

超声波辅助提取松针多糖的工艺研究

许丽丽, 庄晓文

(韩山师范学院化学系, 广东潮州 521041)

摘要: 采用超声波辅助提取法, 对提取松针多糖的工艺条件进行研究。以水为提取溶剂, 通过单因素试验研究 5 个因素: 提取温度、超声功率、提取时间、料液比以及提取次数对松针多糖得率的影响。在单因素试验的基础上, 通过正交试验对超声波辅助提取松针多糖的工艺条件进行优化。结果表明, 最佳条件为: 提取温度 79 °C, 超声波功率 400 W, 提取时间 30 min, 料液比 1:30 (g/mL)。在此最佳工艺条件下提取 1 次, 松针多糖得率为 4.15%。

关键词: 松针; 多糖; 超声波; 提取

文章篇号: 1673-9078(2012)10-1376-1379

Ultrasonic-assisted Extraction of Polysaccharides from Pine Needles

XU Li-li, ZHUANG Xiao-wen

(Department of Chemistry, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

Abstract: Using the ultrasonic-assisted extraction method, process of extracting polysaccharides from pine needles was studied. With water as extraction solvent, 5 factors including extraction temperature, ultrasonic power, ultrasonic extraction time, ratio of solid to liquid and extraction times were studied for their effect on the yield of pine needles polysaccharides. On the base of the single factor experiments, the optimal processing conditions for the extraction of polysaccharides were obtained by orthogonal experiments. The results showed that the optimum parameters were: ultrasonic extraction time 30 min, extraction temperature 79 °C, ratio of solid to liquid 1:30 (g/mL), and ultrasonic power 400 W. When extracting 1 times under these conditions, the yield of pine needles polysaccharides was 4.15%.

Key words: pine needles; polysaccharide; ultrasonic; extraction

松针是松科 (*Pinaceae*) 松属 (*Pinus*) 植物的叶, 是松树的主要副产物之一。我国松针资源丰富, 而且其再生速度快、可一年四季采收。松针具有明目、安神、活血、解毒、止痒、镇痛、镇咳、祛痰、减缓衰老、抗突变、降血脂、降胆固醇、利胆降压和抑菌等功效^[1-3]。因此, 我国自古就有松针入药的记载; 近年来松针除了作为药用, 人们还开发出了一系列的松针保健食品, 如松针保健运动饮料、松针果酒、松针糖果、全松茶等^[4]。松针的保健作用与其富含多糖、黄酮类化合物等活性成分息息相关, 然而目前关于松针多糖的报道较少。本研究采用正交试验分析法, 对超声波提取马尾松松针多糖的工艺条件进行优化, 为更好地开发利用我国丰富的松针资源提供理论参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 国家本科教学质量工程资助项目 (TS11664); 韩山师范学院青年项目 (LQ200906)

作者简介: 许丽丽 (1982-), 女, 实验师, 硕士研究生, 研究方向为分离科学与技术

松针 (采自潮州市韩山师范学院内的马尾松)

1.2 试剂

石油醚 (60~90 °C), 95% 乙醇, 苯酚, 葡萄糖, 浓硫酸, 正丁醇, 三氯甲烷等均为国产分析纯。

1.3 仪器

QK-500DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 722S 型分光光度计 (上海棱光技术有限公司); KA-1000 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); 上皿电子天平 FA2004 型 (上海精密科学仪器有限公司) 等。

2 实验方法

2.1 松针多糖的预处理^[5,6]

将采回的松针洗净、晾干, 于干燥箱中以 60 °C 烘干, 然后将其研磨成粉, 过 100 目筛, 装入磨口瓶置于干燥器中备用。

称取适量的松针样品, 于索氏提取器中经石油醚 (60~90 °C) 回流脱脂脱色 2 次, 1 h/次。再用 95% 乙醇回流提取至浸提液无色, 以除去黄酮等, 将药渣烘干至恒重, 用于下面多糖的提取。

2.2 主要工艺流程^[5-9]

(1) 超声波提取: 按所设定的提取温度、超声功率、提取时间、料液比、提取次数, 将样品放入烧杯中, 加蒸馏水进行超声提取。

(2) 浓缩: 浸提结束后趁热减压抽滤, 收集滤液。将滤液浓缩至 2~3 mL。

(3) 醇沉工艺: 滤液加 5 倍量 95% 乙醇, 充分搅拌后, 在低温 (4 °C) 冷藏静置 3 h。然后离心 15 min (3000 r/min), 收集沉淀。沉淀物用 95% 乙醇洗涤至洗涤液无色, 得到的沉淀即为粗多糖。

