

文章编号:1001-6880(2015)1-0109-05

响应面法优化太白贝母粗多糖超声波提取工艺研究

陈林^{1,2},韩林¹,周浓^{1,2*},李花³,詹莉娟¹¹重庆三峡学院生命科学与工程学院; ²重庆市食品基础实验教学中心,重庆 404100; ³广西大学化学化工学院,广西 531499

摘要:对太白贝母粗多糖提取工艺的研究,为太白贝母的深入综合利用提供依据。采用超声波提取太白贝母粗多糖,在单因素试验基础上,利用响应面法对提取工艺参数进行优化研究。建立料液比、时间、超声温度之间的数学模型,通过典型性分析得出最优工艺条件为:提取时间为 16 min,提取温度 75 ℃,料液比为 1:15,总糖的含量为 0.461%。试验表明,响应面法对太白贝母粗多糖提取条件的优化是可行的,可用于实际预测。

关键词:太白贝母;粗多糖;超声波提取;响应面分析

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.023

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Crude Polysaccharide from *Fritillary taipaiensis P. Y. Li* Using Response Surface Methodology

CHEN Lin^{1,2}, HAN Lin¹, ZHOU Nong^{1,2*}, LI Hua³, ZHAN Li-juan¹¹College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China; ²Biotechnology and Food Basic Experimental Teaching Center (Municipal Experimental Teaching Demonstration Center), Chongqing 404100, China;³School of Chemistry & Chemical Engineering, Guangxi University, Guangxi 531499, China

Abstract: The aim of this study was to optimize the extraction process of crude polysaccharide from *Fritillary taipaiensis P. Y. Li* (FTP). On the basis of single factor experiments with the method of ultrasonic-assisted extraction, extraction parameters was investigated using response surface methodology. A mathematical model including solid/liquid ratio, ultrasonic time and extraction temperature was created. By typicality analysis, the optimized extraction conditions were as follows: ultrasonic time of 16 min, extraction temperature of 75 ℃ and solid/liquid ratio of 1:15 (g/mL). Under the optimized conditions, the extraction yield of crude polysaccharide was determined to be 0.461%. The results showed that the optimization process using response surface methodology was feasible. It can be used in practical forecasting.

Key words: *Fritillary Taipaiensis P. Y. Li*; crude polysaccharide; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

太白贝母,多年生草本,为百合科植物太白贝母 *Fritillary taipaiensis P. Y. Li* 的鳞茎^[1]。贝母具有化痰、润肺、止咳功效。太白贝母长期作为川贝母使用,其地理分布、植物形态、有效成分与川贝母无明显差异^[2]。贝母作为药食同源植物具有一定的保健作用。多糖化合物广泛存在于中药中,生物类多糖在抗肿瘤、抗衰老等方面发挥着重要的生物活性^[3]。随着市场需求的增长,野生贝母资源已面临枯竭,而太白贝母栽培技术成熟并有一定规模,具有较高的研究空间。

超声波提取法最大优点是节约能源和时间。它

利用超声波的空化效应^[4],使植物活性成分在不被破坏的情况下溶出,且体系温度不会大幅度升高。响应面分析方法 (Response Surface Methodology, RSM) 是一种优化工艺条件的有效方法^[5,6],可用于确定各种因素及其交互作用在工艺过程中对指标(响应值)的影响,精确的表述因素和响应值之间的关系。本试验以太白贝母为研究对象,在单因素试验基础上,运用响应面法优化超声波提取太白贝母粗多糖,为深层次开发利用当地贝母资源提供试验和理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料、药品及仪器

太白贝母:重庆巫溪地区采集鲜品,经成都中医药大学中药材标准化教育部重点实验室王光志副教

收稿日期:2014-07-14 接受日期:2014-10-29

基金项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(CSTC2013JCYJA10120);

2014 年重庆三峡学院科学研究青年项目(14QN26)

*通讯作者 Tel:86-013896357862; E-mail:erhaizn@126.com

授鉴定为百合科植物太白贝母 *F. taipaiensis* 的干燥鳞茎; 葡萄糖标准品: 上海一基生物试剂有限公司; 石油醚、无水乙醇、95% 乙醇、氯仿、正丁醇、葱酮、浓硫酸均为分析纯。

UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司), CP225D 型分析天平(德国 Sartorius 公司), SB 25-12DTW 超声波提取机(宁波新基生物科技股份有限公司), FA1004 万分之一天平(上海市舜宇恒平科学仪器有限公司), TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(赛特湘仪离心机仪器有限公司), 101 FAR-1 型电热鼓风干燥箱(黄骅市卸甲综合电器厂), IKA HB10 basic 旋转蒸发仪。

