

高山红景天愈伤组织中红景天甙的微波破细胞提取

刘传斌¹, 王威¹, 白凤武¹, 冯朴荪¹, 苏志国²

(1. 大连理工大学生化工程研究所, 辽宁 大连 116012; 2. 中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 高山红景天愈伤组织经 1 min 微波处理后, 室温下水提取 10 min, 可将红景天甙充分提取出来. 与传统提取方法相比, 微波破细胞提取具有提取时间短、不需加热、提取液中的杂质少等优点.

关键词: 红景天甙; 微波; 细胞破碎; 提取

中图分类号: TQ021.9; TQ028.9+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2001)03-0324-04

1 前言

高山红景天(*Rhodiola sachalinensis*)是我国东北长白山珍贵药用植物^[1], 其有效成份—红景天甙及甙元酪醇是一种环境适应药物, 具有抗疲劳、抗衰老、抗缺氧及增强脑力、体力机能等特殊功效^[2,3]. 红景天甙易溶于水, 但由于其水解酶的存在, 提取仍需用乙醇或甲醇为溶剂. 按传统浸取操作, 以甲醇或乙醇为溶剂, 加热回流 3 次, 每次 30 min, 才可将红景天甙充分提取出来. 采用索氏提取器提取, 也需 2 h^[4].

细胞壁和细胞膜的通透性是限制天然产物提取速率的关键因素, 故细胞破碎后, 将大大加速天然产物的提取. 现有高速珠磨和高压匀浆等细胞破碎方法可以实现目标产物的快速释放, 但同时胞内水解酶一起被释放出来, 造成目标产物的损失. 而且提取液中含有大量蛋白质等杂质, 加重了后续分离纯化的负担. 故上述细胞破碎方法都不适合天然产物的提取. 刘传斌等^[5,6]针对天然产物一般热稳定性好的特点, 利用微波加热速度快、效率高、选择性好等特性, 将微波技术用于细胞破碎, 建立了微波破碎细胞技术, 且成功用于酵母细胞内海藻糖的提取, 并将这种对生物材料进行微波破碎细胞预处理后进行提取的胞内产物提取方法称为“微波破细胞提取”^[7].

本文考察了微波破碎细胞技术对高山红景天愈伤组织中有效成份红景天甙提取的适用性, 并与传统提取方法进行了比较.

2 材料、机理和方法

2.1 实验材料

高山红景天野生植株采自吉林长白山, 并经中国科学院沈阳应用生态所李书心研究员鉴定; 愈伤组织由野生植株的茎作为外植体诱导所得^[8].

2.2 实验方法

高山红景天愈伤组织的微波处理: 将培养得到的高山红景天新鲜愈伤组织铺成厚度为 5 mm 的薄层, 置家用微波炉中处理一定时间.

微波处理后红景天甙的提取: 将微波处理后的生物材料(折合干重 5 g)用 100 ml 指定溶剂在室温下搅拌提取.

红景天甙的热回流提取:取 5 g 高山红景天愈伤组织干粉(0.25~0.35 mm)与 100 ml 甲醇置于 250 ml 烧瓶中加热回流提取 30 min, 过滤, 收集提取液, 药材残渣再提取 2 次。

红景天甙的索氏提取:称取 2 g 高山红景天愈伤组织干粉, 用 30 ml 甲醇于索氏提取器中回流提取 2 h。

提取液中红景天甙分析^[4]:采用岛津 LC-6A 高效液相色谱仪进行分析, 色谱柱为 YWM-C18 (10 μ) 200 \times 4.6 mm (中国科学院大连化物所), 流动相甲醇:乙腈:水=15:5:80, 流速 1 ml/min, 进样量 10 μ l, UV 检测, 定量参数为峰面积。红景天甙标准品购自中国药品生物制品检定所, 酪醇标准品以及溶剂甲醇和乙醇等均为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为二次蒸馏水。每次重复试样 3 个, 取其平均值。

红景天甙的提取率:研究发现^[4], 高山红景天愈伤组织干粉经 2 h 索氏回流提取后, 红景天甙已完全提取出来。所以, 以索氏提取 2 h 得到的红景天甙为基准, 计算不同提取操作的红景天甙提取率, 即

$$\text{红景天甙提取率} = \frac{\text{该条件下从 1g 物料中提取出的红景天甙的量 (g)}}{\text{1g 物料经 2h 索氏回流提取得到的红景天甙的量 (g)}} \times 100\%$$

