

# 超声法提取金叶女贞果实中多糖工艺的研究

王建安<sup>1</sup>, 苑光辉<sup>2</sup>, 李艳芝<sup>1</sup>, 付英杰<sup>1</sup>, 胡太鑫<sup>1</sup>, 赵琳<sup>1</sup>

(1. 济宁医学院药学院, 山东日照 276826)

(2. 莒县人民医院招贤分院, 山东莒县 276516)

[摘要] 为寻找金叶女贞果实多糖超声提取的最佳条件, 采用以金叶女贞多糖含量为考察指标, 用苯酚-硫酸法进行含量测定, 通过单因素及正交实验, 对提取时间、超声波频率、料液比、提取温度等提取因素进行研究。结果显示: 影响金叶女贞多糖提取率的因素依次为: 提取时间 > 超声频率 > 提取温度 > 料液比; 最佳提取工艺为: 提取温度 100℃, 料水比 1:30, 提取时间 80 min, 超声频率为 300 W。

[关键词] 金叶女贞, 多糖, 超声提取

[中图分类号] R931.6 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2012)04-0073-05

## Optimum Extraction of Polysaccharides From Fruits of *Ligustrum Vicaryi* by Ultrasonic Method

Wang Jianan<sup>1</sup>, Yuan Guanghui<sup>2</sup>, Li Yanzhi<sup>1</sup>, Fu Yingjie<sup>1</sup>, Hu Taixin<sup>1</sup>, Zhao Lin<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

(2. Zhaoxian Branch Hospital of Juxian Hospital, Juxian 276516, China)

**Abstract:** Objective: An ultrasonic method for the extraction of polysaccharides from *Ligustrum vicaryi* was investigated and optimized. Method: Using single factor and  $L_9(3^4)$  orthogonal design, the effects of ultrasonic time, ultrasonic frequency, extraction temperature and the ratio of solid to liquid were considered, the comprehensive evaluation was guided by the content of polysaccharides determined by phenol-sulfuric acid method. Result: The effects of 4 factors on extracting polysaccharides component in order were extraction time, ultrasonic frequency, extraction temperature, solid-liquid ratio. The optimum extracting conditions were: the ratio of solid to liquid was 1:30 (m/V); extraction time was 80 min; extraction temperature was 100℃, ultrasonic frequency was 300 W.

**Key words:** *Ligustrum vicaryi*, polysaccharides, ultrasonic extraction

金叶女贞(*Ligustrum vicaryi*)为木犀科女贞属常绿小灌木,是由加州金边女贞与欧洲女贞杂交育成的<sup>[1]</sup>,其同属植物女贞(*Ligustrum lucidum* Ait)的干燥成熟果实女贞子为常用中药<sup>[2]</sup>。经现代药理研究发现<sup>[3]</sup>,女贞子具有提高机体免疫功能、升高白细胞数量、降血糖血脂、抗菌消炎、降低眼压及保肝护肝和抗癌等作用。女贞子多糖是其中的有效成分之一。多糖是由 10 个以上多种单糖聚合而成的高分子物质。现代研究发现,多糖主要影响机体的网状内皮系统(RES)、巨噬细胞(M $\phi$ )、淋巴细胞、白细胞、自然杀伤细胞(NK)、补体系统以及 RNA、DNA 和蛋白质的合成、体内 cAMP 与 cGMP 的含量等,从而使得抗体的生成、淋巴因子及干扰素的诱生增强<sup>[4]</sup>。

目前多糖的提取方法有多种,传统的水浸提法操作简单,然而耗时长、耗能多、提取效率较低。超声波技术随着科学技术的发展已经投入到多种物质的提取中<sup>[5]</sup>。大量的资料表明,超声波的强烈搅拌、振动、空化作用可以破坏细胞结构,加速有效物质的溶出,不仅可以提高提取效率,而且可以大大缩短时间,节省能源<sup>[6]</sup>。作者在前期实验中发现,金叶女贞果实中齐墩果酸的含量高于药典对女贞子含量的规定<sup>[7]</sup>,但目前尚未有对多糖的报道。为进一步研究和开发利用新的药用植物资源,本研究以金叶女贞果实为研究对

收稿日期: 2012-05-28.

