

甜味绞股蓝不同部位多糖含量的研究

郑小江^{1,2}, 刘金龙², 田国政²

(1. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室 湖北民族学院, 湖北恩施 445000; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000)

摘要 [目的] 测定甜味绞股蓝根茎叶中多糖含量, 对增加提取甜味绞股蓝多糖原料、提高种植绞股蓝单位面积产值有重要意义。[方法] 采用超声波和微波结合提取法, 分别提取甜味绞股蓝根茎叶中多糖。[结果] 甜味绞股蓝根、茎、叶中多糖含量分别为0.56%、2.07%、2.51%, 与股蓝原变种差异达到0.05显著水平。[结论] 甜味绞股蓝根茎中多糖有提取价值、综合利用价值, 为甜味绞股蓝根茎叶的综合利用奠定了基础。

关键词 甜味绞股蓝; 不同部位; 多糖含量

中图分类号 S567.23+7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)30-13223-03

Research of Sweet Gynostemma Polysaccharide Content in Different Parts

ZHENG Xiaojiang et al (Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei Institute for Nationalities, Enshi, Hubei 445000)

Abstract [Objective] The polysaccharide contents from roots, stems and leaves of sweet Gynostemma were studied. It was important for the increase of raw material extracted the polysaccharide and the improvement of output value per unit area. [Method] The combination of ultrasonic and microwave was adopted to extract the polysaccharide from the sweet Gynostemma's roots, stems and leaves. [Result] The content of polysaccharides in roots, stems and leaves of sweet Gynostemma were 0.56%, 2.07%, 2.51%. Variance between sweet Gynostemma and original variant Gynostemma was significant. [Conclusion] It had the extracted value and comprehensive utilization value for the extraction of the polysaccharide in the roots and stems of sweet Gynostemma. The research laid the foundation for comprehensive utilization of roots, stems and leaves of sweet Gynostemma.

Key words Sweet Gynostemma; Different parts; Polysaccharide content

随着人们生活水平的提高, 人们对医疗保健品的追求越来越趋向于回归大自然。天然营养保健品和天然药物的研究开发已为国内外有关专家所重视。根据中医理论和现代科学技术分析, 许多生物活性物质对人类健康具有重要意义。它们能提高机体的免疫活性, 诱导干扰素的产生, 使失去平衡的机体恢复正常, 起到保健或对某些疾病的治疗作用。天然多糖是一类重要的生物活性物质, 具有多方面的生物活性和保健功能, 可作为药物和保健品的有效成分, 对于预防和治疗包括癌症在内的多种疾病都具有巨大的作用。现代药理研究表明, 绞股蓝多糖具有抗疲劳和延长细胞寿命、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗癌、镇静、催眠、止痛等作用^[1-24]。甜味绞股蓝多糖无怪味, 比苦味绞股蓝多糖的商品性更好。生产上大量使用绞股蓝地上部分, 主要是叶片, 而把占总产量70%的茎、根茎、根丢掉。所以, 弄清甜味绞股蓝根茎叶中多糖含量, 对增加提取甜味绞股蓝多糖原料、提高种植绞股蓝单位面积产值有重要意义。

1 材料与方

1.1 材料 供试甜味绞股蓝采自不同区域。

1.2 仪器 JY96 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); DL-720L 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); WD800TL23-K3 微波炉(佛山市顺德区微波炉电器有限公司); RESL 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); TGL-L6G A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); HH6 数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司); HN202-2AS 不锈钢电热恒温干燥箱(上海苏进仪器设备厂); JA2003NL 电子分析天平(上海亚荣生化仪器厂); SZ-93 自动双重纯水蒸馏

器(上海亚荣生化仪器厂); 722S 可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)。

1.3 试剂

1.3.1 浓度5%苯酚溶液。取苯酚100g, 加铝片0.1g和NaHCO₃0.05g, 蒸馏, 收集182 馏分, 称取12.5g精制苯酚, 加适量水溶解后转移至250ml容量瓶中定容, 置冰箱内备用。

1.3.2 标准葡萄糖溶液。准确称取干燥至恒重的葡萄糖25.0g, 加适量水溶解, 转移至250ml容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为100μg/ml标准葡萄糖储备溶液。使用时, 再稀释标准葡萄糖储备溶液质量浓度至10、20、30、40、50、60、70、80、90μg/ml的标准使用液。

