

微波辅助水解青钱柳多糖的工艺研究

舒任庚, 蔡永红

江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 优选微波辅助水解青钱柳多糖的工艺。方法 采用单因素试验和均匀设计试验, 以半乳糖的量为评价指标, 对影响青钱柳多糖水解的因素进行研究。结果 微波辅助水解青钱柳多糖的最佳工艺: 水解温度 120 °C, 三氟乙酸的浓度为 2 mol/L, 水解时间 20 min。结论 此方法简单、高效、节能, 可用于青钱柳多糖的水解。

关键词: 青钱柳; 多糖; 微波; 水解; 单因素试验; 均匀设计试验

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)08-1547-03

Microwave-assisted hydrolysis on polysaccharides from the leaves of *Cyclocarya paliurus*

SHU Ren-geng, CAI Yong-hong

Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Key words: *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja; polysaccharide; microwave; hydrolysis; one-factor test; uniform design test

青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja 为胡桃科青钱柳属植物, 据《中华本草》记载, 具有祛风、消炎止痛和杀虫止痒等功效^[1], 本课题组前期研究了青钱柳中的小分子化学成分^[2-4], 青钱柳水提液中高分子化合物青钱柳多糖具有明显的降血糖活性^[5], 而多糖的生理活性与其结构有密切联系, 因此对青钱柳多糖的结构研究十分必要。采用气相色谱 (GC) 法测定多糖中的单糖组成是目前最常用的方法, 其过程的第一步就是对多糖进行水解^[6]。多糖的水解方法有很多, 常用的有三氟乙酸、甲酸和浓硫酸水解 3 种方法^[7-9]。三氟乙酸水解法水解温和完全, 但水解时间较长, 操作较烦琐。本实验采用微波辅助三氟乙酸水解法, 水解时间短、操作安全、简便易行。

1 仪器与材料

MDS—6 微波消解萃取仪 (上海新仪微波化学仪器有限公司); GC—2010 气相色谱仪 (氢火焰离子检测器, 日本岛津公司); BT25S 分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); RE—52 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); GZX—9140MBE 真空

恒温干燥箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); DEF—6030B 减压恒温干燥箱 (上海一恒科技有限公司)。

青钱柳药材产于江西永修县, 经江西中医学院药用植物教研室刘庆华高级实验师鉴定为青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja 的鲜嫩叶。肌醇 (批号 080125, 质量分数 99.80%)、鼠李糖 (批号 080515, 质量分数 99.90%)、葡萄糖 (批号 080310, 质量分数 99.99%)、木糖 (批号 080310, 质量分数 99.80%)、阿拉伯糖 (批号 080410, 质量分数 98.5%)、甘露糖 (批号 080510, 质量分数 99.98%)、半乳糖 (批号 080310, 质量分数 99.99%) 均为上海化学试剂厂产品; 甲醇、三氟乙酸、三氯甲烷、正丁醇等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 青钱柳多糖的提取、分离与纯化

取青钱柳叶 1.5 kg, 在提取罐中于 70 °C 下用 80% 乙醇 10 L 浸提 2 次, 每次 2 h, 滤过, 回收乙醇提取液, 脱脂青钱柳叶晾干至无醇味, 用水煎煮法提取 3 次, 每次浸渍 4 h, 用 12 L 水在 80 °C 提取

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20162002); 国家中医药管理局中医药科技专项 (06-07ZT26)

作者简介 舒任庚 (1964—), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然药物活性成分研究。Tel: (0791)7118657 E-mail: shurg@163.com

2 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩后加入一定体积的 95% 乙醇, 使乙醇体积分数达到 80%, 静置过夜。沉淀分别用乙醇、丙酮、乙醚洗涤多次后减压干燥, 得粗多糖。粗多糖用水溶解, 再加入一定体积的 95% 乙醇, 使乙醇体积分数达到 80%, 静置过夜, 沉淀减压干燥, 同法操作 3 次, 至 80% 乙醇溶液无色止。称取多次醇沉的粗多糖细粉 10 g, 将其配成 0.2% 的糖液, 使其溶解, 滤过, 滤液按 *Sevage* 法除蛋白, 重复操作数次, 至无胶状的变性蛋白产生为止。用茚三酮 (Ninhydrin) 反应和双缩脲 (Biuret) 反应检测, 均呈阴性。

2.2 青钱柳多糖的水解

精密称取 100.0 mg 青钱柳多糖样品置微波反应罐中, 加入 10.0 mL 99.00% 三氟乙酸溶液, 加盖密封, 放入微波消解萃取仪中, 采用微波温控萃取模式, 控制反应时间和温度, 得到不同的青钱柳多糖水解液。对水解液离心, 取上清液, 60 °C 减压蒸干, 用甲醇反复旋蒸以除去残留的三氟乙酸, 直至回收的甲醇溶液呈中性。

2.3 青钱柳多糖水解产物衍生物的制备^[10]

