

牡丹花蕊多糖三相分离纯化及其理化性质
Study on the purification of polysaccharide from *Peony Stamen*
by three phase partitioning and physicochemical property

罗磊¹ 薛依涵¹ 杨永庆² 朱文学¹

LUO Lei¹ XUE Yi-han¹ YANG Yong-qing² ZHU Wen-xue¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 洛阳牡丹生物科技研究院, 河南 洛阳 471023)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. Luoyang Peony Biological Science and Technology Research Institute, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:采用三相分离法纯化牡丹花蕊多糖, 并对其理化性质进行分析。结果表明, 纯化的最优条件是 pH 7、硫酸铵质量分数 10%、叔丁醇与提取液体积比为 2.0, 该条件下多糖回收率为 69%, 蛋白质去除率为 73%, 纯化后多糖纯度为 99.24%, 色素清除率为 95.36%; PMP 柱前衍生化高效液相色谱(PMP-HPLC)分析表明, 牡丹花蕊多糖的单糖组成为鼠里糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖, 其摩尔比为 1.24 : 1.59 : 2.00 : 9.11 : 1.68; 傅立叶红外变换光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FR-IR)与氢核磁共振波谱(¹H nuclear magnetic resonance, ¹H NMR)结果表明, 牡丹花蕊多糖是一种以半乳吡喃糖为主的酸性多糖, 并且同时存在 α -构型和 β -构型, 以 β -构型为主。

关键词:牡丹花蕊; 多糖; 三相分离法; 理化性质

Abstract: Three phase partitioning was used to purify the polysaccharide from peony stamen and its physicochemical properties were analyzed. The optimal conditions of purification were obtained as follows: pH 7, ammonium sulfate concentration(w/v) 10% and ratio of t-butyl alcohol/crude extract(v/v). Under this condition, the polysaccharide recovery was 69% and the protein removal rate was 73%. The purity rate of the purified polysaccharide was 99.24%, and 95.36% pigment was removed by three phase partitioning. The Result of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that it was composed of rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose, and the molar ratio was 1.24 : 1.59 : 2.00 : 9.11 : 1.68. The results of the Fourier transform infrared spectroscopy (FR-IR) and ¹H nuclear magnetic resonance

(¹H NMR) showed that the polysaccharide from peony stamen was an acidic polysaccharide mainly composed of galacto-pyranose, and there are both α - and β -configuration, in which β -configuration accounted for a large proportion.

Keywords: *Peony Stamens*; polysaccharide; three phase partitioning; physicochemical property

牡丹花蕊为牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr)的组成部分, 呈黄色小石榴状, 含有丰富的碳水化合物、蛋白质、不饱和脂肪酸、氨基酸和维生素等营养成分^[1], 丹凤牡丹于 2013 年被中国国家计生委列为一种新食品原料。作为种子植物产生花粉的器官, 牡丹花蕊具有降血脂、降血糖和抗氧化等功效^[2]。但是作为牡丹资源大国, 中国对牡丹花蕊的研究主要集中在营养成分分析和产品开发上^[3-4], 缺乏对牡丹花蕊中有效成分的提取纯化和化学结构的深入研究。

三相分离法是通过在粗提物中加入一定比例的有机溶剂和盐而使体系分成明显的三相, 即色素、脂质和疏水物质集中的上层相, 蛋白质和细胞质集中的中间层, 糖类等极性成分集中的下层相^[5-8]。三相分离法应用了传统盐析、共溶剂、等离子体和蛋白质渗透沉淀等多种原理^[9-10], 最近几年才被用到多糖的分离纯化当中。Yan 等^[11]采用三相分离法对河蚌多糖进行了分离纯化, 得到良好的纯化效果。

本试验拟采用三相分离法纯化牡丹花蕊多糖, 并对所得多糖的理化性质进行分析, 为三相分离体系在多糖纯化方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

新鲜牡丹花蕊: 丹凤, 采自洛阳牡丹园;

叔丁醇、硫酸铵、无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、乙二胺四乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙腈、牛血清蛋白、考马斯亮蓝

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:182102110140); 河南省高校科技创新团队计划(编号:17IRTSTHN016)

作者简介:罗磊, 男, 河南科技大学教授, 博士。

通信作者:朱文学(1976—), 男, 河南科技大学教授, 博士。

E-mail: zwx@haust.edu.cn

收稿日期:2018-04-09

G-250、苯酚、硫酸、溴化钾、氘代水等:分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

- 旋转蒸发仪:RE-52A 型,上海亚荣有限公司;
- 真空冷冻干燥机:LGJ-10 型,北京松原华兴生物技术有限公司;
- 磁力加热搅拌器:78-1 型,金坛市晶玻实验仪器厂;
- 精密 pH 计:PHS-3C 型,上海越平科学仪器有限公司;
- 紫外-可见分光光度计:UV2400 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;
- 台式高速离心机:TDZ5-WS 型,湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司;
- 傅立叶红外变换光谱仪:TENSPD27 型,德国 NRVKER 公司;
- 核磁共振波谱仪:AVANCE III HD400 型,瑞士布鲁克公司。

