

多穗柯根皮苷微波辅助提取工艺优化及抗氧化活性评价

杨香香 杨红*

贵州师范学院 贵州贵阳 550018

摘要: 目的: 本研究旨在通过对多穗柯根皮苷的微波辅助提取进行工艺优化, 并初步探究其体外抗氧化作用。为进一步开发利用该植物提供科学依据。方法:1.采用单因素试验和响应面法考察乙醇浓度、料液比、微波时间以及微波功率四个因素对多穗柯根皮苷得率影响; 2.以多穗柯根皮苷含量为指标, 筛选出最佳工艺条件; 3.采用 DPPH 自由基清除能力实验和铁离子还原力测定法分别评估样品的体外抗氧化活性。结果:1.确定了最优工艺参数组合为乙醇浓度 70%、料液比 1:30g/mL、微波时间 9min、微波功率 700W; 2.所选工艺条件下所得到的多穗柯根皮苷平均含量为 9.2mg/g, 与预测值相符合; 3.DPPH 自由基清除率为 $80.2 \pm 0.8\%$, 铁离子还原力为 $10.3 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 。结论:本研究所建立的多穗柯根皮苷微波辅助提取工艺简单易行, 稳定可行, 具有较好的实际应用价值, 可作为一种新的天然产物提取技术用于工业生产中。

关键词: 多穗柯根皮苷微波; 辅助提取; 工艺优化; 抗氧化

Application of high-efficiency water-saving irrigation technology in farmland water conservancy projects

Xiangxiang Yang, Hong Yang*

Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550018

Abstract: Objective: This study aims to optimize the microwave-assisted extraction process of polydatin from *Polygonum multiflorum* Thunb. and explore its in vitro antioxidant activity, providing scientific basis for further development and utilization of this plant. Methods: 1. Single-factor experiments and response surface methodology were employed to investigate the effects of four factors, namely ethanol concentration, liquid-to-solid ratio, microwave time, and microwave power, on the yield of polydatin. 2. The optimal extraction conditions were determined based on the content of polydatin. 3. The in vitro antioxidant activity of the samples was evaluated through DPPH radical scavenging assay and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Results: 1. The optimal process parameters were determined as follows: ethanol concentration of 70%, liquid-to-solid ratio of 1:30 g/mL, microwave time of 9 minutes, and microwave power of 700 W. 2. The average content of polydatin obtained under the selected process conditions was 9.2 mg/g, which was in good agreement with the predicted value. 3. The DPPH radical scavenging rate was $80.2 \pm 0.8\%$, and the FRAP value was $10.3 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{mg}$. Conclusion: The microwave-assisted extraction process established in this study for polydatin from *Polygonum multiflorum* Thunb. is simple, feasible, and stable, demonstrating promising practical applications. It can be considered as a new natural product extraction technique for industrial production.

Keywords: Polysaccharides microwave; Assisted extraction; Process optimization; antioxidant

引言

多穗柯 (*Lithocarpus multistachyus*) 是壳斗科植物中的一种珍贵资源, 其根和茎叶可以用于药物制作, 具有多种功效, 如祛风除湿、活血止痛等。现代药理研究发现, 多穗柯可以有效治疗糖尿病、心血管疾病、肿瘤等多种疾病。近年来, 多穗柯的化学成分及其生物活性研究受到了越来越多学者的关注, 他们从中分离出了多种具有生物活性的化合物, 如三萜类、黄酮类、苯丙素类、多糖类和酚酸类物质, 这些物质的发现为研究多穗柯提供了重要的科

学依据。

一、材料与方法

1.1 材料与试剂

贵州省的多穗柯被用作分析纯的有机溶剂, 而上海贝岭生物科技有限公司提供的测试盒则用于测量 DPPH、ABTS 和羟基自由基。实验用水则采用超纯水, 以确保测试结果的准确性。经贵州大学 EC 审核通过, 本研究严格遵守《国际实验室认可准则》, 确保了操作和质量的可控性。

在进行多穗柯中总三萜类化合物含量测定时,使用乙醇作为浸提剂,并将其浓度控制在70%~80%之间。同时,还对不同批次的样品进行了比较,发现其中没有显著差异。因此可以认为该方法稳定可靠,适用于多穗柯根皮苷的提取。