基金项目: 日照市科技发展项目(2011SF006)。

通讯联系人: 王建安, 硕士, 讲师, 研究方向: 药用植物资源与活性成分研究. E-mail: anansen@163.com

象,在单因素实验的基础上研究了超声提取过程中相关条件对金叶女贞果实多糖提取率的影响,对进一步优化多糖的提取工艺进行了探索,旨在建立一种快速、简便、有效的提取方法,为实际生产应用提供理论依据。

## 1 仪器、试剂和材料

### 1.1 仪器

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),LD-02 型高速中药粉碎机(中国温岭市大海药材器械厂),电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)等。

### 1.2 试剂

苯酚、葡萄糖、无水乙醇、浓硫酸、乙醚等均为分析纯试剂。

### 1.3 药材

金叶女贞果实采集于济宁医学院日照校区内,经鉴定为木犀科女贞属植物金叶女贞的果实。去除果柄等杂物,通风干燥后密闭保存,临用前于 80℃ 烘干至恒重后备用。

## 2 实验方法

### 2.1 多糖含量的测定方法

本实验采用苯酚-硫酸法<sup>[4]</sup>,以葡萄糖为标准样品。

### 2.2 最大吸收光波长的确定

分别吸取一定量的标准葡萄糖溶液样品,置于比色皿中,加水至 2 mL,加 1 mL 苯酚后,立即加入 5 mL 浓硫酸并混匀,室温显色 20 min。同时取 2 mL 水进行上述同样操作,作为空白对照。样品溶液分别于 200 nm ~ 800 nm 处测吸光度,确定其最大吸收峰所对应的波长。根据实验测定,当吸收光波长为 490 nm 时,样品溶液的吸光度最大,所以测定多糖含量时使用的吸收光波长应为 490 nm。

### 2.3 标准曲线的绘制

精密量取对照品溶液(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0) mL,分别置 100 mL 容量瓶中,定容、摇匀,配制成系列标准溶液;另加 5% 苯酚溶液 0.5 mL,摇匀,迅速滴加浓硫酸 3.5 mL,于 40℃ 水浴中保温 30 min,取出,置冰水浴中 5 min,取出,静置 10 min,在 490 nm 处测吸光度。以吸光度(Y)为纵坐标,溶液的浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标绘制标准曲线。得回归方程为  $Y = 17.106x - 0.0546$  ( $R^2 = 0.9995$ )。

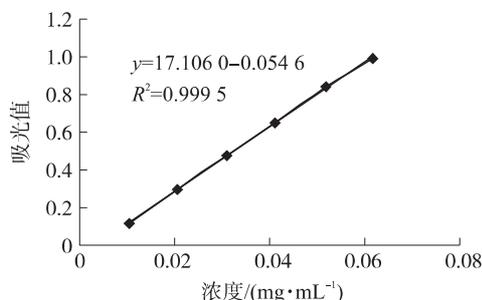


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

### 2.4 金叶女贞果实中多糖的提取工艺流程

将金叶女贞果实洗净后去杂质,在 80℃ 烘箱中烘干至恒重,粉碎过 40 目筛,得金叶女贞果实粉末。精密称取 500 g 粉末置于 150 mL 锥形瓶中,在一定的温度、功率、时间、料液比等条件下超声提取 2 次,离心取上清液。将 2 次离心后的上清液混合,减压浓缩至 30 mL,加入 25 mL 石油醚,冷凝回流脱脂。加入 0.2 倍体积的氯仿和 0.04 倍的正丁醇,混合震荡 15 min, 6000 r/min 离心 10 min 后取上清液,如此重复操作去除蛋白。然后加入 1.5% 活性炭,静置 30 min,脱色,抽滤,取滤液。向滤液中缓慢加入 4 倍体积的无水乙醇,使其含量达 80%,4℃ 过夜,抽滤,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤沉淀 2~3 次,静置过夜,抽滤,滤渣真空冷冻干燥,制备得粗多糖。

