

响应面法优化狗枣猕猴桃叶粗多糖微波辅助提取工艺

陆娟¹, 常清泉¹, 谭莉¹, 周洪玉², 饶立东¹

(1. 长春师范大学 化学学院, 吉林 长春 130032; 2. 中节能万润股份有限公司, 山东 烟台 264006)

摘要:以狗枣猕猴桃叶为试材,在单因素试验的基础上,采用3因素3水平响应面分析法,研究了微波提取因素对狗枣猕猴桃叶粗多糖得率的影响,确定狗枣猕猴桃叶粗多糖微波提取工艺。结果表明:狗枣猕猴桃叶粗多糖微波最佳提取条件为微波提取时间44 min,提取温度81℃,微波功率824 W,在该条件下狗枣猕猴桃叶多糖的实际提取率可达6.72%,与理论的预测值6.82%的相对误差为0.1个百分点。

关键词:狗枣猕猴桃;多糖;微波提取;响应面法

中图分类号:Q 946-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)17-0129-05

狗枣猕猴桃(*Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Planch)属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属多年生藤本植物,俗称狗枣子。狗枣猕猴桃主要分布于我国东北、华北、华中、西北、西南以及朝鲜、日本、俄罗斯等地,其中吉林省长白山地区资源较为丰富。狗枣猕猴桃叶和果实均可入药,果实用于治疗维生素C缺乏症^[1]。据文献报道,狗枣猕猴桃叶中含黄酮、有机酸、多糖、挥发油类等化合物^[2]。课题组曾对狗枣猕猴桃叶乙醇提取物中的黄酮类化合物进行研究^[3-6],但关于狗枣猕猴桃叶多糖类化合物研究尚鲜见报道。

目前,经典的多糖提取方法为热回流法,但是存在很多缺点,如耗能高、提取杂质较多、多糖产率低、时间长等,新的提取工艺如微波辅助提取法、超声波提取、酶辅助提取、超临界流体萃取、压液提取等均被广泛的应用于多糖的提取过程中^[7]。微波辅助提取由于其操作简单、提取时间短、能耗低产率高等优点而被广泛的应用于植物叶、花、种子、根等部位中多糖的提取。此外,据文献报道,微波辅助提取能降低多糖分解和降解的可能性^[8]。

响应面分析(response surface methodology)系采用多元二次回归方法作为函数估计的工具,将多因子试验

中因素与指标的相互关系用多项式近似拟合,依此可对函数的响应面和等高线进行分析,研究因子与响应面之间、因子与因子之间的相互关系。它与过去广泛使用的“正交实验设计法”不同,它具有试验周期短、求得的回归方程精度高、能研究几种因素间交互作用等优点^[9-10]。

该研究以乙醇提取后的狗枣猕猴桃叶为原料,利用响应面法对狗枣猕猴桃叶粗多糖的微波提取工艺条件进行优化,以期对狗枣猕猴桃叶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

供试狗枣猕猴桃叶采自吉林省靖宇县。无水乙醇、95%乙醇、葡萄糖、浓硫酸、苯酚均为分析纯。

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);MAS-I型微萃取仪(上海新仪微波化学科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 狗枣猕猴桃叶粗多糖的提取及样品溶液的制备 准确称取经95%乙醇提取后干燥的狗枣猕猴桃叶粉末5 g,放入250 mL圆底烧瓶中,按照料液比1:30 g·mL⁻¹加入蒸馏水,浸泡24 h,在设定的微波功率及温度下提取一定的时间,以5 000 r·min⁻¹转速离心15 min,弃去沉淀,取上层清液,浓缩至一定体积,加3倍无水乙醇室温下沉淀24 h,以5 000 r·min⁻¹转速离心20 min,得沉淀、脱水、干燥得粗多糖。分别取适量粗多糖粉末,

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);长春师范大学自然科学基金资助项目(长师院自科合字政策[2010]第026号)。

