

研究论文

应用微波前处理-热水浸提技术提取龙眼多糖

杨翠娴, 李清彪, 凌雪萍, 邵文尧, 徐 慧

(厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 龙眼多糖具有抗氧化、抗衰老等多种生物活性, 但对龙眼多糖提取工艺和其化学结构方面的研究文献报道较少。采用微波前处理-热水浸提新工艺提取龙眼多糖, 单因素考察及正交实验结果表明, 在所考察实验范围内, 龙眼多糖的最佳提取工艺条件为: 微波前处理功率 700 W, 处理时间 60 s, 热水浸提料液比 1: 15, 浸提温度 100℃, 浸提时间 7 h, 搅拌速率 240 r·min⁻¹。在此条件下, 龙眼多糖收率可达 9.00 mg·(g 龙眼)⁻¹ (干重)。紫外和红外光谱分析结果显示, 所获得的龙眼多糖是具乙酰氨基结构的β型吡喃酸性杂多糖。

关键词: 龙眼; 多糖; 微波; 提取

中图分类号: R 284.2

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157(2007)08-2004-06

Hot water extraction of longan polysaccharide assisted by microwave pretreatment

YANG Cuixian, LI Qingbiao, LING Xueping, SHAO Wenyao, XU Hui

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Longan polysaccharide (LPS) has been discovered to have high anti-oxidation and anti-senility activity, while only a few studies about its extraction and chemical structure analysis have been reported. In this paper, longan pulp was pretreated by microwave and then LPS was extracted with hot water. The results of single-factor examination and orthogonal experiments showed that the optimal process parameters for this method were: microwave pretreatment with power 700 W for 60 s, followed by hot water extraction with solid (g) – liquid (ml) ratio of 1: 15 at 100℃ for 7 h with stirring speed of 240 r·min⁻¹. The optimal yield of 9.00 mg·g⁻¹ (dried longan biomass weight) was achieved under these parameters. Ultraviolet spectrum and FTIR analysis showed that LPS was a β type acidic heterosaccharide with pyran and acetyl amino group.

Key words: longan; polysaccharide; microwave; extraction

引 言

近年来, 植物多糖的药用保健功能正日益受到人们的重视。植物多糖具有复杂多样的生物活性, 如抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、免疫调节等^[1-3]。目

前, 人们已从多种天然植物及中草药中成功地提取分离出具有显著生理活性的多糖, 如香菇多糖、灵芝多糖、人参多糖等^[4-6]。

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 属无患子科植物, 药用价值高。根据《本草纲目》记载, 龙

2006-09-26 收到初稿, 2006-10-24 收到修改稿。

联系人: 李清彪。第一作者: 杨翠娴 (1982-), 女, 硕士研究生。

基金项目: 厦门市翔安区科技局资助项目。

Received date: 2006-09-26.

Corresponding author: Prof. LI Qingbiao. E-mail: kelqb@xmu.edu.cn

眼肉具有“开胃健脾, 补虚益智”的功效。传统中医学认为, 龙眼肉可用于治疗心血不足、体虚力弱、心悸怔忡、失眠健忘、贫血诸症^[7]。现代药理研究发现, 龙眼提取液具有一定的抗自由基损伤的作用和增强细胞免疫功能的作用^[8]。一些研究发现龙眼多糖具有清除活性氧自由基以及抑制肝微粒体脂质过氧化物 LPO 的作用, 即有明显的抗氧化活性^[9-10]。我国的龙眼种植业在世界上占有重要的地位, 龙眼的综合开发和利用具有很大的潜力和广阔前景。我国龙眼的种植以福建的栽培面积最大, 质量最好^[7], 为充分发挥地区优势, 本课题组以福建同安“凤梨穗”龙眼为研究对象, 探索低成本、高收率的龙眼多糖提取工艺。

传统的多糖提取方法主要采用热水浸提法, 存在费时、溶剂用量大、提取效率低等缺点。近年来, 微波辅助提取 (MAE) 技术在多糖提取工艺领域得到了广泛的应用, 逐渐受到人们的青睐。MAE 技术具有溶剂消耗少、选择性好、提取速度快、产品质量好、可提高收率及提高提取纯度等诸多优势^[11-12]。该技术在海藻多糖、橘皮果胶等天然产物多糖的提取中已获得了成功的应用^[13-14]。

本文采用微波前处理与热水浸提耦联的新工艺提取龙眼多糖, 通过单因素考察及正交实验确立了有效的龙眼多糖微波前处理-热水浸提工艺, 并证实了这一工艺的优越性。本文这些研究工作将为龙眼多糖的工业化提取及应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