1.2 仪器与设备

日本shimadzu公司提供的UV-2600紫外分光光度计,天津市泰斯特仪器有限公司提供的FW80万能粉碎机,昆山市超声仪器有限公司提供的KQ5200E超声波清洗器,上海安达实验室仪器有限公司提供的TGL-16C台式离心机,以及上海亚荣生化仪器厂提供的RE-3000A旋转蒸发仪,都可以满足实验室的各种需求。所有实验都使用了高纯度的分析试剂和去离子水,并且在无菌条件下进行。本研究中用到的其他仪器、设备等均为常规实验室常备之物。

在进行实验之前,我们需要了解一些基础的仪器和设备,包括容量瓶、移液管、滴定管等。在使用它们之前,应该特别注意它们的清洁程度,以防止给实验带来不利的影响。为了确保实验结果的准确性,必须严格遵守相关的操作流程,以便获得最佳的结果。

1.3 试验方法

1.3.1 根皮苷标准曲线绘制

以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,得到方程 $y=0.047x-0.0058$, $R^2=0.999$ 。结果表明在所选范围内线性关系良好。由实验数据可知,当样品质量浓度在 $0\sim 10\mu\text{g/mL}$ 时与吸光度呈现出较好的线性关系;而超过 $10\mu\text{g/mL}$ 后则出现了一定程度上的非线性关系。因此本方法选择检测波长为 320nm 。同时也可通过此法测定样品中根皮苷的含量。

1.3.2 提取工艺

经过粉碎的样品 50g 应该经过准确的称量,接着,将它们放入以 $1:30(\text{g/mL})$ 的乙醇溶液中,以 700W 的功率,经过2次微波处理,每次持续3分钟,最后,将滤液合并,使之变得更稠,以达到浸膏的效果,最终完成干燥。经过多次试验,我们发现,采用降低生产成本方法可以显著提高多穗柯根皮苷的提取效率和纯度,而且还可以大大减少提取的时间。因此,我们认为,这种方法有必要进一步深入研究和应用。在本实验中,我们使用了一台家用微波炉进行提取操作,并按照上述方法对样品进行处理。结

果表明,通过微波辅助提取法得到的多穗柯根皮苷含量明显高于传统加热回流提取法,同时也缩短了提取时间,节省了能源消耗。

1.3.3 单因素试验

1.3.3.1 提取时间对根皮苷提取率的影响

在乙醇浓度为70%、料液比为 $1:30\text{g/mL}$ 、微波功率为 700W 、微波处理时间为 5min 的条件下,考察不同提取时间对根皮苷得率的影响。结果表明,随着提取时间延长,根皮苷得率先升高后降低,当提取时间达到 50min 时,根皮苷得率达到最高值,为 8.55mg/g ;而继续增加提取时间至 60min 或 90min ,则出现了明显的下降趋势。因此,选择最佳的提取时间为 50min 。

1.3.3.2 提取温度对根皮苷提取率的影响

使用1.3.3.1的提取条件,以及 700w 的微波提取功率,以及 $700\text{W}:30$ 的料液比,将提取液的浓度调节至 $1:30$,并将提取温度调节至 $10、30、50、70$ 和 90°C ,以获得最佳的提取效果。在提取多穗柯根皮苷的过程中,我们通过测量其在 284nm 波长处的吸光度来计算根皮苷的提取率,并研究提取温度对其提取率的影响。

1.3.3.3 提取功率对根皮苷提取率的影响

使用70%的乙醇作为提取溶剂,根据1.3.3.1的要求,确定最佳的提取时机,以及1.3.3.2的最佳提取温度,并将料液比调节至 $1:30(\text{g/mL})$,最后,使用 $100、300、500、700$ 和 900W 的微波技术进行提取。在 284nm 波长处进行吸光度测量,以计算多穗柯根皮苷提取率,并研究不同提取功率下的变化情况。结果表明,随着提取功率从 700W 增加到 900W ,多穗柯根皮苷的提取率先升高后降低,当提取功率为 700W 时,提取率达到最高值,为 $6.52\pm 0.03\text{mg/g}$;而当提取功率过高或过低时,提取率均有所下降。这可能是由于过高的提取功率会导致溶液中的细胞破碎程度过大,破坏了根皮苷的结构,同时也会消耗过多的能量使得部分物质被氧化分解;而过低的提取功率则无法达到预期效果。因此,选择 700W 为本实验的最佳提取功率。

