

何婷婷,柴军红,钟读波,等. 蒲公英活性成分提取工艺的优化、多糖红外表征及其抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):163-166.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.043

蒲公英活性成分提取工艺的优化、 多糖红外表征及其抗氧化性

何婷婷¹, 柴军红¹, 钟读波², 张 蕾¹, 郝婧玮¹, 李振东¹, 王 霞¹

(1. 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江牡丹江 157011; 2. 云南云测质量检验有限公司, 云南昆明 650217)

摘要:以总黄酮、多糖、甾醇得率为指标,比较分析索氏提取法、浸提法、超声波辅助提取法、酶解法、微波辅助提取法、闪式提取法、酶促复合法对蒲公英活性成分的提取效果,在此基础上,采用正交试验设计优化酶法+超声波法的复合提取工艺,研究分析蒲公英多糖红外表征及其抗氧化性。结果表明,酶法+超声波法复合提取的最佳工艺条件为 0.5% 纤维素酶添加量(以占蒲公英质量的百分比计)、超声时间 30 min、超声功率 200 W、料液比 1 g:10 mL、乙醇浓度 60%,经放大 20 倍试验,蒲公英总黄酮、多糖、甾醇得率分别为(2.596±0.029)%、(3.098±0.010)%、(4.091±0.025)%;红外光谱表征蒲公英多糖为β-吡喃糖;蒲公英多糖对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、羟自由基有明显的清除效果,1.0 mg/mL 多糖对其清除率均在 40% 以上,对超氧阴离子自由基清除效果与维生素 C 相似,1.0 mg/mL 多糖对超氧自由基的清除率在 80% 以上。

关键词:蒲公英;总黄酮;多糖;甾醇类;工艺优化;抗氧化;红外光谱;β-吡喃糖

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0163-04

蒲公英(*Taraxacum officinale*)为菊科蒲公英属多年生草本植物^[1],富含多糖、三萜、甾醇、绿原酸、咖啡酸、总黄酮等活性成分,是药食兼用植物^[2]。现代药理研究表明,蒲公英具有广谱抑菌、清热解毒、利胆保肝、利尿散节、抗氧化、抗肿瘤、抗内毒素、健胃和免疫促进等作用^[3-6],而这些一般均与其含有多糖、甾醇、总黄酮等物质有一定关系^[6]。目前,蒲公英常见的提取工艺效率低,活性成分得率不稳定,提取率指标单一,不能准确进行提取工艺评价,而对总黄酮、甾醇、多糖等指标采用含量加权法,可以快速评价提取工艺的优劣^[7-8]。本试验以黑龙江牡丹江产东北蒲公英为原料,以多糖、总黄酮、甾醇得率为指标,采用正交试验设计对其提取工艺进行优化,同时,对一般作为副产物丢弃的多糖进行抗氧化、红外光谱研究,以期为多糖的进一步开发利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料、主要试剂和仪器设备

1.1.1 试验材料 东北蒲公英,采自黑龙江省牡丹江地区。

1.1.2 主要试剂 苯酚、浓硫酸、葡萄糖,均为分析纯(analytical reagent,简称 AR),由天津恒兴化学试剂厂生产;双氧水(AR),由天津市北辰方正化学试剂厂生产;无水乙醇(AR)、纤维素酶 R-10,由日本 Yakult 集团生产;芸香苷、β-谷甾醇标准品(纯度>99%)、谷甾醇(纯度>98%),由贵

州迪大生物技术公司生产;甲醇(AR)、盐酸(AR),由哈尔滨天盛精细化工有限公司生产;硫酸亚铁(AR),由天津致远化学试剂有限公司生产;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、D9132,由美国 Sigma 公司生产;香草醛(AR),由天津天新精细化工研发中心生产;高氯酸(AR)、焦性没食子酸(AR),由天津市大茂化学试剂厂生产。

