

韩 丹. 二次通用旋转设计优化葎草多糖提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 308–311.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.101

# 二次通用旋转设计优化葎草多糖提取工艺

韩 丹

(吉林工商学院生物工程学院, 吉林长春 130507)

**摘要:**为确定超声辅助提取葎草多糖的最佳工艺条件,通过单因素试验确定液料比、超声功率、超声温度、超声时间等因素的较适宜范围,并应用二次通用旋转设计优化提取工艺条件。超声辅助提取葎草多糖的最佳工艺条件为:液料比 34 mL : 1 g,超声功率 134 W,超声温度 61 ℃,超声时间 49 min,此时多糖提取率为 3.52%。经二次通用旋转设计优化后的葎草多糖提取工艺具有试验次数少、计算简单、准确可靠等优点,工艺稳定可行。

**关键词:**葎草多糖;超声辅助提取;单因素试验;二次通用旋转设计

**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0308-04

葎草 [*Humulus scandens* (Lour.) Merr.] 别称勒草、涩萝蔓、拉拉秧、五爪龙等,为多年生茎蔓草本植物,是广泛分布于我国(除新疆、青海、西藏外)各省份的常见杂草,其嫩茎和叶可作为食草动物饲料。葎草是我国重要的中药材,其味甘苦、寒、无毒,具有清热解毒、利尿消肿的功效<sup>[1]</sup>。现代药理学研究证实,葎草提取物具有抗菌、抗炎、止泻抑菌、降压、镇痛等作用<sup>[2]</sup>。葎草中含有多糖、黄酮类化合物、胆碱、天门冬酰胺、挥发油、鞣质等成分。近年来,对葎草中黄酮化合物、挥发油的成分与药理研究已取得一些进展,葎草黄酮类化合物主要包含秋英苷(cosmosiin)、本犀草素-7-葡萄糖苷

(luteolin-7-D-glucoside)、牡荆素(vitexin)等;挥发油主要包含 $\beta$ -葎草烯( $\beta$ -humulene)、石竹烯(caryophyllene)、 $\alpha$ -古巴烯( $\alpha$ -copaene)、 $\alpha$ -、 $\beta$ -芹子烯( $\alpha$ -、 $\beta$ -selinene)、 $\gamma$ -毕澄茄烯( $\gamma$ -cadinene)、苯甲醇、苯乙醇等<sup>[3]</sup>,然而关于葎草多糖的报道极为少见。超声波辅助法具有简单、便捷、安全等优点,可缩短提取时间,增大多糖萃取率,目前已被广泛应用于植物多糖的提取。本研究采用超声波辅助法提取葎草多糖,并应用二次通用旋转设计优化提取工艺,以期对葎草资源的有效开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 原料与试剂 葎草采自吉林工商学院周边农田,去掉根部及枯黄部分,洗净后于 60 ℃干燥 8 h,粉碎后过 60 目筛,保存备用。葡萄糖标准品购自上海华蓝化学科技有限公司,蒽酮、浓硫酸、乙醇等试剂均为分析纯,试验用水为去离子水。

1.1.2 仪器 KQ200-KDV 型超声波清洗机(江苏省昆山市超声仪器有限公司),UV-160A 型紫外可见分光光度计

收稿日期:2014-08-16

基金项目:吉林省教育厅资助项目(编号:2014441);吉林省科技厅青年基金(编号:20140520145JH);博士后科研项目(编号:415-111900167)。

作者简介:韩 丹(1982—),女,吉林长春人,硕士,讲师,主要从事生物化学及分子生物学研究。E-mail:jlqshandan@163.com。

通信作者:郭立泉,博士后,教授,主要从事生物工程领域研究。E-mail:guolq948@nenu.edu.cn。

[9] Lim K, Mustapha A. Effects of cetylpyridinium chloride, acidified sodium chlorite, and potassium sorbate on populations of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* on fresh beet[J]. *Journal of Food Protection*, 2004, 67(2): 310–315.

[10] 张 茹. 次氯酸钠中水消毒的研究[D]. 北京:中国地质大学:北京, 2006.

