

微波提取龙须藤多糖的最佳条件研究

汪艳娟¹, 朱倩倩¹, 叶蕪芝², 徐两军¹, 许雪琴¹

(1. 福州大学 食品安全分析与检测技术教育部重点实验室, 福建 福州 350108;

2. 福建中医药大学 中西医结合研究院, 福建 福州 350108)

摘要: 选取微波功率、提取温度、提取时间和料液比作为因素, 以毛细管电泳-紫外检测测定龙须藤多糖水解产物中的单糖峰面积总和为指标, 通过单因素和正交试验, 对提取条件进行了优化. 结果表明, 最大影响因素为微波功率, 其次为提取温度, 再次为提取时间, 最后为料液比. 最优提取条件为微波功率 600 W, 提取温度 70 °C, 提取时间 25 min, 料液比 1:35.

关键词: 微波提取; 龙须藤; 多糖; 毛细管电泳

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2011)02-0092-05

龙须藤 (*Bauhinia championii* Benth.) 系双子叶植物豆科羊蹄甲属植物多年生藤, 又名羊蹄藤、九龙藤、五花血藤、梅花入骨丹, 具有祛风湿、行血气等功效, 主治跌打损伤、风湿骨痛、心胃气痛^[1]. 我国东南沿海植物资源丰富, 龙须藤分布广泛. 文献报道龙须藤中含有黄酮、甾苷、没食子酸等成分^[2-4]. 此外, 龙须藤中还含有糖类成分, 只是文献报道较少, 仅叶蕪芝等^[5]测定了龙须藤中的多糖含量. 本文采用微波协同萃取仪提取龙须藤中多糖成分, 通过单因素和正交试验优化了龙须藤多糖提取的条件, 经 seavage 法脱蛋白^[6]、醇沉^[7]获得龙须藤多糖, 以 8-氨基萘基-1,3,6-三磺酸二钠盐 (ANTS) 为衍生剂^[8-9], 对其多糖水解产物进行衍生, 首次借助毛细管电泳 (CE)-紫外检测 (UV) 测定了龙须藤多糖中的 7 种还原性单糖, 旨在为研究龙须藤糖类成分提供理论依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (美国 Beckman Coulter 公司, UV 检测器); 石英毛细管

(河北永年光导纤维厂); DK-8D 型电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司); PHS-3C 型精密酸度计 (上海大普仪器有限公司); MILLI-Q 超纯水系统 (美国 MILLIPORE 公司); RE-52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); DZF-6050 型真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); MAS-II 微波萃取/合成工作站 (2450 MHz, 上海新仪微波化学技术有限公司); HC-2064 高速离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司).

龙须藤采自福建福州永泰县青云山地区 (经福建中医药研究院鉴定), 由福建中医药大学叶蕪芝老师提供. 氰基硼氢化钠 (NaBH_3CN , Purity: 95%)、D-葡萄糖 (D-glucose, Glu, Purity \geq 99.5%)、D-阿拉伯糖 (D-arabinose, Ara, Purity \geq 99.5%) 均购于 Sigma 公司; 鼠李糖 (rhamnose, Rha)、半乳糖 (galactose, Gal)、D-木糖 (D-xylose, Xyl)、D-葡萄糖醛酸 (D-glucuronic acid, GluA)、D-半乳糖醛酸 (D-galacturonic acid, GalA) 均购于中国药品生物制品检定所, 供含量测定用; 8-氨基萘基-1,3,6-三磺酸二钠盐 (8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, ANTS, Purity: 98.0%)

收稿日期: 2011-01-18; 修订日期: 2011-03-11.

基金项目: 福建省新世纪优秀人才支持计划项目 (XSJRC2007-13); 福州大学人才基金 (XRC-0711); 陈可冀中西医结合发展基金资助项目 (CKJ2007020ZXJH200710).

作者简介: 汪艳娟 (1984-), 女, 在读研究生, 主要从事天然药物分析.