1.3.3 A、B除杂试剂。称取A试剂1g溶解于100ml蒸馏水中; 称取B试剂1g溶解于100ml浓度为1%的醋酸中, 4 保存。

1.4 甜味绞股蓝多糖的提取方法

1.4.1 超声波提取。分别称取过40目筛的绞股蓝根、茎、叶各10g, 分别溶解于80ml纯水中, 静置2h, 然后放于强度为300W的超声波细胞粉碎机中粉碎20min, 过滤后, 再加80ml纯水进行超声波提取, 重复处理2次。

1.4.2 微波提取。将超声波提取的滤渣分别溶解于200ml纯水, 放于强度为300W的微波炉中提取8min, 将提取温度控制在80 。

1.4.3 色素等杂质的去除。收集提取过的滤液, 用转速为1200r/min的冷冻高速离心机离心15min, 去除悬浮于溶液中固体杂质。然后, 在温度恒定为80 的水浴锅中加热, 并以2%的比例加入ZTC除杂剂A溶液, 用玻璃棒搅拌, 每10min搅拌1次, 2h后以同样的比例加入ZTC除杂剂B溶液, 用玻璃棒搅拌, 每10min搅拌1次, 2h后取出提取液, 冷却离心, 除去离心沉淀杂质, 回收上清液。

1.4.4 浓缩。将除杂的上清液置旋转蒸发器浓缩, 温度控

基金项目 生物资源保护与利用湖北省重点实验室资助(2007022, 2007021)。

作者简介 郑小江(1958-), 男, 山东淄博人, 教授, 从事植物资源开发利用方面的研究。

收稿日期 2008-07-23

制在 50 。

1.4.5 总皂甙等杂质的去除。向浓缩液中缓慢滴加无水乙醇,至无沉淀生成为止,然后离心得沉淀物质,放于电热恒温干燥箱干燥至恒重,得到绞股蓝多糖。

1.5 标准曲线的制作 准确移取去离子水 2.00 ml 和质量浓度为 10、20、30、40、50、60、70、80、90 μg/ml 的葡萄糖标准使用液各 2.00 ml 于干燥的具塞试管中,加入浓度 5% 苯酚溶液 1.00 ml,摇匀,立即加入浓 H₂SO₄ 5.00 ml,充分摇匀,室温放置 15 min 后置 40 的水浴中加热 10 min,取出再放置 15 min,以蒸馏水为空白,在波长 490 nm 处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制吸光度—葡萄糖质量浓度的关系曲线,见图 1。线性回归方程为:

$$A = 0.0705 + 0.01345 \quad (1)$$

葡萄糖含量在 5 ~ 90 μg/ml 范围内呈良好的线性关系。

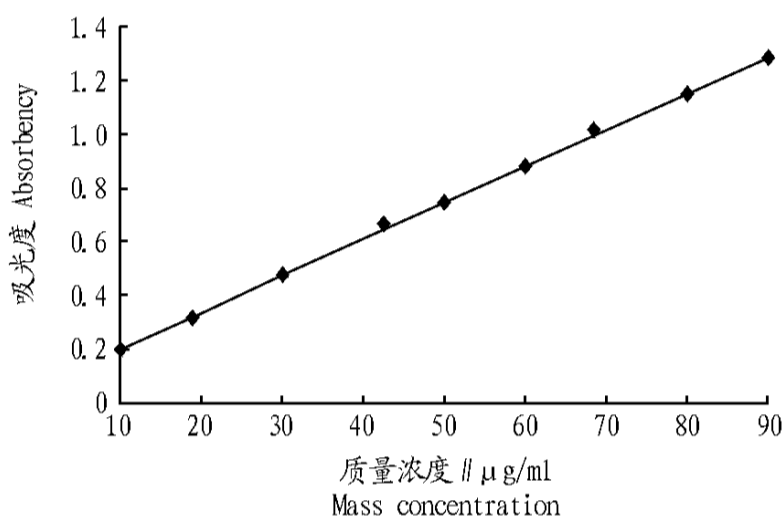


图1 绞股蓝多糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of polysaccharide in Gynostemma

