

文章编号:1673-1689(2007)05-0001-05

牛蒡菊糖的提取及其分离纯化

李丹丹, 刘 葵, 金征宇

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 以水提醇沉工艺, 采用单因素实验和正交实验设计方法研究料液比、提取温度、提取时间以及提取次数对牛蒡菊糖提取率的影响, 得到牛蒡菊糖提取的最佳因素组合: 料液比 1:15 (g:mL), 提取温度 80℃, 提取时间 90 min, 提取 2 次, 提取率为 90.86%。比较不同的脱色、脱蛋白方法, 得到纯度较高的均一多糖。

关键词: 牛蒡; 菊糖; 提取; 纯化

中图分类号: TS 201.1

文献标识码: A

Study on Extraction and Purification of Great Burdock Inulin

LI Dan-dan, LIU Yan, JIN Zheng-yu

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This manuscript was the report on aqueous extraction—alcohol precipitation technology of Burdock oligosaccharide. The effect of each factor such as the ratio of sample to water, the temperature, the time and the times for extraction of Burdock oligosaccharide was investigated by single factor test and orthogonal design test of $L_9(3^4)$. The optimum conditions were that the ratio of sample to water was 1:15, the temperature of extraction was 80℃, the time of extraction was 90 minutes and the times of extraction was 2 times. Using the best technological conditions, the extraction rate of the Burdock oligosaccharide was 90.86%. Compared different methods of de-coloration and de-protein, purified Burdock oligosaccharide was gained.

Key words: great burdock; inulin; extraction; purification

牛蒡别名恶实根、鼠粘根、牛菜等, 属于菊科牛蒡属两年生草本植物, 以肉质根为产品。牛蒡适应性强, 容易种植, 在我国山东、江苏、台湾等省均有大面积种植。

菊糖又称菊粉, 是一种自然界广泛存在的果聚糖, 最早从菊芋中提取出来而得名。它广泛存在于自然界菊科植物体内, 例如菊芋、菊苣、大丽菊、洋

葱等。Edelmen(1968)提出菊粉有两类结构, 一类由果糖残基(F)之间以 β -2,1-糖苷键连接且末端连有一个葡萄糖残基(G)的直链多糖, 结构式为: $G-1, (2-F-1)_n-1, 2-F$, 简称为 GF_n 。绝大部分的菊糖属于此类结构。此外, Erns(1995)菊糖还含有少量的另一类果聚糖, 其末端没有连葡萄糖残基(G), 结构式为: $F-1, (2-F-1)_n-1, 2-F$, 简称为 F_m 。菊糖活性

收稿日期: 2006-11-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20436020).

作者简介: 李丹丹(1981-), 女, 满族, 河北承德市人, 工学博士.

通讯作者: 金征宇(1960-), 男, 江苏扬州人, 教授, 博导, 工学博士, 主要从事粮油与植物蛋白、碳水化合物的研究.

Email: zjin@jiangnan.edu.cn

广泛,可作为防治肿瘤、冠心病、糖尿病、结肠癌、便秘等的保健食品配料和天然药物。据报道,牛蒡根中菊糖含量很高,作者对牛蒡等外根提取的菊糖提取及分离纯化进行了研究,为开发利用这一植物资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料与预处理

牛蒡根采自江苏省沛县牛蒡种植基地,等外品。新鲜的牛蒡根洗净、100℃下灭酶5 min、去皮、切片、60℃下烘干、粉碎、过60目筛得牛蒡根干粉,备用。

1.2 试剂与设备

所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水;大孔阴离子交换树脂 D201、D218、D301-G 由江苏苏青水处理工程集团有限公司提供;大孔阴离子交换树脂 D315 由上海华震科技有限公司提供;Sephadex G-50 葡聚糖凝胶购自 Sigma 公司。

