

蹄叶橐吾叶多糖提取工艺优化及单糖组成研究

尤婷婷, 姜燕*, 张海悦, 张鑫, 李震

长春工业大学化学与生命科学学院, 长春 130012

摘要: 采用水提醇沉法提取蹄叶橐吾叶粗多糖, 通过单因素试验和 Box-Behnken 法优化该多糖的提取工艺。结果表明: 蹄叶橐吾叶粗多糖的最佳提取工艺为: 料液比 1:20 (g/mL)、提取温度 90 °C、提取时间 2 h、提取 3 次, 提取率为 8.76%; 通过红外光谱扫描检测其特征基团, 并应用高效液相色谱技术对已脱除蛋白的多糖结构进行初步鉴定, 得到其单糖组成为半乳糖醛酸: 鼠李糖: 半乳糖: 阿拉伯糖: 甘露糖: 葡萄糖: 葡萄糖酸: 岩藻糖 = 43.5 : 6.0 : 23.6 : 11.5 : 6.3 : 5.4 : 1.6 : 0.9。

关键词: 蹄叶橐吾; 多糖; Box-Behnken 法; 单糖组成

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.1.024

Extraction and Monosaccharide Compositions of Polysaccharides from *Ligularia fischeri*

YOU Ting-ting, JIANG Yan*, ZHANG Hai-yue, ZHANG Xin, LI Zhen

College of Chemical and Life Science, Changchun University of Technology, Jilin Changchun 130012, China

Abstract: The polysaccharide of *Ligularia fischeri* was extracted by water extraction and alcohol precipitation method. The extraction conditions were optimized by single factor experiment and Box-Behnken methodology. The extraction yield of polysaccharide was 8.76% under the optimized conditions with solid to liquid ratio of 1:20 (g/mL) at 90 °C for 2 h with three times of extraction. The structure of the extracted polysaccharide was determined by FT-IR and HPLC analysis. The HPLC analysis illustrated that deproteinated polysaccharide from *L. fischeri* comprised of galacturonic acid, rhamnose, galacturonic, arabinose, mannose, glucose, gluconic acid and fucose with percentages of 43.5%, 6.0%, 23.6%, 11.5%, 6.3%, 5.4%, 1.6% and 0.9%, respectively.

Key words: *Ligularia fischeri*; polysaccharide; Box-Behnken design; monosaccharide compositions

蹄叶橐吾 (*Ligularia fischeri*, 简称 LF), 又名马蹄叶、肾叶橐吾、山紫菀等, 为菊科橐吾属植物, 东北地区、华北地区、安徽、陕西等地均有分布。因蹄叶橐吾叶片具有特殊的风味, 常被吉林省延吉市朝鲜族人作为包饭叶食用。关于蹄叶橐吾的研究最早始于 1987 年沈阳药科大学, 李茁等对蹄叶橐吾的镇咳祛痰作用研究, 并确定其具有祛痰功效^[1]。2000 年至 2013 年期间, 学者们对其进行了更为深入的研究, 确定了蹄叶橐吾地上部分乙醇提取物对小鼠急性乙醇中毒的保护作用^[2]、蹄叶橐吾醇提物的抗氧化作用^[3]、遏制肺癌细胞增殖作用^[4]及抗炎作用^[5]等。2014 年, Lee HN 等^[6]针对蹄叶橐吾提取物中的咖啡酸乙酯对人类卵巢癌 SKOV-3 细胞的抗癌活

性进行机制研究; 另有 Yu KH 等^[7]采用蹄叶橐吾发酵水提取物对由半乳糖胺引起的肝毒性小鼠进行实验, 证明其具有减轻肝损伤的功效; 吉林农业大学刘洪章等^[8]对与蹄叶橐吾同科同属植物复序橐吾叶多糖进行研究, 表明其提取率较高且有较强的促进免疫力作用, 但目前仍未有关于蹄叶橐吾多糖成分的报道。本实验欲选用蹄叶橐吾叶片为原料, 优化提取工艺, 并对该多糖的结构组成进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料准备

蹄叶橐吾叶购于吉林省延吉市, 经东北师范大学生命科学学院周义发教授鉴定为蹄叶橐吾叶片。挑选无霉变、干净的叶片经中草药粉碎机粉碎, 过 80 目筛, 将样品加入 95% 乙醇处理后, 挥干乙醇, 收集滤渣, 放入干燥器中贮存备用。

