

· 研究报告 ·

金线莲多糖的提取优化与纯化

张松柏, 张 勋, 许 文, 徐 伟, 黄泽豪, 林 羽, 陈抒云 (福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

[摘要] 目的 以响应面法优化超声提取金线莲多糖的工艺, 同时, 对多糖纯化中除蛋白方法进行考察。方法 以多糖提取率为检测指标, 在单因素考察的基础上采用 Box-Behnken 实验设计及响应面法对料液比、超声时间、超声提取温度 3 个因素进行优化; 以多糖保留率和蛋白脱除率对 Sevage 试剂法、TCA 法、盐法 (NaOH-CaCl₂ 法和 NaOH-NaCl 法)、盐酸法 5 种脱蛋白方法进行考察。结果 金线莲多糖最佳提取工艺为: 料液比 1 : 10, 超声提取温度 48 °C, 超声提取时间 36 min, 超声提取次数 2 次, 超声功率为 300 W, 该条件下金线莲多糖提取率达到了 13.13%; 同时以 NaOH-CaCl₂ 法脱蛋白, 多糖损失率为 18.74%, 蛋白脱除率为 95.62%。结论 超声提取操作简单, 优化后提取方法能够取得较高提取率, NaOH-CaCl₂ 法脱蛋白能够获得较高蛋白脱除率及多糖保留率, 该方法适用于金线莲多糖活性成分的开发研究。

[关键词] 响应面法; 金线莲多糖; 超声提取; 脱蛋白

[中图分类号] R284

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)04-0354-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202001025

Optimization and purification of extraction of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii*

ZHANG Songbai, ZHANG Xun, XU Wen, XU Wei, HUANG Zehao, LIN Yu, CHEN Shuyun (School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the process of ultrasonic extraction of polysaccharide in *Anoectochilus roxburghii* and to investigate the method of protein removal. **Methods** The extraction rate of polysaccharide was used as the detection index. On the basis of single factor investigation, Box-Behnken experimental design and response surface method were used to optimize the three factors of material-liquid ratio, ultrasonic time and ultrasonic extraction temperature. The five deproteinization methods including Sevage reagent method, TCA method, salt method (NaOH-CaCl₂ and NaOH-NaCl) and hydrochloric acid method were investigated with the retention rate of polysaccharide and protein removal rate. **Results** The optimal extraction conditions of polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii* were as follows: liquid-to-solid ratio was 10 : 1, extraction temperature was 48 °C and extraction time was 36 min with extraction 2 times, ultrasonic power was 300 W, the extraction rate was 13.13%. NaOH-CaCl₂ deproteinized methods : the loss rate of polysaccharide was 18.74%, and the removal rate of protein was 95.62%. **Conclusion** Ultrasonic extraction is easy to operate, and the optimized extraction method can achieve a high extraction rate. NaOH-CaCl₂ deproteinization methods can get high protein removal rate and polysaccharide retention rate. This method is suitable for the research and development of the active components of the polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii*.

[Key words] response surface methodology; polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii*; ultrasonic extraction; deproteinization

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, 又名金线兰、金蚕、乌人参、金线入骨消等, 是一种多年生兰科草本植物^[1], 主产地为福建。文献报道

多糖类、黄酮类、生物碱类、氨基酸类等是金线莲主要化学成分^[2]。其中金线莲多糖是其主要药理活性物质, 具有降血糖、抗氧化、抗肝损伤、增强免疫功能、抗肿瘤等药用功效^[3]。本研究为提高金线莲多糖提取率, 采用超声提取的方法, 在单因素实验的基础上以响应面法优化其提取工艺。蛋白质的存在往往影响到多糖的活性, 蛋白的脱除是多糖提取纯化的一个关键步骤^[4], 且天然植物中多糖与蛋白质两种高分子成分分子量相近, 严重制约了进一步的分析^[5], 而 Sevage 试剂法、三氯乙酸 (TCA)

[基金项目] 福建省科技厅高校产学研合作项目(2019Y41010064); 福建省科技厅引导性项目(2017Y0049); 福建省食品药品监督管理局(3500)FJFF[DY]2018008; 福建省自然科学基金(2017J01538)