[11] 王 萍, 吴燕燕, 李来好, 等. 4 种减菌剂对军曹鱼片的减菌作用[J]. *食品科学*, 2010, 31(21): 283–287.

[12] 李 杉, 马海霞, 李来好, 等. 减菌化预处理对鲜罗非鱼片质量的影响[J]. *食品科学*, 2009, 30(18): 379–384.

[13] 宋志强, 刘超群, 侯温甫. 草鱼鱼腩中热杀索丝菌生长预测模型的建立与验证[J]. *肉类工业*, 2013(8): 26–30.

[14] Dalgaard P. Fresh and lightly preserved seafood[M]//Man C M D, Jones A A. Shelf life evaluation of foods. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers Inc, 2000: 110–139.

[15] Gram L, Huss H H. Fresh and processed fish and shellfish[M]//Lund B M, Baird-Parker T C, Gould G W. The microbiological

safety and quality of food. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers Inc, 2000: 472–506.

[16] Gill C O, Newton K G. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures[J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1977, 43(2): 189–195.

[17] 宋志强, 刘超群, 侯温甫. 鱼腩中假单胞菌预测模型的建立与货架期预测[J]. *食品科学*, 2013, 34(22): 292–297.

[18] GB 4789.2—2008 食品卫生微生物学检验菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社.

[19] 李云雁, 胡传荣. 试验设计与数据处理[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社, 2008: 131.

[20] 李苗云, 杨向莹, 张秋会, 等. 冷却猪肉中特定腐败菌生长动力学参数的分析研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(2): 211–214.

[21] SC/T 3108—2011 鲜青鱼、草鱼、鲢鱼、鳊鱼、鲤鱼[S].

[22] 佟 懿, 谢 晶. 鲜带鱼不同贮藏温度的货架期预测模型[J]. *农业工程学报*, 2009, 25(6): 301–305.

(日本岛津公司), R-301 型旋转蒸发器(上海科升仪器有限公司), SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(河南郑州长城仪器有限公司), TGL-20M 型离心机(湘潭湘仪仪器有限公司), FW177 型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 原料的预处理 将粉碎后的原料按液料比 5 mL:1 g 加入石油醚,回流脱脂 2 次,每次 1.5 h,滤去石油醚,滤渣挥干后获得预处理葎草粉末。

1.2.2 葎草多糖的提取 将预处理葎草粉末按一定液料比加入水中,浸泡 2 h 后置于超声波清洗器,固定超声频率为 40 kHz,以不同超声功率、超声温度、超声时间进行提取。提取结束后过滤,用旋转蒸发器将滤液浓缩至适当体积,加入 3 倍体积的 95% 乙醇醇沉 24 h,离心烘干至恒质量。采用 Sevage 的方法<sup>[4]</sup>除去蛋白质,离心并取上清液进行浓缩,加入 3 倍体积的 95% 乙醇醇沉,所得沉淀用乙醇、丙酮、乙醚反复洗涤,真空烘干后得到葎草多糖。

## 1.3 试验设计

针对影响葎草多糖提取率的各因素进行单因素试验,并采用二次通用旋转设计优化提取工艺条件。固定超声功率 120 W、超声温度 50 ℃、超声时间 50 min,分别按 10 mL:1 g、20 mL:1 g、30 mL:1 g、40 mL:1 g、50 mL:1 g 的液料比提取葎草多糖,以确定超声辅助提取葎草多糖较适宜的液料比。固定液料比 30 mL:1 g、超声温度 50 ℃、超声时间 50 min,分别按 80、100、120、140、160 W 的超声功率提取葎草多糖,以确定超声辅助提取葎草多糖较适宜的超声功率。固定液料比 30 mL:1 g、超声功率 120 W、超声时间 50 min,分别按 30、40、50、60、70 ℃ 的超声温度提取葎草多糖,以确定超声辅助提取葎草多糖较适宜的超声温度。固定液料比 30 mL:1 g、超声功率 120 W、超声温度 50 ℃,分别按 10、30、50、70、90 min 的超声时间提取葎草多糖,以确定超声辅助提取葎草多糖较适宜的超声时间。在确定各因素的适宜范围后,以葎草多糖提取率为指标,作 4 因素 5 水平的二次通用旋转设计,优化超声辅助提取葎草多糖的工艺条件。

