

· 制剂与质量 ·

微波辅助提取茯苓中茯苓多糖的研究

聂金媛^{1,2}, 吴成岩^{1,3}, 吴世容^{1,2}, 李志良^{1,2*}

(1. 重庆大学化学化工学院, 重庆 400030; 2. 生物医学工程教育部与重庆市重点实验室, 重庆 400030; 3. 东北制药总厂研究院, 辽宁 沈阳 110026)

摘要: 目的 将微波辅助提取新技术应用于茯苓水溶性多糖的提取, 寻求最佳提取工艺。方法 采用均匀优化设计试验条件, 以苯酚-硫酸法测定样品中多糖含量。对超声辅助提取和传统水提法比较, 并对水解前后的微波提取多糖衍生物用毛细管电泳检测。结果 最佳提取条件: 时间为 18 min; 固液比为 1:50; 微波占空比 42%, 此时提取率为 2.792%。优于传统。结论 微波辅助提取速度更快, 提取效率更高; 毛细管电泳检测表明微波提取茯苓多糖过程合理, 能得到较理想的提取物。

关键词: 茯苓; 茯苓多糖; 微波辅助提取; 毛细管电泳

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)12-1346-03

Microwave-assistant extraction of water-soluble pachyman from *Poria cocos*NIE Jin-yuan¹, WU Cheng-yan¹, WU Shi-rong², LI Zhi-liang^{1,3}

(1. Department of Applied Chemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Educational Ministry and Chongqing City Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing 400030, China; 3. Northeast General Pharmaceutical Factory, Shenyang 110026, China)

Abstract: **Object** To apply the microwave-assistant extraction (MAE) to extracting the water-soluble pachyman from *Poria cocos* (Schw.) Wolf. **Methods** Uniform design was used to optimize the MAE condition. The polysaccharide was determined by phenol sulfuric method and the MAE was compared with the traditional extracting method. Capillary electrophoresis was applied to detecting the derivant of pachyman extracted from *P. cocos*. **Results** The extraction time was 18 min under solid-liquid ratio of 1:50, occupied-unoccupied ratio of 42%, and the purity of pachyman was obviously enhanced. The extraction rate was 2.792% under the optimized condition. The result is better than the traditional or ultrasonic-assistant extraction. **Conclusion** It shows that the MAE procedure is rational and confirmed to be efficient.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; pachyman; microwave-assistant extraction (MAE); capillary electrophoresis

微波辅助提取(microwave-assistant extraction, MAE)是利用微波能量,快速和有选择性地提取(包括植物和动物)纤维、土壤、水、化妆品等,涉及的应用面有环保、农业、食品、生物医学、药物以及加工过程的检测和控制,扩大后应用于工业规模的土壤治理和食品的生产^[1]。与传统方法相比,微波辅助提取具有速度快、选择性好、提取率高、需要溶剂量少、操作简单等优点^[2]。茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,其水提取物中茯苓多糖能减轻癌症患者放疗、化疗的不良反应,对肝硬化、慢性迁延性肝炎有较好的疗效。本实验对微波回流

萃取茯苓多糖做了系统的研究,采用均匀试验设计,并对实验结果进行直观分析和多元非线性分析,寻找最佳提取条件,并对提取物进行了提纯,将其水解、衍生后进行了毛细管电泳分析。

1 仪器与试剂

改装的格兰仕 W P808 家用微波炉, A S2060B 型超声发生器,紫外-可见分光光度计(澳大利亚 GBC 科学仪器公司)、ACS2000 毛细管电泳仪(北京)、FA 2104 电子天平(上海天平仪器厂)。茯苓(云南产)购于重庆南纪门中药材大市场,经我院周小华副教授鉴定;其他试剂均为分析纯。

* 收稿日期: 2004-02-22

基金项目: 国家教委霍英东基金资助项目(98-7-6); 重庆市应用基础项目(01-3-6); 重庆大学创新基金资助(03-5-6)

作者简介: 聂金媛(1979—),女,瑶族,广西贺州富川县人,2004年毕业于重庆大学化学化工学院分析化学专业,获得硕士学位,现在广州市医药工业研究所制剂研究室工作,主要从事药物的分离、分析及药物质量标准的制定相关的研究。

