

窑归多糖提取工艺研究

汪兴平^{1,2}, 程超^{1,2}, 莫开菊^{1,2}

(1. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000

2. 湖北民族学院湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 湖北恩施 445000)

摘要: 本实验以窑归为主要原料, 研究水溶性和碱性窑归多糖的提取工艺。窑归经破碎、提取、酒精沉淀多糖、Sevag法脱蛋白、水透析、醇析等方法得出较高纯度的多糖, 最后, 通过真空冷冻干燥分别得到水溶性多糖和碱性多糖, 经红外光谱证实: 水溶性多糖和碱性多糖具有一般多糖的特征。水溶性多糖的最佳提取参数是: 3h、1:25、加水, 其提取率是3.32%; 碱性多糖的最佳提取参数是: 1mol/L的NaOH溶液提取6h、加1:25的碱液, 其提取率是4.31%。

关键词: 窑归; 水溶性多糖; 碱性多糖; 提取工艺

Study on Polysaccharide Extracting Technique of *Angelica sinensis(oliv.) Diels*

WANG Xing-ping^{1,2}, CHENG Chao^{1,2}, MO Kai-ju^{1,2}

(1. School of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China; 2. Hubei Key Laboratory of Biological Resource Conservation and Utilization, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: Using *Angelica sinensis(oliv.) Diels* as raw material, the extracting technique of water-soluble and alkali-soluble polysaccharide was studied. *Angelica sinensis(oliv.) Diels* is first crashed, extracted, precipitating polysaccharide with alcohol, eliminated protein by Sevag, water bacillus and alcohol bacillus. In the end, water-soluble and alkali-soluble polysaccharide of *Angelica sinensis(oliv.) Diels* can be dried by vacuum freezing. FR-IT proves that the water-soluble and alkali-soluble *Angelica sinensis(oliv.) Diels* have the common traits of some polysaccharide. The best extracting parameter of water-soluble is extracting 4 times with water (1:25) for 3h. The best extracting ratio is 3.32%. The optimum extracting parameter of alkali-soluble is extracting with NaOH (1:25, 1 mol/L) for 6h. The best extracting ratio is 4.31%.

Key words *Angelica sinensis(oliv.) Diels*; water-soluble polysaccharide; alkali-soluble polysaccharide; extracting technique

中图分类号: S567.239

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)11-0287-03

湖北省恩施市红土乡石窑村及其周边地区生产当归(*Angelica sinensis(oliv.) Diels*), 因其根无纤维、香浓、疗效好, 被医家习称为“窑归”(亦称石窑当归), 窑归为伞科多年生草本植物, 药用其干燥块根。具有补血、和血、调经止痛, 润燥滑肠等功效。据报道, 窑归含多糖、多种氨基酸、VA、VB₁₂、VE及多种人体必需元素等^[1]。研究证实, 窑归具有抗血小板、抗凝、改善血液流变性、抗血栓形成等作用及影响心血管系统、增强免疫功能等药理作用。据报道, 窑归对血小板的粘附, 聚集和释放功能均有抑制作用。动物实验证明, 急性脑血栓患者经当归治疗后凝血酶原时间较给药前明显延长。大鼠口服窑归水煎剂后血浆酶原时间及白陶土部分凝血活酶时间明显延长。说明窑归有抗

凝血作用^[2]。多糖是中草药中重要的、具有独特生理功能的主要物质之一^[3]。研究证明, 当归多糖具有清除自由基、提高免疫力、抗肿瘤、抗辐射的效果^[4-6], 窑归多糖对小鼠移植性肿瘤株各具一定程度抑制作用, 其肿瘤生长抑制率最高达39%^[7]。本实验以窑归为研究对象, 探讨窑归多糖的分离提取技术, 为窑归的综合开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料

窑归采于恩施双河, 采集后略加洗涤, 风干后保存, 使用前粉碎, 密闭待用。

收稿日期: 2007-09-18

作者简介: 汪兴平(1963-), 男, 教授, 博士, 主要从事食品化学及生物资源开发利用研究。

1.1.2 主要设备

R-201 旋转蒸发器 上海申科机械研究所; UV7500 分光光度计 上海天美科学仪器有限公司; HITACHI 260-10 型红外光谱仪。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取工艺

水溶性多糖提取工艺: 原料→烘干→粉碎→沸水提取(搅拌)→离心→减压浓缩→95%乙醇沉淀→收集沉淀物→无水乙醇洗涤→干燥→Sevag 法脱蛋白→水透析→醇析→冷冻干燥