## 1.4 分析及测定方法

采用蒽酮-硫酸法测定总糖含量<sup>[5]</sup>,采用二硝基水杨酸法测定还原糖含量<sup>[6]</sup>,多糖提取率按下式计算:

$$C = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100\%$$

式中:  $C$  为多糖提取率,%;  $m_1$  为样品中总糖含量,mg;  $m_2$  为样品中还原糖含量,mg;  $m$  为样品的质量,mg。

## 2 结果与分析

### 2.1 液料比对葎草多糖提取率的影响

分别以 10 mL:1 g、20 mL:1 g、30 mL:1 g、40 mL:1 g、50 mL:1 g 的液料比提取葎草多糖,研究液料比对多糖提取率的影响。结果表明,多糖提取率随液料比的加大而增加,当液料比超过 30 mL:1 g 后多糖提取率增加不明显(图 1)。较大的液料比将为后期工艺带来困难,且能耗较高,因此选择 30 mL:1 g 左右的液料比。

### 2.2 超声功率对葎草多糖提取率的影响

分别以 80、100、120、140、160 W 的超声功率提取葎草多

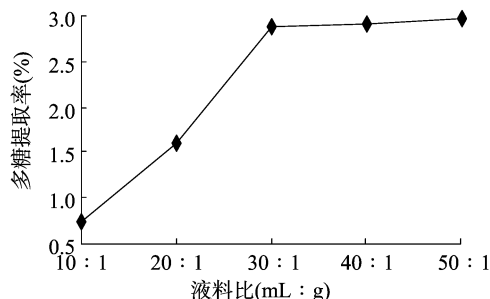


图1 液料比对葎草多糖提取率的影响

糖,研究超声功率对多糖提取率的影响。结果表明,多糖提取率随超声功率的加大而增加,当超声功率超过 140 W 后多糖提取率反而下降(图 2)。超声功率对葎草多糖提取率具有双向影响,前期超声功率必须达到一定强度才能产生空化作用,破坏细胞结构以便多糖的溶出;当超声功率超过 140 W,超声波的机械剪切作用会加快已溶出多糖糖苷键的断裂,从而导致提取率下降,因此选择 140 W 左右的超声功率。

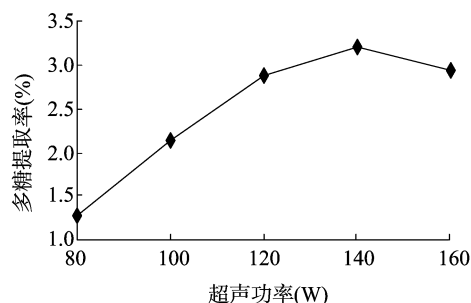


图2 超声功率对葎草多糖提取率的影响

### 2.3 超声温度对葎草多糖提取率的影响

分别以 30、40、50、60、70 ℃ 的超声温度提取葎草多糖,研究温度对多糖提取率的影响。结果表明,多糖提取率随超声温度的升高而增加,当超声温度超过 60 ℃ 后多糖提取率反而下降(图 3)。温度越高则分子运动越强,多糖越易溶出;而过高的温度可与超声波破碎共同作用,破坏多糖的某些结构或使其降解,从而影响提取率,因此选择 60 ℃ 左右的超声温度。

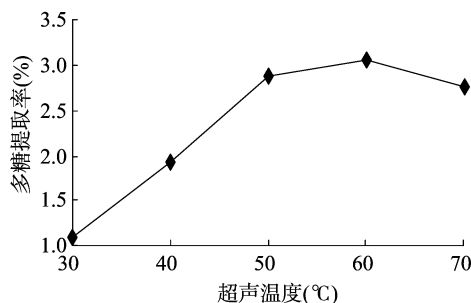


图3 超声温度对葎草多糖提取率的影响

### 2.4 超声时间对葎草多糖提取率的影响

分别以 10、30、50、70、90 min 的超声时间提取葎草多糖,研究超声时间对多糖提取率的影响。结果表明,多糖提取率随超声时间的延长而增加,当超声时间超过 50 min 后多糖提取率反而下降(图 4)。前期超声波机械剪切作用和空化作用使多糖快速溶出;而长时间持续的机械剪切作用使已溶出的多糖分子糖苷键断裂,从而降低提取率,因此选择 50 min 左

