

基于微波技术的翻白草多糖提取工艺研究

陈毅挺, 李艳霞, 黄露, 翁素珍, 林明峰, 郑李钦

(闽江学院 化学与化学工程系, 福建 福州 350108)

摘要: 采用醇沉水提工艺, 使用微波技术提取翻白草中多糖. 先通过单因素分析法对提取工艺进行优选, 并选取 4 个因素进行正交实验. 得到翻白草中多糖的最优提取工艺为: 先使用料液比为 1 : 30 的乙醇进行醇沉 20 min, 再以液固比为 70 : 1 的水 (pH 为 7.0) 作为提取剂, 在 60 ℃ 下微波提取 10 min. 在最优提取工艺下对翻白草不同部位 (根、茎、叶) 的多糖含量进行分析, 发现翻白草的茎部多糖的含量最高, 其次为根部和叶部.

关键词: 翻白草; 多糖; 微波提取

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-3757(2014)04-0191-06

翻白草, 性平、味甘、微苦, 在中国传统的医药典籍和各国民间都有广泛的用途, 有效成分包括生物碱、黄酮、鞣质、多糖等. 其中多糖是一类由醛糖或酮糖通过糖苷键连接而成的天然高分子多聚物, 是构成生命体的分子基础之一^[1], 具有广泛的药理活性, 如增强免疫功能、抗肿瘤、降血糖、抗衰老、抗病毒降血糖和血脂等^[2]. 目前, 植物中多糖提取的方法有许多, 包括溶剂提取法^[3]、酸提法^[4]、碱提法^[5]、酶解法^[6]、超滤法^[7]、超声波强化法^[8]、微波法^[9]等. 由于微波加热具有穿透能力强、能有效的破坏植物细胞壁、加热效率高、耗能低、操作简单、省时易行等特点^[10-11], 若能将其用于翻白草中多糖类物质的提取, 将有助于开展对翻白草中多糖物质的进一步研究.

1 仪器与材料

常压微波合成萃取仪 (MCR-35, 巩义市予华仪器有限公司); 可见分光光度计 (721, 上海宇隆仪器有限公司); 分析用研磨机 (IKA-A11 basic, IKA).

翻白草 (全草) 购自亳州中药材交易市场, 经闽江学院张梅副教授鉴定为蔷薇科委陵菜属翻白草 (*Potentilla discolor* Bge.) 的干燥全草; 葡萄糖与氢氧

化钠购自国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇、浓硫酸、盐酸购自上海成海化学工业有限公司; 苯酚、三氯乙酸、氯仿均购自天津市福晨化学试剂厂. 所用化学试剂均为分析纯; 实验用水均为去离子水.

2 实验方法

2.1 翻白草的预处理

将翻白草清洗干净, 置于 40 ℃ 恒温干燥箱中烘干, 取出后用研磨机粉碎, 得到翻白草粉末, 搅拌均匀后备用.

2.2 多糖的提取

本实验所用常压微波合成萃取仪具有准确控制微波温度或者微波功率 2 种模式, 为了防止多糖类物质在高温下分解, 提取中均采取控制微波温度的方法.

准确称取翻白草干粉 3 g, 加入无水乙醇 (液固比为 30 : 1) 摇匀, 控制微波提取温度和微波提取时间, 微波处理后将料液离心 10 min (4 000 r/min), 除去上清液. 沉淀按液固比为 70 : 1 加入去离子水, 再次进行微波处理, 将料液离心 10 min (4 000 r/min), 弃去固体. 上清液中加入 1% 三氯乙酸以沉淀蛋白质. 再次离心过滤, 取上清液. 在上清液中加入适量活性炭在 60 ℃ 条件下回流至溶液颜色褪去, 得到含有多糖的提取液 (体积计为 V mL).

