

江 珊,刘 焰,赵 斌,等. 猪苓中多酚、黄酮、多糖和蛋白质提取工艺的优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):243-246.

猪苓中多酚、黄酮、多糖和蛋白质提取工艺的优化

江 珊,刘 焰,赵 斌,李俊丽

(武汉理工大学理学院,湖北武汉 430070)

摘要:为了探究猪苓的保健作用,研究用水煮浸提法提取猪苓药用成分,并分别测定浸提液中的多酚、黄酮、多糖及蛋白质的提取量,通过正交试验对提取工艺中的温度、料液比、浸提时间等因素进行优化,用综合评分法确定最佳提取条件。结果表明:在提取温度为 80 ℃、料液比 1 g : 40 mL 的条件下浸提 4 h 时,浸提液中多酚、黄酮和多糖总量最高,此组合最优。

关键词:猪苓;多酚;多糖;黄酮;蛋白质;提取工艺;单因素试验;正交试验

中图分类号:0629.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)09-0243-04

猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries] 在分类学上属于无隔担子菌亚纲无褶菌目多孔菌科多孔菌属,它的干燥菌核称为猪苓,是常用中药,主要分布在亚洲(主要包括中国、日本及东南亚国家)、欧洲及北美洲^[1]。猪苓的药用价值始载于《神农本草经》,至今已具 2 500 多年的药用历史。它具有利尿、抗癌和抗菌的作用^[2],其主要功能是利水渗湿。相

关药理研究表明,猪苓中的甾体化合物是其利尿作用的主要有效成分,其多糖具有增强机体免疫力、抗癌、预防和治疗肝炎等多种药效^[3]。许多利水复方制剂中含有猪苓,在临床应用中均显示了很好的疗效,而且至今未见文献报道它的毒性反应^[4]。随着研究的进展,猪苓的药用价值越来越受到人们的青睐,尤其是可作为免疫增强药的猪苓多糖的提取研究。且随着多糖等浸提新技术的日益改善,研究者发现,超声波、微波、酶解等辅助处理技术也能卓有成效地促进植物细胞内多糖的浸出^[5]。猪苓多糖的研究已取得了良好的进展,而其他药用成分的研究则相对较少。本研究拟对热水煎提猪苓药用成分(多糖、多酚、黄酮和蛋白质)提取量的工艺进行改良,借助正交试验,探讨浸提过程中各种工艺条件对猪苓药用成分得率的交互作用,以期获得猪苓药用成分多糖、多酚、黄酮及蛋白质的最佳提取工艺,并为药典修订以及该药材的质量评价、资源开发提供更加有效的科学依据。

收稿日期:2013-06-12

基金项目:湖北省武汉市青年科技晨光计划(编号:201271031391);

武汉理工大学自主创新研究基金(编号:whut-2013-1a-013);

国家级大学生创新创业训练计划(编号:20121049714006)。

作者简介:江 珊(1992—),女,河北邯郸人,主要从事天然产物化学研究。E-mail:435022156@qq.com。

通信作者:李俊丽,博士,副教授,主要从事植物化学研究。E-mail:lijunli0424@sina.com。

高收率达 55.4%。通过红外光谱及二阶导数红外光谱对纽荷尔脐橙果皮色素结构进行了表征。

参考文献:

[1]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第四十三卷第二册[M]. 北京:科学出版社,1997:184-209.

[2]吕绪佳,于宏伟. 红橘果皮中色素提取研究[J]. 河北化工,2011,34(11):44-46.

[3]Johnson J D, Viale H E, Wait D M. Method for extracting carotenoid pigments from citrus oils; US, 4126709[P]. 1978-11-21.

[4]Howell T M, Huffman C F. Citrus oil containing a high concentration of carotenoid pigments and method for producing same; US, 4377520[P]. 1983-03-22.

[5]Epperson D E, Curley O B, Swisher H E. Process for forming a citrus juice extender; US, 4608266[P]. 1986-08-26.

[6]Lee H S, Coates G A. Pigment extraction system and method; US, 20040258809[P]. 2004-12-23.

