

超声波辅助提取金钗石斛多糖工艺优化研究

邓维泽¹, 唐显福², 古霞¹, 闫天龙¹, 杨文字¹, 李明元^{*1,2}

(1. 西华大学 生物工程学院 / 四川省食品生物技术重点实验室, 四川 成都 610039; 2. 贵州赤水仙草生物科技有限公司, 贵州 赤水 564700)

摘要: 优化超声波辅助提取金钗石斛多糖工艺。以多糖提取率为考察指标, 用苯酚-硫酸法测定多糖的含量, 采用单因素试验正交试验法考察了料液比、超声波提取功率、提取温度和提取时间对金钗石斛多糖提取率的影响。超声波辅助提取金钗石斛多糖的最佳提取工艺条件为: 料液质量体积比 1 g:15 mL, 超声波提取功率为 450 W, 超声波提取温度为 60 ℃, 超声波提取时间为 50 min, 在此条件下多糖得率为 3.11%。

关键词: 金钗石斛多糖; 提取; 工艺优化; 正交试验

中图分类号: R 931.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)10—1101—06

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl.

DENG Weize¹, TANG Xianfu², GU Xia¹, YAN Tianlong¹, YANG Wenyu¹, LI Mingyuan^{*1,2}

(1. College of Bioengineering / Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan Province, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. Guizhou Chishui Xian Cao Biological Technology Co., Ltd, Chishui 564700, China)

Abstract: The study aimed to optimize the ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. Using extraction rate as evaluation index, the polysaccharide content was assayed by the phenol-sulfuric method. Based on the orthogonal test, the optimal ultrasonic-assisted extraction conditions were: material-liquid ratio 1:15 (g/mL), extraction power 450 W, temperature 60 ℃ and time 50 min. With the optimal conditions, the extraction rate of polysaccharides was up to 3.11%.

Keywords: *Dendrobium nobile* Lindl. polysaccharides, extraction, process optimization, orthogonal test

金钗石斛, 俗称扁金钗, 为兰科石斛属多年生附生草本植物^[1], 是我国传统名贵中药, 因其生长在特殊的环境和具有强大的滋补功效而成为“中国九

大仙草”之一。金钗石斛可“益胃生津、补肾益力、延年益寿”, 具有抗衰老、增强免疫力等功效^[2-4], 其主要的功效成分是石斛碱及多糖类物质。金钗石斛是

收稿日期: 2014-09-17

基金项目: 贵州省遵义市中药重大专项赤中药科合(201306)。

* 通信作者: 李明元(1965—), 男, 四川泸州人, 农学博士, 教授, 主要从事食品质量安全及营养保健研究。

E-mail: limingyuan 519@qq.com

国家批准可用于保健食品的物品名单之一。目前,对于金钗石斛研究大多集中在石斛碱上,对于金钗石斛多糖的研究鲜见报道。作者利用超声波法辅助提取金钗石斛多糖,并通过正交试验优化提取工艺,为进一步金钗石斛多糖的分离纯化及其活性的研究提供一定的基础,为金钗石斛多糖的开发及其相关产品的研发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

金钗石斛:贵州赤水仙草生物科技有限公司提供。烘干、粉碎,过40目筛,备用;透析袋:成都奥克生物技术有限公司产品。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 UV2800 紫外可见分光光度计:上海舜宇恒平科学仪器有限公司产品;KQ-700DE 型超声波数控清洗仪:上海沪沁仪器设备有限公司产品;RE-52A 型旋转蒸发器:上海亚荣生化公司产品;Alpha-2LD plus 冷冻干燥机:德国 CHRIST 公司产品。

1.2.2 主要试剂 无水葡萄糖、苯酚、硫酸、石油醚、无水乙醇、丙酮、正丁醇、氯仿,均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 试验样品的前处理 称取金钗石斛干燥粉末,置于索氏提取器中,加入6倍体积石油醚80℃回流提取1h,滤渣挥干溶剂,加入10倍体积分数80%乙醇,70℃回流提取2次,每次1h,趁热抽滤,滤渣挥干溶剂,60℃干燥至恒重备用。