1.2 主要仪器与试剂

Varian Cary 50 紫外可见分光光度计(驭铭实业上海有限公司); LC-10AT/Series 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Magna560 傅里叶变换显微红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)。

95% 乙醇, 长春兰德尔科技有限公司; 硫酸、苯酚、氯仿和正丁醇(分析纯)均购自于北京化工厂; 总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 蹄叶橐吾叶多糖提取工艺流程

称取经处理的蹄叶橐吾叶片(简称 LF)粉末→回流提取→收集提取液→浓缩→醇沉→蹄叶橐吾叶粗多糖(简称 PLF)→Sevage 法脱蛋白→脱蛋白蹄叶橐吾叶多糖(简称 DPLF)。

1.3.2 蹄叶橐吾叶多糖的测定

采用苯酚-硫酸法^[9]测定 PLF 含量, 并计算提取率 R_1 。

$$R_1(\%) = \frac{\text{PLF 含量} \times \text{体积}}{\text{LF 质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.3 PLF 提取工艺的单因素试验

以 PLF 提取率为考察指标, 分别对提取时间、料液比、提取温度和提取次数 4 个因素进行单因素试验。准确称取 5 g LF 粉末, 按不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL)加入蒸馏水, 设置温度(60、70、80、90、100 °C), 提取一定时间(1、1.5、2、2.5、3 h), 重复上述操作若干次(1 次、2 次、3 次、4 次、5 次), 收集提取液, 抽滤, 加入 4 倍体积的 95% 乙醇, 在 4 °C 条件下醇沉过夜, 次日离心, 挥干乙醇, 定容至 100 mL, 不同条件下均进行一次试验, 于 490 nm 处测定其吸光度值。

1.3.4 响应面优化实验

根据单因素试验的结果, 采用 Box-Behnken 法对提取温度、料液比及提取时间进行 3 因素 3 水平优化实验设计, 数据处理采用 Design Expert 7.5 软件。

表 1 响应面优化实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
(A) 温度 Temperature (°C)	80	90	100
(B) 料液比 Solid to liquid ratio (g/mL)	1:15	1:20	1:25
(C) 时间 Time (h)	1.5	2	2.5

1.3.5 DPLF 红外光谱检测

采用红外光谱法于 4000 ~ 400 cm^{-1} 波长条件下对 DPLF 的特征基团进行分析。

1.3.6 DPLF 单糖组成测定

通过 PMP 衍生化过程, 采用高效液相色谱分析 DPLF 的单糖组成。将 0.5 mL PMP 试剂和 0.5 mL NaOH 溶液(0.3 mol/L)加入经完全酸水解的待测样品中, 充分溶解后, 取 0.1 mL 于 70 °C 条件下水浴 30 min 后离心(10000 rpm)5 min, 然后分别加入 0.05 mL 的 HCl 溶液和蒸馏水, 充分混匀, 再加入 1 mL CH_3Cl_3 , 混匀后抽提剩余的 PMP 试剂, 吸去 CH_3Cl_3 层, 保留水层, 0.22 μm 滤膜将其过滤后稀释, 待测。

HPLC 检测条件: Shimadzu HPLC 系统(LC-10ATvP 紫外光检测器); DIKMA Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相为 PBS(0.1 mol/L, pH7.0)-乙腈 82:18(v/v); 流速: 1.0 mL/min; 进

样量: 10 μL ; 检测波长: 245 nm。

2 结果与分析

2.1 蹄叶橐吾叶粗多糖提取工艺的单因素试验

采用单因素试验考察料液比、提取温度、提取次数和提取时间对 DLF 提取率的影响, 如图 1 所示。料液比、提取温度和提取时间逐渐增加, PLF 提取率均呈上升趋势, 当达到一定值后, 曲线开始下降, 提取率降低, 这是由于当溶剂所占比例过高时提取率降低可能是由于在此条件下温度上升较慢的原因, 而提取温度过高或提取时间过长导致部分多糖结构遭到破坏, 进而影响提取率。提取次数增加对多糖提取率的影响呈上升趋势[图 1(d)]。提取 3 次时已基本提取完全, 提取次数进一步增加, 多糖提取率变化不大, 故提取次数选为 3 次。

