

姚秋萍, 罗明高, 潘大托. 响应面法优化超声辅助提取鱼腥草多糖的工艺[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 252–255.

响应面法优化超声辅助提取鱼腥草多糖的工艺

姚秋萍, 罗明高, 潘大托

(贵州民族大学化学与环境科学学院, 贵州贵阳 550025)

摘要:利用响应面法超声辅助对鱼腥草多糖的提取工艺进行优化。以超声时间、超声功率、液料比为影响因素, 在单因素试验基础上, 根据 Box – Benhnken 中心组合试验设计原理采用 3 因素 3 水平试验设计, 以多糖提取率为响应值进行响应面分析。结果表明: 鱼腥草多糖超声提取的最佳工艺条件为: 超声时间为 50 min、功率 606 W、液料比 42.5 mL : 1 g, 多糖提取率验证值为 16.31%, 与预测值 16.372% 的相对误差为 0.32%。响应面法优化超声提取条件准确可靠、提取率较高, 适合于鱼腥草多糖的提取。

关键词:鱼腥草; 多糖; 超声提取; 响应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)10–0252–03

鱼腥草为三白草科(Saururaceae)蕺菜属植物蕺菜(*Houttuyniacordata* Thunb.)的新鲜地上、地下部分以及干燥花期地上植株, 具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋的功效^[1]。鱼腥草既是一种传统的中药材, 又是特味野菜, 极具开发潜力, 临床上用于治疗肺炎、上呼吸道感染、流感、肝炎等疾病, 被推荐为抗严重急性呼吸综合征(SARS)的 8 种中药之一以及抗禽流感的 3 种中药之一^[2–3]。近年来, 鱼腥草中很多天然活性成分得到开发利用, 多糖是鱼腥草的主要有效成分之一。研究表明, 鱼腥草多糖具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、抑菌等作用^[4–8]。目前, 鱼腥草多糖的提取多采用热水提取工艺, 采用超声法提取的报道较少^[9–11]。本研究以鱼腥草地下部分为原料, 采用超声波、水溶醇沉法提取鱼腥草多糖, 通过单因素试验确定鱼腥草多糖提取的最佳超声功率、时间、液料比, 并通过响应面分析确定鱼腥草多糖提取的最优工艺, 以期鱼腥草的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

将鱼腥草在 40 ℃ 下进行热风干燥, 粉碎, 过 60 目筛, 密封好后置于 4 ℃ 冰箱中保存。无水乙醇、丙酮、乙醚、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、3,5–二硝基水杨酸、氢氧化钠、丙三醇等均为分析纯。

1.2 主要仪器

DTY–ZBJ–15A 型台式全自动制冰机(北京天佑科技发展有限公司), RE–52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), SHZ–Ⅲ型循环水式真空泵(上海亚荣生化仪器厂), 101–1 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司), 756PC 型紫外分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

收稿日期: 2013–12–16

基金项目: 贵州省自然科学基金(编号: 黔科合 J 字[2010]2263 号); 贵州民族大学引进人才科研项目。

作者简介: 姚秋萍(1978—), 女, 陕西渭南人, 博士, 副教授, 从事食品化学研究。E–mail: wonderypq@aliyun.com。

1.3 方法

1.3.1 总糖、还原糖含量测定 采用苯酚–硫酸法^[12]测定鱼腥草中总糖含量, 采用 DNS 法^[13]测定鱼腥草中还原糖含量。鱼腥草多糖含量、多糖得率计算公式如下。

多糖含量 = 总糖含量 – 还原糖含量; (1)

多糖得率 = 多糖含量 / 鱼腥草干粉质量 × 100%。 (2)

1.3.2 鱼腥草多糖的超声波提取方法 称取一定质量的鱼腥草干粉, 按一定液料比加入去离子水, 在冰水浴中超声提取一定时间, 离心, 取上清液测定鱼腥草总糖、还原糖含量。

1.3.3 鱼腥草多糖样品的制备 按照“1.3.2”节的方法, 将沉淀物加蒸馏水再超声提取 1 次, 离心, 合并 2 次上清液, 在旋转蒸发器上浓缩至一定体积, 加入 3 倍体积的 95% 乙醇, 放入 4 ℃ 冰箱中静置 12 h。离心, 沉淀加入适量的蒸馏水溶解, 滤除不溶物, 上清液加入 3 倍体积的 95% 乙醇, 4 ℃ 冰箱中静置过夜, 离心, 沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤, 干燥后即得鱼腥草多糖粗提物。

