

牛蒡低聚果糖的提取条件及其稳定性研究

袁平川^{1 2} 陈靠山^{1 2 3} 柳春燕^{1 2 3} 房芳^{1 2} 王颜天池^{1 2}

(皖南医学院 1.药学院; 2.安徽省多糖药物工程技术研究中心; 3.活性生物大分子研究安徽省重点实验室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究牛蒡低聚果糖的最佳提取条件及其稳定性。方法: 通过单因素实验及正交实验对牛蒡低聚果糖的提取条件进行优化, 采用蒽酮法测定其在不同条件下的稳定性。结果: 牛蒡低聚果糖最佳提取条件为固液比 1:25、提取温度 80℃、提取时间 90 min, 在此条件下, 牛蒡低聚果糖得率为 67.54%。牛蒡低聚果糖热稳定性及光照条件下稳定性较好, 易被氧化, 在 pH>8 或 pH<4 及含有 Cu²⁺、Fe³⁺ 溶液中的稳定性较差。结论: 牛蒡低聚果糖在存储过程中应避免与空气及铁铜制品直接接触, 提取时温度应低于 90℃, 且溶液无强酸碱性。

【关键词】牛蒡低聚果糖; 提取; 稳定性

【中图分类号】R 285.5 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2017.05.005

On the extraction process and stability of burdock oligosaccharide

YUAN Pingchuan, CHEN Kaoshan, LIU Chunyan, FANG Fang, WANGYan Tianchi

Department of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the optimal conditions for extracting the oligosaccharide from burdock and stability of the extracts. **Methods:** Single-factor experiment and orthogonal test were used to optimize the extraction conditions for burdock oligosaccharide, and the stability of the extracts was determined under diverse conditions using anthrone method. **Results:** The optimal conditions for extracting the oligosaccharide from burdock were: solid/liquid ratio 1:25, temperature at 80℃, extraction time for 90 min. This condition yielded burdock oligosaccharide by 67.54%. The stability for burdock oligosaccharide was better when heated or lighted, yet the extract was susceptible to oxidation, and the stability appeared poorer when stored in solution with pH> 8 or pH<4 or containing Cu²⁺ or Fe³⁺. **Conclusion:** Burdock oligosaccharide should be stored at room temperature and isolated from oxygen without antioxidant supplement, and be free of direct contact with iron or copper during the extraction process. The extraction process must be under 90℃, and kept from solution with strong acidity and alkaline.

【Key words】 burdock oligosaccharide; extracting; stability

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1408085MH197); 安徽高校自然科学研究项目(KJ2015A199); 芜湖市科技计划项目(2012jc14)

收稿日期: 2017-04-05

作者简介: 袁平川(1992-), 男, 2015 级硕士研究生, (电话) 18355336398, (电子信箱) 2455474850@qq.com;

陈靠山(1962-), 男, 教授, 博士生导师, (电子信箱) ksc313@126.com, 通信作者。

[5] DENICOLA GM, CHEN PH, MULLARKY E, *et al.* NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer [J]. *Nature Genetics* 2015, 47(12): 1475-1481.

[6] KÖHLER UA, KURINNA S, SCHWITTER D, *et al.* Activated Nrf2 impairs liver regeneration in mice by activation of genes involved in cell-cycle control and apoptosis [J]. *Hepatology* 2014, 60(2): 670-678.

[7] LEIPNITZ G, VARGAS GR, WAJNER M. Disturbance of redox homeostasis as a contributing underlying pathomechanism of brain and liver alterations in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency [J]. *Journal of inherited metabolic disease* 2015, 38(6): 1021-1028.

[8] ZHONG Y, ZHANG F, SUN Z, *et al.* Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF-7 /DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response [J]. *Mol Carcinog* 2013, 52(10): 824-834.

[9] CHIAN S, LI YY, WANG XJ, *et al.* Luteolin sensitizes two oxaliplatin-resistant colorectal cancer cell lines to chemotherapeutic drugs via inhibition of the Nrf2 pathway [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014, 15(6): 2911-2916.