1.6 多糖含量的测定 精密称取多糖供试品 1 g,水解后按“1.5”测定吸光度值,计算葡萄糖质量浓度,得换算因子(f) 5.427 3。按下式计算样品中多糖的质量分数。

$$\text{多糖的质量分数} = \frac{C \cdot D \cdot f}{W} \times 100\% \quad (2)$$

式中,C 为样品溶液中葡萄糖质量;D 为样品溶液的稀释倍数;f 为换算因子;W 为样品质量。

1.7 样品含量的测定 称取已提取的绞股蓝根、茎、叶多糖干粉各 200 mg 于 20 ml 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,即为样品液,摇匀待用。从样品液中准确吸取 1 ml 于具塞试管中,测定方法见“1.5”,以空白为对照,测吸光度。

表1 因素水平

Table 1 Factors and levels

| 水平 Level | 因素 Factor | | | |
|----------|---------------------|------------|-------------------------------|-----------------|
| | A(溶剂 Solvent) | B(时间 Time) | C(溶剂浓度 Solvent concentration) | D(强度 Intensity) |
| 1 | 甲醇 Methanol | 10 | 10 | 200 |
| 2 | 乙醇 Ethanol | 20 | 20 | 300 |
| 3 | 超纯水 Ultrapure water | 30 | 30 | 500 |

1.8 回收率的测定 精密称取恒重无水葡萄糖 10 mg,加蒸馏水溶解至 1 ml,测定操作同“1.7”。

2 结果与分析

2.1 超声波提取甜味绞股蓝多糖的多因素正交条件优化结果 在单因素考察的基础上,称取相同质量的绞股蓝粉 9

份,分置于 9 个烧杯中,按表 1 设定的因素进行超声提取、过滤,取过滤液备用。该试验选取溶剂、提取时间、溶剂浓度和提取强度 4 个因素,每个因素 3 个水平,选用 L₉(3⁴) 正交表^[22]。

表2 正交试验方案与结果

Table 2 Scheme and result of orthogonal test

| 序号 No. | A | B | C | D | 粗多糖 % Gude polysaccharide |
|----------------|-------|-------|-------|-------|---------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.599 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.751 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.548 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.601 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.829 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.554 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.431 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.931 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.721 |
| K ₁ | 1.897 | 1.631 | 2.084 | 2.148 | |
| K ₂ | 1.985 | 2.511 | 2.074 | 1.736 | |
| K ₃ | 2.082 | 1.823 | 1.807 | 2.080 | |
| R | 0.185 | 0.880 | 0.276 | 0.412 | |

由正交试验、方差分析可以得出,试验过程中各因素对结果的影响次序为 B > D > C > A,即时间 > 强度 > 溶剂浓度 > 溶剂。由表 2 可知,最优组合为 A₃B₂C₁D₃,即溶剂种类为超纯水,时间为 20 min,强度为 300 W。

2.2 微波多因素正交条件提取绞股蓝多糖的优化结果 称取相同质量的绞股蓝粉 9 份,分置于 9 个烧杯中,按表 3 设定的因素进行微波提取,过滤,取过滤液备用。该试验选取液料比、提取时间、提取温度和提取强度 4 个因素,每个因素 3 个水平,选用了 L₉(3⁴) 正交表。

表3 因素水平

Table 3 Factors and levels

| 水平 Level | 因素 Factor | | | |
|----------|------------------------------|-------------------|------------|-----------------|
| | A(液料比 Liquid to solid ratio) | B(温度 Temperature) | C(时间 Time) | D(强度 Intensity) |
| 1 | 10 | 40 | 6 | 300 |
| 2 | 15 | 60 | 8 | 400 |
| 3 | 20 | 80 | 10 | 500 |

由正交试验、方差分析可以得出,试验过程中各因素对结果的影响次序为 A > C > B > D,即液料比 > 时间 > 温度 > 强度。由表 4 可知,最优组合为 A₃B₃C₂D₁,即液料比为 20 倍,温度为 80 ,时间为 8 min,强度为 300 W。