所用设备:FW80 微型高速万能试样粉碎机:天津市泰斯仪器有限公司生产;101-2 型电热鼓风箱:上海市上海县实验仪器厂生产;FA1004 型精密天平:上海天平仪器厂生产;SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司生产;HHS21-6 型电热恒温水浴锅:上海精密仪器厂生产;LXJ-II 型离心沉淀机:上海医用分析仪器厂生产;JJ-1 精密定时电动搅拌机:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司生产;Delta320 型 pH 计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;722 型可见分光光度计:上海第三分析仪器厂产品;高效液相色谱(HPLC)系统:美国 WATERS 公司生产;傅立叶变换红外光谱仪:日本 Shimadzu 仪器公司生产;色谱柱 Ultrahydrogel™ Linear:美国 WATERS 公司产品(300mm×7.8 mm ID)。

1.3 牛蒡菊糖的提取

以牛蒡根干粉为原料,以水为溶剂,采用不同的料液比、提取温度和时间,分次热水浸提和分次过滤,合并提取液。所收集的滤液进行乙醇沉淀,离心,收集滤饼,冷冻干燥,得粗牛蒡菊糖 BOS-1。

1.4 牛蒡菊糖的分离纯化

1.4.1 采用不同树脂对 BOS-1 进行脱色比较 采用静态吸附法,取一定量处理好的离子交换树脂或吸附树脂,加入 50 mL 质量分数约为 1% 的牛蒡菊糖溶液于 150 mL 三角瓶中,恒温振荡水 2 h(120 r/min)。振荡结束后,用滤纸过滤的方法将树脂和牛蒡菊糖溶液分离,将 pH 值调至 6.5,测定溶液在

420 nm、520 nm、620 nm 的吸光度,多糖质量分数,蛋白质质量分数,比较不同树脂的脱色率、菊糖保留率和蛋白质的去除率^[1-3]。

将 BOS-1 溶液以一定流速流经选定的树脂床,收集柱下口的流出液,并用 Molisch 反应检验流出液是否为含糖组分^[4]。

经多次使用后,树脂吸附的杂质较多,颜色变深,可自柱上端分别加入 5 g/mL NaCl 和 5 g/mL NaOH 溶液洗脱,最后用水洗至流出液为中性即可再用。

1.4.2 脱蛋白方法的选择 已经脱色的菊糖用 3 种脱蛋白方法如 Seveage 法、冻融法和三氯乙酸(TCA)法进行量化对比,以确定最佳脱蛋白方法^[5-6]。

1) 采用改进的 Seveage 法脱蛋白,Seveage 试剂为氯仿:正丁醇=4:1(v/v),每次 Seveage 试剂的加入量是牛蒡菊糖提取液的 1/3,搅拌均匀,静置 20~30 min,使混合液完全分层,除去下层的有机溶剂和界面处的蛋白变性胶状物,保留上清液,再按上述比例加入 Seveage 试剂,如此反复处理 9~10 次。

2) 采用冻融法脱蛋白,将糖液在-40℃冷冻,室温缓慢融化,高速离心 8 000 r/min 15 min,除去沉淀,保留上清液,如此反复处理 3~5 次。

3) 采用 TCA 法脱蛋白,牛蒡菊糖提取液中加入 1.5 倍体积的体积分数 5% TCA 溶液,混合均匀,于冰箱中静置 4~6 h,再以 4 000 r/min 的转速离心 15 min,除去沉淀,保留上清液,如此反复处理 2~3 次。

1.4.3 采用 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱层析法进行纯化 称取 20 g Sephadex G-50,加 20 倍量的水使其自然沉降,室温下浸泡 3 h,再置于沸水浴中充分溶胀 1 h,冷却,用倾泻法除去悬浮的过细颗粒,并抽真空排除凝胶内气泡。在搅拌下,连续地装入层析柱(1.6 cm×100 cm)中,再通过 2~3 倍体积的水使柱床稳定。