牛蒡(*Arctium lappa* L.) 又名“大力子”、“白肌人参”、“东洋人参”等, 菊科牛蒡属直根系二年生大型草本植物, 其根鲜嫩多汁、营养丰富, 食之有香甜味, 具有较高的药用价值^[1-2]。牛蒡低聚果糖是从牛蒡根中提取的一种水溶性菊糖型低聚果糖, 分子质量为 2134 u, 是由 12 个呋喃果糖以 $\beta(2 \rightarrow 1)$ 糖苷键依次相连, 末端 1 个吡喃葡萄糖以 $\alpha(2 \rightarrow 1)$ 糖苷键连接在果糖上的线性直链结构^[3-4]。我国牛蒡资源丰富, 牛蒡根中菊糖含量较高, 从中提取的牛蒡低聚果糖具有增强免疫、抗癌、抗衰老、降低血糖血脂等多种生物活性^[5-11], 有着广阔的开发及应用前景。目前对于牛蒡低聚果糖的提取工艺众说纷纭, 对其稳定性的研究也未见报道, 因此, 本实验将优化牛蒡低聚果糖的提取工艺, 并对其稳定性进行初步的研究, 为牛蒡低聚果糖在食品、药品等领域的应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 新鲜牛蒡根购自于江苏徐州益顺康公司并保存于皖南医学院逸夫科技楼实验室。

1.2 仪器与试剂 小型高速粉碎机 WK-2000A(青州市精诚医药医药装备制造有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9070 型(金坛市荣华仪器制造有限公司); 离心机 SIGMA 4K15; SHB-III S 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); 电子天平 FA2004N (上海民桥精密科学仪器有限公司); 艾科浦超纯水系统 AFZ-1001-U (颐洋企业发展有限公司); 数显控温水浴锅 GKC4 (上海波洛实验设备有限公司)。所用试剂均为分析纯, 水为去离子水; 蒽酮、3, 5 二硝基水杨酸、标准果糖、NaCl、KCl、AlCl₃、FeCl₃、CaCl₂、CuSO₄、MgSO₄、ZnSO₄、浓 H₂SO₄、H₂O₂、Na₂SO₃。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理 原料(新鲜牛蒡根) →洗净、晾干→100℃水热烫 5 min→去皮→切薄片→60℃烘干→粉碎、过 40 目筛→牛蒡干粉(常温下保存)

1.3.2 牛蒡低聚果糖的提取 牛蒡低聚果糖为本实验室提取得到^[3-4]。

1.3.3 牛蒡低聚果糖提取条件的优化 以同批处理的牛蒡干粉为材料, 以水为提取溶剂, 考察不同固液比、提取温度、提取时间和提取次数对牛蒡低聚果糖得率的影响。在单因素试验的结果上进行正交设计法优化提取工艺, 研究影响因素, 确定最佳提取

条件。

1.4 牛蒡低聚果糖稳定性实验 精确称取牛蒡低聚果糖干燥成品 20 mg, 超纯水溶解并定容至 100 mL, 具体实验时进行适当稀释。蒽酮硫酸法测定牛蒡低聚果糖在不同温度、光照条件、pH 值、氧化剂、还原剂和金属离子条件下的稳定性, 所有试验均重复 3 次。

1.5 分析方法

1.5.1 总糖含量测定 采用改良蒽酮硫酸法^[12], 以果糖为标准品, 糖浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程: $y = 4.5257x + 0.0101$ $R^2 = 0.9993$ 。

1.5.2 还原糖含量测定 采用 3, 5 二硝基水杨酸法, 以果糖为标准品, 糖浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程: $y = 1.1334x - 0.0217$ $R^2 = 0.9988$ 。

