

蒲公英多糖的提取及含量测定

付学鹏, 杨晓杰

(齐齐哈尔大学, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 研究了蒲公英多糖的提取分离条件和对含量进行测定。提取条件为料水比 1:30, 80 °C 保温 3 h, 提取 2 次; 分离条件为 80% 乙醇去除单糖和寡糖等杂质, Sevag 法脱蛋白, 石油醚回流脱脂, 乙醇沉淀分离多糖; 测定方法为蒽酮-浓硫酸法, 测得的多糖含量为干重的 52.06%, 回收率为 97%, RSD=2.06%, 此法操作简便, 重现性和稳定性都好, RSD=0.67%, 适合蒲公英多糖的测定。

关键词: 蒲公英; 多糖; 提取; 含量

中图分类号: O629.12; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)05-0037-03

Extraction and Determination of the Polysaccharides from Dandelion

FU Xue-peng, YANG Xiao-jie

(Qiqihaer University, Qiqihaer 161006, China)

Abstract: The extraction conditions of polysaccharides from dandelion roots were optimized here. The optimal extraction temperature, time, the ratio of solid to liquid and extraction times were 80 °C, 3 h, 1:30 and 2 times, respectively. 80% ethanol was used to removal the impurities (monosaccharides and oligosaccharides) and to precipitate polysaccharides, while Sevag method and ligarine were used for deproteinization and degreasing, respectively. The content of polysaccharides was determined by spectrophotometric method with anthrone-sulfuric acid as coloring reagent and shown to be 52.06% with the recovery rate and RSD being of 97% and 2.06%, respectively. The method is suitable for the determination of dandelion polysaccharides due to its simpleness, convenience, accurateness and repeatability.

Key words: dandelion; polysaccharides; extraction; determination

蒲公英 (*Taraxacum*), 是常见的农田杂草, 也是重要的中药材, 属国家中药保护品种之一, 具有清热、消肿、散结和利尿通淋的功效, 临床上主要用于治疗乳疮肿毒等症^[1]。蒲公英富含甾醇、棕榈酸和多糖^[2], 大量的实验证明, 多糖是重要的信息分子, 参与许多生理和病理过程, 一些天然药物其有效成份多糖有着多种药理活性, 在医疗上具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、抗辐射、抗突变、降血糖、增强免疫等多方面的作用^[3]。近年来, 人们深入研究了蒲公英的化学成分和药理作用, 关于蒲公英的组织培养、核型分析与分子水平的研究也已展开^[4], 但是关于蒲公英多糖的提取及含量测定的研究却鲜有报道。本文就蒲公英多糖的提取条件及含量测定进行了研究, 以期为进一步开发利用蒲公英资源提供依据。

1 材料和方法

1.1 蒲公英: 采自五大连池自然风景区。

收稿日期: 2007-02-27

基金项目: 黑龙江省教育厅基金资助项目 (No 11511448)

通讯作者: 杨晓杰, 生物系教授, 硕士生导师。主要从事植物遗传以及多糖方面的研究

1.2 方法

1.2.1 多糖提取

材料预处理: 将新鲜的蒲公英根洗净, 切成小片, 迅速放入 0.25% Na₂SO₃ 护色 30 min^[5]。60 °C 干燥至恒重, 用粉碎机磨成粉末, 过 400 目筛备用。

脱脂: 将蒲公英粉末用滤纸包好, 放入索式提取器, 40 °C 石油醚回流脱脂 2~3 h。

单糖和寡糖的去除: 将脱脂后的滤纸包风干, 准确称取 8 份蒲公英粉末, 分别用滤纸包好, 用 80% 乙醇回流, 以除去样品中的单糖、寡糖以及其它小分子物质。每隔 1 h 取出 1 包, 用蒽酮-浓硫酸法^[6]测定回流后样品的总糖含量。

热水浸提: 影响热水浸提的主要因素是温度、提取时间、料水比、提取次数, 在单因素实验的基础上采用 L₉ (3⁴) 正交实验优化提取条件, 因素水平设计见表 1。

表 1 热水浸提蒲公英多糖因素水平

水平	A.温度/°C	B.料水比	C.提取时间/h	D.提取次数
1	60	1:20	2	1
2	70	1:30	3	2
3	80	1:40	4	3

浓缩：用旋转蒸发器对提取液进行浓缩。

脱蛋白：Sevag 法，向提取液中加入 1/4 倍体积的氯仿-正丁醇 (v/v, 4:1)，混合 20 min，3500 r/min 离心 5 min，中层白色絮状沉淀即为蛋白质，取上清，重复 5~6 次，至中间无明显沉淀为止。

