

响应曲面法优化泡沫分离枸杞酸性多糖

陈亮, 张炜*, 陈元涛, 李轩领, 肖江, 马福林

青海师范大学 化学系, 西宁 810008

摘要: 本文采用泡沫分离法纯化枸杞酸性多糖。在单因素实验基础上, 采用 Design-Expert 软件中的 Box-Behnken Design 设计考察稀释倍数 n 、表观气浮速率 G 和浮选时间 t 三个因素对枸杞酸性多糖富集比和回收率的影响, 建立了各因素对其综合影响的回归方程, 通过该方程预测了其最佳工艺条件为: 稀释倍数为 10、表观气浮速率为 207 mL/min, 浮选时间为 62 min。在此条件下枸杞酸性多糖的富集比和回收率分别为 3.61% 和 81.76%, 验证值分别为 3.81% 和 82.47%, 与预测值的相对误差分别为 5.5% 和 0.87%。

关键词: 枸杞多糖; 糖醛酸; 泡沫分离; 响应曲面法

中图分类号: 00629.12

文献标识码: A

Optimization of Foam Separation of *Lycium barbarum* Acidic Polysaccharides by Response Surface Methodology

CHEN Liang, ZHANG Wei*, CHEN Yuan-tao, LI Xuan-ling, XIAO Jiang, MA Fu-lin

Department of Chemistry, Qinghai Normal University, Xining 810008, China

Abstract: In this study, a novel method for purifying acidic polysaccharides from *Lycium barbarum* by foam separation was established. Based on the single factor experiment, Box-Behnken design in Design-Expert software was adopted to investigate the influence of three factors: dilution times (n), superficial gas floating rate (G) and floating time (t), on enrichment ratio and recovery of acidic polysaccharides. The regression equation showed that under the optimized conditions, when dilution times (n) was 10, superficial gas floating rate (G) was 207 mL/min, floating time (t) was 62 min, enrichment ratio and recovery of acidic polysaccharides reached highest to 3.61 and 81.76%. The relative error between verification values (3.81% and 82.47%) and theoretic values were 5.5% and 0.87%, respectively.

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharides; alduronic acid; foam separation; response surface methodology

枸杞是茄科植物, 是卫生部公布的药食同源的重要植物资源, 枸杞多糖^[1] (*Lycium barbarum* Polysaccharides, LBPs) 作为枸杞中重要的生物活性成分, 具有增强机体免疫力、抗肿瘤、抗衰老等作用。研究表明, 枸杞多糖是以阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖与半乳糖醛酸组成的酸性杂多糖同多肽或蛋白质构成的复合性多糖^[2]。

目前枸杞多糖的分离纯化方法^[3] 主要有乙醇分级沉淀法、柱色谱法、季铵盐沉淀法和膜分离法等。这些方法一般需要加入盐或者有机试剂, 而且操作复杂、成本高, 都不是最经济实用的酸性多糖分离纯化方法。泡沫分离^[4] 是一项利用物质在气泡表面上吸附性质的差异进行分离的技术, 该技术具

有设备简单、能耗低、投资少, 操作和维修方便等优点。殷钢等^[5] 研究了其在蛋白和多糖混合体系分离纯化上的应用, 为天然产物的提取分离建立了一种简单、高效的方法。

溶液中含有表面活性成份是泡沫分离的必要条件之一, 蛋白质含有亲水基和疏水基, 属于生物表面活性物质, 枸杞酸性多糖中蛋白质的存在将赋予其一定的表面活性。因此枸杞水提液具备了泡沫分离的必要条件, 但泡沫分离法在枸杞酸性多糖分离纯化中未见报道。本文采用泡沫分离纯化枸杞酸性多糖, 并通过响应曲面法合理优化, 简化了传统的枸杞多糖分离纯化方法, 为枸杞酸性多糖的分离纯化工艺提供了新思路。

1 材料与仪器

1.1 原料

青海诺木洪枸杞 (产于柴达木盆地的红枸杞成

收稿日期: 2013-06-09 接受日期: 2013-12-24

基金项目: 科技部科技人员服务企业项目 (2009GJG20039); 青海省重点科技攻关项目 (2007-N-120)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6303374; E-mail: zhangwei@qhnu.edu.cn

