

王不留行多糖提取工艺研究及其含量测定

李青^{1,2}, 潘再良³, 吴洁^{1,2,*}, 张海江^{2,*}

(1.西南科技大学材料科学与工程学院, 四川绵阳 621010;

2.淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏淮安 223003;

3.苏州杰成医疗科技有限公司, 江苏苏州 215200)

摘要:采用水提醇沉提取工艺, 运用单因素实验和正交实验, 以多糖提取率为评价指标, 确定王不留行多糖的最佳提取工艺条件。多糖含量测定方法采用酶解-苯酚-硫酸法。结果表明, 王不留行多糖最佳工艺条件为提取温度100℃, 提取时间2h, 水料比10:1(mL/g), 提取次数为3次。在此优化条件下的多糖提取率为29.32%。王不留行经清炒炮制后, 多糖提取率降为22.15%。

关键词:王不留行, 多糖, 提取工艺, 酶解, 苯酚-硫酸法

Study on extraction process and content determination of polysaccharides from Semen vaccaria

LI Qing^{1,2}, PAN Zai-liang³, WU Jie^{1,2,*}, ZHANG Hai-jiang^{2,*}

(1.School of Materials Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2.School of Life Science and Chemical Engineering, Huanyin Institute of Technology, Huaian 223003, China;

3.Suzhou Jiecheng Medical Technology Co., Ltd., Suzhou 215200, China)

Abstract: The extraction of bioactive polysaccharide in Semen vaccaria was studied in this paper. The water extract and alcohol precipitate method was used for the extraction of polysaccharides and was optimized by single factor and orthogonal experiments. The polysaccharide content was determined by phenol-sulfuric acid method after enzymatic degradation. The optimum extraction condition was obtained as follows: 100℃, extract for three times with 2 hours and water-material ratio of 10:1(mL/g) for each time. Under the optimal conditions, the polysaccharide yield was 29.32%. The polysaccharide yield for the fried Semen vaccaria was 22.15%.

Key words: Semen vaccaria; polysaccharide; extraction technology; enzymatic degradation; phenol-sulfuric acid method

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)12-0299-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.057

王不留行, 又名麦蓝菜、剪金花、奶米、大麦牛, 是石竹科植物麦蓝菜 (*Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcker) 的种子, 具有催生下乳的功能, 是临床常用的下乳药, 也是常用的奶牛饲料添加剂^[1-3]。已发现的王不留行主要成分包括黄酮类、生物碱类、三萜皂苷类、环肽类、类脂等化合物^[4-8], 但其活性成分仍未明确。本课题组近年来对王不留行的化学成分及其生物活性开展了较为系统的研究, 发现王不留行中的多糖类成分具有显著的利尿通淋作用, 具有重要的研究价值^[9-11]。多糖是构成生命的四大基本物质之

一, 在动植物体内有着广泛分布。已有研究表明, 多糖具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖血脂、抗衰老等多种药理作用^[12-14], 在保健食品和医药应用等方面具有很广的开发应用价值。本文首次报道了王不留行多糖的提取工艺和含量测定研究, 为王不留行多糖的深入研究与开发提供样品的制备和分析方法, 同时, 为进一步拓宽王不留行药材资源的药用途及开发系列功能性食品添加剂提供了一定的参考价值。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

王不留行 河北安国药材市场; 葡萄糖、无水乙醇、浓H₂SO₄、苯酚 均为分析纯; α-淀粉酶 (20000u/g) 食品级。

电子天平 日本岛津; HHS2数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; EYELA旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司; SHZ-D(III)循环水

收稿日期: 2013-09-02 * 通讯联系人

作者简介: 李青 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分析化学。

基金项目: 江苏省教育厅高校科研成果产业化推进项目 (JHB2012-57);

淮安市“533英才工程”资助项目 (141); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目 (12040)。

式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司; Avanti J-26XP高速冷冻离心机 BECKMAN COULTER; FreeZone冷冻干燥机 LABCONCO; T6新世纪紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 王不留行多糖提取工艺流程 10g王不留行→热水浸提→过滤→浓缩→醇沉12h→离心→冷冻干燥→粗多糖。

