

正交试验优化文蛤水溶性多糖的水提醇沉工艺

陈丽叶, 王令充, 吴皓*, 程建明, 刘睿, 柴尧, 彭九嫚, 冯子芳, 程颖
(南京中医药大学 江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室,
江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] 目的: 优选文蛤水溶性多糖的水提醇沉工艺, 为该有效部位的保健品开发提供实验依据。方法: 采用蒽酮-硫酸法测定水溶性多糖的含量, 检测波长 625 nm。以水溶性多糖转移率为指标, 通过单因素试验考察提取溶剂 pH 及绞碎程度对文蛤水溶性多糖转移率的影响。以水溶性多糖转移率为指标, 通过正交试验考察加水量、提取时间、提取次数对文蛤水溶性多糖水提工艺的影响。以水溶性多糖得率及质量分数的综合评分为指标, 通过正交试验考察浓缩程度、醇沉浓度、醇沉时间对文蛤水溶性多糖醇沉工艺的影响。结果: 文蛤水溶性多糖的最佳水提工艺为加 3 倍水煎煮 3 次, 每次 40 min, 水提液浓缩至原料的 1/2, 加乙醇醇沉至体积分数达 80%, 醇沉 12 h, 抽滤, 60 °C 减压干燥。文蛤水溶性多糖得率 7.71%, 质量分数 42.53%。结论: 优选的文蛤水溶性多糖水提醇沉工艺稳定可行, 可兼顾该有效部位的得率和纯度, 为该部位的研究与开发提供参考。

[关键词] 文蛤; 总多糖; 蒽酮-硫酸法; 转移率

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0018-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050018

Optimization of Extraction Technology and Alcohol Precipitation Process for Water-soluble Polysaccharides in *Meretrix meretrix* by Orthogonal Test

CHEN Li-ye, WANG Ling-chong, WU Hao*, CHENG Jian-ming, LIU Rui,
CHAI Yao, PENG Jiu-man, FENG Zi-fang, CHENG Ying
(*Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization,
Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-resource Pharmaceutics,
Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology and alcohol precipitation process of water-soluble polysaccharides from *Meretrix meretrix*, and provide experimental evidence for health products development of this effective part. **Method:** Content of water-soluble polysaccharides was determined by anthrone-sulfuric acid method at 625 nm. Water-soluble polysaccharides was isolated by water extracting alcohol precipitating method, taking yield, transfer rate and content of polysaccharides as indexes, process conditions were optimized by orthogonal test and single factor test. **Result:** Optimum process conditions for water-soluble polysaccharides were as followings: extracted thrice with 3 times the amount of water at 80 °C, 40 min for each time, extract concentrated to half of raw material, added ethanol to volume fraction of 80%, alcohol precipitation for 12 hours, dried at 60 °C. Under these conditions, average yield of water-soluble polysaccharides was 7.71% and its average content was 42.53%. **Conclusion:** This optimized technology is stable and feasible with high extracting rate and

[收稿日期] 20150708(017)

[基金项目] 国家公益性行业专项(201305007, 201405017); 国家高新技术研究发展计划(863 计划)项目(2013AA093003); 江苏高校优势学科建设项目(PAPD)

[第一作者] 陈丽叶, 在读硕士, 从事中药学研究, Tel: 18351895022, E-mail: 1169964043@qq.com

[通讯作者] * 吴皓, 博士生导师, 从事中药炮制学及海洋药物研究, Tel: 025-85811206, E-mail: whao5795@vip.sina.com

transfer rate of water-soluble polysaccharides in *M. meretrix*, it can balance purity and extracting rate of this effective part.

[**Key words**] *Meretrix meretrix*; total polysaccharides; anthrone-sulfuric acid method; transfer rate

文蛤又名海蛤、圆蛤、紫蛤、黄蛤等,隶属于软体动物门,双壳纲,真瓣鳃目,帘蛤科,文蛤属^[1]。广泛分布于我国南、北沿海滩涂^[2]。《中华海洋本草》中记载文蛤“肉味咸,性平,归胃,肺经,主治消渴,口渴烦热,咳逆胸痹,痰核,盗汗,癭瘤,瘰疬,崩漏,痔漏”^[3]。近现代研究是以软体为主,含有大分子的蛋白、多肽、多糖等成分,以及小分子核苷、不饱和脂肪酸[二十二碳六烯酸(DHA),二十碳五烯酸(EPA)]等成分^[4]。其中多糖类成分具有抗肿瘤、免疫调节^[4]、抗氧化^[5]、降血糖、降血脂^[6]等药理作用。文蛤水溶性总多糖提取工艺尚未见报道,本实验以文蛤水溶性多糖得率、质量分数及转移率为评价指标,通过正交试验优选文蛤水溶性多糖的提取工艺和醇沉工艺,为该有效部位保健食品的开发提供实验依据。