1.1.3 仪器设备 Frontie 红外光谱仪,由美国珀金埃尔默公司生产;T6 紫外可见分光光度计,由北京普析通用仪器有限公司提供;PB-10 型 pH 计、ML503 型梅特勒电子天平,由德国赛多利斯集团生产;R3 旋转蒸发器,由瑞士步琦公司生产;QQ-T650CT 型超声波萃取装置,由上海启前电子技术公司生产;索氏提取装置,由上海比朗仪器制造有限公司生产;NJL07-3 型实验专用微波炉,由南京杰全微波设备有限公司生产;JHBE-50T 型闪式提取器,由南京庚辰科学仪器有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 提取方法的对比 将蒲公英去杂、粉碎至 20~30 目,<35℃低温烘干,备用;取蒲公英 200 g,分别采用浸提法等 10 种方法提取蒲公英活性成分。提取方法有以下 10 种:①浸提法,料液比 1 g:12 mL,50%乙醇浸泡 48 h,提取 2 次;②回流提取法,料液比 1 g:8 mL,50%乙醇回流 6 h,提取 3 次;③索氏提取法,料液比 1 g:8 mL,提取 8~12 h;④超声波辅助提取法,料液比 1 g:8 mL,提取时间 40 min,温度 40℃,功率 150 W^[8];⑤微波辅助提取法,料液比 1 g:8 mL,提取时间 10 min,温度 40℃,功率 300 W^[9];⑥闪式提取法,<25℃室温下提取时间 5 min,pH 值 7,转速 5 000 r/min,方法略有改动^[10-11];⑦酶促+微波法,0.5%纤维素酶(以占蒲公英质量的百分比计,pH 值为 6~7)于 37℃处理 2 h,再按微波辅助提取法提取^[12];⑧酶促+回流提取法,0.5%纤维素酶(以占

收稿日期:2016-12-29

基金项目:黑龙江省牡丹江市科技攻关项目(编号:G2014d1509);牡丹江师范学院国家预研项目(编号:GY201307)。

作者简介:何婷婷(1983—),女,黑龙江牡丹江人,博士,讲师,从事药用植物学研究。E-mail:swxhtt@126.com。

通信作者:柴军红,硕士,讲师,从事天然产物的分离及应用研究。

E-mail:swxcjh@126.com。

蒲公英质量的百分比计,pH 值为 6~7)于 37℃处理 2 h,再按回流提取法提取;⑨酶促+闪式提取法,0.5%纤维素酶(以占蒲公英质量的百分比计,pH 值为 6~7)于 37℃处理 2 h,再按闪式提取法提取;⑩酶促+超声波法,0.5%纤维素酶(以占蒲公英质量的百分比计,pH 值为 6~7)于 37℃处理 2 h,再按超声辅助提取法提取。重复 3 次。

1.2.2 提取工艺正交试验优化 在单因素试验的基础上,以酶促+超声波法提取方法中的功率、提取时间、料液比、乙醇浓度等为正交因子,以总黄酮、多糖、甾醇得率为指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1)进行提取工艺优化。总黄酮得率的测定参照亚硝酸钠-硝酸铝法^[13-14]进行,取适量提取浸膏,用少量甲醇超声处理溶解;用 70% 甲醇定容至 100 mL 容量瓶中,移取 0.5~1 mL 上清于 25 mL 比色管中,测定波长 508 nm 处的吸光度。多糖得率的测定参照硫酸-苯酚法^[7,15],将提取液回收溶剂浓缩至原体积的 1/10~1/6,加乙醇至大于浓缩液体积的 60%,静置 12 h;离心,冷冻干燥;取适量热水,超声 10 min 溶解,定容于 100 mL 容量瓶中,移取上清 0.5~1.0 mL,测定波长 492 nm 处的吸光度。甾醇得率的测定参照 5% 香草醛-高氯酸显色法^[16-18],回收提取液中的乙醇,等体积三氯甲烷萃取;移取 0.5~2.0 mL 萃取液于 25 mL 比色管中,测定波长 540 nm 处的吸光度。根据制得的标准曲线和活性成分的吸光度,统计总黄酮、多糖、甾醇得率,并采用综合评分法将各项指标赋予加权系数,加权系数的大小由指标的重要程度来决定,指标越重要,加权系数越大^[19]。本试验根据活性成分重要程度和提取得率,设蒲公英总黄酮、多糖、甾醇得率的加权系数分别为 200、100、300。同时,对优化工艺放大 20 倍试验进行稳定性验证,重复 3 次。

