

彭浩,秦宏伟,程有君,等. 枸杞多糖提取工艺优化及不同产地枸杞质量比较[J]. 江苏农业科学,2018,46(22):194-197.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.22.046

枸杞多糖提取工艺优化及不同产地枸杞质量比较

彭浩¹, 秦宏伟¹, 程有君¹, 刘正华², 李彦连¹, 宋文路¹

(1. 济宁学院生命科学与工程系, 山东曲阜 273155; 2. 山东博康中药饮片有限公司, 山东青州 262500)

摘要:为优化枸杞多糖超声波辅助提取工艺并比较不同产地枸杞药材的质量差异,以多糖提取率为指标,在料液比、回流时间、超声时间3个单因素基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行提取工艺的优化研究。同时,测定不同产地枸杞子水分、总灰分、浸出物含量,按优化后的工艺提取并测定多糖提取率,比较抗氧化活性,作为药材质量评价项目。结果表明:超声波辅助提取枸杞多糖的最佳工艺条件为料液比1 g:50 mL,回流时间120 min,超声时间70 min。同时,宁夏枸杞多糖提取率更高,为21.39%,总抗氧化能力、DPPH自由基清除率及羟自由基清除率均高于河北枸杞,为枸杞多糖的开发利用提供了试验依据。

关键词:枸杞多糖;超声波辅助提取;提取率;正交试验;质量比较

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)22-0194-04

枸杞果实枸杞子为我国传统的宝贵中药材,具有补肾养肝、润肺明目、益精、补血等功效^[1]。《中华人民共和国药典》2015版^[2](以下简称《药典》)中枸杞子项下规定水分不得超过13%,总灰分不得超过5%,浸出物不得少于55%,以此作为评价枸杞子药材质量的标准。同时,枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharide, LBP)具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗辐射、增强免疫、保护视网膜、保护生殖系统、治疗骨质疏松等作用^[3-6],为《药典》规定检测的主要药用活性成分,它的含量差异亦体现了枸杞品质的差异。近年来枸杞种植面积不断扩大,产区已由道地主产区宁夏扩大到河北、内蒙古、甘肃、陕西、山西、新疆等省(自治区)^[7]。枸杞原料的产地来源与产品的品质密切相关,不同产地的枸杞品质存在不同程度的差异,低温、高海拔、长日照有益于枸杞中主要活性成分的积累^[8]。枸杞多糖提取的常用方法是热水浸提法,但热水浸提法提取时间长、耗能多。超声波辅助提取法因超声波产生的强烈振动、空化效应、搅拌作用等可以加速植物有效成分进入溶剂,提高提取率,缩短提取时间,简化操作步骤,在天然产物提取中显示出了巨大优势^[9-11]。本试验选用超声波辅助法提取枸杞多糖,并通过正交试验进行优化,以期为该成分的开发利用提供依据。同时,以宁夏和河北栽培的枸杞为材料,对它们的水分、总灰分、浸出物及多糖提取率进行测定分析与比较,以此作为中药选材的依据。

1 材料

试验仪器为101A-1型电热鼓风干燥箱(上海市实验仪

器总厂)、SX-4-10型箱式电阻炉(北京永光明医疗仪器总厂)、万用电炉(一联北京科伟永鑫实验仪器设备厂)、DRHH-54型数显恒温水浴锅(上海双捷实验设备有限公司)、BF-Ⅲ型薄层电动涂布器(天津市思利达科技有限公司)、ZF-6型(三用紫外仪上海市金鹏分析仪器有限公司)、L6S型紫外可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司)、KQ-250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。试验用枸杞子分别产自宁夏和河北,并经过济宁学院生命科学与工程系李彦连副教授鉴定为茄科枸杞属植物枸杞(Lycium barbarum)的果实——枸杞子,低温干燥避光保存;D-无水葡萄糖(含量为99.5%)和枸杞子对照药材(均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为1108—2025、121072—201410),其他试剂均为分析纯(AR)。本试验于2017年6月在山东博康中药饮片有限公司及济宁学院生命科学与工程系进行。