[7]李 佳,蒋家新,朱丽云,等. 橘皮色素的微波辅助提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国计量学院学报,2009,20(2):154-157.

[8]李凌绪,曲亮亮,孟昭礼. 橘皮色素的抑菌活性[J]. 湖北农业科学,2010,49(1):80-82.

[9]梁菊红. 橘皮色素对蚕丝纤维的染色性能[J]. 毛纺科技,2010,38(6):18-20.

[10]陈炼红,伍 红,廖 幸. 血橙橙皮色素最佳提取工艺及稳定性的研究[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2011,37(6):924-930.

[11]张熊禄,谢生辉,赖俊杰. 微波法辅助提取脐橙皮色素工艺优化[J]. 食品科学,2010,31(22):286-288.

[12]汪 葵,周 阳,彭 鹏. 超声波法提取赣南脐橙皮色素工艺[J]. 食品研究与开发,2009,30(12):182-185.

[13]曾柏全,李 伟,邓子牛,等. 冰糖橙皮色素的提取及稳定性研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):14-17.

[14]于宏伟,韩卫荣,王 宝,等. 苯甲酸温度效应的 FT-IR 光谱研究[J]. 化工中间体,2012,8(08):50-52.

[15]赵瑶兴,孙祥玉. 有机分子结构光谱测定[M]. 北京:科学出版社,2004:38-41.

[16]翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 2版. 北京:化学工业出版社,2010:254-258.

[17]陈 衡. 红外物理学[M]. 北京:国防工业出版社,1985:135-137.

[18]谢晶曦. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用[M]. 2版. 北京:科学出版社,1987:23-36.

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料、试剂与仪器

猪苓,购自湖北省中药材公司。98%芸香苷标准品、D(+)葡萄糖标准品、茶多酚纯品;浓硫酸、甲醇等试剂均为分析纯。

主要仪器包括752N分光光度计(上海精科实业有限公司)、HH-2K1单孔智能水浴锅(河南省巩义市予华仪器有限责任公司)、FA1004电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 提取工艺的单因素试验^[6] 分别以不同的料液比、温度、浸提时间为单因素,考察各单因素对猪苓各药用成分得率的影响,在猪苓单因素提取试验基础上,选取适当的试验因素与水平进行正交试验,优化提取工艺条件。具体单因素试验方案如下:均称取猪苓3 g,A组控制温度为90℃,料液比为1 g:30 mL,单因素变量为浸提时间2、3、4、5、6 h;B组设定温度均为90℃,浸提时间为6 h,单因素变量为料液比1 g:10 mL、1 g:20 mL、1 g:30 mL、1 g:40 mL、1 g:50 mL;C组控制浸提时间为6 h,料液比为1 g:30 mL,以浸提温度(20、40、60、80、100℃)为单因素变量。分别用纱布过滤,蒸馏水定容至相应体积,浸提稀释后得供试液,测定吸光度,按标准曲线计算提取量。

1.2.2 提取工艺的正交试验 根据单因素试验结果,调节加料量,选取适当水平的料液比、温度、浸提时间作3因素3水平正交试验^[6],确立试验方案。以测定浸提液中的多酚、黄酮、多糖及蛋白质的提取量作为试验结果,继而探究提取工艺的最佳条件。

1.2.3 多糖提取量的测定

1.2.3.1 标准曲线的绘制 精确称取1.000 g分析纯葡萄糖,加蒸馏水溶解,转入100 mL容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度。精确吸取10 mg/mL葡萄糖溶液1 mL置于100 mL容量瓶中,加水至刻度线,为100 μg/mL葡萄糖标准液。取10 mL试管6支,标号,依次加入葡萄糖标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL和蒸馏水1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0 mL。之后按顺序依次向试管中加入5 mL蒽酮浓硫酸试剂,充分振荡,立即将试管放入96℃沸水浴中,每管均保温3 min,取出,流水冷却,于室温下放置15 min,以空白作参比,在630 nm处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,多糖浓度(μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,得出标准线性方程 $y=0.0054x-0.0216$ ($r^2=0.995$)。