Tel: (020) 84489994 E-mail: lucknjl@163.com Fax: (020) 84237584

* 通讯作者 Tel: (023) 65106677 Fax: (023) 65106615 E-mail: zllz2662@163.com

2 方法与结果

2.1 苯酚溶液的制备: 取苯酚约 10 g 于 100 mL 烧瓶中, 加入 0.5 mg 碳酸氢钠, 0.3 mg 铝片, 重蒸, 收集 182 馏份, 取 5.00 g 重蒸过的苯酚配成 100 mL 溶液, 于避光阴凉处保存备用。

2.2 标准曲线的制备: 称取 0.100 8 g 于 105 烘箱中干燥至恒重的葡萄糖, 配成 100 mL 标准溶液备用。分别取葡萄糖标准溶液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL 于比色试管中, 分别用蒸馏水补至 1.0 mL, 分别向每试管加入 1.0 mL 苯酚溶液, 振荡后迅速加入 5.0 mL 浓硫酸, 静置 30 min, 于 480 nm 处测定各试管溶液的吸光度。以葡萄糖质量浓度 (X , $\mu\text{g/mL}$) 对吸光度 (Y) 进行线性回归, 得回归方程: $Y = -0.0096 + 0.0103X$, $r = 0.9996$, 线性范围为 0.1~0.9 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 茯苓多糖的微波提取

2.3.1 均匀试验设计: 根据初步试验的结果, 以水为提取液, 选用了对提取率有影响的 3 个因素, 即微波作用时间 X_1 (2~30 min)、微波占空比 X_2 (28%~100%, 总功率: 800 W)、固液比 X_3 (固定液体质量为 50 g, 固体质量: 1~8 g), 每个因素确定 15 个水平, 以 $U_{15}(15^8)$ 均匀设计表及其使用表安排试验, 见表 1。

2.3.2 微波提取工艺: 将块状茯苓粉碎为小颗粒状, 称取一定质量的茯苓粉末, 固定溶剂水的体积为 50 mL, 按均匀设计表的试验条件, 在一定微波占空比下回流提取一定时间后滤过, 残渣依法再提取两次, 合并滤液, 移至量瓶中, 加水至刻度。取 1 mL 试液于比色试管中, 按标准曲线的制备项下方法测定吸光度, 计算茯苓多糖的量, 并求算提取率 (提取率 = 3 次提取液中茯苓多糖的总量 / 茯苓粉末的质量 $\times 100\%$)。结果见表 1。

2.3.3 试验条件优化: 对以上实验结果用自编 MATLAB 程序借计算机完成了多元非线性回归分析^[3], 得到回归方程: $Y = 3.217 + 0.109X_1 - 0.073X_2 - 0.842X_3 - 0.003X_1^2 - 0.002X_2^2 + 0.060X_3^2 + 0.001X_1X_2 - 0.004X_2X_3 + 0.017X_1X_3$ 。复相关系数 $R = 0.972$ 。而用留一法交互检验对模型进行检验, 得到交互检验的相关系数 R_{CV} 的负值, 说明由于样本数相对较少而变量数过多, 有可能存在过拟合现象。

为了筛选变量, 对实验数据进行逐步回归, 输入逐步回归的临界值为 0.005, 按照逐步回归的结果引入变量, 发现引入 4 个变量 (X_1, X_3, X_2^2, X_3^2) 的时候模型的复相关系数和交互检验相关系数均较高 ($R = 0.924, R_{CV} = 0.847$), 因而取这 4 个变量进行

多元非线性回归, 得到四变量模型: $Y = 3.288 + 0.011X_1 - 0.793X_3 - 0.002X_2^2 + 0.067X_3^2$ 。推出最佳的试验条件为微波占空比为 42%, 固液比为 1:50, 时间越长越好。