2 方法与结果

2.1 LBP提取工艺流程

称取干燥河北枸杞子粗粉0.5 g加入80%乙醇100 mL,加热回流1 h,过滤,80%乙醇分次洗涤滤渣。滤渣中加入蒸馏水,超声波处理,回流。过滤并冷却后,蒸馏水定容至250 mL。

2.2 标准曲线的制备

多糖测定采用改进的苯酚-硫酸法^[12]。使用葡萄糖标准品精确配制浓度为0.1 mg/mL的标准溶液。依次量取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL标准溶液,用蒸馏水定容至2.0 mL。各加入1 mL 5%的苯酚,5 mL浓 H_2SO_4 ,40℃水浴中保温15 min,冷却至室温,于490 nm处测吸光度。以葡萄糖浓度作为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

2.3 LBP提取率的测定

根据葡萄糖标准曲线制作测定容后的枸杞多糖溶液吸光度,根据式(1)计算枸杞多糖提取率。

$$\text{枸杞多糖提取率} = CVD/m \times 100\% \quad (1)$$

式中:C为根据标准曲线求得的多糖浓度,g/mL;V为样品溶

收稿日期:2018-01-05

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2014CL001);山东省高等学校科技计划项目(编号:J17KA095);济宁学院青年科研基金(编号:2016QNKJ09)。

作者简介:彭浩(1982—),女,山东济宁人,硕士,副教授,主要从事生物活性成分开发研究。E-mail:juliejulie009@126.com。

通信作者:宋文路,博士,副教授,主要从事生物质资源化利用研究。E-mail:songwenlu0714@163.com。

液的定容体积, mL; D 为枸杞多糖的稀释倍数; m 为枸杞原料质量, g。

2.4 单因素试验设计

影响枸杞多糖提取率的因素比较多, 如料液比、提取温度和时间、提取次数、pH 值等。以超声波作为多糖样品的辅助提取方法, 单因素试验设计如下:

2.4.1 料液比对 LBP 提取率的影响 固定超声时间为 30 min, 加热回流提取时间为 60 min, 测定料液比分别为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 (g: mL) 时的多糖提取率, 结果如图 1 所示。

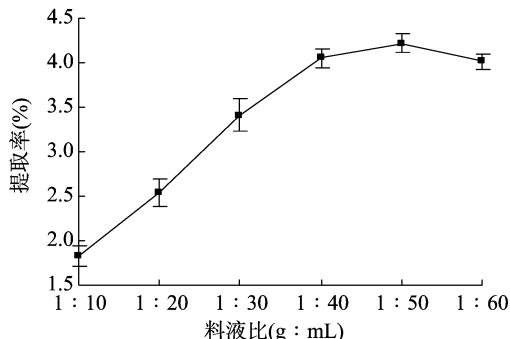


图1 料液比对 LBP 提取率的影响

由图 1 可知, 多糖的提取率随着料液比的增加而逐渐增大。这是由于溶剂的增加有利于多糖的扩散传质, 从而增加多糖的提取率^[13]。当料液比达 1 g: 40 mL 后, 随着水量的增加, 提取率增加不明显, 而且当料液比超过 1 g: 50 mL 后, 过多的溶剂则会消耗大量超声波辐射能量, 影响多糖的析出, 因而提取率呈现下降的趋势。所以提取料液比选取在 1 g: 40 mL 左右。

2.4.2 回流时间对 LBP 提取率的影响 固定料液比 1 g: 40 mL, 超声时间为 30 min, 测定加热回流提取时间分别为 30、60、90、120、150、180 min 时的多糖提取率, 结果如图 2 所示。

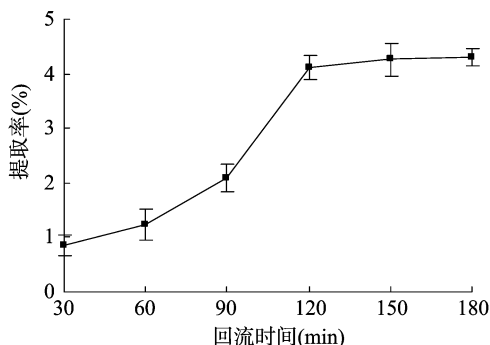


图2 回流时间对 LBP 提取率的影响

由图 2 可知, 随着回流时间的增加, 多糖的提取率也在增加, 且在 120 min 内增加显著, 之后趋于平缓。本着节能原则, 回流提取时间在 120 min 左右为宜。

