

文章编号:1673-1689(2007)03-0037-04

雪莲水溶性多糖提取工艺的研究

刘春兰, 邓义红, 杨林, 杜宁

(中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081)

摘要:雪莲多糖是一种水溶性的功能性天然多糖,作者比较了料液比、温度、提取时间等因素对新疆雪莲组织培养物中雪莲多糖提取率的影响。结果表明,雪莲水溶性多糖的最佳提取工艺条件为料液比为1 g:12 mL,温度85℃,时间2 h,粗多糖最大得率为7.08%。此粗多糖总糖质量分数为15.37%,从糖含量的角度,新疆雪莲组织培养物提取的粗多糖是野生雪莲提取的粗多糖的优良替代物品。

关键词:雪莲;多糖;提取工艺;正交实验

中图分类号:Q 539

文献标识码:A

Study on Extraction Process of Water Soluble Polysaccharide From *Saussurea involucrata*

LIU Chun-lan, DENG Yi-hong, YANG Lin, DU ning

(College of Life and Environmental Sciences, The Central University for Nationalities, Beijing 100081, China)

Abstract: To optimize the quality and quantity of polysaccharides from *Saussurea involucrata*, a water-soluble polysaccharide was extracted from *Saussurea involucrata* by method of boiling water and ethanol deposition. Reagent proportion, reaction temperature and reaction time were selected with substitution degree and yield as index by $L_9(3^3)$ orthogonal design. The result shows that the optimal extraction conditions were 85℃, 2 h as well as the ratio 1:12 v/v. By Combination with the optimum condition, a high crude polysaccharides (7.08%) was obtained, and the content of polysaccharide was 15.37%.

Key words: *Saussurea involucrata*; polysaccharides; extraction process; orthogonal design

雪莲(*Saussurea involucrata* Kar et Kir)系菊科凤毛菊属的高山草本植物,主要分布在海拔4 000 m以上的高寒地区,是我国中药中的珍稀名贵药材,具有终止妊娠、清除自由基及抗疲劳等功效^[1-2]。由于新疆雪莲生长环境特异,生长缓慢,人工栽培困难,加上长期以来雪莲的粗放型和掠夺性采挖,使雪莲资源严重匮乏。目前雪莲已被列为国

家2级濒危物种而受到保护。

关于雪莲多糖的研究已有报道^[3-4]。随着人们保健意识的增强,对于雪莲多糖的研究及开发越来越重视,应用组织与细胞培养技术进行雪莲的离体细胞培养生产活性成分,是一条可行的途径,以代替野生的雪莲^[5]。就此,采用常用的水提醇沉法从料液比、温度、提取时间等3个因素对培养雪莲多

收稿日期:2006-09-20.

基金项目:国家“985”课题—中央民族大学“985”重点科研项目(cun985-4-4)

作者简介:刘春兰(1962-),女,吉林公主岭人,副教授,理学硕士,主要从事多糖化学研究. Email:liuchunlan888@yahoo.com.cn

糖的提取进行了优化,得出雪莲多糖的最佳提取工艺,为开发利用雪莲资源,探索雪莲多糖的药理活性提供研究线索。

1 材料与方法

1.1 试材

新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar et Kir)系菊科凤毛菊属,购自新疆和静县,由中央民族大学生命与环境科学学院杨林老师鉴定。经乙醇提取的新疆雪莲愈伤组织固体继代培养物的固体残渣由协和医科大学药物研究所提供。野生西藏雪莲粗多糖及野生新疆雪莲粗多糖均由作者所在单位提供。

苯酚液的配制:取苯酚晶体 100 g 置于干烧瓶中,加入 0.1 g 铝片和 0.05 g 碳酸氢钠,加热蒸馏,收集 182 ℃ 馏分 10 g,加蒸馏水 190 g 溶解,置于棕色瓶中备用。

葡萄糖标准贮备液的制备:精确称取 105 ℃ 干燥至恒重的标准葡萄糖(生化试剂)100 mg,置 100 mL 棕色容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 1.0 mg/mL 葡萄糖标准贮备液。所用试剂均为分析纯。