1 材料

DW-2 型调温电热器(南通市通州申通电热器厂),BT 125D 型电子分析天平(德国塞多利斯公司),STP FA2004 型电子分析天平(上海上平仪器有限公司),Unique-s15 型超纯水系统(北京佰亿新创科技有限公司),PB-10 型 pH 计[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],202 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),BioMate 3S 型紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),R-210 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司)。

文蛤软体(江苏省海洋水产研究所,经江苏省海洋水产研究所万夕和研究员鉴定为帘蛤科贝类文蛤 *Meretrix meretrix* 的新鲜软体部分,批号 20140718),D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 > 99.5%,批号 110833-201205),95% 乙醇(南京鹏程化玻仪器有限公司),硫酸(上海凌峰化学试剂有限公司),蒽酮(国药集团化学试剂有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 水溶性多糖的含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取烘干的文蛤水溶性多糖 50 mg,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加水 250 mL,超声(300 W,40 kHz)使溶解,放至室温,补足,混匀,精密移取 6.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,备用,即得。

2.1.2 显色反应^[6-7] 取供试品溶液 1 mL,加入蒽酮-硫酸溶液 4 mL,混匀,冰水浴 5 min,沸水浴 15 min,冰水浴 10 min。

2.1.3 显色剂中硫酸浓度考察 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,平行 7 份。称取蒽酮 0.2 g,共 3 份,分别加入浓硫酸,85% 硫酸和 80% 硫酸 100 mL,按 2.1.2 项下方法进行显色反应,6 份做重复性试验,1 份做精密密度试验,结果重复性的 RSD 2.0%,1.3%,0.7%,精密度的 RSD 分别为 0.9%,0.6%,0.3%,故选择 80% 硫酸配制 0.2% 蒽酮-硫酸溶液。

2.1.4 精密密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1.2 项下方法进行显色反应,于 625 nm 处连续测定 6 次吸光度 *A*,计算水溶性多糖含量的 RSD 0.3%。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0,0.5,1,2,4,8,12,24 h 按 2.1.2 项下方法显色,分别于 625 nm 下测定 *A*,计算 RSD 1.3%,表明供试品溶液在 1 d 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1.2 项下方法显色,分别于 625 nm 处测定 *A*,计算水溶性多糖含量的 RSD 0.7%。

2.1.7 线性试验 精密称取 D-无水葡萄糖对照品 105.16 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,精密吸取 10 mL 置 100 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,精密吸取该溶液 0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,配成 0.005,0.01,0.02,0.04,0.08 g·L⁻¹ 的系列对照品溶液,每个质量浓度平行 3 份,按 2.1.2 项下方法显色,以 *A* 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 8.7838X + 0.0004$ ($r = 0.9999$),线性范围 0.005 ~ 0.08 g·L⁻¹。

2.1.8 加样回收率试验 精密称定文蛤水溶性多糖 25 mg,共 9 份,分别按 50%,100%,150% 比例加入 1.025 g·L⁻¹ 葡萄糖对照品溶液,按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.2 项下方法显色,于 625 nm 处测定 *A*,计算平均加样回收率 99.19%,RSD 1.9%,表明该方法准确可靠。

2.2 文蛤软体水溶性多糖的测定 称取文蛤软体(沥干)100 g 匀浆,加 4 倍量水煎煮 5 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至 100 mL,离心(3000 r·min⁻¹,10 min,下同),取上清液,加乙醇至醇含量为

80%，静置 12 h，抽滤，得沉淀，烘干，得文蛤软体水溶性多糖，称重，按 2.1 项下方法测定，结果每 100 g 文蛤软体含水溶性多糖质量平均值 1.8 g (RSD 1.2%)。

2.3 提取工艺路线优化^[8-9]

2.3.1 绞碎程度考察 称取文蛤软体(沥干)100 g，共 4 份，分别加入 4 倍量水，1 份绞碎，煎煮 2 次，每次 1 h；1 份切碎，煎煮 2 次，每次 1 h；1 份不处理，煎煮 2 次，每次 1 h；1 份不做处理，煎煮 3 次，每次 1 h，计算水溶性多糖的转移率分别为 92.78%，90.00%，84.44%，90.75%，从制备工艺的简化方面考虑，选取不做处理，增加煎煮次数。

