

响应面法优化核桃青皮粗多糖超声提取工艺研究

陆 娟, 常 清 泉, 王 思 齐, 朱 媚, 孙 亚 力, 曲 堂 璐

(长春师范大学 化学学院, 吉林 长春 130031)

摘 要:以核桃青皮为试材,以核桃青皮粗多糖得率为响应值,在单因素试验的基础上,采用 3 因素 3 水平响应面分析法,研究超声提取因素对核桃青皮粗多糖得率的影响,确定核桃青皮粗多糖超声提取工艺。结果表明:核桃青皮超声最佳提取条件为超声功率比 60%、提取时间 30 min、温度 60℃,在该条件下核桃青皮粗多糖的提取得率为 15.09%。

关键词:核桃青皮;多糖;超声提取;响应面分析

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)22-0125-05

核桃青皮为核桃未成熟的果皮^[1],又因《山东中草药手册》中称胡桃科胡桃属植物胡桃(*Juglans mandchurica* Maxim.)和胡桃楸(*Juglans regia* L)为青龙衣,此后多用此名。青龙衣辛、苦、涩、平、有毒、微寒^[2],可清热解毒、祛风疗癣、止痛止痢,且能明目、抗肿瘤^[3],临床用于治疗胃溃疡、子宫脱垂、白细胞减少等症,在民间常用作治疗各种癌症、皮肤病以及各种疼痛的止痛药^[4-5]。据文献报道青龙衣主要含有萜醌及其苷类、黄酮及其苷类、二芳基庚烷类和多糖等化合物,其有效活性成分为胡桃醌、粗萜醌、鞣花酸和核桃多糖等,其中以萜醌及其苷类化合物的含量最高^[1]。

目前,多糖提取的方法有很多,例如热回流提取法、微波提取法、超声波提取等。超声波具有热特性、非热特性、高频性和波动性四大特点,因此超声波提取具有操作时间短、受热均匀、试剂用量少、易于控制等特点,是一种高效可行的提取方法^[6]。

该研究以核桃青皮为原料,利用响应面法对核桃青皮粗多糖的超声提取工艺条件进行了优化,以期为废弃生物资源的充分利用提供一种有效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试用核桃青皮采自吉林省安图县山区。石油醚、无水乙醇、葡萄糖、浓硫酸、苯酚均为分析纯。

HH-6 型恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司);UV-2450 型紫外-可见分光光度计(岛津仪器(苏州)有限

公司);FA/JA 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);SL-2010N 超声波信号发生器(SL-2010N 超声波信号发生器最大功率为 1 500 W,南京顺流仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 核桃青皮粗多糖的提取及样品溶液的制备 准确称取经石油醚脱脂的核桃青皮粉末,按照 1:50 g/mL 料液比加入蒸馏水,在设定的超声波功率及温度下提取一定的时间,离心,取上层清液,浓缩至一定体积,加 3 倍无水乙醇室温下醇沉 24 h、离心得沉淀;脱水、干燥得粗多糖。分别取适量粗多糖粉末,加一定量的蒸馏水于容量瓶中并定容,配成样品液,备用。

1.2.2 标准曲线的绘制 精密移取 0.25 mg/mL 葡萄糖标准液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 于 25 mL 具塞刻度试管中,以苯酚硫酸法,按照参考文献[6-9]制备标准曲线,得线性回归方程 $A = 5.3417C + 0.4727$,相关系数 $R^2 = 0.9948$,其中 C 是多糖浓度($\mu\text{g/mL}$), A 为吸光度,线性范围 50~450 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.3 单因素试验 提取时间对粗多糖得率的影响:选择提取时间分别为 0、20、30、40、50 min,提取温度 50℃,超声功率比 50%,考察不同提取时间对核桃青皮粗多糖提取率的影响。提取温度对粗多糖提取率的影响:选择提取温度分别为 40、50、60、70、80℃,提取时间 30 min,超声功率比 50%,考察不同提取温度对核桃青皮粗多糖提取率的影响。提取功率比对粗多糖提取率的影响:选择超声功率比 30%、40%、50%、60%、70%,提取时间 30 min,提取温度 50℃,考察不同功率比对粗多糖提取率的影响。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素的试验基础上,采用用 Box-Behnken Design 试验设计方案,以超声时间(X_1)、超声温度(X_2)、超声波功率比(X_3)为考察变量,以核桃青皮粗多糖得率(Y)为响应值,应用 Design-Expert 6.0 软件,建立数学回归模型,确定核桃青皮粗多糖的最

