

文章编号: 1673-1689(2010)03-0401-05

微波辅助法提取猕猴桃多糖的条件优化

卢丹, 吕淼华, 姚善泾*

(浙江大学 化学工程与生物工程学系, 杭州 杭州 310027)

摘 要: 为了提高猕猴桃多糖的收率, 研究了微波辅助提取法从中华猕猴桃根、茎和叶中分离多糖的过程, 采用均匀设计法考察了固液质量体积比, 提取时间和微波功率对多糖提取率的影响。结果发现不同原料的最佳提取条件也不同, 根据试验数据和实际情况确定了 3 种多糖的最优提取条件分别为: 根多糖的固液质量体积比为 0.016 9 g/mL, 微波功率为 385 W, 作用时间 24 min; 茎多糖的固液质量体积比为 0.017 0 g/mL, 微波功率为 539 W, 作用时间为 23.8 min; 叶多糖的固液质量体积比为 0.016 1 g/mL, 微波功率为 539 W, 作用时间为 23.5 min。在最优提取条件下, 根、茎、叶多糖的得率依次为 7.0%、3.7% 和 3.2%, 明显高于其它的提取方法。同时还经试验验证, 3 种多糖得率实验值与回归方程的计算值偏差均小于 5%。

关键词: 中华猕猴桃, 多糖, 微波辅助提取, 均匀设计法

中图分类号: O 629.12

文献标识码: A

Optimization of the Extraction of Polysaccharides with Microwave-Assisted Extraction from *Actinidia chinensis*

LU Dan, LV Miaohua, YAO Shan-jing*

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Microwave-assisted extraction (MAE) was applied to the polysaccharides extraction from the dried root, stem and leaf of *Actinidia Chinensis*. Three key operation parameters, including the extraction time, the power of microwave and the ratio of material to solvent, were optimized with uniform experimental design method. The optimal conditions for extracting three raw materials were determined by the regression equations. Considering the efficiency and the feasibility of experiment, the actual operating conditions were 0.016 9 of the ratio of material to solvent, 24 min of the extraction time and 385 W of the microwave power in the extraction of root; 0.0170 of the ratio of material to solvent, 23.8 min of the extraction time and 539 W of the microwave power in the extraction of stem; and 0.016 1 of the ratio of material to solvent, 23.5 min of the extraction time and 539 W of the microwave power in the extraction of leaf, respectively. The extracted yields of polysaccharides in the actual optimal conditions were 7.0%, 3.7% and 3.2%. The deviation between the values from experiments and calculation from root and

收稿日期: 2009-06-22

基金项目: 浙江省科技厅面上项目(2008C33031)。

作者简介: 卢丹(1980-), 女, 福建建瓯人, 生物化工博士研究生, 主要从事生物分离工程研究。

Email: danro324@163.com

* 通信作者: 姚善泾(1957-), 男, 浙江平湖, 教授, 主要从事生物分离工程研究。Email: yaosj@zju.edu.cn

leaf were both below 5%, which demonstrated that the regression equation could predict the yield of polysaccharide in the given conditions well.

Key words: *Actinidia Chinensis*, polysaccharide, microwaveassisted extraction, uniform experimental design method

猕猴桃属植物(*Actinidia* Lindl.)在中国的种质资源丰富^[1],其中,中华猕猴桃(*A. chinensis* Planch.)根(藤梨根)在中国传统医药中一直被用于治疗消化不良、痢疾、关节炎等多种疾病^[2]。近年的研究表明了,猕猴桃属植物的根、茎、果多糖均具有一定的抗肿瘤功效^[3-5],而且由于所处的部位不同,其治疗效果也有差异。自1975年 Samra 等首次将家用微波炉用于实验室提取生物样品开始,微波辅助提取技术已经广泛用于植物成分的提取。与传统提取方法相比,微波提取具有提取效率高、对样品的破坏小,节能等优点^[6-9]。文献中已经报导了一些用于猕猴桃多糖的提取方法,主要包括热水浸提、醇提、碱提和超声波辅助提取等^[10-11],有一定效果,但提取率都比较低。