2.2 响应面优化实验结果分析

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 以

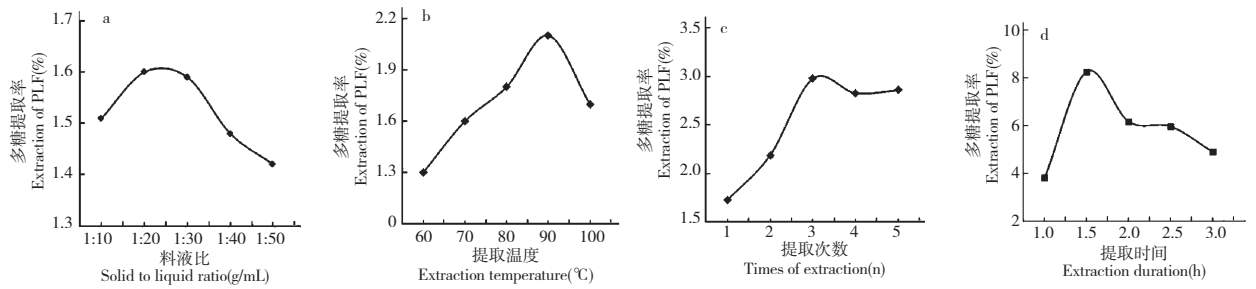


图1 料液比(a)、提取温度(b)、提取次数(c)和提取时间(d)对PLF提取率的影响

Fig.1 Effects of solid to liquid ratio (a), extraction temperature (b), times of extraction (c) and extraction duration (d) on the extraction yield of PLF

表2 响应面优化实验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

编号 No.	响应面实验设计 Box-Benhnken design			提取率 Extraction yield (%) R_1
	A	B	C	
1	0	1	1	8.66
2	-1	0	-1	6.87
3	0	-1	-1	8.56
4	-1	0	1	7.39
5	-1	-1	0	6.33
6	1	0	-1	9.13
7	1	1	0	7.96
8	-1	1	0	5.77
9	1	-1	0	7.01
10	0	1	-1	7.96
11	1	0	1	8.06
12	0	-1	1	6.95
13	0	0	0	8.72
14	0	0	0	9.02
15	0	0	0	8.62
16	0	0	0	8.99
17	0	0	0	8.92

PLF提取率作为响应值(R_1),选取3个因素,并以-1、0、1代表每组3个水平设计3因素3水平的响应面优化实验(表2)。

使用Design Expert 7.5软件对表2中数据进行非线性回归的二次多项式拟合,得到预测模型方程如式(2)。

$$R_1 = 8.85 + 0.72A + 0.19B - 0.18C + 0.38AB -$$

$$0.40AC + 0.58BC - 1.13A^2 - 0.96B^2 + 0.14C^2 \quad \text{式(2)}$$

表3为回归方程方差分析结果,显著性检验表明该回归模型显著($P < 0.0001$),失拟项不显著,且该模型的 $R^2 = 0.9929$, $R_{adj}^2 = 0.9714$,说明该模型与实际拟合较好,自变量与响应值之间线性关系显著,可以预测PLF提取工艺及提取率。

表3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of the regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P-value	显著性 Significant
Model	17.02	9	1.89	64.72	<0.0001	Significant
A	4.20	1	4.20	143.89	<0.0001	* *
B	0.28	1	0.28	9.62	0.0173	*
C	0.27	1	0.27	9.12	0.0194	*
AB	0.57	1	0.57	19.51	0.0031	*
AC	0.63	1	0.63	21.63	0.0023	*
BC	1.33	1	1.33	45.65	0.0003	*
A ²	5.36	1	5.36	183.40	<0.0001	* *
B ²	3.87	1	3.87	132.30	<0.0001	* *
C ²	0.079	1	0.079	2.69	0.1447	
残差 Residual	0.20	7	0.029			
失拟项 Lack of fit	0.081	3	0.027	0.88	0.5220	Not significant
净误差 Pure error	0.12	4	0.031			
总离差 Cor total	17.23	16				

$$R^2 = 0.9929, R^2_{\text{adj}} = 0.9714$$

* 表示显著 ($P < 0.05$); ** 表示极显著 ($P < 0.0001$).

