

超声波提取枳椇多糖的工艺研究

魏丕伟, 余小静, 王凌云, 林陈芳, 蒋雪梅

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘 要:为了优化超声波法提取枳椇果柄多糖的工艺条件,分析了不同超声波功率、超声波温度、料液比、超声波时间、提取次数对提取枳椇多糖的影响,确定了其中影响较大的四个因素,并设计 L_93^4 正交试验。结果表明,超声波法提取枳椇多糖的最佳工艺为:以蒸馏水为提取溶剂,超声波功率为 500 W,温度为 70 °C,料液比为 1:35,提取时间 0.5 h,提取次数为 2 次。在此工艺下得到的多糖含量为 27.949 mg/g,得率为 30.83%。

关键词:枳椇;超声波;多糖

中图分类号:TS201.2

文献标志码:A

引 言

枳椇(*Hovenia acerba* Lindl.) 俗称拐枣、鸡脚爪、是鼠李科落叶乔木^[1]。其果梗肉质膨大扭曲,味甘甜,是主要的食用和药用部位,有广阔的开发前景。其种子具有解酒功能,常与葛根配伍。目前对枳椇的研究多集中在枳椇果酒,枳椇解酒饮料等的产品开发^[2]。多糖是有功能的大分子活性物质,结构复杂。为了深入系统的研究枳椇多糖,首先要将枳椇果柄中的多糖最大限度的提取出来。超声波辅助提取是一种有效的新型提取技术,利用其产生的强烈的空化效应^[3]、机械粉碎作用以及热效应,可以加速有效成分的溶出,从而提高浸出率,缩短提取时间,同时可以避免高温对有效成分的影响^[4]。而且便于产品纯化、对提取产物的结构和性质均无影响,已得到了广泛应用^[5]。超声提取植物材料的多糖成分已经有不少应用^[6-7],在枳椇多糖的超声波提取工艺还未见报道。本文探讨了超声辅助提取枳椇多糖的条件,为高效率的制备枳椇多糖进行工艺优化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枳椇(购买于安国药材市场);葡萄糖、浓硫酸、茚三

酮、蒽酮、石油醚(分析纯,重庆川东化工有限公司);氯仿、正丁醇、无水乙醇(分析纯,成都科龙化工试剂厂);实验用水为蒸馏水。

1.2 主要仪器

数控超声波清洗器,KQ-500DE,昆山市超声波仪器有限公司;旋转蒸发器,RE-52A,上海亚荣生化仪器有限公司;循环水式真空泵,SHB-III,巩义市宇翔仪器有限公司;电子分析天平,TP114,北京赛多利斯仪器有限公司;等。

1.3 试验方法

1.3.1 枳椇多糖提取与精制

先将枳椇果柄干燥,粉碎过 40 目筛,粉末备用。枳椇果粉进行脱脂除单糖等预处理后,再进行蒸馏水回流超声波辅助提取。提取溶液浓缩,用乙醇沉淀,使上清液乙醇浓度为 80%,离心取沉淀,冷冻干燥即得枳椇粗多糖。将粗多糖溶液经活性炭脱色,Sevage 法除蛋白,透析后得到精制多糖溶液,用高浓度乙醇进行沉淀,沉淀干燥即得枳椇精制多糖粉末。

1.3.2 枳椇多糖含量测定及得率计算

枳椇多糖含量的测定采用蒽酮-硫酸法^[8],以葡萄糖为标准品。

收稿日期:2014-06-11

基金项目:四川理工学院大学生创新基金(cx20120407)

作者简介:魏丕伟(1983-),男,山东临沂人,讲师,博士,主要从事生物技术方面的研究,(E-mail)weipiwei2004@163.com

$$\text{多糖含量}(\text{mg/g}) = \frac{\text{多糖浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{稀释因素}}{\text{枳椇粉末质量}(\text{g})}$$

得率 $Q = \text{精制枳椇多糖粉末中多糖的重量}(\text{g}) / \text{枳椇粉末中多糖的重量}(\text{g})$

1.3.3 枳椇多糖最佳提取条件确定

精确称取 3.000 g 枳椇果柄粉末, 预处理后蒸馏水提取, 选择超声波功率、提取温度、料液比、提取时间、提取次数五个因素进行单因素实验, 收集所得提取液, 适当稀释, 取 2 mL 样品稀释液与 8 mL 蒽酮-硫酸试剂反应测吸光值, 确定每一因素的最佳值。选择影响较大的四个因素, 每个因素下分别设三个水平, 采用 L_93^4 正交表作正交设计实验^[9]。正交试验的每个组合得到的多糖溶液均定容至 250 mL, 分别从中取 4 mL 稀释至 25 mL, 再依次取 2 mL 与 8 mL 蒽酮-硫酸试剂反应, 测其吸光值, 重复三次取平均值, 计算多糖含量, 确定超声波辅助提取枳椇果柄多糖的最佳条件。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