表 1 提取蒲公英活性成分正交试验水平设计

水平	A:提取时间 (min)	B:功率 (W)	C:料液比 (g:mL)	D:乙醇浓度 (%)
1	20	200	1:5	30
2	30	300	1:10	50
3	40	400	1:15	60

1.2.3 多糖体外抗氧化 对蒲公英采用酶促+超声辅助法提取多糖,经过醇沉、Savage 法去除蛋白、冷冻干燥获得多糖。参照文献[20-22]的方法测定蒲公英多糖对超氧阴离子自由基、DPPH 自由基、羟自由基的清除能力。

1.2.4 多糖红外表征 将酶促+超声辅助法提取获得的粗多糖用去离子水配成溶液,用 Savage 法去除蛋白,透析^[23],醇沉,离心,冷冻干燥,备用;采用溴化钾压片法制样,用红外光谱仪检测其红外光谱。

1.3 数据统计分析

采用 Excel 2007 软件计算试验数据相对标准偏差,并进行差异显著性分析;采用 Origin7.5 软件拟合相关曲线。

2 结果与分析

2.1 活性成分标准曲线

试验结果表明,总黄酮、多糖、甾醇对应的芸香苷对照品、葡萄糖、 β -谷甾醇标准曲线分别为 $y = 0.5831x + 0.0129$ ($r^2 = 0.9992$)、 $y = 0.0504x + 0.0011$ ($r^2 = 0.9990$)、 $y = 20.9400x + 0.0100$ ($r^2 = 0.9984$),分别在 0.113 3~

0.662 8 mg/mL、2.515 0~20.120 0 μ g/mL、5.020 0~15.060 0 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.2 对蒲公英活性成分不同提取方法的对比

由表 2 可见,与单一的超声波法、微波法、闪式提取法、回流提取法相比,酶法对蒲公英活性成分的提取有一定的促进作用,总黄酮、多糖、甾醇得率较单一方法提取分别提高 0.92%~32.14%、2.76%~51.94%、3.03%~30.46%,这可能是由于酶法促进了细胞纤维质的分解,提高了细胞的通透性^[23-24];酶法+超声波法、酶法+闪式提取法对蒲公英总黄酮、多糖的提取效果相对较好,酶法+超声波法对甾醇的提取效果相对较好,与浸提法相比差异极显著($P < 0.01$)。酶法+超声波法对蒲公英总黄酮、多糖、甾醇的提取得率相对最高,分别为 2.59%、3.13%、3.94%,为本研究中的最佳提取方法。

表 2 不同提取方法对蒲公英活性成分的提取效果

提取方法	蒲公英活性成分得率(%)		
	总黄酮	多糖	甾醇
浸提法	1.31±0.025	1.33±0.115	2.05±0.131
回流提取法	1.40±0.032	1.81±0.089*	2.31±0.036
索氏提取法	1.81±0.025*	1.09±0.015	3.16±0.052*
超声波辅助提取法	1.96±0.062*	2.06±0.098*	3.02±0.053*
微波辅助提取法	1.89±0.082*	2.39±0.082*	3.16±0.065*
闪式提取法	2.17±0.130*	2.08±0.090*	2.90±0.066*
酶法+超声波法	2.59±0.031**	3.13±0.062**	3.94±0.179**
酶法+微波法	2.09±0.083*	2.52±0.013*	3.43±0.137*
酶法+闪式提取法	2.19±0.015**	2.88±0.025**	3.02±0.067*
酶法+回流提取法	1.80±0.166*	1.86±0.052*	2.38±0.015

注:以浸提法为对照,“*”表示与对照差异显著($P < 0.05$),“**”表示与对照差异极显著($P < 0.01$)。

2.3 酶法+超声波法提取蒲公英活性成分工艺优化

由表 3 可知,影响酶法+超声波法提取蒲公英活性成分效果的因子排序为料液比>提取时间>乙醇浓度>微波功率,提取工艺 $A_2B_1C_2D_3$ 即提取时间 30 min、乙醇浓度 60%、料液比 1 g:10 mL、超声功率 200 W 的综合评分相对最高,此时总黄酮、多糖、甾醇的得率分别为 2.54%、3.06%、4.02%;理论最佳工艺 $A_2B_2C_2D_3$ 即提取时间 30 min、乙醇浓度 60%、料液比 1 g:10 mL、超声功率 300 W 经重复 3 次试验验证,总黄酮、多糖、甾醇得率分别为(2.376±0.071)%、(2.955±0.049)%、(3.561±0.052)%,略低于提取工艺 $A_2B_1C_2D_3$,则认为工艺 $A_2B_1C_2D_3$ 即提取时间 30 min、乙醇浓度 60%、料液比 1 g:10 mL、超声功率 200 W 为实际最佳提取工艺。