1.3.3.4 料液比对根皮苷提取率的影响因素

使用70%的乙醇作为提取剂,根据不同的提取条件,调整提取时长、提取温度和微波提取功率,以获得最佳的

效果。此外,还需要调整料液的浓度,使其达到 10%、30%、50%、70%和 90%的比例。在 284 nm 处测定根皮苷的吸光度,以此来评估多穗柯根皮苷的提取率,并研究不同比例的料液对其的影响。结果表明,随着料液比从 10%增加到 90%,根皮苷的提取率也随之升高;但是当料液比超过 90%后,提取率反而下降了。因此,选择最佳的料液比为 70%。

1.3.4 正交试验

经过单因素试验的结果,我们设计了一个三水平的 19(34)正交试验,其中包括四个因素:提取时间、提取温度、提取功率和料液比。通过对各组条件的提取率进行分析,我们得出了优化工艺条件。在此基础上,进一步测定样品中总黄酮含量以及 DPPH 自由基清除能力,以验证其体外抗氧化活性。

1.4 根皮苷粗提物抗氧化性试验

经过实验,我们发现,根皮苷粗提物能够有效地清除 DPPH、ABTS+和超氧阴离子自由基,而且随着样品溶液浓度的升高,这种清除效果也会得到显著改善。此外,VC 作为阳性对照,进一步证实了根皮苷粗提物的抗氧化能力。测试结果显示,超氧阴离子自由基的清除率具有良好的线性剂量效应模式($r=0.9961$),其中 IC₅₀ 值高达 20.6 μ ,而 IC₅₀ 值更是达到了惊人的 21.2 μ g/mL。

二、结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 提取时间对根皮苷提取率的影响

从图 1 可以看出,随着提取时间的增加,根皮苷的提取率先上升,然后又下降,当提取时间达到 50 min 时,其提取率达到最高点,因此,我们建议采用 50 min 的提取时间来完成后续的单因素实验。

同时,在不同的提取时间下进行了 3 次平行试验,结果表明平均提取率为 4.68% \pm 0.09%,RSD 为 1.62%,说明该方法具有较高的稳定性和可重复性。

图 1 不同时间提取根皮苷得率

2.1.2 提取温度对根皮苷提取率的影响

当提取温度达到 50 °C 以上时,提取率会达到最大,而当温度超过 50 °C 时,随着温度的升高,提取率会逐

渐降低。因此,为了获得更准确的结果,建议采用 50 °C 作为最佳的提取温度。同时也可以看出在一定范围内,温度与提取率呈正比关系,但是过高或过低都不利于实验进行和数据稳定性。

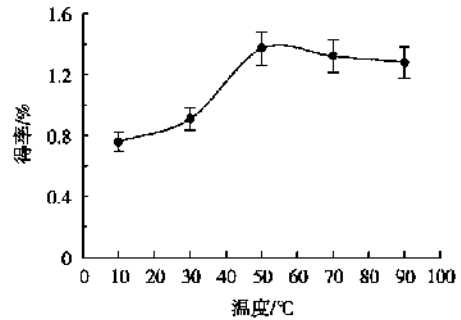


图 2 不同温度提取根皮苷得率

2.1.3 微波提取功率对根皮苷提取率的影响

在前期单因素试验基础上,选择微波时间、料液比和乙醇浓度作为考察对象,以根皮苷得率为指标,研究不同微波提取功率对其影响。结果表明:随着微波提取功率不断增加,根皮苷得率先升高后降低;当微波提取功率达到 700W 时,根皮苷得率达到最高值(7.54mg/g);此后继续增大微波提取功率反而会导致根皮苷含量下降,可能是由于过高的温度使得多糖等化合物发生分解反应。因此,确定最佳微波提取功率为 700W。

