

玉竹多糖的微波超声提取及其抗氧化研究

姜晓坤, 谷慧莹, 魏伶俐, 仲丛慧

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:以玉竹为原料, 水为溶剂, 微波和超声波辅助对玉竹中多糖进行提取, 在单因素实验基础上, 选取微波功率、超声温度、液料比为自变量, 玉竹多糖的提取率为响应值, 采用 Box-Behnken 中心组合设计和响应面分析法对其提取工艺进行研究; 并对提取的玉竹多糖的还原力、DPPH·和·OH 自由基的清除能力进行了测定。建立了回归方程的预测模型, 在乙醇浓度为 70%、超声时间为 8 min 时, 确定最佳提取条件为: 微波功率 250 W、超声温度 50℃、液料比 30:1, 此条件下玉竹多糖的提取率为 8.5 g/100 g; 当玉竹多糖浓度为 0.85 mg/mL 时对 DPPH·和·OH 自由基清除率分别达到 34.58% 和 97.65%。中心组合设计-响应面法可在连续范围内进行分析, 具有实验周期短、精密度高的优点, 抗氧化性研究结果表明, 玉竹多糖是一种具有开发潜力的天然抗氧化剂, 结果可为玉竹多糖产品的开发提供参考依据。

关键词:玉竹; 多糖; 提取; 响应面分析法; 抗氧化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)01-0087-07

Study on Extraction and Antioxidation of Polysaccharide from *Polygonatum Odoratum* by Microwave and Ultrasonic

JIANG Xiaokun, GU Huiying, WEI Lingli, ZHONG Conghui

(Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China)

Abstract: Based on the single factor experiment, microwave power, ultrasonic temperature, liquid to material ratio were selected as independent variables, and the extraction rate of *Polygonatum odoratum* polysaccharide was selected as response value. The extraction process was studied by Box-Behnken central composite design and response surface analysis. The reducing power, DPPH and OH radicals of the polysaccharide were determined. The prediction model of regression equation was established. When the ethanol concentration was 70% and the ultrasonic time was 8 min, the optimal extraction conditions were determined as follows: the microwave power was 250 W, the ultrasonic temperature was 50℃, and the ratio of liquid to solid was 30:1. Under this condition, the extraction rate of *Polygonatum odoratum* polysaccharide was 8.5 g/100 g. When the concentration of the *Polygonatum odoratum* polysaccharide was 0.85 mg/mL, the scavenging rates of DPPH and OH radicals were 34.58% and 97.65%, respectively. Box-Behnken Center combination design and the method of response surface analysis can be used to analyze in a continuous range, which has the advantages of short experimental period and high precision. The results of antioxidant research showed that *Polygonatum odoratum* polysaccharide was a natural antioxidant with development potential, and the results can provide reference for the development of the *Polygonatum odoratum* polysaccharide products.

Key words: *Polygonatum odoratum*; Polysaccharide; Extraction; Response surface analysis; Antioxidation

玉竹(*Polygonatum odoratum*(Mill.) Druce)是百合科黄精属多年生草本植物,以根茎入药,是我国常见的上品药材。具有生津润燥,清热化痰,养

血生肌,补益五脏,补中益气等功效。玉竹及其提取物具有抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、降血脂、降血糖,增强机体免疫功能、改善心血管疾病等药理作用^[1]。

多糖是玉竹的一种主要活性成分,目前玉竹多糖的提取方法主要有水浴法、超声法、微波法和酶法等^[1],以超声法最优,微波法次之。超声波、微波技术是近年来应用于植物有效成分提取

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 吉林农业科技学院重点学科项目(吉农院合字【2019】第 XZ002 号)

作者简介: 姜晓坤(1976-),女,高级实验师,硕士,从事食品科学实验教学与研究工作。

的新方法。采用超声波辅助提取主要是利用超声波的空化作用及其次级效应,在植物细胞周围形成微流,同时在细胞内形成胞内环流,从而使细胞受到严重损坏,提高细胞膜和细胞壁的通透性,达到加快细胞释放多糖、缩短提取时间和提高多糖提取率的目的。微波辅助多糖提取法是在玉竹样品进行热水浸提之前,先用微波进行预处理^[2]。这两个方法具有快速、高效、安全、多糖提取率高且很少破坏多糖的结构与活性等优点。

由于多糖提取多采用水提醇沉法,因此试验以玉竹为原料,水为溶剂同时采用微波与超声波辅助进行多糖提取,以多糖提取率为参考指标,采用响应面法优化提取工艺并进行抗氧化研究,为玉竹多糖产品开发提供理论基础和科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

