

黄精含硒多糖的分离提取及含硒量 分析技术研究

汪兴平, 莫开菊, 周大寨, 单长海
(湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

摘 要: 本文以富含硒元素恩施药材—黄精为原料, 对黄精含硒多糖的分离提取技术进行了初步研究。实验采用水浸提、乙醇醇析提取、seavage 脱蛋白、沉淀、真空冷冻干燥等方法研究黄精含硒多糖的提取工艺, 并用蒽酮比色法和原子吸收法对多糖含量、硒含量进行了测验。结果表明: 黄精水溶性含硒多糖最佳提取参数为: 温度 90℃、提取时间 4h、料液比 1:50、提取次数为 2 次, 水溶性多糖含量为 3.12%, 硒的含量为 0.5973 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 黄精多糖; 提取; 硒

Extraction, Separation and Determination of Polysaccharides and Testing of Selenium (Se) in Polygonatum

WANG Xing-ping, MO Kai-ju, ZHOU Da-zhai, SHAN Chang-hai
(School of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: This article used the medicinal material—Polygonatum which was rich in selenium element as experimental material, preliminarily studied the separating and extracting technology of Selenium polysaccharides. The experiments studied the extracting technology by the methods of water extracting, precipitation with alcohol, seavage deproteinizing, precipitation, vacuum freezing drying and the content of polysaccharides and selenium were determined by anthrone colorimetry and atomic absorption spectrometry. The optimum parameters to extract soluble selenium polysaccharides in Rhizoma Polygonati were as follows: temperature 90℃, extracting time 4h, the ratio of water to material 1:50, extracting times 2, the content of soluble selenium polysaccharides 3.12%.

Key words: polygonatum polysaccharides extraction selenium (Se)

中图分类号 Q946.39 0613.52

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)10-0119-04

黄精是百合科黄柏属多种植物, 具补肾、滋阴润燥之功, 用于滋补强身和治疗肾虚精亏、肺虚燥咳以及脾胃虚弱之症已有很长历史, 是中医常用药物之一。现代药理学研究证明, 黄精具有增强免疫、降低血脂、血糖、延缓衰老等多种药理作用。对黄精化学成分的研究表明, 黄精含有黄精皂、多糖类、氨基类及微量元素。尤其对黄精多糖的研究取得一些很有意义的进展, 如黄精多糖具有免疫激发、增强免疫、延缓衰老、抗病毒、延长实验动物寿命, 提高学习、记忆再现能力的作用^[3]。近年来对黄精的研究逐渐增多并不断深入^[2]。

硒是人体必需的微量元素, 硒的生物学功能很多,

诸如抗氧化、抗衰老功能、保护、修复细胞功能、硒能提高红细胞的携氧能力、硒能提高人体免疫力、硒具有解毒、排毒、抗污染作用^[8]。近代研究表明, 硒具有预防癌变的功效。人类患癌, 一是环境中致癌物质(如黄曲霉素)入侵所致, 二是由体内产生的自由基(俗称体内垃圾)造成^[9]。而硒既能抑制多种致癌物质的致癌作用, 又能及时清理自由基, 使其不能损坏细胞膜结构而趋向癌变, 起着清道夫的作用。据报道: 硒营养状态与癌症密切相关, 血硒水平低的人群癌症发生和死亡率高, 美国人防癌采取的措施是每人每天补充硒^[10]。

本文以富含硒元素恩施药材—黄精为原料, 采用水

收稿日期: 2004-08-10

基金项目: 湖北省教育厅团队项目(2003)

作者简介: 汪兴平(1963-), 男, 教授, 主要从事生物资源开发利用。

浸提、乙醇醇析及恩酮比色法测定恩施黄精药材中的黄精含硒多糖含量等工艺和方法, 研究硒多糖的分离提取技术, 并用原子吸收法进行了原料和硒多糖的硒含量测定, 为硒多糖研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄精 采集于恩施双河。

