

简鞘蛇菰及其寄主植株多糖成分的提取与优化^{*}

姚茜¹, 侯娟², 祝迪凡¹, 袁红¹, 吴昕潮¹, 杨宙¹

(吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000)

摘要: 为了寻找适于测定简鞘蛇菰多糖含量的稳定方法。本文以简鞘蛇菰、粉背南蛇藤、山桂花的块根为材料, 采用超声波协同酶法提取多糖, 再以改良苯酚-硫酸比色法测定, 根据葡萄糖标准曲线计算得其多糖含量。其中多糖含量分别为: 6.75%、9.50%、10.00%。超声波协同酶法可作为简鞘蛇菰及其寄主植株中多糖的提取方法, 且为其多糖的应用与替代奠定了基础。

关键词: 简鞘蛇菰; 多糖; 提取

中图分类号: R931.71

文献标志码: B

文章编号: 1001-9677(2017)08-0067-03

Extraction and Optimization of Balanophore Involucrata Hook. f. and Its Host Plant Polysaccharide^{*}

YAO Xi¹, HOU Juan², ZHU Di-fan¹, YUAN Hong¹, WU Ting-chao¹, YANG Zhou¹

(Medical College, Jishou University, Hunan Jishou 416000, China)

Abstract: In order to find suitable for stable method for determination of Balanophore involucrata Hook. f. polysaccharide content, using Balanophore involucrata Hook. f., powder back south rattan, snake mountain osmanthus root as material, the polysaccharide was extracted by ultrasonic synergy enzymatic, and determined by a modified phenol-sulfuric acid colorimetry, the sugar was calculated by standard curve of polysaccharide content. The results showed that the contents of polysaccharide were 6.75%, 9.50%, 10.00%, respectively. Ultrasonic in collaborative enzymatic can be used as extraction method for involucrata Hook. f. and its host plant polysaccharide, and a solid foundation was laid for the application of the polysaccharide and alternative.

Key words: Balanophore involucrata Hook. f.; polysaccharide; extract

多糖具有多种生物活性, 是一种天然的功能性成分^[1]。目前, 国内外报道的 100 多种多糖来自植物、菌类、海洋生物等, 其中 95% 以上为植物多糖, 其药理作用涉及抗凝血、抗损伤、抗肿瘤、抗辐射、抗菌、抗病毒、抗寄生虫、抗衰老、调节免疫、降低血脂等一系列作用^[2]。

简鞘蛇菰别名鸡心七、借母怀胎、寄生黄、笔包七、鹿仙草、葛菌、文王一支笔(湘西土家族药名: 席科巴地 xi ke ba de), 是湘西土家族传统的“四大名药”之一^[3]。我国是把蛇菰入药最早的一个国家, 历代本草也有记述。《本草纲目》有较详细记载, 指出“秋霜浮空, 如芝、菌涌生地, 其色赤脆, 盖罩类也”^[4]。该植物全株入药, 主治肺热咳嗽、咯血, 脘腹疼痛, 黄疸, 痔疮, 跌打损伤, 月经不调, 阳痿、遗精等^[5]; 而其多糖具有抗疲劳作用^[6]。因此, 拟对蛇菰及其寄主植株中多糖成分的提取和测定方法展开研究, 以期对蛇菰中多糖成分的活性研究提供方法和依据, 为其广泛应用于生活奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

简鞘蛇菰(*Balanophora involucreta* Hook. f.), 在米长忠副教授

授带领下于湘西州永顺县野外(海拔 847 m, N29°09', E109°39') 采集而得, 并分类鉴定。

1.2 仪器

SHA-B 恒温水浴摇床, 精达仪器; UV-1600 双光束紫外-可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司; HH-8 数显恒温水浴锅, 环宇科技; IKA 旋转蒸发仪 RV 10 basic V, 天恒仪器; 智能型电热恒温鼓风干燥箱, 天恒仪器; 苯酚、硫酸、石油醚等试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 6% 苯酚溶液的配制

称取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g 和 NaHCO₃ 0.05 g, 蒸馏, 收集 182 °C 馏份, 称取 12 g, 加水 200 mL 溶解, 置棕色瓶内放冰箱备用。

1.3.2 制备葡萄糖标准曲线

精密称取 105 °C 下干燥恒质量的分析纯葡萄糖 20 mg 于 500 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 分别吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6 及 2.0 mL, 各以蒸馏水补水至 2.0 mL, 然后加入 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 置于 60 °C 水浴 20 min, 冷却,