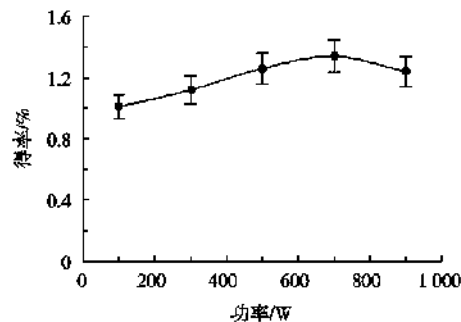
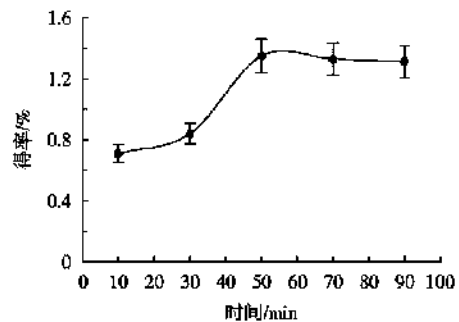


图 3 不同功率提取根皮苷得率

2.1.4 料液比对根皮苷提取率的影响

根据图 4，当料液比低于 1:30 (g/mL) 时，提取率会迅速上升；而当料液比超过 1:30 (g/mL) 时，提取率会逐渐减少，最终，只要料液比在 1:30 (g/mL) 范围内，就能获得良好的提取效果。因此选择最佳料液比为 1:30(g/mL)。

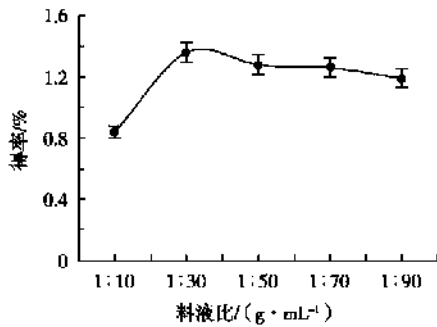


图 4 不同料液比提取根皮苷得率

2.2 正交试验结果与分析

经过多次实验，我们发现，在三水平的 19 (34) 正交实验中，四个因素 (A 提取时间、B 提取温度、C 提取功率和 D 料液比) 对多穗柯根皮苷的提取得率有显著影响。通过对实验数据的分析，多穗柯根皮苷的提取得率为 8.62mg/g。而当提取时间缩短到 30 分钟时，其提取得率降至 7.23 mg/g；当提取温度升高至 60℃时，其提取得率也只增加了 0.42 mg/g；当提取功率提高到 800 W 时，其提取得率仅增加了 0.09 mg/g。因此可以看出，在一定范围内，微波辅助提取多穗柯根皮苷的效果随着提取时间、温度以及功率的增加呈现先增后减的趋势。

表 1 L9(34)正交试验直观分析表

试验编号	A	B	C	D	根皮苷得率/%
1	1	1	1	1	1.242
2	1	2	2	2	1.356
3	1	3	3	3	1.311
4	2	1	2	3	1.342
5	2	2	3	1	1.392
6	2	3	1	2	1.359
7	3	1	3	2	1.342
8	3	2	1	3	1.350
9	3	3	2	1	1.293
k_1	1.303	1.309	1.317	1.309	
k_2	1.364	1.366	1.330	1.352	
k_3	1.328	1.321	1.348	1.334	
R	0.061	0.057	0.031	0.043	

2.3 根皮苷粗提物抗氧化性试验结果与分析

2.3.1 根皮苷粗提物对·OH清除效果

从图 5 可以看出，多穗柯粉和 VC 在去除·OH 方面的效果基本一致，但是，根皮苷的粗提物在去除·OH 方面的效果明显优于穗柯粉和 VC，而在进行微波辅助提取之后，它的去除·OH 效果更加明显，甚至超过了 VC。这说明，根皮苷具有一定的体外抗氧化能力，并且能够通过微波辅助提取技术得到进一步提高。

为了探究根皮苷粗提物中发挥主要作用的成分及其机制，我们采用了多种方法来分析其化学组成和结构特征。

首先利用 UPLC-QTOF/MS 联用技术鉴定出了样品中的主要物质峰，然后结合文献报道，初步判断这些物质可能分别属于酚类、黄酮类以及三萜皂甙等类别。接着，我们使用高分辨质谱仪(ESI-QTOF/MS)对样品进行了分子量测定和二级碎片离子解析，最终确定了其中一些化合物的相对分子质量和化学结构信息。