碱性多糖提取工艺: 原料→烘干→粉碎→稀碱(NaOH)处理→离心得上清液(废渣用3倍碱液提取一次合并滤液)→抽滤→滤液用1.0%的醋酸液中中和→95%乙醇沉淀→收集沉淀物→无水乙醇洗涤→干燥→Sevag 法脱蛋白→水透析→醇析→冷冻干燥

1.2.2 提取工艺要点

Sevag 法脱蛋白^[8]: 用氯仿、正丁醇按4:1比例混合后, 加至沉淀出且干燥后用水稀释的糖溶液中, 溶液中的蛋白质与混合液形成凝胶, 用离心法除去; 水透析^[8]: 用透析袋装上糖液放入流动清水中1d后取出; 醇析^[8]: 搅拌条件下, 向糖液中缓慢加入95%乙醇, 放置1d; 冷冻干燥^[8]: 把样品放在冷冻干燥机中干燥。

1.2.3 测定方法

制作标准曲线: 蒽酮比色法^[8]; 总糖测定: 苯酚-硫酸法^[8]; 还原糖测定: 直接滴定法^[8]; 茶多糖的红外分析: 取提取的茶多糖2.0mg, KBr 压片, 用HITACHI 260-10 型红外光谱仪在4000~650cm⁻¹区间内进行红外扫描。

2 结果与分析

2.1 提取窑归水溶性多糖工艺条件的优化和最佳因素水平的选择

在单因素试验基础上, 进行了L₉(3²) 正交试验设计, 因素水平见表1, 结果见表2。

表1 正交试验因素水平 Table 1 Factors and levels of orthogonal test		
水平	A 料水比(m/V)	B提取时间(h)
1	1:15	2
2	1:20	3
3	1:25	4

从表2可以看出, 按照极差大小决定因素的主次顺序为A>B, 极差分析的观点认为, 对主要因素选取最佳水平, 对次要因素在原则上可选取实验范围内任一点, 可得出最优的提取工艺条件为A₃B₂, 即料水比为

表2 水溶性窑归多糖提取正交试验
Table 2 Orthogonal test of extracting water-soluble polysaccharide of *Angelica sinensis*(oliv.) Diels

试验号	A	B	提取率(%)
1	1	1	2.21
2	2	1	2.30
3	3	1	2.62
4	1	2	2.53
5	3	2	3.32
6	3	2	3.32
7	1	3	2.81
8	2	3	3.24
9	3	3	3.21
K ₁	7.55	7.13	
K ₂	8.43	8.44	
K ₃	10.15	9.26	
k ₁	2.52	2.38	
k ₂	2.81	2.81	
k ₃	3.38	3.07	
R	0.86	0.69	

1:20、时间3h。

2.2 提取窑归碱性多糖工艺条件的优化和最佳水平的选择

根据单因素试验结果, 进行了L₉(3³) 正交试验设计, 因素水平见表3, 结果见表4。

表3 L₉(3³)正交试验因素水平
Table 3 Factors and levels of orthogonal test

水平	A NaOH溶液(mol/L)	B提取时间(h)	C料液比(V/m)
1	0.5	2	1:5
2	0.75	3	1:6
3	1.0	4	1:7

表4 窑归多糖提取正交试验
Table 4 Orthogonal test of extracting alkali-soluble polysaccharide of *Angelica sinensis*(oliv.) Diels

试验号	A	B	C	得率(%)
1	1	2	3	3.51
2	2	3	2	3.65
3	3	1	1	4.12
4	1	3	1	3.52
5	2	2	2	4.20
6	3	1	3	4.19
7	1	1	2	4.00
8	2	2	3	4.18
9	3	3	1	4.31
K ₁	11.03	12.31	11.95	
K ₂	12.03	11.89	11.85	
K ₃	12.62	14.48	11.88	
k ₁	3.68	4.11	3.99	
k ₂	4.01	3.97	3.95	
k ₃	4.21	4.83	3.96	
R	0.53	0.86	0.04	

由表4可知, 按照极差大小决定因素的主次顺序为

$B > A > C$, 极差分析的观点认为, 对主要因素选取最佳水平, 对次要因素在原则上可选取实验范围内任一点, 综合考虑到生产的经济成本, 可得出最优的提取工艺条件为 $B_3A_3C_2$ 。

2.3 多糖的红外分析

分别取 2.0mg 水溶性、碱溶性多糖, KBr 压片, 用傅利叶变换红外光谱仪在 $4000 \sim 500 \text{cm}^{-1}$ 区内进行红外扫描, 其结果见图 1~2。