1.2 主要试剂

工业酒精, 氯仿(AR), 亚丁醇(AR), 恩酮(AR), 硫脲(AR)。

1.3 主要仪器设备

电子天平 FA2014 上海天平仪器厂; 分光光度计 UV, 755B 上海分析仪器厂; 大容量离心机 8008 上海安享科学仪器厂; 旋转蒸发器 R201 上海申科机械研究所; 原子吸收分光光度计; 红外光谱仪 傅利叶变换红外光谱仪。

1.4 黄精含硒多糖提取的方法

1.4.1 工艺流程

黄精原料→烘干→粉碎→石油醚回流脱脂→药渣→一定浓度的乙醇浸提→药渣→水提→过滤→浓缩→seavage 脱蛋白→分离液 95% 乙醇醇析→沉淀洗涤→真空冷冻干燥

1.4.2 操作要点

1.4.2.1 原料粉碎 黄精是一种粘性很强的物质, 粉碎前应首先将其切成小块, 于 50℃ 的烘 1~2d, 直到烘干为止, 然后用万能粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 将原料置于原瓶中。

1.4.2.2 脱脂 将原料置于滤纸筒中, 放入索氏提取器内, 连接已干燥到恒重的脂肪接受瓶, 由冷凝管上端加入石油醚, 体积为接受瓶的 2/3, 于水浴上加热使石油醚不断的回流提取。

1.4.2.3 水提 将药渣装入三角瓶中, 按一定比例加入蒸馏水, 封住瓶口, 在一定温度的水浴中抽取一定时间, 若提取几次, 则可滤出水后, 加入同样的水按以上同样的方法操作。

1.4.2.4 离心分离 将水提液加到离心管中, 离心 8min 左右, 倒出上层液, 即分离了药渣。

1.4.2.5 浓缩 将水浴锅内加 3/4 的水, 加热到 75℃ 左右, 然后将水提液移入到圆底烧瓶中, 不得超过 2/3, 操作过程中要防止倒吸, 一般浓缩到原体积的 1/4 左右为止取出。

1.4.2.6 seavage 脱蛋白 采用 5:2 的氯仿—丁醇溶液按

1:1 的比例加入到浓缩液中充分混合, 静置 50min 左右后倒入分液漏斗中, 静置后分离下层的有机溶剂, 从上面倒出水溶液^[11]。

1.4.2.7 醇析 用 95% 的乙醇与分离液充分混合, 搅拌, 使其浓度达到 60% 左右。静置 4h, 便析出多糖。

1.4.2.8 离心分离 将多糖液用离心机分离, 倒出半固体多糖, 残留的少量用少量的蒸馏水洗出。

1.4.2.9 真空冷冻干燥 将湿多糖置于干燥盘内, 于真空度为 20MPa, 温度为 -30℃ 下干燥 2h。

1.5 多糖的含量测定 采用恩酮比色法^[12]。

1.6 硒的测定 原子吸收法^[13]。

称取一定量的样品, 放入消化瓶中, 加入 7ml 硝酸和 2ml 过氧化氢, 静置 30min, 放入微波消解系统中消化, 将消化后的样品定容到 100ml, 上机测定(设定波长为 196.0nm, 狭缝宽度 2.0L)。

1.7 黄精含硒多糖的红外光谱分析

黄精含硒多糖制品采用溴化钾(KBr)压片, 用傅利叶红外光谱仪进行扫描。

2 结果与分析

2.1 提取率的分析

2.1.1 不同料液比对黄精含硒多糖提取率的影响

实验取 40 目黄精原料分别配备料液比例为 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70 的料液, 在相同的温度下(90℃)提取 5h, 得到不同料液比对提取率的影响, 结果见图 1。