^{*} 基金项目: 2016 年吉首大学校级科研项目(No: 104)。

第一作者: 姚茜(1996-), 女, 在读本科。

通讯作者: 侯娟(1979-), 女, 高级实验师, 本科, 主要从事临床医学研究。

于 490 nm 测其吸光度值。

1.3.3 提取工艺流程

采集清洗→烘干→磨碎→石油醚脱脂干燥→加水调节料液比→调 pH 值→加酶浸提→灭酶→超声波处理→离心分离→取上清液→定容→测多糖含量。

1.3.4 提取步骤

将筒鞘蛇菰及寄主植物粉背南蛇藤、山桂花的根采集、洗净、烘干、粉碎、过筛,用石油醚脱脂干燥 3 次,分别置于试剂瓶中备用;然后用超声波协同酶法进行提取^[7]。称取样品,以料液比 1:30 加入缓冲液置于锥形瓶中,加入一定量复合酶(纤维水解酶 400 u/g、木瓜蛋白酶 400 u/g),于 pH=6.5、50℃ 环境下恒温水浴震荡仪中浸提 1 h。取出放入 100℃ 水浴 30 s 灭酶,再超声波功率 600 W 下处理 30 min 后,以 3000 r/min 离心 15 min,收集上清液,取其中 1 mL 并定容至 50 mL 为中间液,再取中间液 1 mL 定容至 50 mL,作为药品样液。

1.3.5 提取液中多糖的测定

采用苯酚-硫酸比色法^[8]:将样品准确稀释合适倍数,吸取 2 mL 溶液,按标准曲线的步骤操作,测量其吸光度值,以标准曲线计算提取液中的多糖浓度。

1.3.6 计算多糖提取率

多糖提取率的计算方式如下:

$$\text{多糖提取率} = \frac{\text{提取液浓度} \times \text{体积}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 材料的采集

筒鞘蛇菰为多年生寄生肉质草本,无叶绿素,高 5~15 cm。根状茎肥厚,近球形,黄褐色,表面具浅色小疣。花茎红色或带黄色,中部具一总苞状的鞘;鞘筒状,上部稍膨大,寄生于林中粉背南蛇藤、山桂花的根上^[4];分别采集筒鞘蛇菰的全草及寄主植株的块根。如图 1 所示。



图 1 筒鞘蛇菰

Fig. 1 Balanophore involucreta Hook. f

2.2 葡萄糖标准曲线

葡萄糖标准液经测定后绘制标准曲线,如图 2 所示。试验结果表明,无水葡萄糖浓度 0.008~0.04 g/L 之间,呈良好的线性关系, $y=16x-0.002$ ($R^2=0.999$, y 为吸光度, x 为浓度)。

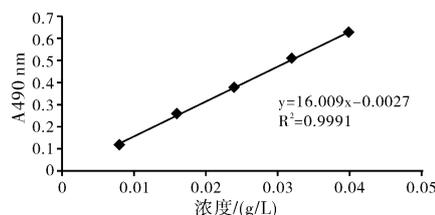


图 2 葡萄糖标准曲线

Fig. 2 Glucose standard curve

2.3 多糖含量的测定

分别将筒鞘蛇菰、粉背南蛇藤及山桂花多糖样液进行多糖的含量测定,样品数均为 $n=3$,平均吸光度分别为: $A_1=0.426$ 、 $A_2=0.607$ 、 $A_3=0.642$;则样液中含多糖浓度分别为: $C_1=0.027$ g/L、 $C_2=0.038$ g/L、 $C_3=0.040$ g/L。以生药量计,多糖含量分数分别为: 6.75%、9.50%、10.00%。可见其多糖含量与寄主植株存在差异,且含量低于寄主植株。

2.4 实验分析

文献表明:筒鞘蛇菰具有镇痛抗炎、醒酒保肝、抗衰老和抗疲劳、抗菌的药理作用^[8];而其多糖也具有抗疲劳等作用,但其多糖的应用有待进一步发展。多糖的提取方法较多,很多中药材中多糖的提取均使用水提醇沉法^[9-10]。多糖的提取从传统的溶剂萃取法到酶法、超声辅助法和微波辅助法,以及超临界 CO_2 萃取技术的应用,总体来说,提取的多糖的纯度有所提高,提取条件的要求也逐渐苛刻,对应的预处理要求和提取成本也就有所提高^[11]。