三年生玉竹样品,产地为吉林省。

葡萄糖、苯酚、铁氰化钾、抗坏血酸(天津市永大化学试剂有限公司),硫酸、磷酸、三氯乙酸、草酸(北京化工厂),磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(北京红星化工厂),无水乙醇、氯化铁、邻二氮菲(天津市北辰方正试剂厂),30%过氧化氢、硫酸亚铁(沈阳市新宇化工厂),DPPH(梯希爱(上海)化工工业发展有限公司),所有试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、AL104电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、ALLEGRA X-15R离心机(贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司)、SB25-12DT超声波清洗机(宁波新艺超声设备有限公司)、Cary60型紫外可见分光光度计(安捷伦科技公司)、Xinyi08S-3超声微波合成反应仪(宁波新艺超声设备有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理

将玉竹样品置于电热恒温鼓风干燥箱中,65℃干燥处理,粉碎后全部通过0.425 mm样品筛,备用。

1.3.2 玉竹多糖的提取工艺

定量称取预处理后的玉竹粉末样品→按液料比30:1的比例加入水→微波提取(250 W, 1 min)→超声波提取(600 W, 50℃, 8 min)→离心(5 000 r/min, 5 min)→干燥浓缩(65℃)→乙醇沉淀(乙醇浓度70%,体积比4:1)→干燥箱干燥(65℃)

1.4 玉竹多糖提取率的测定

1.4.1 葡萄糖标准曲线

精确称取0.01 g无水葡萄糖制成0.1 mg/mL的葡萄糖标准溶液,分别吸取0.4、0.6、0.8、1.0、1.6 mL于试管中,用蒸馏水补至2 mL,然后加入6%的苯酚水溶液1.0 mL,最后加入浓硫酸5 mL,摇匀后放置15 min,在波长490 nm处测定吸光度值,横坐标为葡萄糖浓度,纵坐标为吸光度值,得到标准曲线^[3],结果见图1。

1.4.2 玉竹多糖含量测定

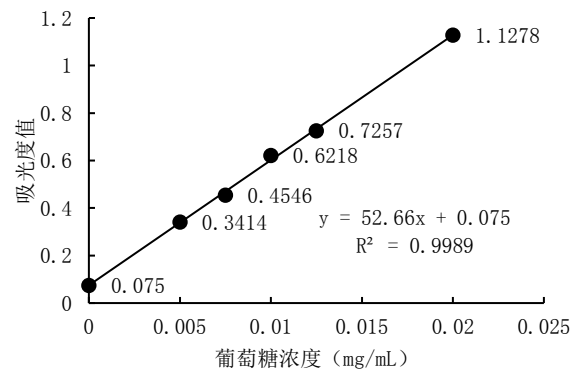


图1 葡萄糖标准曲线

将干燥后的玉竹多糖用水溶解,定容于100 mL容量瓶中混匀,吸取1 mL定容于100 mL容量瓶中摇匀,配制成多糖稀释液。吸取待测多糖稀释液1.0 mL,加水1 mL,加苯酚试液1.0 mL,摇匀后快速加入浓硫酸5.0 mL,放置20 min后测其吸光值,根据回归方程计算出多糖含量。

1.4.3 提取率的计算

提取率按以下公式计算:

$$\eta = \frac{m}{M} \times 100$$

式中: η 为玉竹多糖的提取率(g/100 g); m 为提取液中多糖的含量(g); M 为原料的总质量(g)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 液料比对提取率的影响

微波功率300 W、超声温度55℃、超声时间12 min、乙醇浓度80%,分别选取液料比15:1、20:1、25:1、30:1、35:1进行提取,以多糖提取率为指标,确定液料比对提取率的影响,结果见图2。

由图2可以看出,多糖提取率随着液料比的增加呈现出先上升后下降的趋势,当液料比为30:1时,多糖提取率最高。

2.1.2 微波功率对提取率的影响

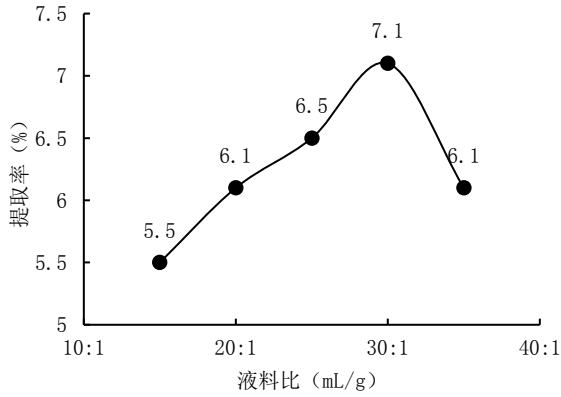


图2 不同液料比对多糖提取率的影响

液料比 25:1、超声温度 55℃、超声时间 12 min、乙醇浓度 80%,分别选取微波功率 200、250、300、350、400 W 进行提取,以多糖提取率为指标,确定微波功率对提取率的影响,结果见图3。