1.3.2 金钗石斛粗制多糖的制备 称取1.3.1中的样品50g,加入500mL蒸馏水,超声波提取(超声温度60℃,超声时间60min,超声功率300W),趁热过滤,减压浓缩,加入无水乙醇使溶液含乙醇体积分数至80%,静止过夜,离心得沉淀冷冻干燥即为金钗石斛粗制多糖。

1.3.3 金钗石斛精制多糖的制备 将1.3.2中的金钗石斛粗制多糖加蒸馏水溶解,溶液用活性炭除色素,Sevage法除去蛋白质,反复操作直至紫外-可见光扫描无明显蛋白质吸收峰为止。用透析袋48h流水透析,蒸馏水透析24h,除去无机盐、小分子杂质及未除尽的色素,将透析袋内多糖液醇沉,离心得沉淀,无水乙醇、丙酮各洗2遍,真空冷冻干燥至恒重即金钗石斛精制多糖^[5-6]。

1.3.4 金钗石斛多糖含量的测定方法 金钗石斛多糖测定采用改进的苯酚-硫酸法^[7],在490nm处测定吸光值,计算多糖含量。精确称取105℃干燥至恒重的葡萄糖标准品1.000g,用蒸馏水定容至100mL,摇匀,配置成10mg/mL的葡萄糖标准储备液。精确取葡萄糖标准储备液1.0mL于100mL容量瓶,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,分别吸取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8mL于9支比色管中,分别以水补至2.0mL,另取1支比色管加入2.0mL蒸馏水,作为空白对照,然后各自加入质量分数5%苯酚溶液,摇匀,迅速加入5.0mL浓硫酸,混匀后,置于40℃水浴中加热30min,冷水冷却至室温,在波长490nm处测定吸光值。以葡萄糖的质量浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标作标准曲线,回归方程 $Y=0.08972X-0.0046$ ($R^2=0.9991$)。

1.3.5 换算因子的测定 精确称取干燥至恒重的金钗石斛精制多糖2.5mg于50mL容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀。从中精确吸取2.0mL,按“1.3.4”的方法测定吸光值,根据标准曲线回归方程计算多糖质量浓度,按下式计算换算因子 $f=(C_0/C)$ 。 C_0 为实际金钗石斛多糖的质量浓度, C 为根据标准曲线计算出的质量浓度。由计算的结果可得换算因子 $f=1.32$ ($n=3$),纯度 $=1/f=1/1.32=75.76\%$ 。

1.3.6 金钗石斛多糖得率测定 取金钗石斛提取工艺中制备的多糖稀释液2mL,按“1.3.4”操作,测定吸光值,根据标准曲线计算多糖稀释液的质量浓度。金钗石斛多糖得率 $=(f \cdot C \cdot N \cdot V/m)$;式中 f 为换算因子, C 为根据标准曲线计算出的多糖稀释液质量浓度值, N 为稀释倍数, V 为提取工艺中的滤液体积, m 为试验样品的质量。

1.3.7 金钗石斛多糖提取单因素试验 准确称取前处理干燥的金钗石斛粉3.0g,放入200mL的锥形瓶中,以水作为提取溶剂,在其他条件相同的情况下,采用不同的料液比、超声波功率、提取时间、提取温度进行超声波辅助提取试验,然后趁热过滤,精确测定滤液体积(V)。用移液管精确移取1mL滤液于50mL的容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度(稀释倍数 N),用“1.3.4”的方法测定金钗石斛多糖的质量浓度,计算金钗石斛多糖得率,逐个考察各提取条件对提取效果的影响,确定每一因素的最佳水平。