722 型光栅分光光度计:上海分析仪器总厂产品;8002 型电热恒温水浴锅:天津市中环实验电炉有限公司产品;KQ-250DB 超声波清洗机:江苏省昆山市超声仪器有限公司产品;精密电子天平、LD4-8 型离心机:北京医用离心机产品;101-3 型电热鼓风干燥箱:天津市泰斯特仪器有限公司产品;UV-Jasco53 型紫外分光光度计:日本岛津产品。

1.2 方法

1.2.1 雪莲中粗多糖的提取 样品与体积分数 95% 的乙醇混合水浴回流 2 h,过滤,挥干有机溶剂后,滤渣加入一定比例蒸馏水,在一定温度下浸提,每隔 15 min 搅拌 1 次。然后离心(3 000 r/min),上清液用乙醇沉淀,使乙醇体积分数达到一定值,静置过夜,离心(3 000 r/min),回收上清乙醇,沉淀用无水乙醇、乙醚洗涤后于 40 ℃ 真空干燥,即得粗多糖。将此粗多糖称重,得多糖质量。由粗多糖的质量和样品的质量之比得粗多糖得率^[6,7]。

$$\text{多糖得率}(\%) = \left(\frac{\text{粗多糖质量}}{\text{样品质量}} \right) \times 100\%$$

1.2.2 多糖含量的测定 标准曲线制备:精密吸取质量浓度为 1mg/mL 葡萄糖标准溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 均定容 100 mL, 葡萄糖质量浓度分别为 5, 10, 20, 30, 4.0 μg/mL。分别取 1.0 mL, 各加入苯酚溶液 1.0 mL, 混合后迅速加入浓硫酸

5.0 mL, 混合均匀, 另以 1.0 mL 水同上操作, 作空白液。于 40 ℃ 水浴放置 30 min, 取出, 冷却 15 min。取其一, 以空白做对照, 从 430 nm 始每隔壁 10 nm 测定 1 次至 530 nm, 进行最大吸光度测定, 选择最大测定波长 λ_{max}。在 λ_{max} 处测定各管吸光度 A 值, 绘制标准曲线^[8~10]。

样品测定:取 10 mg 粗多糖溶于少量水中, 定容至 100 mL, 静止后取出 1.0 mL, 再定容至 100 mL(此时溶液质量浓度为 10 μg/mL), 精确吸取 1.0 mL 粗多糖液于刻度试管中, 按标准曲线操作测定 A 值。

表 1 试验因素水平表^[11]

Tab. 1 Experiment factor and level

水平	因素		
	料液体积比 A	温度 B/℃	时间 C/h
1	1:8	55	1
2	1:10	70	2
3	1:12	85	3

1.2.3 雪莲中粗多糖的确证及理化性质 取粗多糖水溶液 10 mL, 加入过量的斐林试剂煮沸 2 min, 将产生的红色沉淀趁热除去, 滤液加入硫酸酸化, 加热煮沸 10 min 后用质量分数 10% 氢氧化钠中和, 再加入一定量斐林试剂, 加热煮沸, 观察是否有砖红色沉淀。取粗多糖水溶液 10 mL, 加入 I₂-KI 试剂, 观察溶液是否变蓝。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

结果表明最大吸收波长 λ_{max} 为 490 nm, 见图 1。故以 490 nm 为测定波长。在 490 nm 波长处测定吸光度, 得回归方程: $A = 0.0083C - 0.0014$, $R^2 = 0.9976$ ($n=5$)。试验表明在糖质量浓度 5~40 μg/mL 范围内, 吸光度与糖质量浓度呈现良好的线形关系如图 2。