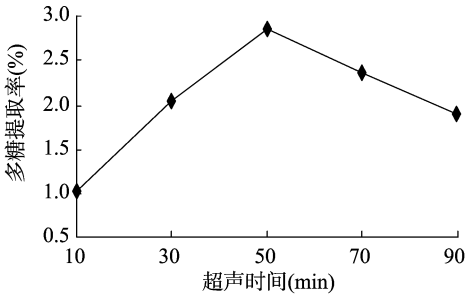


图4 超声时间对葎草多糖提取率的影响

右的超声时间。

2.5 二次通用旋转设计优化试验结果

2.5.1 数学模型的建立与显著性检验 根据单因素试验结果,选取液料比、超声功率、超声温度、超声时间 4 个因素,以葎草多糖提取率为指标,采用二次通用旋转设计优化提取工艺,试验设计见表 1,试验结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 二次通用旋转试验的因素与水平

因素	0 水平	变化区间
$X_1$ :液料比(mL:g)	30:1	5
$X_2$ :超声功率(W)	140	10
$X_3$ :超声温度(℃)	60	5
$X_4$ :超声时间(min)	50	10

表 2 二次通用旋转试验结果

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	多糖提取率(%)
1	1	1	1	1	2.41
2	1	1	1	-1	2.78
3	1	1	-1	1	2.62
4	1	1	-1	-1	2.83
5	1	-1	1	1	3.16
6	1	-1	1	-1	3.37
7	1	-1	-1	1	2.96
8	1	-1	-1	-1	3.24
9	-1	1	1	1	2.27
10	-1	1	1	-1	2.56
11	-1	1	-1	1	2.49
12	-1	1	-1	-1	2.71
13	-1	-1	1	1	2.84
14	-1	-1	1	-1	3.07
15	-1	-1	-1	1	2.82
16	-1	-1	-1	-1	2.95
17	-2	0	0	0	2.27
18	2	0	0	0	3.68
19	0	-2	0	0	2.86
20	0	2	0	0	3.06
21	0	0	-2	0	2.76
22	0	0	2	0	2.93
23	0	0	0	-2	2.13
24	0	0	0	2	2.86
25	0	0	0	0	3.29
26	0	0	0	0	3.48
27	0	0	0	0	3.46
28	0	0	0	0	3.27
29	0	0	0	0	3.36
30	0	0	0	0	3.22
31	0	0	0	0	3.39

表 3 二次通用旋转试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
$X_1$	7.256 4	1	7.256 4	87.197 62	0.000 00
$X_2$	4.033 3	1	4.033 3	48.466 49	0.000 00
$X_3$	0.011 7	1	0.011 7	0.140 76	0.712 45
$X_4$	0.083 3	1	0.083 3	1.000 99	0.331 96
$X_1^2$	2.224 0	1	2.224 0	26.724 53	0.000 09
$X_2^2$	2.403 6	1	2.403 6	28.883 58	0.000 06
$X_3^2$	4.013 0	1	4.013 0	48.222 36	0.000 00
$X_4^2$	11.434 9	1	11.434 9	137.408 80	0.000 00
$X_1X_2$	0.105 0	1	0.105 0	1.261 67	0.277 91
$X_1X_3$	0.048 8	1	0.048 8	0.586 52	0.454 92
$X_1X_4$	0.021 7	1	0.021 7	0.260 68	0.616 63
$X_2X_3$	0.656 2	1	0.656 2	7.885 43	0.012 63
$X_2X_4$	0.031 2	1	0.031 2	0.375 37	0.548 70
$X_3X_4$	0.036 7	1	0.036 7	0.440 54	0.516 31
回归	3.266 3	14	0.233 3	$F_2=13.283$	0.029 59
剩余	1.331 5	16	0.083 2		
失拟	1.274 0	10	0.127 4	$F_1=2.804$	0
误差	0.057 5	6	0.009 6		
总和	4.597 7	30			