以葡萄糖浓度 (mg/mL) 为横坐标, 吸光值 (A) 为纵坐标, Excel 处理数据, 最小二乘法作线性回归, 得方程为: $y = 8.125x + 0.004$, $R = 0.999$ 。葡萄糖标准曲线如图 1 所示。

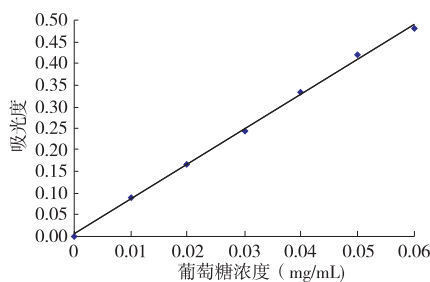


图 1 葡萄糖标准曲线

2.2 单因素试验结果

2.2.1 超声波功率对提取效果的影响

超声波的功率越高可以产生越强烈的振动和空化效应以及搅拌等特殊作用, 能够破坏细胞壁, 使溶剂渗透到细胞中, 有利于其中的化学成分溶于溶剂中, 提高提取效率。由图 2 可以看出, 在 200 W ~ 600 W 超声波功率范围内, 随着超声功率的上升枳椇果柄多糖的溶出增加, 且从折线图可看出在超声波功率为 400 W ~ 500 W 范围内测得吸光值的增量较其他几个范围区间的大, 在 200 W ~ 600 W 范围内, 虽然超声波功率 600 W 时, 测得吸光值最高, 但用超声波清洗器提取, 功率 600 W 时, 噪声已经很大, 而且 500 W ~ 600 W 范围内, 多糖溶出的增

长率已经降低。因此选择 500 W 的超声功率作为最佳。

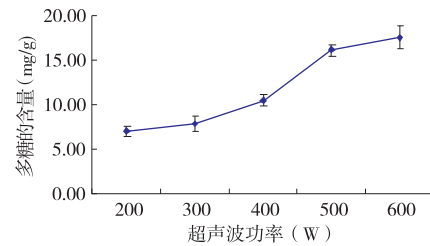


图 2 超声波功率对提取效果的影响

2.2.2 温度对提取效果的影响

温度对多糖的溶出效果影响明显, 当温度从 20 °C 升高到 95 °C, 多糖的溶出增加了 4 倍。多糖的热稳定性好, 较高温度也不会破坏其结构。从图 3 中可以看出, 随着温度升高, 多糖溶出率增多, 尤其是温度在 40 °C ~ 80 °C 时, 多糖溶液的吸光值升高的很快, 在 80 °C ~ 90 °C 时, 曲线变的平缓, 故选择 80 °C 为单因素最佳提取温度。

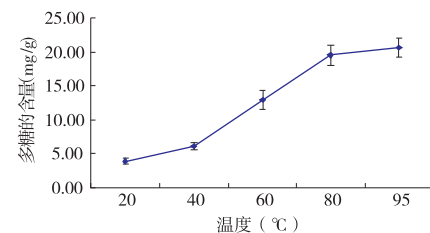


图 3 温度对提取效果的影响

2.2.3 料液比对提取效果的影响

选择不同的料液比, 按照 1.3.3 的实验方法, 提取出的多糖溶液与蒽酮-硫酸反应测其吸光值。结果如图 4 所示, 在料液比为 1:10 到 1:30 范围内, 随着料液比的增大, 吸光值不断增加, 当料液比继续增大到 1:40 时, 吸光值反而降低, 多糖溶出减少, 所以选择 1:30 为最佳的料液比。

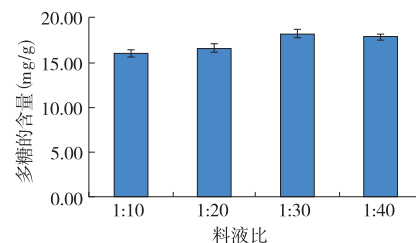


图 4 料液比对提取效果的影响

2.2.4 时间对提取效果的影响

从图 5 可以看出运用超声辅助提取枳椇多糖, 时间在 0.5 h ~ 2.0 h 范围内, 多糖的提取率一直在增大, 多糖含量从 12.464 mg/g 增加到 19.840 mg/g, 但曲线总体比较平缓, 只在 1.0 h ~ 1.5 h 吸光值上升得较大。过长的提取时间不仅增加能源消耗而且不利于工作效率的

