

均匀设计法优化超声波辅助 提取枸杞多糖的工艺

郝继伟^①

(临沂大学生命科学学院 山东省临沂市通达路 18 号 276005)

摘 要 实验采用超声波辅助技术提取枸杞多糖,并通过均匀设计法研究了液料比、提取时间、提取温度和超声功率对枸杞多糖提取的影响。枸杞多糖超声提取的最佳工艺为:液料比 21mL/g,提取时间 27min,提取温度 63℃,超声功率 200W,在该条件下枸杞多糖得率为 5.16%,且表现稳定。均匀设计法在优化枸杞多糖提取条件中应用效果良好。

关键词 枸杞多糖;超声波;均匀设计

中图分类号:O657.32

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2011)05-2493-05

1 引言

枸杞(*Lycium barbarum*)为茄科(*Solanaceae*)枸杞属(*Lycium*)植物,其果实是一种“药食同源”的功能保健性食品,具有补肾养肝、润肺明目、益精、补血等功效^[1]。枸杞多糖(*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP)为枸杞主要功效成分,药理研究表明,枸杞多糖具有抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、降血脂、降血糖、调节免疫等多种保健功能^[2-4]。超声波提取是近年来中药提取分离研究应用较多的方法,相对于传统的热水浸提法,具有提取效率高、提取时间短、能耗低、提取药液杂质少、有效成分易于分离纯化等优点^[5]。本文以无籽枸杞为原料,采用超声波辅助提取技术,并结合均匀设计法研究液料比、提取时间、提取温度以及超声功率对枸杞多糖提取的影响,为无籽枸杞的深加工利用提供理论依据,并探讨均匀设计法在枸杞多糖提取工艺优化上的实际应用效果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

KQ 5200DE 型数控超声清洗器(超声频率 40kHz,额定功率 200W,昆山市超声仪器有限公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);LD5-10B 型低速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司);TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);DZF-6021 型真空干燥箱烘箱(上海一恒科技有限公司);DZMK-D 型水浴锅(余姚市东方电工仪器厂)。

无籽枸杞购于老百姓大药房,经临沂大学生命科学学院王文房副教授鉴定为宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.),经 60℃烘干至恒重,粉碎后过 60 目筛备用。无水葡萄糖、无水乙醇、苯酚、丙酮、乙醚、氯仿、正丁醇、浓硫酸等试剂均为分析纯。实验用水为蒸馏水。

① 联系人,电话:(0539)8766310;E-mail:haojw@126.com

作者简介:郝继伟(1971—),男,山东省临沂市人,副教授,硕士,主要从事天然产物有效成分提取及食品营养方面的教学与研究
工作。

收稿日期:2011-04-01;接受日期:2011-04-24

2.2 实验方法

2.2.1 超声辅助提取枸杞粗多糖方法

准确称取 5.000g 枸杞粉末,按液料比要求加入适量蒸馏水,混匀后充分浸透,首先置于水浴锅内预加热到设定温度,然后置于超声波仪器内,按实验设计的提取温度与超声功率进行提取,一定时间后对提取液进行抽滤,滤液经旋转蒸发仪浓缩加 4 倍体积的 95% 乙醇醇析 24h, 3000r/min 离心 10min,沉淀依次用无水乙醇、丙酮各 5mL 分别洗涤两次,置于真空冷冻干燥箱内冷冻干燥,即得枸杞粗多糖。

2.2.2 多糖杂质去除方法

枸杞粗多糖依次用石油醚、丙酮回流脱脂后,溶于蒸馏水中,加热到 90℃ 溶解成含粗多糖 5% 的溶液,采用 Seavage 法脱蛋白^[6]。脱蛋白多糖液浓缩,加 4 倍体积的 95% 乙醇醇析,经离心 (3000r/min, 10min) 后多糖沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚各 5mL 分别洗涤两次,真空干燥至恒重得枸杞多糖样品。