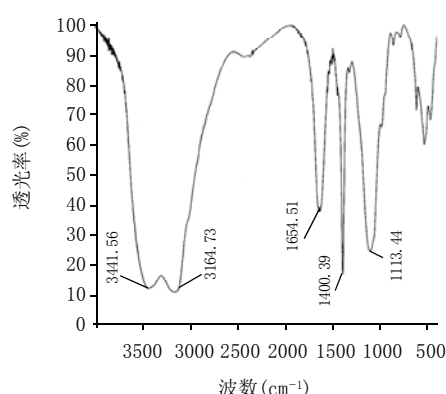


图1 水溶性多糖的红外光谱图

Fig.1 IR of water-soluble polysaccharide of *Angelica sinensis* (oliv.) Diels

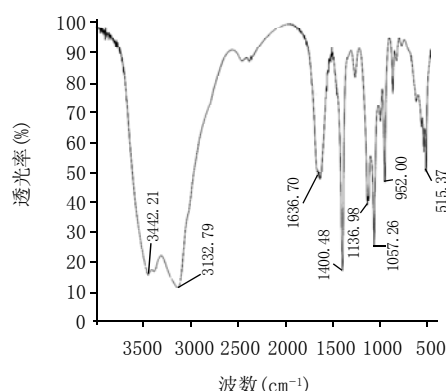


图2 碱溶性多糖的红外光谱图

Fig.2 IR of alkali-soluble polysaccharide of *Angelica sinensis* (oliv.) Diels

从图 1、2 中可以看出水提法提取的窑归水溶性多

糖和经微波处理后提取的窑归水溶性多糖在 $4000 \sim 500 \text{cm}^{-1}$ 内具有多糖性质的一般特征吸收: 即 $3600 \sim 3300 \text{cm}^{-1}$ (水溶性多糖 3442.21cm^{-1} 、碱溶性多糖 3441.56cm^{-1}) (强、宽) 谱带对应于缔合羟基的 $\text{V}_{\text{OH} \cdots \text{O}}$ 伸缩振动; 3000cm^{-1} (水溶性多糖 3132.79cm^{-1} 、碱溶性多糖 3164.73cm^{-1}) 左右为 C-H 的伸缩振动吸收峰; $1400 \sim 1200 \text{cm}^{-1}$ (水溶性多糖 1400.48cm^{-1} 、碱溶性多糖 1400.39cm^{-1}) 左右为 C-H 的弯曲振动吸收峰, $1150 \sim 1060 \text{cm}^{-1}$ 的较宽峰为 C-O 伸缩振动, 1000cm^{-1} 左右为吡喃环结构中 C=O 的吸收峰。 1650cm^{-1} 左右 (水溶性多糖 1636.70cm^{-1} 、碱溶性多糖 1654.51cm^{-1}) 均有酰胺的振动峰, 表明茶多糖中残留有蛋白质。但从图 1、2 中可以看出, 水溶性多糖与碱溶性多糖红外光谱图间存在差异, 说明水溶性多糖与碱溶性多糖在组成上存在一定差异, 其具体有待进一步分析研究。

3 结 论

水溶性窑归多糖最佳提取工艺为: 料水比为 1:25 (m/V)、提取时间为 3h; 碱溶性窑归多糖的最佳提取工艺为: 料液比为 1:6 (m/V)、提取时间为 4h、碱液浓度为 1.0mol/L ; 水溶性提取窑归多糖的最高得率为 3.32%、碱溶性多糖的最高得率为 4.31%, 碱溶性提取多糖的得率比水溶性提取的得率要高。

参考文献:

- [1] 王立恒, 牟乃州. 中医病症诊疗标准[M]. 济南: 黄河出版社, 1990: 171-173.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 2253.
- [3] 梁忠岩. 中草药多糖的应用研究[J]. 长春师范学院学报, 2001, 20(1): 38-40.
- [4] 李贵荣, 吕昌银, 杨胜圆. 当归多糖清除活性氧自由基作用的研究[J]. 南华大学学报: 理工版, 2004, 20(6): 747-749.
- [5] 孔祥峰, 胡元亮, 李祥瑞, 等. 9种中草药成分对新城疫IV系免疫雏鸡血清中血凝抑制抗体水平的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(4): 468-472.
- [6] 骆传环, 崔玉芳, 黄荣清, 等. 当归多糖的制备及抑癌作用[J]. 科学技术与工程, 2003, 3(6): 551-552.
- [7] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 1108.
- [8] 大连轻工业学院, 华南理工学院, 湖北工学院, 等. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.