

正交试验法优选繁枝蜈蚣藻粗多糖的提取工艺

朱 良, 张 青, 王一飞, 岑颖洲
(暨南大学生物医药研究开发基地, 广东 广州 510632)

摘 要: 本文对繁枝蜈蚣藻中可溶性粗多糖的提取工艺进行了研究, 通过单因素试验和 $L_9(3^3)$ 正交试验, 研究了料液比、温度、时间对多糖提取率的影响, 结果显示温度和料液比是影响多糖提取率的主要因素, 最佳工艺为料液比1:60, 温度100℃, 时间3h, 在最佳提取工艺时, 繁枝蜈蚣藻的多糖提取率为22.527%。采用紫外检测和茚三酮法检测未见多糖含有核酸、蛋白质。

关键词: 繁枝蜈蚣藻; 可溶性多糖; 提取工艺

Optimum Extraction Process of Polysaccharides from *Grateloupia filicina* by Orthogonal Test

ZHU Liang, ZHANG Qing, WANG Yi-fei, CEN Ying-zhou
(Biomedical Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: This paper studied the extraction process of polysaccharide from *Grateloupia filicina*. Single factor test and orthogonal experiment design methods $L_9(3^3)$ were applied to analyze the effects of the factors such as solid-liquid ratio and temperature and time on the extraction percentage of the polysaccharides. Experimental results indicated that the temperature and solid-liquid ratio would significantly affect the extraction percentage of the soluble polysaccharides. The optimum solid-liquid ratio was: 1:60, the temperature 100℃ and the extraction time 3h. In the conditions, the extraction percentage of soluble polysaccharides in *Grateloupia filicina* was 22.527%. No nuclear-acid and protein has been found in the polysaccharides by ultraviolet detection and Ninhydrin reaction.

Key words *Grateloupia filicina* soluble polysaccharide extraction technology

中图分类号: 0629.12

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0151-04

繁枝蜈蚣藻为红藻门, 蜈蚣藻属繁枝蜈蚣藻 (*Grateloupia filicina*), 是我国东南海域常见的大型藻类, 生长在低潮线, 我国沿海地区均有分布, 可以进行规模化的人工养殖。

繁枝蜈蚣藻多糖具有很好的提高机体免疫、抗病毒作用, 是一种很有发展前途的生物调节剂。我们在进行繁枝蜈蚣藻抗病毒作用的研究时, 首次从中提取出了水溶性的硫酸化半乳聚糖, 并采用苯酚-硫酸比色法测定多糖含量, 获得满意结果, 为利用繁枝蜈蚣藻植物资源提供了依据。目前对繁枝蜈蚣藻的多糖未见有研究报导。

我们采用不同酸碱度来提取繁枝蜈蚣藻多糖, 再检验其抗病毒的效果, 结果表明在中性条件下提取的多糖抗病毒效果最好, 因此本文采用热水浸提法。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

1.1.1 主要材料 繁枝蜈蚣藻。

1.1.2 主要试剂 95% 乙醇、丙酮、甲醇、苯酚、浓硫酸、葡萄糖。

1.1.3 主要仪器

中药粉碎机 温苓市大海药材器械厂; SHB-G 型循环水多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; 电热恒温干燥箱 上海跃进医疗器械厂; 数显恒温水浴锅 巩义市英峪予华仪器厂; 721 型分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取流程

将繁枝蜈蚣藻原料水洗, 在 50℃ 烘干后将其粉碎, 用无水乙醇回流脱脂, 再在 50℃ 时干燥, 然后加入一

收稿日期: 2005-04-08

基金项目: 中国博士后科学基金(2004036506); 广东省自然科学基金团队项目(200311)

作者简介: 朱良(1975-), 男, 博士, 主要从事中草药有效成分分析。

定量的水,在一定温度下进行一定时间的提取,提取液经过减压浓缩得浓缩液,加三倍95%乙醇醇析得粗多糖沉淀,抽滤,沉淀分别用甲醇、丙酮依次洗涤,真空干燥后得粗多糖产品。

1.2.2 多糖含量的测定方法^[1]

本实验采用苯酚—硫酸法测定总的多糖含量。本实验先把葡萄糖用苯酚、硫酸试剂处理后,进行紫外扫描,在489nm处有最大吸收;再利用标准糖浓度和其用苯酚、硫酸试剂处理后在489nm处的吸光度制作标准曲线,再测定待测样品溶液的吸光度,然后根据回归方程计算相应的浓度从而求出多糖含量。