[作者简介] 张松柏, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析与质量评价研究, Email: 1228263595@qq.com

[通讯作者] 陈抒云, 讲师, 研究方向: 药物分析, Email: gomupoo@126.com

法、盐法(氯化钙和氯化钠法)、盐酸法等是多糖脱蛋白的常用方法^[4,6],为此,笔者对以上方法在金线莲多糖提取中的影响进行了考察,为进一步深入研究金线莲多糖奠定一定的基础。

1 材料

1.1 仪器

UV-3200 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);AR224CN 电子天平(美国奥豪斯仪器常州有限公司);HWS-12 型电热恒温水浴锅、电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SC-04 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料

福建永泰产金线莲样品经福建中医药大学药学院黄泽豪副教授鉴定为兰科开唇兰属的金线莲 *Anoectochilus roburghii* (Wall.) Lindl. D-水葡萄糖(中国食品药品检定研究院,批号:110833-201506);乙醇(批号:20181208)、苯酚(批号:P815401)、氢氧化钠(批号:20160509)购自上海国药集团化学试剂有限公司;硫酸(批号:1706191)、盐酸(批号:1903301)、氯化钠(批号:1610141)、氯仿(批号:1803121)购自广东西陇科学股份有限公司;氯化钙(广东光华化学有限公司,批号:20091031);正丁醇(江苏强盛功能化学股份有限公司,批号:20130418);超纯水(实验室制备)。

2 实验方法

2.1 对照品溶液的制备

取 D-葡萄糖 50 mg 溶于 1000 ml 的量瓶中,加水定容,得对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取金线莲鲜品清洗干净,于 60 °C 恒温干燥箱中烘干,打粉,过 60 目筛,得金线莲干品。取金线莲粉末 5 g,以料液比为 1:10 加水,48 °C 超声提取 30 min,超声功率为 300 W,超声提取 2 次;对上述提取液 3600 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,即得金线莲原始液。取上述原始液 5 ml 加 4 倍体积无水乙醇放置过夜,4000 r/min 下离心 10 min,沉淀加水溶解,于 1000 ml 的量瓶中定容,得供试品溶液。

2.3 金线莲多糖含量

按本课题先前研究的“优化的苯酚硫酸法”^[7],计算金线莲多糖提取得率。

2.4 单因素实验

按“2.2”项下的方法,对超声提取工艺中各单因素进行考察:①以超声温度 30、40、50、60、70、80 °C 分别进行提取;②以超声功率 200、250、300、350、400 W 分别进行提取;③用超声分别提取 10、20、30、40、50 min;④以 1:5、1:10、1:15、1:20、1:30 的料液比加水;⑤用超声分别提取 1、2、3 次。

2.5 响应面法优化超声提取工艺

在单因素考察的基础上,利用软件 Design-Expert.V8.0.6.1 中 Box-Behnken 试验原理,选择对多糖提取率影响较大 3 个因素料液比(A)、超声提取时间(B)、超声温度(C)为自变量,以多糖提取率(R)为响应值,设计 3 因素 3 水平实验。因素与水平设计如表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
料液比(A)	5	10	15
超声时间(B)	20	30	40
超声提取温度(C)	40	50	60

2.6 脱蛋白方法的考察

2.6.1 盐酸法脱蛋白^[4,6]

取 5 ml 金线莲原始液,用 2 mol/L 盐酸调节至 pH 3,并保持过夜。将该混合物在 4000 r/min 下离心 10 min,弃去沉淀,上清液加入 4 倍体积无水乙醇放置过夜,4000 r/min 下离心 10 min,所得沉淀物加水溶解,于 1000 ml 的量瓶中定容,得脱蛋白供试品溶液。

2.6.2 NaOH-CaCl₂ 法脱蛋白^[5]

取 5 ml 金线莲原始液,以 2% NaOH 溶液将其调至 pH 8~9,加热至 85 °C。将 CaCl₂ 固体调至 5%(50 g/L)的浓度,煮沸 30 min,冷却至室温并过滤,用稀盐酸将滤液调至 pH 7,加入 4 倍体积无水乙醇放置过夜,4000 r/min 下离心 10 min,得多糖沉淀。加水溶解重复上述操作 3 次,所得沉淀物加水溶解,于 1000 ml 的量瓶中定容,得脱蛋白供试品溶液。