原料: 福建同安“凤梨穗”龙眼, 新鲜果实采集后即置于 -18°C 冷冻保藏备用。

试剂: 无水乙醇, 6% (体积) 苯酚, 浓硫酸, 葡萄糖, 三氯乙酸 (TCA)。所用试剂均为分析纯。MWCO 3500 透析袋-34 (Green bird)。

仪器: Galanz WD 700 TL 23-K5 微波炉, QHJ756B 磁力恒速搅拌器, SHB-A 循环水式多用真空泵, EYELAN-1001S-WA 旋转蒸发仪, ANKE TDL-5A 高速离心机, DU 7400 紫外可见分光光度计, AVATAR FT-IR 360 傅里叶变换红外光谱仪。

1.2 方法

1.2.1 提取方法

(1) 原材料的处理 冷冻龙眼剥壳去核, 充分

捣碎匀浆后备用。

(2) 多糖的提取 果肉匀浆置于微波炉中进行短时高频微波前处理, 微波功率 700 W, 处理时间 60 s; 微波前处理后的果浆加入一定比例去离子水后, 在搅拌条件下采用热水回流浸提。

(3) 多糖的分离纯化 工艺流程: 浸提液 尼龙布过滤 滤液真空浓缩 加 4 倍无水乙醇沉淀 离心 无水乙醇洗涤沉淀 4 次 沉淀用适量水溶解 TCA 法去蛋白 透析 乙醇沉淀 沉淀真空干燥 淡黄色龙眼多糖 (LPS)。

1.2.2 多糖的含量测定 目前各种多糖提取工艺中多糖含量测定广泛采用苯酚-硫酸法^[15]。本文也采用此法测定提取液中龙眼多糖的含量。以不同浓度葡萄糖为标准品, 测定其在 490 nm 下吸光值, 绘制糖含量标准曲线。将待测粗多糖样品加水溶解并稀释适当倍数后, 进行与标准曲线制作相同的操作, 并对照标准曲线求得其多糖含量。单位质量龙眼果肉 (干重) 所获多糖质量即为龙眼多糖的收率 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.2.3 多糖的定性分析 紫外光谱分析: 将龙眼粗多糖配制成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 检测其在波长 190~300 nm 范围内的吸光度值。

红外光谱分析: 适量龙眼粗多糖, 用 KBr 压片, 在 4 cm^{-1} 光谱分辨率下于 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 范围内进行红外光谱检测。

2 结果与讨论

2.1 微波前处理-热水浸提法的最佳工艺条件确定

2.1.1 微波前处理工艺条件的影响 不同溶剂、微波功率和微波时间对提取率有明显的影响^[16]。由于目标提取物为水溶性多糖, 故选定提取介质为水溶剂。在本实验中, 固定后续热水浸提工艺中的料液比为 1:15、搅拌速率 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、浸提温度 80°C 、浸提时间 2 h, 分别考察不同微波前处理功率和处理时间对多糖收率的影响。

(1) 微波功率 固定微波前处理时间为 40 s, 考察不同微波前处理功率对多糖提取率的影响, 结果如图 1 所示。

由图 1 可见, 当微波功率达 400 W 后, 龙眼多糖收率随微波功率的增大而急剧增加。然而, 过高的微波功率容易导致细胞内失水严重, 升温过快, 造成多糖结构及活性的破坏^[17]。因此, 在本文所考察的功率范围内, 700 W 为微波前处理最佳

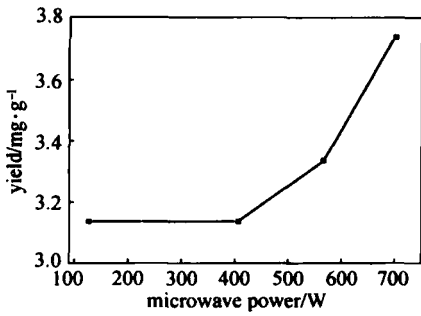


图 1 微波功率对多糖收率的影响

Fig 1 Effect of microwave power on polysaccharide yield

功率。

(2) 微波作用时间 微波连续作用时间与试样质量、溶剂体积和微波功率有关，通常 10~ 100 s 即可达到要求的萃取温度^[11]。在固定微波前处理功率为 700 W 的条件下，本文考察了不同处理时间对多糖提取率的影响，结果如图 2 所示。