2.4.3 超声时间对 LBP 提取率的影响 固定料液比 1 g: 40 mL, 加热回流提取时间为 120 min, 测定超声时间分别为 30、45、60、75、90、105 min 时的多糖提取率, 结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 在超声时间为 30 ~ 60 min 之间时, 多糖提取率随超声时间的增加而上升, 但是当超声时间超过 60 min

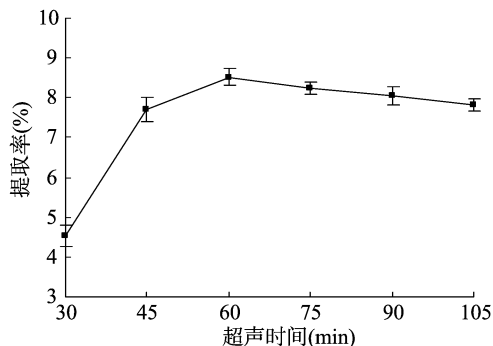


图3 超声时间对 LBP 提取率的影响

后提取率缓慢下降。超声波时间短使多糖不能充分溶解, 但超声波处理时间过长其强剪切作用使大分子多糖断裂, 造成多糖的损失^[14]。所以超声时间应选取在 60 min 左右。

2.5 正交试验设计

根据单因素试验的结果, 选取料液比、超声时间、回流时间 3 个因素的各 3 个适宜水平 (表 1), 按 $L_9(3^4)$ 进行正交试验^[12], 优化提取工艺, 确定最佳提取工艺条件, 结果如表 2 所示。

表 1 正交试验因素与水平

水平	因素		
	A: 料液比 (g: mL)	B: 回流时间 (min)	C: 超声时间 (min)
1	1:30	90	50
2	1:40	120	60
3	1:50	150	70

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

编号	A	B	C	多糖提取率 (%)
1	1	1	1	4.23
2	1	2	2	5.40
3	1	3	3	7.57
4	2	1	2	5.15
5	2	2	3	8.72
6	2	3	1	6.54
7	3	1	3	8.93
8	3	2	1	7.63
9	3	3	2	7.10
K_1	5.73	6.10	6.13	
K_2	6.80	7.25	5.88	
K_3	7.89	7.07	8.41	
k_1	17.2	18.31	18.40	
k_2	20.41	21.75	17.65	
k_3	23.66	21.21	25.22	
R	2.16	1.15	2.28	

2.6 LBP 提取率方差分析

为进一步确定超声波辅助法提取 LBP 的最佳工艺条件, 评估和判断试验误差和条件对试验结果的影响, 利用 SPSS 19.0 软件进行方差分析, 结果如表 3 所示。由表 2 和表 3 可知, 料液比、回流时间、超声时间都会影响 LBP 提取率, 且均达到了显著水平 ($P < 0.05$)。由于 $R_C > R_A > R_B$, 所以超声时间对提取率影响最大。由 k 值可知最优水平为 $A_3B_2C_3$, 即料

表 3 方差分析

误差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
校正模型	20.835	6	3.472	60.519	0.016	**
A	6.955	2	3.478	60.610	0.016	**
B	2.282	2	1.141	19.883	0.048	**
C	11.598	2	5.799	101.065	0.010	**
误差	0.115	2	0.057			
校正的总计	20.950	8				

注：“**”表示差异显著($P < 0.05$)。

液比 1 g : 50 mL、回流时间 120 min、超声时间 70 min。

2.7 验证试验

对通过正交试验得出的最佳工艺条件进行验证试验,3 次平行试验的提取率平均值为 $(9.06 \pm 0.23)\%$, 接近预期值,且显著高于其他条件下的 LBP 提取率。