1.3.8 金钗石斛多糖提取正交试验 根据1.3.7单

因素试验结果,选取料液比、超声波功率、时间、温度 4 个因素及 3 个最佳水平进行正交试验 $L_9(3^4)$, 超声波辅助提取后按“1.3.4”的方法测定金钗石斛多糖的质量浓度,并计算多糖得率,确定金钗石斛多糖提取的最佳条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对多糖得率的影响 在超声波功率 400 W、超声波提取温度 50 ℃、超声波提取时间 50 min 的条件下,依 1.3.7 的试验方法,研究料液质量体积比对多糖得率的影响,结果如图 1 所示。当料液质量体积比大于 1 g:20 mL 时,金钗石斛多糖提取率随料液比的减小而提高,当料液质量体积比小于 1 g:20 mL 时,金钗石斛多糖提取率随料液比继续减小,反而出现多糖提取率稍微下降的情况,从实验条件和后期处理成本出发,选择 1 g:20 mL 为最佳料液质量体积比。

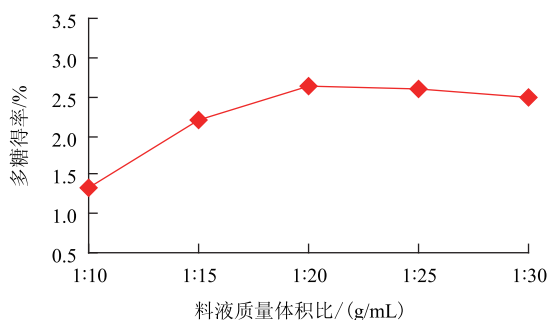


图 1 料液质量体积比对多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of polysaccharides

2.1.2 超声波提取功率对多糖得率的影响 在料液质量体积比 1 g:20 mL、超声波提取温度 50 ℃、超声波提取时间 50 min 的条件下,依 1.3.7 的试验方法,研究超声波提取功率为 300、350、400、450、500、550 W 时对多糖得率的影响,结果如图 2 所示。由图 2 可知,金钗石斛多糖提取率随着超声波提取功率增大,先增大而后减小的趋势,在超声波功率低于 450 W 时,多糖得率随超声波功率的增大而提高,在超声波功率高于 450 W 时多糖得率又随超声波功率的增大而降低,可能是由于大的超声波提取功率所产生机械效应作用使多糖的糖苷键被打断,多糖结构被破坏,使多糖得率降低^[8-9]。因此选择

450 W 为最佳超声波提取功率。

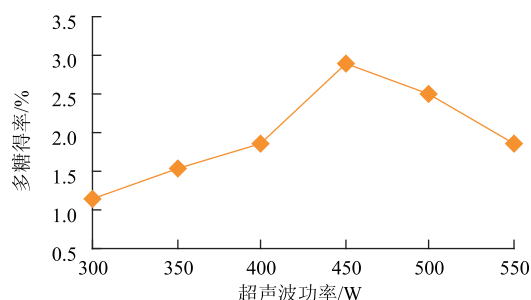


图 2 超声波提取功率对多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic power on extraction rate of polysaccharides

2.1.3 超声波提取温度对多糖得率的影响 在料液质量体积比 1 g:20 mL、超声波提取功率 450 W、超声波提取时间 50 min 的条件,依 1.3.7 的试验方法,研究超声波提取温度为 40、50、60、70、80 ℃时对多糖得率的影响,结果如图 3 所示。由图 3 可知,金钗石斛多糖提取率随着超声波提取温度的升高而增大,在 40~60 ℃时,多糖得率随温度的升高而呈显著性增加,在 60 ℃以后,多糖得率随温度的升高而极度缓慢的增加,从节约能源角度考虑,因此选择 60 ℃为最佳超声波提取温度。

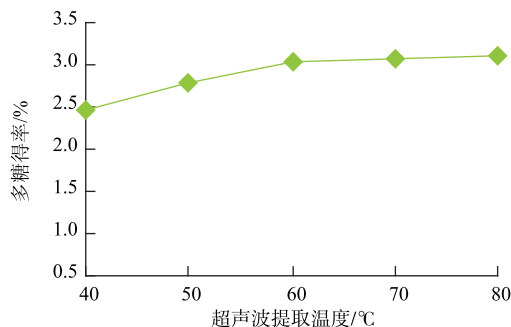


图 3 超声波提取温度对多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic treatment time on extraction rate of polysaccharides