1.5.3 总糖得率及低聚果糖含量的计算 总糖得率(%) = 样品中总糖含量/原料质量×100%; 低聚果糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件, 以 *F* 检验分析组间显著性差异, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 牛蒡低聚果糖提取条件的优化 通过单因素实验探讨了牛蒡低聚果糖提取条件的最佳范围, 选择固液比、提取温度及提取时间为考察因素, 设计三因素三水平正交实验, 见表 1、2。由表 3 可知, 因素 A 具有极显著性差异($P < 0.01$), 因素 B 和 C 都具有显著性差异($P < 0.05$)。因此, 影响牛蒡低聚果糖提取率的因素依次是: 固液比 > 提取温度 > 提取时间, 由表 1、2 可知最佳提取条件为 A₃B₃C₂, 即在固液比为 1:25 (g/mL)、提取温度为 80℃、提取时间为 90 min 条件下, 牛蒡低聚果糖提取率为 67.54%。

表 1 因素与水平设计表

水平	因素		
	固液比(m:V)	提取温度/℃	提取时间/min
	A	B	C
1	1:15	60	60
2	1:20	70	90
3	1:25	80	120

表 2 L₉(3³) 正交实验结果

序号	因素水平			总糖提取率/%
	A 固液比/ m :V(g :mL)	B 提取 温度/°C	C 提取 时间/min	
1	1(1 :15)	1(60)	1(60)	55.06
2	1(1 :15)	2(70)	2(90)	62.56
3	1(1 :15)	3(80)	3(120)	59.56
4	2(1 :20)	1(60)	2(90)	63.25
5	2(1 :20)	2(70)	3(120)	66.19
6	2(1 :20)	3(80)	1(60)	64.95
7	3(1 :25)	1(60)	3(120)	59.50
8	3(1 :25)	2(70)	1(60)	65.45
9	3(1 :25)	3(80)	2(90)	67.54
K ₁	177.18	177.81	185.46	
K ₂	194.39	194.20	193.35	
K ₃	192.49	192.05	185.25	
k ₁	59.06	59.27	61.82	
k ₂	64.80	64.73	64.45	
k ₃	64.16	64.02	61.75	
R	5.74	5.46	2.70	

表 3 正交实验结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	均方	F	P
A	59.354	2	29.667	106.586	0.009
B	52.892	2	26.446	94.982	0.010
C	14.212	2	7.106	25.521	0.038

2.2 稳定性试验

2.2.1 温度条件 取 2 mL 牛蒡低聚果糖溶液 8 份于试管中, 封口避光条件下于 20、30、40、50、60、70、80、90℃ 下恒温水浴 1 h 后, 分别测定溶液吸光度。由图 1 可知, 牛蒡低聚果糖在温度 20~80℃ 范围内吸光值变化较小, 80℃ 后吸光度值明显增大, 可能是由于低聚果糖在高温条件下结构发生改变。由此可知牛蒡低聚果糖在 20~80℃ 范围内热稳定性较好。

2.2.2 光照条件 取 5 mL 牛蒡低聚果糖溶液 14 份于离心管中, 封口并于室温条件下分别光照 0、12、24、36、48、60、72 h, 对照组避光放置, 分别测定溶液吸光度。实验发现光照对牛蒡低聚果糖稳定性基本无影响, 由此可知牛蒡低聚果糖在光照条件下能保持较好的稳定性。

2.2.3 pH 条件 取 5 mL 牛蒡低聚果糖溶液 6 份于

试管中, 室温下用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 分别调节 pH 至 2、4、6、8、10、12, 摇匀避光静置 3 h 后, 分别测定溶液吸光度。由图 2 可知, 牛蒡低聚果糖在 pH 4~8 之间, 吸光度值变化较小, 糖溶液稳定性较好, 而在 pH>8 或 pH<4 的溶液体系中吸光度值明显增大, 糖液稳定性较差, 可能在强酸碱性条件下, 糖结构受到破坏, 导致吸光度值升高。

