

梁永锋. 人工种植与道地野生金莲花多糖含量比较及微波辅助提取工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 332–334.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.118

人工种植与道地野生金莲花多糖含量比较 及微波辅助提取工艺研究

梁永锋

(宁夏师范学院化学与化学工程学院, 宁夏固原 756000)

摘要:在微波辐射下,用水提醇沉法提取金莲花多糖,Seavg 法除去蛋白,苯酚-硫酸法测定金莲花中多糖含量;通过单因素和正交试验,探索微波辅助下多糖提取的最佳工艺,并测定比较人工种植与道地野生金莲花中的多糖含量,对人工种植金莲花的药用品质进行评价。结果表明,人工种植金莲花多糖含量为 2.53%,最佳提取工艺条件为微波功率 400 W、料液比 1:20、微波辐射时间 30 min、浸泡时间 60 min;人工种植金莲花多糖含量较高,完全可满足药用。

关键词:人工种植;金莲花;多糖;提取工艺;药用品质;评价

中图分类号: O657.32;R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0332-02

植物多糖具有免疫调节、抗衰老、抗肿瘤、抗凝血和降血糖等作用,可作为治疗疾病的药物和保健食品。植物多糖来源广泛,毒副作用低,安全性好,无致癌作用^[1-2]。金莲花为毛茛科植物金莲花(*Trollius chinensis* Bunge)的干燥花及其花蕾,味苦、性寒、无毒,可治口疮喉肿、浮热牙宣、耳疼目痛^[3]。现代药理研究表明,金莲花具有抗菌、抗病毒等活性,用于治疗慢性扁桃体炎、感冒、发烧、急性鼓膜炎、尿路感染等其他炎症。文献报道,金莲花中主要含有黄酮类、有机酸、糖类、蛋白质等^[4]。目前,对金莲花的开发研究多限于野生金莲花蛋白质、黄酮类、有机酸类化合物的提取分离和药理活性研究^[5-9],而对人工种植金莲花多糖的提取分离报道不多。随着市场需求量的不断增加,野生金莲花已远远不能满足消费者需求,近年来,各地广泛进行人工种植金莲花。试验通过测定宁夏回族自治区隆德西北中药材有限公司人工种植的金莲花多糖含量,并与野生金莲花多糖含量进行比较,判断其药用价值,为人工种植金莲花的广泛应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试材与前期处理

人工种植金莲花采自宁夏回族自治区隆德县西北中药材有限责任公司种植基地;山西五台山、河北承德、长白山、内蒙古赤峰的野生金莲花购买于宁夏明德中药饮片有限公司,由注册药剂师赵建军鉴定。将试材放入恒温箱中,60℃烘干至恒质量,取出自然阴干、粉碎,过 80 目筛,依次用石油醚、丙酮处理 2 次,除去脂类和色素,再用 80% 乙醇处理 2 次,除去单糖、低聚糖苷类物质,干燥至恒定质量,备用。

1.2 主要仪器与试剂

UV-2450 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司生产;FW-177 型中草药粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司生产;XH-300A 微波催化合成/萃取仪,北京祥鸽科技发展有限公司生产;pHs-2C 型精密酸度计,上海雷磁仪器厂生产;RE-52A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂生产;L-S 电子天平,精度 0.1 mg,梅特勒-托利多仪器公司生产。苯酚、98% H₂SO₄、NaOH、葡萄糖、无水乙醇、CHCl₃、正丁醇等,均为国内产分析纯(AR);水为纯净水。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的建立 取适量葡萄糖于烘箱内,105℃烘干至恒定质量^[10];精确称取 10 mg 葡萄糖,加纯水溶解并定容到 100 mL,配制成 0.1 mg/mL 的标准溶液;分别移取标准液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL 于 25 mL 具塞刻度试管中,以纯水补至 2.0 mL,顺序加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL,振摇均匀,静置 20 min;以试剂空白为参比,在波长 490 nm 处测定吸光度。以吸光度为横坐标(*D*)、葡萄糖含量为纵坐标(*C*),获得标准曲线方程为 $C = 0.0833D - 0.00067$ ($r = 0.9993$),葡萄糖标准品在 0.01~0.16 mg/mL 之间,与吸光度具有良好的线性关系。