1.2 方法

1.2.1 牡丹花蕊粗多糖提取方法 称取脱脂牡丹花蕊粉末 5 g,按照料液比 1 : 25 (g/mL)加入蒸馏水,在超声功率 120 W,超声时间 64 min 条件下超声辅助提取,将浸提液 5 000 r/min 离心 20 min,取上清液即为粗糖液,4 ℃ 冻藏备用。

1.2.2 三相分离法纯化牡丹花蕊多糖 取一定体积粗糖液,1 000 r/min 搅拌下缓慢加入一定质量分数硫酸铵,待硫酸铵固体完全溶解后调 pH 至一定值(用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调节),随后按一定比例加入叔丁醇,快速混匀,将混合液在 30 ℃^[12]条件下静置一定时间,为确保完全分离,将混合物于 5 000 r/min 离心 20 min,以形成澄清的三相。收集上层有机相(叔丁醇)减压蒸发回收,弃去中层沉淀(游离蛋白质),收集下层混合液(主要由硫酸铵和多糖组成),用移液管移出。将得到的下层溶液进一步采用截留分子量为 8 000~14 000 U 的透析袋于蒸馏水中透析 24~36 h,除去硫酸铵,随后将透析袋内提取液移出,浓缩并冷冻干燥,得到纯化牡丹花蕊多糖。

1.2.3 三相分离法纯化单因素试验

- (1) pH 值:固定提取液与叔丁醇体积比 1 : 1,硫酸铵质量分数 20%,提取时间 60 min,考察不同 pH(3,4,5,6,7)对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响。
- (2) 硫酸铵质量分数:在 pH 为 6 的最优条件下,固定提取液与叔丁醇体积比 1 : 1,提取时间 60 min,考察不同硫酸铵质量分数(10%,20%,30%,40%,50%)对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响。
- (3) 体积比:在 pH 为 6、硫酸铵质量分数为 20%的最优条件下,固定提取时间 60 min,考察不同提取液与叔丁醇体积比(1 : 0.5,1 : 1.0,1 : 1.5,1 : 2.0,1 : 2.5)对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响。
- (4) 提取时间:在 pH 为 6、硫酸铵质量分数为 20%、提取液与叔丁醇体积比为 1 : 1.5 的最优条件下,考察不同提取时间(10,30,50,70,90 min)对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响。

1.2.4 多糖回收率测定 采用苯酚—硫酸法^[13],制作葡萄糖标准曲线,在 490 nm 处测定样品吸光度,计算纯化前后样品中多糖含量,按式(1)计算多糖回收率。

$$M = \frac{A_1}{A_2} \times 100\%,$$

(1)

- 式中:
- M——多糖回收率,%;
- A₁——纯化后提取液中多糖含量,g;
- A₂——粗提液中多糖含量,g。

1.2.5 蛋白质去除率测定 采用考马斯亮蓝比色法^[14],制作牛血清蛋白标准曲线,在 595 nm 处测定样品吸光度,分别计算样品中蛋白质含量,按式(2)计算蛋白质去除率。

$$N = (1 - \frac{B_1}{B_2}) \times 100\%,$$

(2)

- 式中:
- N——蛋白质去除率,%;
- B₁——纯化后提取液中蛋白质含量,g;
- B₂——粗提液中蛋白质含量,g。

1.2.6 色素清除率 色素的种类繁多且结构复杂,在色素的测定上暂无确定的方法。根据文献[15]修改如下,将原始粗提液在各个波长下扫描均无特征吸收峰(蛋白质特征吸收峰除外),因此将原始粗提液色素浓度定为 100%,将粗提液稀释不同倍数,选择 360,380,400,420,440,460 nm 为扫描波长,分别测定吸光度值,选择线性拟合最佳的波长作为测定波长,按式(3)计算脱色率。

$$P = \frac{a \times C_1 \times V_1 - b \times C_2 \times V_2}{C_1 \times V_1} \times 100\%,$$

(3)

- 式中:
- P——色素清除率,%;
- a、b——稀释倍数;
- C₁——粗提取液吸光度;
- C₂——透析液吸光度;
- V₁——粗提取液体积,mL;
- V₂——透析液体积,mL。

1.2.7 牡丹花蕊多糖紫外光谱分析 将三相分离法纯后的多糖用蒸馏水配成一定浓度的多糖溶液,在 200~500 nm 内扫描,测量样品紫外吸收光谱,观察在 190~210 nm 以及 260,280 nm 处有无多糖、核酸以及蛋白质等物质的特征吸收峰。

1.2.8 牡丹花蕊多糖单糖组分分析 多糖样品的单糖组成分析根据文献[16]的 PMP 柱前衍生化法,将多糖样品酸水解,然后对水解后的多糖和单糖标准品进行 PMP 衍生化,进行高效液相色谱检测。根据出峰时间以及标准曲线可得出多糖样品各个单糖组分和摩尔比。

1.2.9 牡丹花蕊多糖红外光谱分析 牡丹花蕊多糖的结构及主要官能团采用傅里叶红外光谱法进行分析。采用溴化钾压片法^[17],取牡丹花蕊多糖纯品适量,与溴化钾在体积比为 1 : 100 条件下混匀压片,在 450~4 000 cm⁻¹内扫描,以溴化钾为空白。

