

文章编号: 1673 1689(2011)01-0020-05

响应面法优化微波辅助提取北五味子总三萜工艺

孟宪军, 李斌, 李元甦, 朱力杰, 傅俊范, 薛雪, 汪艳群
(沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 利用响应面分析法对微波辅助提取北五味子中三萜工艺进行研究, 在单因素试验的基础上, 选取乙醇体积分数、提取时间和预处理剂倍数作为考察因素, 采用响应面试验设计, 利用 Design Expert 软件 Central Composite 设计实验进行优化组合, 从而确定微波提取北五味子总三萜的最佳工艺参数: 乙醇体积分数 53.6%、预处理剂倍数为 4.6 倍、提取时间 1.89 min, 预测北五味子总三萜提取率达到 2.137%。验证试验证实了该方程有很好的拟合度, 该方法具有提取率高、污染小、节约能源的特点。

关键词: 五味子; 微波提取; 三萜; 响应面分析

中图分类号: O 629.12

文献标识码: A

Optimization for Microwave Assisted Extraction of Total Triterpenoids from *Schisandra chinensis* by Response Surface Method

MENG Xianjun, LI Bin, LI Yuansu, ZHU Lijie, FU Junfan,
XUE Xue, WANG Yanqun
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In this study, response surface methodology (RSM) was applied to optimize the extraction conditions of total triterpenoids from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail by microwave assisted. Based on the results of the single factor experiments, alcohol concentration, extraction time, pretreatment agents were studied with a central-composite design. The predictive quadratic equations model was developed by Design Expert software. The optimal conditions of microwave extraction of triterpenoids from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail were achieved and listed as follows: alcohol concentration 53.6%, extraction time 1.89min, multipl 4.6 Under the optimum conditions, the yield of total triterpenoids is achieve at 2.137%, this data exhibited a good agreement with the value predicted by the model.

Key words: *Schisandra chinensis*, microwave extraction, triterpenoids, response surface analysis

三萜类(triterpenoids)化合物是一类基本母核由 30 个碳原子组成的萜类化合物, 其结构根据异

戊二烯规则可视为六个异戊二烯单位聚合而成, 是一类重要的天然产物化学成分。三萜及其苷类化

收稿日期: 2010-05-09

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI09B04)。

作者简介: 孟宪军(1960-), 男, 内蒙古赤峰人, 工学博士, 教授, 主要从事食品深加工及综合利用研究。Email:

mengxjsy@126.com

合物在植物中分布广泛, 目前发现其在双子叶植物纲约 220 余种植物中以及单子叶植物纲约 50 种植物中都有分布, 如灵芝三萜、人参三萜苷、黄芪三萜苷等。三萜类化合物具有广泛的生理活性, 研究结果显示, 其具有具有保肝、抗肿瘤、镇痛^[1]、调节免疫力、抗艾滋病毒^[2]、降血糖^[3]等作用。

目前从五味子中发现三萜类化合物, 仅限于南五味子, 中国科学院孙汉董院士等^[4]发现南五味子中含有新奇结构的三萜化合物并具有明显抗-HIV 活性, 中国医学科学院肖培根院士等^[5]发现华中南五味子含有新奇结构的三萜化合物并具有明显抗氧化和抗病毒活性。

但关于北五味子中三萜类化合物的提取和功能性研究还未见报道。因此, 作者利用 RSM 法^[6-10]优化北五味子三萜微波辅助提取工艺, 为北五味子的开发利用提供新的途径和理论基础, 为北五味子三萜系列功能性产品的开发提供一定的依据和参考。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂

北五味子藤茎由辽宁省抚顺市新宾县青松药业公司提供, 置于 50 °C 恒温干燥箱内烘干 24 h 后, 用粉碎机粉碎, 分别过 60 目筛, 恒重, 备用。

齐墩果酸对照品: 中国药品生物制品检定所产品; 乙醇: 天津市富宇精细化工有限公司产品; 冰醋酸: 沈阳沈一精细化学品有限公司产品; 高氯酸: 金鹿化工有限公司产品; 香兰素: 国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器与设备

UV-1600 紫外可见分光光度计: 北京天普仪器技术有限公司产品; NJL0723 型微波实验专用仪器: 南通杰全微波设备有限公司产品; SHZ-III B 循环水真空泵: 上海华琦科学仪器有限公司产品; RE-52AA 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂产品; 电热恒温水浴锅: 上海精宏实验设备有限公司产品; 电子天平: 北京赛多利斯仪器系统有限公司产品。

