



穿山龙多糖分离纯化工艺的研究

刘莹, 戴玉杰, 张黎明
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以粗多糖得率为指标, 比较水醇法、水提 ZTC 吸附澄清剂法和超声波法三种提取方法, 并以穿山龙多糖含量为指标, 考察采用水醇法提取穿山龙多糖时, 回流时间、固液体积比, 提取次数对多糖含量的影响; 同时, 用硫酸-苯酚法对穿山龙粗多糖中的多糖含量进行了测定. 实验结果表明, 水醇法提取的多糖得率高于水提 ZTC 吸附澄清剂法和超声波法, 分别提高 6.0 倍和 6.6 倍. 水醇法的最佳提取工艺条件: 回流提取时间 90 min, 液料比 1:10, 提取次数 3 次.

关键词: 穿山龙多糖; 提取条件; 硫酸-苯酚法; ZTC 澄清法; 水醇法

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-6510 (2007) 04-0027-04

Study on Separation and Purification of *Dioscorea nipponica* Polysaccharide

LIU Ying, DAI Yu-jie, ZHANG Li-ming

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The yields of *Dioscorea nipponica* Polysaccharide extracted by three methods were compared using the yield of crude Polysaccharide as indexes. The three methods were including water-alcohol extraction, ZTC clarifying and ultrasonic extraction. The influences of the circumfluence time, solid-liquid ratio, extraction time on extraction efficiency were investigated using the content of *Dioscorea nipponica* Polysaccharide as indexes while extracting by water-alcohol extraction. In addition, the content of *Dioscorea nipponica* Polysaccharide was determined by phenol-sulphuric acid method. The results show that the extraction yield of water-alcohol extraction is significantly higher than ZTC clarifying and ultrasonic wave extraction. The extraction yield of water-alcohol extraction can be improved up to 6.0 times and 6.6 times separately. The optimum technological conditions of water-alcohol extraction are that circumfluence time is 90 min, solid-liquid ratio is 1:10, extraction time is 3.

Keywords: *Dioscorea nipponica* polysaccharide; extraction; phenol-sulphuric acid method; ZTC clarifying; water-alcohol extraction

穿山龙异名穿龙骨、狗山药、穿山骨等, 为活血舒筋、祛风止痛的常用药, 全国大部分地区药用商品系薯蓣科植物穿龙薯蓣的根茎. 用于治疗腰腿疼痛、筋骨麻木、风湿热、跌打损伤等症. 近年来经医学研究证明, 穿山龙还具有避孕和抗癌的作用, 药用价值很高^[1]. 穿山龙的有效成分除了甾体皂苷类和淀粉之外, 还含有多糖等成分^[2]. 穿山龙一直被用于提取皂苷, 而其有效成分多糖一直被忽视, 以致多糖大量流失浪费. 多糖在抗凝、降血脂、提高机体免疫力和抗肿瘤、辐射方面都具有显著药理作用和疗效. 复合中药多糖还具有免疫调变及肿瘤生物治疗作用, 可对抗化疗药

物的免疫抑制作用^[3]. 云芝多糖对网状内皮系统吞噬功能有刺激作用^[4], 可使接种 S180 肉瘤后 1gG 抗体下降的小鼠产生抗体能力恢复到正常水平, 对 S180 肉瘤、艾氏腹水癌、吉田肉瘤、腹水型肝癌等实验肿瘤有明显抑制作用. 香菇多糖对小鼠移植性肿瘤也有明显抑制作用^[5], 对 S180、H22 抑瘤率分别为 43%, 47%. 黄芪多糖具有促进免疫器官功能和抗体生成, 抗菌、抗病毒和抗肿瘤, 防衰老及抗辐射, 双向调节血糖等作用^[6].