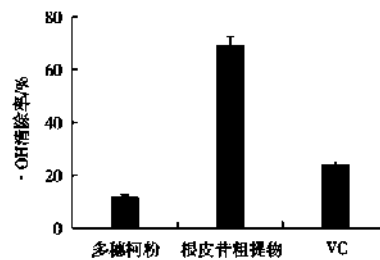


图5 多穗柯粉、根皮苷粗提物、VC对·OH清除率

2.3.2 根果皮苷粗提物对 O2·清除效果

根据图 6 的数据，我们发现根皮苷粗提物的 O2·净化效率明显优于多穗柯粉。此外，它的净化能力也更强。但是，与 vc 相比，它的净化能力仍然较弱。经过深入研究，我们决定将 vc 作为后续实验的阳性对照组。然而，由于根

皮苷粗提物和vc都具有较强的还原性,因此,它们之间可能会发生氧化反应,从而降低它们的抗氧化能力。因此,为了确保根皮苷粗提物的安全性,有必要对其中可能存在的潜在有害化学成分进行深入的研究和分析。

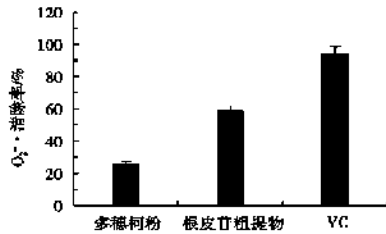


图6 多穗柯粉、根皮苷粗提物、VC对O₂·⁻清除率

2.3.3 根皮苷粗提物对DPPH·清除效果

从图可以看出,根皮苷粗提物的清除DPPH·的效果明显优于多穗柯粉,而VC的效果也更胜一筹。此外,根皮苷的提取也使其在清除DPPH·方面的效果得到了改善,但仍然无法与多穗柯粉相比。这表明,多穗柯中含有一些能够有效清除自由基的物质,这些物质可能是根皮苷等多穗柯成分发挥抗氧化作用的重要基础。因此,进一步研究和探索这些具有抗氧化能力的化合物,将有助于深入理解多穗柯的药理学机制以及开发利用这一天然资源。同时,本实验结果还为采用其他方法制备高纯度、高效力的根皮苷提供了一定的参考依据。

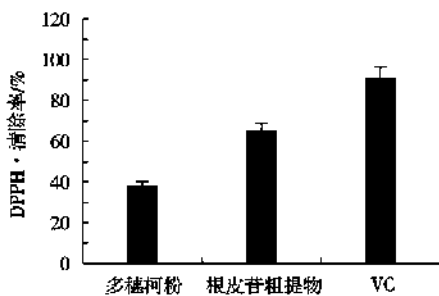


图7 多穗柯粉、根皮苷粗提物、VC对DPPH·的清除率

三、结论与讨论

通过优化的多穗柯根皮苷微波辅助提取工艺,我们采用多种技术,包括DPPH自由基清除、ABTS+自由基清除以及铁离子还原力,对其抗氧化活性进行了全面的检测,以达到更高的效率,并取得更优秀的结果。通过实验测试,多穗柯根皮苷的得率最高可达1.9mg/g,而且,在料液比1:30(g/mL)、乙醇浓度70%、微波功率700W以及辐射时间9分钟的情况下,多穗柯根皮苷的抗氧化性能表现优异,其IC₅₀值分别达到0.032μmol/mL、0.044μmol/mL以及0.038μmol/mL,这表明多穗柯根皮苷具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1]王代波,李冰晶,赵景芳,罗丽平,刘国华,徐青.多穗柯根皮苷微波辅助提取工艺优化及抗氧化活性评价[J].食品工业,2020,41(12):125-128.
- [2]王妍惠,王世儒,于泳渤等.超声微波辅助提取多穗柯根皮苷工艺优化[C]//中国食品科学技术学会.中国食品科学技术学会第十七届年会摘要集.中国食品科学技术学会第十七届年会摘要集,2020:366-367.
- [3]王慧莹.多穗柯根皮苷的提取纯化研究[D].中南大学,2014.