醇析：脱蛋白完毕，向提取液中缓缓加入 95% 的乙醇，并用玻璃棒缓慢搅拌，使乙醇浓度达到 80%。静置 4 h，4000 r/min 离心 5 min，沉淀即为粗多糖。

纯化：将粗多糖复溶于水，透析 36 h，用 80% 乙醇沉淀多糖，4000 r/min 离心 5 min，多糖沉淀分别用无水乙醇、丙酮洗 3 次，真空干燥得精制多糖。

1.2.2 多糖含量测定

1.2.2.1 标准曲线的建立^[6]

葡萄糖标准曲线的建立采用文献^[6]所述方法，所得回归方程为 $y=4.82x-0.001$ ($R^2=0.9995$)

1.2.2.2 换算因子的计算^[7]

准确称取精制蒲公英多糖 20 mg，用蒸馏水溶解，定容到 100 ml。蒽酮-浓硫酸法测定该样液中吸光值，并由葡萄糖回归方程计算样液中多糖含量，根据公式 $F=W/CD$ 计算换算因子，其中 W 为精制多糖重量 (mg)， C 为精制多糖样液的葡萄糖量 (mg)， D 为多糖的稀释倍数。

1.2.2.3 样品中多糖含量测定

准确称取 1 g 蒲公英粉末，经 1.2.1 法脱脂、除单糖和寡糖等杂质，加入 30 ml 蒸馏水，80 °C 提取 3 h，抽滤，重复 2 次，合并滤液，定容到 100 ml，稀释 100 倍，蒽酮-浓硫酸法测吸光值。根据公式 $X=FCD/W \times 100\%$ 计算蒲公英根中多糖含量。

1.2.2.4 稳定性实验

利用 1.2.2.3 中的样品液，测定吸光值，每 10 min 测定一次，记录测定的数值。

1.2.2.5 重现性实验

准确称取 3 g 蒲公英粉末，按 1.2.1 节方法同时制备 3 份样品液并测定吸光值，计算多糖含量。

1.2.2.6 加样回收率实验

准确称取精制蒲公英多糖 10 mg (平行 3 份) 于烧杯中用蒸馏水溶解，加入 1.2.2.3 法得到的样品液 10 ml，定容到 100 ml，稀释 10 倍，测定吸光值，根据公式 $W\%=(W_2-W_1)/W_0$ 计算回收率。

W_1 =试样中原有被测多糖的含量， W_0 =试样中加入精制多糖量， W_2 =试样中加入精制蒲公英多糖后测得的多糖含量。

2 结果与分析

2.1 乙醇回流去单糖、寡糖等杂质

对经乙醇回流过的蒲公英粉末按 1.2.2.3 法进行热水浸提，蒽酮-浓硫酸法测定吸光值如图 1。

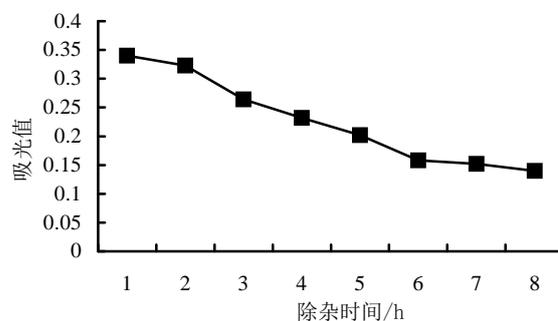


图 1 回流时间对乙醇除杂的影响

由图 1 可看出，随着时间的延长，溶液的吸光值逐渐降低，说明溶液中总糖是不断减少的，减少的部分即为乙醇回流去单糖和寡糖部分。回流到 6~8 h 的时候溶液中的糖含量基本上不变化，说明单糖和寡糖杂质基本除净。

2.2 热水浸提的正交结果

正交实验结果见表 2。

表 2 热水浸提多糖正交实验 L₉ (3⁴) 方案及结果

实验号	A	B	C	D	吸光值
1	1	1	1	1	0.170
2	1	2	2	2	0.250
3	1	3	3	3	0.174
4	2	1	2	3	0.178
5	2	2	3	1	0.225
6	2	3	1	2	0.173
7	3	1	3	2	0.182
8	3	2	1	3	0.255
9	3	3	2	1	0.247
K ₁	0.198	0.177	0.199	0.214	
K ₂	0.192	0.243	0.225	0.202	
K ₃	0.228	0.198	0.194	0.202	
极差 R	0.036	0.066	0.031	0.012	

表 2 极差 R 可看出，提取时间是热水浸提多糖最主要的因素，其次是温度、料水比，最后是提取次数。考虑工艺成本，确定蒲公英根部多糖热水浸提的最佳条件为料水比 1:30，80 °C，保温 3 h，提取 2 次。

