

超微粉碎在孔石莼多糖提取中的应用

慕慧敏^{1, 2}, 赵婷婷^{1, 2}, 张全斌¹, 张虹¹, 牛锡珍¹, 赵增芹^{1, 2}

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 研究超微粉碎技术在孔石莼(*Ulva pertusa*)多糖提取中的可行性。分别用超微粉碎后提取和常规提取两种方法提取孔石莼多糖, 在不同条件下比较其提取率和所得产品的质量。结果表明, 超微粉碎后的孔石莼在 125℃ 提取 4 h 收率达到 17.39%, 与常规方法比较其收率提高 28.8%, 主要化学组分及其含量没有差异, 红外图谱也表明, 两种方法所得的孔石莼多糖其主要官能团没有差异, 说明超微粉碎技术在孔石莼多糖提取过程中的应用是可行的, 它除了保持孔石莼多糖的品质外, 可在较易控制的条件下提高其提取率。

关键词: 超微粉碎; 孔石莼多糖; 理化性质

中图分类号: Q53

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)12-0056-03

超微粉碎是近来国际上发展非常迅速的一项新技术, 应用这种技术可将固体物质粉碎成直径小于微米级的粉体, 并且破壁率特别高, 大于 90%, 将它应用于中药制剂的制备中, 可提高药材中有效成分的释放^[1]。有报道将超微粉碎应用于陆地植物的提取, 如在当归散提取中, 可加快当归散中水溶性成分的溶出速度, 提高溶出量^[2]。但超微粉碎在海洋植物提取中的应用尚未见报道。

孔石莼(*Ulva pertusa*)属绿藻门石莼科石莼属, 俗称海白菜, 海莴苣, 它广泛分布于北太平洋的西部, 朝鲜、日本、中国及独联体亚洲部分海区的海岸。在中国主要分布于辽宁、河北、山东、江苏等沿海地区, 常被作为日常蔬菜食用。孔石莼多糖是细胞间产物, 在藻体中以杂多糖(heteropolysaccharide)形式而存在, 含有鼠李糖(L-Rhamnose)、木糖(D-Xylose)、葡萄糖醛酸(D-Glucuronic acid)、葡萄糖(D-Glucose)及硫酸根(SO₄²⁻)等, 孔石莼作为一种重要的中草药, 具有清热解毒, 软坚散结, 利水减压之功效, 常被用来治疗甲状腺肿大、水肿、高血压等症。通过药效实验已经证明, 孔石莼多糖具有良好的调血脂活性, 并且多糖的分子量范围对其活性有显著影响^[3-4]。作者运用超微粉碎技术研究该技术对孔石莼多糖提取过程和含糖理化性质的影响, 将对海洋生物天然组分分离、制备技术的进步起促进作用。

1 材料与方 法

1.1 仪器

722S 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器

有限公司); 高压釜(山东新华医疗器械股份有限公司); 旋转蒸发仪(Buchi, 德国); Nicolet 360 光谱仪; BFM-6 粉碎机(济南倍力粉技术工程有限公司); 元素自动分析仪(PE2400C); 马福炉; 分析天平。

1.2 材料

孔石莼于 2003 年 10 月采自青岛太平角, 除去泥沙与杂藻, 自来水冲洗干净, 风干, 密封于塑料袋中于阴凉干燥处放置。海藻样品由中国科学院海洋研究所夏邦美研究员鉴定。

1.3 试剂

苯酚(5%, 重蒸), 吡啶, 明胶(北京化学试剂公司, 化学纯), 活性炭(化学纯), 葡萄糖, 鼠李糖(SIGMA), 葡萄糖醛酸标准品(SIGMA), 浓硫酸, 氨水, 考马斯亮蓝试剂 G-250(进口分装), 牛血清蛋白(进口分装), 其余均为分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 孔石莼干藻的超微粉碎

干藻在 45℃ 再次烘干, 用 BFM-6 粉碎机常温下粉碎到 300 目, 1 000 g 干藻粉碎需 13 min。

1.4.2 未超微粉碎孔石莼多糖的提取

干藻在红外灯下烘干剪碎, 称取 100 g 于高压釜

收稿日期: 2004-07-09; 修回日期: 2004-10-20

基金项目: 中国科学院方向性创新项目(KZCX3-SW-215); 青岛市科技计划资助项目(02-2-kj-hh-71)

作者简介: 慕慧敏(1978), 女, 硕士研究生, 主要从事海藻化学与海洋药物的研究, E-mail: qihuimin@m.s.qdio.ac.cn

中,加 40 倍水在 125℃ 下提取 4 h,80 目筛绢过滤,弃去藻渣,用硅藻土作助滤剂趁热过滤,滤液用透析袋先在自来水流动透析 24 h,然后在蒸馏水中透析,透析 2 次,用硅藻土作助滤剂,将透析液再过滤,过滤后的透析液经减压旋转浓缩到原体积的 1/4,加入 95% 的酒精至浓度为 75%,所得沉淀经 95% 的酒精 2 次脱水,红外灯下烘干,即为所得的多糖样品 U1^[5-9]。