对得到的旋转试验结果进行多元分析,回归方程为: $Y=3.352\ 86+0.186\ 67X_1-0.139\ 17X_2+0.007\ 50X_3-0.020\ 00X_4-0.094\ 67X_1^2-0.098\ 42X_2^2-0.127\ 17X_3^2-0.214\ 67X_4^2-0.027\ 50X_1X_2+0.018\ 75X_1X_3-0.012\ 50X_1X_4-0.068\ 75X_2X_3-0.015\ 00X_2X_4-0.016\ 25X_3X_4$ 。

回归方程的失拟性检验  $F_1=2.804 < F_{0.05}(10,6)=4.06$ ,不显著,表明未控制因素对试验结果影响很小;显著性检验  $F_2=28.039\ 43 > F_{0.01}(14,16)=3.41$ ,表明模型的预测值与实际值吻合度高,模型成立。

在  $\alpha=0.05$  显著水平剔除不显著项后,简化后的回归方程为: $Y=3.352\ 86+0.186\ 67X_1-0.139\ 17X_2-0.094\ 67X_1^2-0.098\ 42X_2^2-0.127\ 17X_3^2-0.214\ 67X_4^2-0.068\ 75X_2X_3$ 。最高值的各因素组合  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  分别为 1、-1、0、0,优化方案中葎草多糖理论最高提取率为 3.49%。

2.5.2 单因素分析 根据试验结果对单因素进行效应分析(其他因素为 0 水平),结果表明,各因素在试验取值范围内对多糖提取率的作用从大到小依次为  $X_1 > X_2 > X_4 > X_3$ ,即液料比 > 超声功率 > 超声时间 > 超声温度(表 4、图 5)。

表 4 二次通用旋转试验单因素效应分析

水平	多糖提取率(%)			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
-2.0	2.601	3.237	2.844	2.494
-1.5	2.860	3.340	3.067	2.870
-1.0	3.072	3.394	3.226	3.138
-0.5	3.236	3.398	3.321	3.299
0.0	3.353	3.353	3.353	3.353
0.5	3.423	3.259	3.321	3.299
1.0	3.445	3.115	3.226	3.138
1.5	3.420	2.923	3.067	2.870
2.0	3.348	2.681	2.844	2.494

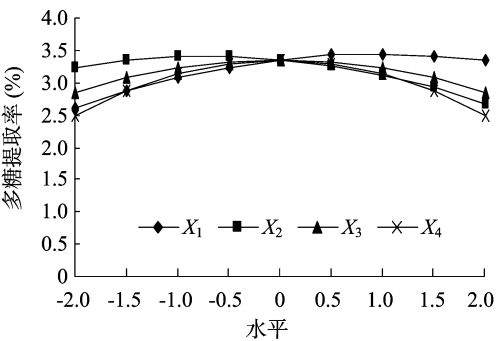


图5 单因素效应分析

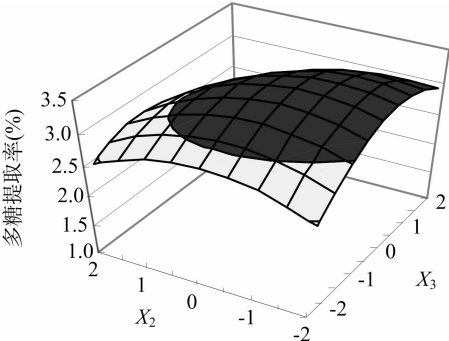


图6 二次通用旋转试验两因素交互效应分析

2.5.3 两因素交互效应分析 由试验结果的方差分析可知,各因素间只有  $X_2$  (超声功率)与  $X_3$  (超声温度)存在交互效应并达到显著水平( $P<0.05$ ),所以选取其他因素为 0 水平,分析  $X_2$  与  $X_3$  的交互效应(图 6)。结果表明,当  $X_2$  处于较低编码范围( $-2 \sim +1$ ),而  $X_3$  处于较高编码范围( $-0.5 \sim +2$ )时,两因素交互效应明显。在该范围内固定超声温度,则多糖提取率随超声功率的加大而先升后降;在该范围内固定超声功率,则多糖提取率随超声温度的升高而先升高后缓慢下降,表明超声功率与超声温度协同作用时条件不宜过高。