1.2 试验方法

1.2.1 太白贝母粗多糖的提取

太白贝母粗多糖的提取流程:

样品处理→脱脂→过滤、烘干、称量→超声提取→离心分离→上清液浓缩→Sevage 法脱蛋白离心分离→乙醇沉淀多糖→离心分离→风干→粗制多糖

1.2.2 葱酮硫酸法测定多糖的含量

多糖的提取率% = (太白贝母粗多糖质量/贝母样品质量) × 100 %

1.2.3 太白贝母粗多糖提取温度的选择

精确称取 6.0 g 太白贝母干粉 6 份, 料液比为 1:15, 考察提取温度(50、60、70、80、90、100 °C)条件下超声辅助提取 15 min, 过滤, 滤液浓缩干燥后称重, 计算多糖提取率。

1.2.4 太白贝母粗多糖提取时间的选择

精确称取 6.0 g 太白贝母干粉 6 份, 在料液比为 1:15, 温度 80 °C 的条件下, 考察提取时间(5、10、15、20、25、30 min), 过滤, 滤液浓缩干燥后称重, 计算多糖提取率。

1.2.5 太白贝母粗多糖提取料液比的选择

精确称取 6.0 g 太白贝母干粉 6 份, 在提取时间为 15 min、提取温度 80 °C 的条件下, 考察料液比

(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35)过滤, 滤液浓缩干燥后称重, 计算多糖提取率。

1.2.6 太白贝母粗多糖提取工艺的响应面法优化^[7,8]

在单因素试验的基础上分别以提取温度、时间及料液比 3 因素为考察对象, 以多糖提取率为响应值, 采用响应分析进行提取条件的优化。

1.2.7 可见光分光光度法标准曲线的制备

选用葡萄糖标准品在 480 nm 波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。回归方程为 $Y = 0.732287X + 0.03176, R = 1.000$ 。

1.2.8 统计学分析

使用 SAS9.0 统计软件对试验数据进行回归分析, 每组试验均重复三次, 预测贝母粗多糖提取的最优工艺参数和进行试验验证。

2 结果与分析

2.1 提取温度、提取时间及料液比对太白贝母粗多糖提取率的影响

图 1 为不同温度、时间及料液比下太白贝母粗多糖提取率。在料液比 1:15、水提时间 15 min、80 °C 时太白贝母粗多糖提取率较高(A)。一般来说, 升温有利于获得较高的提取率, 但温度超过 80 °C, 糖链断裂导致多糖降解。综合考虑, 选择 70~80 °C 为宜。

水浴温度 80 °C, 料液比 1:15, 随着超声波提取时间的延长, 太白贝母粗多糖提取率呈先增加后下降趋势(B)。由于短时间内超声波对细胞的破坏作用较大, 多糖溶出较多, 所以提取率高。当提取时间超过 15 min, 粗多糖溶解度趋于饱和, 多糖提取率逐渐下降。随着超声时间的延长, 细胞进一步破裂, 溶解的杂质也会相应增多。因此, 选取 15~20 min 为宜。

水浴温度为 80 °C, 水提时间 15 min 的条件下, 当料液比从 1:5 提高到 1:20 时, 提取率从 2.5% 升

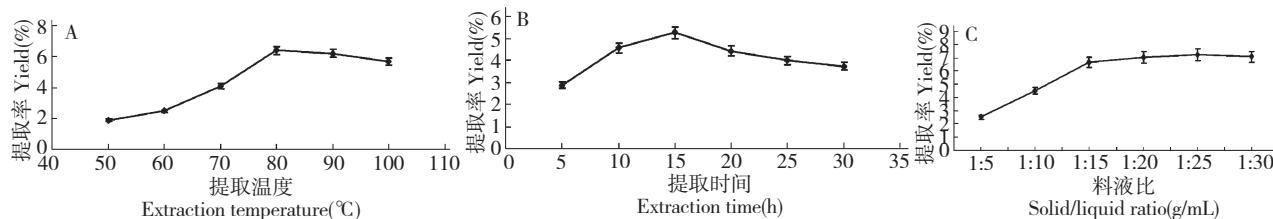


图 1 提取温度(A)、提取时间(B)及料液比(C)对提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature (A), time (B) and solid/liquid ratio (C) on the extraction yield of crude polysaccharide

高到 7.2%, 再提高比例则提取率升幅趋缓(C)。可能是少量溶剂很快被渗出的多糖饱和, 扩散推动力减小; 当溶剂量足够大时, 对超声波的提取基本无阻碍, 提取率显著增加。