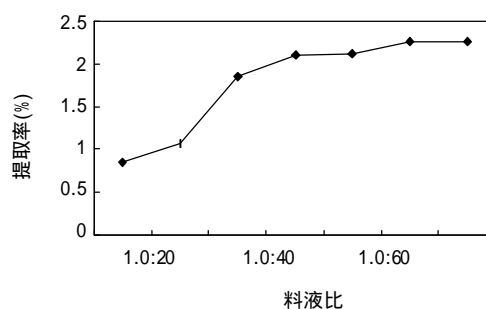


图1 不同料液比的提取率

Fig.1 The extraction in different ratio of material and solution

由上图可以看出, 黄精含硒多糖提取率随着料液比的增加而增加, 当料液比在 1:50 以后便趋于缓和, 但蒸馏水的用量过多反而对实验带来方便, 从综合的因素考虑, 料液比定在 1:50 最佳。

2.1.2 温度对黄精含硒多糖提取率的影响

实验取 40 目黄精原料以一定的料液比(1:50)准备 7、8 份一样的样品, 分别在 30、40、50、60、70、80、90、100℃ 的温度下提取, 探讨温度对黄精含硒多糖提取率的影响, 结果见图 2。

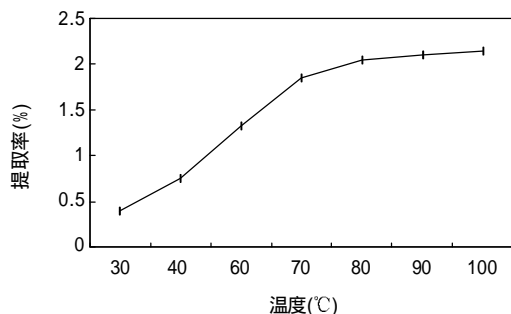


图2 不同温度的提取率

Fig.2 The extraction in different ratio temperature of material and solution

由以上实验结果可以看出, 黄精含硒多糖提取率随着温度的升高而提高, 当温度在 80℃, 趋于缓和, 从综合的因素考虑, 温度在 90℃ 为最佳。

2.1.3 提取时间对黄精含硒多糖提取率的影响

实验取 40 目黄精原料按 1:50 的料液比, 在 90℃ 下分别提取 1、2、3、4、5、6 h, 得出提取时间对黄精含硒多糖提取率的影响见表 3。

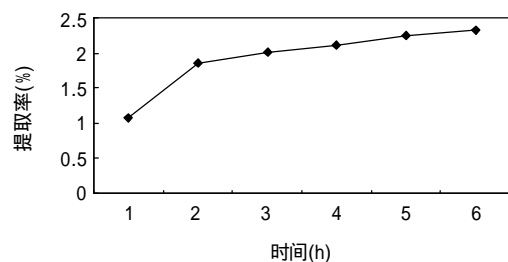


图3 不同时间下的提取率

Fig.3 The extraction in different time of material and solution

由图 3 可以看出, 提取的时间越长, 黄精含硒多糖提取率越高, 在 2h 以后对结果影响不大, 若提取时间过长, 反而会造成更多不必要的反应, 所以从综合考虑可得 4 h 为益。

2.1.4 提取次数对黄精含硒多糖提取率的影响

实验取 40 目黄精原料按料液比 1:50 提取 4h, 分别提取 1, 2, 3 次, 结果见图 4。

由图 4 结果可以看出, 随提取次数的增加, 黄精含硒多糖提取率上升, 但提取率上升率不大, 综合考虑认为提以 2 次为好。

2.1.5 提取黄精含硒多糖工艺条件的优化^[14]

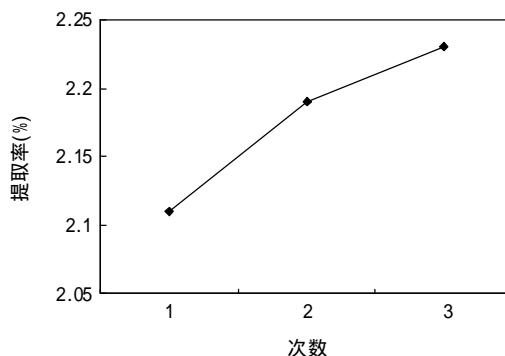


图4 不同提取次数下的提取率

Fig.4 The extraction in different times of material and solution

提取黄精含硒多糖正交实验的因素和水平的确定: 根据以上单因素实验对提取黄精含硒多糖进行了正交实验(设计方案见表 1)以获得最佳提取方案, 结果见表 2 和图 5。