(4) 除蛋白: 粗多糖加 50 mL 蒸馏水重新溶解, 加入 10 mL 氯仿和 2 mL 的正丁醇, 振荡 30 min, 蛋白质与氯仿-正丁醇生成白色凝胶物而分离, 静置 30 min, 脱去蛋白, 取其水相即为松针多糖提取液。

2.3 松针多糖含量的测定 (采用苯酚-硫酸法^[8-10])

2.3.1 苯酚溶液的配制

称取苯酚 100 g, 加入铝片 0.1 g 和 NaHCO₃ 0.05 g 进行蒸馏, 收集 182 °C 的馏分。称取馏分 5.00 g, 加水溶解并定容至 100 mL, 则制得 50 g/L 苯酚溶液, 将其置于棕色瓶内存入冰箱备用。

2.3.2 标准曲线的绘制

称取葡萄糖 0.1123 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 蒸馏水溶解并定容至刻度, 摇匀, 制得 1.123 g/L 葡萄糖储备液。准确量取葡萄糖储备溶液 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mL 于 10 mL 比色管中, 定容, 使其质量浓度分别为 11.23、33.69、56.15、78.61、101.07、123.53 mg/L。取上述溶液各 1 mL 于 10 mL 试管中, 加入 50 g/L 苯酚溶液 1 mL 混合后, 迅速加入 5 mL 浓硫酸, 混合均匀后, 静置 5 min, 沸水加热 15 min, 取出后自来水冷却 10 min 至室温, 在 490 nm 处测吸光度。取 1 mL 蒸馏水代替储备液做空白。绘制标准曲线, 所取标准液的浓度和吸光度值数据经回归处理, 计算得回归方程。

2.3.3 多糖含量测定

将除蛋白后的松针多糖提取液定容并适当稀释, 取稀释液 1.00 mL 于 10 mL 试管中, 按 2.3.2 的方法加入苯酚溶液和浓硫酸, 在 490 nm 处测定吸光度, 根据葡萄糖标准曲线和以下公式计算松针多糖得率:

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{V \times c}{1000W} \times 100$$

式中 c 为标准曲线上查得的葡萄糖溶液浓度 (mg/L), V 为松针多糖溶液的体积 (L), W 为经处理的松针质量 (g)。

2.4 试验设计

称取已处理好的松针样品每份 1 g, 选取提取温度、超声功率、提取时间、料液比、提取次数进行单因素试验, 在单因素试验基础上, 采用正交设计法优

化松针多糖的超声波辅助提取工艺参数。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线的制作

按照 2.3.2 操作, 以吸光度 A 为纵坐标, 标准液浓度 (mg/L) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得到拟合方程 $y=0.0085x+0.0324$, $R^2=0.9990$, 即葡萄糖含量在 11.23~123.53 mg/L 范围内与吸光度呈现良好的线性关系。

3.2 单因素实验

3.2.1 提取温度对松针多糖得率的影响

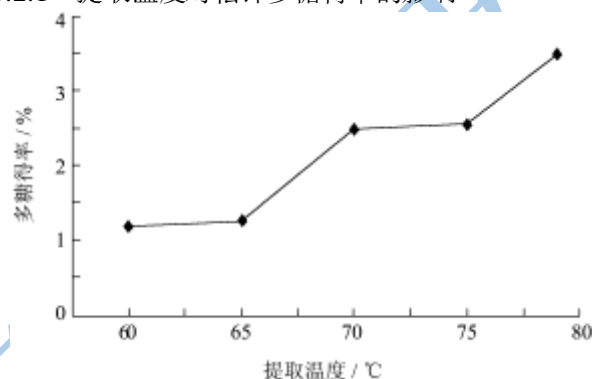


图1 提取温度对松针多糖得率的影响

Fig.1 Effects of extraction temperature on the yield of pine needles polysaccharides

在料液比1:30, 提取时间20 min, 超声功率300 W 的条件下, 分别在提取温度为60 °C、65 °C、70 °C、75 °C和79 °C的条件下提取1次, 结果如图1所示。由图1可知, 随着提取温度的升高, 提取液中松针多糖含量不断增加。其中, 65 °C~70 °C以及75 °C~79 °C之间松针多糖得率上升趋势显著, 由于考虑到提取温度79 °C是超声波仪的最高工作温度, 长期使用会对超声波清洗器造成一定的损坏, 所以选择75 °C为最佳提取温度, 进行接下来的单因素试验。

3.2.2 超声功率对松针多糖得率的影响

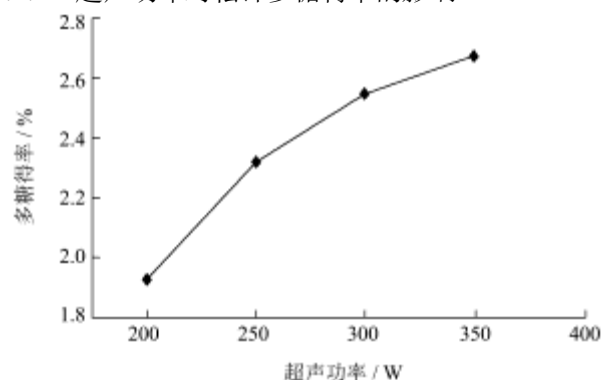


图2 超声波功率对松针多糖得率的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic power on the yield of pine needles polysaccharides