2.5.4 频率分析与模型寻优 本研究采用频率分析法寻找最优工艺,采用 DPS 软件对不同设计水平下的组合进行模拟

试验,获得 97 个大于临界值 2.94 的方案,各变量取值的频率分布见表 5。当  $X_1$  在 0.671~1.041、 $X_2$  在  $-0.962 \sim -0.585$ 、 $X_3$  在 0.009~0.362、 $X_4$  在  $-0.143 \sim 0.143$  时,多糖提取率高于 2.94% 的可能性为 95%,此时优化提取条件为:液料比 33.36 mL:1 g~35.21 mL:1 g、超声功率 133.38~134.15 W、超声温度 60.04~61.81℃、超声时间 48.57~51.43 min。考虑到设备的可操作性,将提取工艺条件更改为:液料比 34 mL:1 g、超声功率 134 W、超声温度 61℃、超声时间 49 min。对此方案进行验证性试验,获得葎草多糖提取率为 3.52%,接近于理论最高提取率 3.49%,因此确定此组合为超声辅助提取葎草多糖的最优工艺条件。

表 5 二次通用旋转试验各变量取值的频率分布

水平	$X_1$		$X_2$		$X_3$		$X_4$	
	频数	频率	频数	频率	频数	频率	频数	频率
-2.0	0	0.000 00	26	0.268 04	0	0.000 00	0	0.000 00
-1.0	7	0.072 16	32	0.329 90	25	0.257 73	25	0.257 73
0.0	29	0.298 97	30	0.309 28	35	0.360 82	47	0.484 54
1.0	32	0.329 90	9	0.092 78	31	0.319 59	25	0.257 73
2.0	29	0.298 97	0	0.000 00	6	0.061 86	0	0.000 00
加权均数	0.856		-0.773		0.186		0.000	
标准误	0.094		0.096		0.090		0.073	
95% 的分布区间	0.671~1.041		-0.962~-0.585		0.009~0.362		-0.143~0.143	
提取条件	(33.36~35.21) mL:1 g		133.38~134.15 W		60.04~61.81℃		48.57~51.43 min	

3 结论

采用二次通用旋转设计优化超声辅助提取葎草多糖的工艺,获得的回归方程为: $Y=3.352 86+0.186 67X_1-0.139 17X_2-0.094 67X_1^2-0.098 42X_2^2-0.127 17X_3^2-0.214 67X_4^2-0.068 75X_2X_3$ 。葎草多糖提取工艺条件为:液料比 34 mL:1 g、超声功率 134 W、超声温度 61℃、超声时间 49 min。二次通用旋转设计优化葎草多糖的提取具有试验次数少、计算简单、准确可靠等优点,可为葎草资源的有效开发提供技术参考。

参考文献:

[1] 蒋益花,陈敏明. 葎草总黄酮的提取工艺和含量测定研究[J].

浙江农业科学,2007(2):150-153.  
[2] 董江涛,李 燕,徐慧强,等. HPD-722 大孔树脂纯化葎草总黄酮的工艺研究[J]. 辽宁农业科学,2010(3):11-15.  
[3] 芦雪霞,蒋建勤. 葎草的化学成分研究[J]. 药学与临床研究,2013(3):230-232.  
[4] 姚惠伶,蒋彬彬. 超声波提取紫薯多糖的工艺优化[J]. 安徽农业科学,2011(14):8357-8358,8361.  
[5] 王艾平,周丽明,张 勇,等. 水溶性茶籽多糖提取条件研究[J]. 上饶师范学院学报,2012,32(6):70-73.  
[6] 周桃英,陈年友,陈中建,等. 超声波-微波协同法提取黄精多糖工艺研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):231-233.