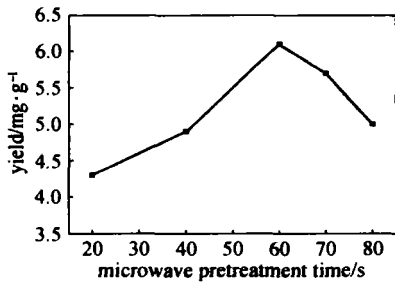


图 2 微波前处理时间对多糖收率的影响

Fig 2 Effect of microwave pretreatment time on polysaccharide yield

从图 2 可见，当微波前处理时间为 60 s 时，龙眼多糖的收率最高。过长的处理时间易引起溶剂温度过高甚至暴沸，导致目标产物损失，收率降低^[11]；同时，过多的辐射能量易导致多糖结构中的部分乙酰基、硫酸酯键断裂，改变其有机结构的三维构像及生物活性^[16]，发生水解等不利反应。

短时高频微波前处理能够促使龙眼果肉细胞破裂和多糖物质浸出，从而提高多糖提取率，主要原因有以下几个方面^[18-21]：微波辐射能穿透萃取介质，到达细胞的内部，细胞吸收微波能后，内部温度迅速升高，细胞内压增加，细胞壁破裂，利于多糖等物质溶出；微波能够直接破坏龙眼果肉细胞壁，促进胞内物质的溶出；微波所产生的电磁

场加速了多糖等有机物质的热运动，缩短了其向溶剂界面的扩散时间；微波对溶剂水分子的加热作用提高了多糖物质在水中的溶解度。

2.1.2 后续热水浸提工艺条件的影响

(1) 单因素水平实验 分别考察单因素条件下，不同料液比、温度、浸提时间和搅拌速率对龙眼多糖收率的影响，初步确定龙眼多糖提取的较佳工艺条件。

由图 3 可见，在单因素范围内，4 种工艺条件的最佳工作参数为：料液比 1 : 15，浸提温度 100 ℃，搅拌速率 240 r · min⁻¹，浸提时间 6 h。

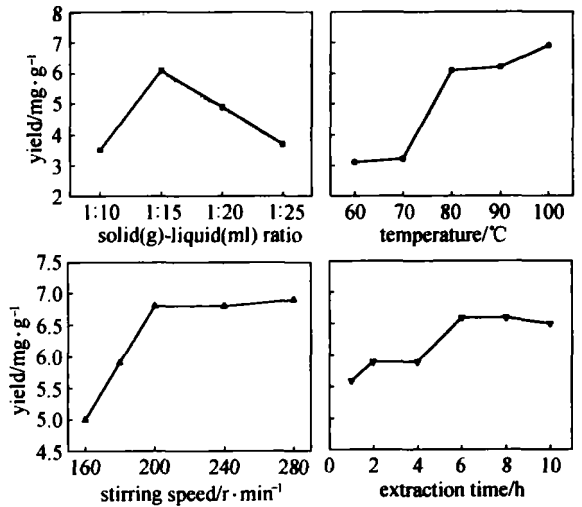


图 3 料液比、温度、浸提时间、搅拌速率 (单因素) 对多糖收率的影响

Fig 3 Effect of four individual factors on polysaccharide yield

(2) 正交实验 由于影响热水浸提的 4 个因素间能够互相影响，因此本文在单因素水平实验结果基础上，设计 4 因素 3 水平正交实验，确定热水浸提的最佳工艺条件。选用因素及水平见表 1，正交实验结果及其极差分析见表 2，各因素水平趋势见图 4。

表 1 正交实验的因素及水平选取

Table 1 Factors and levels in orthogonal experiment

Level	Solid (g)-liquid (ml) ratio (A)	Temperature (B) / °C	Stirring speed (C) / r · min ⁻¹	Time (D) / h
1	1 : 15	90	220	5
2	1 : 12	95	240	6
3	1 : 18	100	260	7

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal test

Test No.	Factor level				Yield /mg · g ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	7.56
2	1	2	2	2	8.18
3	1	3	3	3	8.89
4	2	1	2	3	6.48
5	2	2	3	1	6.36
6	2	3	1	2	6.73
7	3	1	3	2	6.83
8	3	2	1	3	7.58
9	3	3	2	1	7.92
K ₁	24.62	20.86	21.86	21.84	
K ₂	19.57	22.13	22.58	21.74	
K ₃	22.33	23.53	22.08	22.94	
k ₁	8.21	6.95	7.29	7.28	
k ₂	6.52	7.38	7.53	7.25	
k ₃	7.44	7.84	7.36	7.65	
R	1.69	0.89	0.24	0.40	

Note: K—sum of yields of different levels; k—average yield of different levels; R—range.