2.6.3 NaOH-NaCl 法脱蛋白^[5]

取 5 ml 金线莲原始液,在沸腾(90 °C)条件下,用 2%NaOH 溶液将多糖溶液调节到 pH 9~10。加入 NaCl 固体,浓度调至 5%(50 g/L),然后混合煮沸 30 min。冷却至室温并过滤,上清液用稀盐酸调

至 pH 7。添加 4 倍体积无水乙醇放置过夜沉淀多糖, 在 4000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液得多糖沉淀。加水溶解重复上述操作 3 次, 所得沉淀物加水溶解, 于 1000 ml 的量瓶中定容, 得脱蛋白供试品溶液。

2.6.4 三氯乙酸(TCA)法脱蛋白^[5]

取 5 ml 金线莲原始液, 加入 10% TCA 溶液将其调节到 pH 3, 静置过夜。样品 4000 r/min 离心 10 min, 沉淀物丢弃, 上清液加 4 倍体积无水乙醇放置过夜, 在 4000 r/min 下离心 10 min, 弃去上清液得多糖沉淀。加水溶解重复上述操作 3 次, 所得沉淀物加水溶解, 于 1000 ml 的量瓶中定容, 得脱蛋白供试品溶液。

2.6.5 Sevage 法脱蛋白^[6]

取 5 ml 金线莲原始液, 以金线莲水提溶液: 正丁醇: 氯仿按 1: 1: 4 的比例进行除蛋白, 振荡器振荡 20 min 后, 4000 r/min 转速离心 5 min, 弃去下层有机相。该过程重复 3 次, 上层水相添加 4 倍体积无水乙醇放置过夜, 在 4000 r/min 下离心 10 min, 弃去上清液得多糖沉淀物, 所得沉淀物加水溶解, 于 1000 ml 的量瓶中定容, 得脱蛋白供试品溶液。

2.7 多糖损失率与蛋白脱除率

以“紫外分光光度法”对蛋白含量进行测定^[5],

$$\text{蛋白质浓度 } C(\text{mg/ml}) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

多糖损失率 = [(供试品多糖含量 - 脱蛋白供试品多糖含量) / 供试品多糖含量] × 100%

蛋白脱除率 = [(供试品蛋白含量 - 脱蛋白供试品蛋白含量) / 供试品蛋白含量] × 100%

3 实验结果

3.1 不同方法提取金线莲多糖

参考相关文献, 按“2.2”项下使用不同提取方法制得对应的供试品, 比较多糖得率, 结果如表 2。

表 2 提取金线莲多糖方法比较

方法	提取率(%)			平均得率(g/g)
	实验1	实验2	实验3	
超声提取 ^[8]	10.53	10.91	11.21	10.89
回流提取 ^[9]	9.27	8.43	8.82	8.84
温水浸提 ^[10]	5.45	5.63	4.10	5.06
酶提取 ^[9]	9.55	10.30	10.33	10.06

实验结果表明, 超声提取和酶提取均能获得较高的多糖提取率, 由于酶价格昂贵, 超声提取操作简便, 且能获得高提取率, 故选择超声提取进行下

一步研究。

3.2 单因素实验结果

如图 1 所示: ①随着提取温度的增加, 提取得率逐渐增加, 在 50 °C 提取得率达到最大值, 后随着温度的增加提取率逐渐下降并趋于稳定, 故初步确定提取温度 40 ~ 60 °C 作为进一步响应面考察设计的水平; ②在超声功率为 300 W 时多糖提取率最高, 实验结果显示, 随着超声功率的增加, 多糖提取率先上升后下降, 但影响相对较小, 故选定功率为 300 W 进行下一步分析; ③以超声提取 30 min, 提取率最高, 故初步确定超声时间 20 ~ 40 min 作为进一步响应面考察设计的水平; ④料液比为 1 : 10 时, 多糖提取率最高, 随着料液比的增加, 提取率稍有下降且趋于平稳, 故初步确定料液比 1 : 5 ~ 1 : 15 作为进一步响应面考察设计的水平; ⑤随着提取次数的增加, 提取率逐渐降低, 提取 3 次后, 多糖已基本提取完全, 考虑实际操作及原料等, 选定提取 2 次进行下一步分析。