### 2.5 供试品溶液的制备

取干燥至恒重的金叶女贞总多糖,加水溶解并稀释至 100 mL,摇匀,即得供试品溶液。

### 2.6 供试品总多糖含量的测定

精确量取供试品溶液 1 mL,按 2.3 项方法操作,测定吸光值(A),由标准曲线计算浓度,并计算从金叶女贞果实(干品)中提取总多糖的提取率。计算方法如下:

$$\text{多糖提取率}(\%) = \text{多糖质量浓度} \times \text{稀释倍数} / \text{金叶女贞果实总质量} \times 100\%$$

### 3 结果与分析

#### 3.1 超声功率对金叶女贞多糖得率的影响

精密称取过 40 目筛的金叶女贞果实细粉 5.00 g, 料液比 1:20, 常温静置 3 h 后, 提取温度 90℃, 分别在 (100、200、300、400、500) W 功率下进行提取 40 min, 考察超声功率对多糖得率的影响, 按 2.4 项方法测定多糖得率。一般来说, 超声波的功率越高越容易获得较大的声强, 但超声强度对提取物得率的影响却不能一概而论, 要考虑超声波与介质相互作用的程度和提取物的性质。由图 2 可知, 在功率范围 100 W ~ 400 W 内, 随着超声波功率提高, 金叶女贞多糖得率上升, 功率为 400 W 时多糖得率最高, 功率为 500 W 时多糖得率开始下降。说明在所选功率范围内, 功率为 400 W 时超声波与金叶女贞相互作用的程度最大, 此功率最有利于金叶女贞多糖的提取。

#### 3.2 超声时间对金叶女贞多糖提取率的影响

精密称取过 40 目筛的金叶女贞果实细粉 5.00 g, 料液比 1:20, 常温静置 3 h 后, 置于 90℃, 400 W 超声波进行提取 (20、40、60、80、100) min, 按 2.4 项方法处理, 计算多糖得率。

由图 3 可知, 多糖得率在 20 min ~ 60 min 随着超声波作用时间的增加而提高。说明随着作用时间的增加, 细胞壁破碎效果增强, 多糖溶出量增多。超声时间为 60 min 时, 多糖得率最高, 后随时间的增加, 多糖得率反而呈下降趋势, 可能是时间过长使多糖的结构破坏而致。

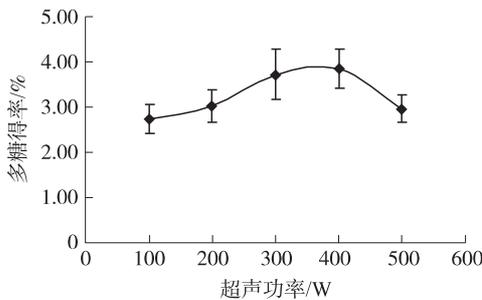


图 2 超声功率对多糖得率的影响

Fig. 2 Effects of extracting frequency on the extraction yield of polysaccharide

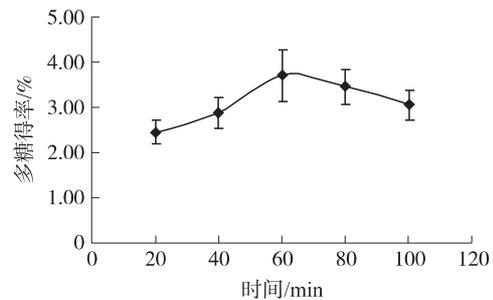


图 3 超声时间对多糖得率的影响

Fig. 3 Effects of extracting time on the extraction of polysaccharides

#### 3.3 提取温度对金叶女贞多糖得率的影响

取 40 目金叶女贞果实粉末 500 g, 于超声功率为 400 W、料液比为 1:20 研究提取温度对金叶女贞多糖得率的影响。超声波作用对物料会产生加热作用, 但确切反应温度却与许多因素有关, 如超声波功率、超声波作用时间等。由图 4 可知, 在 60℃ ~ 100℃ 范围内, 随着温度的提高, 多糖得率逐渐增大, 但为了防止多糖在高温下降解, 故本实验一律采用 90℃ 进行提取。