近年来, 有很多提取方法应用于多糖物质的提取方面. 倪艳等^[7]以黄芪为原料对水煎提取工艺进行了

优化试验. 王莉等^[8]应用微波技术用水提醇沉法制得粗黄芪多糖. 孙素兰等^[9]利用超声波法对灵芝袋泡茶多糖的提取工艺进行多因素研究, 王昭晶等^[10]以穿山龙为原料, 采用热水煮提法和乙醇沉淀法从穿山龙中提取出水溶性粗多糖. 目前, 很少文献提到水醇法提取多糖及提取多糖多种方法的比较, 以及其提取方法的优缺点, 而本文主要研究了水醇法、水提 ZTC 吸附澄清剂法和超声波法的比较, 及多糖提取工艺的优化. 对于多糖的活性研究和资源的有效利用, 多糖提取方法及工艺的优化研究都具有很高的经济和实用价值.

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

苯酚试剂的配制: 取苯酚加入适量碳酸钠、铝片和锌片各 1 g, 将其蒸馏收集 182 °C 的馏分, 配成质量分数 6% 的水溶液. 葡萄糖对照品溶液配制时要将葡萄糖在 105 °C 干燥至恒重, 然后准备称量定容. 水为蒸馏水. 浓硫酸、工业酒精 (95% 乙醇)、无水乙醇、冰乙酸均为国产分析纯.

穿山龙饮片, 山西省离石县医药材公司; ZTC-II 型天然澄清剂, 天津正天成澄清技术有限公司; D-101 大孔吸附树脂, 天津晨光化工厂.

1.2 仪器

医用离心机、723MC 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂; SS230-A 型多功能食物搅拌机, 顺的市容桂区家成电器厂; 电热恒温水浴锅, 中环电炉实验有限公司; FD-2000 型电子天平, 日本 And 公司; LABOROTA4000 型真空旋转蒸发仪, 德国 Heidolph 公司; DFG801 型电热鼓风机, 湖北省黄石市医疗器械厂; SHB-B95 型循环水式真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; FZ102 型微型植物试样粉碎机, 上海申光仪器仪表有限公司; KQ3200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 穿山龙多糖的提取方法

(1) 水醇法

粉碎→回流→离心→再次回流→离心→浓缩→醇沉→过滤→浓缩→ZTC 吸附澄清剂法除蛋白^[11]→醇沉→洗涤→称重

(2) 水提 ZTC 吸附澄清剂法

粉碎→打浆→离心→再打浆→离心→浓缩→ZTC 吸附澄清剂法除蛋白→除皂苷→醇沉→浓缩→

洗涤→称重

(3) 超声波法

粉碎→超声波浸提→过滤→离心→ZTC 吸附澄清剂法除蛋白→浓缩→醇沉→浓缩→醇沉→洗涤→称重

1.3.2 ZTC 吸附澄清剂法除蛋白质

(1) ZTC 吸附澄清剂法除蛋白质作用原理及目的

ZTC1+1 天然澄清剂是一种以天然多糖等为原料制成的天然高分子物质, 安全、无毒, 属新型的食品添加剂, 由 A、B 两组分组成. 其澄清机制是采用“1+1”澄清技术, 一组分起主絮凝作用, 另一组分起辅助絮凝作用. 通常第 2 组分的加入量为第 1 组分的一半. 可以保证第 2 组分的作用完全, 在溶液中不残留. ZTC1+1 澄清剂对蛋白质、鞣质的一次清除率大于 70%, 二次清除率大于 90%, 特别是在热、沸水中澄清, 澄清效果更好^[12].

(2) ZTC 吸附澄清剂法除蛋白质的方法

将回流后所得的多糖提取液倒入烧杯, 将烧杯放入 80 °C 的水浴锅中, 放入提取液量 5% 的配制好的 ZTC 澄清剂的组分 B, 保温 30 min 后加入组分 A, 加入的组分 A 质量应是组分 B 的 1/2, 然后保温 10 min, 离心之后可去除多糖中的蛋白质.