3.3 响应面法优化超声提取工艺

在单因素考察的基础上, 利用软件 Design-Expert. V 8.0.6.1 中 Box-Behnken 试验原理, 设计 3 因素 3 水平实验。响应值设计方案及结果见表 3, 方差分析见表 4。对数据分析后得到回归方程为:

$$\text{多糖提取率 } (R) = 13.08 + 0.026A + 0.50B + 0.25C + 0.085AB + 1.05AC - 0.56BC - 1.05A^2 - 0.47B^2 - 0.49C^2$$

由表 3 知, 回归模型有很好的显著性 ($P < 0.0001$), 说明二项式方程拟合良好, 模型二项式方程失拟项不显著 ($P = 0.2463$), 说明未知因素对实验干扰较小, 拟合的相关系数 $r = 0.9926$, 模型可信度良好, 故可运用此模型实现超声提取金线莲多糖最佳工艺的分析探究。

根据拟合方程绘制响应面图谱, 响应面分析的等高线图和响应面图 (图 2、图 3), AC、BC 具有相互影响, 各图为料液比(A)、超声时间(B)、超声提取温度(C)中任意一个变量取零水平, 其余变量对金线莲多糖提取率的交互作用影响。由图 2、图 3 可以看出, 提取时间对提取率影响最为显著, 三者的主效应关系为: 提取时间 (B) > 提取温度 (A) > 料液比 (C), 其中料液比与提取温度的响应曲面最为陡峭, 证明料液比与提取温度的交互作用最为强。

通过 Design-Expert. V 8.0.6.1 软件对二项式回归方程进行最优值的计算, 确定理论上的多糖提取最佳工艺: 料液比为 1 : 9.88, 超声提取温度为 48.76 °C, 超声提取时间为 36.08 min, 超声提取次数为 2 次, 超声功率为 300 W, 其多糖提取的理论得率为 13.22%, 考虑到实际操作的可行性, 最佳工