2.4 蒲公英活性成分提取最佳工艺稳定性验证试验

由表 4 可知,总黄酮、多糖、甾醇提取率平均值分别为 2.596%、3.098%、4.091%,相对标准偏差分别为 1.12%、0.32%、0.61%,偏差在 1% 左右,考虑到试验误差,说明提取工艺较为稳定。

2.5 蒲公英多糖的抗氧化性

由图 1 至图 3 可见,蒲公英多糖对羟自由基、DPPH 自由基具有一定的清除效果,蒲公英多糖浓度为 1.0 mg/mL 时,对羟自由基、DPPH 自由基的清除率达到 40% 以上;蒲公英多糖对超氧阴离子自由基的清除效果与维生素 C 相似,浓度为 0.6 mg/mL 时对超氧阴离子自由基的清除率达到 80% 以上,

表 3 酶法 + 超声波法提取蒲公英活性成分正交试验结果

试验号	A:提取时间	B:微波功率	C:料液比	D:乙醇浓度	活性成分得率(%)			综合评分 (分)
					总黄酮	多糖	甾醇	
1	1	1	1	1	1.76	3.02	2.50	1 403.667
2	1	2	2	2	2.39	2.96	3.58	1 849.002
3	1	3	3	3	2.05	2.63	4.07	1 893.667
4	2	1	2	3	2.54	3.06	4.02	2 018.010
5	2	2	3	1	2.47	3.09	3.89	1 970.117
6	2	3	1	2	2.48	2.97	3.21	1 758.333
7	3	1	3	2	2.69	3.06	3.12	1 782.002
8	3	2	1	3	2.45	3.11	3.51	1 853.333
9	3	3	2	1	2.57	3.09	3.26	1 801.300
k_1	1 715.445	1 734.560	1 671.778	1 725.028				
k_2	1 915.487	1 890.817	1 889.437	1 796.446				
k_3	1 812.212	1 817.767	1 881.929	1 921.670				
R	200.042	156.257	217.659	196.642				

注:活性成分为取 2 位小数后的平均值,而综合评分为活性成分原始数据(含 3 位小数)计算而成。

表 4 蒲公英活性成分提取最佳工艺稳定性验证试验结果

类别	活性成分提取率(%)		
	总黄酮	多糖	甾醇
重复 I	2.598	3.103	4.104
重复 II	2.624	3.088	4.062
重复 III	2.567	3.103	4.108
均值	2.596	3.098	4.091
标准偏差	0.029	0.010	0.025
相对标准偏差	1.12%	0.32%	0.61%