1.4.3 超微粉碎孔石莼多糖的提取

经超微粉碎的孔石莼分别在 105, 115, 125℃ 分别加热 2, 3, 4 h, 比较温度和加热时间对超微粉碎的孔石莼多糖提取率的影响。其余过程同上,得破壁多糖样品 U2。

1.4.4 多糖及其组分的测定方法

多糖溶出率采用重量法计算;硫酸根的含量以干燥好的 K₂SO₄ 为标准,采用明胶-氯化钡法测定^[7];以 Sigma 公司生产的鼠李糖为标准,采用苯酚-硫酸法测定样品中的总糖含量^[8-10];以 Sigma 公司生产的葡萄糖醛酸为标准,加吡唑显色测定糖醛酸的含量;灰分测定参照国家药典 2000 版附录 K 灰分测定法;样品干燥后,由自动元素分析仪 (PE2400C) 测定碳、氮、氢含量;采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质的含量^[11-12];样品特性粘度的测定参照国家药典

2000 版二部;样品的红外光谱解析,取少量在 P₂O₅ 干燥器中干燥保存的糖样,与光谱纯的溴化钾混合,研磨后压制成厚 1 mm 左右的薄片,于 Nicolet 360 光谱仪上扫描分析。

2 结果和讨论

经 3 次提取发现,未破壁的孔石莼在 125℃ 加热 4 h 得率平均在 13.50%,破壁的孔石莼在同样条件下得率在 17.39%,二者相比,经超微粉碎后得率提高了 28.8%。从表 1 中可以看出,经超微粉碎后,孔石莼在 115℃ 加热 3 h 其得率就接近 13.50%,与未粉碎的相比,降低了提取温度,缩短了提取时间,加快了孔石莼多糖的溶出速度。

表 1 经超微粉碎的多糖在不同温度和加热时间的提取率
Tab 1 The dissolution rate of ulvan after supermicro-pulverization at different temperatures and different heating times

加热时间(h)	提取率(%)		
	温度(℃)		
	105	115	125
2	10.25	12.59	14.90
3	11.25	13.28	16.11
4	11.97	13.94	17.39

表 2 孔石莼多糖的组分含量及其特性粘度

Tab.2 Content of ulvan's components and intrinsic viscosity of ulvan

粉碎方式	含量(%)								特性粘度
	硫酸根	总糖	糖醛酸	蛋白质	灰分	碳	氢	氮	
剪碎 U1	20.26	50.02	20.29	0.33	23.22	30.66	4.75	1.90	90.5
超微粉碎 U2	20.08	49.01	20.20	0.23	22.51	30.57	4.64	1.82	106.9

表 2 中 U1 是未经超微粉碎在 125℃ 加热 4 h 所得的多糖,U2 是经超微粉碎在 125℃ 加热 4 h 所得的多糖,可以看出,U1 和 U2 在硫酸根、总糖、糖醛酸以及灰分的含量基本一样,蛋白质的含量 U2 低于 U1,这与元素分析的结果相吻合,实验表明多糖 U2(超微粉碎)的特性粘度大于多糖 U1,这说明孔石莼经超微粉碎后粒度远远小于剪碎的样品,在加热提取时更有利于大分子量多糖的溶出。

在多糖的红外光谱中(图 1),除在 3 446, 3 452 cm⁻¹ 的羟基伸缩振动和 2 937 cm⁻¹ 的 C-H 伸缩振

动,多糖在 1 258~ 1 230, 850, 788 cm⁻¹ 的吸收峰被认为是硫酸基的特征信号。其中 850 cm⁻¹ 处的信号为硫酸基直立键 C-O-S 的弯曲振动,1 230~ 1 258 cm⁻¹ 为 S=O 键的伸缩振动,在 1 642 cm⁻¹ 较强的 C=O 伸缩振动吸收峰表征了糖醛酸的存在(图 1)。788 cm⁻¹ 可能为硫酸基平伏键 C-O-S 的弯曲振动,但还未被证实^[13]。从红外分析的结果可以看出,经超微粉碎提取的多糖与未粉碎的多糖图谱基本吻合。并且与国外的文献相对照,石莼多糖的红外图谱主要峰基本一致^[13]。

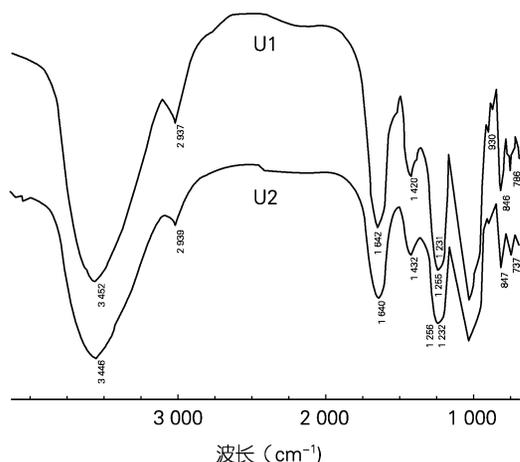


图1 孔石莼多糖 U1 和 U2 的红外图谱

Fig.1 Infrared spectroscopies of U1 and U2 from *Ulva pertusa*

U 1: 未经超微粉碎在 125℃加热 4 h 所得的多糖;