根据多糖的性质,多糖在水中的溶解性较大,且植株其他成分在酶的作用下水解,更便于多糖的提取,章文采用超声波协同酶法提取蛇菰多糖,通过一系列试验确定了提取方法的可靠性。多糖可被酸水解成单糖,单糖可同苯酚、蒽酮、咔唑类发生颜色反应^[12],反应后颜色的深浅和样品中糖的含量成正比,运用分光光度计进行测定。再根据葡萄糖标准曲线计算多糖的提取率达 6.75%。

蛇菰生于海拔 2000 m 以下的针叶林或阔叶林下,多寄生杜鹃花根上。有文献表明:蛇菰科为全寄生植物,根寄生的生态习性决定了它们植株矮小、生境阴湿、完全异养必需依赖寄主而生存,寄生在甜柳的树根上,或寄主为卫矛科植物粉背南蛇藤的块根^[13-14]。通过本次实验分别对其与寄主多糖的提取,可为它们具体化学成分的测定提供前提条件。

3 结论

在本次实验中,利用超声波协同酶法分别对筒鞘蛇菰及其寄主植株的多糖成分进行提取,再以改良苯酚-硫酸比色法测定多糖的含量,得寄主植株多糖含量均高于筒鞘蛇菰,为其多糖的应用是否存在替代品提供了一定方向。同时,筒鞘蛇菰多糖成分的药理效应还有待于进一步的研究,本研究也为以后其多糖应用于生活提供有价值的参考依据。

参考文献

- [1] 尹艳,高文宏,于淑娟. 多糖提取技术的研究进展[J]. 食品工业科技 2007(02): 248-250.
- [2] 王克夷,杜星光. 糖组和糖组学[J]. 医学分子生物学杂志 2004, 1(05): 261-264.
- [3] 杨德胜. 土家族药学[M]. 西宁: 青海人民出版社 2009, 15(10): 67-68.

(下转第 76 页)

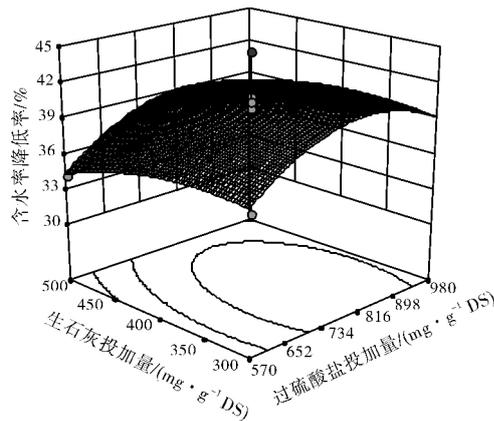
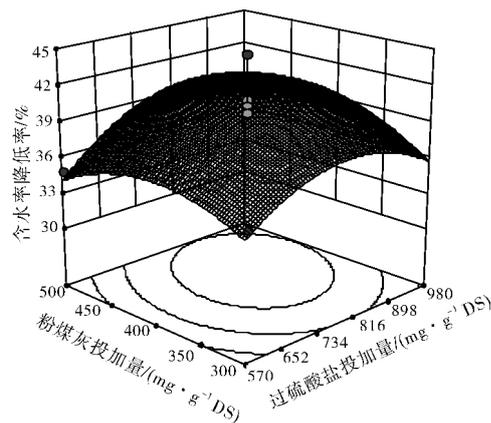
(a) 生石灰和过硫酸盐投加量对 R_1 的交互影响(b) 粉煤灰和过硫酸盐投加量对 R_1 的交互影响

图5 各因素对污泥含水率降低率影响的曲面和等高线图
Fig. 5 The 3D surface graph and contour plots for the effects of variables on moisture reduction efficiency

3 结论

过硫酸盐和骨架构建体协同可以使污泥含水率和比阻降低, 污泥的脱水性能得到改善; 经过RSM优化实验证明, 在活化过硫酸盐投加量为 $833.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DS}$, 生石灰投加量为 $341.44 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DS}$, 粉煤灰投加量为 $435.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DS}$ 时, 污泥含水率可以降至60%以下; 通过最佳条件验证实验获得的污