第一作者简介:陆娟(1982-),女,博士,副教授,研究方向为天然有机化学。E-mail:ljjuan0626@aliyun.com

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术资助项目(吉教科合字[2013]第 255 号)。

收稿日期:2015-07-30

表 1 试验因素水平及编码

Table 1 Variables and levels in central composite design

因变量 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
X ₁ 超声时间 Ultrasonic time/min	25	30	35
X ₂ 超声温度 Ultrasonic temperature/℃	55	60	65
X ₃ 超声功率比 Ultrasonic power ratio/%	50	60	70

佳超声提取工艺。试验因素和水平见表 1。

1.2.5 双因子交互分析 响应面图形是响应值 Y 对应于试验因素 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维空间的曲面图,响应面图可以直观的反映各因素及它们之间的交互作用对响应值的影响。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声时间对核桃青皮多糖提取率的影响 由图 1 可知,随着超声时间的延长,核桃青皮粗多糖提取率逐渐增加,当超声时间超过 30 min 时,再增加超声时间,提取率反而减小。这可能是由于浸泡时间较长,核桃青皮提取液中多糖含量较高,而超声波的时间过长,可能会诱导部分多糖的降解^[7-8],多糖的提取率会随着超声时间的延长而降低。有研究学者认为这部分多糖可能更多的解聚成一些游离的小分子糖^[10]。因此,最佳提取时间是 30 min。

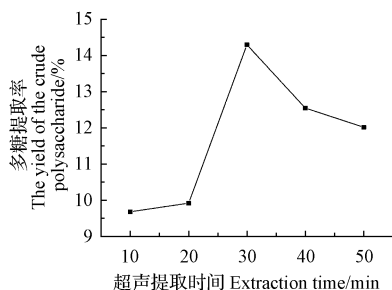


图 1 超声提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 1 The influence of extraction time on the yield of the crude polysaccharide

2.1.2 超声温度对核桃青皮多糖提取率的影响 由图 2 可知,在 40~60℃ 范围内,随着温度的升高,多糖提取率也逐渐增加,当温度为 60℃ 时最大,再增加温度,提取率反而减小。温度的影响可以解释为在较高的温度下溶剂中多糖具有较高的溶解度和扩散性。但是温度过高,部分多糖会发生水解,水解为单糖或低聚糖,从而使多糖的提取率下降。此外过高的温度会导致表面张力降低,增加微气泡,导致提取率的降低^[11]。因此,最佳提取温度是 60℃。

2.1.3 超声提取功率比对核桃青皮多糖提取率的影响 由图 3 可知,随着提取功率的增大,粗多糖提取率也增大,当超声功率为 60% 时最大,再增加超声功率,

提取率反而减小,其原因可能是由于超声功率的增大,较多的多糖可以渗透细胞膜进入细胞和溶剂^[9],因此增加超声功率可以提高提取率。然而,过高的功率比会引起溶剂的剧烈沸腾,这可能会降低超声能量传播到介质中的效率。同时,高强度超声也造成多糖解聚、聚合和粘度降低,这将导致提取率减少^[11]。因此,最佳超声功率比为 60%。

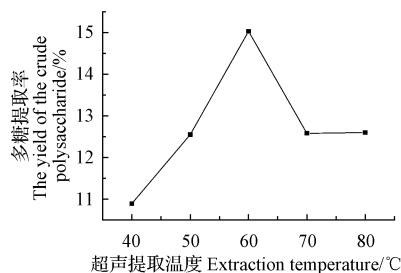


图 2 超声提取温度对多糖提取率的影响

Fig. 2 The influence of extraction temperature on the yield of the crude polysaccharide

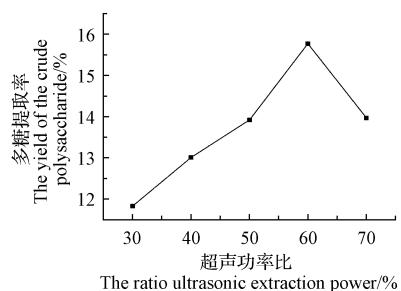


图 3 超声提取功率比对多糖提取率的影响

Fig. 3 The influence of the ratio ultrasonic extraction power on the yield of the crude polysaccharide