由图3可以看出,多糖提取率随着微波功率

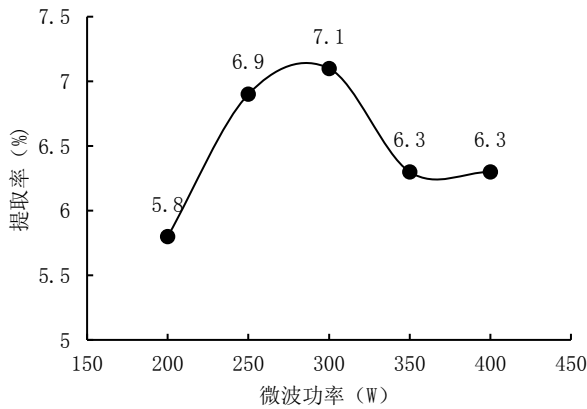


图3 不同微波功率对多糖提取率的影响

的增加不断增加,当微波功率达到 250 W 以后,提取率增加较缓,微波功率达到 300 W 以后,提取率开始下降,因此,确定 250 W 为最终的微波提取功率。

2.1.3 超声温度对提取率的影响

液料比 25:1、微波功率 250 W、超声时间 12 min、乙醇浓度 80%,分别选取超声温度 45℃、50℃、55℃、60℃、65℃进行提取,以多糖提取率为指标,确定超声温度对提取率的影响,结果见图4。

由图4可以看出,多糖提取率随着超声温度的增加呈现先上升后下降的趋势,当超声温度达到 50℃以后,提取率开始下降,因此,确定超声温度为 50℃。

2.1.4 超声时间对提取率的影响

液料比 25:1、微波功率 250 W、超声温度 50℃、乙醇浓度 80%,分别选取超声时间 4、8、12、16、20 min 进行提取,以多糖提取率为指标,确定

超声时间对提取率的影响,结果见图5。

由图5可以看出,多糖提取率随着超声时间

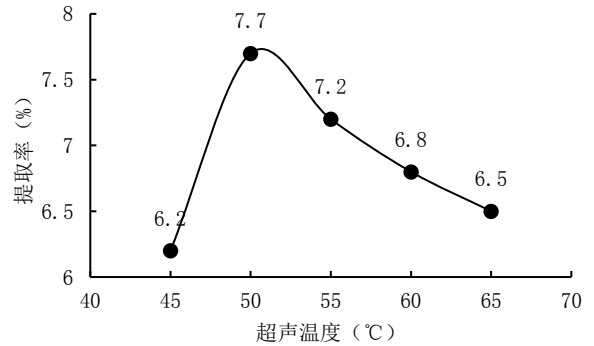


图4 不同超声温度对多糖提取率的影响

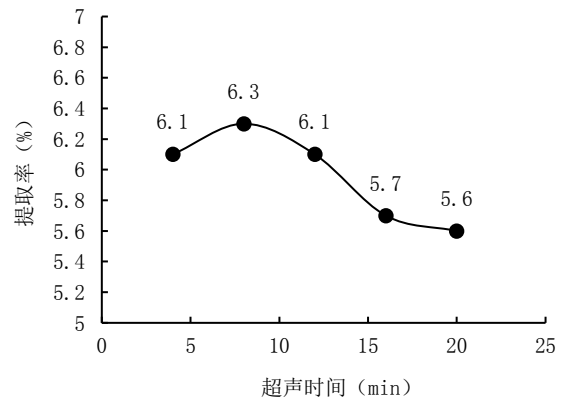


图5 不同超声时间对多糖提取率的影响

的增加呈现先上升后下降的趋势,当超声时间达到 8 min 以后,提取率开始下降,因此,确定超声时间为 8 min。

2.1.5 乙醇浓度对提取率的影响

液料比 25:1、微波功率 250 W、超声温度 50℃、超声时间 12 min,分别选取乙醇浓度 60%、70%、80%、90%、100% 进行沉淀,以多糖提取率为指标,确定乙醇浓度对提取率的影响,结果见图6。