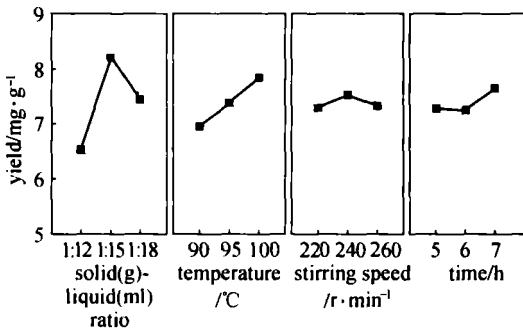


图 4 料液比、温度、浸提时间、搅拌速率对多糖收率的影响

Fig 4 Effect of solid:liquid ratio, extraction temperature, stirring speed, extraction time on polysaccharide yield

正交实验和极差分析结果表明:

不同因素对多糖收率皆有影响。从图 4 可见, 当料液比为 1:15 时, 多糖收率最高。较低的料液比不利于多糖的充分浸出; 而过高的料液比将增加浸提体系的体积以及后续浓缩工艺的操作时间, 易引起多糖的损失, 从而降低了多糖的收率。同时, 高料液比也将增加后续浓缩工艺的成本。搅拌作用可促进龙眼与水溶剂之间的充分混合, 加快多糖的溶解、扩散, 但搅拌速率在 220~260 r·min⁻¹ 范围内对多糖收率影响不大。同时, 正交实验结果表明, 多糖提取工艺的最佳浸提温度为 100℃。浸提温度太低不利于龙眼多糖的完全溶出,

而采用水溶剂浸提的最高工艺温度即为 100℃。在本文考察范围内, 微波前处理-热水浸提法的最佳浸提时间为 7 h。随着浸提时间的增加, 多糖收率略有提高, 但从经济角度考虑, 浸提时间不宜过长。

从表 2 的实验结果看出, 在 9 组实验中 3 号实验的收率最大, 达 8.89 mg·g⁻¹, 相应的水平组合 A₁B₃C₃D₃ 是当前最好的水平搭配。

4 个因素对多糖收率的影响程度不同。从表 2 的极差 R 值看出, 4 个因素对多糖收率的影响顺序为: 料液比 > 浸提温度 > 浸提时间 > 搅拌速率, 料液比 (A) 极差值最大, 即 1.69, 是龙眼多糖热水浸提工艺的关键控制因素。

以多糖收率为目标, 从 4 因素的水平趋势图 4 看出, 后续热水浸提的可能最佳水平组合为 A₁B₃C₂D₃, 即料液比 1:15、浸提温度 100℃、浸提搅拌速率 240 r·min⁻¹、浸提时间 7 h。在此条件下进行龙眼多糖的提取, 收率为 9.00 mg·g⁻¹, 比组合 A₁B₂C₂D₂ 的多糖收率 8.89 mg·g⁻¹ 略高。

本工艺采用短时高频微波前处理, 促使龙眼果肉细胞破裂和多糖物质浸出, 后续的搅拌热水浸提则有效促进了龙眼多糖充分溶解于水溶液中, 从而提高了多糖收率。

2.2 龙眼多糖的光谱分析

对龙眼多糖进行紫外和红外光谱分析, 初步验证多糖提取物并推测龙眼多糖的可能化学结构。

2.2.1 紫外光谱分析 0.5 mg·mL⁻¹ 龙眼粗多糖溶液在波长 190~300 nm 范围内的紫外扫描结果如图 5 所示。

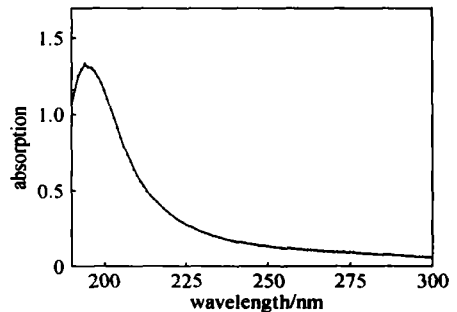


图 5 龙眼多糖的紫外光谱

Fig 5 UV spectrum of LPS

由图 5 可见, 微波前处理-热水浸提工艺所得龙眼多糖在 195 nm 处出现糖类的特征吸收峰, 与文献 [22] 结果相符。同时, 在紫外光谱的 260

nm 和 280 nm 处并无核酸和蛋白质的特征吸收峰, 表明采用本工艺能够有效地去除蛋白质和核酸等杂质, 获得较高纯度的多糖产品。

2.2.2 红外光谱分析 红外光谱是研究多糖类物质有机结构的有效工具, 对龙眼多糖的红外光谱分析将有助于对此类复杂化合物的定性分析。采用微波前处理-热水浸提方法所得多糖在 4000~ 400 cm^{-1} 范围内的红外光谱分析结果如图 6 所示。