熟干燥果实)。

1.2 试剂

D-葡萄糖醛酸(GlcA)、间羟基联苯、无水四硼酸钠(上海源叶生物技术有限公司),所用试剂均为分析纯以上规格。

1.3 仪器

101A-1 E 电热鼓风干燥箱;万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);胶体磨(温州市七星乳品设备厂);LD4-2 低速离心机(北京医用机械厂);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);无油空气压缩机(上海捷豹压缩机制造有限公司);LZB-3 玻璃转子流量计(Senlod 测控有限公司);KQ-250DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);自行设计的泡沫分离装置(附图1)。

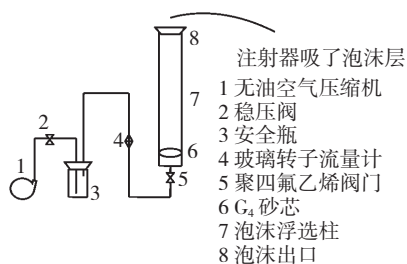


图1 泡沫分离装置示意图

Fig. 1 Diagrammatic sketch of foam separation apparatus

2 实验方法

2.1 初提液的制备^[6]

称取 40 g 于 60 °C 下烘干至恒重的枸杞样品,加 1000 mL 水浸泡,充分吸胀后以胶体磨打成匀浆,在 70 °C、超声功率为额定功率 80% 的条件下提取 60 min 后,经 3000 rpm 转速离心 10 min,真空抽滤,滤渣经二次提取后合并滤液得初提液,冷藏备用。

2.2 泡沫分离

将初提液以一定倍数稀释后进行泡沫分离。浮选结束后吸取泡沫层,量取液层体积,分别测定泡沫层和液层中糖醛酸的含量,计算富集比和回收率。

$$\text{富集比 } E = C_f / C_0$$

$$\text{回收率 } R = (C_0 V_0 - C_w V_w) / C_0 V_0 \times 100\%$$

式中, C_f 为泡沫层浓度; C_0 为料液初始浓度; C_w 为液层浓度; V_0 为装液量(300 mL); V_w 为液层体积。

2.3 糖醛酸含量的测定

由于枸杞酸性多糖中存在半乳糖醛酸,因此,本实验可通过测定半乳糖醛酸的含量作为评价枸杞酸性多糖分离效果的指标^[7],半乳糖醛酸的含量采用间羟基联苯法^[8]测定。

将浮选后的泡沫层按一定的比例稀释定容至 25 mL,各取 1.00 mL 按标准溶液的显色方法测定糖醛酸的含量。得初提液中 $C_0 = 1.610 \text{ mg/mL}$,该枸杞中糖醛酸含量为 21.47%。

3 结果与分析

3.1 单因素试验

3.1.1 稀释倍数 n 对浮选效果的影响

分别取不同体积(300/ $n = 100$ 、60、50、30、20、15、10 mL)的初提液以蒸馏水稀释到 300 mL,装柱。控制表观气浮速率为 200 mL/min,浮选 60 min,结果见图 2。

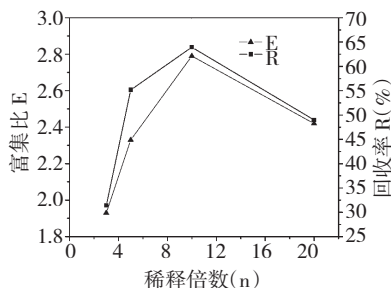


图2 稀释倍数对富集比和回收率的影响

Fig. 2 Effect of dilution times on enrichment ratio and recovery of LBP

随着初始料液浓度增大,在临界胶束浓度以上时,溶液的表面张力并没有太大变化,但高浓度溶液形成的泡沫小而密集,总的气液界面面积增大,且小泡沫在液相主体中的上升速度较慢,利于在泡沫上的吸附。此时泡沫相中小泡沫较稳定,不易发生聚集并破裂,使得泡沫的持液量增大,故回收率上升同时富集比下降。实验结果表明,稀释倍数小于 5 时,初始浓度太高,起泡性太强,不利于稳定分离;而稀释超过 20 倍时,溶液太稀,不能出泡。所以,稀释倍数选择 10 倍作为最佳条件。

3.1.2 浮选时间 t 对浮选效果的影响

取 30 mL 初提液加蒸馏水稀释到 300 mL($n = 10$),控制表观气浮速率为 200 mL/min,控制浮选时间为 30、60、90、120 min,结果见图 3。

