

文章编号:1673-1689(2006)03-0079-05

山药粗多糖的提取工艺

孙 锋, 谷文英, 丁霄霖

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 对鲜山药中水溶性粗多糖的提取工艺进行了研究, 通过单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验, 研究了料液比、提取温度、时间和乙醇体积分数对粗多糖得率的影响, 极差分析及方差分析结果表明提取温度和料液比是影响山药粗多糖提取的主要因素, 较优的工艺为料液比 1 g : 9 mL, 温度 50 °C, 时间 2.5 h, 乙醇体积分数 75%, 在此工艺条件下, 鲜山药粗多糖得率为 0.2449% (以鲜山药质量计)。

关键词: 山药; 水溶性粗多糖; 提取工艺

中图分类号: S 632.1

文献标识码: A

Study on the Extraction Technology of Polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb

SUN Feng, GU Wen-ying, DING Xiao-lin

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The paper studied the extraction of polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb. Single factor test and orthogonal experiment design methods $L_9(3^4)$ were applied to analyze the influence of those factors such as solid-liquid ratio, temperature, time and ethanol concentration on the extraction of the polysaccharides. Experimental results indicated that temperature and solid-liquid ratio would significantly affect the polysaccharides extraction. The optimal solid-liquid ratio was 1 : 9, temperature was 50 °C, extraction time was 2.5h and ethanol concentration was 75%. Under this condition, the yield of water-soluble polysaccharides in *Dioscorea opposita* Thunb. was 0.2449% (by fresh yam).

Key words: *Dioscorea opposita* Thunb; water-soluble polysaccharide; extraction technology

山药(*Dioscorea opposita* Thunb)为薯蓣科多年生宿根蔓草植物薯蓣属的块茎,是我国传统的药食同源食物之一。山药主要分布于热带和亚热带地区,全世界有 600 种以上,而我国有 93 种^[1-2]。目前认为山药多糖是其主要活性成分之一,其主要生理功能有提高机体免疫^[3]、抗衰老^[4]、抗突变^[5]、抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]、降血糖^[8]等。

提取植物多糖主要根据其不同的溶解度来选择不同的溶剂进行提取。提取多糖最常用的溶剂有水、稀酸、稀碱以及二甲亚砜等^[9-10]。其中二甲亚砜虽然是一种提取多糖的良好溶剂,但价格昂贵,对人体有害,在使用上受到限制。用稀酸稀碱提取多糖时,虽然多糖总量比水提取的得率高,但得到的多糖含量低,而且酸碱提取会引起多糖降

收稿日期:2005-01-04; 修回日期:2005-03-08.

作者简介:孙 锋(1979-),男,江苏苏州人,食品科学与工程硕士研究生。

解,影响其生物活性。用水提取多糖,成本低,不破坏生物活性,方便实用且安全性高。因此,作者先用体积分数 80% 的乙醇处理原料以除去单糖、低聚糖、苷类、生物碱及蛋白等物质,再用传统的水提工艺浸提鲜山药中的多糖,通过单因素试验和正交试验确定较优的鲜山药多糖水提醇沉工艺条件,并对精制的山药多糖进行初步鉴定,又用改良的苯酚—硫酸法测定了多糖含量,以期为深入开发利用这一药食同源资源以及更好地研究其生物活性功能提供一定的参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

80-2 离心沉淀器:上海手术器械厂产品;MV 755B 分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品;LXJ-II 离心沉淀机:上海医用分析仪器厂产品;GC 14A 气相色谱仪:日本岛津公司产品。

1.2 试剂

乙醇,食用级;吡啶、盐酸羟胺、醋酸酐、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-鼠李糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、D-木糖、肌醇、硫酸、苯酚等试剂均为分析纯。

2 材料与方方法

2.1 材料

新鲜山药:产地上海,购于无锡天润发超市。

2.2 方法

2.2.1 山药多糖质量分数的测定

1) 山药多糖的提取与精制 称取浆料 200 g,经石油醚(沸程 60~90 °C)500 mL 回流脱脂 4 h,过滤,滤液回收石油醚。滤渣用体积分数 80% 乙醇溶液 500 mL 浸泡过夜,回流提取 2 次,每次 2 h。将滤渣加蒸馏水 1 000 mL,50 °C 热提 2 h,重复提取 3 次,滤液减压浓缩至 300 mL,Sevage 法脱蛋白,加料液质量 1% 的活性炭脱色,离心(3 000 r/min,30 min),滤液加体积分数 95% 乙醇,使乙醇体积分数达 80%,4 °C 静置过夜。离心(3 000 r/min,30 min),沉淀物用无水乙醇、丙酮、无水乙醚多次洗涤,真空干燥得精制山药多糖。