2.3.2 提取液 pH 考察 称取文蛤软体(沥干)100 g，共 3 份，分别加入 4 倍量水，pH 分别为 5.5, 7.0, 8.5，煎煮 2 次，每次 60 min，合并滤液，减压浓缩至 100 mL，离心，加乙醇醇沉至体积分数 80%，抽滤，烘干，称定质量，按 2.1 项下方法进行含量测定。计算总多糖转移率分别为 82.22%，83.89%，80.00%，表明水提有助于文蛤水溶性多糖的提取。水溶性总多糖转移率 = 水溶性多糖得率 × 水溶性多糖质量分数 / 文蛤总多糖质量 × 100%。

2.4 正交试验优选水提工艺^[10-11] 以水溶性多糖转移率为指标，选择加水量、提取时间、提取次数为考察因素，在单因素试验基础上，每个因素选取 3 个水平。准确称取文蛤软体(沥干)100 g，共 9 份，按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，滤过，合并滤液，浓缩至 100 mL，离心，加乙醇使醇含量达 80%，静置 12 h，抽滤，得沉淀，烘干。试验安排及结果见表 1，方差分析见表 2。由直观分析可知，各因素对水溶性多糖转移率的影响顺序为 $C > B > A$ ，方差分析表明因素 C 对试验结果具有显著性影响，确定文蛤水溶性多糖水提工艺为 $A_2B_2C_3$ ，即加 3 倍量水煎煮 3 次，每次 40 min。

表 1 文蛤水溶性多糖水提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extracting process for water-soluble polysaccharides in *Meretrix meretrix*

No.	A 加水量 /倍	B 提取时间 /min	C 提取数 /次	D(空白)	水溶性多糖 转移率/%
1	1	20	1	1	54.94
2	1	40	2	2	78.17
3	1	60	3	3	84.53
4	3	20	2	3	76.40
5	3	40	3	1	90.10
6	3	60	1	2	63.04
7	4	20	3	2	84.35
8	4	40	1	3	62.35
9	4	60	2	1	82.85

表 2 文蛤水溶性多糖转移率方差分析

Table 2 Variance analysis of transfer rate of water-soluble polysaccharides in *Meretrix meretrix*

方差来源	SS	F	P
A	31.495	8.892	>0.05
B	48.880	13.800	>0.05
C	1 101.103	310.870	<0.01
D(误差)	3.54		

注： $F_{0.05}(2,2) = 19$ ， $F_{0.01}(2,2) = 99$ (表 4 同)。

2.5 离心转速考察 称取文蛤软体(沥干)100 g，共 5 份，加 3 倍水煎煮 3 次，每次 40 min，浓缩至原料的 1/2，分别于 3 000, 5 000, 8 000, 10 000, 14 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min，加乙醇醇沉至体积分数 80%，抽滤，得沉淀，烘干，计算水溶性多糖质量分数分别为 38.21%，39.34%，42.59%，42.61%，39.21%，得率分别为 8.81%，8.41%，7.61%，7.29%，6.46%。综合考虑，选取离心转速 8 000 $r \cdot \min^{-1}$ 。

2.6 正交试验优选醇沉工艺 以水溶性多糖质量分数及得率的综合评分为指标，权重系数均为 0.5。选择浓缩程度、醇沉浓度及醇沉时间作为考察因素^[12]，每个因素选取 3 个水平。准确称取文蛤软体(沥干)100 g，共 9 份，按优选的工艺条件水提，滤过，合并滤液，按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，试验安排及结果见表 3，方差分析见表 4。由直观分析可知，各因素对综合评分的影响顺序为 $B > A > C$ 。方差分析表表明因素 A, B 对醇沉工艺具有显著性影响，综合分析，确定文蛤水溶性多糖最佳醇沉工艺为 $A_2B_3C_2$ ，即水提液浓缩至 1/2，加乙醇使含醇量达 80%，醇沉时间 12 h。

2.7 干燥方式考察 称取文蛤软体(沥干)100 g，共 4 份，加入 3 倍量水煎煮 3 次，每次 40 min，减压浓缩至 50 mL，于 8 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min，醇沉至乙醇体积分数达 80%，静置 12 h，抽滤，得沉淀，分别放入常压 60, 80, 100 °C 及减压 60 °C 烘箱中，结果得率相差不大，水溶性多糖质量分数依次为 42.02%，37.74%，20.91%，42.54%，所需的烘干时间为 24, 12, 6, 12 h，结果表明减压 60 °C 干燥的效果最好。

2.8 验证试验 称取文蛤软体(沥干)2 kg，按优选的工艺条件进行水提，滤过，合并滤液浓缩至 1 L，按优选的工艺进行醇沉，抽滤，取沉淀，60 °C 减压烘干，称重，结果文蛤水溶性多糖平均得率 7.71% (RSD 3.5%)，平均质量分数 42.53% (RSD 2.7%)，说明优化的水提醇沉工艺稳定可行。