表 1 $U_{15}(15^8)$ 均匀设计结果

Table 1 Results of $U_{15}(15^8)$ uniform design

试验号	X_1/min	$X_2/\%$	X_3	茯苓多糖提取率 $Y/\%$
1	2	40	4:50	0.843
2	4	60	7.5:50	0.905
3	6	85	3.5:50	1.048
4	8	28	7:50	0.849
5	10	44	3:50	1.523
6	12	66	6.5:50	1.180
7	14	90	2.5:50	1.255
8	16	32	6:50	1.279
9	18	48	2:50	2.491
10	20	72	5.5:50	0.957
11	22	95	1.5:50	1.902
12	24	36	5:50	0.925
13	26	54	1:50	2.532
14	28	78	4.5:50	0.947
15	30	100	8:50	0.892

2.3.4 验证试验: 设置时间为 18 min, 微波占空比为 42%, 固液比为 1:50, 得到茯苓多糖提取率是 2.792%, 比前 15 组提取率都高。

2.4 超声辅助提取: 根据初步试验结果, 选取可控并对提取率有影响的 3 个因素进行设计: 温度 (30~70)、时间 (30~60 min)、固液比 (固定液体质量为 50 g, 固体质量: 1~9 g), 每个因素确定 5 个水平, 以 $U_5(5^4)$ 均匀设计表安排试验, 以水为提取剂, 取一定量的粉碎过的茯苓置 50 mL 烧瓶中, 并将烧瓶置于超声发生器的水槽中, 回流提取, 每组提 3 次, 见表 2。

表 2 $U_5(5^4)$ 均匀设计结果

Table 2 Results of $U_5(5^4)$ uniform design

试验号	温度/	时间/min	固液比	茯苓多糖提取率/%
1	30	30	7:50	1.249
2	40	50	5:50	0.353
3	50	20	3:50	1.627
4	60	40	1:50	1.706
5	70	60	9:50	0.346

2.5 传统沸水提取^[4]: 取 5 g 茯苓置 100 mL 烧瓶中, 加 10 倍量水, 加热提取 1 h, 抽滤, 取残渣再提取 2 次, 合并滤液, 测定多糖含量, 计算得茯苓多糖提取率为 1.352%。

2.6 毛细管电泳分析

2.6.1 精制茯苓多糖的制备: 以最佳提取条件提取 3 份试样, 合并提取液, 低温浓缩至 50 mL。Sevag 法除蛋白 3 次, 低温浓缩至约 15 mL, 加入 4 倍乙醇,

静置, 过夜。小心吸取上清液, 弃去, 剩余物真空干燥, 得茯苓多糖粗品。取部分茯苓多糖粗品固体, 用无水乙醇洗 1 次, 用乙醚洗 2 次, 真空干燥, 得精制茯苓多糖。

水解样品溶液的制备: 取约 0.4 mg 茯苓多糖固体, 加入约 1 mL 水溶解, 加入约 0.3 mL 0.65 mol/L 硫酸, 封管, 沸水浴水解 10 h, 加入过量的碳酸钡除去剩余的硫酸, 至无气泡生成, 离心(1 000 r/min) 5 min, 弃去沉淀, 得水解样品溶液。

2.6.2 电泳分析: 分别取约 1 mg 精制茯苓多糖、水解样品和葡萄糖, 加入约 1 mL 水溶解, 加入约 0.1

mL 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮溶液(0.5 mol/L, 以甲醇为溶剂)、0.1 mL 氢氧化钠(0.3 mol/L), 在 70 °C 水浴中加热反应 30 min, 取出, 室温下冷却约 10 min, 加入 0.15 mL 盐酸溶液(0.3 mol/L) 中和, 混合后加入 1 mL 氯仿萃取剩余的衍生剂, 离心(1 000 r/min) 5 min, 取上清液再萃取 1 次, 离心得到上清液, 用于电泳分析。电泳条件为: 电压 17 kV, pH=5.5, 电动进样 6 s, $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-N a}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH=5.8), 毛细管(80 cm × 50 μm), 于 210 nm 处采用紫外-可见分光光度检测器检测, 所得谱图见图 1。

