

人工蛹虫草固体培养残基中虫草素的提取分离研究

钟艳梅¹, 黄志全¹, 温凯²

(1. 嘉应学院生物系, 广东 梅州 514015) (2. 深圳市农作物良种引进中心, 广东 深圳 518040)

摘要: 以人工蛹虫草固体培养残基为原料, 采用索氏提取后, 用离子交换层析进行分离研究。索氏提取结果表明水比乙醇更优于提取虫草素; 离子交换层析分离提取固体培养残基中虫草素的正交实验表明洗脱流速、料水比为主要影响因素, 最优条件为: 料水比 1:16, 离子柱 pH 3.5; 洗脱流速为 1 滴/2 秒。

关键词: 蛹虫草; 固体培养残基; 虫草素; 提取; 分离

中图分类号: R284.2; 文献标识码: B; 文章编号: 1673-9078(2007)02-0040-03

Extraction and Isolation of Cordycepin from the Deserted Solid Medium of *Cordyceps militaris*

ZHANG Yan-mei¹, HUANG Zhi-quan¹, WEN Kai²

(1. Department of biology, JiaYing university, Meizhou 514015, China) (2. Shenzhen City Crop Varieties Introduction, Shenzhen 518040, China)

Abstract: Extraction and isolation of cordycepin from the deserted solid medium of *cordyceps militaris* by soxhlet Extraction and ion exchange chromatography was studied. The soxhlet extraction showed that water was better than ethanol for the extraction of the cordycepin. The orthogonal test of ion exchange chromatography showed the main influential factors were flow rate of elution and ratio of material to water. The optimal ratio of material to water, the flow speed and the pH value were also confirmed to be 1:16, 3.5 and 1drop/2second, respectively.

Keywords: *Cordyceps militaris*; solid deserted medium; cordycepin; extraction; isolation

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 又称北虫草、北冬虫夏草, 是我国的一种名贵药用真菌和高级滋补品。用米饭、蚕蛹粉为主要原料制成固体培养基人工培育蛹虫草子实体是近几年发展的新技术, 但子实体采收后, 长满菌丝体的固体培养残基的利用却鲜有报道。据资料报道^[1], 蛹虫草固体培养残基虫草素的含量约为 5%, 总糖含量为 21.93%, 蛋白质仍达 10% 左右(比培养前高 2.1%), 虫草多糖含量为 12.86%, 此外还含有生物碱、萜类化合物、甾醇、苷类、酚类、酶、维生素、Mn-SOD 等有效成分。虫草素(Cordycepin)具有抑菌、抗肿瘤、抗病毒、拮抗氧自由基等功效, 具有较高的药用价值和广泛的药理作用, 是药学界比较重视的一类生理活性物质, 目前虫草素纯品在国内市场上的价格约为 10 万元/kg, 若能有 75% 的提取率, 则 1 kg 固体培养残基的虫草素提纯物将可售价 400 元, 经济效益可观, 故其提取方法的研究值得重视。为了更好地开发利用蛹虫草资源, 同时为其培养残基找到一种较好的利用途径, 本研究采用正交试验对人工蛹虫草固体培养残基中虫草素的提取分离条件进行了深

收稿日期: 2006-08-24

入研究, 旨在进一步开发利用提供有价值的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

人工蛹虫草固体培养残基: 梅州侨中微生物厂提供, 已晒干(含水量为 14.42%), 贮藏于密封罐内, 备用。

主要仪器与设备: 食品粉碎机、电子天平、LXJ-III B 型低速大容量多管离心机、电热恒温水浴箱、766-2 型远外辐射干燥箱、pH 酸度计、HL-2S 恒流泵、DBS-160 电脑全自动部分收集器、F755b 紫外可见光光度计、索氏提取器。

主要试剂: 活性炭; 0.15 mol/L NH₃·H₂O 缓冲液; 2 mol/L HCl; 2 mol/L NaOH; 95%乙醇; 75%乙醇; pH 3.0 HCl 缓冲液; pH 3.5 HCl 缓冲液; pH 4.0 HCl 缓冲液; 硝酸; 石油醚; 732-阳离子交换树脂(完全交换当量 ≥ 4.4 mmol/g) (以上试剂均为分析纯)。

1.2 试验方法

1.2.1 提取分离工艺流程

蛹虫草固体培养残基 → 粉碎过筛 → 脱脂 → 索氏抽提或水浴浸提 → 除杂 → 浓缩 → 离子交换柱分离 → 收集 → 定性定量检测

1.2.2 样品处理

粉碎过筛:称取人工蛹虫草固体培养基残基 200 g,用食品粉碎机粉碎,过 80 目筛。

脱脂:将上述粉末置于三角锥瓶中,按 $V_{(培养基粉)}:V_{(石油醚)}=1:1$ 搅匀,置于水平摇床上,振荡 48 h。将混合溶液从水平摇床上取下,滤纸过滤或离心,取固体,风干备用。