2.3 采用优化后最佳提取技术对绞股蓝根、茎、叶多糖含量的方差分析 对采自不同区域的绞股蓝不同部位多糖含量,采用筛选出的绞股蓝多糖最佳提取参数,用超声波在溶剂种类为超纯水、时间为 20 min、强度为 300 W 的条件下提取,再用微波在液料比为 20 倍、温度为 80 、时间为 8 min、强度为 300 W 的条件下提取,不同区域不同部位多糖含量见表 5。

方差分析结果表明,绞股蓝在不同区域的环境条件下,多糖含量不存在差异,不同部位的多糖含量有 0.05 水平显著差异。甜味绞股蓝根、茎、叶中多糖的含量分别为 0.56%、2.07%、2.51%。

表4 正交试验方案与结果

Table 4 Scheme and result of orthogonal test

| 序号 No. | A | B | C | D | 粗多糖 % Gude polysaccharide |
|----------------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.452 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.585 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.670 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.729 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.588 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.656 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.866 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.704 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1.261 |
| K ₁ | 1.707 | 2.074 | 1.811 | 2.300 | |
| K ₂ | 1.973 | 1.877 | 2.576 | 2.107 | |
| K ₃ | 2.831 | 2.587 | 2.124 | 2.103 | |
| R | 1.124 | 0.710 | 0.765 | 0.197 | |

表5 不同区域不同部位多糖含量 %

Table 5 Polysaccharide contents in different parts at different regions

| 不同部位 Different parts | A | B | C | D | E |
|-------------------------|------|------|------|------|------|
| 根 Root | 0.56 | 0.54 | 0.58 | 0.57 | 0.55 |
| 茎 Stem | 2.07 | 2.05 | 2.09 | 2.08 | 2.06 |
| 叶 Leaf | 2.51 | 2.49 | 2.53 | 2.50 | 2.52 |

3 结论与讨论

(1) 该试验采用优化后的最佳提取技术——超声波微波结合法,即采取超声波微波各自正交最佳组合,提取甜味绞股蓝不同部位的多糖,得甜味绞股蓝根、茎、叶中多糖含量为0.56%、2.07%、2.51%,比超声波微波任何单一方法提取率高。其原因是超声波以破碎细胞壁为主,微波以破碎细胞膜为主,而植物多糖主要来源于植物的细胞壁和细胞膜内,所以两者结合使用提取速度快且彻底。

(2) 在使用超声波提取绞股蓝粗多糖时,有人采用乙醇或甲醇作为提取剂。该试验曾采用乙醇、甲醇及超纯水作为提取剂进行正交试验。在最佳提取组合中,超纯水多糖效果较好,可大幅度降低生产成本,提高产品质量。

(3) 在采用苯酚—硫酸法测定多糖含量时,由于使用的溶液为硫酸,在比色时应将比色杯上硫酸擦尽,否则会影响结果。

(4) 研究表明,甜味绞股蓝中根、茎、叶中都含有一定量的多糖,但含量有比较大的差别,其中叶中多糖的含量最高,根中的含量最低。虽然绞股蓝根茎多糖含量低于叶多糖,但绞股蓝根茎的产量是叶的3倍,因此开发利用绞股蓝根茎多

糖为绞股蓝综合开发利用奠定了基础。

(5) 有研究表明,绞股蓝原变种茎、叶多糖的含量分别为0.84%、1.78%,没有根多糖含量的报道^[25-26]。供试甜味绞股蓝品种不同部位多糖含量高于全世界推广的绞股蓝原变种,具有更高的工业提取价值和推广应用价值。