准确称取已脱色脱蛋白的牛蒡菊糖 0.5 g,溶于 2 mL 水中,上柱,室温下水进行洗脱,体积流量 0.6 mL/min,自动部分收集洗脱液,每 17 min 收集 1 管(每管 10 mL)。用苯酚-硫酸显色法逐管检测,于 490 nm 测定吸光值。根据洗脱体积对吸光值作图,合并单一高峰区的菊糖溶液,减压浓缩,冷冻干燥,得牛蒡菊糖纯品(BOS-2)^[7]。

1.4.4 牛蒡菊糖的纯度鉴定

1) 比旋光度检测:分别称取样品(BOS-2) 0.1,

0.2, 0.3, 0.4 g 和 0.5 g, 各溶于 10 mL 水中, 测定不同质量浓度下样品溶液的旋光度, 计算比旋光度 $[\alpha]^{20D}$ 。

2) 紫外光谱检测: 将 100 $\mu\text{g/mL}$ 样品(BOS-2) 溶液在波长 190~300 nm 处进行紫外扫描, 观察吸收峰^[8]。

3) 高效凝胶渗透色谱检测: 将 10 mg/mL 样品(BOS-2) 溶液经 HPLC 分离, 根据峰型判断样品纯度。分析条件: UltrahydrogelTM Linear, 300 mm $\times$ 7.8 mm ID 色谱柱; 流动相 0.1 mol/L 硝酸钠溶液, 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 2 μL , 示差折光检测器检测^[9]。

1.5 分析方法

1.5.1 菊糖含量的测定 采用改良的苯酚-硫酸法^[5], 以果糖为标准, 以吸光值(A)为纵坐标, 糖浓度(C)为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程: $y = 7.619\ 3x, R^2 = 0.999\ 5$ 。检测原料和所制备的样品中菊糖的含量。

1.5.2 菊糖提取率的测定 菊糖提取率(%) = (样品中菊糖质量/原料中菊糖质量) $\times$ 100

1.5.3 蛋白质含量测定 Folin-酚法。以结晶牛血清白蛋白溶液为标准, 以吸光值(A)为纵坐标, 结晶牛血清白蛋白溶液(C)为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程: $y = 0.234\ 6x + 0.022, R^2 = 0.996\ 8$ 。

2 结果与分析

2.1 牛蒡菊糖的提取

2.1.1 浸提单因素实验 称取牛蒡干粉 15 g, 固定制备工艺中的其他步骤, 对浸提的各因素进行研究。

1) 料液比对牛蒡菊糖提取率的影响

固定提取时间为 60 min, 提取温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 分别采用不同的料液比进行浸提, 考察料液比对牛蒡菊糖提取率的影响。结果表明, 牛蒡菊糖提取率随料液比的增大而增大, 但增加到一定程度($m(\text{g}) : v(\text{mL}) = 1 : 15$) 以后就趋于平稳, 因此宜选取料液比为(1 : 10)~(1 : 20)。

2) 提取温度对牛蒡菊糖提取率的影响

固定提取时间为 60 min, 料液比为 1 (g) : 15 (mL), 采用不同的温度进行浸提, 考察提取温度对牛蒡菊糖提取率的影响。结果表明, 从 60 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 80 $^{\circ}\text{C}$ 提取率有较显著增大, 但从 80 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 100 $^{\circ}\text{C}$ 提取率增大不明显。因此提取温度以 70~90 $^{\circ}\text{C}$ 较为合适。

3) 提取时间对牛蒡菊糖提取率的影响

固定提取温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 料液比为 1 (g) : 15 (mL), 采用不同的时间进行浸提, 考察提取时间对牛蒡菊糖提取率的影响, 结果表明, 牛蒡菊糖提取率随浸提时间的延长而增大, 但增幅递减, 提取 90 min 以后差异不明显。为缩短工时减少能耗, 提取时间以 60~120 min 为宜。