2.3 微波破碎细胞的机理^[7]

微波破碎细胞是基于微波加热的选择性、瞬时性和高效性, 控制适宜的微波条件而实现的。生物细胞内不同部位的物质, 对微波能的吸收能力存在显著差别, 从而导致微波场中的细胞局部受热。富含自由水的部位, 如液胞, 在微波场的作用下迅速升温, 水份汽化, 胞内压力骤增。细胞壁和(或)细胞膜不能承受如此大的内压, 故细胞在一定强度的微波冲击下出现缺口而破碎。

3 结果与讨论

3.1 提取溶剂的选择

将高山红景天愈伤组织进行 3 min 微波处理后, 分别用甲醇、95%乙醇、70%乙醇和水在常温下搅拌提取 10 min, 测定提取液中红景天甙的含量。

传统回流提取选择醇为提取剂, 一方面是防止红景天甙被其水解酶降解, 另一方面是由于提取出的杂质种类和数量较少, 便于后续处理。而由实验结果(图 1)可见, 微波处理后再提取红景天甙, 最适的提取溶剂是水而不是醇。微波处理同时为灭酶过程, 处理后再提取, 不必担心目标产物的酶解。室温下红景天甙在水中的溶解度比在醇中好, 故可用水为溶剂。

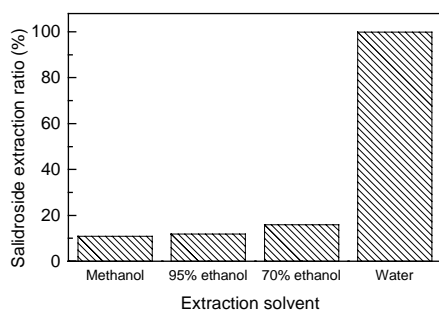


图 1 提取溶剂的选择
Fig.1 Selection of extraction solvent

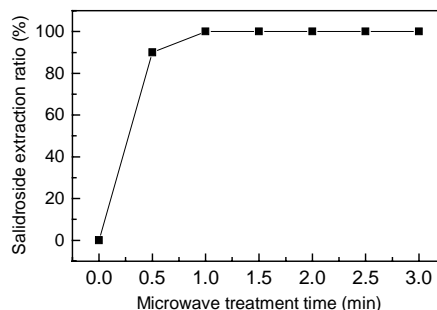


图 2 微波处理时间的确定
Fig.2 Determination of microwave treatment time

3.2 微波处理时间的确定

分别将高山红景天愈伤组织处理不同时间,然后用水在室温下提取 10 min,测定提取液中红景天甙的含量,结果见图 2,表明微波处理 1 min 就能达到提取的要求.

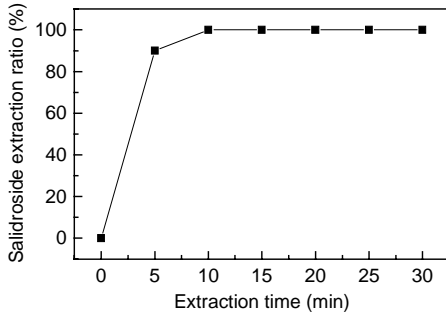


图 3 提取时间的确定

Fig.3 Determination of extraction time

3.3 提取时间的确定

将高山红景天愈伤组织进行 1 min 微波处理后,用水在常温下分别搅拌提取 5~30 min,测定提取液中红景天甙的含量,结果见图 3,表明提取时间为 10 min 即可.

3.4 微波破细胞提取与传统提取的比较

分别取高山红景天愈伤组织进行微波破细胞提取、3 次 30 min 加热回流提取及 2 h 索氏回流提取.实验发现,3 种方法得到的红景天甙的量基本相同.但微波破细胞提取的蛋白质等杂质大大少于传统提取,这对于有效成份的后分离具有重要意义.实验结果见表 1.