苯酚试液的配制 取苯酚100g,加铝片0.1g和碳酸氢钠0.05g,蒸馏,收集182℃馏分。称取6g,加水溶解,定容于100ml棕色容量瓶(临用前新配)。

标准曲线的制备 精密称取约105℃干燥至恒重的无水葡萄糖804.0mg,置50ml容量瓶中加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液备用。取该溶液分别稀释成0.00504、0.01008、0.02016、0.04200、0.06720、0.08400mg/ml的6个不同浓度的对照品溶液。精密吸取上述溶液各1.0ml置10ml的具塞试管中,加入苯酚2.0ml混匀,再迅速加入浓硫酸5.0ml混匀,置40℃水浴中加热30min,取出放置15min,以蒸馏水同法操作为空白,照分光光度法在489nm处测定吸收度。

粗多糖样品处理 取粗多糖干品100.0mg,用蒸馏水定容于100ml容量瓶,从中吸取5.0ml于100ml的容量瓶中定容。吸取1.0ml于带塞试管中,按上述步骤操作,测其吸光度,以标准曲线计算多糖含量。

1.2.3 单因素试验 料液比采用1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、五个水平,浸提温度采用70、80、90、100℃四个水平,浸提时间采用1、2、3、4、5h五个水平分别进行单因素试验。

1.2.4 正交试验^[2,3]

在上述单因素试验的基础上,选定3因素3水平作正交试验,确定提取繁枝蜈蚣藻中可溶性多糖的最佳工艺参数,用苯酚—硫酸法测定多糖含量,统计试验结果。

1.2.5 核酸、蛋白质的检测

多糖水溶液在200~400nm扫描,在260及280nm处未见有吸收峰,茚三酮法检测未见变色。

2 结果与讨论

2.1 多糖含量的测定

在实验条件下,以吸收度为横坐标,标准液浓度(mg/ml)为纵坐标,得标准曲线,计算回归方程为:

$$C=0.1369A+0.0002, (\text{相关系数 } r=0.9998).$$

$$\text{多糖提取率} = (V \times C \times f \times W_2 / W_3 \times W_1) \times 100\%$$

W_1 : 称取干燥繁枝蜈蚣藻的质量(g);

W_2 : 由 W_1 提取的粗多糖的质量(g);

W_3 : 从 W_2 中称取的用于分析测定的粗多糖质量(g);

V : 溶解 W_3 定容后的体积(L);

f : 多糖的校正系数^[4], $f \approx 0.9$;