* Significant ($P < 0.05$); ** Extremely significant ($P < 0.0001$).

各因素的 F 值可以反映各因素对实验指标的重要性, F 值越大, 表明对响应值的影响越大。如表 3 所示, $F_A = 143.89$, $F_B = 9.62$, $F_C = 9.12$, 故可知各因素对 PLF 提取率的影响主次顺序为: 提取温度 > 料液比 > 提取时间。由表 3 还可以看出, 方程的一次项 A (提取温度) 对响应值的影响极显著, B (料液比)、C (提取时间) 对响应值的影响显著, 二次项 A²、B² 对响应值的影响均为极显著, A、B、C 之间交互作用对响应值的影响显著。

因素之间交互作用见图 2。图 2(a) 表示温度与料液比之间的交互作用, 该响应曲面呈开口向下

的凸面且其中心位于考察区域内, 说明其存在响应最大值; 温度与时间交互作用如图 2(b) 所示, 提取时间较短时, 温度不断升高, 曲线较陡, 上升幅度大, 直至约 90 °C 后, 曲线略有下降, 而提取温度较低时, 曲线则随时间延长呈缓慢上升趋势; 由图 2(c) 可以看出, 当料液比处于较低水平时, 提取时间不断增加, PLF 提取率逐渐下降, 这可能是由于提取时间的增加导致已提取多糖分解或破坏, 影响 PLF 提取率, 而当料液比为较高水平时, 提取时间不断延长, PLF 提取率上升幅度大。

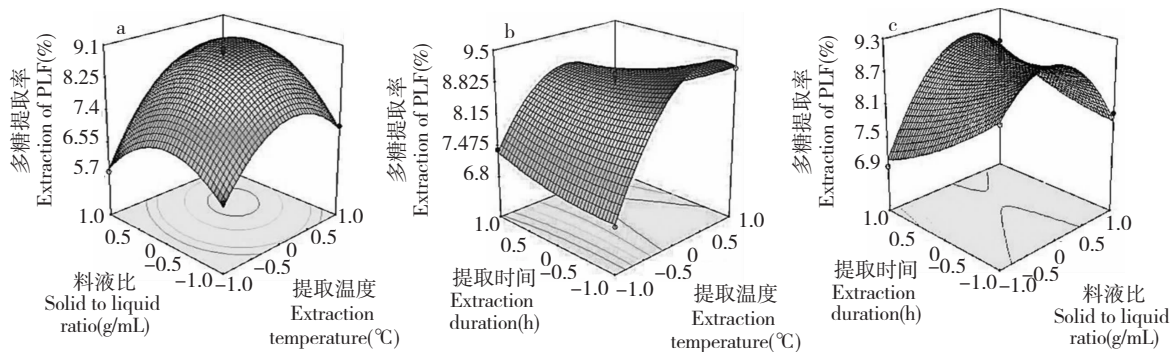


图2 提取温度、料液比和提取时间三者之间对 PLF 提取率交互影响的响应面图

Fig. 2 Response surface plots showing the interactive effect among extraction temperature, solid to liquid ratio and extraction duration on the extraction yield of PLF

由该模型优化得到蹄叶橐吾叶粗多糖的最优提取工艺为:提取温度 90.89 °C,料液比 1:19.75 g/mL,提取时间 2.19h,蹄叶橐吾叶多糖的提取率为 8.8214%。考虑实际操作,设定提取温度为 90 °C,料液比 1:20 g/mL,提取时间 2 h,按上述条件进行 3 组平行验证实验,平均提取率为 8.76%,与理论预测值相近,故通过该响应面优化后得出的回归方程具有实际意义。