2.8 不同产地枸杞的质量评价

选用水分、总灰分、浸出物和多糖提取率作为评价指标,对河北枸杞子和宁夏枸杞子进行质量评价。将干燥枸杞子粉碎,过二号筛[24 目,筛孔内径为 $(850 \pm 29) \mu\text{m}$] 备用。

2.8.1 水分测定法 参照《药典》中的烘干法进行测定,精确称取 2 种枸杞子粉末各 3 份,每份 2 g,计算供试样品含水量(%),结果如表 4 所示。由表 4 可知,2 种枸杞子水分均符合《药典》中不得超过 13.0% 的要求。

2.8.2 总灰分测定 参照《药典》中的总灰分测定方法进行测定,精确称取 2 种枸杞子粉末各 3 份,每份 2 g,计算供试品中总灰分的含量(%),结果如表 4 所示。由表 4 可知,2 种枸杞子的总灰分测定均低于《药典》5.0% 的要求。

表 4 不同产地枸杞中水分、总灰分、浸出物及多糖提取率($\bar{x} \pm s, \%$)

枸杞产地	水分	总灰分	浸出物	多糖提取率
宁夏	9.81 ± 0.13	4.17 ± 0.12	60.67 ± 2.72	21.39 ± 0.41
河北	10.22 ± 0.26	4.09 ± 0.24	65.75 ± 1.38	9.28 ± 0.32

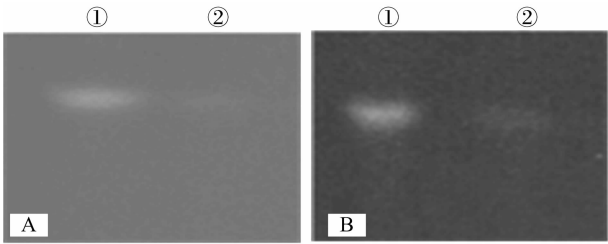
2.8.3 浸出物测定 参照《药典》中的热浸法进行浸出物测定,精确称取 2 种枸杞子粉末各 3 份,每份 4 g,计算浸出物的含量(%),结果如表 4 所示。由表 4 可知,2 种枸杞子的浸出物含量均符合《药典》中不得少于 55.0% 的规定标准。

2.8.4 糖类的定性鉴别 干燥的枸杞子粉末 0.5 g,加水溶解至 50 mL 后将其置于加热套中加热回流 15 min,冷却过滤后滤液置于梨形分液漏斗中加入 15 mL 乙酸乙酯萃取,将萃取的乙酸乙酯液转移至蒸发皿中沸水浴浓缩至 1 mL,得到供试品溶液。采用同样的方法制备枸杞对照药材溶液,作为对照。按照薄层色谱法试验,各吸取 5 μL 供试品溶液和对照溶液分别点至同一硅胶 G 薄层板,将其放置在展缸中,加入展开剂(比例为 3 : 2 : 1 的乙酸乙酯 - 三氯甲烷 - 甲酸),展开,至 8 cm 后小心取出晾干,将硅胶薄板置于紫外光灯(365 nm)下检视。由图 4 可知,2 种枸杞子中均含有多糖成分。

2.8.5 枸杞多糖提取率测定 按照“2.6”节优化出的最佳工艺条件分别提取 2 种枸杞多糖,并进行提取率测定。由表 4 可知,宁夏枸杞多糖提取率明显高于河北枸杞。

2.8.6 2 种枸杞多糖的体外抗氧化性分析与比较

2.8.6.1 2 种枸杞多糖的总抗氧化能力比较 采用 FRAP 法^[15-16],分别取 1 mL 不同质量浓度的 2 种枸杞多糖水溶液



A 为宁夏枸杞; B 为河北枸杞; ① 为对照药材溶液; ② 为供试品溶液

图 4 枸杞多糖薄层色谱鉴别

进行测定,空白组以水代替样品,对照组则为同等质量浓度的维生素 C 溶液。以 1.0 mmol/L FeSO_4 溶液为标准物绘制标准曲线,样品抗氧化活性以达到同样吸光度所需 FeSO_4 的浓度($\mu\text{mol/L}$)表示,定义为 FRAP 值,结果如图 5 所示。