C : 由回归方程计算所得多糖的浓度(g/L)。

2.2 热浸提的料液比、温度、时间单因素对繁枝蜈蚣藻可溶性多糖提取率的影响

热浸提工艺涉及三个关键条件:热浸提的料液比、温度和时间。下面就这三个方面进行单因素的试验。

2.2.1 时间的影响

改变时间对多糖的提取率的影响如图3所示。时间单因素试验显示:随着热浸提时间的增加,繁枝蜈蚣藻中多糖提取率也有所增加,但3h以后增加趋势缓慢。

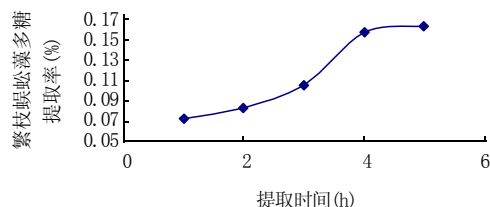


图1 时间对蜈蚣藻多糖提取工艺的影响

Fig.1 Effect of period on the extraction percent of polysaccharides

2.2.2 温度的影响

改变温度对多糖提取率的影响如图2所示。温度单因素试验表明:温度对繁枝蜈蚣藻多糖的提取率有显著的影响,温度的上升伴随着多糖提取率的显著上升。

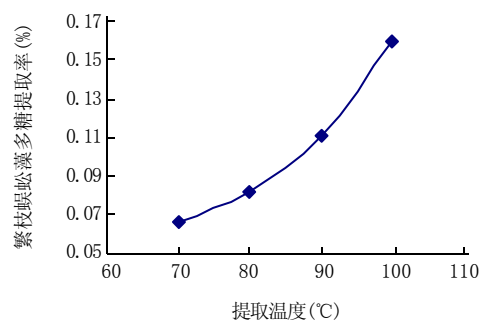


图2 温度对蜈蚣藻多糖提取工艺的影响

Fig.2 Effect of temperature on the extraction percent of polysaccharides

2.2.3 料液比的影响

改变料液比对多糖提取率影响如图1所示。试验结果显示:料液比的上升会增加多糖的溶出量,1:50以后,上升的幅度趋于平缓。

2.3 热水浸提繁枝蜈蚣藻多糖提取率的正交试验

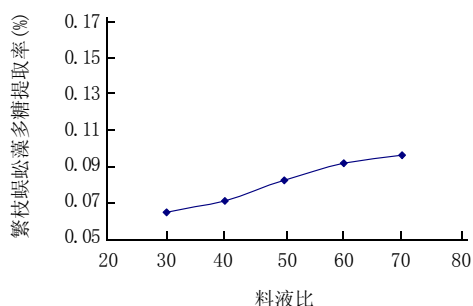


图3 料液比对繁枝蜈蚣藻多糖提取工艺的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on the extraction percent of polysaccharides

2.3.1 正交试验设计和结果的直观分析

在上述单因素试验的基础上,选定3因素3水平作正交试验,因素水平、试验结果计算及分析见表1。

表1 正交实验结果

Table 1 The results of orthogonal experiment

试验	因 素			蜈蚣藻多糖提取率 (%)
	A 时间(h)	B 温度(℃)	C 料液比	
1	2	80	50	8.201
2	2	90	60	15.132
3	2	100	70	16.063
4	3	90	70	15.537
5	3	100	50	18.244
6	3	80	60	13.754
7	4	100	60	22.527
8	4	80	70	13.966
9	4	90	50	16.735
k ₁	39.396	35.921	43.179	
k ₂	47.535	47.404	51.413	
k ₃	53.228	56.834	45.566	
优水平	4	100	60	
K ₁	13.132	11.974	14.393	
K ₂	15.845	15.801	17.138	
K ₃	17.743	18.945	15.189	
R _i	4.611	6.971	2.7444	
主次顺序	B	A	C	

从表1可知,提取温度是影响多糖提取率的最关键因素,其次是提取时间,在实验范围内,料液比的影响最小。

2.3.2 正交试验的方差分析结果

表2 正交实验的方差分析

Table 2 The table of variance analysis of orthogonal experiment

差异来源	d _f	ss	s ²	F	F _{0.05}	F _{0.01}
A(时间)	2	32.220	16.110	155.652**	19.00	99.00
B(温度)	2	73.126	36.563	353.266**	19.00	99.00
C(料液比)	2	11.963	5.982	57.792*	19.00	99.00
误差	2	0.210	0.105			
总变异		117.519				

正交试验的方差分析结果表2显示:温度和时间差异显著对繁枝蜈蚣藻多糖提取率的影响起最主要作用,料液比在此实验范围内对测定结果的影响较小。这与直观分析结果是相吻合的。

2.3.3 正交试验多重性比较

2.3.3.1 提取时间各水平间差异显著性SSR比较

表3 提取时间各水平间差异显著性SSR检验

Table 3 The shortest significant range test of period among different levels

处理	平均数	a=0.05	a=0.01
3	17.743	a	A
2	15.845	a	A
1	13.132	a	A

表3的SSR检验显示:三个水平间都没有显著差异,选平均值最大的,故时间的最佳工艺参数选为4h。

2.3.3.2 温度各水平间差异显著性SSR比较

表4 温度各水平间差异显著性SSR检验

Table 4 The shortest significant range test of temperature among different levels

处理	平均数	a=0.05	a=0.01
3	18.945	a	A
2	15.801	ab	A
1	11.974	b	A

表4的SSR检验显示:控制提取温度非常重要,3与1水平间有显著差异,故温度最佳工艺参数为100℃。

2.3.3.3 料液比各水平间差异显著性SSR比较

表5 料液比各水平间差异显著性SSR检验

Table 5 The shortest significant range test of solid-liquid ratio among different levels