1.3.3 水醇法中各因素对多糖含量的影响

在水醇法提取工艺的基础上, 以穿山龙的多糖含量为指标, 考察了回流时间、固液体积比、提取次数对多糖含量的影响.

(1) 回流时间

准确称取穿山龙磨碎样 10 g, 加 100 mL 水, 分别回流提取 30、60、90、150 min, 硫酸-苯酚法测定多糖含量^[13, 14], 筛选最佳回流时间.

(2) 固液体积比

准确称取穿山龙磨碎样 10 g, 以上述已确定的回流时间, 按固液体积比 1:6, 1:10, 1:14, 1:18, 1:22 提取, 硫酸-苯酚法测定多糖含量, 筛选最佳固液体积比.

(3) 提取次数

准确称取穿山龙磨碎样 10 g, 按上述试验确定的回流时间、固液体积比, 分别提取 1、2、3、4 次, 硫酸-苯酚法测定多糖含量, 筛选最佳提取次数.

1.3.4 测定穿山龙多糖含量的方法

以苯酚-硫酸为显色剂, 用比色法测定穿山龙粗多糖中的多糖含量. 多糖类成分在浓硫酸作用下, 先水解成单糖, 单糖迅速脱水生成糠醛衍生物, 糠醛与苯酚直接结合生成橙色衍生物, 该衍生物在 490 nm

处出现最大吸收,其吸收值与糖质量浓度呈线性关系.标准曲线按文献^[11]方法制作,样品测定以标准曲线计算多糖含量.

1.3.5 水醇法工艺正交实验

L₉(3⁴)正交表分别采用水醇、水提 ZTC 吸附澄清剂、超声波方法,对穿山龙多糖提取工艺参数进行试验,用硫酸-苯酚法测定多糖含量.

2 结果与分析

2.1 提取方法对穿山龙多糖含量及得率的影响

表 1 列出的是三种方法提取的穿山龙粗多糖的得率.如表 1 所示,分别用三种方法所提取的穿山龙多糖的得率中,水醇法的提取多糖得率显著高于水提 ZTC 吸附澄清剂法与超声波法,分别提高了 6.0 倍和 6.6 倍.这是由于穿山龙饮片较坚硬,此植物细胞不易破碎,用超声波法只能低限度的提取其中多糖,导致产品的得率和纯度偏低;而水提 ZTC 吸附澄清剂法提取多糖,虽纯度比较高,但工序较多,其中多糖损失严重,导致多糖得率降低.采用水醇法提取穿山龙多糖过程中,加热煮沸能在机械法破坏细胞结构的基础上进一步使水溶性多糖溶入提取液中,从而提高了穿山龙多糖的得率.所以,实验选取水醇法提取穿山龙多糖,并对此方法的实验条件进行优化.穿山龙中多糖含量和多糖纯度在本文中是相同的,均为多糖质量占原料干重的百分率.

表 1 提取方法对穿山龙多糖得率的影响

Tab. 1 Effect of method on extraction efficiency

| 提取方法 | 粗多糖质量/g | 粗多糖得率/% |
|---------------|---------|---------|
| 水醇法 | 0.351 5 | 3.515 |
| 水提 ZTC 吸附澄清剂法 | 0.059 0 | 0.590 |
| 超声波法 | 0.053 5 | 0.535 |

2.2 单因素对穿山龙多糖含量的影响

回流时间对多糖含量的影响见图 1.由图 1 可知,随着回流时间的延长,多糖含量增加,在 90 min 时达到最大值,继续延长时间同样会造成糖苷键的断裂,使多糖受热而分解,因此导致多糖含量降低,因此,穿山龙多糖提取回流时间的最佳条件为 90 min.