通讯作者: 许雪琴, 女, 教授, 主要从事天然药物分析. 电话: (0591) 87892415. E-mail: xxq@fzu.edu.cn

购于上海阿拉丁公司;冰乙酸($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$,成都市科龙化工试剂厂,水分0.2%)、浓磷酸(H_3PO_4 ,汕头市达濠精细化学品公司,85%)、二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,国药集团化学试剂有限公司,AR)、二甲基亚砜(DMSO,水分0.5%)、无水乙醇($\geq 99.7\%$)、正丁醇($\geq 99.7\%$)、氢氧化钠($\geq 96.0\%$)均购于天津市福晨化学试剂厂,无水乙醚($\geq 99.5\%$)、丙酮($\geq 99.5\%$)均购于上海化学试剂总厂,盐酸(36%~38%)购于泉州东海试剂有限公司,上述试剂均为分析纯。

1.2 标准溶液配制

准确称取上述7种单糖,分别溶于2.00 mL二次水,配成5.00 mmol/L溶液。各取单糖二次水溶液0.200 mL混合均匀,制备成混合标准溶液,存于冰箱保存。

1.3 龙须藤多糖的提取

称取龙须藤5.00 g,加入一定量的水,微波设定温度、时间、功率提取。提取液抽滤,滤液70℃浓缩至5.00 mL,sevage法(氯仿与正丁醇的体积比为4:1)多次脱蛋白至有机层澄清,分离上层液,浓缩至3.00 mL,加入乙醇至乙醇浓度为80%,4℃冰箱静置12 h,离心,80%乙醇洗涤沉淀物数次除去单糖,离心,沉淀物再用无水乙醇、乙醚、丙酮洗涤数次,60℃烘箱干燥,即得龙须藤粗多糖。

1.4 水解多糖样品溶液的制备

准确称取龙须藤粗多糖样品粉末9.0 mg装入水解管中。加入1.0 mL HCl(1.5 mol/L),充 N_2 后封管,置于105℃水解4 h。水解液经过滤后用饱和NaOH中和,定容至2.50 mL后,待用。

1.5 CE测试样品的制备

分别移取单糖混合标准溶液或样品溶液0.200 mL,依次加入0.200 mL含ANTS为25 mmol/L的醋酸水溶液(醋酸与水的体积比为3:17)、0.200 mL含氰基硼氢化钠为125 mmol/L的二甲基亚砜溶液,超声混匀。60℃下水浴加热1.5 h,得到单糖的ANTS衍生产物。每次测定时用水稀释到适当的浓度并用0.45 μm 的微孔滤膜过滤后测定。

1.6 CE测定条件

石英毛细管(60 cm \times 50 μm \times 370 μm ,有效长度50 cm);80 mmol/L磷酸-磷酸二氢钠(pH 2.10)为运行缓冲液,进样时间:0.5 psi \times 12 s,分离电压-20 kV,检测波长214 nm。

2 结果与讨论

2.1 单糖的CE测定

在最佳毛细管电泳分离条件下,对单糖衍生物混合溶液进行毛细管电泳分析,其电泳谱图见图1(a)。测得其日内、日间重现性如表1所示,各物质迁移时间的日内相对标准偏差(RSD)在0.21%~0.24%之间,日间RSD在0.66%~0.71%之间;峰面积日内RSD在1.9%~2.7%之间,日间RSD在2.7%~7.6%之间,说明该方法的重现性良好。不同提取条件下的龙须藤多糖水解后,经ANTS衍生,借助毛细管电泳-紫外检测测定龙须藤多糖水解产物(其电泳谱图见图1(b)),以单糖峰面积总和为指标,优化龙须藤多糖提取工艺。