1.3.2 金莲花多糖的提取 准确称取预处理的金莲花样品 1.00 g,加适量纯净水于 50℃浸泡,按不同液料比、微波功率、微波辐射时间和浸泡时间等条件进行微波提取,以 4 000 r/min 离心 15 min,取上清液;将滤渣在同样条件下再浸提 1 次,合并 2 次所得滤液,减压浓缩;向浓缩液中加入 1/4 倍体积的氯仿-正丁醇($V:V = 4:1$),混合 20 min,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,重复 5~6 次,至中间无明显沉淀为止;将上清液转移到 100 mL 容量瓶中,用纯水定容至刻度,作为供试样品溶液。

1.3.3 多糖含量的测定 取样品液 0.1 mL,置于 25 mL 容量瓶中,按照制作标准曲线溶液的方法配制样品溶液并定容至 25 mL,用 UV-2450 型紫外可见分光光度计测定波长 490 nm 处吸光度,计算多糖提取量和多糖含量,计算公式为:多糖提取量(g/mL) = 多糖质量浓度(mg/mL) × 10⁻³ × 稀释

收稿日期:2014-02-13

基金项目:宁夏科技支撑计划(编号:NXKJZC2013);宁夏师范学院创新团队项目(编号:ZZ201203)。

作者简介:梁永锋(1963—),男,甘肃宁县人,硕士,教授,主要从事天然药物分析及应用研究。E-mail:qyly338@163.com。

倍数;多糖含量(%) = 多糖提取量 × 100/金莲花样品质量。

1.3.4 提取工艺研究 分别考察液料比、微波辐射时间、微波功率和浸泡时间 4 个因素对多糖提取的影响;采用 4 因素 3 水平正交试验,对提取过程中液料比(A)、微波功率(B)、微波辐射时间(C)和浸泡时间(D)进行优化工艺研究。

2 结果与分析

2.1 单因素对金莲花多糖提取的影响

2.1.1 料液比对多糖提取的影响 称取预处理人工种植金莲花 1.00 g 各 5 份,分别取料液比(g : mL)为 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30,固定微波功率 400 W、浸泡时间 60 min、微波辐射时间 30 min 进行多糖提取。结果表明,多糖提取率开始随料液比的增大而增加,当料液比大于 1 : 20 时,随着料液比的增大,多糖提取率反而逐渐减小;料液比为 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30 时,多糖提取率依次为 1.21%、1.29%、1.41%、1.39%、1.36%。这是因为随液料比增大,溶剂与原料接触充分,二者的传质作用增强,多糖的提取率增大;当液料比大于 1 : 20 时,随料液比增大,微波功率相同条件下,提取液温度呈下降趋势,致使多糖提取得率反而下降。因此,确定金莲花多糖提取适宜的液料比为 1 : 20。

2.1.2 微波功率对多糖提取的影响 称取预处理人工种植金莲花 1.00 g 各 5 份,固定微波辐射时间 30 min、液料比 1 : 20、浸泡时间 60 min,超声功率分别为 300、350、400、450、500 W 进行多糖提取。结果表明,随微波功率增大,多糖提取率增大,当功率超过 400 W 时,多糖提取率增大趋于缓慢;功率分别为 300、350、400、450、500 W 时,多糖提取率分别为 1.19%、1.46%、1.78%、1.79%、1.81%。这可能是因为随着微波功率增大,物系升温加快,固液传质速度加快,对细胞破坏作用增大,有利于多糖浸出,但功率过高,瞬间加热作用会使液体沸腾溢出。为节省能源,微波功率选取 400 W 为宜。

2.1.3 微波辐射时间对多糖提取的影响 称取预处理人工种植金莲花 1.00 g 各 5 份,固定微波辐射功率 400 W、液料比 1 : 20、浸泡时间 60 min,微波辐射时间分别为 10、20、30、40、50 min 进行多糖提取。结果表明,多糖提取率初始随微波辐射时间的延长而增加,微波辐射时间在 30 min 时,提取率最高,当辐射时间大于 30 min 时,多糖提取率反而下降;微波辐射时间分别为 10、20、30、40、50 min 时,多糖提取率分别为 1.39%、1.42%、1.53%、1.51%、1.48%。这可能是因为多糖热稳定性较差,随微波辐射时间延长,部分多糖变性,使多糖提取率降低。因此,确定适宜的微波辐射时间为 30 min。