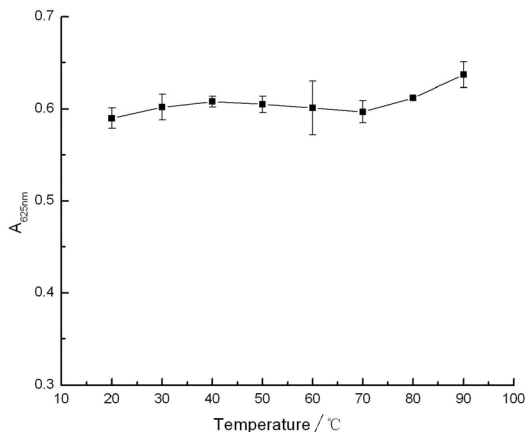


图 1 温度对牛蒡低聚果糖稳定性的影响

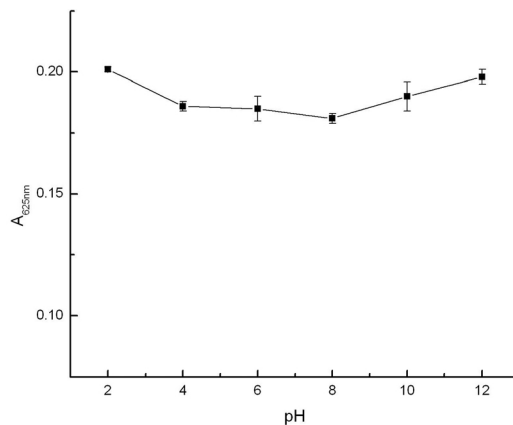


图 2 pH 对牛蒡低聚果糖稳定性的影响

2.2.4 氧化剂、还原剂条件 取 1 mL 牛蒡低聚果糖溶液 12 份, 分别加入浓度为 0.00、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mol/L 的 H₂O₂ 和浓度为 0.00、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mol/L 的 Na₂SO₃ 溶液各 4 mL, 摇匀避光静置 3 h 后, 分别测定溶液吸光度。由图 3 可知, 牛蒡低聚果糖水溶液的吸光度随 Na₂SO₃ 浓度增大未产生明显改变, 而随 H₂O₂ 浓度增大而增大。或由于在氧化剂的作用下, 低聚果糖产生较多醛类物质, 在结合蒽酮后颜色加深。

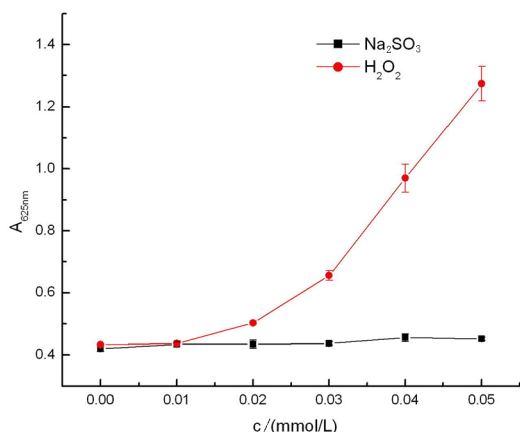


图3 氧化还原剂对牛蒡低聚果糖稳定的影响

2.2.5 金属离子条件 取 1 mL 牛蒡低聚果糖溶液 8 份 ,分别加入离子浓度为 0.05 mol/L 的 NaCl、KCl、AlCl₃、FeCl₃、CaCl₂、CuSO₄、MgSO₄、ZnSO₄ 溶液各 4 mL 摇匀避光静置 3 h ,分别于 0、1、2、3 h 测定溶液吸光度。由图 4 可知 ,牛蒡低聚果糖在多数金属离子溶液体系中稳定性较好 ,但在 Cu²⁺、Fe³⁺ 溶液中稳定性较差。或由于 Cu²⁺、Fe³⁺ 与低聚果糖发生某些化学反应 ,如氧化、络合等 ,导致多糖结构改变。