2.1.4 超声波提取时间对多糖得率的影响 在料液质量体积比 1 g:20 mL、超声波提取功率 450 W、超声波提取温度 60 ℃的条件,依 1.3.7 的试验方法,研究超声波提取时间为 10、30、50、70、90 min 时对多糖得率的影响,结果如图 4 所示。在超声波提取时间 10~50 min 的范围内,随着提取时间的延长,金钗石斛多糖提取率也随之提高,但是超过 50 min 后,继续延长超声波提取时间,金钗石斛多糖得

率不再提高反而降低。这可能是超声波处理时间短,多糖溶出不完全;处理时间过长,可能会对破坏多糖结构,影响金钗石斛多糖得率。因此选择 40~60 min 之间为最佳的超声波提取时间。

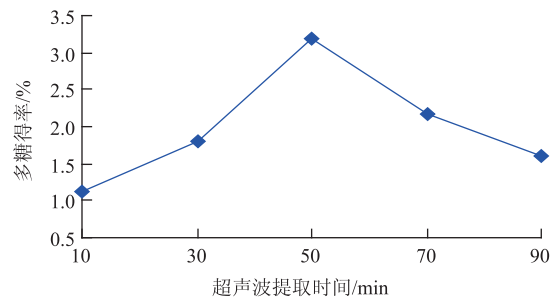


图 4 超声波提取时间对多糖得率的影响
Fig. 4 Effect of ultrasonic treatment temperature on extraction rate of polysaccharide

2.2 正交试验结果

金钗石斛多糖提取效果受多个因素的交叉影响。上述试验只是单因素影响,为了确定在提取过程中这 4 个因素对金钗石斛多糖提取效果的影响大小,选出最佳的提取条件。依“1.3.8”的试验方法,正交试验设计见表 4,正交试验结果见表 5 所示。

由表 5 可知,从极差 R 的大小可以看出影响金钗石斛多糖提取的 4 个因素的主次关系是:超声波提取功率>超声波提取时间>料液质量体积比>超声波提取温度。因素 C 的极差很小,所以将此列作为方差分析的误差列^[10],结果见表 6。 F 检验表明, B 因素(超声波提取功率) $P<0.01$, D 因素(超声波提取时间) $P<0.05$,说明在 B 因素所设的不同水平下对金钗石斛提取效果有极显著性差异,在 D 因素所设不同水平下有显著性差异,其他因素各水平间差异均不显著。

从正交试验结果可以看出金钗石斛多糖得率最高的提取组合是 $A_1B_2C_2D_2$,即料液质量体积比为 1 g:15 mL,超声波提取功率为 450 W,超声波提取温度为 60 ℃,超声波提取时间为 50 min。单因素试验中的 4 个单因素的最佳组合为 $A_2B_2C_2D_2$,即料液质量体积比为 1 g:20 mL,超声波提取功率为 450 W,超声波提取温度为 60 ℃,超声波提取时间为 50 min。下面对两者进行比较:提取功率、提取温度、提取时间相同,料液质量体积比的差异性不显著,可以忽略不计。考虑小的料液质量体积比会给后续提取液的浓缩带来困难以及节约能源,所以选择 1 g:

15 mL 的料液质量体积比更科学,更合理。综上所述,本试验条件下确定最最佳的提取条件为料液质量体积比为 1 g:15 mL,超声波提取功率为 450 W,超声波提取温度为 60 ℃,超声波提取时间为 50 min。

表 4 正交试验 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 表
Table 4 Four factors and three levels of $L_9(3^4)$ of the orthogonal test