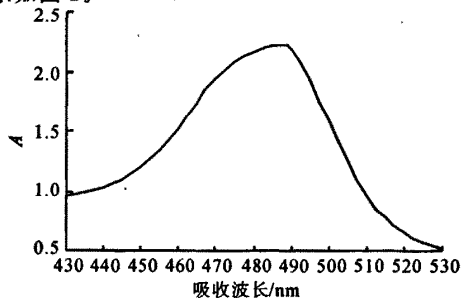


图 1 最佳吸收波长的选择

Fig. 1 The selection of the optimal absorption wavelength

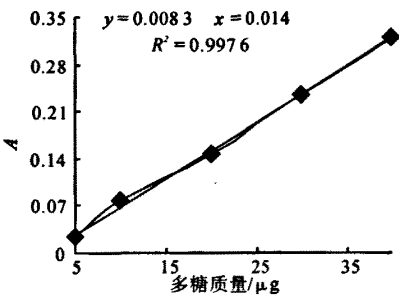


图 2 葡萄糖标准曲线

Fig. 2 The standard curve of glucose

按标准曲线操作测定 A 值,代入回归方程,求出总糖质量分数为 15.37%。在相同的条件下提取后,测得野生新疆雪莲和西藏雪莲粗多糖中糖含量,如表 2。由表 4 可知新疆雪莲组织培养物提取的粗多糖中糖含量和野生新疆雪莲提取的粗多糖中糖含量比较接近,比野生西藏雪莲提取的粗多糖中糖质量分数多 2.57%。从糖含量的角度,新疆雪莲组织培养物提取的粗多糖是野生雪莲提取的粗多糖的优良替代品。

表 2 粗多糖中多糖质量分数

Tab. 2 The content of polysaccharide in rude polysaccharide

雪莲种类	多糖质量分数/%
组织培养物	15.37
野生新疆	16.25
野生西藏	12.80

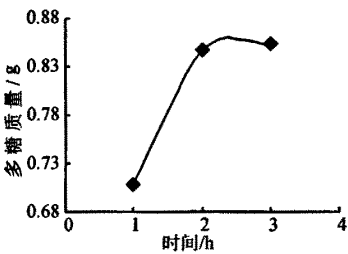
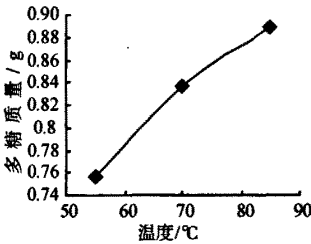
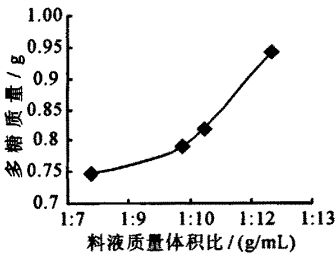


图 3 不同因素对雪莲多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of factor on the extraction rate of polysaccharides from *Saussurea involucre*

表 4 多糖质量方差分析

Tab. 4 Variance analysis based on yield as index

方差来源	离差平方和	自由度	F	显著性
A	0.020 9	2	6.3	
B	0.008 8	2	2.7	
C	0.003 3	2		

$F_{0.05}(2,2)=19.0$

2.2 雪莲多糖提取工艺条件

据多糖提取方法,按照正交实验。结果如表 3 和图 3。不同因素水平对提取率有明显的作用,当料液比增大时,多糖质量增加。当料液比 1 g : 12 mL 时,多糖质量增加很少。提取温度低,多糖扩散慢,提取率低。由图 3 可以看出,在同一条件下随温度增加,多糖质量呈现上升趋势。

随浸提时间的增加,多糖质量也有递增趋势。如图 3 所示,当浸提时间超过 2 h,多糖质量增加不明显,从节能方面考虑,选择浸提 2 h 为宜。

表 3 正交实验结果

Tab. 3 The results of orthogonal design

列号	A	B	C	多糖质量/g	多糖得率/%
1	1	1	1	0.222 4	
2	1	2	2	0.244 1	
3	1	3	3	0.281 6	
4	2	1	2	0.250 2	
5	2	2	3	0.287 4	
6	2	3	1	0.253 8	
7	3	1	3	0.284 6	
8	3	2	1	0.304 4	
9	3	3	2	0.354 0	7.08
K_1	0.748 1	0.757 2	0.780 6		
K_2	0.791 4	0.835 9	0.848 3		
K_3	0.942 0	0.889 4	0.853 6		
R_3^*	0.0646	0.044 1	0.0243		

从表 4 方差分析的结果表明:以多糖质量为指标时,各因素均无显著性影响($P>0.05$)。

从极差 R 值的大小($R_A>R_B>R_C$)可得出,料液比(A)是影响雪莲多糖提取的主要因素,其次是温度(B),最后是浸提时间(C)。从 R 值再结合各因素 K 值,可得出较好的因素水平是 $A_3B_3C_2$,与正交实验所设计的工艺条件基本一致。综合能耗方