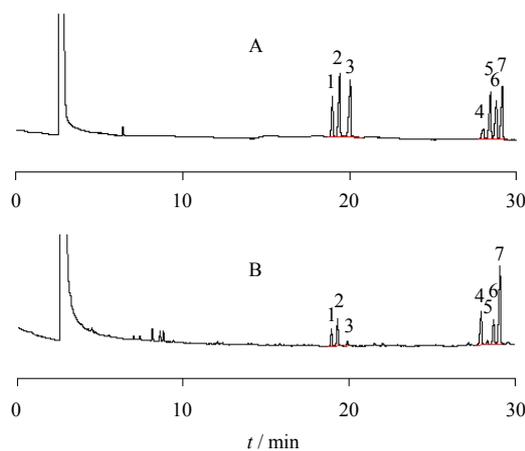
将水解产物溶解在 5.0 mL 的去离子水中, 加入 30.0 mg 硼氢化钠还原剂和 3.0 mg 肌醇内标物, 在 60 °C 恒温反应 1 h。加乙酸分解过量的硼氢化钠, 至无气泡逸出为止。60 °C 减压蒸干, 用甲醇反复旋蒸, 直至壁上为透明物质。真空干燥 24 h。将 2.0 mL 吡啶和 2.0 mL 乙酸酐加入到干燥的盛有还原糖样品的反应瓶中, 密封, 在 100 °C 反应 2 h 后, 加入 2.0 mL 二氯甲烷, 滤过后备用。

2.4 半乳糖的 GC 分析

2.4.1 色谱条件 SGE-AC1 毛细管柱 (30 m×0.22 mm, 0.25 μm), 检测器温度 290 °C; 汽化室温度 260 °C; 载气 N₂; 线速 26 cm/s; 分流比 50:1; 进样量 2 μL; 程序升温: 柱初温 165 °C, 保持 2 min, 2 °C/min 升温至 190 °C, 再以 1.5 °C/min 升温至 220 °C, 最后 220 °C 保持 5 min。

2.4.2 检测指标的选择 将青钱柳多糖水解衍生后的产物进行 GC 分析, 结果见图 1, 确定青钱柳多糖由鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖 6 种单糖组成, 其中半乳糖的量较高, 因此选择半乳糖作为青钱柳多糖水解条件的考察指标。

2.4.3 半乳糖的测定 以肌醇为内标, 测定半乳糖的定量校正因子^[11]。精密称取半乳糖 4.98、10.59、14.51、20.52、24.61 mg 及肌醇 10 mg (使半乳糖与



1-鼠李糖 2-阿拉伯 3-木糖 4-肌醇 5-甘露糖 6-葡萄糖 7-半乳糖
1-rhamnose 2-arabinose 3-xylose 4-inositol 5-mannose
6-glucose 7-galactose

图 1 混合对照品 (A) 及青钱柳多糖水解产物 (B) 的 GC 色谱图

Fig. 1 GC chromatograms of mixed reference substance (A) and hydrolytic products from polysaccharide in leaves of *C. paliurus* (B)

肌醇的质量比值在 0.5~2.5) 5 份, 按“2.3”项方法制备糖醇乙酰化衍生物, 并进行 GC 分析, 以半乳糖与肌醇峰面积之比 (Y) 对其质量之比 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.7755X+0.204$ ($r=0.9994$), 按内标法计算半乳糖的量。

2.4.4 精密度试验 将用来测量校正因子的其中一个样品 (2.118 mg/mL) 连续重复进样 5 次, 计算得半乳糖与肌醇峰面积比的 RSD 为 0.90%。

2.4.5 重现性试验 精密称取青钱柳多糖样品 5 份, 水解并进行衍生化反应, 依法测定, 计算得半乳糖质量分数的 RSD 为 0.78%。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取青钱柳多糖样品 8 份, 依次加入半乳糖适量, 按“2.2”、“2.3”项下方法操作, 依法测定, 计算半乳糖的回收率。结果半乳糖的平均回收率为 98.91%, RSD 为 2.49%。

2.5 单因素试验

2.5.1 水解温度 称取 5 份样品, 分别加入 2.0 mol/L 三氟乙酸 10.0 mL, 水解时间 20 min, 水解温度分别设为 100、110、120、130、140 °C。依法水解并进行衍生化反应, GC 法测定, 得半乳糖的质量分数分别为 7.59%、8.11%、10.25%、7.00%、5.34%。因此, 选择水解温度为 120 °C。

2.5.2 水解时间 称取 5 份样品, 分别加入 2 mol/L 三氟乙酸 10.0 mL, 水解温度 120 °C, 水解时间分

别设为 10、20、30、40、50 min。依法水解并进行衍生化反应，GC 法测定，得半乳糖的质量分数分别为 8.75%、10.25%、8.35%、7.24%、6.18%。因此，选择水解时间为 20 min。

2.5.3 三氟乙酸浓度 称取 5 份样品，分别加入 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mol/L 三氟乙酸 10.0 mL，水解温度 120 °C，水解时间 20 min。依法水解并进行衍生化反应，GC 法测定，得半乳糖的质量分数分别为 10.25%、9.72%、8.06%、7.64%、7.31%。因此，选择三氟乙酸浓度为 2.0 mol/L。