4) 提取次数对牛蒡菊糖提取率的影响

在以上试验的基础上, 选用 1 (g) : 15 (mL), 80 $^{\circ}\text{C}$ 及 90 min 的条件分别提取 1 次、2 次、3 次。结果表明, 提取次数越多, 牛蒡菊糖的提取率越高, 但提取 2 次与 3 次相比, 没有明显差异, 这表明 2 次浸提已基本上把牛蒡根中的菊糖完全提取出来了。因此选择提取 2 次, 可以免去 1 次操作工序和节约能耗、降低成本。

2.1.2 最佳条件的确定 采用正交试验法确定牛蒡菊糖提取的最佳条件, 设计三因素三水平($L_9(3^4)$) 正交试验表(见表 1)。

2.2 牛蒡菊糖的脱色处理

分别向三角瓶中加入 4 种树脂和料液, 用 HCl 调节 pH 值为 6.5, 10 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡, 测定并计算料液的脱色率、菊糖的保留率和蛋白质的去除率, 结果如表 1 所示。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验方案和实验结果
Tab. 1 $L_9(3^4)$ trial schemes and the results

序号	因素水平			粗菊糖 提取 率/%
	A 提取 温度/ $^{\circ}\text{C}$	B 提取 时间/min	C 料液比/ $m/v(\text{g} : \text{mL})$	
1	1(80)	1(60)	1(1 : 20)	79.03
2	1(80)	2(90)	2(1 : 15)	85.35
3	1(80)	3(120)	3(1 : 10)	63.82
4	2(70)	1(60)	2(1 : 15)	49.53
5	2(70)	2(90)	3(1 : 10)	44.21
6	2(70)	3(120)	1(1 : 20)	56.98
7	3(90)	1(60)	3(1 : 10)	63.08
8	3(90)	2(90)	1(1 : 20)	80.42
9	3(90)	3(120)	2(1 : 15)	50.11
K_1	228.20	191.64	216.43	
K_2	150.72	209.98	184.99	
K_3	193.61	170.91	171.11	
k_1	76.07	63.88	72.14	
k_2	50.24	69.99	61.66	
k_3	64.54	56.97	57.04	
R	25.83	13.02	15.10	

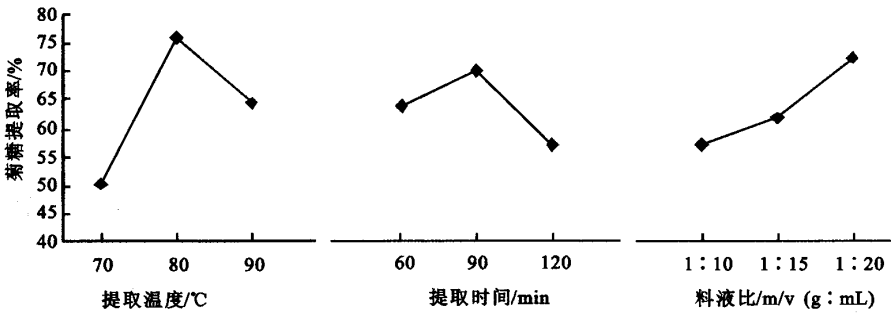


图 1 正交试验因素变化趋势图

Fig. 1 Chang trend of orthogonal experimental factors

从表 2 可以看出, D301-G 脱色率达到了 50% 以上, 多糖保留率也超过了 60%, 并且蛋白质的去除率也接近 80%, 这对菊糖的纯化很有价值。

牛蒡菊糖提取液过 D301-G 树脂脱色, 用 Molisch 反应检验柱下口的流出液是含糖组分, 且处理后的提取液呈白色, 表明采用树脂吸附法脱色效果较好。脱色处理后, 多糖保留率为 74.52%。

表 2 4 种树脂对牛蒡菊糖溶液的脱色效果比较

Tab. 2 Comparison of six types of resin in de-coloration of Burdock Oligosaccharide

树脂种类	脱色率/%	多糖保留率/%	蛋白质去除率/%
D201	20.24	47.06	68.05
D315	41.4	61.59	62.22
D218	25.64	59	74.44
D301-G	74.98	76.96	79.4