面的原因考虑,选择料液比为 1 g : 12 mL, 浸提温度为 85 ℃、浸提时间为 2 h 较为理想。如表 2 所示,以提取多糖质量为目标,料液比以 1 g : 12 mL, 温度 85 ℃, 时间 2 h, 提取率可达 7.08%。

2.3 雪莲粗多糖的分析

雪莲醇沉淀物去除还原糖后,酸化水解,加入适量斐林试剂产生砖红色沉淀,证明雪莲醇沉淀含有多糖成分。在多糖溶液中加入 I₂-KI 试剂,溶液未变成蓝色,说明多糖中不含有淀粉。雪莲中粗多糖是灰褐色粉末,溶于水,不溶于高浓度的乙醇、丙酮等有机溶剂。

参考文献(References):

- [1] 王慧春,徐文华. 藏药雪莲花的研究进展[J]. 青海大学学报,2001,19(4):7-9.
WANG Hui-chun, XU Wen-hua. Advances in studies on *Saussurea involucre*[J]. J Qinghai Univ,2001,19(4):7-9. (in Chinese)
- [2] 高博,梁中琴,顾振纶. 天山雪莲水提取物对小鼠辐射损伤的保护作用[J]. 中草药,2003,34(5):443-445.
GAO Bo, LIANG Zhong-qin, GU Zhen-lun. Protective effect of extract of *Saussurea involucre* on radiation injured mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs,2003, 34(5): 443-445. (in Chinese)
- [3] 方溪,叶伟胜,温志永,等. 雪莲提取物抗生育作用的实验观察[J]. 天津医学院学报,1983,1:41-45.
FANG Xi, YE Wei-sheng, WEN Zhi-yong, et al. Reasrch on anti-reproductivefunction of extraction from *Saussurea involucre*[J]. Tianjin Medical University, 1983, (1):41-45. (in Chinese)
- [4] 郑荣梁,刘光顺,刑光新,等. 大苞雪莲花中多糖清除自由基能力及抗疲劳作用[J]. 中国药理学报,1993,14(Suppl):47-49.
ZHANG Rong-liang, LIU Guang-shun, XING Guang-xin, et al. Free radical scavenging and activities of *Saussurea involucre* polysacchrides[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1993,14(Suppl):47-49. (in Chinese)
- [5] 袁晓凡,赵兵,王玉春. 雪莲的研究进展[J]. 中草药,2004,35(12):1424-1426.
YUAN Xiao-fan, ZHAO Bing, WANG Yu-chu. Advances in studies on *Saussurea involucre*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2004, 35(12):1424-1426. (in Chinese)
- [6] 卫莹芳,王梦月,史森,等. 荨麻多糖的提取及含量测定[J]. 华西药学杂志,2001,16(6):469-470.
WEI Ying-fang, WANG Meng-yue, SHI Yang, et al. Eextraction and drtermination of polysacchrides in *Urtica fissa E. pritz*[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences,2001, 16(6): 469-470. (in Chinese)
- [7] 余晓雷,张可,郑旭霞. 芦荟中多糖含量测定方法的探讨[J]. 营养学报,2003,25(2):149-152.
SHE Xiao-lei, ZHANG Ke, ZHENG Xu-xia, Study on the derermination of aloe oligosaccharides[J]. Acta Nutrimenta Sini-ca,2003.25(2):149-152. (in Chinese)
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1996.
- [9] 蔡云清,杨婕,易凌,等. 树花多糖的提取及含量测定[J]. 食品研究与开发,2002,23(6):88-90.
CAI Yun, YANG Jie, YI Ning, et al. Study On Extraction and The content of polysaccharide from *Schizophyllum Com-mune*[J]. Food Research and Development,2002, 23(6):88-90. (in Chinese)
- [10] 罗毅,潘细贵,刘刚等. 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(1):45-46.
LUO Yi, PAN Xi-gui, LIU Gang, et al. Optimization of the way of coloration in the press of determing polysaccharide content by phenol-sulfuric acid method[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2005, 12(1):45-46. (in Chinese)
- [11] 张珏,张志才,王玉红,等. 灵芝菌丝体碱提水溶性多糖工艺条件及对羟自由基的清除作用[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(3):98-100.
ZHANG Yu, ZHANG Zhi-cai, WANG Yu-hong, et al. Studies on water soluble polysaccharides from the mycelia of *ganoderma lucidun* by alkaline extraction[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24(3):98-100. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)