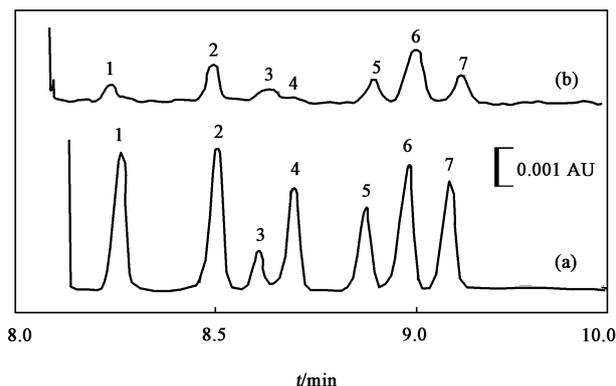


图1 标准品(a)及龙须藤多糖(b)直接水解样品的电泳图

1. ANTS-D-木糖; 2. ANTS-D-阿拉伯糖; 3. ANTS-D-葡萄糖; 4. ANTS-D-葡萄糖醛酸; 5. ANTS-L-鼠李糖; 6. ANTS-半乳糖; 7. ANTS-D-半乳糖醛酸。

Fig. 1 Electropherogram of Standards(a) and direct hydrolyzed saccharides(b)

of *Bauhinia championii* Benth polysaccharides

1. ANTS-D-Xyl, 2. ANTS-D-Ara, 3. ANTS-D-Glu, 4. ANTS-D-GluA, 5. ANTS-Rha, 6. ANTS-Gal, 7. ANTS-D-GalA.

2.2 微波提取时间的选择

固定料液比1:25,微波功率500 W,提取温度70℃,转速300 r/min,考察微波提取时间的影响。实验结果(见图2)表明提取时间超过25 min,总峰面积有下降趋势,可能是微波提取时间过长对多糖提取成分造成破坏,故单因素最优提取时间为25 min。

表 1 单糖衍生物混合溶液日内重现性($n=5$)
和日间重现性($n=3$)

Table 1 Precision of present
method in intra-day ($n=5$) and inter-day ($n=3$)

分析物	日内 RSD/%		日间 RSD/%	
	迁移时间	峰面积	迁移时间	峰面积
D-Xyl	0.21	1.9	0.68	2.7
D-Ara	0.23	1.9	0.68	4.2
D-Glu	0.22	2.7	0.66	6.3
D-GluA	0.22	2.3	0.68	4.6
Rha	0.22	2.0	0.69	6.9
Gal	0.23	2.0	0.69	7.6
D-GalA	0.24	2.7	0.71	6.7

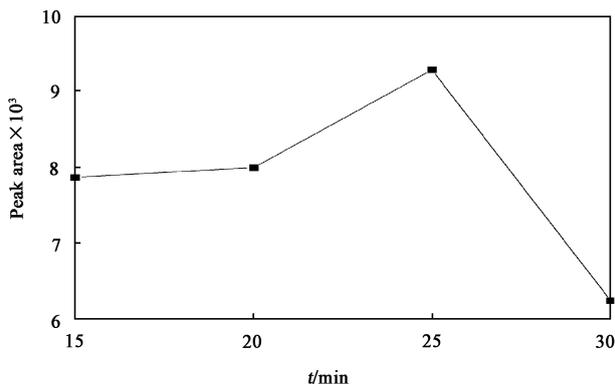


图 2 提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of extraction
time on extraction efficiency of polysaccharide

2.3 提取料液比的选择

固定微波功率 500 W, 提取时间 25 min, 转速 300 r/min, 提取温度 70 °C, 考查料液比对多糖提取的影响. 实验结果(见图 3)表明料液比小时, 多糖提取率低, 可能是提取不完全; 随着料液比增大提取率提高, 但料液比为 1:40 时, 提取率有所降低, 且增大了浓缩难度, 故单因素最优提取料液比为 1:25.

2.4 微波功率的选择

固定料液比为 1:25, 提取时间 25 min, 转速 300 r/min, 提取温度 70 °C, 考查微波功率的影响. 实验结果(见图 4)表明, 微波功率为 500 ~ 700 W 之间时提取率达到最高且稳定, 考虑微波功率大有可能破坏提取成分, 故单因素最优提取功率为 500 W.

2.5 提取温度的选择

固定微波功率 500 W, 提取时间 25 min, 转速 300 r/min, 料液比 1:25, 考察提取温度的影响. 实验结果(见图 5)表明, 温度过低, 有可能提取不充分;

而提取温度太高, 提取液沸腾, 会对提取成分造成破坏, 故单因素最优提取温度选取 60 °C.