#### 3.4 料液比对金叶女贞多糖提取率的影响

取 40 目金叶女贞果实粉末 500 g, 在温度为 90℃、超声功率为 400 W 条件下, 研究料液比对金叶女贞多糖得率的影响。由图 5 可知, 在料液比不断增加时, 多糖得率随之增加。在 V/W 为 1:30 时, 多糖得率达

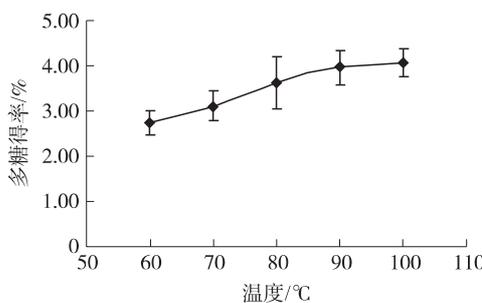


图 4 温度对多糖得率的影响

Fig. 4 Effects of extracting temperature on the extraction of polysaccharides

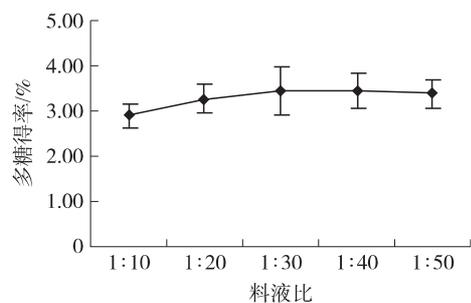


图 5 料液比对多糖得率的影响

Fig. 5 Effects of solid-liquid ratio on the extraction of polysaccharides

到最高,当料液比继续增加时,得率未见明显变化.向鸣等认为在较高料液比情况时<sup>[8]</sup>,单位体积分子受超声波的作用减少,影响植物细胞破壁,从而多糖含量降低.且高料液比为后续的回收等工作增加了成本,因此在后续正交试验中选择1:20、1:30、1:40料液比进行进一步优化.

### 3.5 正交试验

为了获得金叶女贞多糖的最佳提取条件,根据单因素实验结果,选取超声时间(A)、温度(B)、料液比(C)、超声功率(D)为考察因素,实验设计见表1.正交实验采用4因素3水平实验设计,即 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验,每个实验重复3次.

表1 正交实验因素与水平

| 水平 | 因素       |      |      |        |
|----|----------|------|------|--------|
|    | 超声时间/min | 温度/℃ | 料液比  | 超声功率/W |
| 1  | 40       | 80   | 1:20 | 200    |
| 2  | 60       | 90   | 1:30 | 300    |
| 3  | 80       | 100  | 1:40 | 400    |

表2  $L_9(3^4)$ 正交实验设计及结果Table 2  $L_9(3^4)$  orthogonal design and results

| 试验号 | 超声时间/min | 温度/℃  | 料液比   | 超声功率/W | 多糖得率/% |
|-----|----------|-------|-------|--------|--------|
| 1   | 1        | 1     | 1     | 1      | 2.84   |
| 2   | 1        | 2     | 2     | 2      | 3.42   |
| 3   | 1        | 3     | 3     | 3      | 2.79   |
| 4   | 2        | 1     | 3     | 2      | 3.31   |
| 5   | 2        | 2     | 1     | 3      | 3.89   |
| 6   | 2        | 3     | 2     | 1      | 4.02   |
| 7   | 3        | 1     | 2     | 3      | 4.21   |
| 8   | 3        | 2     | 3     | 1      | 3.68   |
| 9   | 3        | 3     | 1     | 2      | 4.43   |
| I   | 3.017    | 3.453 | 3.513 | 3.720  |        |
| II  | 3.740    | 3.663 | 3.720 | 3.883  |        |
| III | 4.107    | 3.747 | 3.630 | 3.260  |        |
| R   | 1.090    | 0.294 | 0.207 | 0.623  |        |

从表2可以得到超声波提取金叶女贞多糖的最佳因素组合为: $A_3B_3C_2D_2$ ,即温度为100℃、超声波功率为300W、作用时间为80min、料液比为1:30.各因素对多糖提取的影响大小为:时间>功率>温度>料液比,即时间为重要影响因素,其结果达到显著水平( $P < 0.05$ ),而功率、温度及料液比的影响相对较小.