2.3 提取率的测定

以葡萄糖为标志物,使用硫酸-苯酚法测定多糖含量^[12]。利用多糖在硫酸的作用下先水解成单糖,并迅速脱水生成糖醛衍生物,然后与苯酚生成橙黄色化合物。再以比色法测定。精密称取葡萄糖0.011 9 g,用去离子水配制成100 mL溶液,分别吸取0.2、0.8、1.2、1.6、2.0 mL置50 mL容量瓶中,稀释至刻度,计算此溶液中葡萄糖的质量浓度。再移取2.0 mL于试管中,另取2.0 mL去离子水作空白对照。各加入6%苯酚试液1.0 mL,摇匀迅速滴加浓硫酸各5.0 mL,摇匀并在室温下放置5 min,于490 nm处测定吸光度。以葡萄糖的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A=0.0323 \times C(\text{mg/L})+0.0181$,其相关系数 r 为0.998 6。

取2.2中获得的提取液25 mL,置于1 000 mL容量瓶中,用去离子水定容至刻度线(相当于将提取液稀释40倍)并混合均匀。移取2.0 mL稀释液于试管中,同样使用硫酸-苯酚法测定多糖含量,其提取率(Y)的计算公式为:

$$Y = \frac{(A - 0.0181) / 0.0323 \times V \times 40 \times 10^{-6}}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中: Y —多糖提取率,%; A —吸光度; V —提取液的体积,mL; 40 —为稀释倍数; M —翻白草样品质量,g。

3 结果与讨论

3.1 单因素条件实验

3.1.1 醇沉时间对多糖提取率的影响

在醇沉温度为60℃、水提料液比为1:30、水提温度为60℃、时间为6 min的条件下,考察醇沉时间分别为10、20、30、40 min时翻白草中多糖的提取率。结果发现:当醇沉时间为20 min时,提取率达到最大;当醇沉时间大于20 min时,提取率随着醇沉时间的增大而降低。这可能是因为随着时间的延长,导致部分多糖在醇沉过程中有所损失,故提取率下降,因此,微波提取的时间以20 min为宜。

3.1.2 醇沉温度对多糖提取率的影响

控制醇沉时间为20 min,水提液固比为70:1,水提温度为60℃,时间为10 min,水提溶剂为去离子水,醇沉温度分别为40、50、60、70、75℃,进行多糖提取,以考察醇沉温度对翻白草中多糖提取率的影响,结果如图1所示。

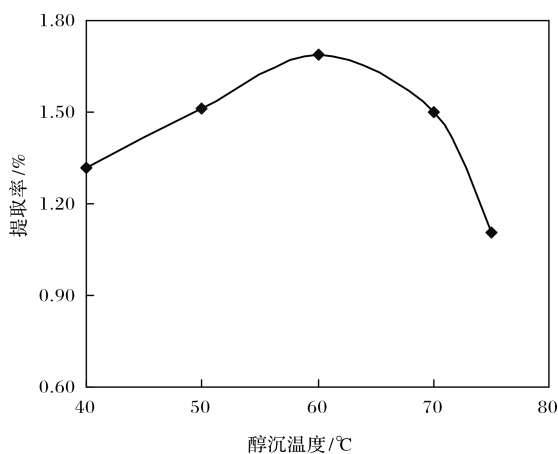


图1 醇沉温度对提取率的影响

Fig. 1 Effect of temperature of alcohol precipitation on extraction rate

由图1可见,在40~60℃范围内多糖的提取率随着温度的增加而增加。当醇沉温度大于60℃后,提取率反而随着温度的升高而降低,这可能是由于长时间的高温加热使部分多糖发生氧化或者分解在乙醇溶液中^[13],从而影响多糖的提取率。因此选择60℃为最佳的醇沉温度。

3.1.3 提取剂 pH 对提取率的影响

当醇沉时间为20 min,水提液固比为70:1,醇沉与水提温度均为60℃,时间为10 min,溶剂酸度分别为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0时,分别进行翻白草中多糖的提取实验,其结果见图2。

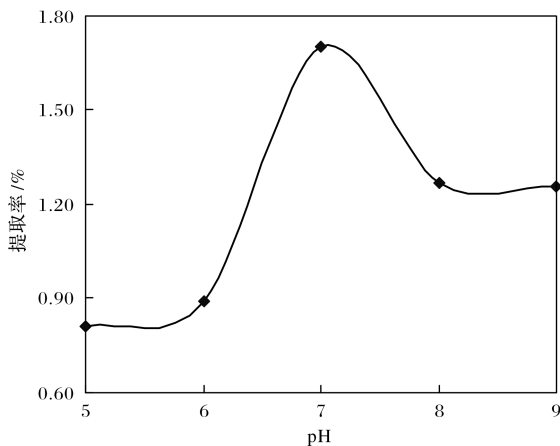


图2 水溶液 pH 对提取率的影响

Fig. 2 Effect of pH on extraction rate

水溶液的pH值为7.0时,多糖的提取率最高,这可能是由于翻白草中的多糖多为中性多糖,容易溶于中性的水溶液当中,因此水提时pH值为7.0

时最宜.