2) 精制多糖的初步鉴定 称取 20 mg 分离提取得到的精制多糖样品,加入 2 mL 2 mol/L H₂SO₄ 溶液后,抽真空封管。100 °C 水解 12 h。水解液用固体 BaCO₃ 中和,加少量蒸馏水,离心,真空干燥至无水。加入 10 mg 盐酸羟胺,0.5 mL 吡啶,然后放入 90 °C 水浴中反应 30 min,取出后冷却至室温,加入 1 mL 醋酸酐,在 90 °C 条件下继续反

应 30 min,进行乙酰化,反应物进行气相色谱分析。

气相色谱分析条件:色谱柱:弹性石英毛细管柱,30 m×0.32 mm;固定液:OV-1701;载气:N₂;体积流量:1.5 mL/min;检测器:FID;汽化室温度:280 °C;监测器温度:260 °C;程序升温:180 °C→250 °C(30 min);升温速度:3 °C/min;助燃空气体积流量:550 mL/min;进样量:1.0 μL。

3) 标准曲线的制备 吸取 100 μg/mL 葡萄糖标准液 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL 分置于具塞试管中,各加蒸馏水至 2.0 mL,再加质量分数 6% 苯酚液 1.0 mL,摇匀,迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,摇匀后放置 5 min,置沸水浴中加热 15 min,取出迅速冷却至室温。另以蒸馏水 2.0 mL,加苯酚和硫酸,同上操作做空白对照,在最大吸收波长(490 nm)处测定吸光度值。以葡萄糖质量浓度为横坐标(μg/mL),吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

4) 换算因子的确定

精确称取精制山药多糖 20 mg,置 100 mL 容量瓶中,蒸馏水定容至刻度,作为贮备液。准确吸取贮备液 0.2 mL,照标准曲线制备项下的方法测定吸光度,从标准曲线中求出供试液中葡萄糖的含量,按下式计算换算因子 F :

$$F = m / (\rho \times D)$$

式中: m 为多糖质量(μg), ρ 为多糖液中葡萄糖质量浓度(μg/mL), D 为多糖稀释因素。

5) 粗提物多糖质量分数的测定 精密称取粗提物适量,蒸馏水定容至 100 mL,精密吸取适量,测定吸光度值,查标准曲线得葡萄糖质量浓度,然后按下式计算多糖质量分数 YP:

$$YP(\%) = (\rho \times D \times F \times 100) / m$$

式中: ρ 为粗提物样液葡萄糖质量浓度(μg/mL), D 为样品液稀释因素, F 为换算因子, m 为样品质量(μg)。

2.2.2 原料预处理 新鲜山药→清洗→晾干→称重→去皮→称重→打浆→加酒精使乙醇体积分数达 80%→50 °C 水浴提取 2 h→离心→沉淀 A→相同体积分数乙醇再提一次→离心→沉淀 B(用于提取水溶性多糖)→冰箱储存

2.2.3 山药多糖提取方法

沉淀 B
 热水提取 2 h → 提取液 $\xrightarrow[60\text{ }^{\circ}\text{C}]{\text{减压浓缩}}$ 提取浓缩液
 离心(3 000 r/min,15 min)
 乙醇沉淀 → 沉淀物 $\xrightarrow[40\text{ }^{\circ}\text{C}]{\text{干燥}}$ 粗多糖

2.2.4 山药水溶性多糖提取工艺的确定 选取与多糖提取密切相关的 4 个因素:料液比、提取温度、时间和乙醇体积分数进行单因素试验,确定山药水

溶性多糖的提取工艺。

2.2.5 山药水溶性多糖提取工艺条件的优化 在单因素试验的基础上进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,优化提取工艺。 $L_9(3^4)$ 因素水平表如表 1。

表 1 因素水平表

Tab. 1 Level of factor

因素	因素			
	料液质量 体积比/(g : mL)	温度/ ℃	时间/ h	乙醇 体积分数/%
1	1 : 7	40	1.5	75
2	1 : 8	45	2.0	80
3	1 : 9	50	2.5	85

2.2.6 统计分析 采用 SAS 8.2 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异高度显著。