作者以中华猕猴桃的根、茎和叶为原料,从中提取出猕猴桃多糖。考虑到由于材质的不同,提取过程的参数也会不同。因此将采用均匀设计法优化,对在微波辅助提取中的3个最主要参数——固液质量体积比、提取时间和微波功率,进行优化,以得到中华猕猴桃根、茎、叶多糖的在不同部位时的优化提取工艺条件,以期获得更高的提取效率。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 设备 高速中药粉碎机:DFY-500,大德中药机械有限公司产品;紫外/可见分光光度计:Ultrospec 3300 pro,英国 Biochrom Ltd 公司产品;微波炉:PJ21G-AN,美的微波炉公司产品。

1.1.2 原料与试剂 中华猕猴桃根、茎和叶均采自浙江省桐庐县;葡萄糖:浙江华东医药公司产品;硫酸(分析纯),医用酒精:浙江方亭化工公司产品;质量分数6%苯酚溶液:取苯酚100 g,加铝片0.1 g和NaHCO₃ 0.05 g,减压蒸馏,收集182℃馏分。称取苯酚结晶15 g,加适量去离子水溶解,转移至250 mL容量瓶中,加水至刻度。转移至250 mL棕色瓶中,置冰箱内备用^[12-13]。

1.2 试验方法

1.2.1 原材料预处理 将采自果园的新鲜中华猕猴桃根和茎切片,室温风干后用高速中药粉碎机粉

碎。中华猕猴桃叶经室温风干后切碎。为了除去脂溶性杂质,粉碎样品经60℃石油醚回流提取1 h后,40℃真空干燥。干燥后样品加入体积分数80%乙醇,采用不同微波功率(700, 539, 385, 231, 119 W)依次作用4 min,除去含有单糖、低聚糖及苷类的上清后真空干燥备用。原材料预处理流程见图1所示。

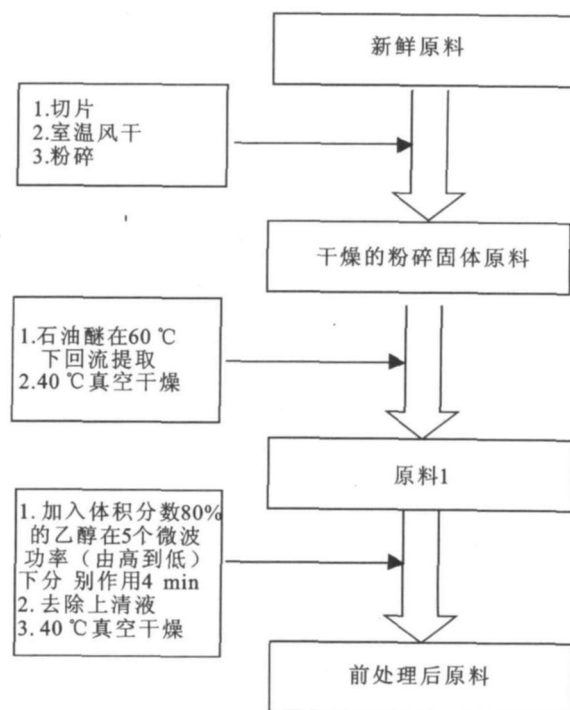


图1 原材料预处理流程图

Fig.1 Flow chart of pretreatment of fresh materials

1.2.2 多糖测定方法 采用苯酚-硫酸法,具体参照文献[14]。精确移取葡萄糖标液(40 mg/L) 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL,依次置于9个试管中,再分别加入去离子水补至2.0 mL。摇匀后分别加入质量分数6%的苯酚1.0 mL和浓硫酸5.0 mL,室温静置10 min,摇匀。再静置20 min,以空白溶液作参比,分别于490 nm处测定吸光值(A)。标准曲线的线性回归方程为:

$$Y = 0.01376 \cdot X, R = 0.9997 \quad (1)$$

1.2.3 样品的均一性测定 为了避免样品差异掩盖微波辅助提取条件对提取率的影响,在进行微波提取前有必要对样品的均一性进行测定。根、茎和叶各取3份样品,每份5 g。加入250 mL去离子

水,浸泡 30 min 后,539 W 功率作用 10 min。用苯酚- 硫酸法测定每份样品中的多糖含量。

1.2.4 多糖的微波辅助提取 微波辅助提取多糖过程在常压下进行。称取 10 g 的预处理后的干燥样品置于反应皿中,加入相应体积的去离子水。浸泡 30 min 后,按均匀设计的相应操作条件进行提取。均匀设计操作条件见表 1。用苯酚- 硫酸法测定多糖含量。