由图6可以看出,多糖提取率随着乙醇浓度

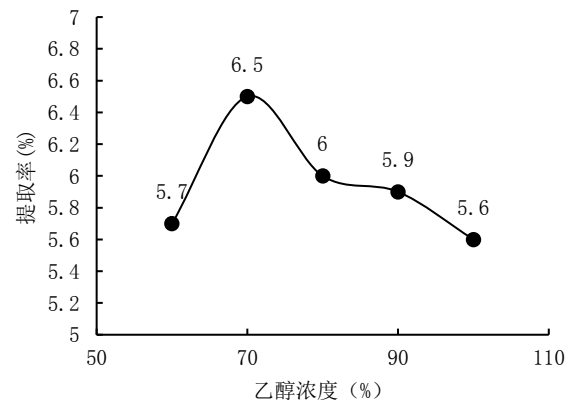


图6 不同乙醇浓度对多糖提取率的影响

的增加呈现先上升后下降的趋势,当乙醇浓度为70%时,多糖提取率最高,以后开始下降,因此,确定乙醇浓度为70%。

2.2 响应面法对提取条件的优化

根据 Box-Behnken^[4]中心组合实验设计原理,综合分析单因素试验,确定超声时间 8 min、乙醇浓度 70%,用影响提取效果更明显的微波功率、超声温度和液料比为试验因素,以多糖提取率为响应值,设计了三因素三水平的响应面分析试验,每个试验因素水平选取见表 1,响应面试验设计与结果见表 2。

使用 Design Expetr 8.0 软件对表 2 进行数据处

表 1 响应面试验因素水平表

水平	A.微波功率(W)	B.超声温度(°C)	C.液料比(mL/g)
-1	250	45	25:1
0	300	50	30:1
1	350	55	35:1

理,得到表 3 方差分析结果。对表 3 中数据进行回归分析后,得二次多元回归模型为:

$$Y=7.42-0.19A+0.25B-0.39C-0.025AB+0.05AC+0.075BC+0.19A^2+0.31B^2-0.91C^2$$

由方差分析可知,模型的 $F=43.57$, $P<0.0001$ 且 $P<0.001$,表明试验所采用的模型是极显著的,相关系数较好 ($R^2=0.9825$, 大于 0.9),与 $R^2_{adj}=0.9599$ 接近,说明模型相关度很好;表 3 中模型失拟项的 $P=0.1197>0.05$,模型失拟项不显著,模型选择合适,试验误差小^[5],可以用此模型对玉竹多

表 2 响应面试验设计及结果

试验号	A.微波功率(W)	B.超声温度(°C)	C.液料比(mL/g)	提取率(g/100g)
1	0	0	0	7.3
2	0	0	0	7.5
3	-1	-1	0	7.9
4	0	0	0	7.5
5	1	0	1	6.3
6	-1	0	1	6.4
7	0	-1	-1	7.1
8	0	1	-1	7.4
9	-1	1	0	8.5
10	1	-1	0	7.4
11	0	0	0	7.4
12	-1	0	-1	7.2
13	0	0	0	7.4
14	0	-1	1	6.1
15	0	1	1	6.7
16	1	1	0	7.9
17	1	0	-1	6.9

糖的提取工艺进行优化。

因素 A($P=0.0035$)、因素 B($P=0.0007$)、因素 C ($P<0.0001$),对试验结果影响是极显著的, A^2 ($P=0.0156$)对试验结果影响显著, B^2 ($P=0.0012$)、 C^2 ($P<0.0001$)二次项对提取率影响是极显著的。因此,各因素对多糖提取率影响程度大小的顺序为:液料比>超声温度>微波功率。三个因素之间的交互作用见图 7~图 9。

由图 7 可见,随着微波功率的降低,玉竹多糖

表 3 试验结果方差分析

项目	平方和	均方	F 值	P 值	显著水平
模型	5.91	0.66	43.57	<0.0001	**
A	0.28	0.28	18.66	0.0035	**
B	0.50	0.50	33.18	0.0007	**
C	1.20	1.20	79.70	<0.0001	**
AB	2.500E-003	2.500E-003	0.17	0.6960	
AC	0.010	0.010	0.66	0.4422	
BC	0.022	0.022	1.49	0.2613	
A ²	0.15	0.15	10.09	0.0156	*
B ²	0.42	0.42	27.72	0.0012	**
C ²	3.49	3.49	231.35	<0.0001	**
残差	0.11	0.015			
失拟项	0.077	0.026	3.69	0.1197	
净误差	0.028	7.000E-003			
总离差	6.02				

注:**表示极显著($P<0.01$),*表示显著($0.01<P<0.05$)