2.3 DPLF 的红外光谱分析

PLF 经 Seavage 法处理后进行紫外全波长扫描(图 3),在 250~300 nm 波长范围内未见明显吸收峰以初步去除蛋白质和核酸等杂质,对其进行

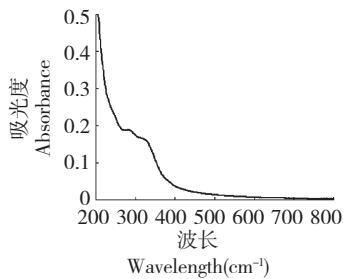


图 3 DPLF 紫外全波长扫描光谱图

Fig. 3 UV-Vis scanning spectrum of DPLF

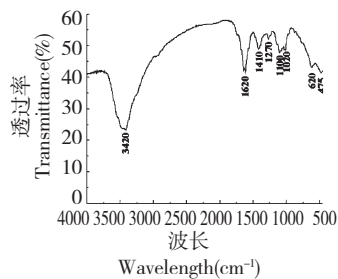
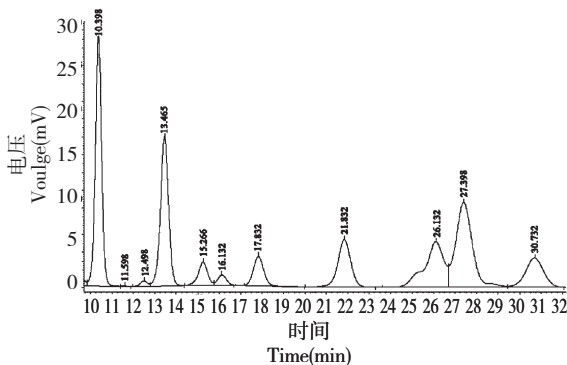


图 4 DPLF 的红外光谱图

Fig. 4 FT-IR spectrum of DPLF



红外光谱检测(图 4),分析确定其包含的基团如下:3420 cm^{-1} 处表明分子间存在氢键,推断物质为一种多羟基化合物;1620 cm^{-1} 处吸收峰表明其含有糖类酮 $\text{C}=\text{O}$;1410 cm^{-1} 是振动类型为羟基-OH 变形振动面内的羟基吸收峰;1100 cm^{-1} 和 1020 cm^{-1} 处为两个 D-呋喃糖苷的特征吸收峰,由此可以看出 DPLF 中包含多糖类特征基团,进一步确定其为多糖类物质。

2.4 DPLF 单糖组成分析

根据单糖混合标准品的高效液相色谱图对比分析得出 DPLF 的单糖组成成分(图 5)为半乳糖醛酸:鼠李糖:半乳糖:阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:葡萄糖酸:岩藻糖=43.5:6.0:23.6:11.5:6.3:5.4:1.6:0.9,由此看出,DPLF 中单糖种类较多,其中半乳糖醛酸含量最高。

3 结论

目前,国内外对于蹄叶橐吾多糖的研究未见报道。本文通过单因素试验和 Box-Behnken 法优化蹄叶橐吾叶片多糖的提取工艺,确定影响 PLF 提取率的主次因素依次为提取温度 > 料液比 > 提取时间,最佳工艺条件为提取温度 90 °C,料液比 1:20 g/mL,提取时间 2 h,PLF 提取率为 8.76%。采用红外光谱法和 HPLC 法对已脱除蛋白质的 DPLF 结构初步检测,明确单糖组成及各自所占比例为半乳糖醛酸:鼠李糖:半乳糖:阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:葡萄糖酸:岩藻糖=43.5:6.0:23.6:11.5:6.3:5.4:1.6:0.9,为后续研究奠定基础并提供理论依据。下一步研究将对蹄叶橐吾多糖进一步分离,如中性糖、酸性糖的分离纯化和分子量的确定等,并针对不同结构性质的多糖进行生物学活性研究,如抗氧化活性、增强机体免疫力、清咽活性及缓解体力疲劳活性等。

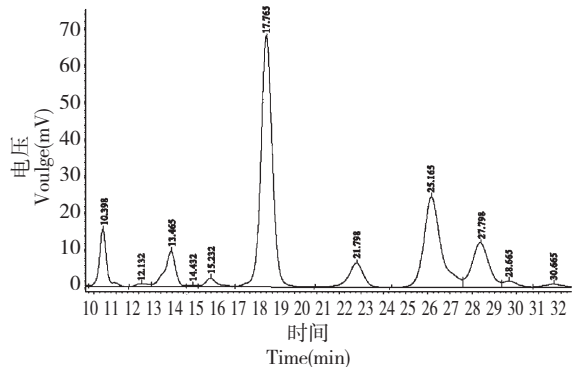


图 5 不同单糖混合标品 (a) 与 DPLF (b) 单糖组成高效液相色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of monosaccharide standards (a) and DPLF (b)