表 1 均匀设计操作条件

Tab.1 Experimental design matrix

固液质量体积比/ (g: mL)	作用时间/ min	微波 功率/W
1: 50	14	700
1: 60	23	700
1: 70	32	539
1: 80	8	539
1: 90	17	385
1: 45	27	385
1: 55	35	231
1: 65	11	231
1: 75	20	119
1: 85	29	119

2 结果与分析

2.1 样品的均一性

经苯酚- 硫酸法测定,根、茎和叶中每份样品中多糖含量的标准偏差依次为 3.0%,5.0%和 2.5%,小于等于 5%。因此,可以认为样品均一。结果如表 2 所示。

表 2 样品的均一性

Tab.2 The homogeneity of the samples

样品	多糖的平均质量分数/ (mg/g)	标准差/ mg	RSD/ %
根	31.4	0.9	3.0
茎	19.7	1.0	5.0
叶	17.6	0.4	2.5

注:多糖含量表示为每克样品所含多糖的质量数。

2.2 提取溶剂的选择

介质吸收微波的能力主要取决于其介电常数、介质损失因子、比热和形状等。极性大的溶剂或目标成分,其吸收微波的能力强,反之弱^[8]。常用于微波辅助提取多糖的溶剂包括乙醇、甲醇和它们的水溶液。对于一个给定的微波功率,溶剂的相对介

电常数越大,释放的热量越多,加热越快。水作为微波辅助提取的溶剂,有高介电常数,具备很好的吸收微波能量的能力^[15]。因此,在本试验中,作者选择水作为微波辅助提取多糖的溶剂。

2.3 均匀设计回归分析

试验数据符合二阶多元模型。总的多元二阶模型如下:

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i x_i + \sum_{i=1}^3 a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 a_{ij} x_i x_j$$

(2)

式中 Y 指多糖得率,以提取得到的多糖质量与进行反应的预处理后样品质量的百分比值表示; x_i 和 x_j 表示自由变量,这里分别指固液比、提取时间和微波功率; a_0 , a_i , a_{ii} 和 a_{ij} 分别表示截距、一次项、二次项和交互项的回归系数。多糖的质量以苯酚- 硫酸法测得的多糖浓度与相应溶液体积的乘积表示。

根据设置的提取条件,进行了相关的提取试验,得到了不同条件下 3 种多糖的提取得率,采用软件 SAS 进行回归分析,分别得到如下根、茎和叶多糖得率的回归方程:

猕猴桃根多糖得率:

$$Y = 8.3226 - 0.63802x_2 - 47.092x_1^2 - 3.052 \times 10^{-5}x_3^2 + 46.05823x_1x_2 + 1.65905x_1x_3 + 2.3883 \times 10^{-4}x_2x_3,$$

$$R^2 = 0.9779$$

(3)

猕猴桃茎多糖得率:

$$Y = -27.26774 + 2266.2798x_1 + 0.58924x_2 + 0.02493x_3 - 667.32x_1^2 - 9.13 \times 10^{-2}x_2^2 - 1.853 \times 10^{-5}x_3^2 - 3.4353 \times 10^{-4}x_2x_3,$$

$$R^2 = 0.9732$$

(4)

猕猴桃叶多糖得率:

$$Y = -7.53447 + 480.79611x_1 + 0.26951x_2 + 1.549 \times 10^{-2}x_3 - 11.225x_1^2 - 4.77 \times 10^{-3}x_2^2 - 9.62 \times 10^{-6}x_3^2 - 0.24649x_1x_3 - 9.376 \times 10^{-5}x_2x_3,$$

$$R^2 = 0.9935$$

(5)

式中自变量与应变变量表示与式(2) 相同。由上面 3 个方程,可以计算得到不同条件下,3 种多糖的提取率,3 种多糖得率实验值与方程的计算值偏差均小于 5%。

为了得到最优的操作条件,对回归方程中的 x_1 , x_2 和 x_3 求偏导,联立方程求解,在导数等于零时求得极大值,如表 3 所示。

由于受所采用的微波率固定功率的限制,作者选取最接近的微波功率替代计算得到的最佳微波功率。实际可行的优化操作条件如表 4 所示。

表 3 从回归方程中得到的极值

Tab.3 Extremes obtained from the equations

样品	固液质量体积比 $x_1/(g/mL)$	时间 x_2/min	微波功率 x_3/W
根	0.016 9	24	422.2
茎	0.017 0	23.8	452.5
叶	0.016 1	23.5	484.4