2.1.4 浸泡时间对多糖提取的影响 称取预处理人工种植金莲花 1.00 g 各 5 份,固定微波辐射功率 400 W、液料比 1 : 20、微波辐射时间 30 min,浸泡时间分别是 20、40、60、80、100 min 进行多糖提取。结果表明,多糖提取率随浸泡时间的延长而增加,但当浸泡时间大于 60 min 时,随浸泡时间的延长,提取率增大明显趋于缓慢;浸泡时间分别是 20、40、60、80、100 min 时,多糖提取率分别为 0.73%、1.08%、1.86%、1.87%、1.89%。为节约时间,确定适宜浸泡时间为 60 min。

2.2 多因素正交试验对金莲花多糖提取的影响

根据单因素试验结果,采用 3 水平 4 因素 $L_{16}(3^4)$ 正交试验设计(表 1),确定金莲花多糖提取最优提取工艺。结果由

表 2 可见,影响金莲花多糖提取的主要因素是微波辐射时间,各因素影响大小依次为 $C > B > D > A$,即微波辐射时间 > 微波辐射功率 > 浸泡时间 > 料液比;结合单因素试验结果,确定最佳多糖提取工艺条件为 $A_2B_3C_2D_2$,即料液比 1 g : 20 mL、微波功率 400 W、微波时间 30 min、浸泡时间 60 min。

表 1 金莲花多糖提取正交试验因素和水平				
水平	A:料液比 (g : mL)	B:微波功率 (W)	C:微波时间 (min)	D:浸泡时间 (min)
1	1 : 15	350	20	40
2	1 : 20	400	30	60
3	1 : 25	450	40	80

表 2 金莲花多糖提取正交试验结果					
编号	因素				多糖含量 (%)
	A:料液比	B:微波功率	C:微波时间	D:浸泡时间	
1	1	1	3	2	1.51
2	2	1	1	1	1.71
3	3	1	2	3	2.01
4	1	2	2	1	1.89
5	2	2	3	3	1.61
6	3	2	1	2	1.74
7	1	3	1	3	1.93
8	2	3	2	2	2.53
9	3	3	3	1	1.53
K_1	5.33	5.23	5.38	5.13	
K_2	5.85	5.24	6.43	5.78	
K_3	5.28	5.99	4.65	5.55	
k_1	1.78	1.74	1.79	1.71	
k_2	1.95	1.75	2.14	1.93	
k_3	1.76	2.00	1.55	1.85	
R	0.19	0.26	0.59	0.22	

由表 3 可见,微波辐射下提取金莲花多糖的主要影响因素是微波辐射时间,微波功率、料液比和浸泡时间对多糖的提取无显著影响。因此,提取过程中应严格控制微波辐射时间,浸泡时间可适当缩短。

表 3 金莲花多糖提取正交试验结果方差分析					
方差来源	偏差平方和(S)	自由度(f)	F	$F_{0.2}(2,2)$	$F_{0.1}(2,2)$
料液比(A)	0.07	2	1.00	4	9
微波功率(B)	0.13	2	1.86	4	9
微波时间(C)	0.54	2	7.71	4	9
浸泡时间(D)	0.08	2	1.14	4	9
误差	0.07	2			

2.3 验证试验

取适量粉碎后的金莲花,在正交试验所得优化提取工艺条件下进行验证试验,得到多糖提取率为 2.53%($n=3$)。

2.4 不同产地金莲花与人工种植金莲花多糖含量比较

金莲花在我国主要分布于河北、山西、内蒙古、新疆、四川、云南、东北、陕西、甘肃、青海等省(区),山西、河北是传统的金莲花道地产地和栽培地^[9]。从宁夏明德中药饮片有限公司购买河北承德、山西五台山、内蒙古赤峰、长白山产的野生金莲花,在优化提取工艺条件下进行提取,得到多糖提取率

白小军,吴 燕,牛 艳,等. 玉米中乙草胺和莠去津残留量 GC-MS/MS 分析法的建立[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):334-336.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.119

玉米中乙草胺和莠去津残留量 GC-MS/MS 分析法的建立

白小军,吴 燕,牛 艳,赵子丹,王晓菁

(宁夏农林科学院,宁夏银川 750002)

摘要:为准确分析玉米中乙草胺、莠去津的残留量,建立试样用乙酸乙酯-石油醚(1:1,V/V)提取、弗罗里硅土柱净化、正己烷定容后,通过 GC-MS/MS(EI 源)测定,采用面积外标法定量检测。结果表明,乙草胺平均回收率为 75.1%~87.3%,相对标准偏差为 1.7%~8.5%;莠去津平均回收率为 73.5%~80.5%,相对标准偏差为 1.9%~5.6%;方法快速准确。