1.3.4 单因素试验优化鱼腥草多糖超声波法提取 采用单因素试验方法考察超声波提取时间、超声波功率、液料比 3 个因素对鱼腥草多糖得率的影响。

1.3.5 中心组合试验设计 在单因素试验基础上, 进行 3 因素 3 水平 Box – Benhnken 中心组合试验设计, 采用响应面法对试验结果进行分析, 优化鱼腥草多糖超声波法提取条件。

2 结果与分析

2.1 鱼腥草总糖、还原糖标准曲线

采用苯酚–硫酸法测定总糖含量, 以葡萄糖含量为横坐标, 吸光度为纵坐标制作标准曲线, 得回归方程: $y = 2.5556x - 0.0057$, $r = 0.9990$ 。采用 DNS 法测定还原糖含量, 以葡萄糖含量为横坐标, 吸光度为纵坐标制作标准曲线, 得回归方程: $y = 0.7585x - 0.031$, $r = 0.998$ 。

2.2 单因素试验优化鱼腥草多糖超声波提取条件

2.2.1 超声波提取时间对鱼腥草多糖提取率的影响 鱼腥草干粉在液料比为 30 mL : 1 g、提取功率为 400 W 的条件下, 在冰水浴中分别超声波提取 10、20、30、40、50、60、70 min, 测定鱼腥草多糖提取率。由图 1 可以看出, 超声时间 50 min

时,鱼腥草多糖的提取率最大。超声时间低于 50 min 时,多糖提取率随时间的增加而增大,超声时间大于 50 min 时鱼腥草多糖得率稍有下降,这可能是由于超声时间过长导致多糖结构遭到破坏,从而导致多糖得率降低。

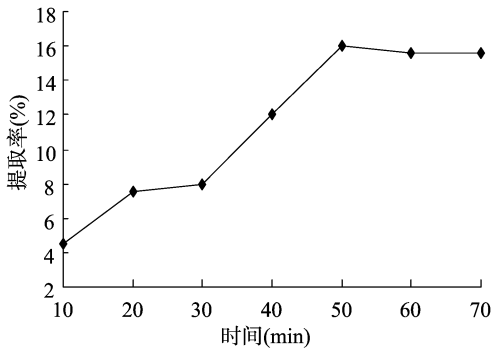


图1 超声波时间对鱼腥草多糖提取率的影响

2.2.2 超声波功率对鱼腥草多糖提取率的影响 鱼腥草干粉在液料比为 30 mL : 1 g, 超声波功率分别为 180、270、360、450、540、630、720 W 条件下,在冰水浴中超声波提取 50 min 后,测定鱼腥草多糖提取率。由图 2 可以看出,超声功率为 540 W 时,鱼腥草多糖提取率最大,由于功率在 540 ~ 720 W 之间多糖得率变化不大,因此选择超声波功率为 540 W 进行下一步试验。

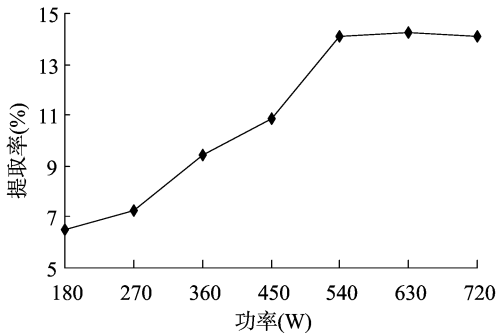


图2 超声波功率对鱼腥草多糖提取率的影响

2.2.3 液料比对鱼腥草多糖提取率的影响 鱼腥草干粉在功率为 540 W, 液料比 (mL : g) 分别为 10 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1 条件下,冰水浴中超声提取 50 min,测定鱼腥草多糖的提取率。从图 3 可以看出,当液料比为 40 mL : 1 g 时,多糖提取率最大。因此,选择液料比为 40 mL : 1 g 进行下一步试验。

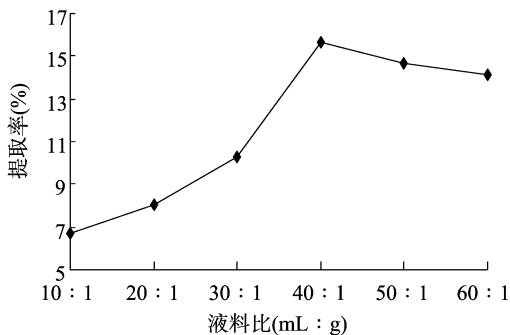


图3 液料比对鱼腥草多糖提取率的影响

2.3 鱼腥草多糖超声提取响应面优化结果

在单因素试验基础上,以超声时间、功率、液料比作为自变量,进行 3 因素 3 水平 Box - Behnken 的中心组合试验设计(表 1)。

表 1 Box - Behnken 中心组合试验设计因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
超声波处理时间 X_1 (min)	40	50	60
超声波功率 X_2 (W)	450	540	630
液料比 X_3 (mL : g)	30 : 1	40 : 1	50 : 1