U 2: 经超微粉碎在 125℃加热 4 h 所得的多糖

U1: the polysaccharide extracted from uncomminuted seaweed at 125℃ for 4 h

U 2: the polysaccharide extracted from comminuted seaweed at 125℃ for 4 h

超微粉碎的工作原理是利用振动使介质产生振动冲击及介质回转,使粉料得到正向撞击的同时又得到剪切力,高速、高能量进行粉碎,在粉碎的同时可以对磨筒套内通入冷却水,控制粉碎温度^[14-15]。对孔石莼来说,经超微粉碎后,所制得的细粉粒均可达到 300 目以上,破壁率达 90% 以上,它的有效成分充分暴露出来,有效成分从细胞内向细胞外迁移的过程所需时间缩短,且超微粉碎样品的比表面积明显增加,而多糖的溶出速度与比表面积成正比,因此,多糖的释放速度及释放量就会提高。总的说来,对于超微粉碎的孔石莼来说,优化了提取条件,加快了溶出速度,提高了多糖的得率,同时,所得到的多糖其硫酸根、总糖、糖醛酸和灰分的含量与剪碎的样品基本一样,同时红外解析说明 U2 中主要的官能团与 U1 没有差异,这就保证了孔石莼多糖的组分不会因为使用超微粉碎技术而受到影响。超微粉碎技术可以广泛应用于孔石莼等海藻多糖的提取。

参考文献:

[1] 关天增,雷敬卫,郑艳丽. 浅谈超微粉碎[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 499.

[2] 葛付存, 王爱武. 超微粉碎对当归散水溶性组分溶出特性的研究[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(1): 42-44.

[3] 严宏谟. 海洋大辞典[M]. 沈阳: 辽宁人民出版社, 1998. 425-427.

[4] Yu Peng-zhan, Li Ni, Liu Xi-guang, et al. Antihyperlipidemic effects of different molecular weights polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) [J]. **Pharmacological Research**, 2003, 15(1): 21-27.

[5] 于鹏展, 张虹, 牛锡珍, 等. 正交实验法优选孔石莼多糖 (*Ulva Pertusa*) 的提取工艺[J]. 中成药, 2004, 26(1): 16-18.

[6] 吴志军, 徐祖洪, 李智恩, 等. 孔石莼 (*Ulva pertusa* Kjellm) 调血脂作用的初步研究 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(2): 13.

[7] Dodgson K S, Price R G. Determination of Ester Sulphate [J]. **Biochem**, 1962, 84: 106.

[8] 张立, 马琼, 何永利, 等. 灵芝、香菇、黄芪、枸杞提取物中多糖含量的测定 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 167-168.

[9] 徐秀兰. 生物化学实验与指导[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 131-133.

[10] 王家好. 灵芝菌提取物中多糖含量的测定 [J]. 中成药, 1996, 18(8): 13-14.

[11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(7): 246-254.

[12] 李建武, 陈丽蓉, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 174-176.

[13] Ray B, Lahaye M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan* 1 [J]. **Short Communication Carbohydrate Research**, 1995, 274(8): 313-318.

[14] 何煜, 郭琪. 中药细胞级微粉碎对体内吸收的影响 [J]. 中成药, 1999, 21(11): 601-602.

[15] 金万勤, 黄芳, 郭立玮. 苍术、黄柏及二妙丸超微粉碎的生物药剂学的研究 I. 扫描电子显微镜技术对超微粉的表征 [J]. 中草药, 2001, 32(4): 306-308.

(下转第 80 页)

The application of supermicro-pulverization to the extraction process of ulvan

QI Hui-min^{1,2}, ZHAO Ting-ting^{1,2}, ZHANG Quan-bin¹, ZHANG Hong¹, NIU Xi-zhen¹,
ZHAO Zeng-qin^{1,2}

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Jul. 9, 2004

Key words: supermicro-pulverization; Ulvan; physical; chemical properties

Abstract: The application of supermicro-pulverization to the polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* was studied. At different temperatures and different heating times, the comparisons of the yields and properties of polysaccharide from comminuted seaweed and that of uncomminuted one were made. It proved that the yield of polysaccharide from comminuted seaweed attained to 17.39%, and it increased 28.8% compared with that uncomminuted at 125 °C and heating 4 h. The primary components and content had no change. Infrared spectroscopy proved that the primary groups had no change, so the results suggested that the technique of supermicro-pulverization was feasible at extraction of polysaccharide from *U. pertusa*. The technique can increase yield at simple conditions, and keep the properties of ulvan.

(本文编辑:张培新)