1.2.3.2 样品测定 吸取供试液置于1.0~10 mL试管中,重复3次,按顺序依次向试管中加入5 mL蒽酮浓硫酸试剂,充分振荡,立即将试管放入96℃沸水浴中,每管均保温3 min,取出,流水冷却,在室温下放置15 min,在630 nm处测定吸光度。根据标准曲线计算多糖提取量。

1.2.4 多酚提取量的测定

1.2.4.1 标准曲线的绘制 称取茶多酚纯品0.250 g,加水溶解定容至250 mL,混匀,即为1 mg/mL提取纯品的标准溶液。分别吸取茶多酚标准溶液1.0、2.0、3.0、4.0 mL于4个25 mL容量瓶中,各加水至5 mL,再加酒石酸亚铁溶液5 mL,加入pH值为7.5的磷酸缓冲液至刻度,混匀后用1 cm比色皿,以空白试剂作参比,于波长540 nm处测定吸光度,其标准曲线为 $y=0.123x+0.036$ ($r^2=0.997$)。其中 x 为多酚浓度

(mg/mL), y 为吸光度。

1.2.4.2 样品测定 取供试液1.0 mL放入25 mL容量瓶中,加蒸馏水4.0 mL,加酒石酸亚铁溶液5.0 mL,摇匀,再加入pH值为7.5的磷酸缓冲液,并稀释至刻度线,以蒸馏水代替供试液加入同样试剂作空白,用721分光光度计在540 nm处测吸光度,按标准曲线计算多酚提取量。每个试验重复3次,取平均值。

1.2.5 黄酮提取量的测定

1.2.5.1 标准曲线的绘制 精确称取0.010 g干燥恒重的芸香苷标准品置于10 mL干燥的容量瓶中,加无水甲醇,定容至刻度线,摇匀,即得浓度为1 mg/mL的芸香苷标准溶液。分别吸取芸香苷标准溶液0.05、0.10、0.20、0.25、0.30 mL,置于10 mL容量瓶中,加10 mg/mL AlCl₃水溶液9.5 mL,再加水定容至刻度线,摇匀,静置10 min,在420 nm处测吸光度,其标准曲线为 $y=0.1421x-0.0314$ ($r^2=0.997$)。其中 x 为黄酮浓度(μg/mL), y 为吸光度。

1.2.5.2 样品测定 吸取0.5 mL供试液,加10 mg/mL AlCl₃水溶液9.5 mL,摇匀,10 min后在420 nm处测吸光度,以10 mg/mL AlCl₃水溶液为空白对照,根据标准曲线计算黄酮提取量。

1.2.6 蛋白质提取量的测定

1.2.6.1 标准蛋白质曲线的绘制 称取牛血清白蛋白25 mg,加水溶解并定容至100 mL,吸取该溶液40 mL,用蒸馏水稀释至100 mL。取6支试管,分别加入标准蛋白质溶液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,对应加入蒸馏水1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0 mL,混合均匀,向各管中加入5 mL考马斯亮蓝G-520溶液,摇匀,并放置5 min左右,在595 nm下比色测定吸光度。绘制标准曲线,得出标准曲线方程为 $y=0.1059x+0.1176$ ($r^2=0.998$)。其中 x 为蛋白质浓度(mg/mL), y 为吸光度。

1.2.6.2 样品测定 吸取供试液0.1 mL,放入具塞试管中,加入5 mL考马斯亮蓝G-520溶液,充分混合,放置2 min,在595 nm下比色,测定吸光度,并通过标准曲线计算蛋白质提取量。

1.2.7 试验数据处理 根据得到的多糖、多酚、黄酮和蛋白质的吸光度-浓度标准曲线,由单因素试验及正交试验测得的各成分的吸光度,从而计算出各成分的提取量。用SPSS软件对单因素试验数据进行多重检测和正交试验结果的方差、极差分析^[7-8]。