2.2 响应面法分析优化试验

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 在单因素试验基础上, 确定中心组后试验的因素和

方法, 以粗多糖得率为响应值。超声辅助提取贝母粗多糖的响应面试验的 3 因素 5 水平提取条件(表 1)进行优化试验设计与结果(表 2)SAS9.2 统计软件对试验数据进行回归分析, 回归模型的方程为:

$$Y = 0.438012 + 0.080932X_1 + 0.086891X_2 + 0.126704X_3 - 0.110039X_1X_1 - 0.075852X_1X_2 - 0.073539X_2X_2 - 0.074441X_1X_3 - 0.056801X_2X_3 - 0.166039X_3X_3$$

表 1 太白贝母粗多糖提取响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of central composite test on extraction of polysaccharide

水平 Level	因素 Factor		
	X ₁ 提取温度 Extraction temperature(°C)	X ₂ 提取时间 Extraction time(min)	X ₃ 料液比 Solid/liquid ratio(g/mL)
1.68	76.8	23.4	1:23.4
1	70	20	1:20
0	60	15	1:15
-1	50	10	1:10
-1.68	43.2	6.6	1:6.6

表 2 太白贝母粗多糖提取响应面试验设计方案及结果

Table 2 Experimental design and result of central composite test on extraction of polysaccharide

组别 Group	X ₁	X ₂	X ₃	粗糖含量 PTF content(%)
1	1	1	1	0.458
2	1	1	-1	0.285
3	1	-1	1	0.461
4	1	-1	-1	0.187
5	-1	1	1	0.378
6	-1	1	-1	0.290
7	-1	-1	1	0.253
8	-1	-1	-1	0.105
9	1.68	0	0	0.432
10	-1.68	0	0	0.258
11	0	1.68	0	0.471
12	0	-1.68	0	0.292
13	0	0	1.68	0.392
14	0	0	-1.68	0.186
15	0	0	0	0.377
16	0	0	0	0.473
17	0	0	0	0.446
18	0	0	0	0.450

对该模型的方差分析(表 3)。从此模型的方差

分析表可知, 响应面回归模型达到极显著水平($P =$

$0.0002 < 0.01$), 复相关系数 R^2 为 0.9541, 说明该

二次模型能够拟合真实的试验结果, 试验误差小。

表 3 回归方程的方差分析表

Table 3 Analysis of variance of the regression model

自由度 DF	平方和 Of Squares	复相关系数 R-squares	F 值 F value	P 值 P value
3	0.145778	0.6482	37.65	<0.0001
3	0.054214	0.2411	14.00	0.0015
3	0.015483	0.0648	3.77	0.0593
9	0.214576	0.9541	18.47	0.0002

从二次多项式回归模型系数的显著性检验结果(表4)可知, 在所选的各因素水平范围内, 对结果影响因素大小顺序为: 提取温度 > 提取时间 > 料液比。

其中, X_1 、 X_2 、 X_1X_1 、 X_3X_3 对 Y 的影响极显著, X_2X_2 对 Y 的影响显著, X_3 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 对 Y 的影响不显著。

表 4 二次多项式回归模型系数的显著性检验结果

Table 4 Regression coefficients of predicted quadratic polynomial model

参数 Parameter	自由度 DF	估计值 Estimate	标准差 Standard error	T 值 T value	P 值 P value
截距 Intercept	1	-2.590100	0.539852	-4.80	0.0014
X_1	1	0.051753	0.013317	3.89	0.0046
X_2	1	0.085936	0.021012	4.09	0.0035
X_3	1	0.066104	0.021012	3.15	0.0137
X_1X_1	1	-0.000390	0.000101	-3.85	0.0048
X_1X_2	1	-0.000538	0.000254	-2.12	0.0672
X_2X_2	1	-0.001042	0.000405	-2.58	0.0328
X_1X_3	1	0.000528	0.000254	2.08	0.0715
X_2X_3	1	-0.000805	0.000508	-1.58	0.1517
X_3X_3	1	-0.002353	0.000405	-5.82	0.0004

利用 SAS 绘制各种因子对得率的响应面和等高线图, 结果见图 2。等高线的性状可以反映出交互效应的强弱大小, 圆形表示两交互作用不显著, 椭圆形表示两者交互作用显著。

图(a)表明了料液比取中心水平时, 提取温度与超声波提取时间对太白贝母粗多糖得率的交互作用。在试验水平范围内, 提取温度与提取时间之间的交互作用显著。随着提取温度的增加贝母粗多糖得率呈先增加后逐渐减小的趋势, 超声时间较短时提取温度的影响显著, 表现为先增加后减小的过程。在超声时间较长时提取温度对贝母粗多糖的得率影响不大。图(b)可知, 试验范围内贝母粗多糖得率随着提取时间和料液比的增加呈现出迅速增加后逐渐减小的情况, 在低水平区两者的交互作用对贝母