收稿日期:2016-04-26

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 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), A 为吸光度,线性范围为 $50 \sim 450 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 单因素试验 分别精密称取 95%乙醇提取后干燥的狗枣猕猴桃叶粉末 5 g,按照 1.2.1 中的方法制备样品溶液。提取时间对粗多糖得率的影响:设置不同提取时间分别为 20、30、40、50、60 min,微波提取温度 60°C ,微波功率 800 W。提取温度对粗多糖提取率的影响:设置不同提取温度分别为 50、60、70、80、 90°C ,微波提取时间 40 min,微波功率 800 W。微波提取功率对粗多糖提取率的影响:设置不同微波提取功率为 500、600、700、800、900 W,提取时间 40 min,提取温度 60°C 。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素的试验基础上,采用 3 因素 3 水平 Box-Behnken Design(BBD)试验设计方案,以微波时间(X_1)、微波温度(X_2)、微波功率(X_3)为考察变量,以狗枣猕猴桃叶粗多糖得率(Y)为响应值,应用 Design-Expert 8.0.5 软件,建立数学回归模型,确定狗枣猕猴桃叶粗多糖的最佳微波提取工艺。试验因素和水平见表 1。

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
微波时间 Microwave time/min	30	40	50
微波温度 Microwave temperature/ $^\circ\text{C}$	70	80	90
微波功率 Microwave power/W	700	800	900

1.2.5 双因子交互分析 固定其中一个试验因素,根据回归方程绘制出三维(3D)响应面和二维(2D)等高线生成的模型图,二者能直观准确地描述其余 2 个变量因素

之间的交互作用对响应值的影响。参照文献[11]可知,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对 Y 的影响较显著,而圆形的等高线则表示变量之间的交互关系对 Y 的影响不显著。

1.3 数据分析

采用 SAS 软件(版本 8.0 美国)分析试验数据和计算响应的预测。方差分析则由方差分析程序(ANOVA procedure)进行。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 微波提取时间对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响 由图 1A 可知,随着微波提取时间的延长,狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率逐渐增加,当微波时间超过 40 min 时,再增加微波时间,提取率反而减小。这可能是由于微波提取时间过长,诱导了部分多糖的降解^[12],因此,最佳微波提取时间设置为 40 min。

2.1.2 微波提取温度对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响 由图 1B 可知,在提取温度为 $50 \sim 80^\circ\text{C}$ 时,随着温度的升高,粗多糖提取率也逐渐增加,当温度为 80°C 时,粗多糖提取率最大,再增加温度,提取率反而降低。这可能是由于在较高的温度下,溶剂中多糖具有较高的溶解度和扩散性。但是温度过高,部分多糖会水解为单糖或低聚糖,从而使多糖的提取率下降。因此,最佳提取温度是 80°C 。

2.1.3 微波提取功率对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响 由图 1C 可知,随着提取功率的增大,粗多糖提取率也增大,当微波功率达到 800 W 时,粗多糖的提取率最大,再增加微波功率,提取率降低,其原因可能是由于微波功率的增大使较多的多糖可以渗透细胞膜进入细胞和溶剂,然而,过高的提取功率会引起溶剂的剧烈沸腾,这可能会降低微波能量传播到介质中的效率。因此,最佳微波功率为 800 W。

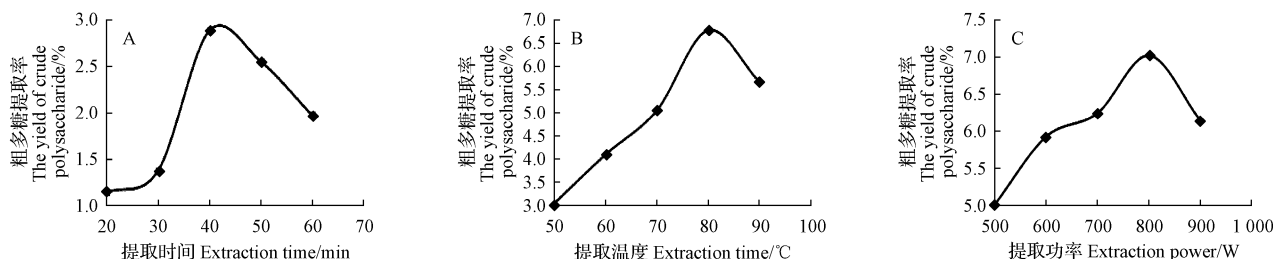


图 1 微波提取各因素对粗多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of different extraction variables on extraction yield

2.2 响应面试验分析

2.2.1 响应面试验结果 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,得到二次多项回归模拟方程: $Y(\%) = 6.56 + 0.75X_1 + 0.51X_2 + 0.6X_3 -$

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 提取时间 Extraction time /min	X ₂ 提取温度 Extraction temperature /℃	X ₃ 提取功率 Ultrasonic power /W	Y 得率 Yield /%
1	40	80	800	6.083
2	30	80	900	4.689
3	30	90	800	4.212
4	30	70	800	2.453
5	40	80	800	6.583
6	40	90	900	4.867
7	50	80	700	5.337
8	40	80	800	6.684
9	40	80	800	6.785
10	40	90	700	3.593
11	50	90	800	4.586
12	30	80	700	2.897
13	40	70	800	4.524
14	40	70	900	3.914
15	50	80	900	5.837
16	40	70	700	2.268
17	40	80	800	6.690