2.3 换算因子的测定

将 1.2.2.2 法得到的吸光值 0.095 代入回归方程，得 $C=0.199$ 。根据公式 $F=W/CD$ ，计算得 $F=1.005$ 。

2.4 样品中多糖含量测定

将 1.2.2.3 中得到的样品液的吸光值 0.247 代入式

$X = FCD/W \times 100\%$, 得蒲公英根部多糖含量为 52.06%。

2.5 稳定性实验结果

结果显示, 蒽酮-浓硫酸法测多糖含量很稳定, 在 1 h 内不会影响实验结果, 如表 3。

表 3 蒽酮-浓硫酸反应的显色稳定性

时间/min	1	2	30	40	50	60
吸光值	1.01	1.01	1.02	1.01	1.00	1.01

2.6 重现性实验结果

按 1.2.2.5 方法测定重现性, 结果见表 4。表 4 可看出, 重现性非常好, 说明此法适合蒲公英多糖的提取和含量测定。

表 4 重现性实验结果

样品号	吸光值	样品液中葡萄糖浓度/(mg/ml)	多糖含量/%	平均含量/%
1	0.248	0.0517	51.959	
2	0.251	0.0523	52.562	52.15
3	0.249	0.0519	51.952	

2.7 加样回收率实验结果

按 1.2.2.6 测定回收率, 结果如表 5。

表 5 加样回收率实验结果

样品号	精制多糖量/mg	样液中多糖量/mg	加样后样液中多糖量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	10	51.7	61.2	95		
2	10	51.7	61.4	97	97	2.06
3	10	51.7	61.6	99		

由表 5 可看出, 用蒽酮-浓硫酸法测定蒲公英根部多糖, 其回收率为 97%, 说明回收效果好。因此该法可用于蒲公英多糖的测定。

3 结论

用蒽酮-浓硫酸法测定多糖含量时, 主要的干扰因子是单糖和寡糖, 因此需除去。用 80% 的乙醇回流 6 h 以上可除去单糖和寡糖, 但是材料的量不同时需要回流的时间也不同, 要根据实际材料量决定回流的时间。

热水浸提法提取蒲公英多糖提取率的影响由大到小依次为时间、温度、料水比、提取次数。最佳提取工艺为料水比 1:30, 80 °C 保温 3h, 提取 2 次。

通过稳定性、重现性及回收率实验可看出, 蒽酮-浓硫酸法适合于蒲公英多糖的测定, 测得蒲公英根部多糖占蒲公英根干重的 52.06%。

参考文献

- [1] 许丹, 侯凤飞, 吴立军等. 蒲公英的化学研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3): 278
- [2] 骆和生等. 免疫中药学[M]. 北京: 中国协和医科大学等联合出版社, 1999, 188-191
- [3] 魏金婷, 刘文奇. 天然活性多糖的研究现状[J]. 莆田学院学报, 2004, 11(3): 19-23
- [4] 陈华, 李银心. 蒲公英研究进展和用生物技术培育耐盐蒲公英展望[J]. 植物学通报, 2004, 21(1): 19-25
- [5] 胡蝶, 邓钢桥, 彭伟正等. 菊糖提取工艺的研究[J]. 湖南农业科学, 2006, 1(1): 74-75
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 浙江大学出版社, 2001
- [7] 甘璐, 张声华. 枸杞多糖纯度与四个级分含量的测定[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 172-175

(上接第 31 页)

方式, 反面有黄色或黄褐色, 后变暗。

2.2.4 霉菌型豆豉中微生物的初步鉴定结果

发酵豆豉中主要微生物的菌相组成如表 5。

表 5 霉菌型豆豉中主要微生物的菌相组成

显微镜检测特征	微生物属
无假根, 菌丝无隔膜	毛霉属
有假根, 菌丝无隔膜	根霉属
菌丝有隔, 巨大顶呈椭圆形	曲霉属
有扫帚状分生孢子小梗	青霉属

3 小结

细菌型的土家豆豉以长杆菌、短杆菌杆菌属的细菌为主; 霉菌型的土家豆豉有毛霉、根霉、曲霉和青

霉四种类型, 随着培养基和温度的不同而不同。

参考文献

- [1] 石彦国. 大豆制品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000
- [2] 张炳文. 为了健康吃豆豉吧[J]. 厦门科技, 2003, 14(4): 12-14
- [3] 秦礼康, 曾海英, 丁霄霖. 陈窖豆豉传统工艺剖析及优势菌群鉴定[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 118-123.
- [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996
- [5] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990
- [6] 布坎南 R E, 吉本斯 N E 伯杰氏. 细菌鉴定手册(第 8 版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996