3 讨论

测定总多糖含量常选用蒽酮-硫酸法及苯酚硫

表 3 文蛤水溶性多糖醇沉工艺正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis of alcohol precipitation process for water-soluble polysaccharides in *Meretrix meretrix*

No.	A 浓缩程度/mL	B 醇沉体积分数/%	C 醇沉时间/h	D(空白)	水溶性多糖		综合评分
					质量分数/%	得率/%	
1	1	60	6	1	53.35	4.46	75.93
2	1	70	12	2	52.38	5.23	79.50
3	1	80	24	3	48.75	6.27	82.14
4	1/2	60	24	3	45.66	6.40	80.00
5	1/2	70	6	1	48.59	6.22	81.70
6	1/2	80	12	2	42.75	7.58	84.14
7	1/3	60	12	2	39.69	6.30	73.83
8	1/3	70	24	3	36.16	7.06	74.94
9	1/3	80	6	1	33.31	8.60	81.22

表 4 综合评分方差分析

Table 4 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	F	P
A	41.897	72.612	<0.05
B	53.829	93.291	<0.05
C	5.442	9.432	>0.05
D(误差)	0.58		

酸法,考虑到苯酚存在一定毒性,且蒽酮硫酸法比较稳定,故本文选择了蒽酮硫酸法。预试验对蒽酮硫酸法测定总多糖含量的条件进行了优化,比较了不同体积分数硫酸(100%,85%,80%),结果发现80%硫酸的稳定性及精密度都较好,同时从节约硫酸的角度考虑,故选择硫酸体积分数80%。

实验室前期利用水提液中总多糖计算转移率,但水提液中除了含有相对分子质量大的多糖类成分之外,还含有相对分子质量较小的寡糖及单糖,结果可能存在一定误差,故本文采用醇沉工艺除去小分子的单糖及寡糖,可更准确地反应文蛤水溶性多糖的提取率。试验还考察了离心转速对总多糖得率及质量分数的影响,文蛤水提液中有多糖、蛋白等杂质,转速低,不能使杂质离心沉淀下来,但转速过高,会使大量多糖类成分损失,质量分数下降,因此,转速不宜过高,应控制在 $<14\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在醇沉工艺的正交试验中,若以文蛤水溶性多糖的质量分数为指标,则结果得率低且乙醇用量较大,而若以文蛤水溶性多糖得率为指标,则总多糖质量分数较低,故本文选用文蛤水溶性多糖的质量分数及得率的综合评分为指标,以得到较合理的实验结果。

[参考文献]

[1] 张安国,李太武,苏秀榕,等.文蛤养殖现状及展望[J].水产科学,2005,24(2):31-33.
[2] 宋文涛.文蛤的养殖和研究现状[J].山东工业技术,

2013(11):246.

[3] 管华诗,王曙光.中华海洋本草[M].上海:上海科学技术出版社,2009:397.
[4] 陆杰霖,柴尧,贾梦蛟,等.四角蛤蜊、菲律宾蛤仔及文蛤水提醇沉上清液中相关核苷类物质的含量测定[J].南京中医药大学学报,2014,30(1):76-78.
[4] 张铂,吴梧桐.抗肿瘤文蛤糖肽(MGP0405)的分离纯化及性质研究[J].中国天然药物,2006,4(3):230-233.
[5] Schmeer M R. Growth-inhibiting agents from *Mercenaria* extracts: chemical and biological properties[J]. Science, 1964,144(3617):413-414.
[6] 罗忠圣,黄秀平,周镁,等.海拔高度对黔产太子参总多糖含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(10):39-42.
[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:175.
[8] Zeid A H A, Aboutabl E A, Sleem A A, et al. Water soluble polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities [J]. Carbohydr Polym, 2014, 113: 62-66.
[9] 刘筱潇,孙颖颖,管习超,等.3种海洋微藻多糖提取工艺的研究[J].海洋通报,2010,29(5):534-539.
[10] 元玲刚,常明昌,刘靖宇,等.北虫草多糖提取工艺优化及抗氧化作用研究[J].中国农学通报,2015,31(19):144-148.
[11] 金燕,吴皓,常念,等.四角蛤蜊多糖的提取工艺与单糖组分研究[J].中华中医药学刊,2010,28(3):479-481.
[12] 陈凯,郭丽冰,王计长,等.六味地黄生物制剂总多糖的精制工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(10):1-4.

[责任编辑 刘德文]