2.6 正交试验设计

在单因素考查的基础上, 以微波提取时间、料液

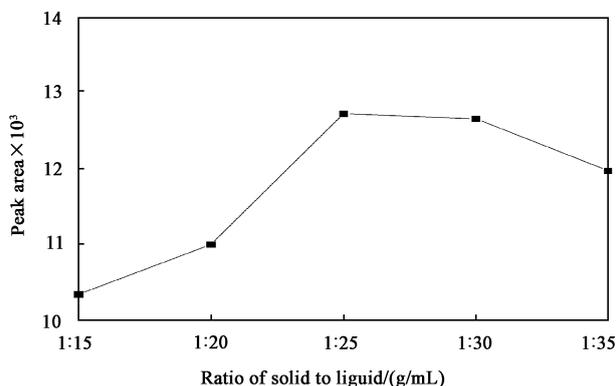


图 3 料液比对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of ratio of solid to liquid
on extraction efficiency of polysaccharide

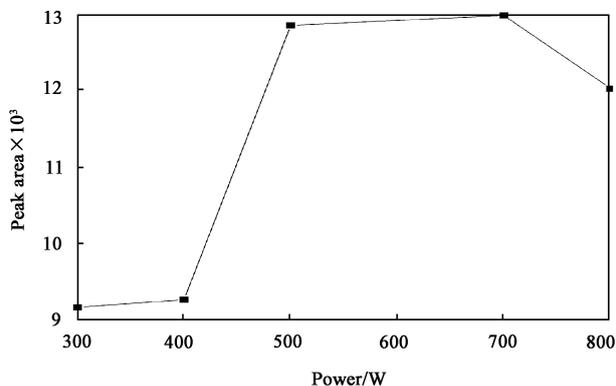


图 4 微波功率对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of microwave power
on extraction efficiency of polysaccharide

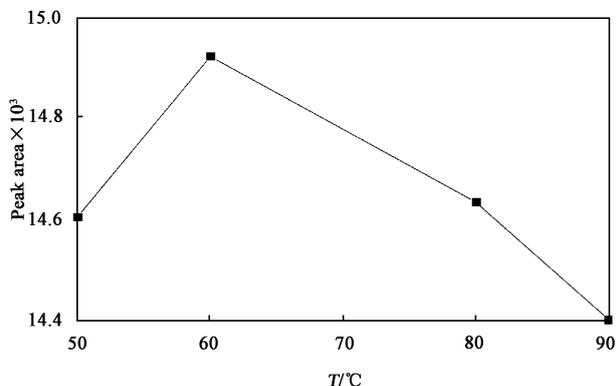


图 5 提取温度对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction temperature
on extraction efficiency of polysaccharide

比、微波功率和提取温度为因素,设计4因素、3水平的 $L_9(3^4)$ 试验,见表2。正交实验结果见表3。从极差 R 值分析可以看出 $R_C > R_D > R_A > R_B$,故微波提取龙须藤多糖最大影响因素为微波功率,其次为提取温度,再次为提取时间,最后为料液比。得到最优提取条件为C2D2A3B3,即600 W、70℃、25 min、1:35。

2.7 龙须藤粗多糖的测定和回收率实验

称取龙须藤样品3份,按最佳提取工艺提取龙须藤多糖,龙须藤中平均粗多糖含量为7.5 mg/g。用毛细管电泳测得龙须藤粗多糖中木糖、阿拉伯糖、

葡萄糖、葡萄糖醛酸、鼠李糖、半乳糖、半乳糖醛酸的含量分别为7.0、13.4、18.6、6.0、16.2、31.4、16.3 mg/g。为了评价本法用于分析实际样品的可行性,对龙须藤多糖水解糖类成分进行了回收率测定,其测定结果详见表4。由表4可见,龙须藤多糖水解糖类成分中7种糖类化合物的回收率基本满足了分析方法的要求。

3 结论

本文首次用毛细管电泳-紫外检测测定龙须藤多糖水解产物中的7种还原性单糖成分,通过四因

表2 正交试验的因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A 时间/min	B 料液比/(g/mL)	C 功率/W	D 温度/℃
1	15	1:25	500	60
2	20	1:30	600	70
3	25	1:35	700	80