处理	平均数	a=0.05	a=0.01
2	17.138	a	A
3	15.189	a	A
1	14.393	a	A

表5的SSR检验显示:三个水平间都没有显著差异,故选平均值最大的,即料液比的最佳工艺参数是1:60。

2.4 有关提取流程的其他讨论

2.4.1 样品粉碎为10目即可,否则提取后难于离心或过滤,多糖产率也未见有提高。先用95%乙醇除杂脱色,得到的多糖为浅灰色,质量高于不除杂脱色工艺提取的多糖。

2.4.2 粗多糖的醇析采用三倍量的95%乙醇,4℃静置12h以上,沉淀比较完全。

3 结 论

酸浆果实中多糖的提取及含量测定

韩阳花, 高 莉, 刘丽艳, 阿不都拉·阿巴斯*
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 从酸浆果实中分离提取出了多糖, 并应用分光光度法对酸浆果实中的多糖含量进行了测定。经蒽酮—硫酸显色, 于 580nm 处测定, 其多糖的含量为 5.22%, RSD=1.35% (n=3)。研究结果表明, 此测定方法简便, 样品溶液在 4h 内显色稳定, 重现性较好, 平均回收率为 98.9%±1.40%, RSD=1.42% (n=3)。

关键词: 酸浆果实; 多糖; 蒽酮—硫酸法; 含量测定

Extraction and Determination of Polysaccharides in Fruit of *Physalis*

HAN Yang-hua, GAO Li, LIU Li-yan, ABDULLA Abbas
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Polysaccharides from fruit of *Physalis* was isolated and determined by spectrophotometry. The content of polysaccharide measured by anthrone-H₂SO₄ colorimetry under 580nm, was 5.22% with 1.35% of RSD (n=3). The results showed that the method used in this paper was simple, and the colour of the treated samples was stable in 4h, while the average recovery value for the polysaccharide measured was 98.9%±1.40% with 1.42% of RSD (n=3).

Key words *Physalis* fruit; polysaccharides; anthrone-sulfuric acid method; determination

中图分类号: 0623.59

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0154-03

酸浆 (*Physalis alkekengi* L. var. *francheti* (Mast.) Makino), 俗称红姑娘, 挂金灯, 天泡果等, 为茄科酸浆属多年生草本, 圆球形浆果, 外有膨大的花萼包裹^[1]。酸浆果具有药食两用性, 它不但含有丰富的蛋白质、脂肪、微量元素, 还具有多种活性成分, 如植物甾醇、黄酮、甙类及多糖等。

酸浆首载于《神农本草经》, 列为中品, 性味苦、寒, 归肺经; 具清凉、消肿、利尿、止咳、

化痰之功效。现代医学认为酸浆有抗乙肝病毒, 治疗上呼吸道感染及糖尿病的作用。国外常用酸浆做抗癌的草药, 民间也有用其治疗膀胱癌、食管癌之验方^[2, 3]。

多糖是由多个相同的单糖基以糖苷键相连而形成的高聚物。自然界分布极广, 60 年代以来, 人们逐渐发现多糖具有生物活性功能, 如免疫调节功能、抗病毒、抗肿瘤、降血脂、降血糖等^[4]。

目前, 对酸浆的研究主要集中在植物甾醇上, 而

收稿日期: 2005-04-05

*通讯作者

基金项目: 新疆科委自然科学基金资助项目 (2003-09)

作者简介: 韩阳花 (1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向为资源植物有效成分分析。

在热浸提取繁枝蜈蚣藻可溶性多糖的过程中, 温度是影响多糖提取率的最关键因素, 多糖提取的最佳工艺条件为料液比 1:60, 温度 100℃, 时间 4h。此时, 繁枝蜈蚣藻中可溶性多糖的提取率 (相对于繁枝蜈蚣藻被提取的干重) 为 22.527%, 而且不含蛋白、核酸, 有利于繁枝蜈蚣藻多糖的开发利用。

参考文献:

- [1] 陈鸿英, 朱永智, 等. 朝鲜淫羊藿多糖的含量测定[J]. 中草药, 2003, 34(9): 810-811.
- [2] 李巧云, 居红芳, 等. 五味子多糖提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 105-109.
- [3] 于鹏展, 张虹, 等. 正交实验法优选孔石莼 (*Ulva Pertusa*) 多糖的提取工艺[J]. 中成药, 2004, 26(1): 16-18.
- [4] 翟春. 普通念珠藻中多糖的提取、分离、纯化和初步结构分析的研究[D]. 广西大学, 2000.