2.2.3 多糖含量测定

实验采用硫酸-苯酚法^[7]测定枸杞多糖含量。以 105℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖为标准品,用紫外可见分光光度计于 490nm 波长处测定吸光度 A。以葡萄糖浓度 C 为横坐标,以吸光度 A 为纵坐标,绘制吸光度-葡萄糖浓度的校准曲线,其线性回归方程为 $A = 8.56C + 0.0043$, $r = 0.9991$, 葡萄糖浓度在 0.01—0.06mg/mL 范围内吸光度与浓度呈良好的线性关系。

准确称取干燥至恒重的枸杞多糖样品 20mg,置于烧杯中,加少量蒸馏水 90℃ 下溶解,冷却至室温后移至 200mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,即得 0.10mg/mL 多糖储备液。吸取多糖储备液 0.5mL 置于带塞试管中,加蒸馏水至 2mL,采用硫酸-苯酚法测定枸杞多糖含量,按下式计算多糖得率:

$$\text{多糖得率}(\%) = (\text{多糖质量} / \text{样品质量}) \times 100\%$$

2.2.4 均匀设计实验

影响枸杞多糖提取的主要因素有液料比、提取时间、提取温度以及超声功率。实验因素较多,而且实验过程中每一个因素变化区间较大,因素之间又相互关联,因此,在本实验中选择了均匀设计法优化枸杞多糖提取工艺。实验因素水平见表 1。

表 1 均匀设计实验因素与水平

实验因子	水平					
	1	2	3	4	5	6
X_1 液料比(mL/g)	10	15	20	25	30	35
X_2 提取时间(min)	10	20	30	40	50	60
X_3 提取温度(℃)	40	50	60	70	80	90
X_4 超声功率(W)	100	120	140	160	180	200

3 结果与讨论

3.1 均匀设计实验结果

根据表 1 的实验因素及水平,利用 DPS 软件设计一个 4 因素 6 水平 12 个实验处理的均匀设计[即 $U_{12}(6^4)$],实验设 3 次重复,结果取 3 次重复的平均值。实验方案及结果见表 2。

表 2 均匀设计实验方案和实验结果

实验号	X_1 (mL/g)	X_2 (min)	X_3 ($^{\circ}$ C)	X_4 (W)	多糖得率(%)
1	10	10	40	160	2.91
2	10	40	70	140	4.00
3	15	50	60	160	4.72
4	15	30	80	180	4.48
5	20	50	50	200	5.05
6	20	20	90	100	3.31
7	25	30	50	120	4.37
8	25	60	90	180	2.91
9	30	20	60	200	4.81
10	30	60	70	140	4.30
11	35	40	40	120	3.53
12	35	10	80	100	2.46

3.2 均匀设计实验结果分析

表 2 实验结果经 DPS 统计软件进行二次多项式逐步回归分析各自变量与多糖得率(Y)的回归模型为:

$$Y = -7.6929 + 0.2031X_1 + 0.1439X_2 + 0.1941X_3 + 0.0183X_4 - 0.0051X_1^2 - 0.0005X_2^2 - 0.0013X_3^2 + 0.0006X_1X_2 - 0.0010X_2X_3 - 0.0003X_2X_4$$

对该模型进行 F 检验结果为 $P = 0.0136$, 表示该模型具有显著的统计学意义($P < 0.05$); 根据 $R_{adj}^2 = 0.9994$, 剩余标准差 $s = 0.0157$, 表明该模型与实际实验拟合程度很高, 能很好的拟合超声波提取枸杞多糖的工艺条件。对模型中各项的回归系数利用 DPS 软件的均匀设计回归分析进行检验, 根据表 3 检验结果中 t 值与 P 值大小可以判断^[8], 各因素对多糖得率影响大小次序为提取温度(X_3) > 提取时间(X_2) > 液料比(X_1) > 超声功率(X_4), 且 4 因素对多糖得率的影响均达极显著水平($P < 0.01$)。