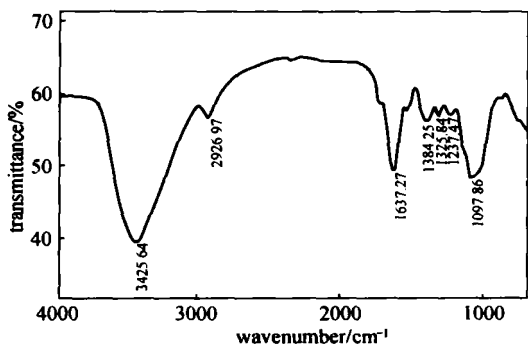


图 6 龙眼多糖的红外光谱

Fig 6 FTIR results of LPS

红外光谱中的 3500~ 3200 cm^{-1} 处的吸收峰为 O—H 和 N—H 的伸缩振动吸收峰; 在更低的区域 3000~ 2800 cm^{-1} 处为 C—H 的伸缩振动吸收峰。目前已知乙酰氨基广泛存在于许多含糖物质如血型多糖、甲壳素、硫酸软骨素、玻尿酸(糖醛酸)等的糖基中^[23]。LPS 的红外光谱在 1560~ 1508 cm^{-1} 范围内吸收峰可对应于乙酰氨基 (—NHCOCH₃) 的 N—H 变角振动, 1648 cm^{-1} 附近的吸收峰对应于乙酰氨基的 C=O 伸缩振动; 1200~ 1000 cm^{-1} 间比较大的吸收峰应归属于吡喃糖环的醚键 C—O—C 和羟基的吸收峰; 885 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应于 β 型吡喃糖环的 C—H 直立键; 在 1320~ 1210 cm^{-1} 处为 —COOH 上的 O—H 变角振动^[23-24]。根据红外光谱分析结果, 初步鉴定龙眼多糖是具乙酰氨基结构的 β 型吡喃酸性杂多糖, 进一步的结构分析正在进行中。

3 结 论

采用微波前处理-热水浸提新工艺提取龙眼多糖。该工艺的优势在于先采用短时高频微波前处理破裂龙眼果肉细胞, 再通过后续热水浸提促进龙眼多糖的充分溶解, 从而提高了多糖的收率。

为了进一步优化微波前处理-热水浸提工艺, 本文考察了微波前处理的微波功率及处理时间, 以

及后续热水浸提工艺的 4 个重要影响因素对龙眼多糖收率的影响。通过单因素和正交实验, 本文确定了在考察实验范围内的龙眼多糖最佳提取工艺条件为: 微波前处理功率 700 W, 处理时间 60 s, 热水浸提料液比 1: 15, 浸提温度 100℃, 浸提时间 7 h, 搅拌速率 240 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在此工艺条件下, 龙眼多糖收率达 9.00 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。其中, 料液比是后续热水浸提工艺的关键控制因素。龙眼多糖的紫外和红外光谱初步分析结果表明, 龙眼多糖是具乙酰氨基结构的 β 型吡喃酸性杂多糖。