表1 正交实验的因素和水平表

Table 1 The factors and levers of orthogonal design

水平	因素			
	A 料液比	B 温度(°C)	C 时间(h)	D 提次数
1	1:40	80	4	1
2	1:50	90	5	2
3	1:60	100	6	3

表2 正交实验的参数表

Table 2 The result parameter of orthogonal design

实验号	A	B(°C)	C(h)	D	吸光度	得率(%)
1	1:40	80	4	1	0.114	2.41
2	1:40	90	5	2	0.141	2.92
3	1:40	100	6	3	0.091	1.81
4	1:50	80	5	3	0.103	2.05
5	1:50	90	6	1	0.086	1.63
6	1:50	100	4	2	0.165	3.12
7	1:60	80	6	2	0.133	2.54
8	1:60	90	4	3	0.145	2.71
9	1:60	100	5	1	0.121	2.11
K ₁	7.14	7.00	8.24	6.15		
K ₂	6.80	7.26	7.08	8.17		
K ₃	7.36	7.04	5.98	6.98		
k ₁	2.38	2.33	2.75	2.05		
k ₂	2.27	2.42	2.36	2.71		
k ₃	2.45	2.32	1.99	2.32		
R	0.18	0.09	0.76	0.66		

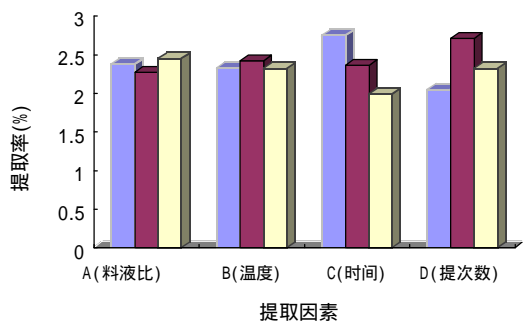


图5 黄精多糖的k值图

Fig.5 The k figure of polygonatum polysaccharides

从表2和图5可以看出:黄精含硒多糖提取技术最佳工艺方案为 $A_3B_2C_1D_2$,其中影响因素依次是 $C > D > A > B$,其中影响最大的是C(浸提时间),其次是D(提取次数),其他因素影响不太明显。黄精含硒多糖的最佳提取的工艺条件为:浸提温度为 90°C ,料液比为1:50,浸提时间为4h,次数为2次。

2.2 含硒量分析

试验分别称取黄精原料和黄精含硒多糖一定量的样品,放入消化瓶中,加入7ml硝酸和2ml过氧化氢,静置30min,放入微波消解系统中消化,将消化后的样品定容到100ml,上机测定(设定波长为196.0nm,狭缝宽度2.0L),结果见表3。

表3 黄精含硒多糖含硒量检测结果

Table 3 The testing result of selenium(Se) content in polygonatum polysaccharides

原料($\mu\text{g/g}$)	黄精多糖($\mu\text{g/g}$)
0.1770	0.5973

从表3可以看出,黄精原料中含有 $0.1771\mu\text{g/g}$ 的硒,而黄精多糖中含有 $0.5973\mu\text{g/g}$ 的硒,说明黄精多糖有硒的存在,但是黄精含硒多糖中硒的形态、价态及硒与多糖的结合方式仍然不清楚,有待于今后研究。