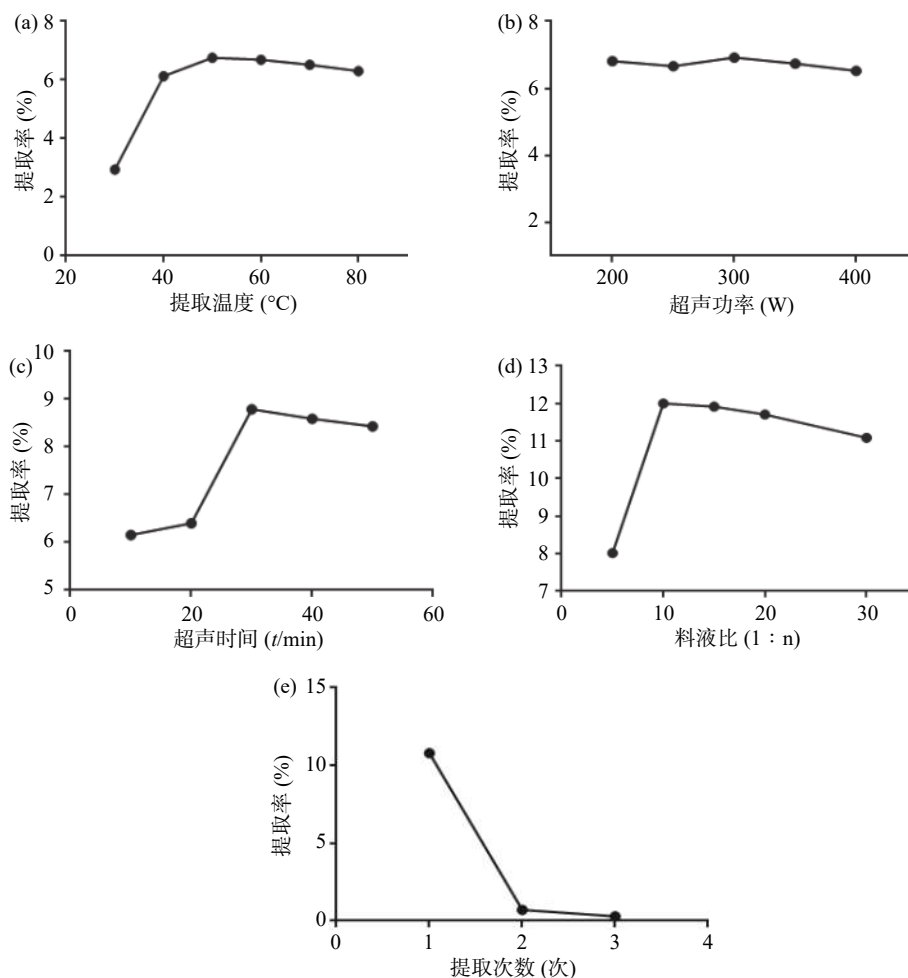


图1 单因素实验考察结果

表3 Box-Behnken 试验设计方案及结果

实验号	A	B	C	多糖提取率(%)
1	-1.000	0.000	-1.000	12.22
2	1.000	0.000	-1.000	10.16
3	0.000	1.000	-1.000	13.13
4	0.000	0.000	0.000	13.03
5	1.000	0.000	1.000	12.98
6	0.000	-1.000	-1.000	10.86
7	-1.000	-1.000	0.000	11.19
8	0.000	0.000	0.000	13.21
9	0.000	1.000	1.000	12.28
10	0.000	-1.000	1.000	12.25
11	-1.000	1.000	0.000	11.88
12	1.000	-1.000	0.000	11.08
13	0.000	0.000	0.000	13.12
14	0.000	0.000	0.000	12.85
15	-1.000	0.000	1.000	10.83
16	1.000	1.000	0.000	12.11
17	0.000	0.000	0.000	13.21

表4 模型回归系数显著性检验结果

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	15.41	9	1.71	51.68	<0.0001
A	5.513×10^{-3}	1	5.513×10^{-3}	0.17	0.6955
B	2.02	1	2.02	60.98	0.0001
C	0.49	1	0.49	14.64	0.0065
AB	0.029	1	0.029	0.87	0.3814
AC	4.43	1	4.43	133.76	<0.0001
BC	1.25	1	1.25	37.87	0.0005
A ²	4.65	1	4.65	140.33	<0.0001
B ²	0.92	1	0.92	27.87	0.0011
C ²	0.99	1	0.99	29.99	0.0009
残差	0.23	7	0.033		
失拟项	0.14	3	0.047	2.07	0.2463
纯误差	0.091	4	0.023		
总离差	15.64	16			

艺定为料液比 1 : 10, 超声提取温度 48 °C, 超声提取时间 36 min, 超声提取次数为 2 次, 超声功率为 300 W。为验证实验结果, 进行 3 组平行实验, 多糖