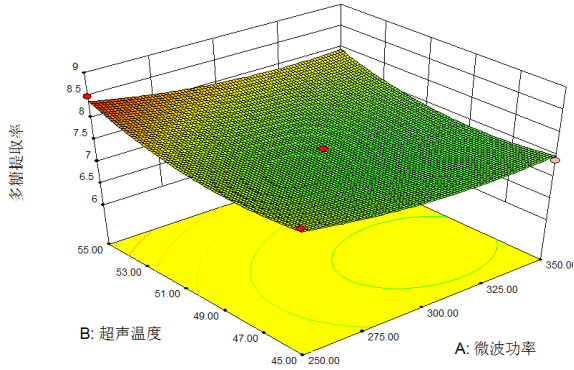


图7 微波功率和超声温度的交互作用响应曲面

的提取率呈现逐渐升高且增速趋缓的走势,表明微波功率对玉竹多糖提取率影响作用显著。而在一定微波功率的条件下,增加超声温度也可提高玉竹多糖提取率,当微波功率处于较低水平而超声温度处于较高水平时,提取率比较高。

由图8看出,在一定液料比下,随着微波功率

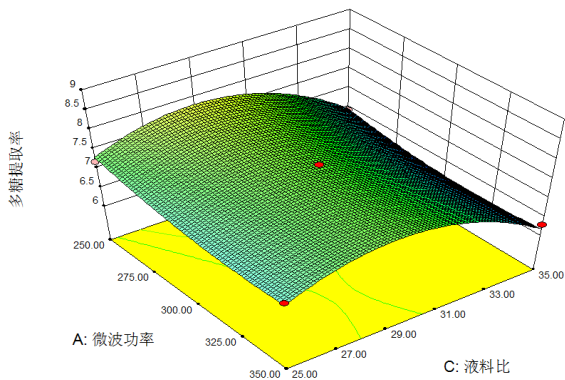


图8 微波功率和液料比的交互作用响应曲面

的降低,多糖提取率逐渐增高,而微波功率一定时,液料比升高可以提高多糖提取率,但达到最高后,提取率会随着液料比增加而降低,说明液料比对玉竹多糖的提取有很大影响。

图9表明,当超声温度一定时,提取率随液料比升高呈现增加的趋势,达到高峰后减小,变化

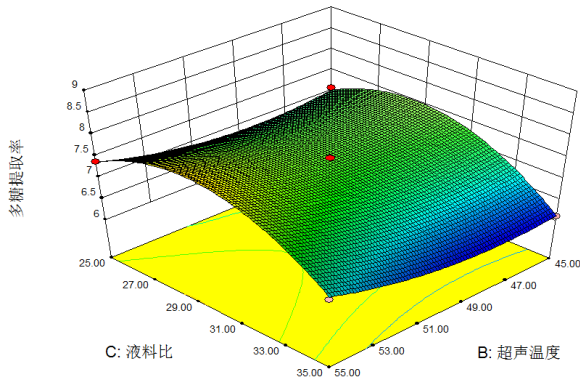


图9 超声温度和液料比的交互作用响应曲面

幅度较大;当液料比一定时,提取率随着超声温度的升高而增加,变化幅度较大,二者协同作用效果明显。

由回归模型的分析可知,玉竹多糖最佳工艺参数为:微波功率250 W,超声温度50.98°C,液料比29.05:1,理论上最高提取率为8.61 g/100 g,为检验其可靠性,采用上述最佳提取条件做玉竹多糖的提取试验^[6]。考虑到实际操作条件,将工艺修正为:微波功率250 W,超声温度50°C,液料比1:30,超声时间8 min,乙醇浓度70%,实际提取率为8.5 g/g,与理论预测值相比,其相对误差为1.27%,说明响应面法优化得到的提取工艺参数准确、可靠,具有实用价值。

3 玉竹多糖抗氧化性研究

3.1 还原力测定

将2 mL H₃PO₄缓冲液(pH值6.6)、2 mL K₄Fe(CN)₆溶液(质量分数1%)和1 mL玉竹多糖溶液(0.65、0.7、0.75、0.8、0.85 mg/mL)分别加入试管中,充分振荡混匀后50°C水浴20 min,迅速冷却。加入2.5 mL三氯乙酸溶液(质量分数10%),混匀后过滤取2.5 mL,加入蒸馏水和FeCl₃各2.5 mL,混匀,

