

几种石斛多糖的提取分离及其抗氧化性能研究^{*}

★ 熊丽萍 (华东交通大学基础科学学院 南昌 330013)

★ 万屏南 袁友泉 (江西中医学院 南昌 330006)

摘要:运用正交实验设计对水煎提取石斛中的石斛多糖工艺进行优选,得出了最佳的工艺条件,并且利用化学发光法对其进行抗氧化性能研究。结果显示在不同的自由基体系下铁皮石斛多糖的作用不同,有清除作用,也有促进氧化作用。

关键词:石斛多糖;正交实验;抗氧化;化学发光法

中图分类号:TQ 460.6 **文献标识码:**A

石斛为兰科石斛属多种药用植物的总称,是一种常用珍贵中药,《神农本草经》将其列为上品,它味甘,微寒,无毒,入胃、肾经,具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳的功效。临床一般将其用于阴伤津亏,口干烦渴,食少干呕,病后虚热,目暗不明等^[1],特殊用于慢性萎缩性胃炎及降血糖、抗肿瘤、抗衰老等。现代药理研究表明,其主要成分是多糖,能显著提高 SOD(超氧化物歧化酶)水平,从而降低 LPO(过氧化脂质)的作用^[2],达到清除体内自由基的作用。近年来,石斛多糖的研究逐渐引起人们的重视,石斛生理活性的强弱与其多糖的含量有一定关系,常以其高低来判断某一石斛类药材质量的好坏^[3]。

本文通过正交试验方法对石斛多糖提取工艺进行条件优选,以提高石斛多糖的提取效率;考察预处理过程对提取产物物理性质的影响;并对提取出的石斛多糖的抗氧化性进行研究,探索其在不同自由基体系下表现出的抗氧化性能,以及石斛多糖含量与抗氧化性能的关系。

1 材料与方法

1.1 植物原料、试剂与仪器

将金钗石斛、细茎石斛、紫皮石斛、软脚铁皮、水兰石斛、黄花石斛、紫皮兰等七种石斛晒干,磨成粉。使用的化学试剂均为分析纯;邻苯三酚和鲁米诺均由上海试剂厂提供的分析纯试剂;722 型分光光度计,SHG-D 型生物化学发光测量仪。

1.2 实验方法

1.2.1 预处理与纯化过程 在提取与分离过程中,预处理和纯化过程包括:石油醚除脂、80%乙醇除醇溶性糖和 Sevage 法除蛋白、活性炭脱色。为了尽可能除尽非多糖分子,提尽多糖,并且兼顾提取过程的效率性,以部分正交的方法挑选优选工艺过程,包括:(1)实验测定铁皮石斛中的脂类含量,在最短的时间内除去尽量多的脂类;(2)实验测定糖类成分中醇溶性糖的含量;(3)考察不同次数 Sevage 法脱蛋白对最终多糖含量的影响,以期提高整个提取过程的效率。同时检验各个预处理步骤对多糖含量的综合影响,即分别略去除脂、除醇溶性糖、除蛋白的步骤,然后再分别测定多糖含量,以检测不同预处理步骤对多糖含量最终测量结果的影

响。

1.2.2 多糖提取的正交实验 各取 5.0 g 石斛粉末,按 L₉(3⁴)正交设计方案,各自加入不同量的去离子水,分别在特定的温度下提取一定时间和次数,每次提取完后过滤;然后合并滤液,稀释定容后用硫酸-苯酚法测定提取的多糖含量,每一实验平行 2 次,取平均值进行正交实验结果分析,找出最佳提取条件。实验因素水平安排见表 1。

表 1 因素水平表

| 水平 | A. 温度 /℃ | B. 溶剂用量 /倍 | C. 时间 /h | D. 次数 /次 |
|----|----------|------------|----------|----------|
| 1 | 50 | 10 | 1 | 1 |
| 2 | 70 | 20 | 2 | 2 |
| 3 | 90 | 30 | 3 | 3 |