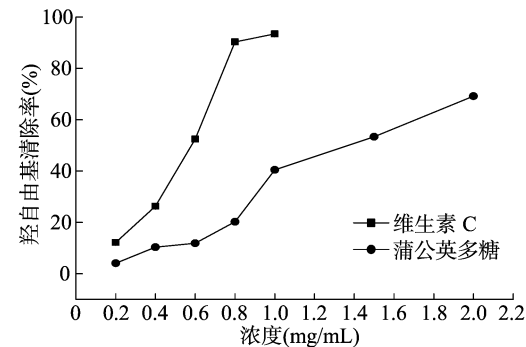


图1 蒲公英多糖对羟自由基的清除效果

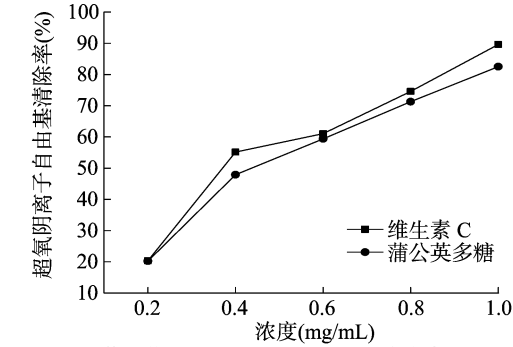


图2 蒲公英多糖对超氧阴离子自由基的清除效果

1.0 mg/mL 时清除率达到 80% 以上。

2.6 蒲公英多糖的红外表征

由图 4 可知,3 435、13 386 cm 分别为—OH、N—H 伸缩

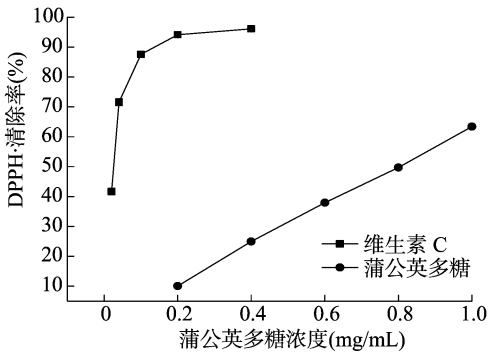


图3 蒲公英多糖对 DPPH· 的清除效果

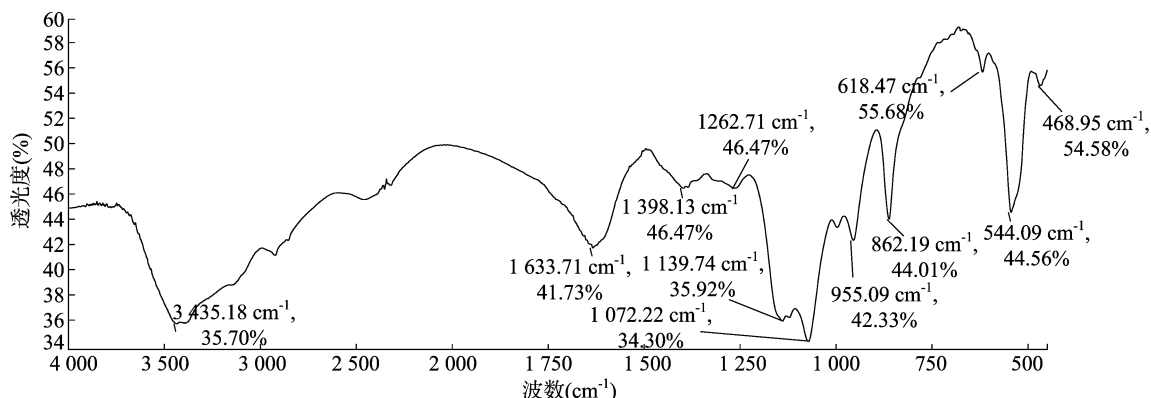
振动峰,1 072、779、618、541 cm^{-1} 为吡喃糖特征吸收峰之一^[23,25],蒲公英多糖还在 998 ~ 1 100 cm^{-1} 出现 2 个峰,由此判断蒲公英多糖为 β -吡喃糖。此外,在 1 633 cm^{-1} 处有大吸收峰,说明多糖中存在酰胺基^[25],则该多糖可能为蛋白多糖。

3 结论与讨论

考虑到工业化及控制条件优化难易程度,选择超声波技术提取蒲公英活性成分较为合理。在此基础上,酶的加入能明显提高蒲公英多糖、甾醇、总黄酮等活性成分的提取率。酶促反应在提取工艺中具有重要的意义,可降低过滤阻力^[26-29],有利于提高工艺时效。

正交优化试验与综合加权分析相结合,可以解决多成分活性物质提取工艺讨论复杂的问题,能简洁、客观评价相应的提取工艺,无须对所有指标进行正交分析,这有利于生产企业的实际操作应用。蒲公英活性成分最佳提取工艺为提取时间 30 min、乙醇浓度 60%、料液比 1 g : 10 mL、超声功率 200 W,其综合评分相对最高,为 2 018.010 分,此时总黄酮、多糖、甾醇的得率分别为 2.54%、3.06%、4.02%,相对较高。

本试验结果表明,酶法 + 超声波法提取蒲公英活性成分经放大 20 倍试验,总黄酮、多糖、甾醇提取率平均值分别为 2.596%、3.098%、4.091%,相对标准偏差分别为 1.12%、0.32%、0.61%,偏差在 1% 左右,提取工艺较为稳定;蒲公英多糖对超氧阴离子自由基的清除效果与维生素 C 相似,