在料液比1:30, 提取时间20 min, 提取温度75 °C

的条件下, 分别在超声功率为200 W、250 W、300 W和350 W的条件下提取1次, 结果如图2所示。由图2可知, 随着超声波功率的增加, 提取液中松针多糖含量不断增加。所以选择350 W为最佳提取功率。

3.2.3 提取时间对松针多糖得率的影响

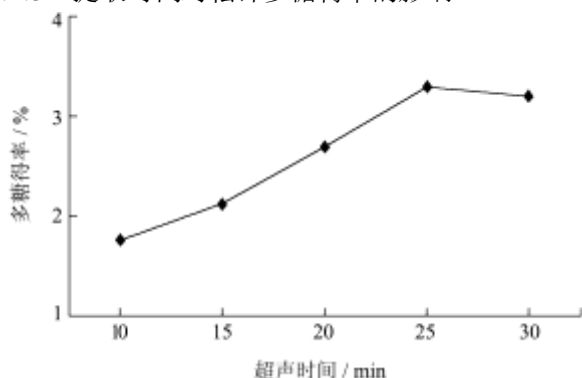


图3 提取时间对松针多糖得率的影响

Fig.3 Effects of extraction time on the yield of pine needles polysaccharides

在料液比1:30, 提取温度75 °C, 超声功率350 W的条件下, 分别在超声时间为10 min、15 min、20 min、25 min、30 min的条件下提取1次, 结果如图3所示。由图3可知, 在10~25 min区间内, 多糖得率与提取时间呈正相关, 但是当提取时间为25~30 min时, 多糖得率变化缓慢, 且出现下降的现象, 原因可能是提取液中的多糖随着加热时间的延长结构受到破坏。因此, 确定最佳提取时间为25 min。

3.2.4 料液比对松针多糖得率的影响

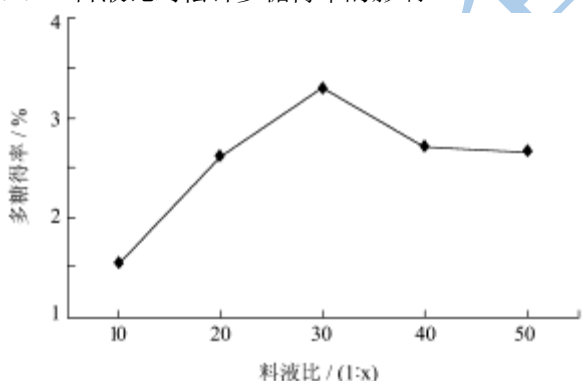


图4 料液比对松针多糖得率的影响

Fig.4 Effects of solid-liquid ratio on the yield of pine needles

在提取温度75 °C, 提取功率350 W, 提取时间25 min的条件下, 分别在料液比为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50的条件下提取1次, 结果如图4所示。由图4可知, 在1:10~1:30时, 多糖得率增大比较快, 从1:0~1:50多糖得率稍有下降, 说明适量的提取溶剂有利于多糖的充分溶出, 但溶剂过多或过少均不利于多糖的提取。因此选定1:30为最佳料液比。

3.2.5 提取次数对松针多糖得率的影响

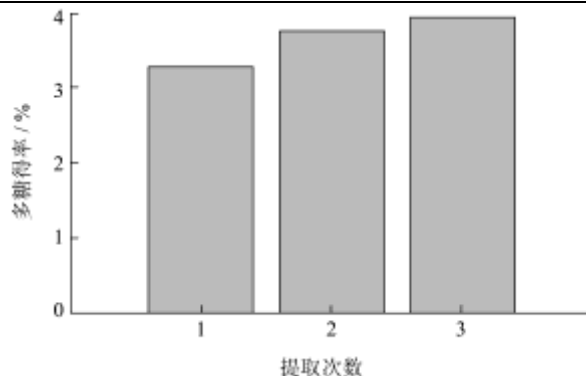


图5 提取次数对松针多糖得率的影响

Fig.5 Effects of extraction times on the yield of pine needles

在提取温度75 °C, 超声功率350 W, 提取时间25 min, 料液比1:30的条件下, 对比浸提次数分别为1、2、3次对多糖得率的影响, 结果如图5所示。由图5可知, 随着提取次数的增加, 多糖得率也呈上升趋势, 考虑到其上升趋势缓慢, 后期浓缩等处理时间较长, 因此选择提取1次即可。