对超声时间 (X_1)、功率 (X_2)、超声波液料比 (X_3) 的编码值与试验值进行转换: $X_1 = (Z_1 - 50)/10$, $X_2 = (Z_2 - 540)/90$, $X_3 = (Z_3 - 40)/10$, 以 3 次试验所得多糖提取率的平均值为响应值 (Y), 试验设计及结果见表 2 (其中 1 ~ 13 是析因试验, 14 ~ 17 是中心试验, 用来估计试验误差)。

表 2 Box - Behnken 中心组合设计方案及试验结果

序号	X_1	X_2	X_3	多糖得率 (%)
1	-1	1	0	16.01
2	1	1	0	15.82
3	0	1	1	16.04
4	1	0	-1	15.19
5	1	-1	0	15.61
6	0	1	-1	15.74
7	-1	0	-1	14.72
8	-1	0	1	15.52
9	1	0	1	15.93
10	0	-1	1	15.76
11	0	-1	-1	14.83
12	-1	-1	0	15.08
13	0	0	0	16.08
14	0	0	0	16.14
15	0	0	0	16.23
16	0	0	0	16.42
17	0	0	0	16.23

通过 Design - Expert 软件进行二次响应面回归分析,得到多元二次响应面回归模型:

$$Y = -21.10125 + 0.55050X_1 + 0.042736X_2 + 0.50363X_3 - 0.0002X_1X_2 - 0.015X_1X_3 - 0.000175X_2X_3 - 0.0042125X_1^2 - 0.00002083X_2^2 - 0.0045875X_3^2$$

采用 F 检验方法对回归模型的各项系数进行检验,评价各项对响应值影响的显著性, P 值小于 0.01 为极显著项, P 值小于 0.05 为显著项。从表 3 可知,整体模型的 $Prob > F$ 值小于 0.01,表明该模型具有统计学意义。在各因素水平范围内,对多糖提取率的影响顺序由大到小依次为:液料比 > 超声功率 > 超声时间。各因素中 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_3^2 对 Y 的影响极显著, X_1 、 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_2^2 对 Y 影响显著,试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系,交互项、二次项对响应值都有很大影响。失拟项用来表示所用模型与试验拟合的程度,即二者差异的程度。本模型中 P 值为 0.4851 > 0.05,无失拟因素存在,因此可用回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。

由 SAS 分析得到响应值最大时 X_1 、 X_2 、 X_3 对应的编码值分别为 $X_1=0.020\ 0$ 、 $X_2=0.736\ 8$ 、 $X_3=0.255$ ，对应的鱼腥草多糖最佳提取条件为：超声时间为 50.20 min、功率 606.11 W、液料比 42.52 mL : 1 g，理论提取率为 16.372%（图 4、图 5、图 6）。

表 3 回归分析结果					
方差来源	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值	Prob>F
模型	5.47	9	0.440	26.910	0.000 1
X_1	0.73	1	0.190	11.330	0.012 0
X_2	0.78	1	0.680	41.320	0.000 4
X_3	1.42	1	0.960	58.390	0.000 1
X_1X_2	0.200	1	0.130	7.89	0.026 2
X_1X_3	0.017	1	0.009	0.055	0.821 6
X_2X_3	0.099	1	0.099	6.040	0.043 6
X_1^2	0.49	1	0.750	45.490	0.000 3
X_2^2	0.006 821	1	0.120	7.300	0.030 6
X_3^2	1.59	1	0.890	53.950	0.000 2
残差	0.25	7	0.016		
失拟项	0.045	3	0.016	0.980	0.485 1
纯误差	0.20	4	0.017		
总离差	5.72	16			

