaw C C, Pan S Z, et al. *Phellinus linteus* polysaccharides and their immunomodulatory properties in human monocytic cells[J]. J Funct Foods, 2013, 5(2):679.
- [10] Guo X, Zou X, Sun M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*[J]. Carbohydr Polym, 2010, 80(2):344.
- [11] 秦俊哲, 刘华. 桑黄子实体多糖提取工艺及单糖组成研究[J]. 中国食用菌, 2008, 27(6):43.

# 超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术降低哈蟆油中雌激素的工艺优选

王永生<sup>1,2</sup>, 罗阳<sup>1</sup>, 王诗涵<sup>2</sup>, 王诗惠<sup>2</sup>, 曲晓波<sup>1\*</sup>

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林大学, 长春 130021)

**[摘要]** **目的:** 优选超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术降低哈蟆油中雌激素含量的工艺条件。**方法:** 采用放射免疫法测定雌激素(雌二醇、雌三醇)含量,以哈蟆油中雌激素的平均去除率为指标,通过正交试验考察萃取温度、萃取时间、萃取压力、夹带剂用量对雌激素 CO<sub>2</sub> 超临界萃取工艺的影响。**结果:** 最佳萃取工艺条件为温度 50 ℃,压力 30 MPa,乙醇夹带剂用量 35 mL,萃取时间 4 h;雌激素平均除去率 32.12%,1-甲基海因剩余率 88.7%。**结论:** 优选的 CO<sub>2</sub> 超临界萃取工艺稳定可行,能有效降低哈蟆油中雌激素含量且基本保留了哈蟆油润肺止咳的有效成分。

**[关键词]** 哈蟆油; 雌激素; 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺; 放射免疫法; 雌二醇; 雌三醇

**[中图分类号]** R283.6;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0016-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180016

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140722.1450.008.html>

**[网络出版时间]** 2014-07-22 14:50

## Optimization of Supercritical CO<sub>2</sub> Fluid Extraction Process for Deduction of Estrogen in Ranae Oviductus

WANG Yong-sheng<sup>1,2</sup>, LUO Yang<sup>1</sup>, WANG Shi-han<sup>2</sup>, WANG Shi-hui<sup>2</sup>, QU Xiao-bo<sup>1\*</sup>

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jilin University, Changchun 130021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction process for reducing the content of estrogen in Ranae Oviductus. **Method:** The content of estrogen (estradiol and estriol) was determined by radioimmunoassay, taking average removal rate of estrogen in Ranae Oviductus as index, orthogonal design was adopted to optimize supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction process with entrainer dosage, extraction temperature, time and pressure as factors. **Result:** Optimum process conditions were as follows: extracted 4 h at temperature of 50 ℃ and pressure of 30 MPa, with 35 mL of ethanol as entrainer; average removal rate of estrogen was 32.12%.

**[收稿日期]** 20140417(007)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2011BAI03B07)

**[第一作者]** 王永生,博士,博士生导师,从事中药有效成分研究,Tel:0431-86172298,E-mail:13944165683@163.com

**[通讯作者]** \* 曲晓波,博士,博士生导师,从事中药开发及药理学研究,Tel:0431-86172508,E-mail:quxiaobo0504@hotmail.com

- [12] 杨全,严寒静,李艳辉,等. 药用真菌桑黄菌丝体多糖提取工艺的研究[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(6):697.
- [13] 梁大勇,赵晨,黄芳,等. 响应面法优化桑黄发酵液总多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(4):114.
- [14] 范传颖,陶正明,吴志刚. 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定铁皮石斛中多糖含量的比较[J]. 浙江农业科学, 2013(7):799.
- [15] 李晓红,邹昀员,田易玲,等. 苯酚-硫酸法测定茶藨子叶状层菌发酵菌丝多糖含量[J]. 山东中医杂志, 2013, 32(5):346.
- [16] 于立芹,范毅,陈玲,等. TLC与GC法测定红薯叶多糖的单糖组成[J]. 河南科学, 2011, 29(2):150.
- [17] 王钦博,杨焱,周帅,等. 八种桑黄粗多糖化学组成与体外免疫活性的比较[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(5):873.

[责任编辑 刘德文]