1.2.3 石斛多糖的含量测定 采用硫酸-苯酚比色法^[4]测定含量。

1.2.4 铁皮石斛多糖的抗氧化性研究 运用化学发光法^[5~6]在超氧体系(O₂⁻·)(邻苯三酚 + 发光剂鲁米诺)和过氧化氢体系(H₂O₂)(2% 的 H₂O₂ 溶液 + 发光剂鲁米诺)两个自由基体系中测定铁皮石斛多糖的抗氧化性能,比较不同种的铁皮石斛在不同自由基体系中的抗氧化性能以及在同一自由基体系中考察不同多糖浓度对抗氧化性能的影响。

2 结果

2.1 预处理与纯化过程

(1)100 mL 石油醚脱脂 1 小时,水浴回流至沸腾,抽真空过滤;(2)100 mL 80% 乙醇脱醇溶性糖 1 小时,水浴回流至沸腾,抽真空过滤;(3)100 mL 蒸馏水,在 50 ℃ 加热提取 3 次,每次 1 小时,超速离心过滤,合并滤液,减压浓缩至 50 mL;(4)以 50 mL 多糖溶液 - 15 mL 氯仿 + 5 mL 正丁醇为标准用 Sevage 法脱蛋白,分液;(5)加适量活性炭,煮沸 20 分钟,抽真空过滤;(6)以 1:5 的比例加入 95% 乙醇醇析多糖,静置 24 小时;(7)抽真空过滤,沉淀依次以无水乙醇、丙酮洗涤;(8)取过滤所得的多糖,60 ℃ 低温烘干,研磨,再烘干,称重。

2.2 多糖提取的正交实验

在预处理实验的基础上,对影响石斛多糖提取效果的因素,即提取温度(A)、溶剂用量(B)、提取时间(C)、提取次数

* 江西省卫生厅科技计划项目(No.20052025)和华东交通大学校立基金资助

(D)进行了 $L_9(3^4)$ 正交实验,见表2。

表2 正交实验结果分析

| 编号 | 因 素 | | | 多糖含量(%) |
|----|------|------|------|---------|
| | A/℃ | B/倍 | C/h | |
| 1 | 50 | 10 | 1 | 3.7 |
| 2 | 50 | 20 | 2 | 12.1 |
| 3 | 50 | 30 | 3 | 15.8 |
| 4 | 70 | 10 | 2 | 6.5 |
| 5 | 70 | 20 | 3 | 7.4 |
| 6 | 70 | 30 | 1 | 11.3 |
| 7 | 90 | 10 | 3 | 7.9 |
| 8 | 90 | 20 | 1 | 13.4 |
| 9 | 90 | 30 | 2 | 8.7 |
| K1 | 10.5 | 6.0 | 9.5 | 6.6 |
| K2 | 8.4 | 11.0 | 9.1 | 10.4 |
| K3 | 10.0 | 11.9 | 10.4 | 11.9 |
| R | 2.1 | 5.9 | 1.3 | 5.3 |

结果表明,B因素对应的极差R最大,其次是D因素,两者为影响石斛多糖提取的主要因素;A因素影响较小,C因素影响最不明显,故各因子对提取效果的影响大小顺序是:溶剂用量>提取次数>提取温度>提取时间;溶剂用量的影响在10~20倍水平之间差异显著,而20~30倍之间差别较小,为了减轻后续浓缩处理工作,以20倍溶剂用量提取比较合适;不同水平的提取时间和提取温度对多糖的提取效果影响不大,从时间成本上考虑,两者均可采用第一水平,故确定石斛多糖的较佳提取工艺条件为:用20倍重量的水,在50℃水浴中加热提取3次,每次1小时。

2.3 多糖含量测定

见表3。

表3 几种不同石斛的多糖含量

| 编号 | 名称 | 多糖含量(%) |
|----|------|---------|
| 1 | 金钗石斛 | 5.41 |
| 2 | 细茎石斛 | 13.87 |
| 3 | 紫皮石斛 | 14.27 |
| 4 | 水兰石斛 | 14.07 |
| 5 | 黄花石斛 | 20.32 |
| 6 | 软脚铁皮 | 12.09 |
| 7 | 紫皮兰 | 10.12 |