粗多糖得率的影响高于两者高水平区。图(c)显示等高线的形状趋近于圆形, 说明了提取温度与料液比之间的交互作用较不显著, 在试验范围内随着料液比的增加太白贝母提取率呈先增加后缓慢减小的趋势。

根据 Box-Behnken 试验所得到的数据结果和回归方程, 用 SAS9.2 统计软件对试验数据进行回归分析响应值最大时, 提取温度、提取时间、料液比对应的编码值分别为 $X_1 = 0.312945$ 、 $X_2 = 0.003718$ 、 $X_3 = 0.234869$ 实际值为: 提取温度 75.3 °C, 提取时间为 15.8 min, 料液比为 1:15.4。为实际操作方便选取提取温度 75 °C, 提取时间 16 min, 料液比 1:15。

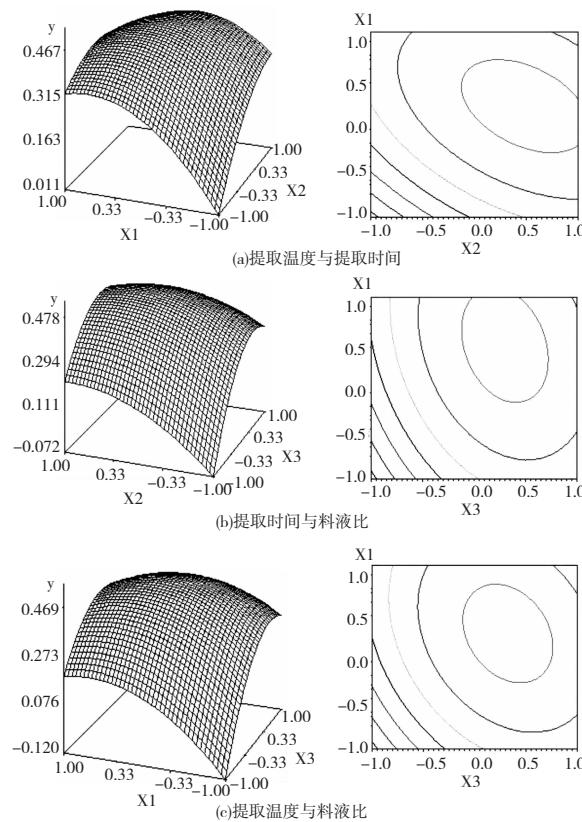


图 2 因素交互作用对太白贝母粗多糖提取率影响的响应曲面和等高线

Fig. 2 Response surface plots showing the effects of extraction parameter on the extraction yield of FTP

3 结论

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 在单因素试验基础上采用 3 因素 5 水平的相应面分析方法对太白贝母粗多糖提取工艺进行了优化, 取得了较好的试验效果。结果显示贝母粗多糖提取的最佳提取工艺参数为: 提取温度 75 ℃, 提取时间为 16 min, 料液比为 1: 15, 总糖的含量为 0.461%。同时得到太白贝母粗多糖提取率与各因素变量的二次多项式回归方程, 该模型回归显著, 具有实际应用价值。

参考文献

- Wang L(王丽), Peng R(彭锐), Li LY(李隆云). Research advances in *Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2001, 39: 22309-22310.
- Liu H(刘辉), Chen SL(陈士林), Yao H(姚辉), et al. Research progress on resources in Bulbus Fritillariae Cirrhosae. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 1645-1648.

- Ding BJ(丁保金), Jin LQ(金丽琴), Lv JX(吕建新). Advance in the biological of polysaccharides. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39: 561-563.
- Hu AJ(胡爱军), Qiu TQ(丘泰球). Physical enhancement extraction and application of new technologies. *Anhui Chem* (安徽化工), 2002, (1): 26-29.
- Li QH, Fu CL. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chem*, 2005, 92: 701-706.
- Mao SS(茆诗松), Wang JL(王静龙), Shi DH(史定华), et al. Statistics Hand Book (统计手册). Beijing: Science Press, 2003. 78-86.
- Han L(韩林), Zhang HD(张海德), Li GS(李国胜), et al. Optimization of extraction technology and antioxidant activities of total phenom from betel nut seed. *Agric Mach*(农业机械学报), 2010(4): 134-139.
- Xiong JH(熊建华), Wu Q(吴琴), Lin LP(林丽萍), et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction techniques camphor seed oil by using response surface methodology. *J Chin Cel Oils Ass*(中国粮油学报), 2013, 28(3): 65-69.