1.2.10 牡丹花蕊多糖核磁共振波谱分析 将一定量干燥牡丹花蕊多糖纯品用一定体积氘代水溶解,真空冷冻干燥,重复置换 3 次,将多糖中的轻水置换^[18]。将置换后的多糖样品用氘代水配置成 20~30 mg/mL 溶液,至于核磁管中,在 400 Hz 条件下进行一维核磁共振氢谱测定。

2 结果与分析

2.1 三相分离纯化

2.1.1 pH 值对牡丹花蕊多糖回收率和蛋白质去除率的影响

在三相分离试验中,pH 常作为首先考虑因素。由图 1 可以看出,pH 值在 3~6 时,多糖回收率与蛋白质去除率都呈现上升的趋势,并在 pH 值为 6 时多糖回收率与蛋白质去除率同时达到最大值,呈现最佳的纯化效果。当 pH 值由 6 上升至 7 时,多糖的回收率呈略微下降的趋势,但是蛋白质的去除率明显下降。可能是当 pH 值达到蛋白质等电点附近时,蛋白质分子的正负电荷相等,溶解度最小,形成沉淀物,与蛋白质等电点沉淀方法类似^[19-20]。因此蛋白质在 pH 值为 6 时,蛋白质生成沉淀最多,即蛋白质去除率达到最佳值。

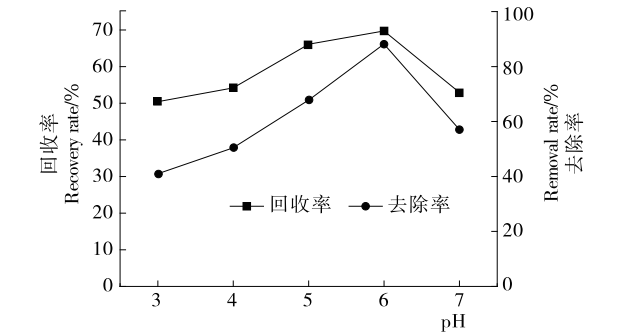


图 1 pH 值对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响
Figure 1 Effect of pH on recovery and protein removal of polysaccharide from peony stamen

2.1.2 硫酸铵质量分数对牡丹花蕊多糖回收率和蛋白质去除率的影响

在三相分离分配体系中,硫酸铵起到了破坏水化膜和中和电荷的作用^[21]。由图 2 可知,硫酸铵质量分数在 10%~50% 时,多糖回收率与蛋白质去除率都呈先增加后减小的趋势。当硫酸铵质量分数为 20% 时,多糖的回收率达到最大值,然而随着硫酸铵质量分数的持续增加,多糖与下层水分子之间形成的氢键网络减弱,网络被破坏,从而降低了萃取收率。同样,Tan 等^[22]报道了增加硫酸铵质量分数,会造成多糖提取效率的下降。在三相分离体系中蛋白质的去除,硫酸铵的主要作用是蛋白质盐析,在高浓度的硫酸铵溶液中,硫酸铵解离形成大量的 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} 离子,会结合大量的水分子,产生强烈的盐析效应,使蛋白质疏水沉淀。

2.1.3 提取液与叔丁醇体积比对牡丹花蕊多糖回收率和蛋白质去除率的影响 在三相分离体系中,叔丁醇和硫酸铵的量之间常常存在相互关系^[23]。从图 3 中可以看出,当提取液与叔丁醇体积比由 1:0.5 增加到 1:2.5 时,多糖回收率先增加后减少,当体积比为 1:1.5 时,多糖的回收率最大为 71.33%。同时,随着体积比的变化,蛋白质的去除率也呈先

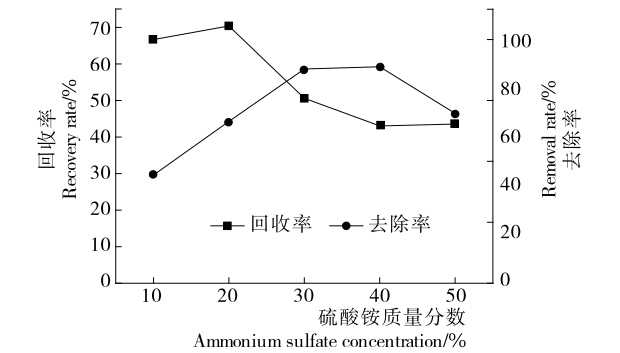


图 2 硫酸铵质量分数对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响
Figure 2 Effect of ammonium sulfate concentration on recovery and protein removal of polysaccharide from peony stamen

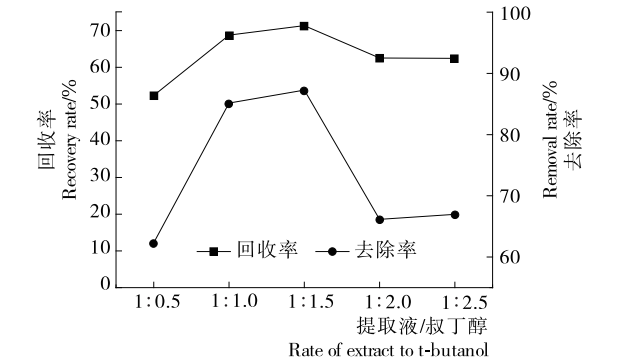


图 3 提取液与叔丁醇体积比对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响
Figure 3 Effect of rate of extract to t-butanol on recovery and protein removal of polysaccharide from peony stamen