参考文献

- 1 Li Z (李茁), Fan BL (樊变兰), Yuan WX (袁文学), *et al.* Experimental studies on the antitussive and expectorant effects of *Ligularia fischeri* Turcz. and *Aster tataricus* L. *J Shenyang Coll Pharm* (沈阳药学院学报), 1987, 4: 136-139.
 - 2 Yoo JH, Oidovsambuu S, Kim SM, *et al.* Hepatoprotective effect of Handaeri-gomchi (*Ligularia fischeri* var *spiciformis* Nakai) extract against chronic alcohol-induced liver damage in rats. *Food Sci Biotechnol*, 2011, 20:1655-1661.
 - 3 An S, Park HS, Kim GH. Evaluation of the antioxidant activity of cooked gomchwi (*Ligularia fischeri*) using the myoglobin methods. *Prev Nutri Food Sci*, 2014, 19:34-39.
 - 4 Cho YR, Kim JK, Kim JH, *et al.* *Ligularia fischeri* regulates lung cancer cell proliferation and migration through down-regulation of epidermal growth factor receptor and integrin b1 expression. *Genes Genom*, 2013, 35:741-746.
 - 5 Choi EM, Kim YH. A preliminary study of the effects of an extract of *Ligularia fischeri* leaves on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46:375-379.
 - 6 Lee HN, Kim JK, Kim JH, *et al.* A mechanistic study on the anti-cancer activity of ethyl caffeate in human ovarian cancer SKOV-3 cells. *Chem-Biol Inter*, 2014, 219:151-158.
 - 7 Yu KH, Lee SY, Yang HM, *et al.* Effects of fermented aqueous extracts from leaves of *Ligularia fischeri* on hepatotoxicity in D-galactosamine-induced rats. *FASEB J*, 2014, 28:647-673.
 - 8 Zhu M (朱梅). Studies on the bioactive constituents of *Ligularia jaluensis* and *Ligularia intermedia* in Changbaishan region. Changchun: Jilin Agricultural University (吉林农业大学), PhD. 2013.
 - 9 Ren XY (任晓云), Yin CY (尹春英), Chen JZ (陈建中), *et al.* Determination of ferulic acid and polysaccharide in roots of *Vicatia thibetica* de Boiss. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:1804-1807.
- (上接第 124 页)
- 10 Liu H, Tsai Y, Chang S. *Toona sinensis* leaf extract inhibits lipid accumulation through up-regulation of genes involved in lipolysis and fatty acid oxidation in adipocytes. *J Agric Food Chem*, 2014, 62:5887-5896.
 - 11 Yang H, Chen S, Lin K, *et al.* Antioxidant activities of aqueous leaf extracts of *Toona sinensis* on free radical-induced endothelial cell damage. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137: 669-680.
 - 12 Yu W, Chang C, Kuo T, *et al.* *Toona sinensis* Roem leaf extracts improve antioxidant activity in the liver of rats under oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50:1860-1865.
 - 13 Duan XQ (段小群), Zhang XF (张小芳), Lu X (卢曦), *et al.* *In vitro* activity of inhibition on lipid peroxidation of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2010, 33:1618-1621.
 - 14 Jiang Z (蒋泽), Wang J (王军), Zhu XH (朱晓晖), *et al.* The performance of three inspection methods in the diagnosis of peripheral neuropathy in diabetes. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2010, 30:735-736.
 - 15 Koneri RB, Samaddar S, Simi SM, *et al.* Neuroprotective effect of a triterpenoid saponin isolated from *Momordica cymbalaria* Fenzl in diabetic peripheral neuropathy. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46:76-81.
 - 16 Yang W (杨薇), Sun SB (孙世博), Bai J (白晶), *et al.* The changes of sciatic nerve sensory and motor conduction velocity in diabetes mellitus rats. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2009, 29:933-934.
 - 17 Qu L (屈岭), Liang XC (梁晓春), Wu QL (吴群励), *et al.* Effects of Jinmaitong capsule on nerve growth factor in diabetic rats. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33:2539-2544.
 - 18 Yang XW, Liu FQ, Guo JJ, *et al.* Antioxidation and anti-inflammatory activity of Tang Bi Kang in rats with diabetic peripheral neuropathy. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15:1-10.