表 4 实际采用的最优的操作条件

Tab.4 The Actual optimum operating conditions

样品	固液质量体积比/ (g/mL)	时间/ min	微波功率/ W
根	0.016 9	24	385
茎	0.017 0	23.8	539
叶	0.016 1	23.5	539

2.4 验证试验

根据回归方程计算得到的实际选取的优化操作条件下的多糖得率与该条件下的试验值如图 3 所示。两者的偏差依次为 4.4%、19.5% 和 0。因此,所得到的回归方程可以较好地预测根和叶在不同操作条件下的多糖得率。

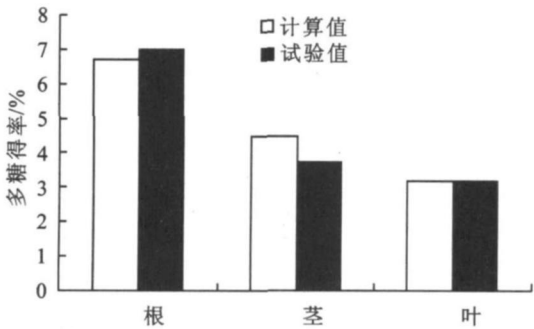


图 3 实际优化操作条件下的试验值与计算值比较

Fig.3 Experimental and calculated values of polysaccharide yield under optimal operating conditions

3 讨 论

微波辅助提取技术具有快速、高效、安全、节能的优点,近年已被广泛应用于植物成分的提取。微波作用于细胞,使胞内温度迅速升高,水汽化,胞内的压力升高,致使细胞破裂,使胞内物质自由流出,溶于提取剂中。其中影响微波提取的最主要的因素有溶剂种类、提取时间、微波功率以及固液质量体积比等等^[8]。

在确定了水为溶剂后,作者主要考虑的就是固液质量体积比、提取时间和微波功率 3 个参数,对此进行优化,可得到相应的提取操作条件。在优化的操作条件下中华猕猴桃根、茎、叶多糖的得率依次为 7.0%、3.7% 和 3.2%。作者在之前的工作中也曾对中华猕猴桃根、茎、叶多糖采用了传统的水浴回流提取,其多糖得率依次为 0.64%、1.85% 和 2.0%。吴瑾瑾^[11]曾用超声波辅助方法从中华猕猴桃根、茎和叶中提取多糖,其提取率依次只有 0.544%、1.814% 和 0.405%,这些提取率已经比传统热水提取多糖得率要高。而作者采用的微波辅助提取方法,已明显优于超声波辅助提取法和传统提取法,是超声波辅助提取法的多糖得率的 12.9、2.0 和 7.9 倍。

另外,利用微波辅助提取方法从 3 种原料中均可以提取得到多糖,其中根的多糖含量最高,叶子的多糖含量次之,而茎中的多糖含量相对较低。但根是植物的不可或缺的关键生长部位,而茎、叶则较易获取。因此,如果后续的多糖结构分析和药理研究显示 3 种多糖具有可比性,则以茎、叶代替根作为药材来源则更有现实意义。

参考文献(References):

[1] Noboru M, Yoshiaki S, Masami K, et al. Cancer prevention and therapy with kiwifruit in Chinese folklore medicine: a study of kiwifruit extracts[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2002, 81(3) : 357- 364.

[2] 吴怀恩, 甄汉深, 钟振国. 猕猴桃属植物的研究进展[J]. 中药材, 2004, 27: 59- 63.
WU Hua-en , ZENG Han-shen, ZHONG Zhen-guo. The development of Actindia research[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2004, 27: 59- 63. (in Chinese) .

[3] 林佩芳, 张菊明, 徐杭明, 等. 中华猕猴桃多糖复合物的抗肿瘤作用[J]. 中华肿瘤杂志, 1988, 10(6): 441- 443.
LIN Pei-fang, ZHANG Ju-ming, XU Hang-ming, et al. The anti-tumor effect of polysaccharide from *Actinidia chinensis* [J]. **Chinese Journal of Oncology**, 1988, 10(6): 441- 443. (in Chinese)

[4] 侯芳玉, 陈飞, 陆意, 等. 长白山产软枣猕猴桃茎多糖抗感染和抗肿瘤作用的研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(5) : 472- 474.