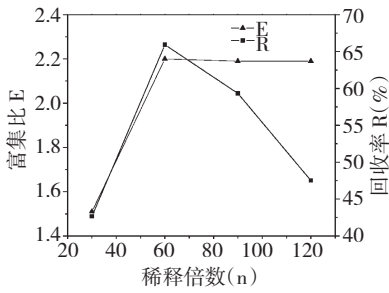


图3 浮选时间对富集比和回收率的影响

Fig. 3 Effect of floating time on enrichment ratio and recovery of LBP

浮选时间对酸性多糖在泡沫层和液层中的分配平衡有影响。由实验结果可看出,随着浮选时间的增加,富集比增加到一定程度不再上升,回收率呈现出峰值趋势。出现这一结果的原因可能为:时间过短,作为表面活性成分的酸性多糖在气液界面的平衡仍未建立,富集倍数逐渐升高液层浓度和泡沫产生量均升高,故而回收率增加;浮选时间太长,富集比趋于平稳,但泡沫稳定性降低,出现破泡, V_w 增加,回收率迅速下降。所以,浮选时间最佳水平选取 60 min。

3.1.3 表观气浮速率 G 对浮选效果的影响

取 30 mL 初提液加蒸馏水稀释到 300 mL ($n =$

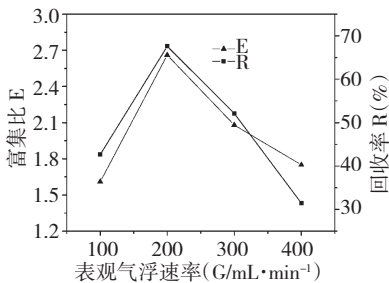


图4 表观气浮速率对富集比和回收率的影响

Fig. 4 Effect of superficial gas floating rate on enrichment ratio and recovery of LBP

10),控制表观气浮速率依次为 100、200、300、400 mL/min,浮选 60 min,结果见图 4。

表观气浮速率影响气泡的稳定性和泡沫层的高度,当气速比较低的时候,泡沫在塔中停留时间比较长,因此排液充分,出口持液量小,富集比大,回收率小。当气速增加后,泡沫在塔中停留时间减小,泡沫生成速率和上升速率都增加,而靠重力作用的泡沫间排液速率保持不变,导致排液不充分,大量液体被泡沫夹带,因此富集比降低,回收率增大。但气速过低,在 100 mL/min 以下时气泡量很少;在 400 mL/min 以上时示数及泡沫层高度不易稳定,且分离柱内溶液出现“返混”,富集比反而降低。故而选取 200 mL/min 作为最佳表观气浮速率。

3.2 RSM 试验设计

选择稀释倍数 10、浮选时间 60 min、表观气浮速率 200 mL/min 作为“0”水平,对各因素的试验水平分别以-1、0、1 进行编码(见表 1),共设计 15 个试验组,其中 12 个析因点为单因素取值在各因素所构成的三维顶点;3 个零点为区域的中心点,中心试验重复 3 次,用来估计试验误差。

表 1 各因素水平设计

Table 1 Factors and levels of the three investigated factors

编码 Code	因素 Factors	水平 Levels		
		-1	0	1
X_1	稀释倍数 Dilution times	5	10	15
X_2	浮选时间 Floating time (min)	30	60	90
X_3	表观气浮速率 Superficial gas floating rate (mL/min)	100	200	300

其中,对稀释倍数 n 、浮选时间 t 及表观气浮速率 G 作如下变换: $X_1 = (n-10)/5$, $X_2 = (t-60)/30$, $X_3 = (G-200)/100$ 。以 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量,以计算出的富集比(E)和回收率(R)作为响应值(Y_1 、 Y_2),试验方案及结果见表 2。

表 2 响应面设计及试验结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

试验组 No.	X_1	X_2	X_3	C_f (mg/mL)	C_v (mg/mL)	V_w (mL)	E	R (%)
1	-1	1	0	2.830	0.757	225	1.76	64.74
2	0	-1	1	2.785	0.876	248	1.73	55.02
3	-1	-1	0	2.654	0.723	240	1.65	65.07
4	1	-1	0	2.309	0.834	255	1.43	55.97