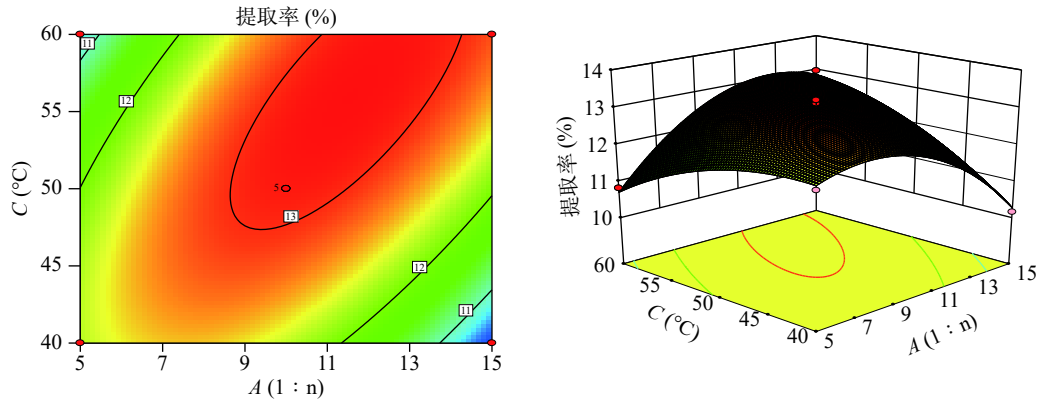


图2 料液比与提取温度的等高线及响应面图

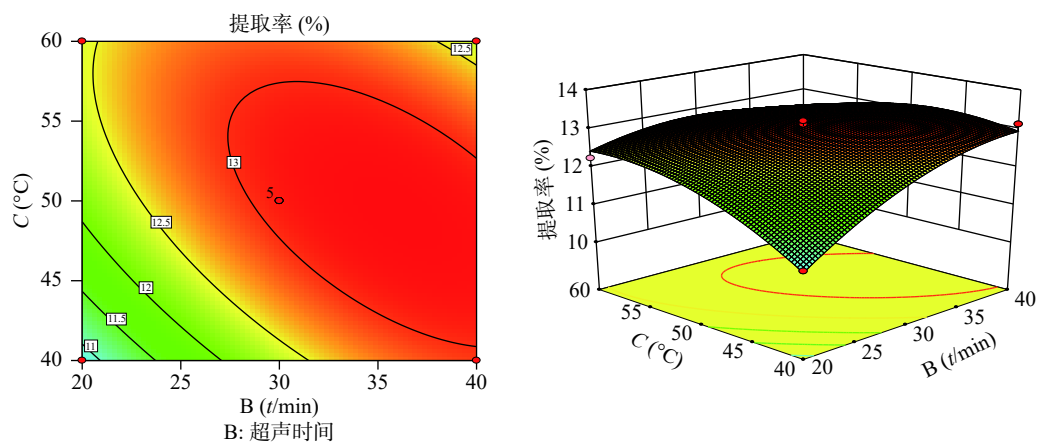


图3 超声提取时间与提取温度的等高线及响应面图

提取得率分别为 13.14%、13.05%、13.20%，其 RSD 为 0.57%，提取得率的均值 13.13% 与理论值 13.22% 偏差 0.09%，表明优化后的提取工艺可行，适用于金线莲中多糖的提取。

3.4 脱蛋白方法的比较

按“2.6”项下的方法进行脱蛋白操作，得出多糖损失率及蛋白脱除率结果如表 5。实验结果表明，NaOH-CaCl₂ 法脱蛋白可以获得较高蛋白脱除率，同时也能获得最低的多糖损失率。

表 5 不同脱蛋白方法对金线莲多糖损失及蛋白脱除的考察结果 (n=3)

方法	多糖损失率(%)	蛋白脱除率(%)
HCl法脱蛋白 ^[4,6]	41.82	96.71
NaOH-CaCl ₂ 法脱蛋白 ^[5]	18.74	95.62
NaOH-NaCl法脱蛋白 ^[5]	27.07	92.95
TCA法脱蛋白 ^[5]	46.63	97.90
Sevage法脱蛋白 ^[6]	47.23	91.92

4 结论与讨论

植物多糖的提取方法包括了超声提取法^[8]、酶

法^[9]、回流提取^[9]、传统温水浸提^[10]等，传统热水浸提与回流提取的提取效率低，且操作烦琐，考虑到酶法中由于酶价格昂贵，不适用于批量金线莲多糖的提取，本文采用超声提取的方法，操作简单，且以响应面优化后的提取工艺能够取得较高得率。因金线莲多糖中所含蛋白对进一步分析产生影响^[6]，所以，本研究考察了 5 种除蛋白的方法，结果表明 NaOH-CaCl₂ 法最佳，既能获得较高蛋白脱除率，同时多糖损失最少；本研究将两者结合，实现了对金线莲多糖成分的最大化提取与保留，为金线莲多糖的深度开发提供了参考。

【参考文献】

- [1] 朱建军, 黄雨佳, 金建红, 等. 不同栽培基质对金线莲3种基原植物生长及其活性成分含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2467-2471.
- [2] YE S Y, SHAO Q S, ZHANG A L. *Anoectochilus roxburghii*: a review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 209: 184-202.
- [3] 张晓辉. 金线莲多糖结构分析及抗糖尿病活性研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2011.

(下转第 382 页)