1.3 提取工艺

在单因素试验和参考相关资料基础上, 确定影响微波辅助提取的主要因素为乙醇体积分数、提取时间和预处理剂倍数, 以这 3 个因素采用响应面分析法确定最佳工艺条件, 实验因素和水平见表 1。

将北五味子藤茎 1.0 g 粉碎到 60 目的, 加入相应的乙醇溶液, 置微波提取器中提取, 趁热抽滤, 提

取后过滤并收集滤液, 备用, 待测。在确定影响微波辅助提取的主要因素的基础上, 采用响应面分析法确定最佳工艺条件。

表 1 试验因素水平及编码表

Tab. 1 Codes and levels of factors chosen for test

水平 编码	因素		
	体积分数 $X_1 / \%$	倍数 X_2 / n	时间 X_3 / Min
+ 1.682	76.8	5.7	3.7
+ 1	70.0	5.0	3.0
0	60.0	4.0	2.0
- 1	50.0	3.0	1.0
- 1.682	43.2	2.3	0.3

1.4 标准曲线的制作

准确称取干燥恒重的齐墩果酸标准品 4.0 mg 于 50 mL 的容量瓶中, 加入无水乙醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 即为浓度 0.08 mg/mL 的标准品溶液。精密吸取齐墩果酸对照品溶液(质量浓度 0.08 mg/mL) 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 置试管中, 水浴挥干乙醇, 加体积分数 5% 香草醛-冰醋酸液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 60 °C 水浴 15 min, 冷却, 加冰醋酸 5.0 mL, 摇匀, 在 547 nm 处测定吸收值。以齐墩果酸的质量为横坐标, 吸光定值为纵坐标, 建立标准曲线。

1.5 总三萜含量的测定

将不同条件下微波辅助提取的样品分别过滤后, 每份样品分别吸取 0.2 mL, 置于 80 °C 恒温水浴锅中挥去溶剂, 再分别加入体积分数 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 混匀, 置于 60 °C 恒温水浴 15 min, 冰浴, 加冰醋酸 5 mL, 混匀, 静置 10 min, 于 547 nm 处测定吸光度值 A , 代入标准曲线中计算北五味子三萜的含量。

1.6 响应面优化实验设计

基于第一阶段试验结果, 采用 Design Expert 软件(Vision 7.0.0.1, stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) 设计, 采用 Central Composite 设计实验法优化最佳提取方法, 选取 3 主要的因素乙醇体积分数、预处理剂倍数、时间作为自变量, 以提取率作为响应函数, 采用响应曲面分析法, 通过回归得出自变量与响应函数之间的统计模型, 确定提取北五味子总三萜最佳工艺参数。

因此本试验以乙醇体积分数、预处理剂倍数、时间为主要的考察因子(自变量), 分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 表示, 并以 + 1.682、+ 1.0、- 1.0、- 1.682 分别表示自变量的高、较高、中、较低、低水平, 按照方程

$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码, 其中 x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, ΔX 为自变量的变化, 本试验因子编码及水平见表 1。

北五味子总三萜的提取率 Y 作为评价指标(响应值)的预测模型由最小二乘法拟合的二次多项式方程为:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

方程(1) 其中 Y 代表预测响应值, β_0 为常数值, β_i 代表线性系数, β_{ii} 代表二次项系数, β_{ij} 代表交互项系数。

2 结果与分析

2.1 标准曲线与换算因素

根据齐墩果酸含量与吸光度相对应的关系, 绘制标准曲线如下图 1, 并由此得到回归方程为:

$$y = 0.009x - 0.0482, R^2 = 0.9971$$

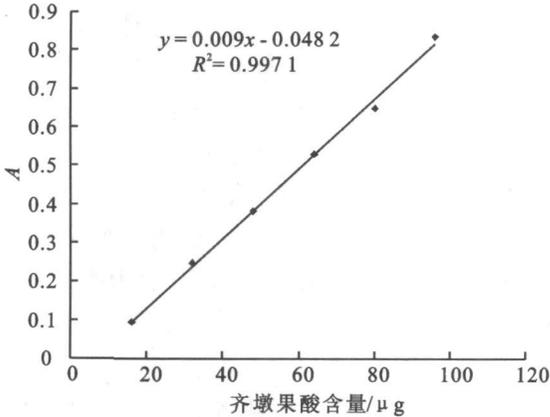


图 1 齐墩果酸标准曲线

Fig. 1 Standard curve of oleanolic acid

2.2 模型的建立与显著性分析

根据 RSM 设计, 选取 20 个实验点, 以乙醇体积分数、预处理剂倍数、时间 3 个主要因素作为自变量, 以提取率作为 RSM 响应值。表 2 为提取率试验值与模型预测值。结果进行二次多项回归拟合, 获得了预测相应值(提取率, Response)与乙醇体积分数($X_1, \%$)、倍数(X_2)、时间(X_3, min)的二次回归方程如下:

$$\begin{aligned} \text{提取率}(\%) = & 2.09 - 0.055X_1 + 0.073X_2 - \\ & 0.061X_3 - 0.054X_1X_2 - 0.011X_1X_3 - \\ & 0.019X_2X_3 - 0.070X_1^2 - 0.081X_2^2 - \\ & 0.27X_3^2 \end{aligned}$$

对模型方程进行方差分析表明, 该方程显著, 结果见表 3。通过校正决定系数(Adjusted coefficient of determination, R_{adj}^2)和相关系数(Correlation coefficient, R)来验证。此处 $R_{adj}^2 = 0.9395$, 表

明大约有 93% 的提取率变异分布在所研究的 3 个相关因素中, 其总变异度仅有 7% 不能由该模型来解释; 相关系数 R 为 0.9839, 表明提取率的实测值和预测值间有很好的拟合度; 失拟项 $P = 0.6030 > 0.05$, 表明方程的拟合不足检验不显著, 二次响应曲面回归方程能够很好的拟合本实验所得的结果, 自变量与响应值之间线性关系显著, 该模型可用于提取率试验的理论预测。

表 2 提取率试验值与模型预测值

Tab. 2 Measured values and predicted values of extracting yield

序号	乙醇体积分数 $X_1 / \%$	倍数 X_2	时间 X_3 / min	实测值 / %	预测值 / %
1	60.0	4.0	2.0	2.16	2.09
2	60.0	5.7	2.0	2.01	1.99
3	70.0	5.0	3.0	1.49	1.55
4	50.0	3.0	1.0	1.68	1.63
5	50.0	3.0	3.0	1.57	1.57
6	70.0	3.0	1.0	1.65	1.65
7	70.0	5.0	1.0	1.72	1.73
8	76.8	4.0	2.0	1.86	1.80
9	50.0	5.0	1.0	1.95	1.92
10	60.0	4.0	3.7	1.29	1.23
11	60.0	4.0	2.0	2.05	2.09
12	60.0	4.0	0.3	1.40	1.44
13	60.0	2.3	2.0	1.73	1.74
14	60.0	4.0	2.0	2.07	2.09
15	70.0	3.0	3.0	1.51	1.55
16	60.0	4.0	2.0	2.11	2.09
17	43.2	4.0	2.0	1.94	1.98
18	60.0	4.0	2.0	1.99	2.09
19	50.0	5.0	3.0	1.78	1.79
20	60.0	4.0	2.0	2.17	2.09

表 3 回归模型方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for second order polynomial model fitted to the response variable

变异源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	1.2826	0.1425	33.7661	< 0.0001
失拟项	5	0.0185	0.0037	0.7821	0.6030
纯误差	5	0.0237	0.0047		
综合	19	1.3249		$R = 0.9839; R^2 = 0.9681;$ $R_{adj}^2 = 0.9395$	

二次模型中回归系数的显著性检验表 4, 表明:

因素 X_1 、 X_2 、 X_3 都对提取效果的线性效应显著; 因素 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对提取效果的曲面效应显著; $X_1 X_2$ 对提取效果的交互影响显著(见图 2), $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 对提取效果的交互影响不显著(见图 3, 图 4)。

表 4 回归方程系数显著性检验

Tab. 4 Significance test for regression coefficients

系数项	自由度	回归系数	标准误差	置信下限	置信上限	F 值	P 值
Intercept	1	2.092 1	0.026 5	2.033 0	2.151 1	33.766 100	< 0.000 1
X_1	1	-0.054 5	0.017 6	-0.093 7	-0.015 3	9.617 126	0.011 2
X_2	1	0.073 3	0.017 6	0.034 1	0.112 5	17.379 940	0.001 9
X_3	1	-0.061 1	0.017 6	-0.100 3	-0.022 0	12.095 820	0.005 9
$X_1 \times X_2$	1	-0.053 8	0.023 0	-0.104 9	-0.002 6	5.475 992	0.041 3
$X_1 \times X_3$	1	-0.011 3	0.023 0	-0.062 4	0.039 9	0.239 889	0.634 9
$X_2 \times X_3$	1	-0.018 8	0.023 0	-0.069 9	0.032 4	0.666 359	0.433 3
$X_1 \times X_1$	1	-0.070 5	0.017 1	-0.108 6	-0.032 3	16.953 460	0.002 1
$X_2 \times X_2$	1	-0.081 1	0.017 1	-0.119 2	-0.042 9	22.441 390	0.000 8
$X_3 \times X_3$	1	-0.266 7	0.017 1	-0.304 8	-0.228 6	242.840 400	< 0.000 1