2.2 响应面试验分析结果

2.2.1 响应面试验结果 根据单因素试验结果,选择超声时间(X_1)、超声温度(X_2)以及超声功率比(X_3)3 个因素,以核桃青皮粗多糖提取率(Y)为响应值进行优化,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,设计 3 因素 3 水平的试验方案,试验结果见表 2。

2.2.2 多元二次响应面回归模型的建立与分析 通过 SAS 数据分析软件对表 2 中的响应面试验结果进行回归分析,以核桃青皮粗多糖的提取率(Y)为因变量,超声时间(X_1)、提取温度(X_2)以及超声功率(X_3)为自变量,进行回归拟合,得到回归方程: $Y(\%) = 14.88 + 0.37X_1 + 0.15X_2 + 0.24X_3 - 1.48X_1^2 - 2.04X_2^2 - 0.84X_3^2 - 0.70X_1X_2 + 0.69X_1X_3 - 1.21X_2X_3$ 。对上述回归模型进行 F 检验,判定回归方程中各变量对响应值影响的显著性,概率越小,则相应变量的显著程度越高。由方差分析表 3 可以看出,模型 $F=10.87$, $P=0.0024$ 差异有统计学意义,说明建立的模型极显著 ($P <$

表 2 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 2 Box-Behnken design matrix and response values

试验编号 No.	X ₁ 超声时间 Ultrasonic time /min	X ₂ 超声温度 Ultrasonic temperature /℃	X ₃ 超声功率比 Ultrasonic power ratio /%	Y 得率 Yield /%
1	1.00	-1.00	0.00	14.04
2	1.00	0.00	1.00	14.52
3	1.00	1.00	0.00	10.58
4	1.00	-1.00	0.00	12.09
5	0.00	-1.00	-1.00	10.52
6	-1.00	-1.00	0.00	10.75
7	0.00	1.00	1.00	11.07
8	0.00	1.00	-1.00	13.63
9	0.00	0.00	0.00	15.10
10	-1.00	0.00	1.00	11.59
11	-1.00	1.00	0.00	12.05
12	0.00	0.00	0.00	15.10
13	0.00	0.00	0.00	15.08
14	1.00	0.00	-1.00	11.98
15	0.00	-1.00	1.00	12.80
16	0.00	0.00	0.00	15.08
17	1.00	0.00	-1.00	12.16

0.01);失拟项 $F=0.75$,失拟项相对于绝对误差不显著,说明模型的拟合程度良好,未知因素对试验结果干扰很小。模型 $R^2=0.933\ 2$, $\text{Adj } R^2=0.847\ 4$,表明模型与实际试验拟合较好,试验误差较小,可以用此模型对核桃青皮粗多糖的超声提取进行分析和预测。对回归方程系数进行显著性检验,表明超声时间、超声温度及超声功率比(X_1 、 X_2 、 X_3)对核桃青皮粗多糖的提取率影响均不显著,而超声时间二次项、超声温度二次项、超声功率二次项、超声温度与超声功率比交互作用(X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_2X_3)对核桃青皮粗多糖提取率有显著影响。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Result of analysis of variance

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型	43.94	9	4.88	10.87	0.002 4	显著
X ₁	1.11	1	1.11	2.47	0.159 9	
X ₂	0.17	1	0.17	0.38	0.558 6	
X ₃	0.36	1	0.36	0.80	0.402 2	
X ₁ ²	9.19	1	9.19	20.47	0.002 7	显著
X ₂ ²	17.44	1	17.44	38.83	0.000 4	显著
X ₃ ²	2.97	1	2.97	6.62	0.036 9	显著
X ₁ X ₂	1.97	1	1.97	4.40	0.074 2	
X ₁ X ₃	1.89	1	1.89	4.21	0.079 3	
X ₂ X ₃	5.86	1	5.86	13.04	0.008 6	显著
残差	3.14	7	0.45			
失拟	2.26	3	0.75	3.42	0.133 1	不显著
误差	0.88	4	0.22			
总和	47.08	16				