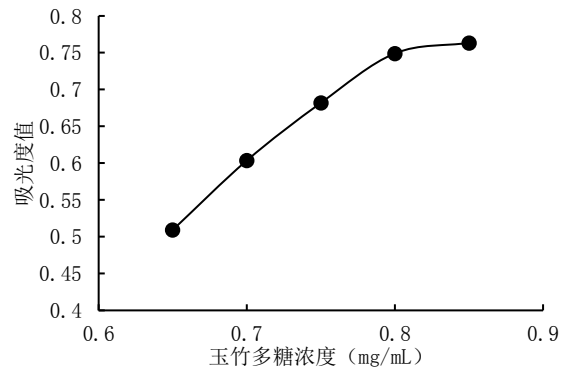


图10 玉竹多糖溶液的还原能力

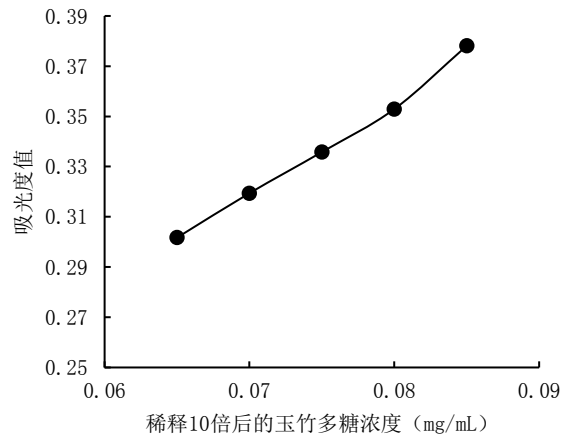


图11 稀释10倍后的玉竹多糖溶液的还原能力

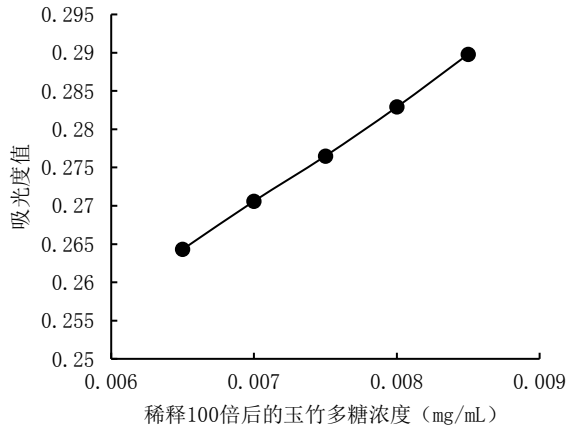


图12 稀释100倍后的玉竹多糖溶液的还原能力

静置 10 min。在 700 nm 波长处测定吸光度^[7]。将玉竹多糖溶液稀释 10 倍和 100 倍后重复上述操作,结果见图 10 ~ 图 12。图中结果表明,当玉竹多糖浓度较高时,还原能力较强,且随着浓度的增加呈上升趋势,趋势较强,达到一定浓度后还原能力增幅趋势较缓;当玉竹多糖浓度较低时,还原能力较弱,随着玉竹多糖浓度的降低,还原能力呈下降趋势,但影响不够明显。

3.2 DPPH·清除能力测定

将 2 mL 玉竹多糖溶液(0.65、0.7、0.75、0.8、0.85 mg/mL)与 2 mL DPPH(0.4g/L, 无水乙醇溶解)充分混匀后,避光静置 20 min,在 517 nm 波长处测吸光度 A_i 。将 2 mL 玉竹多糖溶液(0.65、0.7、0.75、0.8、0.85 mg/mL)与 2 mL 蒸馏水混匀后测吸光度 A_j ,将 2 mL 蒸馏水与 2 mL DPPH 溶液混匀后测吸光度 A_c ^[8]。用 V_c 作对照。结果见图 13、图 14。按下述公式计算清除率:

$$DPPH\cdot\text{清除率}(\%) = \left[1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \right] \times 100$$