由表3可以看出,黄花石斛的含量最高,金钗石斛的含量最低。

2.4 两种铁皮石斛抗氧化性能的研究^[7]

依据实验方法提取软脚铁皮、紫皮石斛的多糖成分在羟基自由基体系和过氧化氢体系中考查了它们的抗氧化性能。见图1和图2。

可见,软脚铁皮和紫皮石斛促氧化,普遍为浓度低的促氧化作用较明显。与空白数据项比较,软脚铁皮和紫皮石斛对超氧阴离子为抗氧化作用,软脚铁皮随着浓度的升高抗氧化作用减弱,紫皮石斛随着浓度的升高抗氧化作用得到增强,到一定的浓度表现出极值。

过氧化氢体系总体上规律性不强,软脚铁皮表现出滞后效应,高浓度时促进氧化,低浓度时抗氧化,并且发光值与浓度有梯度关系;紫皮石斛表现出发光值与浓度成梯度关系,

低浓度时促氧化,高浓度时抗氧化。

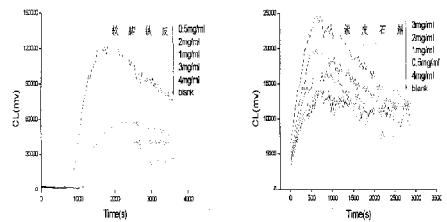


图1 在超氧阴离子体系($O_2\cdot^-$)中发光时间与发光值的关系

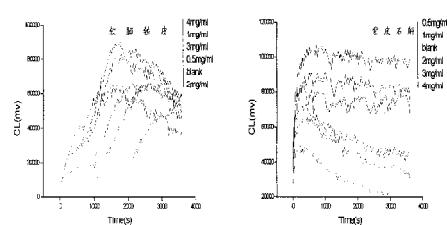


图2 在过氧化氢体系中发光时间与发光值的关系

4 结论

经过对预处理部分和水提取进行正交实验,综合考虑预处理对多糖含量的影响,得出最佳提取、分离的步骤。

经过对预处理进行部分正交实验,并分别测定多糖含量,证实预处理对多糖含量提取有很大影响,未脱脂和醇溶性糖使多糖提取含量偏小,未脱蛋白使多糖提取含量偏大,这表明石斛成分中非糖分子的存在对多糖提取含量有很大影响。而这些非糖分子中,特别是蛋白质,很可能与多糖分子以结合的状态共存,如糖蛋白。

几种石斛的多糖含量大小顺序为:黄花石斛>紫皮石斛>水兰石斛>细茎石斛>软脚铁皮>紫皮兰>金钗石斛。

对软脚石斛和紫皮石斛进行多糖含量以及抗氧化性能的研究发现,两种铁皮石斛在超氧阴离子体系下为促进氧化的作用,在过氧化氢体系下的作用规律性不明显。整体来看,铁皮石斛多糖的浓度与其抗氧化的性能呈梯度关系。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2000.75.
- [2] 夏春东,廖学才,李守良. 石斛药用概述[J]. 实用中医药杂志,1998,14(4):45.
- [3] 李满飞,徐国钧. 中药石斛类多糖的含量测定[J]. 中草药,1990,10(21):10~12.
- [4] 曹晖,刘玉萍. 分子标记技术在中药品种鉴别中的应用[J]. 中国药学杂志,1998,33(5):25.
- [5] 胡天喜. 测量活性氧、自由基及脂质过氧化物的化学发光技术[J]. 自由基生命科学进展,1997,5.
- [6] 张仲伦. 微弱发光分析技术原理及应用实例[J]. 生物化学与生物物理进展,1999,26(4):28.
- [7] 彭昕,聂理,徐朗莱. 中药对自由基清除作用的研究进展[J]. 基层中药杂志,2002,16(1):23.

(收稿日期:2006-02-27)