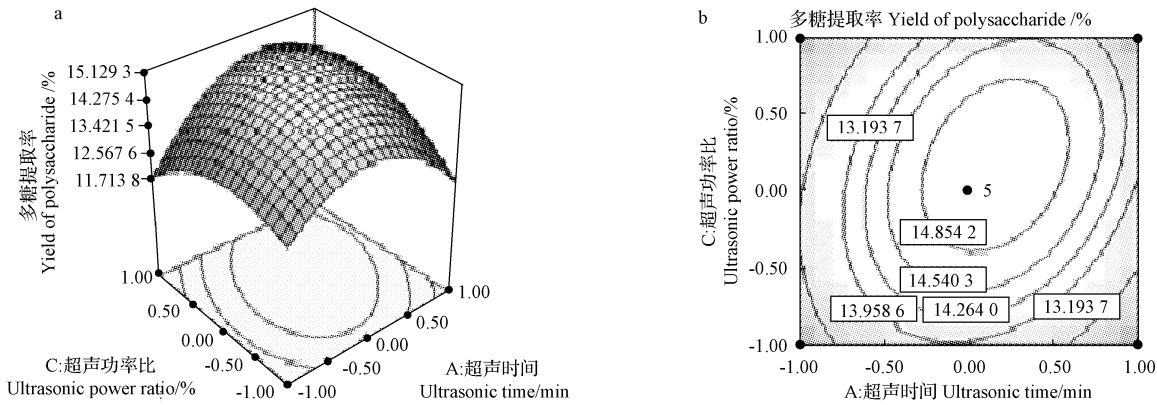
相关系数(R^2)=0.933 2,校正系数($\text{Adj } R^2$)=0.847 4

注: $P<0.01$,差异极显著; $P<0.05$,差异显著。
Note: $P<0.01$,highly significant difference; $P<0.05$,significant difference.

2.3 双因子间交互影响分析

2.3.1 超声功率比和超声时间对多糖提取率的影响

图 4 中的 a 和 b 是根据回归方程所绘制的三维(3D)响应面图和二维(2D)等高线生成的模型图,它们能直观准确地描述 2 个变量因素之间对响应值的交互作用。并且不同形状的轮廓图表示不同变量之间的相互作用,一个椭圆的等高线表示变量之间的交互关系。图 4 中的 a 和 b 显示了在固定温度 60℃时,超声波功率(X_3)和提取时间(X_1)对多糖提取率的影响。可以看出,在 30%~60%范围内,随着超声波功率(X_3)增加提取率也相应增加,但超声波功率超过 60%,提取率迅速下降。在 10~30 min 范围内,逐渐增加萃取时间,多糖提取率



注:(a)三维(3D)响应面,(b)二维(2D)等高线。下同。

Note:(a) is the 3D response surface,(b) is the 2D contour line. The same below.

图 4 超声波功率比和提取时间对粗多糖提取率影响

Fig. 4 The influence of ultrasonic power ratio and ultrasonic time on crude polysaccharide extraction rate

也相应增加,而 30~50 min 范围内,随着提取时间延长,多糖得率逐渐下降。这种现象可能由于超声波功率促进对植物真菌组织和细胞壁的破坏。超声波功率越高,多糖透过细胞膜进入细胞和溶剂就越多,因此增加超声波功率可以提高提取得率。然而,过高的功率会引起溶剂的剧烈沸腾,这可能会降低超声波能量传播到介质中的效率^[13]。同时,高强度超声波也造成多糖解聚^[13]、聚合^[14]和粘度降低,这将导致多糖的提取得率下降。随着提取时间的延长,所有的植物细胞将被完全地分解,提取得率也逐渐增加。然而,当植物细胞破裂,各种化合物如不溶性物质和细胞溶质会悬浮在萃取液中,因此也会降低溶剂的渗透率。因此,多糖在长时间的超声波辐射下,提取得率会降低。

2.3.2 超声波功率比和提取温度对多糖提取得率的影响 图 5 中的 a 和 b 显示了在固定提取时间为 30 min 时,超声波功率(X_3)和提取温度(X_2)对多糖提取得率的影响,可以看出,随着提取温度从 40℃ 升高到 60℃,提取得率也逐渐增加,但当超过 60℃ 提取得率达到最大化而不再增加。在 30%~60%,随着超声波功率比的增加提取得率也迅速增加,而随着超声波功率从 60%~80%,提取得率稍微下降。提高提取介质的温度可以促使溶剂向细胞内扩散,提高所提取化合物细胞的吸附性和溶解度。然而,过高的温度会导致溶剂表面张力降低,增加微气泡,影响提取得率^[13]。由于超声波功率比的增大,较多的多糖可以渗透细胞膜进入细胞和溶剂,因此,增加超声波功率可以提高提取得率。