水平	A 料液质量体积比/(g:mL)	B 超声波功率/W	C 超声波提取温度/℃	D 超声波提取时间/min
1	1:15	400	50	40
2	1:20	450	60	50
3	1:25	500	70	60

表 5 正交试验结果的直观分析表
Table 5 Results of the orthogonal test

序号	因素				多糖得率/%
	A 料液质量体积比/(g:mL)	B 超声波功率/W	C 超声波提取温度/℃	D 超声波提取时间/min	
1	1	1	1	1	1.49
2	1	2	2	2	3.11
3	1	3	3	3	2.41
4	2	1	2	3	2.27
5	2	2	3	1	2.95
6	2	3	1	2	2.77
7	3	1	3	2	2.22
8	3	2	1	3	3.09
9	3	3	2	1	2.26
k_1	2.337	1.993	2.450	2.233	—
k_2	2.663	3.050	2.547	2.700	—
k_3	2.523	2.480	2.527	2.590	—
R	0.327	1.057	0.097	0.467	—

表 6 方差分析表
Table 6 Analysis of Variance table

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
A	0.161	2	0.081	10.316	>0.05
B	1.678	2	0.839	107.430	<0.01
误差	0.016	2	0.008	—	—
D	0.357	2	0.179	22.858	<0.05

3 结 语

1) 通过单因素及正交试验得出了超声波辅助提取金钗石斛多糖的最佳提取工艺条件为:料液质量体积比 1 g:15 mL, 超声波提取功率为 450 W,超声波提取温度为 60 ℃,超声波提取时间为 50 min。在此条件下金钗石斛多糖的提取得率达 3.11%,各个因素对金钗石斛多糖得率的影响作用大小顺序

依次为超声波提取功率>超声波提取时间>料液比>超声波提取温度,这为金钗石斛多糖的深入研究提供一定的理论依据。

2) 金钗石斛多糖超声波辅助提取法与热水回流提取法、水煎煮提取法比较见表 7。

3) 超声波辅助提取是否影响金钗石斛活性多糖的结构、破坏金钗石斛多糖的生物活性,还值得以后做进一步的研究和论证。

表 7 不同金钗石斛多糖提取法比较

Table 7 Comparison of different extraction methods for *Dendrobium nobile* Lindl. polysaccharides

	超声波辅助提取法	热水回流提取法 ^[5]	水煎煮提取法 ^[11]
最佳工艺条件	料液质量体积比 1 g:15 mL, 超声波提取功率 450 W, 超声波提取温度 60 ℃, 超声波提取时间 50 min	料液质量体积比 1 g:45 mL, 提取温度为 90 ℃, 提取时间 2.5 h	金钗石斛饮片用 10 倍量的水煎煮提取 3 次, 每次 1.5 h
金钗石斛多糖得率	3.11%	2.80%	1.33%
优点	多糖提取率高、能源消耗少、提取周期短	操作、仪器简单	操作、仪器简单
缺点	需超声波设备	能源消耗高、提取周期长	多糖得率低、能源消耗高

参考文献:

[1] 王康正, 高文远. 石斛属药用植物研究进展[J]. 中草药, 1997, 28(10): 633-635.
WANG Kangzheng, GAO Wenyuan. Current status in studies of *Dendrobium* of medicinal plants [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1997, 28(10): 633-635. (in Chinese)

[2] 张纪立, 何锦丽. 石斛药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(5): 469-470.
ZHANG Jili, HE Jinli. Current status in studies of *Dendrobium* pharmacology [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2000, 11(5): 469-470. (in Chinese)

[3] 黄玲, 施红, 章小宛, 等. 水提和醇提的石斛口服液对衰老药效学指标的影响[J]. 福建中医学院学报, 1996, 6(3): 27.
HUANG Ling, SHI Hong, ZHANG Xiaowan, et al. Effect of water & alcohol extracted dendrobium oral liquid on therapeutic indexes of anti-senility[J]. *Journal of Fujian Cpllege of TCM*, 1996, 6(3): 27. (in Chinese)