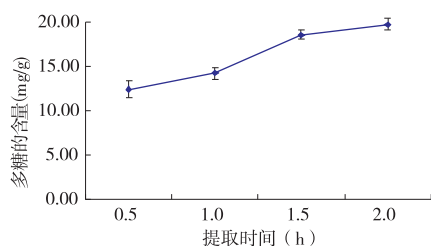


图5 提取时间对提取效果的影响

提高,选择1.5 h为单因素的最佳提取时间。

2.2.5 次数对提取效果的影响

由图6中可以看出,随着提取次数的增多,吸光值增大。仅提取1次很难将枳椇果柄中的多糖溶出彻底,但是提取次数过多会给后续的滤液浓缩带来困难,综合考虑,从第3次开始所提取多糖含量增加的较小,仅为1.374 mg/g,确定最佳提取次数为2次。

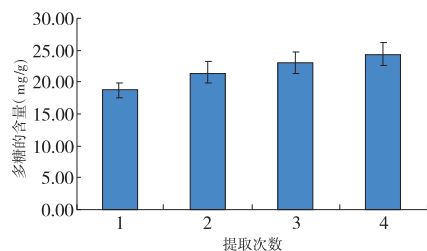


图6 提取次数对提取效果的影响

2.3 正交试验结果

结合上述五个单因素的分析结果,由于提取次数为两次时,枳椇中的多糖几乎全部溶出,提取次数这个因素不必再进行深入研究,因此选择超声波功率、温度、料液比、提取时间这四个因素进行正交试验。参考单因素的最佳条件,同时考虑节约能源、提高工作效率等,制定正交表(表1)。

表1 L_93^4 因素水平表

水平	A 超声波功率 (W)	B 温度 (°C)	C 料液比 (W/V)	D 提取时间 (h)
1	400	60	1:25	0.5
2	450	70	1:30	1.0
3	500	80	1:35	1.5

正交试验结果见表2。通过直观分析,各因素极差R值的大小分别为 $R_A = 17.949$ 、 $R_B = 5.064$ 、 $R_C = 22.436$ 、 $R_D = 4.295$,从而可看出四个因素对枳椇果柄多糖提取的影响顺序:料液比 > 超声波功率 > 温度 > 提取时间。从正交试验结果可以看出多糖含量最佳的提取条件是 $A_3B_2C_3D_1$,即提取的超声波功率为500 W,温度为70 °C,料液比为1:35,提取时间为0.5 h,提取次数为2次,在此条件下得到的提取液吸光值为0.440,根据标准曲线及多糖含量测定公式换算得到多糖含量为

27.949 mg/g。

表2 正交试验结果的直观分析

序号	因素				多糖含量 (mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	13.013
2	1	2	2	2	17.692
3	1	3	3	3	19.295
4	2	1	3	2	26.667
5	2	2	1	3	19.231
6	2	3	2	1	21.282
7	3	1	2	3	20.769
8	3	2	3	1	27.949
9	3	3	1	2	19.231
K1	50.000	60.449	51.474	62.244	K = 185.128
K2	67.179	64.872	59.744	63.590	
K3	67.949	59.808	73.910	59.295	
R	17.949	5.064	22.436	4.295	

正交试验的方差分析见表3,F检测表明,A因素(超声波功率)的 $p < 0.05$,说明在所设的超声波功率为400 W、450 W、500 W的条件下,其提取效果有显著性差异;同理,C因素(料液比)的 $p < 0.05$,说明在料液比为1:25、1:30、1:35的范围内,其提取效果也有显著性差异;B因素(温度)的 $p > 0.05$,说明在温度为60 °C、70 °C、80 °C的范围内各水平间差异不显著。因素D(提取时间)的极差较小,所以将此因素作为方差分析的误差列。

表3 正交试验的方差分析

因素	Df	SS	MS	F	p
A	68.654	2	34.327	21.341 *	0.01 < p < 0.05
B	5.069	2	2.534	1.576	p > 0.05
C	85.827	2	42.914	26.679 *	0.01 < p < 0.05
误差	3.217	2	1.608		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, $F_{0.01}(2,2) = 99.00$

2.4 验证试验分析

单因素试验得到的各因素的最佳组合(超声波功率:500 W,提取温度:80 °C,料液比:1:30,提取时间1.5 h,提取次数2次),不在正交试验的9个试验组合中,因此将单因素最佳组合与正交试验最佳组合进行比较。

精确称取3.000 g样品,按照超声波功率为500 W,提取温度为80 °C,料液比为1:30,提取时间1.5 h,两次进行试验,做三次平行。提取液稀释至250 mL,取4 mL定容至25 mL,再取2 mL与蒽酮-硫酸溶液反应,测其吸光值,计算多糖含量,结果是28.076 mg/g。正交实验中的最佳组合测出多糖含量为27.949 mg/g。两者相比,单因素的最佳组合测得吸光值比正交实验最佳组合得出的多糖含量大0.127 mg/g,相差不大,但前者提取时间是1.5 h,后者的提取时间是0.5 h,过长的提取时间不利于工作效率的提高也增加源耗。综合考虑,应选择正交实