3.1.4 水提时间对提取率的影响

控制醇沉时间为 20 min,水提液固比为 70 : 1,醇沉与水提温度均为 60 ℃,以 pH 为 7.0 的水溶液作为溶剂,分别微波提取 2、5、10、15、20 min,其提取率如图 3 所示.

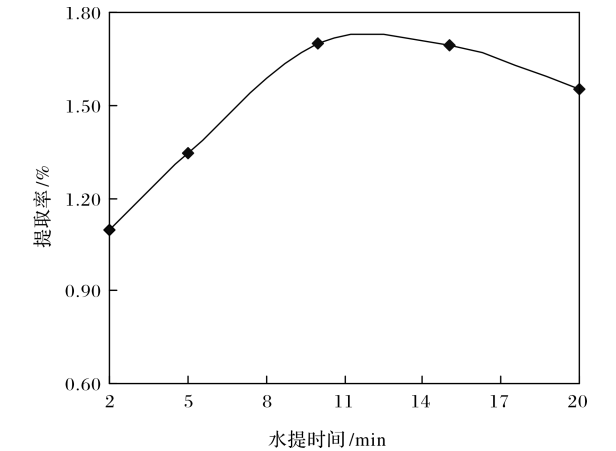


图 3 水提时间对提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on extraction rate

从图 3 可以看出,当水提时间为 2 ~ 10 min 时,多糖提取率随着时间的增大而增大,这可能是由于在一定时间内提取时间越长,多糖溶解于热水中的量就多. 当提取时间大于 10 min 后,提取率稍微有所下降,可能是由于提取时间过长,其他一些物质竞争溶出所致,因此选择提取时间为 10 min.

3.1.5 水提温度对提取率的影响

以醇沉时间为 20 min,醇沉温度为 60 ℃,水提液固比为 70 : 1,时间为 10 min,溶剂为 pH 7.0 的水溶液,水提温度分别为 40、50、60、70、80 ℃,进行翻白草中多糖的提取,得到的结果如图 4 所示.

由图 4 可见,多糖在水提温度在 40 ~ 60 ℃ 时,提取率随着温度的升高而增大,这可能是由于热作用使分子运动速度加快,加快传质运动,使细胞内多糖容易浸出,同时热作用加大了细胞壁的破坏,使细胞内的多糖浸出,从而使得提取率上升. 但是温度过高对细胞的破坏作用增大,翻白草细胞开始处于“崩溃”、溶解的状态^[14],同时过高的温度可能使部分多糖发生氧化或者分解. 因此当提取温度大于 60 ℃ 后,提取率反而随着水提温度升高而下降. 综合考虑,选择 60 ℃ 作为合适的水提温度.

3.1.6 液固比对提取率的影响

以醇沉时间为 20 min,醇沉温度为 60 ℃,水提

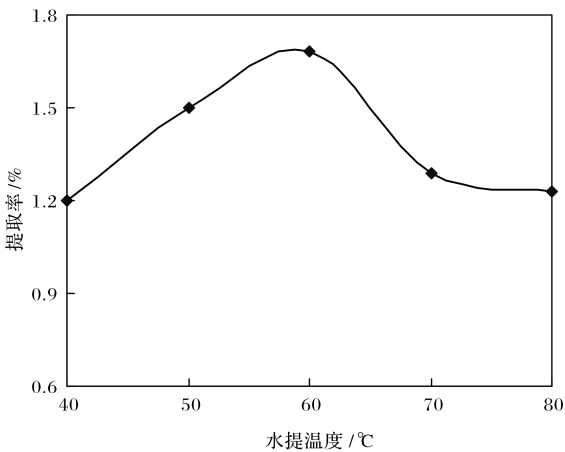


图 4 水提温度对提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on extraction rate

时间为 10 min,溶剂为 pH=7 的水溶液,水提液固比分别为 50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1、90 : 1,考察液固比对提取率的影响,结果如图 5 所示.

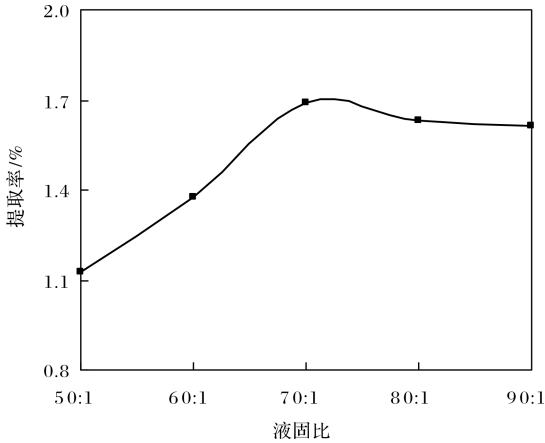


图 5 液固比对提取率的影响

Fig.5 Effect of liquid-solid ratio on extraction rate

从图 5 可以看出当液固比为 70 : 1 时提取效果最好. 这是由于液固比越大,翻白草细胞内外的多糖浓度差就越大,传质推动力大则利于多糖的浸出^[13]. 液固比达到 70 : 1 后提取率开始下降,可能此时多糖已基本完全溶解. 考虑到液固比过大,会增加浓缩的工作量,因此选择液固比为 70 : 1.

3.2 正交优化实验

在单因素的实验基础上,考虑各因素的相互影响和影响的程度,选择水溶液 pH、料液比、水提时间、水提温度 4 个因素,以 4 水平 4 因素 $L_{16}(4)^5$ 设计实验,结果如表 1 所示.

表 1 正交因素设计方案与响应值
Table 1 Orthogonal table and results of orthogonal tests

水平	因素					提取率/%
	提取液 pH	液固比	时间/min	温度/℃	误差项	
1	5	50	5	40		0.36
2	5	60	10	50		1.12
3	5	70	15	60		1.22
4	5	80	20	70		0.57
5	6	50	10	60		1.05
6	6	60	5	70		0.71
7	6	70	20	40		1.61
8	6	80	15	50		1.06
9	7	50	15	70		1.09
10	7	60	20	60		1.61
11	7	70	5	50		1.68
12	7	80	10	40		1.58
13	8	50	20	50		0.99
14	8	60	15	40		1.22
15	8	70	10	70		1.54
16	8	80	5	60		1.56
$K_1/\%$	0.818	0.873	1.078	1.193	1.143	
$K_2/\%$	1.107	1.165	1.323	1.213	1.345	
$K_3/\%$	1.490	1.512	1.147	1.360	1.125	
$K_4/\%$	1.328	1.192	1.195	0.978	1.130	
$R/\%$	0.672	0.639	0.245	0.382	0.220	

即水提过程中各因素的显著性依次为:提取液 pH 值>料液比>水提温度>水提时间,最优组合:pH 为 7.0、液固比为 70 : 1、水提时间为 10 min、水提温度为 60 ℃.

3.3 样品中不同部位多糖的提取

由于在植物的不同部位,多糖的含量并不相同,因此在以上得到的最优条件下,分别对翻白草的根、茎与叶中的多糖进行了提取. 实验结果发现根、茎与叶中的多糖提取率为 1.381%、1.852%、1.191%,即翻白草中的含量顺序为茎>根>叶.

3.4 精密度与回收率

取同 1 份葡萄糖标准溶液(3.0 mg/L),按照

2.3 中的硫酸-苯酚法重复测定 7 次,实验结果见表 2,其相对标准偏差 RSD 为 0.88%. 取 7 份翻白草(每份 10 g),控制溶液 pH 为 7.0、液固比为 70 : 1、水提时间为 10 min、水提温度为 60 ℃,实验结果见表 3,平均提取率为 1.709%,其相对标准偏差 RSD 为 1.97%.

取 8 份翻白草(每份 10 g),第 1 份为空白,其他 7 份分别加入葡萄糖样品 0.08 g,混合均匀后按照最佳微波提取工艺提取多糖,并计算回收率,结果见表 4,得到平均加样回收率为 98.00%,RSD 为 2.46%.

表 2 精密度实验结果
Table 2 Results of precision

测量值 / (mg/L)							平均值/(mg/L)	RSD/%
2.97	3.01	3.03	2.96	2.99	2.98	3.02	2.99	0.88

表 3 重现性实验结果
Table 3 Results of repeatability (%)

提取率							平均值	RSD
1.673	1.678	1.688	1.726	1.701	1.729	1.767	1.709	1.97

表 4 多糖回收率
Table 4 Recovery of polysaccharide

序号	空白样	加入量/g	提取量/g	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.170 5	0.08	0.246 4	94.88	98.00	2.46
2			0.248 9	98.00		
3			0.249 4	98.63		
4			0.248 9	98.00		
5			0.252 3	102.25		
6			0.249 5	98.72		
7			0.246 9	95.50		

4 结论

该实验采用微波辅助醇沉水提法提取翻白草中的多糖,通过分别研究醇沉时间、温度和水提时间、温度、料液比及水溶液对多糖提取率的影响,并在单因素实验的基础上通过正交优化了水提条件,确定对翻白草中多糖提取率影响的主次顺序是:pH>料液比>水提温度>水提时间. 最优工艺条件为醇沉温度 60 ℃,醇沉时间为 20 min,水提过程中溶液 pH 为 7.0、液固比为 70 : 1、微波时间为 10 min、微波提取温度为 60 ℃. 此条件下多糖提取率为 1.709%,而在翻白草各部位中多糖的含量顺序为:茎>根>叶. 该工艺提取时间短、操作简单,有望为翻白草中多糖类成分的大规模提取提供一定的参考.

参考文献:

[1] 杨春宇,张瑞红. 多糖功能[J]. 食品科学,2010,12(02):66-67.
[2] 邓雪玉. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国现代药物应用,2011,5(20):119-121.

[3] 王爱武,王梅. 猫爪草提取物体外抗肿瘤作用的研究[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(6):529-531.
[4] 周裔彬,汪东风,杜先锋,等. 酸化法提取海带多糖及其纯化的研究[J]. 南京农业大学学报,2006,29(3):103-107.
[5] 向东,赖凤英,梁平. 碱法提取南瓜多糖的研究[J]. 食品工业科技,2004,25(11):119-122.
[6] 姜红,孙宏鑫,李晶,等. 酶法提取黑木耳多糖[J]. 食品与发酵工业,2005,31(6):129-134.
[7] 焦光联,杨艳,何葆华. 超滤提取黄芪多糖的工艺研究[J]. 化学与生物工程,2010,27(8):58-61.
[8] 李金忠,马海乐,吴沿友. 超声波提取山药多糖的研究[J]. 粮油食品科技,2005,13(5):12-16.
[9] 靳丹虹,牛艳秋,陈博,等. 微波提取法提取灵芝多糖的研究[J]. 长春医学,2007,5(3):20-21.
[10] 陈毅挺,何雷玉,陈卫华,等. 翻白草中熊果酸的微波提取工艺研究[J]. 分析测试技术与仪器,2012,18(1):19-23.
[11] 陈毅挺,戴婷婷,李艳霞,等. 翻白草中中鞣质的微波提取工艺研究[J]. 分析测试技术与仪器,2014,20(2):73-78.
[12] 王明道,胡虹,郜峰,等. 猫爪草多糖的微波提取工艺

优化[J]. 江西农业学报,2011,23(1):132-134.

[13] 金丽梅,刘伟,汤一哲,等. 水提醇沉法玉米须多糖提取工艺研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2007,19

(5):62-66.

[14] 向东,赖凤英,陈冠. 水溶性南瓜多糖的提取工艺的研究[J]. 广州食品工业科技,2004,20(2):48-50.

Extraction of Polysaccharides in Potentilla Discolor by
Microwave Extraction

CHEN Yi-ting, LI Yan-xia, HUANG Lu, WENG Su-zhen, LIN Ming-feng, ZHENG Li-qin
(*Department of Chemistry and Chemical Engineering, Minjiang University, Fuzhou 350108, China*)

Abstract: Using an alcohol precipitation and water extraction technique, the polysaccharides in potentilla discolor were extracted by the microwave extraction. First, the microwave extraction technique of polysaccharides in potentilla discolor was optimized through the single factor analysis. Then, four factors were chosen to conduct the orthogonal experiments. The optimum extraction conditions were as follows: the alcohol precipitation was performed with alcohol (the ratio of solid to liquid was 1 : 30) for 20 min, water (pH=7.0, the ratio of solid to liquid was 1 : 70) was used as the extraction agent, the extraction temperature was 60 ℃, and extraction time was 10 min. In addition, the contents of polysaccharides in different parts of potentilla discolor were also determined. The results showed that the content of polysaccharides in the stem is the highest, and those in root and leaf are the next and third.

Key words: potentilla discolor; polysaccharide; microwave extraction

Classifying number: R284.2