方差分析显示(见表3),超声提取时间对金叶女贞多糖提取率具有显著的影响( $P < 0.05$ ),而其他因素均未达到显著水平( $P > 0.05$ ).

表3 正交实验结果方差分析表

Table 3 The table of variance analysis of orthogonal test

| 因素 | 自由度 df | 偏差平方和 | F比     | F临界值   | 显著性 |
|----|--------|-------|--------|--------|-----|
| A  | 2      | 1.846 | 28.844 | 19.000 | *   |
| B  | 2      | 0.137 | 2.141  | 19.000 |     |
| C  | 2      | 0.064 | 1.000  | 19.000 |     |
| D  | 2      | 0.627 | 9.797  | 19.000 |     |
| 误差 | 0.06   |       |        |        |     |

为考察上述优选工艺条件的稳定性,按 $A_3B_3C_2D_2$ 组合重复实验3次,实验结果均优于正交实验表中任何一组,平均提取率为4.49%.因此,认为此正交实验得出的优化水平是可靠的,其方法可行.

## 4 讨论

超声波提取法在中草药化学成分提取中的应用已经显示出明显的优势,具有省时、节能、提取率高等优点<sup>[9]</sup>.超声的作用原理为利用超声波的空化现象,空化产生的极大压力造成被破碎物细胞壁及整个生物体破裂,而且整个破裂过程在瞬间完成;同时超声波产生的振动作用加强了细胞内物质的释放、扩散及溶解,加速植物中的有效成分进入溶剂,使其进一步增大了有效成分的溶出.除空化和振动作用外,超声波的许多次级效应,如乳化、扩散、化学效应等也有利于植物中有效成分的转移,并充分和溶剂混合,促进提取的进行<sup>[10]</sup>.

多糖广泛存在于自然界,是多种中草药的有效成分之一,具有多种生物活性,是理想的免疫增强剂。它能提高机体免疫系统的功能,而对正常细胞没有毒副作用,在抗肿瘤、抗病毒、抗衰老等药物研究中,多糖类药物的研制已成为当今世界新药的发展方向之一<sup>[11]</sup>。本实验利用超声波辅助热水,从金叶女贞的果实中提取多糖类化合物,采取单因素试验和正交试验对总多糖的提取工艺进行了研究。实验结果发现,在粉碎粒40目、提取温度100℃、料液比1:30、提取时间80 min、超声频率为300 W的条件下,多糖得率最高,同时将该结果与传统水提法结果(提取率3.36%)进行比较,证明提取率高于传统方法。这为多糖类化合物的提取提供新的思路和方法,且提取工艺稳定,为今后的工业化生产和进一步研究提供参考,值得推广利用。

#### [参考文献]

- [1] 孙晓萍. 金叶女贞的引种栽培和园林价值[J]. 浙江林学院学报, 1995, 12(2): 156-160.
- [2] 陈红卫. 女贞子的研究进展[J]. 时珍国医国药, 1997, 8(4): 376-378.
- [3] 靳晓明, 董琳, 范峰, 等. 女贞子化学成分与药理作用的研究进展[J]. 中医药信息, 2008, 25(1): 40.
- [4] 张庆茹. 中草药免疫促进作用的研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 1997(5): 15.
- [5] 赵兵, 王玉春, 欧阳藩, 等. 超声波在植物提取中的应用[J]. 中草药, 1999, 30(9): 1-3.
- [6] 邬方宁. 超声提取技术在现代中药中的应用[J]. 中草药, 2007, 38(2): 315-316.
- [7] 王建安, 王慧云, 李艳芝, 等. 金叶女贞果实中齐墩果酸的提取与测定[J]. 食品工业科技, 2010, 31(11): 301-303.
- [8] 向鸣, 王晓君, 王维香. 超声波提取川芎多糖的工艺优选[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1621-1623.
- [9] 项昭保, 霍丹群, 仁绍光. 超声波在中草药化学成分提取中的应用[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 289-291.
- [10] 应崇福. 超声学[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 511.
- [11] 熊子仙. 植物多糖与保健[J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2004, 24(3): 41-44.

[责任编辑: 黄 敏]