增加后减小的趋势。这可能是较少量的叔丁醇不能够与硫酸铵起到协同作用^[11]。提取液与叔丁醇体积比较大时,过量的叔丁醇使多糖吸收了一定的水,导致无足够的水以完全水合硫酸根离子,同时水相与有机相的浓度增大可能导致回收率与去除率的减小^[24-25]。因此,提取液与叔丁醇体积比选为 1:1.5,该条件下多糖回收率最优且蛋白质去除率较高。

2.1.4 提取时间对牡丹花蕊多糖回收率和蛋白质去除率的影响

从图 4 可以看出,在 10~90 min 内,多糖回收率与蛋白质去除率大体上呈先增加后减小的趋势。萃取时间达到 50 min 时,多糖回收率达到最大值 71.99%。蛋白质去除率在 10~50 min 中有一定幅度的减小,随后在 50~70 min 时,蛋白质去除率不断增加,在 70 min 达到最大值。结果显示,时间在 50~70 min 时,三相分配体系中各因素相互平衡,多糖回收率与蛋白质去除率结果较优,因此选择 60 min 作为三相分离萃取时间。

2.1.5 三相分离法纯化正交试验设计

根据单因素试验结果,选取 pH 值、硫酸铵质量分数、粗提液与叔丁醇体积比为考察因素,选取 $L_9(3^4)$ 正交表用于优化三相分离法纯化牡丹

花蕊多糖粗提液的正交试验。

2.1.6 正交结果分析 正交试验极差分析采用加权综合评分法^[26]。本试验以三相分离法纯化后的牡丹花蕊多糖回收

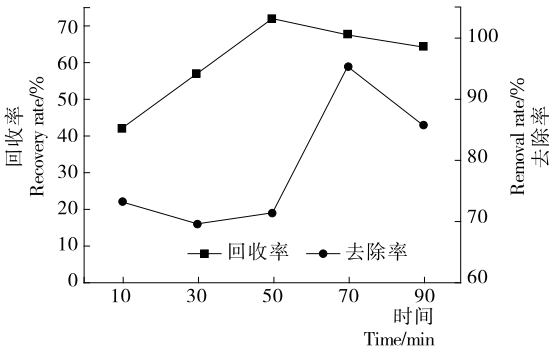


图 4 提取时间对牡丹花蕊多糖回收率与蛋白质去除率的影响

Figure 4 Effect of extraction time on recovery and protein removal of polysaccharide from peony stamen

率与蛋白质去除率为综合评价指标,以多糖回收率作为主要指标。多糖回收率权重为 0.7,蛋白质去除率权重为 0.3,消除两指标 y_1 和 y_2 量纲,计算加权综合评分值。

由表 2 可知,三相分离法纯化牡丹花蕊多糖的因素影响主次为体积比>pH 值>硫酸铵质量分数,较优组合为 pH 值 7、提取液与叔丁醇体积比 1:2 和硫酸铵质量分数为 10%。该条件下多糖回收率为 69%,蛋白质去除率为 73%。

由表 3 可知,因素 A、B 和 D 对综合指标的影响极显著,因此选取 $A_3B_3D_1$ 组合作为三相分离纯化的最优工艺。

表 1 正交试验因素水平编码表			
Table 1 Factor-level coding table of orthogonal expriment			
水平	A pH 值	B 叔丁醇/提取液 (体积比)	D 质量分数/%
1	5	1.0	10
2	6	1.5	20
3	7	2.0	30

表 2 正交试验结果极差分析							
Table 2 Result of orthogonal experiment range analysis							
处理号	A	B	C(空列)	D	y_1 多糖回收率/%	y_2 蛋白质去除率/%	综合评分
1	1	1	1	1	50	69	18.274
2	1	2	2	2	49	72	14.642
3	1	3	3	3	52	85	26.198
4	2	1	2	3	48	95	12.000
5	2	2	3	1	64	52	65.491
6	2	3	1	2	60	61	49.972
7	3	1	3	2	49	57	15.797
8	3	2	1	3	59	71	47.165
9	3	3	2	1	69	73	82.000
k_1	19.704	15.357	38.470	55.255			
k_2	42.487	42.432	36.214	26.803			
k_3	48.321	52.723	35.829	28.454			
R	28.616	37.366	2.642	28.451			

2.1.7 色素清除率 牡丹花蕊粗多糖中还残留部分色素,会影响多糖纯度,且会对多糖结构的分析造成影响。三相分离法对色素有较好的清除作用,可用于牡丹花蕊粗多糖中色素的清除。在 360~460 nm 内对色素浓度与吸光度值进行线

性拟合,结果见图 5。显示在 420 nm 处 R^2 为 0.999 最优,因此选择 420 nm 作为色素浓度测定波长,测得经三相分离法纯化后牡丹花蕊多糖的色素清除率达 95.36%。

