

灰树花多糖提取工艺的研究

刘炳福¹, 宫志远², 张 华³, 姚 强²

(1. 山东省农业科学院 科技信息研究所, 山东 济南 250100; 2. 山东省农业科学院 农业资源与环境研究所, 山东 济南 250100; 3. 山东中医药大学, 山东 济南 250352)

摘要:为进一步优选灰树花多糖的最佳提取工艺,研究了溶剂用量、提取时间及提取次数对灰树花多糖提取的影响。结果表明:通过提取方法的考查确定葡萄糖吸收曲线为 $Y=0.1258X+0.1055$ ($R^2=0.9992$),浓度在 $0.0214\sim0.1284\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时与吸收度呈良好的线性关系。采用正交设计,用硫酸-蒽酮法在波长618 nm处测定其吸收度,通过灰树花多糖得率的计算最终确定灰树花多糖的最佳提取工艺为水煎煮2次,煎煮时间分别为第1次提取2.0 h,第2次提取1.0 h,加28倍水,该方法简单,重现性好,提取率高。

关键词:灰树花;多糖;提取工艺;硫酸—蒽酮法

中图分类号:S646

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)03-0104-03

灰树花(*Griiflola frondosa*)是原产于北美和日本东部的一种食用菌,为珍稀的食、药两用菌,具有很好的保健作用和较高的药用价值,我国多地有零星野生分布。近年来,我国大量人工种植栽培,以浙江、福建和云南较为集中。研究表明,灰树花多糖有抗肿瘤作用,可用于治疗胃癌、食道癌及乳腺癌,若长期食用几乎可防止一切癌变。此外,灰树花多糖还可以增强肝功能,改善脂肪代谢,从而避免动脉硬化,抑制肥胖症,稳定血压^[1]。可见,灰树花的深入研究和开发具有非常重要的意义。该试验采用正交设计优选灰树花多糖的最佳提取工艺,为灰树花后续的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 721-100 分光光度计(上海第三分析仪器厂);恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);高速离心机(上海医疗器械三厂);FA1104型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.1.2 试剂及样品 无水葡萄糖对照品(105℃干燥恒重);新配0.2%蒽酮乙酸乙酯试剂;硫酸(分析纯,莱阳市双双化工有限公司);乙醇(分析纯,天津市北方天医化学试剂厂);乙醚(分析

纯,北京益利化学品有限公司)。灰树花,经鉴定为多孔菌科真菌灰树花(贝页多孔菌)[*Griiflola frondosa* (Dicks.) S. F. Gray (*Polyporus fondosus* (Dicks.) Fr)]的干燥子实体,购自浙江庆元县。

1.2 方法

1.2.1 灰树花多糖的提取 (1)标准液的制备 精密称取105℃下干燥至恒重的无水葡萄糖0.0214 g,置于100 mL容量瓶中,蒸馏水溶解并定容至刻度,即得浓度为 $0.214\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准液。

(2)供试液的制备 将灰树花粉碎,精密称取细粉9份,每份4 g,分别加入50 mL乙醚回流2次,每次1 h,弃醚液;再分别用90%乙醇50 mL回流2次,每次1 h,弃醇液;挥净乙醇,再加入蒸馏水回流,加水量、煎煮时间、煎煮次数按正交设计进行提取。提取液 $2500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,取上清液,水浴加热浓缩到4 mL,加入适量乙醇,使其含醇量为80%,放置过夜,离心,取沉淀,用蒸馏水溶解沉淀,定容到100 mL容量瓶中。

为快速并有效地提取灰树花中的多糖,采用正交试验确定提取的最佳条件,选择溶剂用量、提取时间以及提取次数3个水平进行试验(见表1)。

1.2.2 提取方法 (1)线性关系。精密称取标准液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL,分别置于10 mL具塞试管中,并编号,各用蒸馏水稀释至1.0 mL,放入冰水浴中,再分别加入4 mL浓硫酸,摇匀,5 min后加入1 mL 0.2%蒽酮-乙酸乙酯显色剂,100℃水浴10 min,取出放至室温。空

收稿日期:2013-12-18

基金项目:国家食用菌产业技术体系资助项目(CARS-24)

第一作者简介:刘炳福(1964-),男,山东省青岛市人,农艺师,从事农业技术与推广研究。E-mail: qbswjs2008@sina.com。

通讯作者:张华(1967-),女,山东省青岛市人,副教授,硕士生导师,从事中药新药研究。E-mail: zhongyiyao77@126.com。

白对照于 618 nm 测吸收度,以吸收度为纵坐标,制作线性关系曲线^[2-4]。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors		
	溶剂用量 A/倍	提取时间 B/h	提取次数 C/次
	Amount	Extraction time	Times
1	24	2	2
2	28	3	3
3	32	4	4

(2)精密度。精密吸取葡萄糖标准液 0.3 mL,按线性关系中提取方法进行测定,计算吸收度的相对标准偏差(RSD)。

(3)稳定性。取 2 号供试液,在制备后 0、2、4、6、8 h 分别进行测定吸收度并计算吸收度的 RSD。

(4)重现性。另取灰树花样品 6 份,对 2 号工艺进行提取并进行含量测定。

(5)回收率。精密吸取 2 号供试液(多糖含量为 8.436 2 mg·mL⁻¹)0.3 mL,9 份,分别加入葡萄糖标准液 5、10、15 mL,在 100 mL 容量瓶中,

混匀并稀释至刻度。精密吸取 1 mL,按照含量测定方法进行测定。

1.2.3 多糖含量测定 精密吸取供试液 0.8 mL,置入 100 mL 容量瓶并加蒸馏水稀释至刻度,从中吸取 1 mL。放入 10 mL 具塞试管中,按照线性关系提取方法项中自“放入冰水浴中”始,进行测定,计算多糖得率。