References

- [1] Ikekawa T, Ikeda Y, Yoshioka Y, Nakanishi K, Yokoyama E, Yamazaki E. Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt ex Fr.) Sing (): The structure of EA3 and further purification of EA5. *J. Pharmacobiodyn.*, 1982, 5 (8): 576-581
- [2] Xiang D B, Li X Y. Effects of *Achyranthes bidentata* polysaccharides on interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production from mouse peritoneal macrophages. *Acta Pharmacol. Sin.*, 1993, 14 (4): 332-336
- [3] Hokputsa S, Harding S E, Inngjerdingen K, Jumel K, Michaelsen T E, Heinze T, Koschellad A, Paulsen B S. Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features. *Carbohydr. Res.*, 2004, 339 (4): 753-762
- [4] Daba A S, Ezeronye O U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *Afr. J. Biotech.*, 2003, 2 (12): 672-678
- [5] Lin Z B, Zhang H N. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2004, 25 (11): 1387-1395
- [6] Sun X B, Matsumoto T, Yamada H. Purification of an anti-ulcer polysaccharide from the leaves of *Panax ginseng*. *Planta Med.*, 1992, 58 (5): 445-448
- [7] Li Shengfeng (李升锋), Liu Xueming (刘学铭), Wu Jijun (吴继军), Yao Rongqing (姚荣清), Huang Ruqiang (黄儒强), Chen Zhiyi (陈智毅), Zou Yuxiao (邹宇晓). Research and development of longan fruit. *Fujian Fruits* (福建果树), 2004, 2: 12-15
- [8] Wang Huiqin (王惠琴), Bai Jiechen (白洁尘), Jiang Baofeng (蒋保丰), Ma Zhongjie (马忠杰), Liu Lijuan (刘丽娟), Fu Xijuan (付希娟), Shen Jiaqin (沈家芹), Zhang Hongwei (张宏伟). Research on anti-hydroxyl and immunoregulation of longan fruit extraction. *Chinese Journal of Gerontology* (中国老年学杂志), 1994, 14 (4): 227-229
- [9] Li Xuehua (李雪华), Long Shengjing (龙盛京), Xie

- Yunfeng (谢云峰), Wei Wei (韦巍). The extraction of *euphoria longan* (lour.) steud and *litchi chinensis* sonn polysaccharides and its effect of cleaning oxygen radical *Journal of Guangxi Medical University* (广西医科大学学报), 2004, 21 (3): 342-344
- [10] Wu Huahui (吴华慧), Li Xuehua (李雪华), Qiu Li (邱莉). Studies on superoxide scavenging capability on litch and longan fruit pulp by its polysaccharides *Food Science* (食品科学), 2004, 25 (5): 166-169
- [11] Zhang Ying (张英), Yu Zhuoyu (俞卓裕), Wu Xiaoqin (吴晓琴). A new technique of extracting effective components from Chinese herb and natural plant—microwave assisted extraction, MAE. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2004, 29 (2): 104-108
- [12] Marie E L, Farid C, Jacqueline S. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation *J. Chromatogr. A*, 2004, 1043 (2): 323-327
- [13] Liu Chuanbin (刘传斌), Li Ning (李宁), Lu Jiqing (鲁济清), Miao Weirong (苗蔚荣), Su Zhiguo (苏志国). Application of microwave energy in sample preparation for analysis of trehalose in yeast *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学), 1999, 27 (1): 24-28
- [14] Fishman M L, Chau H K, Hoagland P, Ayyad K. Characterization of pectin, flask-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure *Carbohydr. Res*, 1999, 323 (1/2/3/4): 126-138
- [15] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Anal. Chem*, 1956, 28 (3): 350-356
- [16] Chen Yegao (陈业高), Hai Lina (海丽娜), Bi Xianjun (毕先钧). Application of microwave radiation in the extraction of natural active principles *Journal of Microwaves* (微波学报), 2003, 19 (2): 85-89
- [17] Wang Xingping (汪兴平), Mo Kaiju (莫开菊), Cheng Chao (程超), Cao Sha (曹莎). Application of microwave to extracting technology for *condonopsis* polysaccharide *Transaction of the CSAE* (农业工程学报), 2004, 20 (suppl.): 206-209
- [18] Camel V. Recent extraction techniques for solid matrices supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave assisted extraction: their potential and pitfalls *Analyst*, 2001, 126 (7): 1182-1193
- [19] Zhang Daijia (张代佳), Liu Chuanbin (刘传斌), Xiu Zhilong (修志龙), Chang Zengyi (昌增益). The application of microwave in the extraction of bioactive molecule from plant cell. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2000, 31 (9): 5-6
- [20] Ganzler K, Szinai I, Salgo A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique *J. Chromatogr.*, 1990, 520: 257-262
- [21] Pare J R J, Belanger J M R, Stafford S S. Microwave assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory. *Trend Anal. Chem.*, 1994, 13 (4): 176-184
- [22] Qin Chuanguang (钦传光). The separation, purification, characterization and bioactivity study of loach polysaccharide [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2001
- [23] Zhang Weijie (张惟杰). Carbohydrate Complex Biochemistry Research (糖复合物生化研究技术). 2nd ed Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999: 193-198
- [24] Chen Yegao (陈业高). Chemical Composition of Plants (植物化学成分). Beijing: Chemical Industry Press, 2004