3 结果与讨论

3.1 精制山药多糖的初步鉴定

精制山药多糖的气相色谱分析如图 1 和图 2 所示,结果表明山药多糖是一种杂多糖。图 1 是标准单糖的气相色谱图,按出峰的先后顺序依次为鼠李糖,阿拉伯糖,木糖,甘露糖,葡萄糖,半乳糖和肌醇;图 2 是精制山药多糖完全水解物的气相色谱图,表明山药多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成。

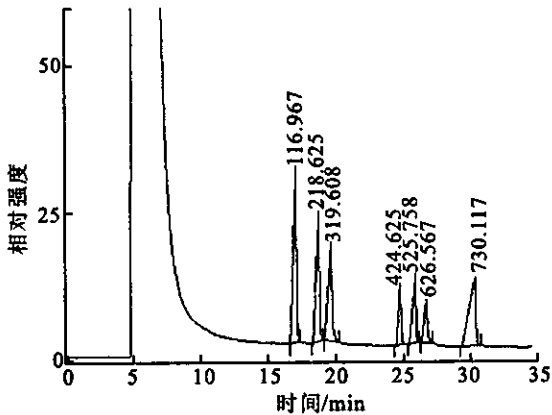


图 1 单糖标样的气相色谱图

Fig. 1 GC analysis of standard monosaccharide

3.2 山药多糖质量分数的测定

按 2.2.1 项测得葡萄糖标准曲线的回归方程以及山药中水溶性多糖对葡萄糖的换算因子 F 分别为:

$$y = 0.0065x + 0.0034 \quad (R^2 = 0.9996);$$

$$F = 1.67$$

万方数据

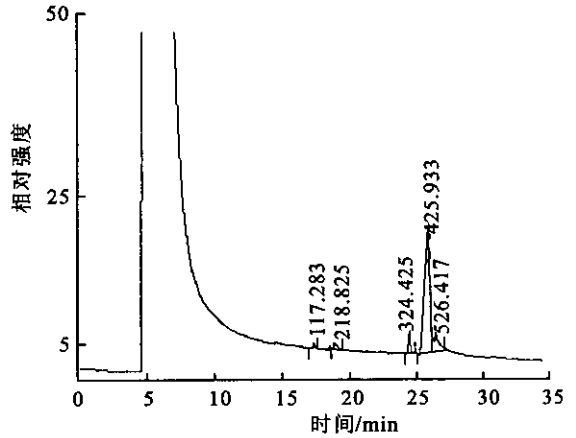


图 2 精制山药多糖的气相色谱图

Fig. 2 GC analysis of sugar composition of yam polysaccharide

3.3 山药粗多糖提取工艺条件的确定

3.3.1 料液比对粗多糖得率的影响 料液比对粗多糖的提取有较大影响。在相同的提取条件下对不同的料液比进行提取比较,根据提取效果来确定最佳的料液比。图 3 表明不同的料液比和多糖提取总质量的关系。

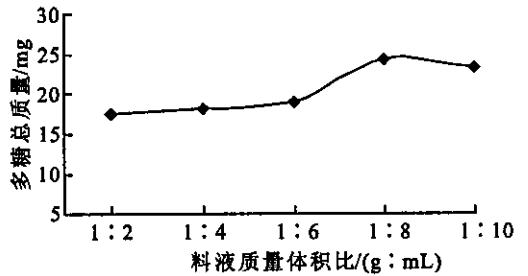


图 3 料液质量体积比对粗多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of material-to-liquid on polysaccharide yield

从图 3 可以看出,料液比的提高会增加多糖的溶出量,1 g : 8 mL 以后的趋势较为平稳;考虑到再提高料液比会给后续的浓缩工艺增加能耗,因此选择料液质量体积比 1 g : 8 mL (以鲜山药计)较为合适。

3.3.2 提取温度对粗多糖得率的影响 温度单因素试验表明,温度对山药水溶性粗多糖的提取有显著影响,结果见图 4。

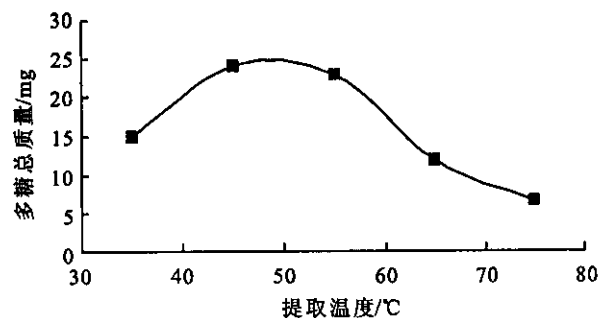


图 4 提取温度对粗多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on polysaccharide yield