参考文献

- [1] 聂凌鸿,宁正祥. 活性多糖的构效关系[J]. 林产化学与工业,2003,23(4):89-94.
- [2] RYOKO KONDA, MASASHI TOMODA. Structural features of Monan C, arcticuloendthelial system active arg polysaccharide from the Rhizome of curcuma longa [J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(2):441.
- [3] 王蓉,吴剑波. 多糖生物活性的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2001,22(5):97-100.
- [4] CAO H. 具有抗HIV活性的天然产物[J]. 国外医药植物药分册,1993,8(2):65.
- [5] 王钦茂,洪浩,赵帆平. 丹皮多糖-2b对2型糖尿病大鼠模型的作用及其降解作用机制[J]. 中国药理学通报,2002,18(4):456-459.
- [6] 何伟,刘金玲,谢巍. 海带纤维降血脂作用研究[J]. 河南医科大学学报,1999,34(2):41-43.
- [7] 梁英,杨宏志,夏远亮. 黑木耳多糖对小鼠血脂及过氧化物酶的影响[J]. 营养学报,2000,22(3):250-252.
- [8] 李茂言,何利城,吴志诚. 莽桔果胶对高血脂大鼠调脂作用的实验研究[J]. 中成药,1999,21(3):135-137.
- [9] 汪东风. 茶叶多糖抗辐射能力的研究[J]. 茶叶科学,1996,16(1):1-18.
- [10] 张以芳,段刚. 螺旋藻及其多糖、多糖蛋白提取物对体外癌细胞的抑制作用[J]. 海洋科学,2000(3):16-18.
- [11] 姜振岭,陈伟民,马丽萍,等. 绞股蓝多糖对肿瘤细胞的抑制作用[J]. 河南医科大学学报,1996(1):87-88.
- [12] 姜振岭,马丽萍,张晓琴,等. 绞股蓝多糖(GPS)生物学作用的研究[J]. 河南肿瘤学杂志,1996(3):168.
- [13] 李景良,姜振岭,马丽萍,等. 绞股蓝多糖F1服液治疗失眠症62例临床分析[J]. 河南医科大学学报,1996(3):90.
- [14] 王卫国,赵永亮,韩山宝. 香菇多糖分离纯化技术研究[J]. 中国食用菌,2001,21(2):30-32.
- [15] 陈都昌,吴东儒,陶乐平. 天门冬多糖的分离纯化及部分理化性质[J]. 安徽大学学报,1994(2):88-94.
- [16] 黄民权,蔡体育,黄步汉,等. 铁皮石斛多糖的提取分离和分析[J]. 中草药,1994,25(3):128-129.
- [17] 张晓静,刘会东. 植物多糖提取分离及药理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药,2003,14(8):495-497.
- [18] 赵国华,李志孝,陈宗道. 百合多糖的化学结构及抗肿瘤活性[J]. 食品与生物技术,2002,21(1):62-66.
- [19] 苗海云,吴国荣,陈景耀,等. 白苕中性杂多糖的分离纯化与结构分析[J]. 安徽农业大学学报,2004,31(1):30-33.
- [20] 鞠海,张建民,魏峰. 天然多糖的分离、纯化和结构鉴定[J]. 国外医药·植物药分册,2000,15(3):107-113.
- [21] 陈京,熊耀康. 多糖类药物的质量标准研究现状及其进展[J]. 浙江中医学院学报,2004,28(3):77-80.
- [22] 刘定远. 医药数理统计方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:254.
- [23] RUJANAWATIE C, KANJANAPOTH D, AMO M, MERDIPSON D. The anti-gastric ulcer effect of Gynostemma pentaphyllum Makino [J]. Phytotherapy, 2004, 11:431.
- [24] 罗焱辉,王昭晶. 绞股蓝多糖的研究进展[J]. 生物技术通讯,2005,16(6):703-704.
- [25] 郑小江,刘金龙. 甜味绞股蓝人参总皂甙、总氨基酸、总多糖综合提取工艺[J]. 农业工程学报,2002,18(6):144-147.
- [26] 马丽萍,赵培荣,张惠芳,等. 绞股蓝不同部位多糖含量的测定[J]. 河南医科大学学报,2000,9(5):445-446.
- [20] CZECH B. Ecosystem management is no paradigm shift: Let's try conservation [J]. Journal of Forestry, 1995, 93(12):17-21.
- [21] 李俊清. 森林生态学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:477,480-481.
- [22] WCED. Our common future [M]. Oxford Univ Press, Oxford, 1987.
- [23] 欧阳勋志. 森林生态系统经营探讨[J]. 林业资源管理,2002,10(5):43-47.

(上接第13162页)

- [18] WOOD C A. Ecosystem management: Achieving the new land ethic [J]. Renewable Resources Journal, 1994, 12:6-12.
- [19] FLICK W A, KING W E. Ecosystem management as American Law [J]. Renewable Resources Journal, 1995, 13:6-11.