关键词:玉米;乙草胺;莠去津;残留量;气质联用仪;优化测定方法

中图分类号: TQ450.2⁺63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0334-03

乙草胺是一种选择性芽前处理除草剂,属内吸性农药,施药后经单子叶植物的胚芽鞘或双子叶植物的下胚轴吸收后向上传导,通过阻碍蛋白质合成而抑制细胞生长,使杂草幼芽、幼根生长停止,进而死亡,用于防治一年生禾本科杂草和部分小粒种子的阔叶杂草。莠去津是一种选择性苗前、苗后封闭性除草剂,属内吸性农药,施药后被植物根部吸收,然后在植

物体内传导,抑制杂草的光合作用,导致枯死,用于防治一年生禾本科杂草和阔叶杂草。乙草胺和莠去津均为我国运用较广泛的除草剂,为了全面评价乙草胺、莠去津 2 种农药的环境效应,指导其科学合理使用,开发乙草胺、莠去津的残留分析方法显得十分重要^[1-2]。目前,国内外分析方法主要有 GC-NPD、GC-ECD、GC/MS、HPLC、LC/MS 测定莠去津残留量^[3-8],GC-ECD、GC/MS 测定乙草胺残留量^[9-13],然而对于玉米中乙草胺、莠去津残留量用 GC-MS/MS 同时测定还未见报道。本研究建立了以乙酸乙酯/石油醚为提取剂,经硅镁型固相柱净化,采用 GC-MS/MS(EI 源)测定玉米中乙草胺和莠去津残留量的分析方法,与现有方法相比,操作简单快速、测定准确、精密度高。

收稿日期:2013-12-03

基金项目:农业部农药残留课题资助项目(编号:2011H220)。

作者简介:白小军(1972—),男,宁夏固原人,副研究员,主要从事植物保护方面的研究。E-mail:nxnkybxj@163.com。

通信作者:吴 燕,实验师,主要从事农产品质量监测相关研究。

E-mail:wfsnow_1985@163.com。

分别为 2.71%、2.62%、2.54%、2.48%($n=3$),与宁夏隆德人工种植的金莲花多糖提取率没有显著性差异。

3 结论

利用直观法分析微波辐射下提取金莲花多糖,影响因素大小依次为微波辐射时间>微波辐射功率>浸泡时间>料液比,金莲花多糖提取最佳工艺条件为料液比 1:20、微波辐射功率 400 W、微波辐射时间 30 min、浸泡时间 60 min。

与河北、山西、内蒙古、长白山产野生金莲花多糖含量比较,宁夏隆德西北中药材有限公司人工种植的金莲花多糖含量与野生差异不大,完全能满足药用。不过,影响金莲花多糖含量的因素比较多,除人工种植与野生栽培方式能引起多糖含量差异之外,可能还与产地气候、采摘时间、土壤养分等因素有关。

参考文献:

[1] Lee B C, Bae J T, Pyo H B, et al. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(5): 574-581.

[2] Du X J, Zhang J S, Yang Y, et al. Purification, chemical modification and immunostimulating activity of polysaccharides from *Tremella aurantialba* fruit bodies [J]. Journal of Zhejiang University - Science B, 2010, 11(6): 437-442.

[3] (清) 赵学敏, 闫 冰. 本草纲目拾遗[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 256.

[4] 刘召阳, 罗都强. 金莲花的化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 370-373.

[5] 张丽娟, 张贵君, 李仁伟. 金莲花蛋白超声提取工艺优化及其抑菌活性的初步测定[J]. 天津中医药, 2007, 24(1): 63-65.

[6] 朱登祥, 安 芳, 王书华. 牡荆苷对人食管癌 EC-109 细胞生长及凋亡的影响[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1781-1784.

[7] An F, Yang G D, Tian J M, et al. Antioxidant effects of the orientin and vetixin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice [J]. Neural Regeneration Research, 2012, 7(33): 2565-2575.

[8] 梁永锋. 金莲花中绿原酸提取工艺的优化及其含量比较[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(21): 5296-5298, 5302.

[9] 梁永锋. 不同产地野生与人工种植金莲花黄酮含量的比较及提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 253-255.

[10] 董钰明, 唐兴文, 张树江, 等. 红毛五加多糖的含量测定条件和提取工艺优选[J]. 中南药学, 2006, 4(2): 86-88.