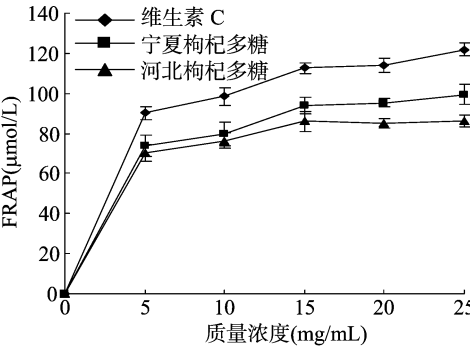


图 5 枸杞多糖总抗氧化能力的比较

由图 5 可知,宁夏枸杞和河北枸杞多糖总抗氧化能力随着质量浓度的增加而逐渐增强,当质量浓度为 25 mg/mL 时,其总抗氧化能力分别达到 99.39、86.25 $\mu\text{mol/L}$,说明 2 种枸杞多糖均具有一定的总抗氧化能力。但与同质量浓度的维生素 C 相比,枸杞多糖的 FRAP 值较小,说明总抗氧化能力略小。此外,在相同质量浓度下,宁夏枸杞总抗氧化能力显著高于河北枸杞。

2.8.6.2 2 种枸杞多糖对 DPPH 自由基的清除能力比较 参考 Atoui 等的测定方法^[16-17],分别取 1 mL 不同质量浓度的 2 种枸杞多糖的水溶液进行试验,空白组以水代替样品,对照组则为同等质量浓度的维生素 C。DPPH 自由基清除率按式(2)计算,结果如图 6 所示。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{D_1}{D_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中: D_1 为样品组的吸光度, D_0 为空白组的吸光度。

由图 6 可知,质量浓度在 0 ~ 25 mg/mL 范围内,2 种枸杞多糖对 DPPH 自由基的清除率随样品质量浓度升高而增大。当质量浓度为 25 mg/mL 时,宁夏枸杞和河北枸杞多糖对 DPPH 自由基清除率达到最大值,分别为 60.98% 和 56.39%,说明 2 种枸杞均具有一定的 DPPH 自由基清除能力。与同质量浓度的维生素 C 标准品相比,2 种枸杞多糖对 DPPH 自由基的清除率略小,但在相同质量浓度下,宁夏枸杞多糖对 DPPH 自由基清除能力明显高于河北枸杞多糖。

2.8.6.3 2 种枸杞多糖对羟自由基的清除能力比较 采用 2 - 脱氧核糖法^[16,18],分别取 500 μL 不同质量浓度的 2 种枸杞多糖的水溶液进行试验,空白组以水代替样品,对照组则为

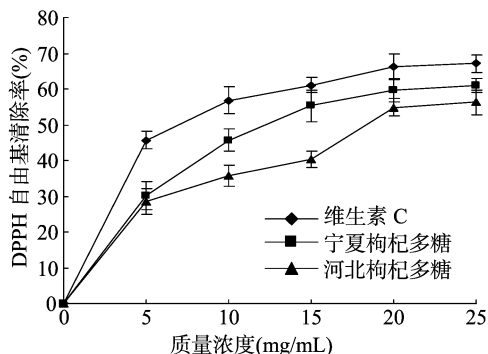


图6 枸杞多糖 DPPH 自由基清除能力的比较

同等质量浓度的维生素 C。DPPH 自由基清除率按式(3)计算,结果如图 7 所示。

$$\text{羟自由基清除率} = \left(1 - \frac{D_1}{D_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中: D_1 为样品组的吸光度, D_0 为空白组的吸光度。

由图 7 可知,质量浓度在 0~25 mg/mL 范围内,2 种枸杞多糖对羟自由基的清除率随样品质量浓度升高而增大。在 25 mg/mL 时,宁夏枸杞和河北枸杞多糖对羟自由基清除率达到最大值,分别为 82.02% 和 81.96%。2 种枸杞多糖羟自由基清除能力差异不明显,但均略大于同质量浓度下维生素 C 的羟自由基清除率,说明 2 种枸杞多糖具有较强的羟自由基清除能力。