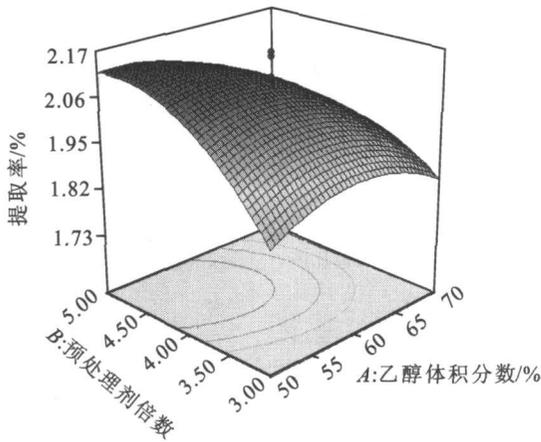


图 2 乙醇体积分数和预处理剂倍数交互影响提取率的响应面图

Fig. 2 Response surface of yield versus ethanol concentration and Multiple

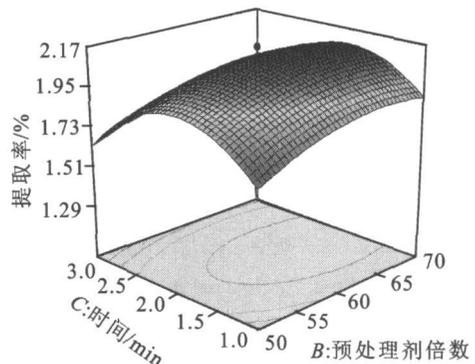


图 4 预处理剂倍数和时间交互影响提取率的响应面图

Fig. 4 Response surface of yield versus Multiple and extraction time

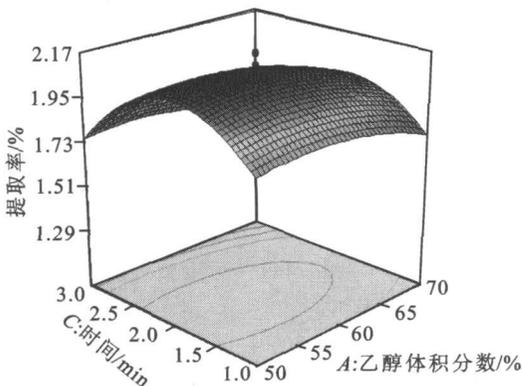


图 3 乙醇体积分数和微波处理时间交互影响提取率的响应面图

Fig. 3 Response surface of yield versus ethanol concentration and time

2.3 响应面优化

RSM 法的图形是响应值 Y 对应自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 构成的一个三维空间图及在二维平面上的等高线图, 等高线图可以直观的反映各因素对响应值的影响, 从试验所得响应面分析图上可以看出它们在反应过程中的相互作用, 确定合适的工艺条件。对前面所获得的第一个模型方程系数进行显著性检验, $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 项不显著, 舍去该项优化模型, 可以得到优化后的回归方程为: 提取率(%) = $2.09 - 0.055 \times X_1 + 0.073 \times X_2 - 0.061 \times X_3 - 0.054 X_1 \times X_2 - 0.070 \times X_1^2 - 0.081 X_2^2 - 0.27 \times X_3^2$

去掉 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$, 项后方程中 $R_{Adj}^2 = 0.945 0$, 表明调整后的模型与调整前的模型对提取率变异的描述准确程度相当; 而 $R^2 = 0.965 3$, 表明调整后的模型和调整前的模型在实测值和预测值拟合度基本一致。利用优化后的模型, 通过对二次多项式数学模型的解逆矩阵, 求出最大提取率的工艺条