5	-1	0	-1	2.552	0.967	245	1.59	50.95
6	-1	0	1	2.759	0.675	235	1.71	67.16
7	0	0	0	5.909	0.489	205	3.67	79.25
8	0	-1	-1	3.060	1.026	258	1.90	45.20
9	1	1	0	2.660	0.866	255	1.65	54.28
10	1	0	-1	2.594	0.725	265	1.61	60.22
11	0	0	0	5.345	0.397	208	3.32	82.90
12	0	0	0	6.197	0.416	210	3.85	81.91
13	0	1	1	2.640	0.741	238	1.64	63.49
14	1	0	1	2.833	0.626	270	1.76	65.01
15	0	1	-1	1.085	0.735	260	1.82	60.43

运用 Design-Expert 软件进行拟合,由方差分析得到三个因素对富集比和回收率影响的回归方程分别为: $E = 3.61 - 0.033X_1 + 0.020X_2 - 0.010X_3 + 0.028X_1X_2 + 7.5 \times 10^{-3}X_1X_3 - 2.5 \times 10^{-3}X_2X_3 - 1.05X_1^2 - 0.94X_2^2 - 0.90X_3^2$; $R = 81.35 - 1.55X_1 + 2.71X_2 + 4.24X_3 - 0.34X_1X_2 - 2.85X_1X_3 - 1.69X_2X_3 - 8.27X_1^2 - 13.07X_2^2 - 12.25X_3^2$ 。

由回归方程看出,三个单因素与富集比和回收率均存在交互影响。对富集比 E, X_1X_3 和 X_2X_3 交互项系数很小,由表 3 给出的回归分析结果显示,响应值和全体自变量之间的线性相关系数 $R_1^2 = 8.96/$

$9.21 = 0.9728$,失拟值 $F > f_{0.01}(9,5) = 0.46$,高度显著,说明富集比有 97.28% 的变化来自稀释倍数 (n)、浮选时间 (t) 和表观气浮速率 (G),即三个因素对响应值的贡献度很高,可以很好地描述各因素与响应值之间的真实关系;对回收率 R,由表 4 得,线性相关系数 $R_2^2 = 1522.13/1709.17 = 0.8906$,失拟值 $F = 16.83$,显著性一般,说明除所分析的单因素外,存在其他不可忽略因素的影响。 $P < 0.05$ 时,该项的影响是显著的,仅二次项有显著性影响:其中, X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 项对富集比的影响是显著的,而 X_1^2 、 X_2^2 项对回收率的影响显著。

表 3 富集比的 Box-Behnken 试验设计回归分析结果

Table 3 ANOVA for response surface reduced quadratic model using LBP enrichment ratio as calculating index

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F 值 F value	p-value Prob > F	
Model	8.96	9	1.00	20.36	0.0020	Significant
X_1	8.45×10^{-3}	1	8.45×10^{-3}	0.17	0.6949	
X_2	3.2×10^{-3}	1	3.2×10^{-3}	0.065	0.8083	
X_3	8.0×10^{-4}	1	8.0×10^{-4}	0.016	0.9032	
X_1X_2	3.025×10^{-3}	1	3.025×10^{-3}	0.062	0.8135	
X_1X_3	2.25×10^{-4}	1	2.25×10^{-4}	4.6×10^{-3}	0.9486	
X_2X_3	2.5×10^{-5}	1	2.5×10^{-5}	5.11×10^{-4}	0.9828	
X_1^2	4.05	1	4.05	82.89	0.0003	
X_2^2	3.28	1	3.28	67.11	0.0004	
X_3^2	2.98	1	2.98	60.86	0.0006	
残差 Residual	0.24	5	0.049			
失拟项 Lack of Fit	0.099	3	0.033	0.46	0.7413	not significant
纯误差 Pure Error	0.15	2	0.073			
总值 Cor Total	9.21	14				

表 4 回收率的 Box-Behnken 试验设计回归分析结果

Table 4 ANOVA for response surface reduced quadratic model using LBP recovery as calculating index