$0.80X_1^2 - 1.83X_2^2 - 1.08X_3^2 - 0.42X_1X_2 - 0.32X_1X_3 - 0.093X_2X_3$ 。

2.2.2 多元二次响应面回归模型的建立与分析 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 $F=49.48$, $P<0.0001$ 差异有统计学意义,说明建立的模型极显著($P<0.01$);失拟项 $F=0.24$ 相对于绝对误差并不显著,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 $R^2=0.9845$, $\text{Adj } R^2=0.9646$,表明模型与实际试验拟合较好,试验误差较小,可以用此模型对狗枣猕猴桃叶粗多糖的微波提取进行分析和预测。对回归方程系数进行显著性检验,表明微波提取时间、微波提取温度及微波功率(X_1 、 X_2 、 X_3)对狗枣猕猴桃叶粗多糖的提取率影响显著。

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 Model	34.96	9	3.88	49.48	<0.0001	Very significant
X ₁	4.55	1	4.55	57.95	0.0001	Very significant
X ₂	2.10	1	2.10	26.75	0.0013	Significant
X ₃	3.40	1	3.40	43.25	0.0003	Very significant
X ₁ ²	2.67	1	2.67	33.97	0.0006	Very significant
X ₂ ²	14.03	1	14.03	178.70	<0.0001	Very significant
X ₃ ²	4.90	1	4.90	62.46	<0.0001	Very significant
X ₁ X ₂	0.72	1	0.72	9.17	0.0192	Significant
X ₁ X ₃	0.42	1	0.42	5.32	0.0545	
X ₂ X ₃	0.035	1	0.035	0.44	0.5280	
残差 Residual	0.55	7	0.079			
失拟 Lack of fit	0.24	3	0.080	1.02	0.4708	Not significant
误差 Error	0.31	4	0.078			
总和 Total	35.51	16				

相关系数(R^2)=0.9845,校正系数($\text{Adj } R^2$)=0.9646

注: $P<0.01$,差异极显著; $P<0.05$,差异显著。

Note: $P<0.01$, very significant difference; $P<0.05$, significant difference.

2.3 双因子间交互影响分析

2.3.1 微波提取时间和提取温度对粗多糖提取率的影响 由图 2 可知,在固定微波提取功率 800 W 时,微波提取时间(X_1)和微波提取温度(X_2)对多糖提取率的影响形成了一个椭圆的等高线,这就表明微波提取时间和微波提取功率之间的交互作用对粗多糖提取率的影响显著,这也与表 3 中 X_1X_2 的 P 值的显示结果一致($P=0.0192$)^[11]。由图 2 可知,从 30~45 min 逐渐增加微波提取时间,多糖提取率相应增加,而从 45~50 min 多糖得率却下降。粗多糖提取率随着微波提取温度的升高也逐渐增大,当提取温度为 82℃ 时,提取率达到最大,随后随着温度的升高,粗多糖提取率下降。这种现象是由于微波能加速溶质从植物细胞到溶剂的扩散和渗透过程,使得多糖在很短的时间内从细胞内扩散到外部的萃取溶剂中。但是,长时间微波照射可能会