2.2 理化性质

2.2.1 紫外图谱分析 将三相分离法纯化多糖在 200~500 nm 内扫描。从图 6 中可以看出,在 209 nm 处有一多糖特征吸收峰,说明组分为多糖,而在 280 nm 左右有一个微弱吸收峰,说明经过三相分离纯化已除去大部分核酸和蛋白质等杂质,纯度较高。

2.2.2 单糖组成分析 单糖标品和牡丹花蕊多糖水解产物的 PMP 衍生化色谱图见图 7。将多糖水解产物的出峰时间与各标准单糖的保留时间和峰面积对比,得出牡丹花蕊多糖由鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成,摩尔比为 1.24:1.59:2.00:9.11:1.68,其中半乳糖含量明显高于其他几种单糖,可见牡丹花蕊多糖主要由半乳糖组成,

表 3 正交试验结果方差分析 [†]					
Table 3 Results of orthogonal experiment analysis of variance					
方差来源	平方和 SS	自由度 f	均方 MS	F 值	显著性水平
A	1 371.989	2	685.995	112.292	$\alpha=0.01$
B	2 235.228	2	1 117.614	182.946	$\alpha=0.01$
D	1 530.457	2	765.228	125.262	$\alpha=0.01$
误差 e	12.218	2	6.109		
总和 T	5 149.890	8			

[†] $F_{0.01}(2,2)=99.01, F_{0.05}(2,2)=19$ 。

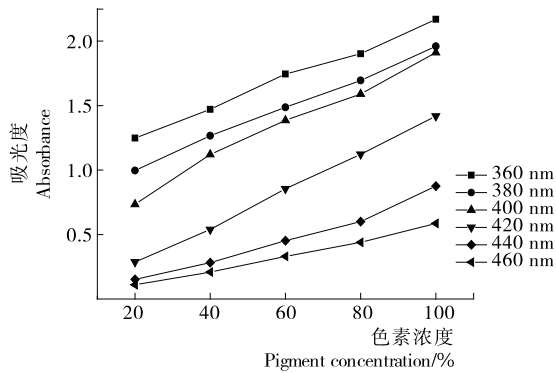


图 5 不同色素浓度与吸光度值关系

Figure 5 Relation of different pigment concentration and absorbance value

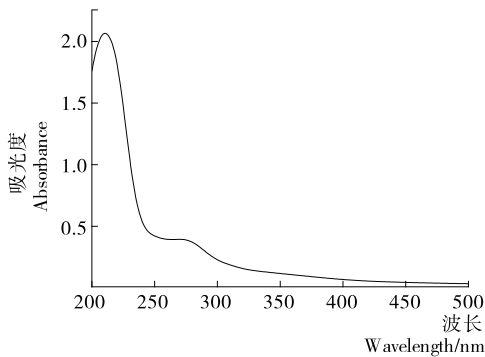


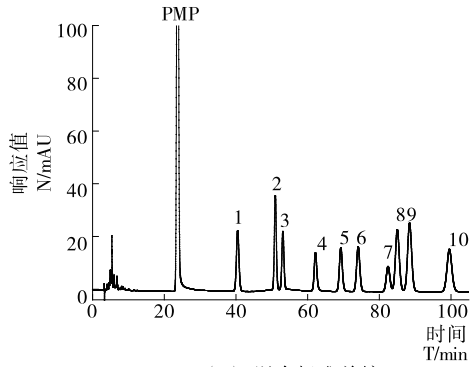
图 6 牡丹花蕊多糖的紫外光谱图

Figure 6 UV spectra of polysaccharide from peony stamen

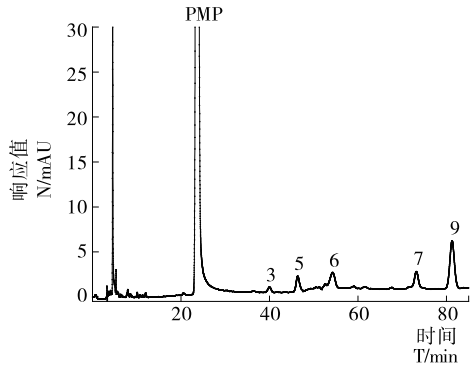
并含有少量鼠李糖、葡萄糖和阿拉伯糖。

2.2.2.3 红外光谱分析 通过红外光谱分析,结果见图 8。样品在 $3\,435\text{ cm}^{-1}$ 处宽而深的峰是由羟基 O—H 伸缩振动引起的, $2\,952\text{ cm}^{-1}$ 处是由烷基 C—H 伸缩引起的,以上 2 组峰为多糖特征吸收峰,断定样品为多糖类物质。 $1\,742$, $1\,316\text{ cm}^{-1}$ 处由羧基的 C=O 键伸缩振动和 O—H 弯曲振动引起,推断有半乳糖醛酸的存在,此结果与单糖组分分析中含有半乳糖醛酸结果相同,另外在 $1\,637\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为羧基酯化吸收峰,表明样品为一种酸性果胶类多糖^[27-28]。在 $1\,443\text{ cm}^{-1}$ 处是由烷基的 C—H 弯曲振动引起,说明有烷基链存在。 $1\,240\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰推断是硫酸基的 S=O 伸缩震动引起,推断有硫酸基存在^[29]。在指纹区内, $1\,094$, $1\,013\text{ cm}^{-1}$ 处由醚键的 C—O 伸缩振动引起,为糖苷键非对称振动峰,结合在 896 cm^{-1} 处由 C—H 横向振动引起微弱吸收峰,推断有 β 型吡喃糖存在^[30]。 840 cm^{-1} 处无明显吸收峰表明该多糖不具有或含有少量 α 型糖苷键^[31]。另外 896 , 819 cm^{-1} 2 处吸收峰证明多糖中有半乳糖存在,此结果与单糖组分分析结果一致。