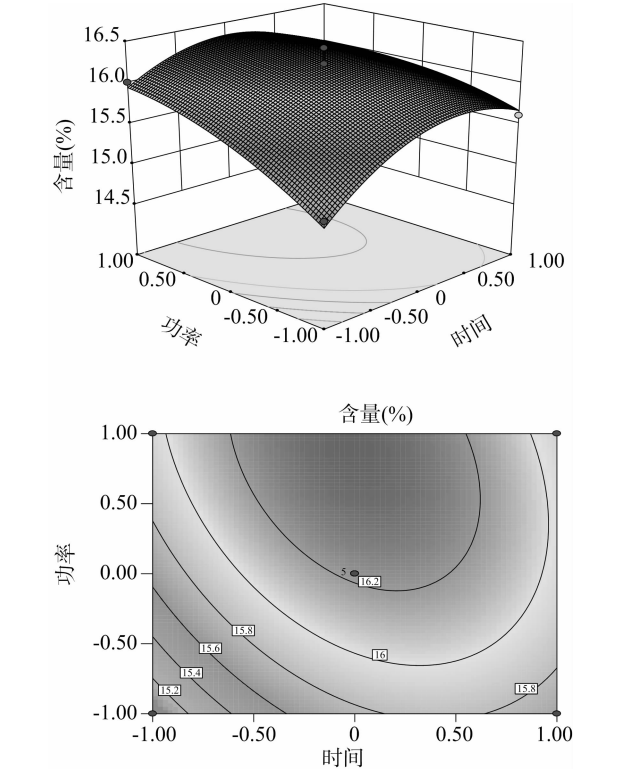


图4 $Y=f(X_1,X_2)$ 的响应面与等值线图

为了验证模型预测的可行性，在最佳提取条件下提取鱼腥草多糖，进行 3 次平行验证试验，3 次平行试验得到鱼腥草多糖实际平均提取率为 16.31%，与理论预测值相比相对误差为 0.32%，预测值与试验值吻合得很好。因此，采用响应面法对鱼腥草多糖超声提取条件进行优化是可行的。

3 结论与讨论

本研究在单因素试验基础上，采用响应面分析法优化了超声提取鱼腥草多糖工艺，建立了回归模型。在各因素水平

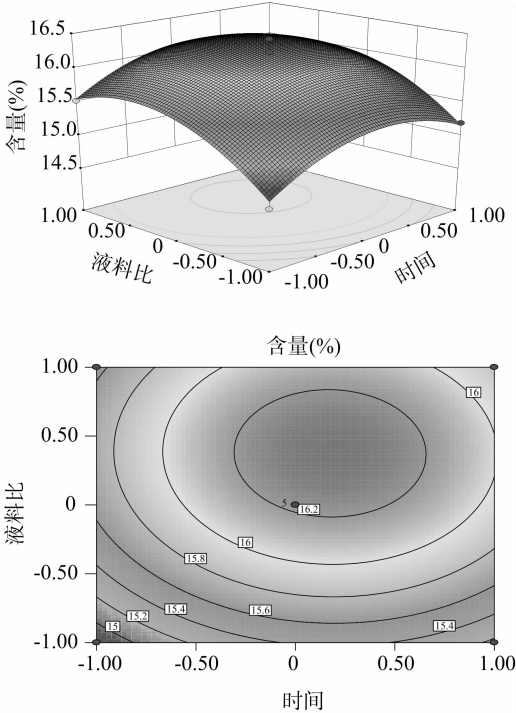


图5 $Y=f(X_1,X_3)$ 的响应面与等值线图

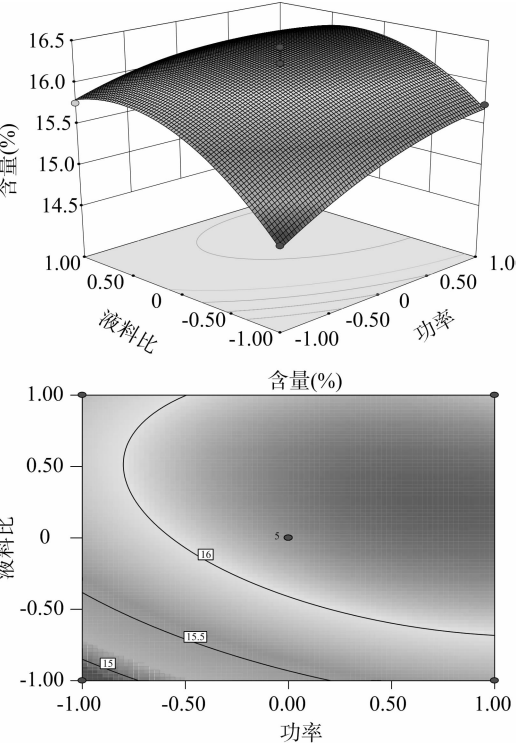


图6 $Y=f(X_2,X_3)$ 的响应面与等值线图

范围内，超声提取对鱼腥草多糖提取率的影响顺序为：液料比 > 超声功率 > 超声时间。鱼腥草多糖超声提取的最佳工艺条件为：超声时间为 50 min、功率 606 W、液料比 42.5 mL : 1 g，多糖提取率验证值为 16.31%，与预测值 16.372% 的相对误差为 0.32%。响应面法优化超声提取条件准确可靠、提取率

樊琛,曾庆华,王会,等.金银花总黄酮的提取[J].江苏农业科学,2014,42(10):255-256.