1.2.3 树脂处理

称取新的 732-阳离子交换树脂 200 g→用 2 mol/L NaOH 置摇床振荡浸洗 2 h 以上,用蒸馏水冲洗至呈中性→用 2 mol/L HCl 置摇床振荡浸洗 2 h 以上,而后用蒸馏水冲洗至呈中性→再次用 2 mol/L NaOH 摇床振荡浸洗 2 h 以上,用蒸馏水冲洗至呈中性→再次用 2 mol/L HCl 摇床振荡浸洗 2 h 以上,用蒸馏水冲洗至呈中性,水封备用。

1.2.4 索氏提取

准确称取处理好的样品各 10 g,共 4 份,置于滤纸筒中,把滤纸筒放进索氏提取器,分别加入水、75%乙醇、95%乙醇和无水乙醇作提取剂,在沸水浴中抽提 8 h,收集提取液。提取液经除杂、浓缩,定吸 5 mL 上离子柱纯化后(离子柱的条件是:pH 3.5,流速 1 滴/秒)检测比较不同提取剂对虫草素提取的影响,以确定最佳提取剂。

1.2.5 除杂、浓缩

将索氏提取中的水提液和正交试验中的各种水提液,加 3 倍无水乙醇,沉淀过夜,然后将所有提取液于 4800 r/min 下离心 20 min 以除去粗多糖等物质,取上清液。用滴管加入 2 mol/L HCl 滴定,操作过程中,用酸度计随时测试溶液中的 pH 值,当 HCl 滴定至溶液的 pH 3.5 时,停止滴定,有沉淀产生,于 4800 r/min 下离心 20 min,此步骤主要去除乙醇不溶性杂质和一些蛋白质,取上清液,与溶液等量的活性炭混匀,摇床振摇 12 h,过滤除色素。溶液用 766-2 型远外辐射干燥箱浓缩至 50 mL。

1.2.6 离子交换柱分离

装柱、平衡:先在空柱中装入少量蒸馏水,开启螺旋夹,赶走气泡,使水缓缓下滴,将带水的树脂通过漏斗连续装入层析柱,装至 3/4—2/3 柱高,防止断层和气泡。树脂床顶呈平面状态,并低于水平面,装好后,根据正交试验各实验号所需 pH 环境用相应的 HCl 平衡液 3 倍柱体积过柱,待流出液 pH 值恒定时停止。

加样、固定:将层析柱底部的螺旋打开,树脂床上层水缓缓滴下,待水弯月面接近树脂床平面时,用

滴管顺管壁一滴滴的缓缓加入待过柱液,做到不冲床,待样品液完全进柱,加相应的 HCl 平衡液固定被树脂吸附的虫草素,用双蒸馏水过柱,去除杂质。

洗脱与收集:用恒流泵将洗脱液 0.15 mol/L 氨水加到层析柱内,根据正交试验对应的流速,用全自动收集器收集。

实验过程如下:将处理好的培养基粉置于三角锥瓶中,加入蒸馏水,搅拌均匀,置于电热恒温水浴箱中,80 °C 浸提 10 h,期间要定期振摇。然后上离子交换柱进行分离。

1.2.7 鉴定方法^[2]

将收集到的滴出液,分别用红紫酸胺反应定性定量鉴定虫草素的含量。方法:洗脱液取 1.2 mL 加浓硝酸 0.6 mL,加热,加入 0.15 mol/L 氨水 6 mL,在 260 nm 波长下比色即可鉴定。

1.2.8 计算^[3]

虫草素浓度($\mu\text{g/mL}$)= $A_{260\text{nm}}/(0.020 \times L)$,其中 L 是指比色皿的厚度(cm),算出虫草的浓度,可得:

$$\text{虫草素质量}(\mu\text{g})=\text{虫草素浓度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{收集液总体积}(\text{mL})$$

$$\text{虫草素得率}(\%)=\text{虫草素质量}(\mu\text{g})/\text{称取培养基的质量}(\mu\text{g}) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 索氏提取中不同提取剂的比较

用蒸馏水、不同浓度乙醇作提取剂时对虫草素提取效果的影响见表 1。

表 1 索氏提取中不同提取剂的比较数据

提取剂	收集液总体积/mL	OD 值	虫草素质量/ μg	虫草素得率/%
无水乙醇	255	0.041	522.75	0.0052
95%乙醇	122	0.088	536.80	0.0053
75%乙醇	107	0.145	775.75	0.0078
蒸馏水	381	0.064	1219.20	0.0122

从表 1 可见,用水作提取剂时虫草素的得率最大。因此这四种提取剂当中,以蒸馏水最佳。

2.2 $L_9(3^3)$ 正交试验结果及分析

根据单因素实验,pH=3.5、洗脱流速为 1 滴/秒、料水比为 1:12 时离子交换柱的分离效果较好。现对离子柱 pH(A),洗脱流速(B)、料水比(C) 3 个因素作 $L_9(3^3)$ 实验,以确定其最佳提取条件。因素水平设计表见表 2,实验结果和方差分析分别见表 3、表 4。