[4] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
CHEN Xiaomei, GUO Shunxing. Advance in the research of constituents and pharmacology of dendrobium[J]. *Natural Product Research and Development*, 2001, 13(1): 70-75. (in Chinese)

[5] 陈志国, 叶松山, 范迎, 等. 金钗石斛多糖提取工艺的优化及其对小鼠脾细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 28.
CHEN Zhiguo, YE Songshan, FAN Ying, et al. Optimization of extraction technology of polysaccharide from *dendrobium nobile* and effects on pro-liferation of mouse splenocytes [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2011, 17(15): 28. (in Chinese)

[6] 杨颖, 孙文武, 周晨, 等. 响应曲面法优化玉竹水溶性多糖提取及体外抗氧化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(3): 200-203.
YANG Yin, SUN Weiwu, ZHOU Cheng, et al. Optimization of water-soluble polysaccharides extraction from rhizome of *polygonatum odoratum* using response surface methodology and its antioxidant activities in vitro [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(3): 200-203. (in Chinese)

[7] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-552.
DONG Qun, ZHENG Liyi, FANG Jinian. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo-and polysaccharides[J]. *Chin Pharm J*, 1996, 31(9): 550-552. (in Chinese)

- [8] 刘航, 国旭丹, 马雨洁, 等. 超声波辅助提取苦荞麦多糖工艺优化及其体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2013, 14(34):45-47.
LIU Hang, GUO Xudan, MA Yujie, et al. Ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activity evaluation of polysaccharides from tartary buckwheat[J]. **Food Science**, 2013, 14(34):45-47. (in Chinese)
- [9] 杨润亚, 李维焕, 吕芳芳. 秀珍菇子实体多糖的提取工艺优化及体外抗氧化性[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(10):78-80.
YANG Rundong, LI Weihuan, LV Fangfang. Optimization of the extraction technique and the antioxidant activity of polysaccharides from pleurotus geesteranus[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(10):78-80. (in Chinese)
- [10] 王钦德, 杨坚, 明道绪. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010:116-117.
- [11] 陈丽琼, 傅蔚兰. 金钗石斛总多糖提取工艺研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2007, 5(4):24-26.
CHEN Liqiong, FU Weilan. Study on the extraction technology optimization of total polysaccharide from dendrobium nobile Lindl.[J]. **Chinese Medicine Modern Distance Education of China**, 2007, 5(4):24-26. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 2015 年第二届全国功能基因组学学术峰会

会议名称(英文): 2015 second national functional genomics Conference

开始日期: 2015-11-11

结束日期: 2015-11-12

所在城市: 北京市 朝阳区

主办单位: 百迈客研究院、全国卫生产业企业管理协会基因技术研究与应用专业委员会

承办单位: 北京百迈客生物科技有限公司

摘要截稿日期: 2015-11-05

全文截稿日期: 2015-11-05

联系人: 李俊

联系电话: 010-56440874、010-56440828

E-MAIL: lijun@biomarker.com.cn

通讯地址: 北京市顺义区南法信府前街 12 号顺捷大厦

邮政编码: 101300

会议注册费: 1200 元/人

会议网站: <http://www.360zyx.com/home-research-index-rid-59338.shtml>

会议名称(中文): 2015 年全国生物学、生物化学博士后学术论坛

开始日期: 2015-11-12

结束日期: 2015-11-13

所在城市: 湖北省 武汉市

具体地点: 华中农业大学

主办单位: 全国博士后管委会办公室 中国博士后科学基金会 湖北省人力资源和社会保障厅

承办单位: 华中农业大学

联系人: 任超

联系电话: 027-87280957

传真: 027-87384670

E-MAIL: bsh@mail.hzau.edu.cn

会议网站: <http://jj.chinapostdoctor.org.cn/Xslt/szdwlt.action?szdwid=100040016&forumid=abdfc3c0-2785-4029-aff6-0d3e55912708>