金银花总黄酮的提取

樊琛,曾庆华,王会,李燕,孙小凡

(聊城大学农学院,山东聊城 252059)

摘要:以金银花为原料,通过正交试验探讨了乙醇浓度、料液比、超声提取时间以及提取温度等对金银花总黄酮提取率的影响。结果表明,最佳提取条件为料液比 1 g : 200 mL、提取时间 15 min、乙醇浓度 30%、提取温度 40 ℃。

关键词:金银花;总黄酮;超声辅助;最佳提取方法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0255-02

金银花(*Lonicera japonica*)为忍冬科植物忍冬的花蕾^[1],是我国公布的既是食品又是药品的植物,具有清热解毒、疏风通络等功效^[2]。金银花中有挥发油、黄酮类、有机酸、三萜类、无机元素等多种化学成分^[3]。有研究表明,绿原酸类和黄酮类化合物具有抗氧化、清除自由基的作用^[4-5]。本研究以金银花为原料,运用正交试验法,以料液比、提取时间、提取液(乙醇)浓度、提取温度为因素,提取金银花中的总黄酮成分,以期为金银花的综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金银花,由北京同仁堂健康药业(福州)有限公司提供;乙醇、NaNO₂、芸香苷等为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1800 紫外可见分光光度计,日本岛津公司;

SK1200H 超声清洗机,上海科导超声仪器有限公司;79-2 双向磁力加热搅拌器,江苏省金坛市医疗仪器厂;SB-2000 水浴锅,上海爱朗仪器有限公司;TD5 台式多管架离心机,长沙英泰仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 金银花提取液的制备 称取干金银花样本,用研钵研成粉末,溶于不同浓度的提取剂(乙醇)溶液中,45 W 超声浸提处理 15~45 min 后抽滤,将滤液于 3 000 r/min 离心 15 min 后,得到的澄清液体即为金银花提取液。

1.3.2 正交试验的设计 用正交试验 L₉(3⁴) 确定最佳料液比、处理时间、乙醇浓度、提取温度等工艺条件。考虑到生物活性物质对温度的敏感性和实际操作中节省物料、能源的实际情况,正交试验因素水平设置见表 1。

表 1 金银花总黄酮提取正交试验设计

水平	因素			
	料液比 (g : mL)	提取时间 (min)	乙醇浓度 (%)	提取温度 (℃)
1	1 : 200	30	60	60
2	1 : 300	45	30	40
3	1 : 400	15	0	20

收稿日期:2013-11-29

基金项目:聊城大学博士科研启动基金(编号:31805)。

作者简介:樊琛(1978—),女,山东聊城人,博士,副教授,主要从事食品营养、病原体分子生物学、食品卫生学方面的研究。E-mail: fanchen7810@126.com。

较高,适合于鱼腥草多糖的提取。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:人民卫生出版社,1957:155.
- [2] 卢红梅,彭丽华,郭方遒,等. 鱼腥草中黄酮类成分的高效液相色谱指纹图谱分析[J]. 色谱,2010,28(10):965-970.
- [3] 王健,史玉,张永泽,等. 鱼腥草不同部位提取物的抗菌抗病毒作用比较[J]. 河北工程大学学报:自然科学版,2010,27(2):104-106.
- [4] 刘光建,王璐,王菲菲,等. 鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌和脑组织抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):207-210.
- [5] Tian L M, Zhao Y, Guo C, et al. A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2):537-544.

- [6] Meng J, Leung K S, Jiang Z H, et al. Establishment of GC-MS fingerprint of fresh *Houttuynia cordata* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53(11):1484-1489.
- [7] 何士敏,方平,郭利佳. 鱼腥草抗氧化成分的研究[J]. 西南农业学报,2009,22(3):625-631.
- [8] 张娟娟,卢燕,陈道峰. 鱼腥草抗补体活性多糖的制备工艺研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2071-2075.
- [9] 李利华. 鱼腥草多糖超声波提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(5):2571-2573.
- [10] 王素萍,杨亚玲,李晚谊,等. 鱼腥草多糖提取工艺及成分分析研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,2008,30(4):396-400.
- [11] 孟江,周毅生,廖华卫. 超声波提取鱼腥草多糖工艺研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):17-18.
- [12] 刘军海,黄宝旭,蒋德超. 响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J]. 食品科学,2009,30(2):114-118.
- [13] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1994:13-16.