2 结果与分析

2.1 单因素提取试验结果分析

单因素试验中各成分在各变量下的最优3个水平如表1所示。确定正交试验的因素水平时,3:3:3:1的权重^[9]也考虑在内。

2.1.1 浸提时间对猪苓药用成分提取量的影响 设定提取温度为90℃,料液比为1 g:30 mL,不同浸提时间下的多酚、多糖、黄酮及蛋白质提取量变化如图1所示。由图1知,随着时间的延长,多糖、蛋白质提取量整体呈增加趋势;而黄酮、多酚提取量在提取2~3 h时随着时间延长而增加,5~6 h下降的幅度较大。可能是提取时间的延长增加了杂质的溶出量,或

表1 猪苓多酚、多糖、黄酮、蛋白质提取量的单因素水平

药用成分	浸提时间(h)	料液比(g:mL)	浸提温度(°C)
多酚	5	1:30	40
	3	1:40	100
	4	1:20	80
多糖	6	1:50	100
	5	1:40	80
	4	1:20	60
黄酮	5	1:50	100
	3	1:40	80
	2	1:30	60
蛋白质	6	1:50	40
	5	1:40	80
	4	1:30	100

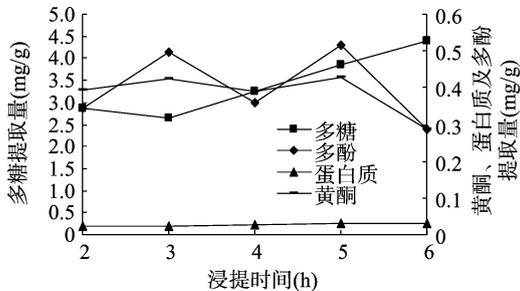


图1 浸提时间对猪苓药用成分提取量的影响

者是黄酮或多酚成分结构发生了变化^[10]。另外,考虑到权重和均匀可比性的关系,故选择3、4、5 h为正交试验浸提时间的水平。

2.1.2 料液比对猪苓药用成分提取量的影响 设定浸提时间为6 h,料液比为1 g:30 mL,不同料液比下多糖、多酚、黄酮及蛋白质的提取量如图2所示。从图2可以看出,随着提取剂的增加,黄酮、蛋白质提取量增加。料液比为1 g:30 mL时的多糖提取量较料液比为1 g:10 mL、1 g:20 mL时的有所减少,后随着提取剂的增加,多糖提取量增加,且涨幅较大。料液比为1 g:40 mL时的多酚提取量较料液比为1 g:30 mL时的有所减少,后又增加,在1 g:50 mL时达到最大值。结合表1可知,综合各成分最优条件,选择1 g:30 mL、1 g:40 mL、1 g:50 mL为正交试验料液比的3水平。

2.1.3 浸提温度对猪苓药用成分提取量的影响 设定浸提时间为6 h,料液比为1 g:30 mL,不同浸提温度下的多糖、多

酚、黄酮及蛋白质提取量变化如图3所示。随提取温度的升高,多糖和黄酮提取量增加;多酚和蛋白质提取量在20~40 °C时增加,40~60 °C时减少,60~100 °C时增加。结合表1,综合各成分选择80、90、100 °C为正交试验提取温度的3水平。