泥含水率与模型得到的预测值相比平均偏差为7.49%, 预测模型与实际结果吻合度良好。

参考文献

- [1] Zhen G, Lu X, Wang B, et al. Synergetic pretreatment of waste activated sludge by $\text{Fe}(\text{II})$ -activated persulfate oxidation under mild temperature for enhanced dewaterability [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 124(9): 29-36.
- [2] 徐鑫, 濮文虹, 时亚飞, 等. 活化过硫酸盐对市政污泥调理效果的影响[J]. *环境科学*, 2015, 36(11): 4202-4207.
- [3] 宋秀兰. 过硫酸盐氧化法对污泥脱水性能的影响[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(11): 5586-5589.
- [4] Benítez J, Rodríguez A, Suárez A. Optimization technique for sewage sludge conditioning with polymer and skeleton builders [J]. *Water Research*, 1994, 28(10): 2067-2073.
- [5] 刘欢, 杨家宽, 时亚飞, 等. 不同调理方案下污泥脱水性能评价指标的相关性研究[J]. *环境科学*, 2011, 32(11): 3394-3399.
- [6] Liang C, Wang Z S, Bruell C J. Influence of pH on persulfate oxidation of TCE at ambient temperatures [J]. *Chemosphere*, 2007, 66(1): 106-113.
- [7] Karr P R, Keinath T M. Influence of particle size on sludge dewaterability [J]. *Journal*, 1978, 50(8): 1911-1930.
- [8] Furman O S, Teel A L, Watts R J. Mechanism of base activation of persulfate [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(16): 6423-6428.
- [9] Zhen G, Lu X, Zhao Y, et al. Enhanced dewaterability of sewage sludge in the presence of $\text{Fe}(\text{II})$ -activated persulfate oxidation [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 116(4): 259-265.
- [10] 周健, 柴宏祥, 龙腾锐, 等. 活性污泥胞外聚合物EPS的影响因素研究[J]. *给水排水*, 2005, 31(8): 19-23.
- [11] 李亚林, 杨家宽, 杨昌柱, 等. 基于骨架构建体脱水污泥填埋长期稳定性研究[J]. *华中科技大学学报*, 2013, 41(9): 76-80.
- [12] Ferreira S L C, Bruns R E, Ferreira H S. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597(2): 179-186.
- [13] 邢奕, 王志强, 洪晨, 等. 芬顿试剂与DDBAC联合调理污泥的工艺优化[J]. *中国环境科学*, 2015, 35(4): 1164-1172.
- [14] 唐海, 沙俊鹏, 刘桂中, 等. $\text{Fe}(\text{II})$ 活化过硫酸盐氧化破解剩余污泥的实验研究[J]. *化学学报*, 2015, 66(2): 785-792.
- [15] 邢奕, 王志强, 洪晨, 等. 基于RSM模型对污泥联合调理的参数优化[J]. *中国环境科学*, 2014, 34(11): 2866-2873.
- [9] 徐海云, 杨尚军, 白少岩. 筒鞘蛇菰化学成分和药理活性的研究进展[J]. *食品与药学*, 2014, 14(01): 71-72.
- [10] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. *中国药学杂志*, 1996, 31(09): 550-553.
- [11] 郭胜伟, 蔡宝昌. 白参菌多糖的提取及含量测定[J]. *时珍国医国药*, 2001, 12(12): 1065-1067.
- [12] 杨黎江, 路金荣, 王晓娟, 等. 蛇菰多糖的提取及测定[J]. *昆明学院学报*, 2010, 32(3): 44-46.
- [13] 罗树毅. 蛇菰: 寄生在树根上[J]. *森林与人类*, 2012(1): 44-47.
- [14] 龚云维, 刘健昕, 刘向阳. 寻找神奇的寄生植物—蛇菰[J]. *中华大地上的神奇医药*, 2013(4): 40-41.

(上接第68页)

- [4] 米长忠, 周卫华, 彭英福. 湘西产筒鞘蛇菰生态环境及寄主植物初探[J]. *湖南中医药大学学报*, 2011, 31(11): 38-39.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第2册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 622.
- [6] 何玲, 高辉, 李春艳. 筒鞘蛇菰多糖抗疲劳作用研究[J]. *怀化学院学报*, 2011, 30(s1): 43-45.
- [7] 徐扬, 杨保伟, 柴博华. 超声波-酶法提取海带多糖及其抑菌活性[J]. *农业工程学报*, 2010, 26(s1): 356-362.
- [8] 薛梅, 周静. 五味子多糖的提取及含量测定[J]. *陕西中医*, 2003, 24(03): 267-268.