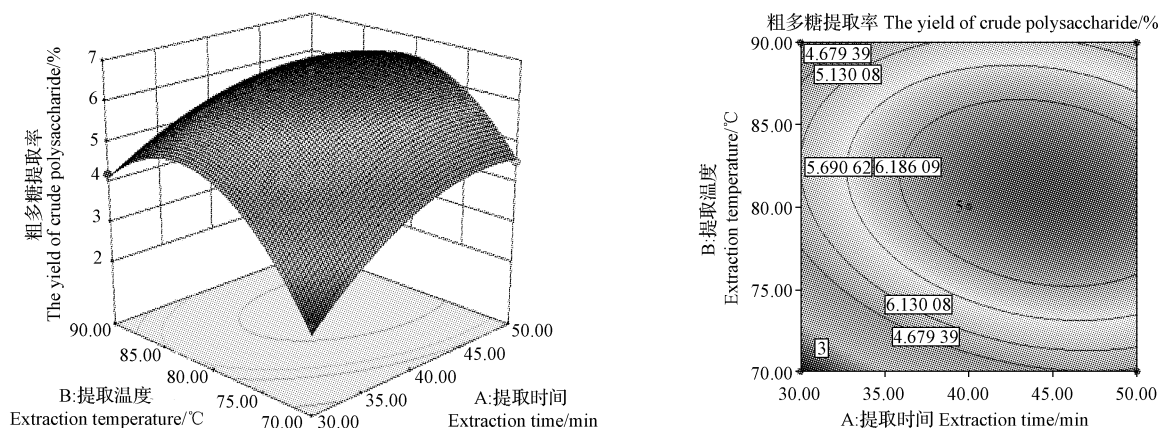


图2 微波提取时间和提取温度对粗多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time and extraction temperature on the yield of crude polysaccharide

诱导多糖的降解,多糖的提取率会随着照射时间的增加而降低。升高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溶解度和吸附性。但是,温度过高会导致溶剂表面张力降低,增加微气泡,影响提取率^[13]。

2.3.2 微波提取温度和微波提取功率对粗多糖提取率的影响 图3显示了在固定微波提取温度为80℃时,微波提取时间(X_1)和微波提取功率(X_3)交互作用

对多糖提取率的影响。微波提取功率在700~850 W,随着微波功率(X_3)增加,粗多糖提取率缓慢增加,但微波功率超过850 W,多糖提取率基本保持不变。在30~46 min逐渐增加提取时间,多糖提取率缓慢增加,而46~50 min随着提取时间延长,粗多糖提取率基本保持不变。表明微波提取时间和微波提取温度之间的交互作用对粗多糖提取率的影响不显著,这也与表3中 X_1X_2 的 P 值的显示结果一致($P=0.0545$)^[11]。

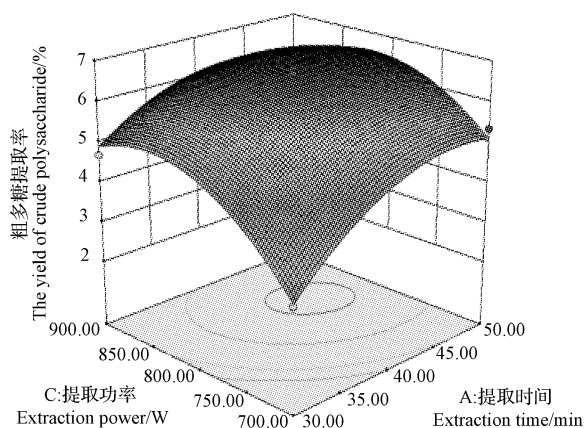


图3 微波提取时间和微波提取功率对粗多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time and extraction power on the yield of crude polysaccharide

2.3.3 微波提取温度和微波提取功率对多糖提取率的影响 图4显示了在固定提取时间为40 min时,微波提取功率(X_3)和微波提取温度(X_2)交互作用对粗多糖提取率的影响,可以看出,微波提取温度从65℃升高到71℃,粗多糖提取率缓慢增加,超过71℃提取率最大且

基本不变。微波提取功率在700~840 W,随着微波提取功率的增加,粗多糖提取率缓慢增加,随后粗多糖提取率基本保持不变。表明微波提取功率(X_3)和微波提取温度(X_2)交互作用对粗多糖提取率的影响不显著,这也与表3中 X_3X_4 的 P 值的显示结果一致($P=0.5280$)^[11]。

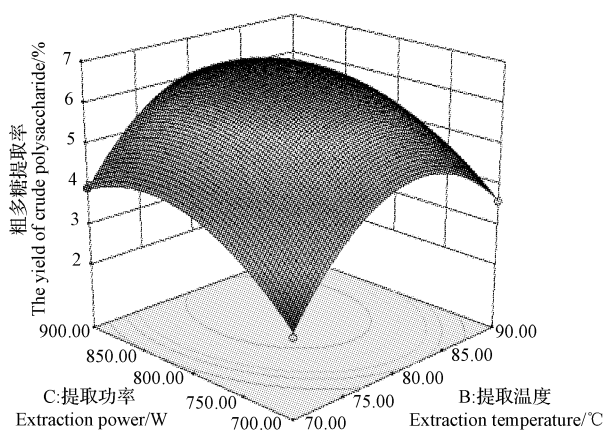


图4 微波提取温度和微波提取功率对粗多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature and extraction power on the yield of crude polysaccharide