2.3 牛蒡菊糖的脱蛋白处理

表 3 牛蒡菊糖的不同脱蛋白方法

Tab. 3 Different de-protein methods of Great Burdock inulin

脱蛋白方法	菊糖中原蛋白质质量分数/%	处理后蛋白质质量分数/%
Seveage 法	7.66	1.025
冻融法	7.66	2.435
三氯乙酸(TCA)法	7.66	0.32

由表 3 可见, Seveage 法和冻融法脱蛋白的效果不如三氯乙酸法。Seveage 法条件比较温和, 不会破坏样品的活性, 能较有效地脱除蛋白, 但操作比较繁琐, 且每次除去的蛋白变性胶状物中不可避免地混有少量糖, 造成提取液中糖的损失。冻融法操作条件最温和, 但其除蛋白效果不佳。TCA 法操作简单, 成本较低, 脱蛋白效果也很好, 但是条件比较不温和。综合考虑, 采用 TCA 法一次除蛋白。

2.4 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱层析

0.5 g 已脱色脱蛋白的牛蒡菊糖粗品经 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱层析分离纯化后的结果见

图 2。可以看出, 样品经柱层析分离后, 出现 1 个大峰(1 号峰)和 2 个小峰(2 号峰和 3 号峰)。1 号峰峰形较对称, 分离效果较好, 且吸光值较大, 表明这部分是牛蒡菊糖粗品的主要成分, 收集合并该高峰区的糖液, 经减压浓缩、冷冻干燥后得牛蒡菊糖纯品(BOS-2)。2 号峰和 3 号峰因吸光值较低, 得率较低, 可能是次要成分, 故未做进一步探讨。

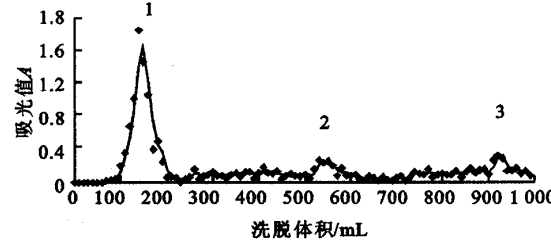


图 2 牛蒡菊糖样品的 Sephadex G50 凝胶柱层析结果

Fig. 2 Column chromatography of burdock oligosaccharide on Sephadex G-50

2.5 牛蒡菊糖的纯度鉴定

2.5.1 比旋光度检测 样品 BOS-2 有旋光性, 在水中为左旋, 而且所配制的各种浓度的样品溶液旋光度值基本一致, 即 $[\alpha]^{20D} = -(25 \pm 1)$ 。说明样品的纯度较高。

2.5.2 牛蒡菊糖样品的紫外吸收光谱分析结果 通过图 3 可知紫外扫描在 260 nm 和 280 nm 处均未见吸收峰, 表明样品中不含大分子蛋白质、多肽和核酸。