- [1] 郑义,郭小娇,赵婷,等. 东北地区8种蒲公英(*Taraxacum*)叶片主要品质指标评价[J]. 沈阳农业大学学报,2013,44(5): 712-715.
- [2] 赵守训,杭秉倩. 蒲公英的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源,2001,20(3):1-3.
- [3] 谢沈阳,杨晓源,丁章贵,等. 蒲公英的化学成分及其药理作用[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(增刊1):141-151.
- [4] 屠国昌. 蒲公英化学成分、药理作用和临床应用[J]. 海峡药学,2012,24(5):33-35.
- [5] 杨晓杰,付学鹏,刘泽东. 蒲公英多糖抗疲劳作用研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(11):2686-2687.
- [6] Liu J T, Xiong H Z, Cheng Y, et al. Effects of taraxasterol on ovalbumin-induced allergic asthma in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology,2013,148(3):787-793.
- [7] 杨晓杰,付学鹏. 蒲公英多糖体外抑瘤和抗突变作用研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(10):2470-2471.
- [8] 柴军红,何婷婷,金志民,等. 花楸叶活性成分提取工艺的优化[J]. 食品研究与开发,2014,35(3):23-27.
- [9] 徐澜,王明华,渠娟娟,等. 酶解法提取蒲公英多糖工艺[J]. 食品研究与开发,2016,37(5):46-51.
- [10] 李德海,孙常雁,孙莉洁,等. 微波辅助法提取滑菇多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技,2008,29(4):226-228.
- [11] 刘娟,徐倩,赵旭伟. 闪式提取法提取龙牙楸木中总皂苷的工艺研究[J]. 现代食品科技,2010,26(6):622-624.
- [12] 林青,林亚平,邱德文. 用多指标活动水平的正交设计法对苏长史茱萸汤提取工艺进行优选[J]. 中国药学杂志,2004,39(2):182-184.
- [13] 谢普军,黄立新,张彩虹,等. 蒲公英茶与叶的化学成分测定及含量[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(1):60-62.
- [17] 孙慧慧,刘长军,顾青,等. 大海马中总甾醇提取工艺优化及成分分离[J]. 食品研究与开发,2015,36(1):40-42.
- [18] 李英霞,王凤云. 可见分光光度法测定大豆甾醇提取物中总甾醇的含量[J]. 辽宁中医药大学学报,2007,9(5):154-155.
- [19] 柴军红,何婷婷,杨春文,等. 狼爪瓦松中活性成分提取工艺的优化[J]. 贵州农业科学,2015,43(10):188-190.
- [20] 盛卫国,叶剑锋,徐勇,等. 紫外-可见分光光度法测定普乐安片中总甾醇含量[J]. 中国医药导报,2012,9(23):8-10.
- [21] 孟磊磊,陈瑞战,张敏,等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2010,31(10):168-172.
- [22] 陈佳,徐怀德,米林峰,等. 洋葱皮总黄酮纤维素酶法提取及抗氧化研究[J]. 食品科学,2011,32(4):37-41.
- [23] 夏朝红,戴奇,房韦,等. 几种多糖的红外光谱研究[J]. 武汉理工大学学报,2007,29(1):45-47.
- [24] 谭静,姜子涛,李荣,等. 微波萃取和超声波提取法提取柚皮中总黄酮类化合物的对比[J]. 食品研究与开发,2010,31(2):42-45.
- [25] 孙延芳,李子昂,梁宗锁,等. 食用菌多糖及其红外光谱分析[J]. 黑龙江农业科学,2011(10):99-100.
- [26] 廖黎,樊荣,徐文俊,等. 酶解法提取川贝母组培物总生物碱[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):313-315.
- [27] 韩建军,宁娜,郁建生,等. 响应面优化微波协同酶法提取川芎阿魏酸的工艺[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):284-288.
- [28] 王星敏,殷钟意,郑旭熙,等. 微生物酶解破壁提制葛根总黄酮的工艺[J]. 食品科学,2011,32(2):28-31.
- [29] 宁娜,韩建军,胡宇莉,等. 响应面法优化蛇床子中蛇床子素的酶法提取工艺[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):169-173.