表3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment

因素	A 时间	B 料液比	C 功率	D 温度	实验结果
实验1	1	1	1	1	10940
实验2	1	2	2	2	13684
实验3	1	3	3	3	10253
实验4	2	1	2	3	12316
实验5	2	2	3	1	10210
实验6	2	3	1	2	13741
实验7	3	1	3	2	12848
实验8	3	2	1	3	11696
实验9	3	3	2	1	14991
均值1	11626	12035	12126	12047	
均值2	12089	11863	13664	13424	
均值3	13178	12995	11104	11422	
极差R	1553	1132	2560	2003	

表4 龙须藤多糖中糖类物质回收率

Table 4 Recovery of saccharides of polysaccharides from *Bauhinia championii* Benth

分析物	低加标浓度/($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%	中加标浓度/($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%	高加标浓度/($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%
D-Xyl	0.89	75.3	1.79	83.6	3.57	84.6
D-Ara	0.89	83.8	1.79	80.0	3.57	92.1
D-Glu	1.07	91.6	2.14	109	4.28	116
D-GluA	1.15	86.0	2.31	82.3	4.62	80.4
Rha	1.08	92.7	2.16	92.9	4.32	106
Gal	1.07	74.1	2.14	86.9	4.28	85.1
D-GalA	1.15	75.4	2.31	84.5	4.62	96.2

素三水平正交试验,得到了龙须藤多糖微波提取的最佳条件,为龙须藤糖类研究提供了理论依据.

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1975: 43.
- [2] 徐伟, 郑海音, 洪振丰, 等. RP - HPLC 测定龙须藤中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(9): 763 - 766.
- [3] 陈黄保. HPLC 法测定龙须藤中没食子酸的含量[J]. 首都医药, 2009, 7(下): 60 - 61.
- [4] 白海云, 詹庆丰, 夏增华, 等. 九龙藤化学成分研究(I)[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(1): 42 - 43.
- [5] 叶蕪芝, 杨名平, 林薇, 等. 梅花入骨丹多糖含量的测定[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(4): 22 - 24.
- [6] 李向东, 惠和平, 封士兰, 等. 红芪多糖的脱蛋白及脱色素工艺[J]. 中国当代医药, 2010, 17(3): 40 - 41.
- [7] 李颖, 李庆典. 北沙参多糖提取工艺的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(1): 171 - 173.
- [8] Shuji K, Sen A, Atsushi T, *et al.* Simultaneous chiral resolution of monosaccharides as 8 - aminonaphthalene - 1, 3, 6 - trisulfonate derivatives by ligand - exchange CE using borate as a central ion of the chiral selector [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(21): 3 930 - 3 933.
- [9] 车发云, 刘正宇, 王克夷. 毛细管电泳分离寡糖衍生物及其电泳行为研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(5): 495 - 500.

Study on Microwave Extraction of Polysaccharides from *Bauhinia Championii* Benth

WANG Yan - juan¹, ZHU Qian - qian¹, YE Hong - zhi², XU Liang - jun¹, XU Xue - qin¹

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food Safety (Fuzhou University), and Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

Abstract: In order to optimize the microwave extraction conditions of polysaccharides from *Bauhinia championii* Benth, different factors affecting the extraction efficiency, such as the extraction time, solid - liquid ratio, microwave power, extraction temperature, were selected as the levels of single factor. The single factor and orthogonal tests were used to investigate the optimal microwave extraction conditions indicated by the total peak areas of monosaccharide in the hydrolyzed saccharides from *Bauhinia championii* Benth polysaccharide using CE equipped with a UV detector. The experiment results showed that the microwave power has the greatest impact on extraction efficiency, followed by the extraction temperature, extraction time and solid - liquid ratio. Therefore, the optimal microwave power, extraction temperature, extraction time and solid - liquid ratio were 600 W, 70 °C, 25 min, 1:35, respectively.

Key words: microwave extraction; *Bauhinia championii* Benth; polysaccharides; capillary electrophoresis

Classifying number: O657. 7