2.4 提取工艺条件的优化

通过软件分析得到的微波辅助提取狗枣猕猴桃叶粗多糖的最佳条件为微波提取时间44.02 min、温度

80.87℃,提取功率为823.69 W。在此条件下,狗枣猕猴桃叶多糖提取率理论值为6.82%。修正上述最佳提取多糖条件为微波提取时间44 min,温度81℃,功率

824 W,进行微波提取多糖的试验,平行测定 3 次,试验结果所得狗枣猕猴桃叶多糖提取率为 6.72%,与理论多糖提取率的相对误差为 0.1 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

在单因素试验基础上,采用三因素三水平的 Box-Behnken Design 试验设计方案,以微波提取时间(X_1)、微波提取温度(X_2)、微波提取功率(X_3)为考察变量,以狗枣猕猴桃叶粗多糖得率(Y)为响应值,应用 Design-Expert 8.0.5 软件,建立数学回归模型,确定狗枣猕猴桃叶粗多糖的最佳微波提取工艺:微波提取时间为 44.02 min、提取温度为 80.87 °C,提取功率为 823.69 W。在此条件下,狗枣猕猴桃叶多糖提取率理论值为 6.82%。修正后的微波提取时间为 44 min,提取温度为 81 °C,提取功率 824 W,进行微波提取多糖的试验,平行测定 3 次,试验结果所得狗枣猕猴桃叶多糖提取率为 6.72%,与理论多糖提取率的相对误差为 0.1 个百分点。此外,按照最优提取方案所得的粗多糖提取率明显高于传统热回流提取法的提取率 4.34%(回流提取温度 100 °C,回流提取时间 120 min),表明微波提取可以显著提高狗枣猕猴桃叶粗多糖的提取率,具有操作简单、提取时间短、能耗低产率高等优点。

参考文献

[1] 张继有,严仲铠,李海日.长白山植物药志[M].长春:吉林出版社,

1982:736.

[2] 严仲铠,李万林.中国长白山药用植物彩色图志[M].北京:人民科学出版社,1997:285-286.

[3] 金立日,桂明玉,李绪文,等.狗枣猕猴桃叶化学成分研究[J].高等学校化学学报,2007,28(11):2060-2064.

[4] 陆娟,李绪文,桂明玉,等.狗枣猕猴桃叶化学成分研究(II)[J].高等学校化学学报,2009,30(3):468-474.

[5] LU J, JIN Y R, LIU G Y, et al. Flavonoids from the leaves of *Actinidia kolomikta*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2010, 46(2): 205-208.

[6] 陆娟,杨瑞杰,桂明玉,等.狗枣猕猴桃叶中一个新的三萜皂苷[J].中国药理学杂志,2009,44(16):1215-1217.

[7] SHI Z J, XIAO L P, DENG J, et al. Isolation and characterization of soluble polysaccharides of *Dendrocalamus brandishii*: A high yielding bamboo [J]. Bio Resources, 2011, 6(4): 5151-5166.

[8] 韦巍.多糖的研究进展[J].国外医学药学分册,2005,32(3):179.

[9] 李亚娜,林永成,余志刚.响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺[J].华南理工大学学报(自然科学版),2004,32(11):29-31.

[10] 刘海军,任惠兰,官波,等.响应面分析法优化白术多糖提取工艺[J].中成药,2008,30(5):667-670.

[11] LIU Y, WEI S L, LIAO M C. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 49: 837-843.

[12] 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.

[13] 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.

Optimization of the Microwave-assisted Extraction of Polysaccharide From the Leaves of *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Planch Using Response Surface Methodology

LU Juan¹, CHANG Qingquan¹, TAN Li¹, ZHOU Hongyu², RAO Lidong¹

(1. College of Chemistry, Changchun Normal University, Changchun, Jilin 130032; 2. GECEP Valiant Co. Ltd., Yantai, Shandong 264006)

Abstract: Using the leaves of *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Planch as test material, on the basis of single factor experiment, the effect of microwave-assisted extraction factors on crude polysaccharide from the leaves of *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Planch were designed. A three - level - three - factor Box - Behnken design was employed to optimize the three extraction variables and to determine the optimum technology. The experimental results showed that the optimum technology was that the extraction time was 44 minutes, the extraction temperature was 81 °C, the microwave power was 824 W. Under the condition, the yield of the crude polysaccharide from the leaves of *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Planch was 6.72%. The predictive value of the theory was 6.82%. The relative error was 0.1 percentage point.

Keywords: *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Planch; polysaccharide; micro-assisted extraction; response surface methodology