从表 3、表 4 的虫草素得率直观分析和方差分析结果可知:R 值由大到小依次为 B、C、A 因素,其中 B、C 因素有极显著意义($F \gg F_{0.01(2,2)}$),A 因素无显著意义($F < F_{0.1(2,2)}$),说明洗脱流速、料水比因素为主效

因素。根据各因素 k 的变化率可以看出各因素的最佳搭配为 A₂B₃C₃, 即 pH 3.5, 流速为 1 滴/2 秒, 料水比 1:16, 虫草素的得率最高。

表 2 正交试验因素水平表

水平编号	A.pH	B.洗脱流速	C.料水比
1	3.0	2 滴/秒	1:8
2	3.5	1 滴/秒	1:12
3	4.0	1 滴/2 秒	1:16

表 3 正交实验结果

序号	A	B	C	OD 值	收集液/mL	虫草素得率/%
1	1	1	1	0.024	137	0.0066
2	1	2	2	0.029	132	0.0077
3	1	3	3	0.048	137	0.0132
4	2	1	3	0.028	140	0.0078
5	2	2	1	0.042	137	0.0115
6	2	3	2	0.047	135	0.0127
7	3	1	2	0.031	138	0.0086
8	3	2	3	0.039	134	0.0105
9	3	3	1	0.029	125	0.0073
K ₁	0.0274	0.0230	0.0253			
K ₂	0.0320	0.0296	0.0289			
K ₃	0.0263	0.0331	0.0314			
k ₁	0.0091	0.0077	0.0084			
k ₂	0.0117	0.0099	0.0096			
k ₃	0.0088	0.0110	0.0105			
R	0.0029	0.0033	0.0021			

注: 每样质量为 25g

(上接第 39 页)

3.5 质量指标

3.5.1 感官指标

产品色泽均匀一致, 呈琥珀色澄清透明溶液, 略带苦味, 具有苦瓜与金银花的舒心清香。

3.5.2 理化指标

可溶性固形物≥10%; pH5.0。

3.5.3 微生物指标

细菌总数≤100 个/mL; 大肠菌群≤3 个/100mL; 致病菌不得检出。

4 结论

本研究研制的苦瓜、金银花、淡竹叶复合保健饮料, 其最佳配比为 25% 苦瓜汁、1.5% 金银花浸出汁、1% 淡竹叶浸出汁、8% 糖浆。具有除湿、利尿、清热解暑之功效, 是一种适用于夏季的清凉型功能性饮品。生产中不添加任何色素、香精和合成防腐剂, 为天然的营养保健饮料。

金银花、淡竹叶的有效成分为绿原酸、异氯原酸、

表 4 虫草素得率方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	e	F 值
A	6.25955E-06	2	0.000003	1.00
B	0.0008333	2	0.000417	133.12**
C	0.000821954	2	0.000411	131.31**
e	6.25955E-06	2	0.000003	1.00

注: F_{0.01(2,2)}=99; F_{0.05(2,2)}=19.0; F_{0.1(2,2)}=9.0; e 为误差; * 为显著; ** 为极显著。

3 结论

人工蛹虫草固体培养残基提取分离虫草素的研究结果表明: 水比乙醇更优于提取虫草素; 在离子交换层析分离虫草素时洗脱流速、料水比为主要影响因子; 固体培养残基中虫草素提取分离最优条件为: 料水比 1:16, 离子柱 pH 3.5; 洗脱流速为 1 滴/2 秒。

参考文献

- [1] 郭旭辉, 梁宗琦. 人工虫草发酵液的综合利用与展望[J]. 贵州农业科学, 2002, 30(5): 58-61.
- [2] 潘中华, 贡成良, 范雪峰. 蚕蛹虫草中虫草素的提取及纯化工艺研究[J]. 江苏蚕业, 2003, (2): 13-15.
- [3] 王重庆, 李云兰, 李德昌等. 高级生物化学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 64-71.

芦竹素、白茅素、木犀草素类黄酮、三萜、氨基酸等, 这些成分易溶于水, 因此选择水作浸提剂。为使有效成分充分浸出, 应确定适宜的浸提方法和浸提条件。

为确保饮料的澄清、稳定, 实验中重点研究苦瓜汁的酶解澄清, 获得了最佳酶解条件。同时通过醋酸纤维膜精滤, 添加 β-CD 等措施, 使产品的澄清度和稳定性更好。

参考文献

- [1] 张雁等. 苦瓜的营养保健功能及加工工艺[J]. 广州食品工业科技, 2000, (2): 24-25, 73.
- [2] 朱珠. 苦瓜保健饮品研制[J]. 食品科技, 2001(4): 48-49.
- [3] 徐怀德等. 金银保健饮料加工技术[J]. 食品工业科技, 1997, (1): 68-69.
- [4] 卢益中. 淡竹叶天然保健饮料的研制[J]. 食品工业科技, 1998, (4): 48-49.
- [5] 刘忠义, 江堂壁等. 金银花、甘草保健饮料的研制[J]. 软饮料工业, 1996(4): 42-44.