固液体积比对多糖含量的影响见图 2.由图 2 可知,在固液体积比 1:6 至 1:22 的范围内,随着固液体积比的增大,溶质的扩散动力增加,穿山龙材料中的多糖易于扩散到提取液中,因此,多糖含量不断增加;但当固液体积比达到 1:18 时,多糖已基本溶出,继续增加料液比,多糖含量增加不显著,而且还会使

更多的杂质溶入提取液,使纯化工序增加,增加了各个纯化程序的损失.因此,固液体积比 1:10 左右为佳.

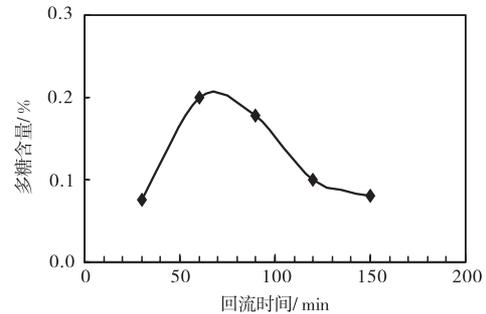


图 1 回流时间对多糖含量的影响

Fig. 1 Effect of circumfluence time on extraction yield

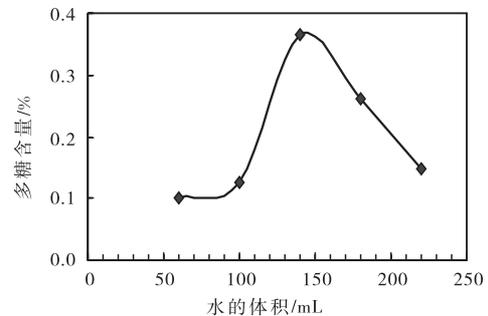


图 2 固液体积比对多糖含量的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on extraction yield

提取次数对多糖含量的影响见图 3.由图 3 可知,随着提取次数的增多,多糖含量不断提高,当提取次数增加到 3 次以后,增加幅度很小,综合考虑后续工序的能源消耗问题,采取 3 次提取较好.

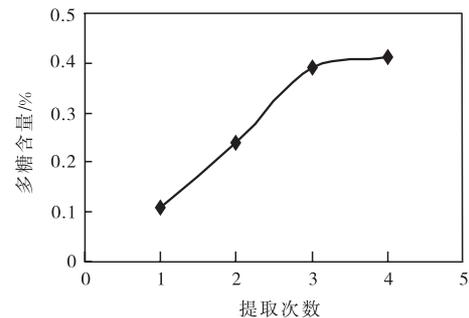


图 3 提取次数对多糖含量的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on extraction yield

2.3 水醇法工艺正交实验

正交实验的设计见表 2、表 3,方差分析见表 4.结果可知,影响提取穿山龙多糖含量因素的主次顺序为:回流时间对多糖含量的影响最大,其次是提取次数,固液体积比影响相对较小.其最佳提取参数为

$A_2B_1C_3$, 即: 回流时间 90 min, 固液体积比 1 : 10, 提取 3 次. 在最佳条件下, 多糖含量为 0.703%.

表 2 水醇法正交实验因素水平表

Tab. 2 Actors and levers of orthogonal design with water extraction

| 实验号 | 回流时间/min (A) | 固液体积比 (B) | 提取次数 (C) |
|-----|-----------------|--------------|-------------|
| 1 | 60 | 1:6 | 1 |
| 2 | 90 | 1:14 | 2 |
| 3 | 120 | 1:18 | 3 |