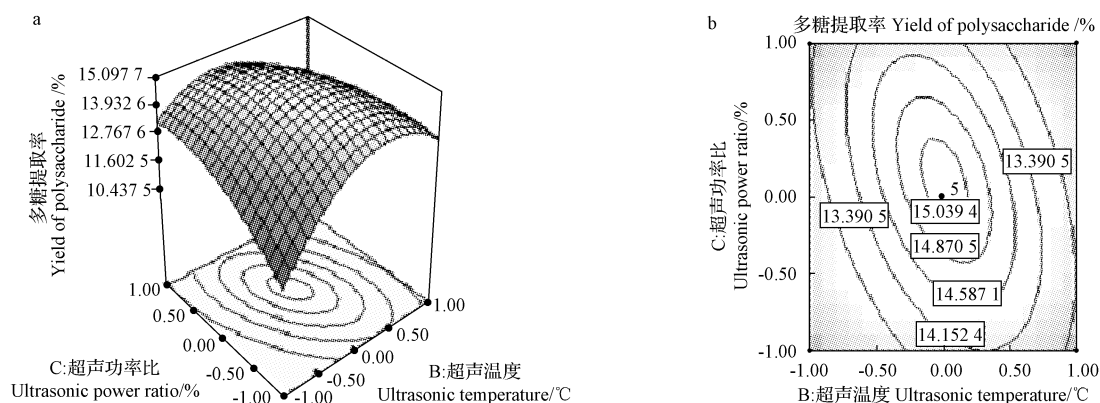


图 5 超声波功率比和提取温度对提取得率的影响

Fig. 5 The influence of ultrasonic power ratio and ultrasonic temperature on crude polysaccharide extraction rate

2.3.3 提取时间和提取温度对多糖提取得率的影响

图 6 中的 a 和 b 显示了在固定超声波功率为 60% 时,提取时间(X_1)和提取温度(X_2)对多糖提取得率的影响,可以看出,从 10~30 min,逐渐增加萃取时间,多糖提取得率也相应增加,而从 30~50 min,多糖得率逐渐下降。随着提取温度从 40℃ 升高到 60℃,提取得率也逐渐增

加,但当超过 60℃,提取得率达到最大化而不再增加。由于超声波可以加速溶质从植物细胞到溶剂的扩散和渗透过程,在很短的时间内多糖从细胞内扩散到外部的萃取溶剂中。然而,长时间超声波照射可能会诱导多糖的降解,多糖的提取得率会随着照射时间的延长而降低,提高提取介质的温度可以提高溶剂进入细胞的扩散速度,增加

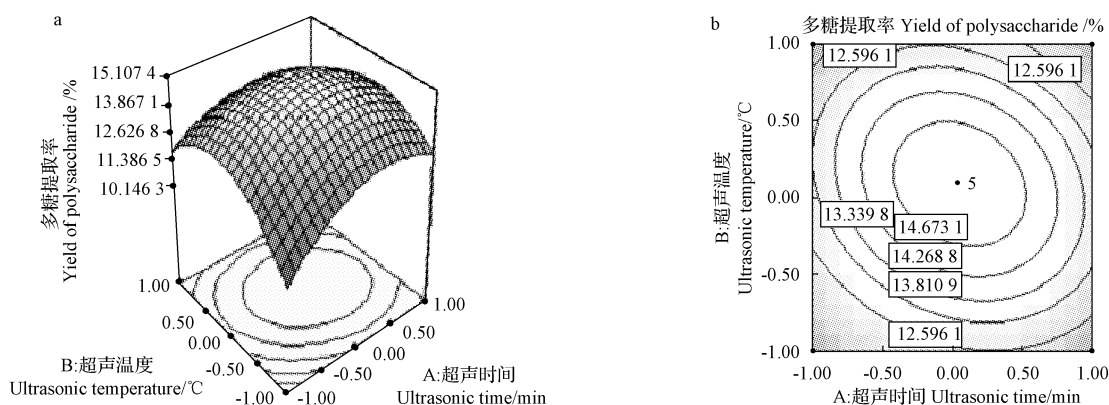


图 6 提取温度和提取时间对提取得率的影响

Fig. 6 The influence of ultrasonic temperature and ultrasonic time on crude polysaccharide extraction rate