验中得到的最佳条件,即超声波功率:500 W,提取温度:70 ℃,料液比:1:35,提取时间:0.5 h,提取次数为 2 次。

2.5 枳椇多糖提取得率的计算

称取枳椇果柄粉末 150 g,按照实验得到的最佳提取工艺制备多糖溶液,并按照 1.3.1 的方法制得精制多糖,得到精制多糖粉末为 2.81 g,算出得率

$$Q = 2.81 / 2.174 / (27.949 \times 150 \times 10^{-3}) \times 100\% = 30.83\%$$

在此工艺条件下提取多糖的得率为 30.83%,得率偏小,可能是前处理没能将原料中的单糖、寡糖彻底除尽,低聚糖不溶于高浓度的乙醇,通过醇沉后得到的多糖溶液几乎不含单糖、寡糖。但在正交试验时没有进行醇沉,是用水提液测吸光值,因而正交试验提取的多糖溶液中有低聚糖的残留,导致蒽酮硫酸反应测出的吸光值偏大,即多糖含量偏大。导致计算出的多糖得率偏小。

3 结 论

通过超声波辅助提取枳椇的优化实验,得到枳椇多糖的最佳提取工艺为超声波功率 500 W,温度 70 ℃,料液比为 1:35,提取时间 0.5 h,提取次数为 2 次。与传统的热回流提取^[10](条件:温度 80 ℃,料液比 1:15,提取时间 2 h,提取次数 3 次)相比较,提取时间缩短了 5 h,提取次数减少了 1 次,温度低了 10 ℃,大大节省了时间和操作工序。在超声辅助条件下得到的多糖含量是 27.949 mg/g,与传统热水回流法得到的多糖含量 10.288 mg/g 相比,提高了接近 3 倍。但超声辅助提取的多糖得率为 30.83%,比传统提取法要低 50%,分析原因,可能是试验中使用的测定多糖含量的方法有一定局

限性,蒽酮-硫酸法可测总糖含量,当借助超声波提取多糖时,超声波的空化和振动使枳椇果柄中的多糖溶出增加,同时材料中未除净的低聚糖的溶出也会增加,使吸光值偏大,也就使计算的得率偏小。总之,超声波辅助提取枳椇多糖,是对传统提取法的改进,可以提高效率。

参 考 文 献:

- [1] Xu F F, Zhang X Q, Zhang J, et al. Two methyl-migrated 16,17-seco-dammarane triterpenoid saponins from the seeds of *Hovenia acerba*[J]. *Journal of Asian natural products research*, 2012, 14(2):135-140.
- [2] 汤卫东,朱海涛.醒酒保健口服液的研制[J]. *食品科技*, 2004(6):75.
- [3] 孙玉敬.类胡萝卜素在超声波辅助提取中的稳定性及其定量构效关系的研究[D].杭州:浙江大学, 2011.
- [4] 王振宇,赵鑫.超声波提取大花葵色素的工艺研究[J]. *林产化学与工业*, 2003, 23(2):65-67.
- [5] 王桓,潘杨.超声强化提取喀什小枣多糖的工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(11):40.
- [6] 景荣琴,熊清平,景怡.响应面法优化桑葚多糖的超声波辅助提取工艺条件[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(4):570-574.
- [7] 张雪.超声波提取茯神多糖的工艺研究. *现代食品科技*, 2011, 27(2):170-172.
- [8] 王钦德,杨坚.食品试验设计与统计分析[M].北京:中国农业大学出版社, 2009.
- [9] 张惟杰.糖复合生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社, 1999.
- [10] 魏丕伟,王凌云,熊俐,等.枳椇多糖提取工艺研究[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(8):272-274.

Study on Technology of Extracting Polysaccharides From *Hovenia acerba* Lindl. by Ultrasonic Waves

WEI Piwei, YU Xiaojing, WANG Lingyun, LIN Chenfang, JIANG Xuemei

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: To optimize the ultrasonic technology of extracting polysaccharides from Stalk of *Hovenia acerba* Lindl., several factors such as the ultrasonic power, ultrasonic temperature, solid-liquid ratio, the duration time of sonication and the total extraction times, as well as their effects on the extraction of polysaccharides were investigated, of which four factors have the distinguished influences on the extraction efficiency. Then, the L_93^4 orthogonal test as for the above four factors was conducted and it finally shows that the optimum condition for extraction of polysaccharides from Stalk of *Hovenia acerba* Lindl. is: water chosen as the extraction agent, 500W as the ultrasonic power, 70℃ as the ultrasonic temperature, 1:35 as the solid-solvent ratio, 0.5h as the duration time of sonication, to extract totally twice. Under this condition, 30.83% of polysaccharides from Stalk of *Hovenia acerba* Lindl. can be extracted, which means 27.949 mg/g of dry weight.

Key words: *Hovenia acerba* Lindl.; polysaccharides; ultrasonic waves