件:乙醇体积分数 53.6%、预处理剂倍数为 4.66 倍、处理时间 1.89 min, 预测北五味子总三萜提取率达到 2.137%。

为了验证回归模型的有效性,根据推断的最佳工艺参数和实际操作过程中的可行性进行验证实验,乙醇体积分数 53%、预处理剂倍数为 4.6 倍、处理时间 2 min 的条件下,进行验证试验,实测提取率(2.021 ± 0.123)%,与预测值较接近。结果表明实际测量值接近预测值,说明该模型是合理有效的具有一定的实际指导意义。

3 结 语

利用统计学方法建立了微波辅助提取北五味子总三萜的二次多项数学模型。通过对模型进行

分析,获得影响提取率的最佳萃取条件,并利用模型方程对提取率进行预测。由二次多项回归系数显著性检验表明:最大提取率的工艺条件:乙醇体积分数 53.6%、预处理剂倍数为 4.66 倍、处理时间 1.89 min, 预测北五味子总三萜提取率达到 2.137%。为了验证回归模型的有效性,根据推断的最佳工艺参数和实际操作过程中的可行性进行验证实验,乙醇体积分数 53%、预处理剂倍数为 4.6 倍、处理时间 2 min 的条件下,进行验证试验,实测提取率(2.021 ± 0.123)%,与预测值较接近。研究结果证明,采用 Central Composite 设计实验法对北五味子总三萜微波辅助提取条件进行优化,不仅科学合理,而且快速高效,具有很强实际生产指导作用。

参考文献(References):

- [1] 钱竹,徐鹏,章克昌,等. 大树树脂分离提取发酵液中灵芝三萜类物质[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 111- 115.
QIAN Zhu, XU Peng, ZHANG Kechang, et al. Extraction of ganoderic triterpenes from fermented broth by macroporous resin[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(6): 111- 115. (in Chinese)
- [2] 崔月花,丁重阳,章克昌. 一种灵芝三萜皂甙新物质的分离鉴定和结构推断[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 3(27): 60- 63.
CUI Yuehua, Ding chongyang, ZHANG, Kechang. Separation, purification and structure deduction of a saponin from ganoderma lucidum[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 3(27): 60- 63. (in Chinese)
- [3] 纵伟,夏文水,崔宝良,等. 大叶紫薇叶中降血糖活性成分的筛选[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3): 67- 71.
ZHONG Wei, XIA Wen shui, CUI Baoliang, et al. Screening of lagerstroemia speciosa leaves constituents Hypoglycemic Activity[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(3): 67- 71. (in Chinese)
- [4] XIAO Weilie, LIRongtao, LIShenghong, et al. Lancifodilactone F: A novel nortriterpenoids possessing a unique skeleton from schisandra lancifolia and its anti HIV activity[J]. *Organic letters*, 2005, 7(7), 1263- 1266.
- [5] Li Rongtao, Zhao Qirshi, Li Shenghong, et al. Micrandilactone A: a novel triterpene from schisandra micrantha[J]. *Organic Letters*, 2003, 5, 1023- 1026.
- [6] 李亚萍,程卫东,詹萍,等. 响应面法优化微波辅助提取β-胡萝卜素工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 487- 490.
LI Yaping, CHENG Weidong, ZHAN Ping, et al. Optimization for microwave assisted extraction of β-carotene by response surface method[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(4): 487- 490. (in Chinese)
- [7] 王娜,潘治利,谢新华,等. 红枣渣中芦丁的提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 185- 188.
WANG Na, PAN Zhili, XIE Xinhua, et al. Optimization of ethanol extraction of rutin from of Chinese jujube residue by response surface methodology[J]. *Food Science*, 2009, 30(16): 185- 188. (in Chinese)
- [8] 陈芹芹,李景明,胡雪芳,等. 响应面法优化超临界 CO₂ 流体萃取苹果籽油的工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 30(14): 47- 51.
CHEN Qinqin, LI Jingming, HU Xuefang, et al. Optimization of supercritical CO₂ fluid extraction of apple seed oil using response surface methodology[J]. *Food Science*, 2008, 30(14): 47- 51. (in Chinese)
- [9] 徐响,孙丽萍,董捷. 响应面法优化蜂胶超临界二氧化碳萃取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 30(8): 86- 89.
XU Xiang, SUN Liping, DONG Jie. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of effective components from propolis using response surface methodology[J]. *Food Science*, 2008, 30(8): 86- 89. (in Chinese)
- [10] 李蕾,岳喜华,于欢,等. 响应面法优化酸浆果多糖的提取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 53- 56.
LI Lei, YUE Xiuhua, YU Huan, et al. Optimization of the extraction of polysaccharide (PAP) by response surface analysis[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(1): 53- 56. (in Chinese)