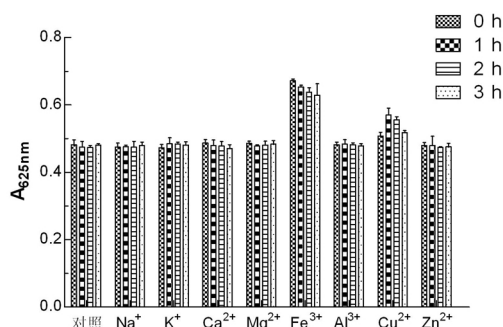


图4 金属离子对牛蒡低聚果糖稳定性的影响

3 结论

通过单因素实验分析后 ,选取固液比、提取温度、提取时间为考察因素 ,进行 L₉(3³) 正交实验设计 ,结合方差分析得到影响因素为: 固液比>提取温度>提取时间 ,最佳提取条件为 ,固液比 1:25、提取

温度 80℃、提取时间 90 min ,此条件下牛蒡低聚果糖提取率为 67.54%。

稳定性试验结果表明: 牛蒡低聚果糖在 20 ~ 80℃ 条件下热稳定性较好 ,不受光照影响 ,易被氧化 ,不易被还原 ,在 pH 4 ~ 8、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Zn²⁺ 溶液中稳定性较好 ,在 pH>8 或 pH<4 及体系含有 Cu²⁺、Fe³⁺ 情况下稳定性较差。因此牛蒡低聚果糖常温存储过程中需隔绝氧气或加入抗氧化剂 ,避免与铁、铜制品直接接触 ,在提取过程中应于 90℃ 以下提取 ,避免在强酸碱性的溶液中提取。

【参考文献】

- [1] 曹旭 ,曹剑锋 ,陈靠山. 牛蒡的药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学 ,2012 ,29(11) : 975-979.
- [2] 陈世雄 ,陈靠山. 牛蒡根化学成分及活性研究进展 [J]. 食品与药品 ,2010 ,12(7) : 281-285.
- [3] 郝林华 ,陈磊 ,仲娜 ,等. 牛蒡寡糖的分离纯化及结构研究 [J]. 高等学校化学学报 ,2005 ,26(7) : 1242-1247.
- [4] 郝林华 ,陈靠山 ,李光友. 牛蒡菊糖及其制备方法的研究 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版) ,2004 ,34(3) : 423-428.
- [5] CHAN YS ,CHENG LN ,WU JH *et al.* A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock) [J]. *Inflammopharmacology* ,2011 ,19(5) : 245-254.
- [6] ZHAO F ,WANG L ,LIU K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin a lignan from *Arctium lappa* L. ,through inhibition on iNOS pathway [J]. *Journal of ethnopharmacology* ,2009 ,122(3) : 457-462.
- [7] 王佳佳 ,刘玮 ,朱静 ,等. 牛蒡多糖的降血糖活性 [J]. 中国药科大学学报 ,2013 ,44(5) : 455-459.
- [8] 栾畅 ,王宏伟 ,何忠梅 ,等. 植物乳杆菌 Sc52 联合牛蒡低聚果糖对 2 型糖尿病模型小鼠的治疗作用 [J]. 食品科学 ,2015 ,36(21) : 214-220.
- [9] 宋子敬 ,张春风. 牛蒡多糖对免疫低下小鼠增强免疫及抗氧化作用研究 [J]. 海峡药学 ,2016 ,28(5) : 25-27.
- [10] 唐仕荣 ,宋慧 ,刘全德 ,等. 牛蒡多糖的分离纯化及其抗氧化活性研究 [J]. 徐州工程学院学报(自然科学版) ,2014 ,29(2) : 30-35.
- [11] 孟宇 ,吕俊 ,齐世美. 牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制及其机制的探讨 [J]. 右江民族医学院学报 ,2014 ,36(1) : 10-11.
- [12] 张杰 ,李春艳 ,李劲平 ,等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定竹节参多糖含量的比较研究 [J]. 中南药学 ,2012 ,10(6) : 421-424.