2.2.2.4 ^1H NMR 分析 牡丹花蕊多糖的 ^1H NMR 图谱见图 9。一般情况下,异头氢质子 H-1 的化学位移处于 $\delta\,4.5\sim 5.5$, α -型异头氢质子 H-1 化学位移大于 5, β -型异头氢质子 H-1 化学位移小于 5^[32]。图 9 中在 $\delta\,4.94$ 处有一强信号,表明糖环以 β -型为主,另外 $\delta\,5.26,5.09,5.00$ 处信号较弱,表明有少量 α -型糖环存在。此外,在 $\delta\,4.5\sim 5.5$ 共有 4 个质子信



(a) 混合标准单糖



(b) 牡丹花蕊多糖水解组分

1. Man 2. Rib 3. Rha 4. GlcA 5. GalA 6. Glc 7. Gal
8. Xyl 9. Ara 10. Fuc

图 7 混合标准单糖和牡丹花蕊多糖水解组分色谱图

Figure 7 HPLC chromatography of mix monosaccharides standard and hydrolysis component of polysaccharides from peony stamen

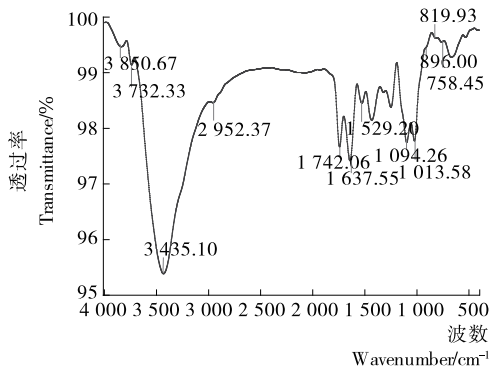


图 8 牡丹花蕊多糖的红外光谱图

Figure 8 FT-IR spectra of polysaccharide from peony stamen

号,表示有 4 种单糖种类^[33],此结果与单糖组成分析结果完全一致。在 $\delta\,3.51\sim 4.14$ 的信号主要是糖环上 $\text{C}_2\text{—H}$ 至 $\text{C}_6\text{—H}$ 的信号峰位,因受羟基作用严重重叠^[34]。化学位移在 $\delta\,1.08\sim 1.25$ 的信号可能为鼠李糖 C-6 甲基上的氢质子信号,此结果与单糖组分分析中有鼠李糖结果相同。化学位移在 $\delta\,2.00$ 附近的信号可能为糖醛酸羧基乙酰化结构中乙酰基的甲基氢信号^[34]。综合分析可知,牡丹花蕊多糖中同时存在 α -构型和 β -构型,并且大部分牡丹花蕊多糖以 β -构型连接,少量为 α -构型,此结果与红外光谱分析结果相符。

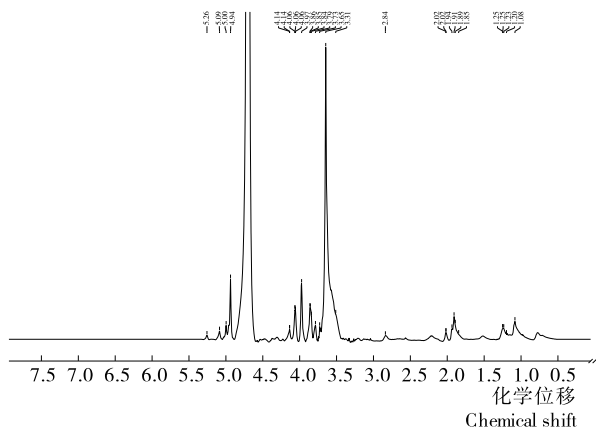


图 9 牡丹花蕊多糖的¹H 核磁共振图

Figure 9 ¹H NMR spectra of polysaccharide from peony stamen

3 结论

(1) 三相分离法纯化牡丹花蕊多糖的最优条件为 pH 值 7、硫酸铵质量分数 10%、提取液与叔丁醇体积比 1：2，此条件下多糖回收率为 69%，蛋白质去除率为 73%，纯化后的牡丹花蕊多糖纯度为 99.24%。可将 420 nm 作为色素浓度测定波长。测定三相分离纯化后的牡丹花蕊多糖的色素清除率为 95.36%。

(2) 对纯化后牡丹花蕊多糖的理化性质分析表明，牡丹花蕊多糖由鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖 5 种单糖组成，其摩尔比为 1.24：1.59：2.00：9.11：1.68。紫外光谱分析验证了牡丹花蕊多糖纯度较高。傅立叶红外变换光谱和核磁共振波谱表明，牡丹花蕊多糖是一种酸性吡喃糖，主要由半乳糖组成且多以 β-构型连接。