根据实验设计在相应提取条件(温度、时间、水料比、次数)下,采用热水浸提法提取王不留行多糖,250目滤布过滤,合并提取液,浓缩至100mL左右,加无水乙醇至浓度约75%,醇沉12h,5000r/min离心5min,沉淀经冷冻干燥后研磨,备用。

1.2.2 苯酚-硫酸法测定多糖含量 参照中国药典^[5]和文献[16-18]报道的苯酚-硫酸法并稍作修改,以葡萄糖为标准品制备标准曲线。精确称取105℃干燥至恒重的无水葡萄糖100mg于100mL容量瓶中,加去离子水至刻度,超声溶解得1.0mg/mL的标准葡萄糖母液。基于母液配制15、20、25、30、35、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列葡萄糖标准溶液。用移液枪分别吸取上述浓度的葡萄糖标准液2.0mL于25mL具塞比色管中,然后加入1.0mL新制的6%苯酚,摇匀,迅速加入5.0mL浓 H_2SO_4 ,摇匀,室温显色30min,以2.0mL去离子水按同样显色操作为空白,在490nm波长处测定吸光度。以葡萄糖浓度(X)为横坐标,以吸光度(Y)为纵坐标绘制标准曲线,拟合回归方程。

1.2.3 王不留行多糖含量的测定 直接测定:精确称取25.0mg提取物样品,加入100mL去离子水,于90℃水浴溶解,配制适当浓度的待测样品液,按照1.2.2中的苯酚-硫酸法测定吸光值,根据葡萄糖标准曲线计算提取物中多糖含量。

酶解后测定:精确称取25.0mg提取物样品,加入100mL去离子水,再精密加入相当于约10 μg 淀粉酶的稀释液,于90℃水浴搅拌酶解至用碘液检测到无蓝色为止。配制适当浓度的待测样品溶液,按照1.2.2中的苯酚-硫酸法测定吸光值,根据葡萄糖标准曲线计算提取物中多糖含量。

$$\text{总提取率}(\%) = (\text{提取物质量}/\text{原料质量}) \times 100$$

$$\text{多糖提取率}(\%) = \text{总提取率}(\%) \times \text{多糖含量}(\%)$$

1.2.4 单因素实验设计 按1.2.1工艺流程提取王不留行多糖,设计单因素实验考察提取温度、提取时间、水料比和提取次数对多糖提取率的影响。

1.2.4.1 提取温度考察 固定提取时间2h,水料比20mL/g,提取次数2次;提取温度设计为85、90、95、100℃。

1.2.4.2 提取时间考察 固定提取温度100℃,水料比20mL/g,提取次数2次;提取时间设计为1、2、3、4h。

1.2.4.3 水料比考察 固定提取温度100℃,提取时间2h,提取次数2次;水料比设计为5:1、10:1、20:1、30:1mL/g。

1.2.4.4 提取次数考察 固定提取温度100℃,提取时间2h,水料比20mL/g;提取次数设计为1、2、3、4次。

1.2.5 正交实验设计 在单因素实验基础上,综合

提取成本和效率因素,确定正交实验工艺参数范围,以提取温度、提取时间、水料比和提取次数四个因素设计正交实验,每个因素设定3个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交表,以多糖提取率为评价指标,优化出多糖提取的最优条件。正交实验因素水平设计见表1。

表1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental

水平	因素			
	A 提取温度 ($^{\circ}\text{C}$)	B 提取时间 (h)	C 水料比 (mL/g)	D 提取次数
1	90	1	10:1	1
2	95	2	20:1	2
3	100	3	30:1	3

1.2.6 炮制后王不留行多糖提取 按药典方法^[5],取三批王不留行,每批200g置铁锅内,用电磁炉于中火(1200W)加热,边炒边搅拌,至大部分(85%)王不留行爆开白花,停止加热。取出,放凉,称重。

在正交实验优化所得到的最佳提取工艺条件下,准确称取10g炮制后的王不留行,按照1.2.1工艺流程提取王不留行多糖。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线的建立

苯酚-硫酸法测定葡萄糖标准曲线见图1。以吸光度(Y)对葡萄糖浓度(X)进行线性回归,得回归方程: $Y=0.0159X-0.009$, $R^2=0.9984$ 。实验表明,在15~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,葡萄糖浓度与吸光度之间呈现良好的线性关系。