从图4可以看出,粗多糖总质量随提取温度的升高呈现先提高后下降的趋势,提取温度在45℃,粗多糖总质量相对最高;温度高于45℃时,粗多糖总质量呈下降的趋势;分析原因可能是随着提取温度的升高,山药多糖开始降解以及蛋白质逐渐溶出。另外升高提取温度并在长时间浸提条件下可能会影响多糖的生理活性。因此综合考虑多糖的得率及活性等各种因素,提取温度以45℃为宜。

3.3.3 提取时间对粗多糖得率的影响 提取时间对提取效果有一定影响。在不同的提取时间下,比较提取效果,结果见图5。

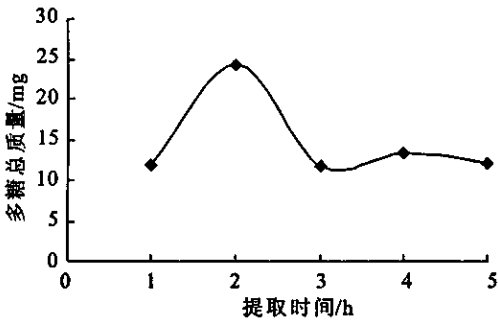


图5 提取时间对粗多糖得率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on polysaccharide yield

从图5可以看出,山药经热水提取2.0h,多糖总质量达最高值;提取时间在2.0h后多糖总质量反而下降;分析原因可能是山药提取2.0h,大多数多糖已溶出达到平衡,而蛋白质等其它杂质随着时间的延长而逐渐溶出。因此提取山药多糖所需的适宜时间为2.0h。

3.3.4 乙醇体积分数对粗多糖得率的影响 在乙醇沉淀法提取多糖时,乙醇体积分数对多糖的得率影响很大。一般情况下,多糖的相对分子质量越大,被沉淀下来所需的乙醇体积分数就越小^[13]。选择不同的乙醇体积分数进行试验,结果见图6。

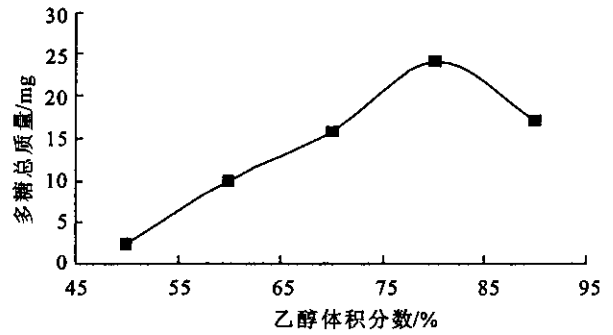


图6 乙醇体积分数对粗多糖得率的影响

Fig. 6 Effect of ethanol concentration on polysaccharide yield

从图6可以看出,随着乙醇体积分数的增加,粗多糖提取量增加,乙醇体积分数在80%时,多糖总质量为最高值。乙醇体积分数在80%以后,多糖总质量开始下降。因此乙醇体积分数以80%为宜。

3.4 山药粗多糖提取工艺条件的优化

在单因素试验的基础上,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验对山药粗多糖提取工艺条件进行优化。试验结果和极差分析见表2。

根据表2的极差R的大小,影响山药多糖提取的因素主次顺序为 $B>A>D>C$,即提取温度>料液比>乙醇体积分数>提取时间。

3.5 正交试验的方差分析

为进一步判断上述4类受控制的因素对试验结果的影响是否存在,运用SAS 8.2软件对正交试验数据进行方差分析,找出这些因素中起主导作用的变异来源。正交试验的方差分析结果(表3)表明:温度的差异高度显著,料液比差异也呈显著水平,说明提取温度和料液比对山药粗多糖提取起主要作用。时间和乙醇体积分数没有显著性差异,即时间和乙醇体积分数因素对最后结果影响较小。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验表

Tab. 2 Orthogonal Design of $L_9(3^4)$

试验号	料液质量体积比 A/(g : mL)	温度 B/℃	时间 C/h	乙醇 体积分数 D/%	多糖 得率/%
1	1(1 : 7)	1(40)	3(2.5)	2(80)	0.101 5
2	2(1 : 8)	1(40)	1(1.5)	1(75)	0.117 3
3	3(1 : 9)	1(40)	2(2.0)	3(85)	0.133 0
4	1(1 : 7)	2(45)	2(2.0)	1(75)	0.139 6
5	2(1 : 8)	2(45)	3(2.5)	3(85)	0.158 8
6	3(1 : 9)	2(45)	1(1.5)	2(80)	0.146 2
7	1(1 : 7)	3(50)	1(1.5)	3(80)	0.178 8
8	2(1 : 8)	3(50)	2(2.0)	2(85)	0.188 6
9	3(1 : 9)	3(50)	3(2.5)	1(75)	0.244 9