1.2.4 验证试验 按照 A2B2C3 和 A2B2C1 两种工艺,分别提取 3 份样品,并进行多糖的提取及含量测定。

2 结果与分析

2.1 灰树花多糖提取方法

由线性关系、稳定性、重现性以及回收率的试验表明,以无水葡萄糖浓度为横坐标作图得线性方程为: $Y=0.125\ 8X+0.105\ 5(R^2=0.999\ 2)$,葡萄糖的浓度在 0.021 4~0.128 4 mg·mL⁻¹ 时与吸收度呈良好的线性关系;吸收度的 RSD 为 1.9%,表明仪器的精密度良好;吸收度的 RSD 为 2.1%,表明样品液在 8 h 内稳定;葡萄糖得率的 RSD 为 1.6%,表明方法的重现性良好;回收率考查结果(见表 2)表明,平均回收率为 99.4%,其 RSD 为 1.1%,表明回收效率良好。

表 2 灰树花多糖回收率分析

Table 2 Recovery rate of polysaccharide of *Grifolola frondosa*

编号 No.	取样量/mg Sample volume	加入量/mg Addition	测定值/mg Estimated value	回收率/% Recovery rate	平均回收率/% Average recovery rate	RSD/%
1	2.5308	1.07	3.5812	98.2	99.4	1.1
2	2.5308	1.07	3.5724	97.3		
3	2.5308	1.07	3.5905	99.0		
4	2.5308	2.14	4.6476	98.9		
5	2.5308	2.14	4.6797	100.4		
6	2.5308	2.14	4.6615	99.6		
7	2.5308	3.21	5.7632	100.7		
8	2.5308	3.21	5.7463	100.2		
9	2.5308	3.21	5.7399	100.0		

2.2 各因素对灰树花多糖提取率的影响

对正交试验结果(见表 3)分析可知,3 因素的影响大小为 B>A>C;方差分析结果表明,该影

响无显著性差异。根据生产实际,拟定工艺为 A2B2C1,该工艺与直观分析所得工艺 A2B2C3 的差异,需进一步验证。

表 3 正交设计测得灰树花多糖得率

Table 3 Obtained rate of polysaccharide by orthogonal test

编号 No.	溶剂用量 A/倍 Amount	提取时间 B/h Extraction time	提取次数 C/次 Times	多糖得率/% Obtained rate
1	1	1	1	18.32
2	1	2	2	20.45
3	1	3	3	18.89
4	2	1	2	19.16
5	2	2	3	22.37
6	2	3	1	21.18
7	3	1	3	19.80
8	3	2	1	20.71
9	3	3	2	19.26
R1	57.66	57.28	60.21	A2B2C3
R2	62.71	63.53	58.87	
R3	59.77	59.33	61.06	
R	1.68	2.08	0.73	

由表 4 可知,验证试验结果表明,两种工艺差别不明显,考虑到生产的成本等因素,最终确定灰树花多糖的提取工艺为 A2B2C1。

表 4 验证试验结果分析

Table 4 Verification testing results

序号 No.	多糖提取率/% Extraction rate of polysaccharide	平均提取率/% Average extraction rate	RSD/%
A2B2C1	21.54 22.13 20.92	21.53	2.5
A2B2C3	22.36 21.24 21.85	21.82	

3 结论

该研究采用正交试验设计,最终确定灰树花多糖的最佳提取工艺是蒸馏水煎煮 2 次,提取时

间 3 h(第 1 次提取 2 h,第 2 次提取 1 h),加水量 28 倍(第 1 次提取 16 倍,第 2 次提取 12 部)。通过水提醇沉法精制,除去了醇溶性的单糖、双糖及其它低聚糖成分,剩下水溶性多糖成分,精制效果良好,可溶性多糖含量可达到 50% 以上。该试验结果为灰树花多糖的提取和精制提供快速、可靠、高效的提取分离方法,也为进一步研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 杨海,耿传信,周学锋.灰树花多糖药理研究综述[J].中国执业药师,2012,9(3):30-33.
- [2] 冯怡,韩宁,徐德生.麦冬多糖含量测定方法的研究[J].中成药,2006,28(5):705-707.
- [3] 马昌豪,刘红艳,彭慧敏,等.不同品种玫瑰花多糖含量测定[J].食品与药品,2011,13(11):432-433.
- [4] 朱伟.蒽酮-硫酸比色法测定香菇多糖含量[J].北方药学,2011,8(8):8-10.

Study on Extract Technique of Polysaccharide in *Griflola frondosa*

LIU Bing-fu¹, GONG Zhi-yuan², ZHANG Hua³, YAO Qiang²

(1. Institute of Scientific Information, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100; 2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100; 3. Shandong University of Traditional Chinese medicine, Jinan, Shandong 250352)

Abstract: In order to optimize the best extract technique for Polysaccharide of *Griflola frondosa*, the effect of dosage of solvent, extraction time and times on extracting of *Griflola frondosa* were studied. The results showed that through the determine of extraction method of polysaccharide, the amylose sorption degree linearity relation was $Y = 0.1258X + 0.1055$ ($R^2 = 0.9992$), the range of concentration was in $0.0214 \sim 0.1284 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and had good linearity relation with absorbance. Orthogonal experiment was adopt, the absorbance was measured by anthrone-sulfuric acid at 618 nm. The best technique for *Griflola frondosa* polysaccharide was boiling 2 times, decoction time was 2.0 h first and then 1.0 h, amount of added water were 28 times. The simple method which was good for extracting of polysaccharide had good reproducibility and high extraction efficiency.

Key words: *Griflola frondosa*; polysaccharide; extract technique; anthrone-sulfuric acid