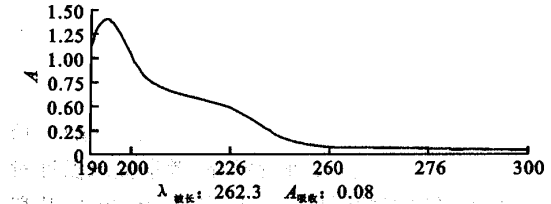


图 3 牛蒡菊糖样品的紫外吸收光谱分析结果

Fig. 3 UV spectrum of Burdock oligosaccharide

2.5.3 高效凝胶渗透色谱分析结果 经高效凝胶

渗透色谱分析,结果显示样品 BOS-2 呈现形状对称的单一峰(图 4),表明样品的纯度较高。

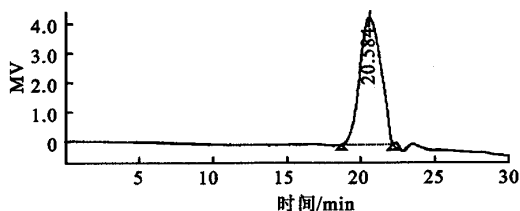


图4 牛蒡菊糖样品的高效凝胶渗透色谱分析结果

Fig.4 HPLC Chromatography of Burdock oligosaccharide

2.6 牛蒡菊糖的理化性质

牛蒡菊糖纯品(BOS-2)为白色絮状粉末,微甜,无臭,易吸湿,易结块,溶于冷水,极易溶于热水,不溶于乙醇、丙酮、乙醚、氯仿、苯等有机溶剂,热稳定性很好。Molish 反应产生紫色环,搅拌后溶液呈

紫色,硫酸苯酚颜色反应为桔红色,蒽酮-硫酸试剂反应呈绿色,表明提取物为多糖。

3 结 语

1) 影响牛蒡菊糖提取的主要条件为料液比、提取时间、温度和次数。通过单因素和正交试验确定了牛蒡菊糖的最佳提取条件为: 料液比 1:15(g:mL)、时间 90 min、温度 80 °C、重复提取 2 次,菊糖提取率可达 90.86%。

2) 对 4 种树脂的脱色效果进行比较,确定 D301-G 树脂进行脱色。脱色率为 54.98%,多糖保留率 66.96%,蛋白质去除率 79.4%。

3) 对牛蒡菊糖脱蛋白的 3 种方法进行对比,结果表明采用 TCA 法效果最好。

4) 采用上述条件所提取的牛蒡菊糖,纯度较高。

参考文献(References):

- [1] 王元凤, 金征宇. 茶多糖脱色的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12): 61-66.
WANG Yuan-feng, JIN Zheng-yu. Study on de-coloration of tea polysaccharides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2004, 30(12): 61-66. (in Chinese)
- [2] I Achaerandio, C Guell, F Lopez. Continuous vinegar decolorization with exchange resins [J]. *Journal of Food Engineering*, 2002, 51: 311-317.
- [3] 黄海, 杨瑞金, 王璋. 低聚木糖的脱色工艺[J]. 无锡轻工大学学报: 食品与生物技术, 2002, 21(2): 125-129.
HUANG Hai, YANG Rui-jin, WANG Zhang. Studies on decolorizing of xylo-oligosaccharides[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2002, 21(2): 125-129. (in Chinese)
- [4] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术: 第二版[M] 杭州: 浙江大学出版社, 1999, 12-13.
- [5] 郭辉, 李善玲, 张红旭, 等. 红毛五加粗多糖脱蛋白工艺比较[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(6): 53-55.
GUO Hui, LI Shan-ling, ZHANG Hong-xu, et al. Comparison between methods for removal of protein from *acanthopanax giraldii* harms polysaccharides[J]. *Research and Practice of Chinese Medicines*, 2004, 18(6): 53-55. (in Chinese)
- [6] 赵梅, 丁霄霖. 甘薯糖蛋白脱游离蛋白的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 90-114.
ZHAO Mei, DING Xiao-ling. Study on removal of protein from sweet potato glycoprotein[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*. 2006, 25(1): 90-114. (in Chinese)
- [7] 郝林华, 陈靠山, 李光友. 牛蒡菊糖及其制备方法的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(3): 423-428.
HAO Lian-hua, CHEN Kao-shan, LI Guang-you. Study on great burdock inulin and its extraction technique[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2004, 34(3): 423-428. (in Chinese)
- [8] 张桂和, 赵谋明, 王伟. 方格星虫多糖分离纯化及性质鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 63-66.
ZHANG Gui-he, ZHAO Mou-ming, WANG Wei. Isolation, purification and property identification of polysaccharide contained in *sipunculus nudus*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 63-66.
- [9] Cecilie Sogn Nergard DD, Terje Einar Michaelsen, Karl Egil Malterud, et al. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *vernonia kotschyana* sch. bip. ex walp[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 91: 141-152.

(责任编辑: 杨 萌)