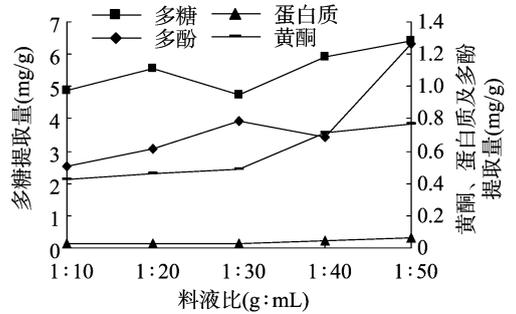


图2 料液比对猪苓药用成分提取量的影响

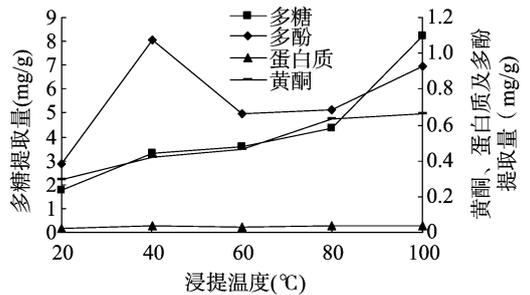


图3 浸提温度对猪苓药用成分提取量的影响

2.2 正交试验结果及综合评分分析

2.2.1 正交试验方案 参照猪苓单因素提取试验的结果,3因素对各种药用成分影响的最佳组合略有不同,综合考虑各药用成分的提取量及试验目的,确定正交试验提取工艺的3个主要因素温度、料液比、浸提时间的范围,如表2所示。在单因素试验的基础上,制定了猪苓多酚、多糖、黄酮和蛋白质提取的正交试验方案^[11],其结果如表3、表4所示。

表2 猪苓药用成分提取工艺的正交试验因素与水平

水平	A:温度(°C)	B:料液比(g:mL)	C:时间(h)
1	80	1:30	3
2	90	1:40	4
3	100	1:50	5

表3 猪苓多酚、多糖、黄酮和蛋白质提取的正交试验结果

编号	A:温度	B:料液比	C:时间	多酚提取量(mg/g)	黄酮提取量(mg/g)	多糖提取量(mg/g)	蛋白质提取量(mg/g)	综合评分
1	1	1	1	0.479	0.513	5.147	0.002	18.422
2	1	2	2	0.897	0.955	11.217	0.004	39.209
3	1	3	3	0.773	0.709	10.804	0.004	36.864
4	2	1	2	0.424	0.411	7.285	0.002	24.364
5	2	2	3	0.616	0.651	10.165	0.004	34.300
6	2	3	1	0.525	0.642	9.196	0.003	31.090
7	3	1	3	0.522	0.482	10.950	0.004	35.864
8	3	2	1	0.448	0.532	9.196	0.004	30.531
9	3	3	2	0.558	0.706	5.989	0.005	21.761

表4 猪苓药用成分提取正交试验结果的直观分析

水平	多酚提取量(mg/g)			黄酮提取量(mg/g)			多糖提取量(mg/g)			蛋白质提取量(mg/g)			综合评分		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
k_1	0.716	0.475	0.484	0.726	0.469	0.562	9.056	7.794	7.846	0.003	0.003	0.003	31.498	26.217	26.681
k_2	0.522	0.654	0.626	0.568	0.713	0.691	8.882	10.193	8.164	0.003	0.004	0.004	29.918	34.68	28.445
k_3	0.509	0.619	0.637	0.573	0.686	0.614	8.712	8.663	10.64	0.004	0.004	0.004	29.386	29.905	35.676
R	0.207	0.179	0.153	0.158	0.244	0.129	0.344	2.399	2.794	0.001	0.001	0.001	2.112	8.463	8.995

2.2.2 直观分析与综合评分分析^[8] 对猪苓中4种药用成分的提取量分别进行直观分析,其结果如表4所示。由表4可知,影响多酚提取量因素的主次顺序是温度>料液比>时间,最佳提取方案为 $A_1B_2C_3$,即在温度为80℃、料液比为1g:40mL的条件下浸提5h。影响黄酮提取量因素的主次顺序为料液比>温度>时间,最佳提取方案为 $A_1B_2C_2$,即在温度为80℃、料液比为1g:40mL的条件下浸提4h。影响多糖提取量因素的主次顺序是时间>料液比>温度,最佳提取方案为 $A_1B_2C_3$,即在温度为80℃、料液比为1g:40mL的条件下浸提5h。各药用成分提取量的最佳水平组合不同,为了同时使药用活性成分提取率越大越好,需要综合考虑,以目标函数来确定哪个试验条件最佳,因此,采用综合评分法,以多糖(y_{11})、多酚(y_{12})和黄酮(y_{13})各占30%权重,蛋白质(y_{14})占10%权重为依据,确定最佳工艺条件^[9]。加权评分为 $y_i = y_{i1} \times 30\% + y_{i2} \times 30\% + y_{i3} \times 30\% + y_{i4} \times 10\%$,各个试验号的加权评分值见表4。根据表4综合评分的极差值大小判断提取过程中影响因素的主次顺序为时间>料液比>温度。从直接分析来看,2号试验分值最高,其最优组合为 $A_1B_2C_2$ 。而根据正交试验设计的均匀可比性可知,最优组合方案是 $A_1B_2C_3$,即在80℃、1g:40mL、5h时提取量最高。