(3) 从试验结果中看出三相分离法是一种较好的多糖纯化方法，与传统的柱层析方法相比较不仅纯化速度快，且得到多糖纯度较高，多糖损失较少，色素清除率较高。纯化后的牡丹花蕊多糖为一种酸性果胶类多糖，为今后牡丹花蕊多糖的进一步研究提供了理论基础。

(4) 本试验采用了一种较新的多糖纯化方法，在牡丹花蕊的纯化中起到了较好的效果，但是对于其他类多糖的纯化是否适用还需在今后的试验中进一步的探索。

参考文献

[1] 赵海军, 傅茂润. 牡丹花蕊的营养成分研究[J]. 山东林业科技, 2010(5): 24-27.

[2] 李朝苹, 陈立勇, 阴英超, 等. 牡丹花蕊水提取液抗氧化功能研究[J]. 山东大学学报: 医学版, 2015(11): 32-36.

[3] 傅茂润, 刘峰, 赵海军, 等. 牡丹雄蕊的营养成分和抗氧化能力研究[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(5): 71-74.

[4] 游玉明, 杨帆, 熊运海. 牡丹花的综合利用与开发前景[J]. 北方园艺, 2011(1): 67-69.

[5] SHARMA A, ROY I, GUPTA M N. Affinity precipitation and macroaffinity ligand facilitated three-phase partitioning for re-folding and simultaneous purification of urea-denatured pectinase[J]. Biotechnology Progress, 2010, 20(4): 1 255-1 258.

[6] BAYRAKTAR H, ÖNAL S. Concentration and purification of

α-galactosidase from watermelon (Citrullus vulgaris) by three phase partitioning[J]. Separation & Purification Technology, 2013, 118: 835-841.

[7] LI Zhu-bo, JIANG Fei-fei, XU Ya-li, et al. Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae Chlorella spp. by three-phase partitioning[J]. Bioresource Technology, 2013, 149(12): 286-291.

[8] VIDHATE G S, SINGHAL R S. Extraction of cocoa butter alternative from kokum (Garcinia indica) kernel by three phase partitioning[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(4): 464-466.

[9] ROY I, GUPTA M N. Three-Phase Affinity Partitioning of Proteins[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 300(1): 11-14.

[10] 罗磊, 董金龙, 朱文学, 等. 金银花过氧化物酶的三相分离纯化及酶学性质[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 20-27.

[11] YAN Jing-kun, WANG Yao-yao, QIU Wen-yi, et al. Three-phase partitioning for efficient extraction and separation of polysaccharides from Corbicula fluminea [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 163: 10-19.

[12] DENNISON C, LOVRIEN R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins[J]. Protein Expression & Purification, 1997, 11(2): 149.

[13] 郭金龙, 陈有君, 孙国琴, 等. 苯酚-硫酸法测定杏鲍菇多糖方法的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 555-558.

[14] BRADFORD MM A. A Rapid and sensitive method for the quantitation on microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.

[15] 苑艳辉. 豆豉纤溶酶发酵条件的优化及双水相萃取工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006: 48.

[16] DAI Jun, WU Yan, CHEN Shang-wei, et al. Sugar compositional determination of polysaccharides from dunaliella salin by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 629-635

[17] 何慕雪, 孟凡成, 王春明, 等. 1 种水溶性霸王花多糖的分离纯化及结构鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 106-112.

[18] 白丽娟. 马奶酒中产胞外多糖瑞士乳杆菌的筛选及多糖的结构和抗氧化活性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017: 64.

[19] DENNISON C, LOVRIEN R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins[J]. Protein Expression and Purification, 1997, 11(2): 149-161.

[20] SAGU S T, NSO E J, HOMANN T, et al. Extraction and purification of beta-amylase from stems of Abrus precatorius, by three phase partitioning[J]. Food Chemistry, 2015, 183: 144-153.

[21] DUONGLY K C, GABELLI S B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation[J]. Methods in Enzymology, 2014, 541(541): 85.

[22] TAN Zhi-jian, WANG Chao-yun, YI Yong-jian, et al. Three phase partitioning for simultaneous purification of aloe polysaccharide and protein using a single-step extraction[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(3): 482-486.

[23] SHARMA A, GUPTA M N. Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ-bifunctional protease/amylase inhibitor[J]. Process Biochemistry, 2001, 37(2): 193-196.

(下转第 134 页)

3 结论

通过麦角甾醇与硫辛酸的酯化对麦角甾醇进行了改性,提高了其在食用油中的溶解度和抗氧化性,从而扩大了麦角甾醇在食品工业中的应用范围。产物硫辛酸麦角甾醇酯在菜籽油中的溶解度为 19.81 g/L,相较于麦角甾醇的 9.76 g/L 有了很大改善,表明甾醇酯化后其脂溶性成分能改善甾醇的亲脂性。硫辛酸和麦角甾醇均具有一定的抗氧化性,酯化后的产物硫辛酸麦角甾醇酯抗氧化能力优于改性前的麦角甾醇,与甾醇阿魏酸酯处在同一水平。通过对添加不同浓度硫辛酸麦角甾醇酯的菜籽油的过氧化值测定,得到 0.3 g/kg 为较好的添加量,可明显提高食用油的抗氧化性,可为实际应用提供一定依据。目前,对于麦角甾醇改性国内外研究较少,这意味着将改性麦角甾醇应用于食品工业还很遥远,麦角甾醇的改性和品质优化还有待进一步研究。

参考文献

[1] OREP J U, WALTER R, KORTEKAMP A, et al. Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes[J]. Food Control, 2014, 37(1): 77-84.