- HOU Fang-yu, CHEN Fei, LU Yi, et al. Studies on anti infective and antitumor effects of actinidia arguta stem polysaccharide(AASP)[J]. **Journal of Norman Bethune University of Medical Sciences**, 1995, 21(5): 472–474. (in Chinese)
- [5] 卢丹, 俞立超, 姚善涇. 中华猕猴桃果多糖的分离纯化与抗肿瘤试验研究[J]. **食品科学**, 2005, 26(2): 213–215.
- LU Dan, YU Li-chao, YAO Shan-jing. Studies on purification and antitumor activity of fruit polysaccharide isolated from *Chinensis Actinidia* planch[J]. **Food Science**, 2005, 26(2): 213–215. (in Chinese)
- [6] Samia A A, Morris J S, Koirtiyohann S R. Wet ashing of some biological samples in microwave oven[J]. **Analytical Chemistry**, 1975, 47: 1475–1477.
- [7] Letellier M., Budzinski H. Microwave-assisted extraction of organic compounds[J]. **Analusis**, 1999, 27: 259–271.
- [8] 黎海彬, 王邑, 李俊芳, 等. 微波辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J]. **现代食品科技**, 2005, 21(3): 148–150.
- LI Hai-bin, WANG Yong, LI Jun-fang, et al. Application of microwave-assisted extraction technology to extraction of natural products[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2005, 21(3): 148–150. (in Chinese)
- [9] 张自萍. 微波辅助提取技术在多糖研究种的应用[J]. **中草药**, 2006, 37(4): 630–632.
- ZHANG Zi-ping. The application of microwave assisted extraction in polysaccharides[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2006, 37(4): 630–632. (in Chinese)
- [10] 王岸娜, 吴立根. 猕猴桃多糖提取工艺的研究[J]. **食品研究与开发**, 2008, 29(2): 73–75.
- WANG An-na, WU Li-gen. Studies on the extraction technics of polysaccharide of kiwifruit[J]. **Food Research and Development**, 2008, 29(2): 73–75. (in Chinese)
- [11] 吴瑾瑾, 石森林, 张小寅, 等. 浙产猕猴桃属植物根、茎、叶中多糖的比较[J]. **中草药**, 2006, 37(7): 1099–1100.
- WU Jin-jin, SHI Sen-lin, ZHANG Xiao-yin, et al. Comparing the content of the polysaccharides from root, stem and leaf of kiwifruit of Zhejiang province[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2006, 37(7): 1099–1100. (in Chinese)
- [12] 赵云生, 严铸云, 李占林, 等. 晋产远志品种资源多糖含量测定[J]. **时珍国医国药**, 2005, 16(9): 867–868.
- ZHAO Yun-sheng, YAN Zhu-yun, LI Zhan-lin, et al. The determination of polysaccharide's content in the different *polygalatenuifolia* wild resoures from Shanxi[J]. **LiShizhen Medicine and Materia Medica Research**, 2005, 16(9): 867–868. (in Chinese)
- [13] 陈萍, 路波, 成东生. 苦竹叶多糖含量定量分析方法研究[J]. **药物分析杂志**, 2006, 26(3): 319–321.
- CHEN Ping, LU Bo, CHEN Dong-sheng. Study on determination of polysaccharide in *Pleioblastus amarus* Kengf[J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2006, 26(3): 319–321. (in Chinese)
- [14] 于村, 丁钢强, 俞莎, 等. 香菇多糖测定的方法学研究[J]. **中国公共卫生**, 2000, 16(3): 245–246.
- YU Cun, DING Gang-qiang, YU Sha, et al. The method research of Lentinan determination[J]. **China Public Health**, 2000, 16(3): 245–246. (in Chinese)
- [15] ZHU Xiaolan, SU Qing-de, CAI Ji-bao, et al. Optimization of microwave-assisted solvent extraction of volatile organic acids in tobacco and its comparison with conventional extraction methods[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2006, 579(1): 88–94.

(责任编辑: 朱明)