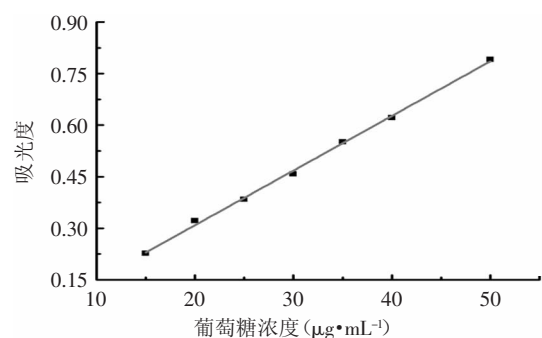


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

2.2 不同方法测定多糖含量的比较

多糖含量测定过程中发现,王不留行多糖的水溶性较差,加热后仍有较多不溶物。碘液实验显示提取液呈阳性反应,表明提取物中的多糖存在 α -1,4和 α -1,6葡萄糖苷键。基于此,实验首先采用淀粉酶对提取物进行酶解,以期将不溶性多糖降解后提高水溶性以有效测定其多糖含量。对提取物样品分别采用直接测定和酶解后测定多糖含量,结果见表2。

酶解后的多糖水溶性明显提高,测得的多糖含量较酶解前有明显提高,论证了实验设想。因此,本研究工作中均采用酶解-苯酚-硫酸法作为多糖含量

表2 酶解前后多糖含量对比 (n=3)

Table 2 Contrast of polysaccharide content before and after enzymatic degradation (n=3)

提取物质量(g)	多糖含量(%)	
	直接测定	酶解后测定
1.68	18.93	93.73

测定方法。同时,这一结果初步显示 α -1,4和 α -1,6葡萄糖苷键是王不留行多糖中的重要糖苷键型。

2.3 单因素实验结果分析

2.3.1 提取温度对王不留行多糖提取率的影响 由图2可看出,多糖提取率随温度的升高而增加,表明温度的升高有利于提高多糖分子的传质速率,同时也增加了多糖在水中的溶解度。提取温度为85~95℃时,王不留行破壁缓慢,且破壁率较低,多糖提取率随着提取温度有缓慢增加。当温度达到100℃时,水沸腾,王不留行迅速破壁,大大加速了多糖溶出,使得多糖提取率从7.51%猛增至24.77%。

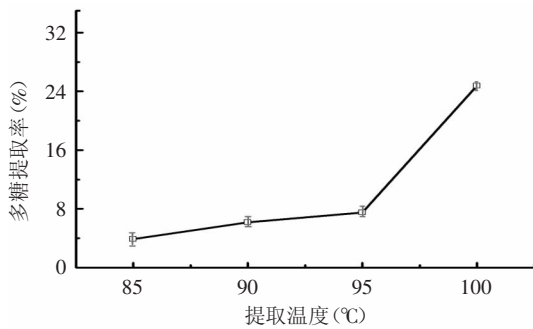


图2 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.2 Influence of extraction temperature on yield of polysaccharide

2.3.2 提取时间对王不留行多糖提取率的影响 由图3可看出,多糖提取率随提取时间的增加呈上升趋势,当达到3h后多糖提取率变小。这是由于随着时间的延长,多糖不断被浸提出来,提取3h后,多糖提取率趋于平缓。

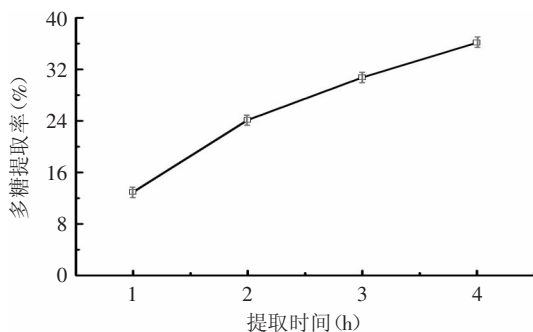


图3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Influence of extraction time on yield of polysaccharide