表 3 正交实验结果

Tab. 3 Orthogonal test and results

| 实验号 | 回流时间/min | 固液比 | 提取次数 | 空白 | 多糖含量/% |
|-----|----------|--------|-------|-------|--------|
| 1 | 60 | 1 : 10 | 1 | 1 | 0.162 |
| 2 | 60 | 1 : 14 | 2 | 2 | 0.217 |
| 3 | 60 | 1 : 18 | 3 | 3 | 0.387 |
| 4 | 90 | 1 : 10 | 2 | 3 | 0.670 |
| 5 | 90 | 1 : 14 | 3 | 1 | 0.601 |
| 6 | 90 | 1 : 18 | 1 | 2 | 0.580 |
| 7 | 120 | 1 : 10 | 3 | 2 | 0.304 |
| 8 | 120 | 1 : 14 | 1 | 3 | 0.248 |
| 9 | 120 | 1 : 18 | 2 | 1 | 0.173 |
| K | 0.222 | 0.279 | 0.197 | 0.212 | |
| K | 0.384 | 0.222 | 0.220 | 0.200 | |
| K | 0.142 | 0.247 | 0.331 | 0.335 | |
| R | 0.242 | 0.057 | 0.134 | 0.135 | |

表 4 方差分析表

Tab. 4 Analysis of variance

| 变异来源 | 平方和 | 均方 | F 值 | 显著性 |
|------|-------|---------|-------|-----|
| A | 0.272 | 0.136 0 | 3.476 | * |
| B | 0.001 | 0.000 5 | 0.013 | |
| C | 0.017 | 0.008 5 | 0.217 | |
| 误差 | 0.310 | 0.038 8 | | |

3 结 论

用水醇法提取多糖的含量及得率较高. 以穿山龙多糖含量为工艺指标优化提取工艺条件, 提取次数对

多糖含量的影响最大, 其次为回流时间, 固液体积比影响相对较小, 试验优化出穿山龙多糖的水醇法提取的最佳工艺条件: 回流时间 90 min, 固液体积比 1 : 10, 提取 3 次. 按此条件提取的穿山龙多糖含量最高, 与其他两种方法相比, 所用成本较低.

参 考 文 献:

- [1] 柳全文, 田景振, 李 民. 穿山龙的成分、药理及临床应用研究概况[J]. 山东中医杂志, 1998, 17 (1): 29—31.
- [2] 李永茂, 何宝俊, 刘振庸. 穿山龙水溶性有效成分的研究[J]. 中国医科大学学报, 1979 (4): 14—16.
- [3] 马世华, 李 言, 许淑敏. 中药多糖生物活性的实验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1994 (5): 27—28.
- [4] 乐 毅, 陈 瑗, 周 玫. 灵芝多糖对受 O-LOL 攻击的小鼠巨噬细胞的保护作用及免疫调节作用[J]. 第一军医大学学报, 1994, 14 (1): 12—14.
- [5] 马占好, 张春艳, 刘 旭, 等. 香菇多糖对小鼠腹水型 S180, H22 抑瘤作用的实验研究[J]. 实用肿瘤学杂志, 1996, 10 (4): 7—8.
- [6] 刘瑞生. 黄芪多糖提取方法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41 (3): 35—36.
- [7] 倪 艳, 苏 强, 刘 霞, 等. 黄芪多糖水煎提取工艺的优化试验研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23 (5): 284—285.
- [8] 王 莉, 刘志勇, 鲁建江, 等. 黄芪多糖的微波提取及含量测定[J]. 中医药学报, 2001, 29 (6): 35—37.
- [9] 孙素兰, 俞励平, 叶青山. 超声波法提取灵芝袋泡茶多糖的实验研究[J]. 食品与药品, 2006, 8 (1): 52—54.
- [10] 王昭晶, 罗巛辉. 穿山龙多糖的提取, 纯化与抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 29—34.
- [11] 李朝兴. 新一代纯天然澄清剂[J]. 离子交换与吸附, 1994, 10 (6): 565—568.
- [12] 段晓颖, 王又红, 潘 白. ZTC1+1 天然澄清剂与乙醇用于清热血口服液除杂的对比研究[J]. 中草药, 1999, 29 (8): 523.
- [13] 常桂英, 孙 仓, 尚严城. 黄芪废弃物中多糖得率的分析[J]. 特产研究, 2000 (2): 25—27.
- [14] 司世麟, 赵春桂. 苯酚-浓硫酸比色法在糖测定中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986 (5): 68—69.