[2] VILLARES A, GARCIA-LAFUENTE A, GUILLAMON E, et al. Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. Truffles[J]. Food Composition and Analytical, 2012, 26(1/2): 177-182.

[3] HU Shu-hu, LIANG Zeng-chin, CHIA Yi-chen, et al. Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(6): 2 103-2 110.

[4] KUO Chia-feng, HSIEH Chin-hsuan, LIN Wun-yuan. Proteomic response of LAPactivated RAW 264.7 macrophages to the anti-inflammatory property of fungal ergosterol[J]. Food Chemistry, 2011, 126(1): 207-212.

[5] 高虹, 史德芳, 杨德, 等. 巴西菇麦角甾醇抗肿瘤活性及作用机

理初探[J]. 中国食用菌, 2011, 30(6): 35-39.

[6] SCHNEIDER I, KRESSE G, MEYER A, et al. Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans[J]. Functional Foods, 2011, 3(1): 17-24.

[7] CHAIBAKHSH N, BASRI M, RAHMAN M B A, et al. Lipase-catalyzed synthesis of ergosterol ester[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012, 1(1): 51-56.

[8] HE Wen-sen, MA Yuan, PAN Xiao-xia, et al. Efficient solvent-free synthesis of phytostanyl esters in the presence of acid-surfactant-combined catalyst[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(38): 9 763-9 769.

[9] NG Z K, KHERADA N, FARRAR B, et al. Lipoic acid effects on established atherosclerosis[J]. Life Sciences, 2010, 86(3/4): 95-102.

[10] MOURA F A, DE ANDRADE K Q, DOS SANTOS J C F, et al. Lipoic acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2015, 15(5): 458-483.

[11] TSUJI-NAITO K, ISHIKURA S, AKAGAWA M, et al. alpha-Lipoic acid induces collagen biosynthesis involving prolyl hydroxylase expression via activation of TGF-beta-Smad signaling in human dermal fibroblasts[J]. Connective Tissue Research, 2010, 51(5): 378-387.

[12] HE Wen-sen, YIN Ji, XU Han-shan, et al. Efficient synthesis and characterization of ergosterol laurate in a solvent-free system[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(48): 11 748-11 755.

[13] LIN Ming-zhu, LI Hai-jun, YAN Zan, et al. 2-Naphthoic acid ergosterol ester, an ergosterol derivative, exhibits anti-tumor activity by promoting apoptosis and inhibiting angiogenesis[J]. Steroids, 2017, 122: 9-15.

[14] 贾承胜, 黄晓爱, 董涛, 等. 植物甾醇脂肪酸酯的抗氧化作用研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(6): 80-82.

(上接第 128 页)

[24] SAGU S T, NSO E J, HOMANN T, et al. Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phase partitioning [J]. Food Chemistry, 2015, 183: 144-153.

[25] ÖZER, B, AKARDERE E, CELEM E B, et al. Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato [J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 50(3): 110-115.

[26] 张仲欣, 杜双奎. 食品试验设计与数据处理[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2011: 227-228.

[27] LIAO Ning-bo, ZHONG Jiang-jun, YE Xing-qian, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Corbiculafluminea*: Characterization and antioxidant activity [J]. LWT-Food Science & Technology, 2015, 60(2): 1 113-1 121.

[28] 蔡为荣, 孙元琳, 汤坚. 果胶多糖结构与降血脂研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 307-311.

[29] PERCIVAL E, WOLD J K. The acid polysaccharide from the green seaweed *ulva lactuca*. Part II. The site of the ester

sulphate[J]. J. Chem. Soc, 1963, DOI: 10.1039/jr9630005459.

[30] 潘峰, 姚芸欣, 唐鑫, 等. 瓦布贝母内生真菌 *Fusarium redolens* 6WBY3 多糖的理化性质及抗氧化活性[J]. 微生物学报, 2017, 57(2): 240-253.

[31] NA Y S, KIM W J, KIM S M, et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *capsosiphon fulvescens*[J]. International Immunopharmacology, 2010, 10(3): 364-370.

[32] 李炳奇. 天然产物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 201-202.

[33] 西尔弗斯坦. 有机化合物的波谱解析[M]. 药明康德新药开发有限公司分析部, 译. 上海: 华东理工大学出版社, 2007: 139-142.

[34] XING Xiao-hui, STEVE W Cui, NIE Shao-ping, et al. Study on *Dendrobium officinale*, *O*-acetyl-glucomannan (*Dendronan*®): Part I. Extraction, purification, and partial structural characterization[J]. Bioactive Carbohydrates & Dietary Fibre, 2014, 4(1): 74-83.