2.3.3 水料比对王不留行多糖提取率的影响 由图4可看出,多糖提取率随水料比的增加呈上升趋势,根据固液扩散原理,溶剂量的增加有利于多糖分子的转移及

扩散,从而使多糖提取率提高。在10~30mL·g⁻¹水料比范围内,溶剂用量对王不留行多糖提取率影响不大。

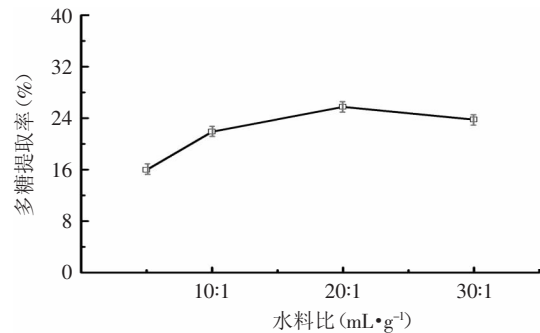


图4 水料比对多糖提取率的影响

Fig.4 Influence of water-material ratio on yield of polysaccharide

2.3.4 提取次数对王不留行多糖提取率的影响 由图5可看出,多糖提取率随提取次数的增加呈上升趋势。当提取3次后,多糖提取率的增加趋于平缓。考虑到时效、能耗等成本因素,设计正交实验的提取次数最多为3次。

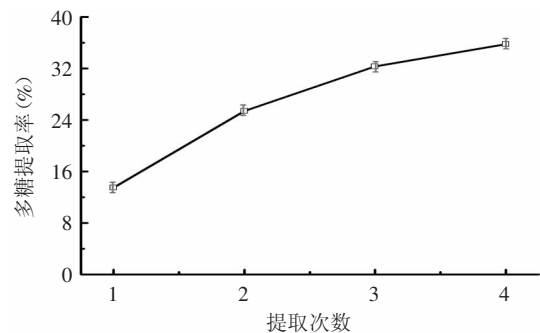


图5 提取次数对多糖提取率的影响

Fig.5 Influence of times of extraction on yield of polysaccharide

2.4 正交实验结果分析

正交实验结果见表3,方差分析见表4。由方差分析结果可知,热水浸提法各因素对王不留行多糖提取率没有显著影响,对其影响的主次顺序与极差分析一致,即A>D>B>C。其中,提取温度对王不留行多糖提取率影响最大,其次是提取次数、提取时间,水料比的影响最小。分析结果表明,王不留行多糖最优提取工艺条件为A₃B₂C₁D₃,即提取温度100℃,提取时间2h,水料比10:1 (mL·g⁻¹),提取3次,恰为正交试验的第8组,此时王不留行多糖提取率为29.32%,提取物中的多糖含量为93.27%。

2.5 王不留行炮制前后对比

王不留行多以清炒炮制后入药,王不留行炮制得率约为86.3% (n=3),即10g王不留行经清炒后得到8.63g炮制品。本文按正交实验优化得到的最佳条件对炮制前后的王不留行分别进行多糖提取,结果见表5。从表5中可以看出,王不留行经炮制后,总提取率和多糖提取率均明显降低,而总提取物中的多糖

表3 正交实验结果

Table 3 Results of Orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	多糖提取率(%)
1	1	1	1	1	0.92
2	1	2	2	2	6.83
3	1	3	3	3	11.58
4	2	1	2	3	4.76
5	2	2	3	1	2.93
6	2	3	1	2	7.89
7	3	1	3	2	9.04
8	3	2	1	3	29.32
9	3	3	2	1	15.73
k ₁	6.44	4.91	12.71	6.53	
k ₂	5.19	13.03	9.11	7.92	
k ₃	18.03	11.73	7.85	15.22	
R	12.84	8.12	4.86	8.69	

表4 方差分析结果

Table 4 Results of ANOVA

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F值
A	300.60	2	150.30	7.87
B	114.21	2	57.10	2.99
C	38.18	2	19.09	1.00
D	130.81	2	65.40	3.43

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

表5 炮制前后的王不留行多糖提取结果($n=3$)Table 5 Results of polysaccharides extraction from Semen vaccaria and fried Semen vaccaria ($n=3$)