表 3 回归系数及检验结果

项目	回归系数	标准系数	t 值	p 值
X_1	0.2031	2.1152	43.0502	0.0005
X_2	0.1439	2.9977	43.1151	0.0005
X_3	0.1941	4.0423	50.2988	0.0004
X_4	0.0183	0.7619	32.2656	0.0010
X_1^2	-0.0051	-2.4301	65.2171	0.0002
X_2^2	-0.0005	-0.7739	17.1146	0.0034
X_3^2	-0.0013	-3.6241	42.0581	0.0006
X_1X_2	0.0006	0.3460	8.5292	0.0135
X_2X_3	-0.0010	-1.6334	47.9424	0.0004
X_2X_4	-0.0003	-1.2629	18.3860	0.0030

表 3 中液料比(X_1)、提取时间(X_2)及提取温度(X_3) 3 因素二次项的回归系数均为负值, 表明实验初期随 3 因素量的增大多糖得率提高, 但达到一定程度后多糖提取反而受到一定抑制, 导致多糖得率降低。分析原因为: 液料比(X_1)较小时多糖提取不充分导致多糖得率过低, 过大时超声波辐射被溶剂大量吸收, 不能完全作用于物料, 从而影响多糖得率; 提取时间(X_2)较短时多糖不能充分提取出来, 过长又使得多糖分子在超声波的剪切作用下发生破坏和降解, 造成后期多糖的损失影响了得率; 提取温度(X_3)升高多糖的溶解度增大, 有利于多糖的溶出, 但升高到一定程度部分多糖水解为单糖或低聚糖, 从而导致多糖得率下降。

表 3 统计分析结果还可看出,液料比(X_1)与提取时间(X_2)间存在正向交互作用,是由于加大液料比(X_1)时物料浓度降低,超声波辐射被溶剂大量吸收不能集中对物料处理,因此需延长提取时间(X_2)才能使多糖充分提取;提取时间(X_2)与提取温度(X_3)间存在负向交互作用,是由于升高提取温度(X_3),多糖的溶解度增大,有利于多糖的溶出,可以有效缩短提取时间(X_2);提取时间(X_2)与超声功率(X_4)间存在负向交互作用,是由于超声波功率(X_4)提高时,水的循环加速,传质被加强,扩散、溶解速度加快,可有效缩短多糖提取时间(X_2)。

结合以上分析及 DPS 统计软件优化分析,当液料比为 21.05mL/g,提取时间为 26.64min,提取温度为 63.20℃,超声功率为 200.00W 时,超声波辅助提取枸杞多糖理论得率为 5.29%。

3.3 验证实验

考虑到方便操作,修正优化提取条件为液料比 21mL/g,提取时间 27min,提取温度 63℃,超声功率 200W,进行验证实验,结果见表 4。与回归分析预测结果比较相对误差为-2.46%,说明均匀设计优化多糖提取条件稳定性好,且非常可靠,可用于超声法提取枸杞多糖。

表 4 验证实验结果

提取次数	1	2	3	4	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
多糖得率 (%)	5.14	5.25	5.09	5.17	5.16±0.07	1.36

4 结论

本研究采用超声波辅助技术结合均匀设计实验,分别考察了液料比、提取温度、提取时间以及超声功率对枸杞多糖得率的影响,获得了较理想的优化提取条件,即液料比 21mL/g,提取时间 27min,提取温度 63℃,超声功率 200W,在此优化条件下枸杞多糖得率为 5.16%。

均匀设计是方开泰将数论和多元统计相结合创造的一种适用于多因素多水平的实验设计方法,它通过提高实验点“均匀分散”的程度,使实验点具有更好的代表性及能用较少的实验获得较多的信息,具有实验次数少、均匀分散、实验数据用计算机处理和方便、迅速、准确的特点^[9,10]。本研究利用均匀设计仅通过 12 次实验便对 4 个因素的 6 个水平进行了考察,且实验所获得优化条件经验证是可靠的,充分证实均匀设计在优化工艺研究中具有较高的实用性。需注意的是在具体的实验设计中,要根据实验条件选择相适应的合理高效的设计方案,既反映实验的科学性同时又可减少工作量。