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F 值 F value	p-value Prob > F	
Model	1522.13	9	169.13	4.52	0.0557	significant
X ₁	19.34	1	19.34	0.52	0.5043	
X ₂	58.75	1	58.75	1.57	0.2655	
X ₃	143.48	1	143.48	3.84	0.1075	
X ₁ X ₂	0.46	1	0.46	0.01	0.9158	
X ₁ X ₃	32.60	1	32.60	0.87	0.3934	
X ₂ X ₃	11.42	1	11.42	0.31	0.6043	
X ₁ ²	252.48	1	252.48	6.75	0.0484	
X ₂ ²	630.66	1	630.66	16.86	0.0093	
X ₃ ²	554.00	1	554.00	14.81	0.0120	
残差 Residual	187.04	5	37.41			
失拟项 Lack of Fit	179.91	3	59.97	16.83	0.0566	not significant
纯误差 Pure Error	7.13	2	3.56			
总值 Cor Total	1709.17	14				

3D surface 图是响应值对三个影响因子 X₁、X₂、X₃ 所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用,从三维空间点到底面的投影可得到椭圆形等高线图,而由等值线图可以看出试验最优化的条件应该在圆心处。根据回归方程得出不同因素的响应面分

析图及相应等高线图(图 5),可较为直观地看出各因素对富集比和回收率的影响为:G 对富集比的影响最大,n 的影响次之,t 的影响最小;n 对回收率的影响最大,G 的影响次之,t 的影响最小。回归分析结果也印证了图中给出的信息。

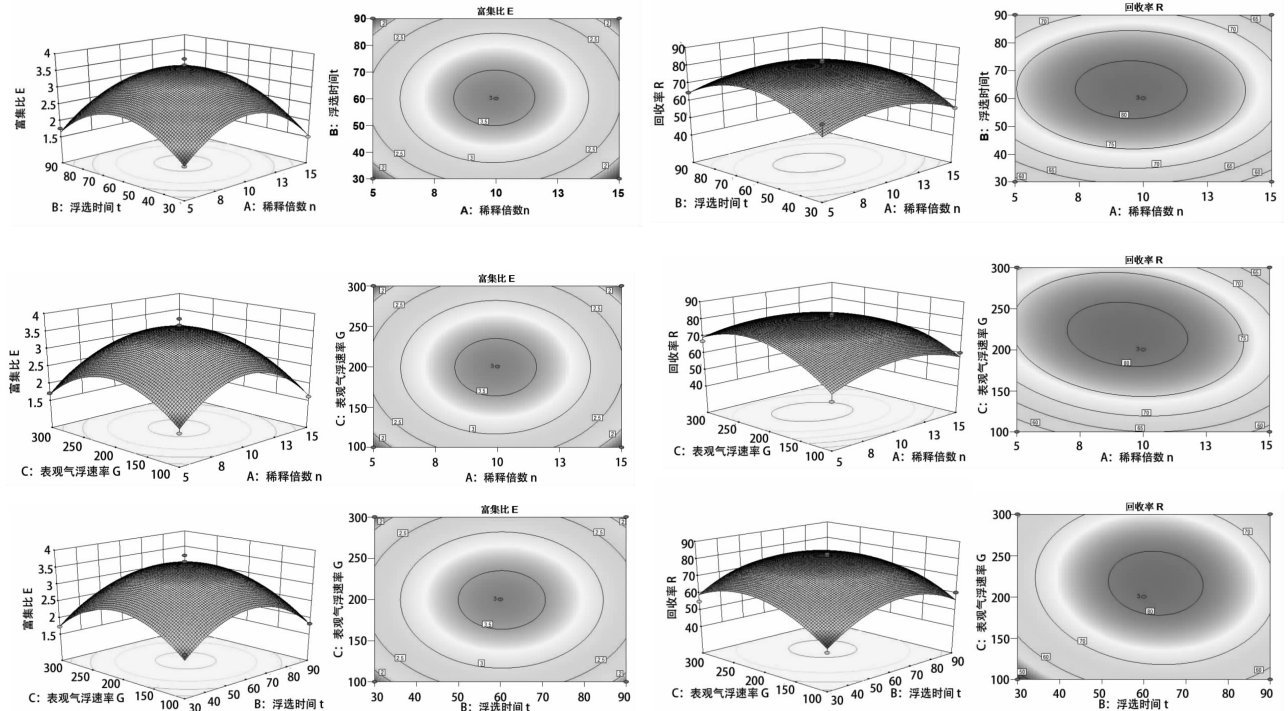


图 5 各因素交互影响的响应面图及相应等高线图

Fig. 5 Response surface plots and contour plots showing the effects of 3 factors on E and R values