处理	总提取率(%)	多糖含量(%)	多糖提取率(%)
炮制前	31.44	93.27	29.32
炮制后	23.16	95.63	22.15

含量相近。表明在炮制过程中,王不留行中的多糖发生了较程度的分解。这为进一步开展王不留行的炮制作用及其机理研究提供了重要的线索。

3 结论

本论文首次对王不留行中多糖成分的提取制备工艺与含量测定开展研究。采用水提醇沉法进行提取,酶解-苯酚-硫酸法测定多糖含量,优化得到最佳工艺条件:提取温度 100°C ,提取时间2h,水料比 $10:1(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$,提取3次,其中提取温度对多糖提取率的影响最大。最优提取工艺下的总提取率和多糖提取率分别为31.44%和29.32%。王不留行经清炒炮制后,总提取率和多糖提取率均明显降低,分别为23.16%和22.15%。研究结果为王不留行多糖的制备和分析提供了可靠的方法学支持,为进一步研究与开发王

不留行多糖打下了良好的科学基础。

参考文献

- [1] 李帆,梁敬钰.王不留行的研究进展[J].海峡药学,2007,19(3):4.
- [2] 万中英,佟慧丽,李庆章,等.王不留行增乳活性单体对奶牛乳腺上皮细胞增殖及泌乳性能的影响[J].乳业科学与技术,2010(2):66-68.
- [3] 孟海洋.王不留行对奶牛乳腺上皮细胞泌乳信号转导通路的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [4] Sang SM, Xia ZH, Lao AN, et al. Studies on the constituents of the seeds of *Vaccaria segetalis*[J]. Heterocycles, 2003, 59(2): 811-821.
- [5] 董红敬,李佳,郭英慧,等.高效液相色谱法测定王不留行中王不留行环肽A和王不留行环肽B[J].药物分析杂志,2012,32(5):793-796.
- [6] 鲁静,林一星,马双成.中药王不留行中刺桐碱和异肥皂草苷分离鉴定和测定[J].药物分析杂志,1998,18(3):163-165.
- [7] 孟贺,陈玉平,秦文杰,等.王不留行中王不留行黄酮苷的分离与鉴定[J].中草药,2011,42(5):874-876.
- [8] 桑圣民,夏增华,毛士龙,等.中药王不留行中黄酮甙类成分的研究[J].中国中药杂志,2000,25(4):221-222.
- [9] Zhang HJ, Wang KW, Wu J, et al. A New Flavonoid Glycoside from *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert [J]. Natural Product Communications, 2011, (1): 1599-1602.
- [10] Zhang HJ, Yao W, Chen YY, et al. Simultaneous determination of four major constituents of Semen Vaccariae Using HPLC-DAD [J]. Natural Product Communications, 2012, 9(7): 1185-1186.
- [11] Zhang HJ, Jing Y, Wu GT. Inhibitory effects of crude polysaccharides from Semen vaccariae on benign prostatic hyperplasia in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 2(145): 667-669.
- [12] 林龙,常建波,孙煜焯.孔石莩多糖降血糖作用研究[J].食品科技,2012,37(6):224-227.
- [13] 刘德胜,刘为忠,颜玲.樱桃叶多糖的抗氧化活性研究[J].中国生化药物杂志,2012,33(5):571-573.
- [14] Li JE, Nie SP, Yang C, et al. Extraction optimization, characterization and bioactivity of crude polysaccharides from *Herba Moslae* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 1201-1206.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典,1部[S].北京:人民卫生出版社,2010.
- [16] 徐静静,艾训儒,李琴,等.正交试验优选延龄草多糖提取工艺研究[J].中药材,2013,36(2):306.
- [17] 郑亚军,陈卫军,赵松林,等.椰花汁多糖提取工艺的研究[J].食品工业科技,2009,30(8):165-166.
- [18] 徐虹,朱雨薇,曹杨,等.莲子红皮多糖提取工艺研究[J].食品工业科技,2011,32(2):26.
- [19] 王钦德,杨坚.食品实验设计与统计分析[M].北京:中国农业出版社,2003:2.
- [20] 李宝艳,万端极.超滤膜法制备豌豆蛋白的工艺[J].食品研究与开发,2010,31(10):75-77.
- [21] 刘中华,曾维丽.微波辅助提取低温豆粕中的大豆蛋白[J].油脂工程,2011(17):58-61.
- [22] 林岩,戴家焜,骆炼,等.大豆蛋白的膜分离技术[J].中国食物与营养,2000(1):21-22.

(上接第239页)