续表2

试验号	料液质量体积比 A/(g:mL)	温度 B/°C	时间 C/h	乙醇 体积分数 D/%	多糖 得率* /%
I	0.419 9	0.351 8	0.442 3	0.501 8	—
II	0.464 7	0.444 6	0.461 2	0.436 3	—
III	0.524 1	0.612 3	0.505 2	0.470 6	—
R	0.104 2	0.260 5	0.062 9	0.065 5	—

注:多糖得率以鲜山药计。

表3 正交试验方差分析表
Tab.3 Analysis of Variance Table

方差来源	自由度 (DF)	离差平方和 (SS)	均方(MS)	F值	P值(P>F)	显著性
料液比	1	0.001 809 61	0.001 809 61	7.94	0.048 0	*
温度	1	0.011 310 04	0.011 310 04	49.61	0.002 1	**
时间	1	0.000 659 40	0.000 659 40	2.89	0.164 2	
乙醇体积分数	1	0.000 162 24	0.000 162 24	0.71	0.446 4	
误差	4	0.000 911 85	0.000 227 96			
总和	8	0.014 853 14				

注:*表示差异显著,**表示差异高度显著。

4 讨论

在热水浸提山药可溶性多糖的过程中,温度和料液比是影响多糖提取的主要因素。山药水溶性多糖提取较优的工艺条件为料液质量体积比1g:9mL,提取温度50℃,提取2.5h,乙醇体积分数75%,在此条件下山药多糖的得率为0.2449%。

在多糖质量分数测定中,得到相应的多糖标准品比较困难,因多糖组成比较复杂,往往采用葡萄糖代替对照品,测定样品多糖质量分数。作者在经

典苯酚-硫酸法^[14]基础上,采用体积分数80%乙醇溶液热提以除去单糖、低聚糖、甙类及生物碱等干扰成分,Sevage法脱蛋白至茛山酮反应^[15]呈阴性,活性炭脱色,获得比较纯净的山药多糖,并通过气相色谱分析确定其主要由葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖组成。然后用精制的多糖计算葡萄糖与山药多糖的换算因子($F=1.67$),这样可以避免用葡萄糖作标准品引起的系统误差,结果比较真实准确。

提取后的山药水溶性多糖的进一步纯化和生物活性功能尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Chen Hsiao-Ling, Wang Cheng-Hsin, Chang Chen-Tien. Effects of Taiwanese Yam (*Dioscorea japonica* Thunb *Var. pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and metabolism in Balb/c Mice[J]. *Nutrition*, 2003, 19: 646—651.
- [2] 明·李时珍. 本草纲目(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1982.
- [3] 赵国华,李志孝,陈宗道,等. 山药多糖的免疫调节作用[J]. *营养学报*, 2002, 24(4): 187—188.
- [4] 詹彤,陶靖,王淑如. 水溶性山药多糖对小鼠的抗衰老作用[J]. *药学进展*, 1999, 23(6): 356—360.
- [5] 阚建全,王雅茜,陈宗道,等. 山药活性多糖抗突变作用的体外实验研究[J]. *营养学报*, 2001, 23(1): 76—78.
- [6] 何书英,詹彤,王淑如. 山药水溶性多糖的化学及体外抗氧化活性[J]. *中国药科大学学报*, 1994, 25(6): 369—372.
- [7] 赵国华,李志孝,陈宗道. 山药多糖 RDPS-I 的结构分析及抗肿瘤活性[J]. *药学学报*, 2003, 38(1): 37—41.
- [8] 张忠泉,陈百泉,许启泰. 山药多糖对大鼠血糖及胰岛释放影响的研究[J]. *上海中医药杂志*, 2003, 37(10): 52—53.
- [9] 张翼坤. 多糖的结构测定[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1983, 5: 18—23.
- [10] 韩玉莲,罗雪云. 植物多糖的测定[J]. *中国食品卫生杂志*, 1995, (3): 47—51.
- [11] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科技出版社,1987.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.
- [13] 李建萍,詹贻振,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,2001. (责任编辑:朱明)