2.6 均匀设计试验

2.6.1 试验设计 选择对青钱柳多糖水解反应影响较大的 3 个因素：水解时间 (X_1)、水解温度 (X_2)、三氟乙酸浓度 (X_3) 进行 $U_7(7^3)$ 均匀设计试验^[12]，因素水平表见表 1。

2.6.2 均匀设计试验结果及数据处理与分析 按表 1 中方法安排试验，依法水解并进行衍生化反应，GC 法测定，计算半乳糖的质量分数，结果见表 1。

表 1 均匀设计试验及结果

Table 1 Test and results of uniform design

序号	X_1/min	$X_2/^\circ\text{C}$	$X_3/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	半乳糖/%
1	50 (7)	135 (4)	3.0 (3)	3.00
2	20 (1)	140 (5)	3.5 (4)	4.58
3	45 (6)	120 (1)	4.0 (5)	6.74
4	25 (2)	125 (2)	2.5 (2)	8.46
5	35 (4)	130 (3)	5.0 (7)	4.80
6	40 (5)	145 (6)	2.0 (1)	3.12
7	30 (3)	150 (7)	4.5 (6)	1.28

2.6.3 多糖水解最佳工艺筛选 数据用 SPSS 数理统计软件进行分析。根据各方程的回归系数、 F 值及其显著性检验结果，选出优化方程 $Y=39.375-0.097 X_1-0.220 X_2-0.625 X_3$ 。其中 $n=7$ ， $S_e=0.450$ ， $F=77.482$ ， $P<0.05$ ， $r=0.994$ 。由方差分析可知回归方程具有显著性统计学意义，回归方程各项系数均具有显著性差异 ($P<0.05$)；由标准回归系数可知，3 个因素对半乳糖的质量分数都有影响，其中温度对糖质量分数的影响最大，其次为时间，影响最小的为三氟乙酸浓度。根据回归方程和单因素试验结果得到微波辅助酸水解青钱柳多糖的最佳工艺条件：水解温度 120 °C，三氟乙酸浓度 2 mol/L，水解时间 20 min，得到半乳糖质量分数的预测值为 10.19%。

2.6.4 验证试验 精密称取青钱柳多糖 100.0 mg，加入 2 mol/L 三氟乙酸 10 mL，置微波消解仪中，控制温度 120 °C，水解 20 min。水解样品衍生后进行 GC 分析，得半乳糖的质量分数为 10.23%，结果与均匀设计试验预测值较接近。

3 讨论

本实验采用微波辅助三氟乙酸法水解青钱柳多糖，由单因素试验结果可知，微波酸水解多糖应在一个适宜的温度条件下水解，温度不能太高，超过 120 °C 时，糖的量开始减少，但温度太低，多糖不能完全水解。水解时间也是影响多糖水解的一个重要因素，长时间使用微波加热可使水解后的单糖构型发生变化，最后使其分解。酸浓度对多糖的水解影响较小，在微波辅助水解的条件下低浓度的三氟乙酸就能使其水解。

微波加热与传统加热不同：体系受热均匀，升温迅速，但微波促进有机反应除具有热效应外，还应有非热效应。本实验采用单因素试验和均匀设计试验，结果显示采用微波辅助酸水解法，可缩短青钱柳多糖的水解时间，而且操作简单易行。

参考文献

[1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

[2] 舒任庚, 徐昌瑞, 黎莲娘. 青钱柳甜味成分的研究 [J]. 药学学报, 1995, 30(10): 757-761.

[3] Shu R G, Xu C R, Li L N, et al. Two secodammarane triterpenoid sapoinins from *Cyclocarya paliurus* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(6): 551-553.

[4] 舒任庚, 舒积成. 青钱柳中的酚类化学成分 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 507-508.

[5] 李 磊, 谢明勇, 易 醒. 青钱柳多糖降血糖作用研究 [J]. 中药材, 2002, 25(1): 39-41.

[6] 刘 娟, 屈效源. 块菌多糖的相对分子量测定和单糖组成分析 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1380-1384.

[7] 黄荣清, 王作华, 马成禹. 红景天多糖的组成及摩尔比分析 [J]. 现代应用药学, 1997, 14(1): 33-34.

[8] 陈晓萍. 枸杞中性多糖的糖链结构分析 [J]. 浙江农业大学学报, 1996, 22(1): 37-40.

[9] 康学军, 曲见松, 顾忠泽. 白芷多糖的分析 [J]. 分析化学, 2006, 34(4): 533-535.

[10] 李 娟, 王 红, 王晋焜, 等. 毛细管气相色谱法测定多糖的单糖组成 [J]. 化学研究与应用, 2007, 19(5): 521-523.

[11] 康学军, 曲见松. 白芷多糖中单糖组成的气相色谱分析 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 891-894.

[12] 刘明芝, 周仁郁. 中医药统计学与软件应用 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006.