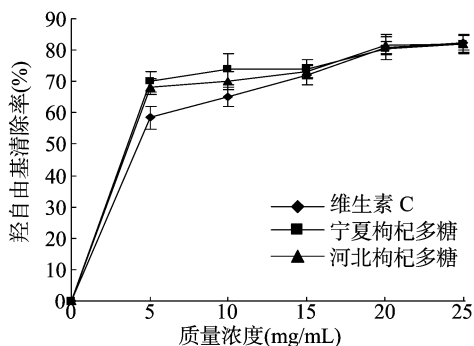


图7 枸杞多糖羟自由基清除能力的比较

3 结论

通过单因素试验和 SPSS 19.0 软件对 LBP 提取条件进行了正交试验优化,得到优化后的工艺条件为料液比 1 g : 50 mL,回流时间 120 min、超声时间 70 min。各因素对 LBP 提取率的影响顺序为超声时间 > 料液比 > 回流时间,验证试验的结果与预测值接近,表明通过正交试验所得的优化条件稳定、可靠。同时,比较了不同产地枸杞水分、总灰分、浸出物和多糖提取率。从测定结果可以看出,宁夏枸杞和河北枸杞均符合药典标准,但二者多糖提取率差别较大,其中,采用优化工艺提取并测定的宁夏枸杞多糖提取率更高,达 21.39%,且宁夏枸杞多糖的抗氧化活性优于河北多糖。近年来枸杞配方的中药产品逐年增加,大多数取其补益和增强免疫功能的作用,产品的功效与枸杞多糖抗氧化活性有密切的

关系,本试验的结果能为枸杞多糖的开发利用、有关厂家选择用药及适当调整枸杞用药剂量提供可参考的依据。

参考文献:

- [1] 侯学谦,祝婉芳,曲 玮,等. 枸杞化学成分及药理活性研究进展[J]. 海峡药学,2016,28(8):1-7.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] Jin M, Huang Q, Zhao K, et al. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 54(1):16-23.
- [4] Tang H L, Chen C, Wang S K, et al. Biochemical analysis and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 77:235-242.
- [5] Cui B, Chen Y, Liu S, et al. Antitumour activity of *Lycium chinensis* polysaccharides in liver cancer rats[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51(3):314-318.
- [6] Zhang X, Li Y, Cheng J, et al. Immune activities comparison of polysaccharide and polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 65:441-445.
- [7] 林 楠. 不同产地枸杞品质对比研究及优良株系的筛选[D]. 兰州:甘肃农业大学,2013:1-2.
- [8] 林 楠,杨宗学,蔺海明,等. 不同产地枸杞质量的比较研究[J]. 甘肃农业大学学报,2013,48(2):34-39.
- [9] Vilku K, Mawson R, Simons L, et al. Applications and opportunities for ultrasound-assisted extraction in the food industry: a review[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008, 9(2):161-169.
- [10] Chemat F, Huma Z, Khan M K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(4):813-835.
- [11] 陈 晨,胡文忠,田沛源,等. 超声辅助提取香蕉皮多酚工艺优化及其抗氧化性的分析[J]. 食品科学,2014,35(2):12-17.
- [12] 杨勇杰,姜瑞芝,陈英红,等. 苯酚硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. 中成药,2005,27(6):706-708.
- [13] 张双灵,李文香,赵海燕,等. 超声波协同酶法提取香菇多糖的工艺优化[J]. 食品科技,2016(3):192-196.
- [14] 刘 航,国旭丹,马雨洁,等. 超声波辅助提取苦荞麦多糖工艺优化及其体外抗氧化研究[J]. 食品科学,2013,34(14):45-50.
- [15] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1):70-76.
- [16] 李亚辉,马艳弘,黄开红,等. 响应面法优化复合酶提取芦荟多糖工艺及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学,2014,35(18):63-68.
- [17] Atoui A K, Mansouri A, Boskou G, et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile[J]. Food Chemistry, 2005, 89(1):27-36.
- [18] 曹 炜,卢 珂,陈卫军,等. 不同种类蜂蜜抗氧化活性的研究[J]. 食品科学,2005,26(8):352-356.