3.3 正交试验设计

表1 松针多糖提取的因素水平表

Table 1 The orthogonal table of factors levels tested

水平	A (温度 / °C)	B (超声功率 / W)	C (提取时间 / min)	D [料液比 / (g/mL)]
1	70	300	20	1:25
2	75	350	25	1:30
3	79	400	30	1:35

表2 正交实验设计与结果

Table 2 Results of the orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	多糖得率 / %
1	1	1	1	1	2.00
2	1	2	2	2	2.32
3	1	3	3	3	2.66
4	2	1	2	3	3.23
5	2	2	3	1	2.78
6	2	3	1	2	3.04
7	3	1	3	2	3.83
8	3	2	1	3	2.90
9	3	3	2	1	3.65
K ₁	2.327	3.020	2.647	2.810	
K ₂	3.017	2.667	3.067	3.063	
K ₃	3.460	3.117	3.090	2.930	
R	1.133	0.450	0.443	0.253	

影响因素 提取温度>超声功率>提取时间>料液比
最优水平 A₃B₃C₃D₂

通过单因素试验初步确定提取松针多糖工艺条件为提取温度75 °C、超声功率350 W、提取时间25 min、

料液比 1:30、提取次数 1 次。在此基础上选取提取温度、超声功率、提取时间和料液比 4 个主要因素进行 $L_9(3^4)$ 实验, 每个实验进行 3 次。正交试验因素水平表和结果分别见表 1 和表 2, 数据处理采用直观分析方法, 以极差大小确定因素主次顺序。

由直观分析可知, 最佳组合为 $A_3B_3C_3D_2$, 即最佳工艺条件为: 提取温度 $79\text{ }^\circ\text{C}$, 超声功率 400 W , 提取时间 30 min , 料液比 1:30。由极差 R 分析可知, 提取温度对松针多糖得率影响最大, 其次是超声功率和提取时间, 料液比对松针多糖得率影响较小。

3.4 验证试验

由直观分析所得的最佳条件不在 9 个正交设计实验范围内, 于是我们在最佳条件下进行验证试验, 平行实验 3 次, 测得松针多糖得率为 4.15%。该结果大于单因素实验最佳条件的得率。说明各因素间相互作用可以提高松针多糖得率, 达到更好的提取效果。

4 结论

在提取温度 $79\text{ }^\circ\text{C}$, 超声功率 400 W , 提取时间 30 min , 料液比 1:30 的条件下提取 1 次, 松针多糖得率为 4.15%。本实验松针多糖得率与文献^[11-13]相比稍有差异, 一方面由于松针的来源(如种类、产地、采摘季节和生长年限等)不同; 另一方面是提取条件存在一定差异。总的来说, 本法(超声波辅助提取法)和微波辅助提取法^[13]松针多糖得率均较理想, 与传统的热水浸提法^[11,12]相比, 具有提取条件温和、操作简便省时等优点, 更有利于保持多糖的生物活性, 从而为松针多糖保健功效的研究和相关产品的研发奠定基础。

参考文献

- [1] 李萍, 刘友平. 松针研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(3): 49-50
- [2] 张霞, 孙爱东. 松针提取物的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2009, 9: 23-25
- [3] 劳业兴, 张冰若, 苏薇薇. 松针化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(9): 681-683
- [4] 刘晓庚, 陈梅梅. 我国松针的开发利用研究及进展[J]. 粮食与食品工业, 2003, 3: 25-29
- [5] 江岩, 李斌, 郭晓军. 新疆黑桑椹多糖的提取和测定[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 224-226
- [6] 李粉玲, 蔡汉权, 邱永革, 等. 白茅根中多糖的微波提取工艺研究[J]. 食品机械, 2009, 25(2): 137-140
- [7] 黄洁, 徐文清, 郎玉娇, 等. 石花多糖脱蛋白工艺研究[J]. 医学导报, 2008, 27(6): 689-692
- [8] 史德芳, 杨洋, 孙晓雪, 等. 仙人掌多糖提取过程中三种脱蛋白方法的比较研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 93-95
- [9] 姜峻, 陈蕾俊, 王晓梅, 等. 正交试验优化浙贝母多糖的提取工艺[J]. 现代食品科技, 2011, 27(7): 823-825, 772
- [10] 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): 550-553
- [11] 徐丽珊, 张萍华. 松针多糖的提取工艺优化[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(4): 73-76
- [12] 葛霞, 王文君, 欧阳克蕙, 等. 水提法提取雪松松针多糖[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(7): 20-23
- [13] 谢清若, 郑立文, 凌新龙, 等. 响应面法优化微波辅助提取松针多糖工艺研究[J]. 食品科技, 2010, 35(12): 201-205