参考文献

- [1] 段昌令,乔善义,王乃利等.枸杞子活性多糖的研究[J].药学学报,2001,36(3):196—199.
- [2] 钱彦丛,宇文萍.枸杞子的化学成分及药理研究新进展[J].中医药学报,2000,28(4):33—35.
- [3] 严成,严夏.枸杞多糖提取工艺比较及体外抗氧化性研究[J].食品科学,2008,29(7):183—187.
- [4] 龚涛,王晓辉,赵靛等.枸杞多糖抗氧化作用的研究[J].生物技术,2010,20(1):84—86.
- [5] 熊伟,陈芝兰,钟国辉等.西藏枸杞多糖的提取及其单糖组成研究[J].化学与生物工程,2009,26(8):58—60.
- [6] 赵长家,何云庆.赤芝菌丝体活性多糖的分离、纯化及结构研究[J].中药材,2002,25(4):252—254.
- [7] 刘晓涵,陈永刚,林励等.蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J].食品科技,2009,34(9):270—272.
- [8] Atkinson A C, Donev A N. *Optimum Experimental Designs* [M]. Oxford: Oxford University Press, 1992. 132—189.
- [9] 方开泰,王元.数论方法在统计中的应用[M].北京:科学出版社,1996.5—36.
- [10] 夏之宁,谢其厚,穆小静等.正交设计与均匀设计的初步比较[J].重庆大学学报(自然科学版),1999,22(5):112—117. <http://www.cqjtu.edu.cn>

Optimal Ultrasonic-Assisted Extraction Conditions of Polysaccharides in *Lycium barbarum* by Uniform Design

HAO Ji-Wei

(College of Life Science, Linyi University, Linyi, Shandong 276005, P. R. China)

Abstract The polysaccharides in the *Lycium barbarum* were extracted by ultrasonic-assisted technology, and the effects of ratio of liquid-solid, extracting time, extracting temperature and ultrasonic power on extraction polysaccharides from *Lycium barbarum* were investigated by uniform design method. The optimal extraction conditions were obtained as follows: ratio of liquid-solid of 21mL/g, extracting time of 27min, extracting temperature of 63°C and ultrasonic power of 200W. Under the optimized conditions, the yield of *Lycium barbarum* polysaccharides was 5.16%, and the process was stable. Uniform design method obtains the good results in optimization extraction conditions of *Lycium barbarum* polysaccharides.

Key words *Lycium barbarum* Polysaccharides; Ultrasonic; Uniform Design

欢迎您投稿 “高效、保质、宽容”的中文核心期刊
《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障!

发表周期多数(50% - 75%)为 5—9 个月,

少数(20% - 45%)为 1—5 个月,极少数(0- 7%)为 15—30 天

及时发表科技论文,是尽快实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的可靠保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此,本刊把尽快(“高效、保质、宽容”)发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作中有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“缺欠”和“毛病”,换言之,作者发表论文总是要为自己“争光”;而不是让自己“蒙羞”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即文字、表格、图片等齐全,并符合本刊《投稿须知》的各项要求;“清”即文字、图片打印清楚,不得有模糊不清的图片(包括上面的文字和数字);若有彩色图片及彩色曲线,请转化为清晰的黑白图片和黑色曲线,并清除图片和曲线上的背景,便于排版和复制;“定”即做到稿件内容(文字、表格、图片等)完整,无需再作增删修改。

来稿请用 Word 排版,用电子邮件发到本部电子信箱(E-mail: gpsys@263.net)。

本刊收到作者来稿后,都会在 3 日(遇公休日顺延)内发出“收稿通知”。因此,作者发送稿件后 7 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的正确的姓名和详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而产生的后果由作者自己负责。

本刊发表论文的宗旨是交流学术,而不是为了应付“评职称”、“拿文凭”。

《光谱实验室》编辑部