2.3 黄精含硒多糖的结构分析

实验分别取黄精含硒多糖10~20mg进行溴化钾压片,用傅利叶红外光谱仪在 $4000\sim 500\text{cm}^{-1}$ 区进行红外扫描,结果见图6。

图6表明黄精含硒多糖在 $4000\sim 500\text{cm}^{-1}$ 内具有多糖性质的一般特征吸收:即 $3600\sim 3300\text{cm}^{-1}$ 处为-OH和-NH₂的吸收峰, 3000cm^{-1} 左右为C-H的伸缩振动吸收峰, 1600cm^{-1} 左右为酰胺的振动峰, 1400cm^{-1} 左右为C-H的弯曲振动吸收峰, 1000cm^{-1} 左右为吡喃环结构中C=O的吸收峰。但从图6中可以看出,黄精含硒多糖红外光谱图尚有一些特殊吸收峰的出现,其原因和黄精含硒多糖组成、结构有待进一步分析研究。

3 结 论

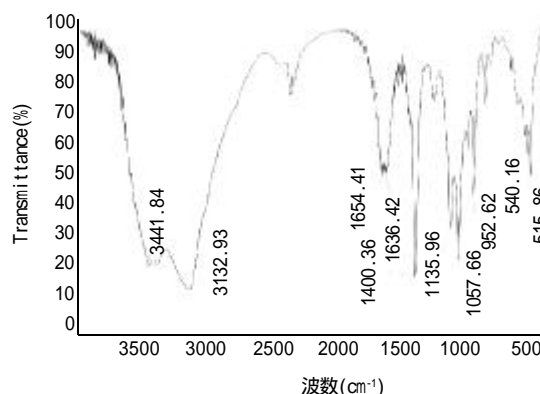


图6 黄精含硒多糖红外光谱图

Fig.6 IR of polygonatum polysaccharides of selenium

3.1 采用水提醇析的方法从黄精中提取水溶性多糖,经过去色素,脱蛋白后,等工艺条件可以初步确定黄精中水溶性多糖含量约为3.12%。

3.2 黄精含硒多糖的最佳浸提条件是:浸提温度的 90°C ,料液比为1:50,浸提时间为4h,浸提次数为2次。

3.3 黄精含硒多糖硒含量为 $0.5973\mu\text{g/g}$,至于黄精含硒多糖硒的形态及硒的价态有待进一步研究。

3.4 黄精含硒多糖的组成及黄精多糖与硒的结合形态和黄精含硒多糖的生理功能有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 王筠默,王恒芬,许长照.中药研究与文献检查[M].上海:上海远东出版社,1994.
- [2] 谈恒山.黄精多糖的免疫激发作用[J].1989,20(11):36.
- [3] 曾庆华.黄精多糖制剂治疗单纯疱疹病毒性角膜炎的实验观察[J].成都中医学院学报,1988,11(1):30.
- [4] 张维杰.糖类复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1994.
- [5] 康永.中药药理学[M].北京:科学出版社,2001.
- [6] 张军平,阮士怡,祝炳华,等.敦煌长寿方药延缓衰老的实验研究[J].甘肃中医学院学报,1990,7(4):27.
- [7] 欧阳广瑛.敦煌补益方中七叶药物微量元素含量分析[J].甘肃中医学院学报,1990,7(4):24.
- [8] 左银虎.环境与植物中硒形态研究进展[J].植物学通报,1999,16(4):378-380.
- [9] 徐光碧.硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M].武汉:华中理工大学出版社,1994.104-109.
- [10] 邢世瑞,王彩霞,许险峰,等.宁夏中药资源[M].银川:宁夏人民出版社,1987.
- [11] 刘志强,何昭青.水酶法花生蛋白质得取[J].中国粮油学报,1999,14(1):23-39.
- [12] 碳水化合物的测定.食品分析[M].中国轻工业出版社,1994.
- [13] 食品中限量元素的测定,食品分析[M].中国轻工业出版社,1994.
- [14] 王钦德,杨坚.食品试验设计与统计分析[M].中国农业出版社,2002.