玉竹多糖具有一定的清除 DPPH·自由基的能力,清除能力随玉竹多糖浓度的增大而升高,且

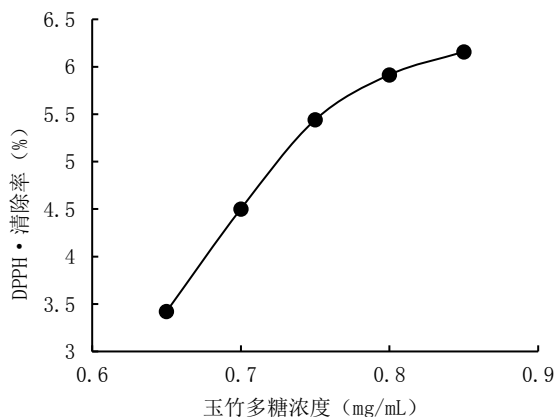


图13 玉竹多糖溶液的DPPH·清除能力

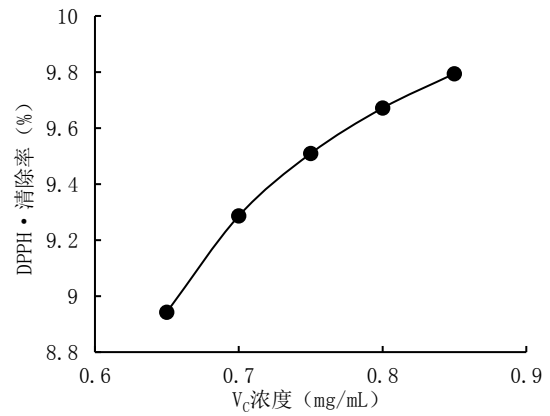


图14 Vc溶液的DPPH·清除能力

达到一定浓度后增大趋势减弱,与维生素 C 比较,其 DPPH·清除能力较弱。

3.3 ·OH清除能力测定

将 1 mL 磷酸盐缓冲液(pH7.4)、1 mL 邻二氮菲溶液(2.5×10^{-3} mol/L)、1 mL $FeSO_4$ 溶液(2.5×10^{-3} mol/L)、1 mL 玉竹多糖水溶液(0.65、0.7、0.75、0.8、0.85 mg/mL)、0.5 mL 双氧水(0.02 mol/L)混匀后,37°C 水浴 60 min,在 536 nm 波长处测定吸光度 A_i 。以 1 mL 蒸馏水取代多糖水溶液,重复上述操作,吸光度为 A_j 。以 1.5 mL 蒸馏水取代多糖水溶液和双氧水溶

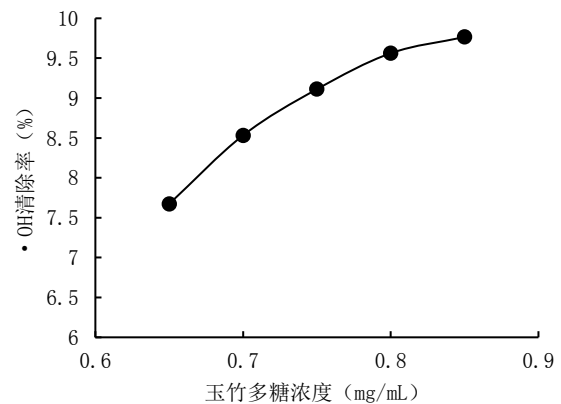


图15 玉竹多糖溶液的·OH清除能力

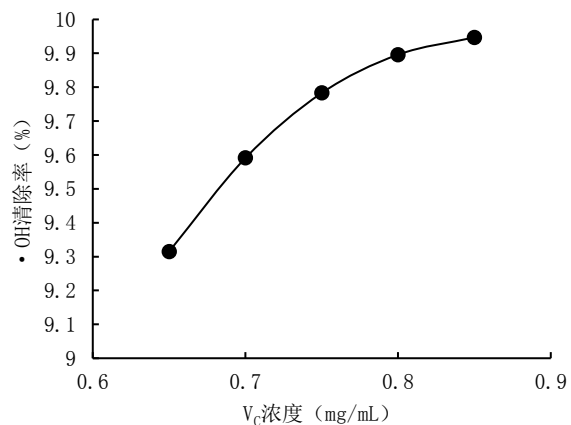


图16 Vc溶液的·OH清除能力

液,重复上述操作,吸光度为 A_c ^[9]。用 V_c 作对照。结果见图15和图16。按下述公式计算清除率:

$$\cdot OH\text{清除率}(\%) = \frac{A_i - A_j}{A_c - A_j} \times 100$$

结果表明,玉竹多糖清除 $\cdot OH$ 的能力随着多糖浓度的增加而升高,其清除能力虽比维生素C弱,但相差不大。

4 结 论

通过单因素试验和Box-Behnken中心组合设计,以水为溶剂对玉竹多糖进行提取,以影响多糖提取率的A(微波功率)、B(超声温度)、C(液料比)三个因素设计安排试验,得到三元二次数学回归模型: $Y=7.42-0.19A+0.25B-0.39C-0.025AB+0.05AC+0.075BC+0.19A^2+0.31B^2-0.91C^2$ 。经检验证明该模型合理可靠,能较好地预测玉竹多糖的提取率。各因素对提取率影响程度大小的顺序为:液料比>超声温度>微波功率。