设置三个单因素在所选区间浮动(in range),使响应值富集比和回收率最大(maximum)生成优化方案。由模型优化结果给出,当稀释倍数 $n = 10$,浮选时间 $t = 62 \text{ min}$,表观气浮速率 $G = 207 \text{ mL/min}$ 时,富集比和回收率可达到的理论最优值分别为3.605和81.76%,可信度(Desirability)达0.934,模型拟合结果较好。

3.3 验证试验

按照响应面分析的结果,对所考察的三个因素进行优化优化后,量取得到液层体积为205 mL,泡沫层糖醛酸含量为 $C_f = 6.128 \text{ mg/mL}$,液层浓度为 $C_v = 0.413 \text{ mg/mL}$ 。从而得到富集比 $E = 3.81$,回收率 $R = 82.47\%$ 。

4 结论

Box-Behnken Design 设计对枸杞酸性多糖的泡沫分离的优化结果显示,选定的三个单因素最佳水平依次为:稀释倍数为10、表观气浮速率为207 mL/min,浮选时间为62 min,得到的富集比和回收率最高,分别为3.61和81.76%,验证试验结果分别为3.81和82.47%,与预测值的相对误差分别为5.5%和0.87%,验证结果与理论值较为接近,该设计模型的拟合分析符合实际,具有较好的可行性。本方法工艺流程简单,操作方便,未添加其他有机试剂,多糖得率高。因此,泡沫分离法为枸杞酸性多糖的分离纯化工艺提供了新的思路。

参考文献

- Luo Q(罗琼), Yan J(闫俊), Li JW(李瑾玮), et al. Effect of *Lycium barbarum* L. and its polysaccharides on decreasing serum lipids in rabbits. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 1997, 19:415-418.
- Zhi F(植飞), Zheng WP(郑卫平), Chen P(陈平), et al. Study on the extraction process of polysaccharide from *Lycium barbarum*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27:948-950.
- Zhou YX(周艳霞), Tang ML(唐明林), Yin HA(殷辉安), et al. Extraction and content determination of polysaccharides from *Poria cocos*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15:330-333.
- Deng X(邓修). The progress of foam adsorption separation technology. *Petrochem Technol* (石油化工), 1984, 13:627-635.
- Yin G(殷钢), Zhou R(周蕊), Li C(李琛), et al. Separation of carbohydrate-protein mixture by foam fractionation. *Chem Eng* (化学工程), 2000, 28(6):34-37.
- Wang HY(王航宇), Liu JR(刘金荣), Dan JM(但建明), et al. The ultrasonic extraction and content determination of LBP in Xinjiang. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25:42-43.
- Xiong SL(熊双丽), Li AL(李安林). Progress in acidic polysaccharide. *Food Sci Tech* (食品科技), 2010, 35(5):80-83.
- Xu HS(许会生), Zhang TJ(张铁军), Zhao GR(赵广荣), et al. Determination of uronic acid and neutral sugar in acidic polysaccharides content of improved methods. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2007, 28:197-199.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, Appendix 63.
- Legault J, Pichette A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59:1643-1647.
- Sköld M, Karlberg AT, Matura M, et al. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44:538-545.
- Gertsch J, Leonti M, Raduner S, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:9099-9104.
- Xie JC, Sun BG, Yu M. Analysis of volatiles in the leaf and stem of fragrant plant *Vitex negundo* L. var. *heterophylla* (Franch.) Rehd. *Food Ferment Ind*, 2005, 31:100-103.
- Xie JC, Sun BG, Zheng FP, et al. Components of extract from leaf or stem of *Vitex negundo* L. var. *heterophylla* (Franch.) Rehd. by supercritical CO₂ fluid. *Food Sci*, 2005, 26:281-283.
- Sun LY, Wang SZ, Yang BC. Research note of essential oil composition of *Vitex negundo* var. *heterophylla*. *Practical Forestry Technol*, 1990, (2):30-31.
- Liu XB, Cao H, Tian GH. Study on essential oil obtained from seeds of wild *Vitex negundo* var. *heterophylla*. *Amino Acids Biotic Resour*, 2010, 32:75-78.

(上接第885页)