3 结果与讨论

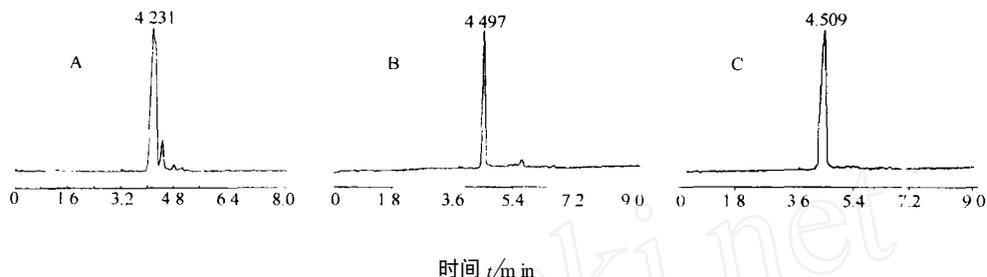


图 1 茯苓多糖衍生物(A)、茯苓多糖水解衍生物(B)和葡萄糖衍生物(C)的毛细管电泳图

Fig. 1 Capillary electrophoresis chromatogram of pachyman derivant (A), pachyman hydrolysate (B), and glucose derivant (C)

对水溶性茯苓多糖进行微波提取, 并对试验条件进行考察和优化, 得到一个四变量回归模型。根据该模型可知, 提取时间(X_1)越大, 提取率越高。而随着微波占空比(X_2)的增加, 提取率先增大后减小, 其间应有一个最大值。对方程进行函数最值分析, 可以知道当微波占空比为 42% 的时候, 提取率有最大值。根据以上四变量方程, 固液比对提取率的影响是最大的, 固液比(X_3)只有最小值, 没有最大值, 根据实际情况, 该因素不能为负值, 而且根据事实可知, 固液比至一定大时, 提取率不会提高。这与实验结果一致: 当固液比分别为 1:50 和 2:50 时, 提取率分别为 2.532% 和 2.491%, 是试验中提取率最高的两组, 而这两组试验的微波占空比(分别为 56% 和 48%), 距离 42% 很近。因此, 无论是从相关系数、留一法交互检验, 还是从实验数据本身评价, 都可以说明该四变量模型具有一定的稳定性和预测能力。

微波法与传统回流法中(时间: 1 h, 固液比: 1:10, 温度: 100 °C, 提取 2 次, 提取率: 1.352%) 提取率最高的一组相比, 时间大大缩短, 提取率是传统法的两倍; 与超声提取(时间: 40 min, 固液比: 1:50, 温度: 60 °C, 3 次, 提取率: 1.706%) 相比, 只用不到一半的时间, 提取率提高 63.5%。另外, 与文献^[4]中

的酶法(时间: 100 min, 温度: 100 °C, 提取 2 次, 加酶, 提取率: 2.4%) 相比, 提取时间明显缩短, 提取率也相当或略高, 不论在节能、高效还是在实验操作方面微波辅助提取都优于酶法提取。

茯苓是一种葡聚糖, 由葡萄糖聚合而成的, 水解以后变成了葡萄糖。由于水解产物的 CE 图上唯一的峰其保留时间与葡萄糖的保留时间一致, 因此可以判定水解产物的单峰是葡萄糖。并且单糖衍生物的谱图上没有其他杂质(只有一个单峰), 可以判断茯苓多糖的毛细管电泳图上的各个峰所代表的组份全部水解转换成了单糖, 因而确定该谱图上的峰应该是不同聚合度的多糖。从以上分析得知, 整个提取过程较为合理, 能得到较理想的提取物。

References

- [1] Luo J M, Lu X Y, Zhang M Q. Microwave aided extraction technique and its application [J]. *Chem Ind Eng Prog* (化工进展), 2001, 20(12): 46-48.
- [2] Yu W L, Ou Q Y. *Gas Capillary Chromatography and New Isolation and Analytical Techniques* (毛细管气相色谱和分析新技术) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [3] Li Z L. *Elements of Analytical Chemistry* (分析化学计量学基础) [M]. Chongqing: Chongqing University Publishing House, 1999.
- [4] Li J, Han X H, Li Z H, et al. Isolation and determination of pachyman in *Poria cocos* (Schw.) Wolf [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2000, 17(1): 49-50.