表 1 微波破细胞提取与传统方法的比较

Table 1 Comparison of salidroside extraction between microwave cell disruption and traditional methods

Extraction method	Extraction after microwave cell disruption	Leaching	Soxhlet extraction
Extraction solvent	Water	Methanol	Ethanol
Extraction temperature	Room temperature	Boiling point	Boiling point
Extraction time (min)	10	3×30	120
Salidroside extracted (mg/g)	6.67	6.65	6.68
Salidroside extraction ratio (%)	100.00	99.69	100.15
Protein extracted (mg/g, dry)	0.86	6.21	3.89

细胞破碎后,细胞内容物一般全部释放,提取液中将含有大量蛋白质等大分子杂质.但实验发现,微波破细胞提取,提取液中的蛋白质杂质含量很少.这是因为微波破细胞只使细胞表面出现孔洞和裂纹,小分子物质可以自由进出细胞,但并未将细胞内容物完全释放到胞外,细胞仍保持其形态.另外,在微波处理过程中,胞内蛋白质分子的三维结构随微波场方向的变化而被破坏,蛋白质分子缠绕成球,又加上胞内的局部升温,蛋白质发生变性,从而改变了其溶解性.

天然产物的提取,工业上仍普遍采用传统的浸取操作,费时、费力,效率低,技术水平落后^[9,10].一方面,浸取操作在提取前没有进行细胞破碎,细胞壁和(或)细胞膜带来很大的提取阻力,提取时间长;另外,浸取操作不能使胞内水解酶迅速失去活性,反而由于缓慢升温促进了酶对目标产物的降解,珍贵的原料资源没有被充分利用.所以,提取时间长和收率低是困扰胞内天然产物提取的关键问题之一.而微波破细胞提取技术恰恰克服了浸取操作的上述缺点.微波破碎后的细胞,由于减小了提取阻力,其胞内小分子物质的溶出变得非常容易,可大大缩短提取时间;此外,微波处理还能使胞内目标产物的水解酶失去活性,避免提取过程中目标产物的降解.因此,微波破细胞提取技术同时解决了降低提取阻力和避免酶对产物的降解这两个问题,为天然产物提取技术的进步提供了新的选择.

4 结 论

微波处理后,高山红景天愈伤组织中有效成份红景天甙的提取变得非常容易,以水为提取溶剂,常温搅拌提取 10 min 即可.与传统加热回流提取相比,微波破细胞提取具有提取时间短、不需加热、提取液中的杂质少等优越性.

参考文献:

- [1] 吴维春. 长白山珍贵药用植物高山红景天 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1987. 1-18.
- [2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志, 34 卷, 第一分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984. 161.
- [3] 许建峰, 应佩青, 苏志国. 高山红景天资源应用与开发研究进展 [J]. 中草药, 1998, 29(3): 202-204.
- [4] 刘传斌, 金郁, 李宁, 等. 不同来源高山红景天材料中有效成分的 HPLC 分析 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(2): 18-22.
- [5] LIU C B, XIE J, BAI F W, et al. Trehalose Extraction from Microwave Treated Yeast [J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(12): 941-943.
- [6] 刘传斌, 谢健, 云战友, 等. 用微波破碎细胞及胞内产物的分离 [P]. 中国专利: 97123380, 1997-12-05.
- [7] 刘传斌. 酵母胞内海藻糖的积累规律和微波破细胞提取技术 [D]. 大连: 大连理工大学, 1999. 61-90.
- [8] XU J F, LIU C B, HAN A M, et al. Strategies for the Improvement of Salidroside Production in Cell Suspension Cultures of *Rhodiola Sachalinensis* [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 288-293.
- [9] 化学工程手册编委会. 化学工程手册, 第 14 篇: 萃取和浸取 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1989. 298-313.
- [10] 徐莲英, 陶建生, 冯怡, 等. 中药制剂发展的回顾 [J]. 中成药, 2000, 21(1): 6-21.

Salidroside Extraction from *Rhodiola Sachalinensis* Callus after Microwave Cell Disruption

LIU Chuan-bin¹, WANG Wei¹, BAI Feng-wu¹, FENG Pu-sun¹, SU Zhi-guo²

(1. Inst. Biochem. Eng., Dalian Univ. Technol., Dalian, Liaoning 116012, China;

2. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Chem. Metall., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: After 1 min of microwave treatment for cell disruption, salidroside can be extracted from *Rhodiola sachalinensis* fresh callus by water at room temperature within 10 min. Compared with traditional operations, the extraction time was shortened, long time heating was avoided, and less impurity was extracted into the extractant.

Key words: salidroside; microwave; cell disruption; extraction