从表5可知,温度、料液比、时间3个因素对提取量的影响都不显著,因此不必再进行各因素水平间的多重比较。

表5 猪苓正交试验综合评分的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
矫正模型	251.6	6	41.932	0.500	0.784
截距	8 244.9	1	8 244.943	98.313	0.010
温度	7.2	2	3.623	0.043	0.959
料液比	108.0	2	54.016	0.644	0.608
时间	136.3	2	68.156	0.813	0.552
误差	167.7	2	83.864		
总变异	8 664.3	9			
总变差	419.3	8			

注: $R^2 = 0.600$ 。

2.3 试验验证优化结果^[6]

在 $A_1B_2C_2$ 和 $A_1B_2C_3$ 条件下进行验证试验,结果表明, $A_1B_2C_2$ 组合比 $A_1B_2C_3$ 组合的4种成分总提取量高,因此认为该组合最优,即浸提温度80℃、料液比1g:40mL、浸提时间4h。此时,多酚提取量为0.895mg/g,多糖提取量为13.218mg/g,黄

酮提取量为0.949mg/g,蛋白质提取量为0.005mg/g。

3 结论

为开发猪苓在保健食品、食品抗氧化剂以及医药方面的应用潜力,本研究采用单因素试验和正交试验法对水煮法浸提猪苓药用成分的工艺进行优化研究。以正交设计综合评分的极差分析得出猪苓中多酚、多糖和黄酮的最优提取工艺条件,即在温度为80℃、料液比为1g:40mL条件下浸提4h。

从试验结果来看,对猪苓药用活性成分提取量影响最大的因素是浸提时间,其次分别为料液比、温度。在实际生产中,通过控制浸提条件可以得到可观的产量,而且由于猪苓本身具有利尿、抗癌和抗菌的疗效,水煮浸提法不仅提取出了多酚、黄酮、多糖等成分,其他可溶性的成分如氨基酸、蛋白质等也会进入水中,因此,用此浸提液开发保健饮料,也将具有广阔的前景。

参考文献:

- [1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997:150-170.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:2191-2192.
- [3] 李江林. 猪苓栽培方法及药材质量分析研究[D]. 西安:陕西师范大学,2012.
- [4] 中医研究院中药研究所药理室肿瘤组. 猪苓提取物的毒性试验观察[J]. 新医药学杂志,1979(5):59-60.
- [5] 周元,梁宗锁. 猪苓发酵菌丝胞内多糖提取工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(6):219-227,234.
- [6] 刘咏,行春丽,成战胜,等. 从桑叶中提取多酚、黄酮和多糖的优化试验[J]. 林产化工通讯,2005,39(1):10-13.
- [7] 顾志峰,叶乃好,石耀华. 实用生物统计学[M]. 北京:科学出版社,2012:99-100.
- [8] 张力. SPSS 13.0在生物统计中的应用[M]. 厦门:厦门大学出版社,2006:68-71.
- [9] 陆旋,周达炜. 桑叶黄酮多酚类物质提取优化试验[J]. 浙江化工,2012,43(11):26-29.
- [10] 肖浩. 发酵藤茶黄酮和多糖的综合提取及黄酮组分和抗氧化活性的研究[D]. 恩施:湖北民族学院,2012.
- [11] 韩敏敏,黄亚东. 化学法提取蒲菜皮中水溶性膳食纤维的工艺条件优化[J]. 江苏农业科学,2012,40(12):283-285.