以水为溶剂,微波和超声波辅助提取玉竹中多糖的最佳工艺条件为:液料比30:1、微波功率250 W、超声温度50℃、超声时间8 min、乙醇浓度70%,此条件下玉竹多糖的提取率为8.5 g/100 g。

通过试验发现玉竹多糖具有一定的还原能力,且其对DPPH \cdot 和 $\cdot OH$ 自由基均具有良好的清

除效果,多糖提取率为0.85 mg/mL时,清除率分别达到34.58%和97.65%,玉竹多糖是一种具有开发潜力的天然抗氧化剂。

参考文献:

- [1] 李素红,王昭曦,姜晓坤,等.超声波辅助法提取玉竹多糖工艺优化研究[J].东北农业科学,2018,43(3):61-64.
- [2] 周丹红,蔡晓咏,王 聪,等.微波-超声波辅助提取枸杞中的多糖工艺[J].光谱实验室,2013,30(1):383-387.
- [3] 王海波.玉竹多糖的提取、纯化及活性研究[D].天津:天津科技大学,2011.
- [4] 南美娟,唐 凯,崔春利,等.Box-Behnken响应面法优选山茱萸果核提取工艺[J].中国药师,2018,21(11):1927-1930.
- [5] 王喜萍,李长生.响应面法优化菝葜中活性成分提取工艺[J].食品科技,2014,39(2):205-209.
- [6] 刘晓鹏,张俊霞,姜 宁,等.响应面法优化超声辅助提取连钱草多糖工艺及其体外抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(4):13-19.
- [7] 李红法,郭松波,满淑丽,等.乙醇分级沉淀提取黄芪多糖及其理化性质和抗氧化活性研究[J].中国中药杂志,2015,40(11):2112-2116.
- [8] 于侃超,杨晓杰,王 瑶,等.不同提取方法对桔梗多糖体外抗氧化性的影响[J].天然产物研究与开发,2016,28(2):251-256.
- [9] 高行恩,王洪新.不同提取方法对山药多糖含量及其体外抗氧化活性的影响[J].食品与发酵工业,2015,41(7):256-262.

(责任编辑:王丝语)

.....

的先行示范户介绍电商渠道,分享(下转第93页)(上接第62页)自家选择电商的收获和心得,并以先进农户带动普通农户作为突破。此外,还可以搭建交流平台,将电商先行示范户、农村技术人员和普通农户联系起来,通过政策鼓励和技术指导双重辅助,带动普通农户参与农产品电商^[7]。

4.2 农户应该积极参加专业技术培训,可以与当地农业科研院所合作,将职业学习与技术培训相结合,接受更专业的电商培训,掌握更先进互联网拓宽销售渠道的新技能,并将此应用到农产品的销售中,更好地提高农户收入。积极向农村电商示范典型农户学习,与其搭建信息交流平台,加强自身与新型经营主体之间的联系。

4.3 当地企业和农业服务部门应该树立新型的品牌意识,将本地特色产品进行规范化整合,对其引入特色化标识和深加工处理,进一步提升地区特色农产品的质量和知名度。利用新兴自媒体进行品牌推广,打造特色品牌,实现农产品溢价,

从而提高农户收入,达到双赢的目的。

参考文献:

- [1] 唐立强,周 静.社会资本、信息获取与农户电商行为[J].华南农业大学学报(社会科学版),2018,17(3):73-82.
- [2] 毕文泰,梁 远.乡村振兴战略背景下农村宅基地三权分置改革的研究[J].农业开发与装备,2019(1):13,21.
- [3] 孙玉奎,冯 乾.我国农村金融发展与农民收入差距关系研究—基于农村正规金融与非正规金融整体的视角[J].农业技术经济,2014(11):65-74.
- [4] 程名望,史清华, Jin Yanhong,等.农户收入差距及其根源:模型与实证[J].管理世界,2015(7):17-28.
- [5] 孙敬水,黄秋虹.中国城乡居民收入差距主要影响因素及其贡献率研究—基于全国31个省份6937份家庭户问卷调查数据分析[J].经济理论与经济管理,2013(6):5-20.
- [6] 彭定赞,王 磊.财政调节、福利均等化与地区收入差距—基于泰尔指数的实证分析[J].经济学家,2013(5):21-28.
- [7] 武 亮,郭美文.基于“互联网+”的农产品营销渠道模式创新研究—以新疆红枣为例[J].价格月刊,2017(7):59-63.

(责任编辑:刘洪霞)