所有细胞内化合物溶解度,这将导致多糖溶解率的降低,从而引起多糖提取得率的下降。

2.4 提取工艺条件的优化

通过软件分析,得到的超声波提取核桃青皮粗多糖的最佳条件为超声波辐射时间 30 min、提取温度 60℃、超声波功率比 60%。在此条件下,核桃青皮粗多糖提取得率理论值为 16.11%。

为检验响应面优化法预测结果的可靠性,采用上述最优提取条件对核桃青皮进行多糖的微波提取测试,3 次平行试验所得到的实际提取得率为 15.09%,比理论提取得率降低 1 个百分点,因此,采用响应面优化法得到的提取条件参数准确可靠,具有实际应用价值。

3 结论与讨论

采用响应面法(RSM)建立了超声波辐射时间、提取温度、超声波功率比的数学模型,确定最佳工艺条件为:超声波辐射时间 30 min、提取温度 60℃、超声波功率 60%,在该条件下核桃青皮粗多糖的提取得率为 15.09%,明显高于传统热回流提取法的提取得率 9.11%,且时间缩短,表明超声波法可以显著提高核桃青皮多糖的提取率。利用超声波提取法提取核桃青皮多糖可大大缩短提取时间,该方法具有成本低、操作简单、投资较少、提取效率较高、环境污染小和安全无毒等优点。建立的模型预测提取得率为 16.11%,实际提取得率为 15.09%,与理论提取得率相差 1 个百分点,预测值和试验值吻合得很好,说明模型预测可靠,可应用于从核桃青皮中提取青皮多糖提取条件的优化,对多糖的工业化生产具有一定的理论指导意义。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [2] 张婷,张虹. 山核桃青皮化学成分及生物活性研究进展[J]. 食品科

技,2007(5):117-119.

- [3] 李玉彬,马宏图,杨波,等. 青龙衣不同提取部位的抗肿瘤作用研究[J]. 中草药,2004,31(10):1145-1147.
- [4] 周媛媛,王栋. 青龙衣化学成分的研究[J]. 中医药信息,2010,27(2):18-20.
- [5] 刘薇,林文翰,季宇彬. 青龙衣毒性作用及体外抗肿瘤作用的试验研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(9):887-889.
- [6] CHEN R Z, MENG F L, LIU Z Q, et al. Antitumor activities of different fractions of polysaccharide purified from *Ornithogal caudatum* Ait [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3):845-851.
- [7] LI J W, LIU Y F, FAN L P, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphu jujuba* cv. Jinsixiaozao [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1):390-394.
- [8] KRATCHANOVA M, PAVLOVA E, PANCHEV I. The effect of microwave heating of fresh orange peels tissue and quality of extracted pectin [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56(2):181-185.
- [9] 孟繁磊,陈瑞战,张敏,等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2010,31(10):168-174.
- [10] LI J W, DING S D, DING X L. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Jinsixiaozao [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(1):176-183.
- [11] ZHAO S N, KWOK K C, LIANG H H. Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri* [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 55(3):307-312.
- [12] FILGUEIRAS A V, CAPELO J L, LAVILLA I, et al. Comparison of ultrasound assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry [J]. Talanta, 2000, 53(20):433-441.
- [13] WANG J, ZHANG J, WANG X, et al. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserine* L. polysaccharides with conventional method; Molecule weight and antioxidant activities evaluation [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1):84-93.
- [14] VODENIC AROVA M, DIMALOVÁ G, HROMADKOVA Z, et al. Xyloglucan degradation using different radiation sources; a comparative study [J]. Ultrason Sonochem, 2006, 13(2):157-164.

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of *Juglans regia* L. Husk Crude Polysaccharide Using Response Surface Methodology

LU Juan, CHANG Qingquan, WANG Siqu, ZHU Mei, SUN Yali, QU Tanglu
(College of Chemistry, Changchun Normal University, Changchun, Jilin 130031)

Abstract: Using walnut green husk as test material, taking the yield of walnut green husk polysaccharide as the response value, on the basis of single factor experiment, the effect of ultrasonic factors on crude polysaccharide from walnut green husk were designed by the response surface methodology with three factors and three levels to determined the optimum technology. The experimental results showed that walnut green husk ultrasonic power ratio was 60%, the extraction time was 30 min and the extraction temperature was 60℃. Under the condition the yield of the crude polysaccharide from walnut green husk was 15.09%.

Keywords: Walnut green seedcase; polysaccharide; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology