

二次正交旋转超声制备黄芪多糖及其抗氧化性分析

宋照风, 周子凡, 朱峰, 赵海全

佛山科学技术学院, 广东 佛山
Email: 270418231@qq.com

收稿日期: 2020年9月26日; 录用日期: 2020年10月7日; 发布日期: 2020年10月14日

摘要

该文主要研究利用超声辅助来提取黄芪多糖。通过醇沉、旋转蒸发浓缩, 获得提纯过后的黄芪多糖粉末。然后再通过苯酚-硫酸法来测定出多糖的含量。以单因素实验的实验结果为基础来设计二次正交旋转试验, 从而得出黄芪多糖提取率的最佳工艺条件。即当液料比为1:7, 超声时间为15 min, 水浴时间为50 min, 水浴温度为70°C时, 提取率靠近最佳值为2.19%。并且通过对黄芪多糖进行红外光谱解析, 可以证实实验制备所获得的样品是多糖。然后对该实验制备出来的黄芪多糖进行抗氧化性测定。通过羟基自由基清除作用来测定其抗氧化性的能力大小。运用了芬顿法和水杨酸法两种方法, 测定出当黄芪多糖的浓度在1 mg·mL⁻¹时, 自由基的清除率分别为15.58%和33.2%。从而证明了黄芪多糖具有良好的抗氧化能力。

关键词

黄芪多糖, 超声提取, 二次正交旋转, 抗氧化测定, 羟基自由基的清除

Preparation and Antioxidant Activity of *Astragalus* Polysaccharides by Quadratic Rotation-Orthogonal Combination Design

Zhaofeng Song, Zifan Zhou, Feng Zhu, Haiquan Zhao

Foshan University, Foshan Guangdong
Email: 270418231@qq.com

Received: Sep. 26th, 2020; accepted: Oct. 7th, 2020; published: Oct. 14th, 2020

Abstract

This paper mainly studies the use of ultrasound to extract the polysaccharide. The polysaccharide

powder is obtained after purification by the concentration of alcohol and spin evaporation. The polysaccharide is then measured by the phenol sulfate method. According to the experimental results of single-factor experiment, the optimum technological conditions of the extraction rate of the polysaccharide were obtained. When liquid ratio is 1:7, ultrasonic time for 15 min, water bath time is 50 min, water bath temperature of 70°C, the extraction yield close to the optimal value of 2.19%. And by analyzing the infrared spectra of *Astragalus* polysaccharide, it can be proved that the samples obtained were polysaccharide. The antioxidant properties of *Astragalus* polysaccharide were determined by the experiment. The antioxidant ability was determined by hydroxyl radical removal. Using the two methods of fenton and salicylic acid, the free radical removal rate was 15.58% and 33.2%, respectively, when the polysaccharide concentration was 1 mg·mL⁻¹. It is proved that the polysaccharide has good antioxidant ability.

Keywords

***Astragalus* Polysaccharide, Ultrasonic Extraction, Two Orthogonal Rotation, Antioxidation, Hydroxyl Radical Scavenging**

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黄芪，又名绵芪。它是豆科植物。同时，它属于豆科黄芪属。黄芪的味道甘甜，性微温，具有补气固表、敛疮生肌等功效[1]。它是一种平常容易见到的补益中药。它的主要化学成分有黄酮类、氨基酸皂苷类、黄芪多糖等许多种具有活性的天然成分。在目前的医药学专研中，发现黄芪具有治愈各类疾病的作用，也能用来增加生命体的免疫力。

黄芪多糖是黄芪活性物质中最重要的天然有效成分之一。目前，黄芪多糖能水解出 5 种单糖。经鉴定可知道 4 种单糖，分别是：葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、阿拉伯糖和葡萄糖。其中主要的有效成分是阿拉伯糖与葡萄糖的多聚体。它具有强的抗氧化性，是天然抗氧化剂家族中重要的一员。同时，它可以被用来当作抗氧化剂在特定的环境下使用。在另一方面，它对人体有强健作用，可以增强机体的免疫功能，能促进免疫器官功能和抗体生成[2]。同时，它也起到强健心脏和保护心血管系统的作用，对于机体的降压、降血糖等有着很强的功效与帮助，具有血糖进行双向调节的作用。在其他方面，黄芪多糖能对骨髓中的造血干细胞的增加起到促进作用，从而重筑血管。也对人体的组织的修复有着促进和优化的作用。这使得黄芪多糖在中医临床和疾病防治等领域都得到了普遍的应用。

近年来又增加了几种从植物中提取多糖的新技术。它包括超临界流体萃取法，超声波提取法和微波提取法[3]。其间，相比于其他方式，超声波提取法对植物的结构与分子活性的伤害更低。同时，超声波能够破坏细胞壁，去掉细胞壁的阻碍，利用它的空化作用，增加了溶解与扩散的能力，让溶剂能更轻松地进入细胞内，从而有效地溶解多糖，增加了多糖的提取速率，极大地提高了它的产率。

因为传统的水浴法提取相比于其他方法能获得的更多的多糖，可是这种方法的提取速度较慢。因此，本实验采用的是先超声辅助提取后直接水浴提取的方法。其原理是先通过超声的空化作用，破坏细胞壁，改变渗透压，加速多糖的扩散，从而加快多糖的提取速度，然后直接水浴提取，使多糖能充分地溶解出来，得到更多的多糖。

2. 材料与方法

2.1. 主要原料和仪器

黄芪购于广东省佛山市御嘉中药饮片有限公司, 硫酸、无水乙醇来自广东光华科技股份有限公司, 苯酚购于天津市百世化工有限公司。TENSOR27 傅立叶变换红外光谱(德国布鲁克公司), RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂), UV-1100 型紫外/可见光分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 超声法提取黄芪多糖的流程

将购买来的片状黄芪用搅拌机碎成粉状, 然后过 60 目筛。然后准确称取 5g 干粉置于锥形瓶中, 根据固液比(1:10, 1:15, 1:20, 1:25, m/V, g/mL)加入蒸馏水, 在单槽式超声清洗机中根据超声时间(10, 15, 20, 25 min)进行提取。超声提取后, 将锥形瓶放在 HH-2 数显恒温水浴锅中, 按照水浴时间(30, 40, 50, 60 min)和水浴提取温度(55°C, 60°C, 65°C, 70°C)进行水浴提取。水浴提取后, 用纱布过滤掉大部分滤渣。收集滤液于 4000 r/min 常温下离心 10 min, 取上清液。向上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇进行沉淀, 置于室内过夜。隔天以 4000 r/min 离心 10 min。取沉淀在烘箱内 50°C 烘干, 获得粗产品。

2.2.2. 黄芪多糖含量的测定方法

1) 苯酚-硫酸分光光度法

多糖在加热和强酸的条件下能很快地水解成单糖。同时, 单糖在强酸的条件下能与苯酚反应生成橙色衍生物。这种橙色衍生物在波长 490 nm 处有最大吸收, 可用分光光度法进行定量分析[4]。

2) 标准曲线的绘制

准确用移液管移取 0、5、10、15、20 mL 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液分别置于 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度线定容, 摇匀后, 配成标准溶液。准确移取上述各标准溶液 2.0 mL 于试管中, 分别加入 5% 苯酚溶液 2 mL, 摇匀。然后边摇动试管边慢慢加入 5 mL 95%浓硫酸溶液, 摇动 2 min。将它置于沸水浴上加热 15 min, 然后放在冷水浴中冷却 30 min。在波长 490 nm 处测定其吸光度。以标准溶液浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线如图 1, 由图 1 得到回归方程 $y = 8.09x + 0.003$ $R^2 = 0.9994$

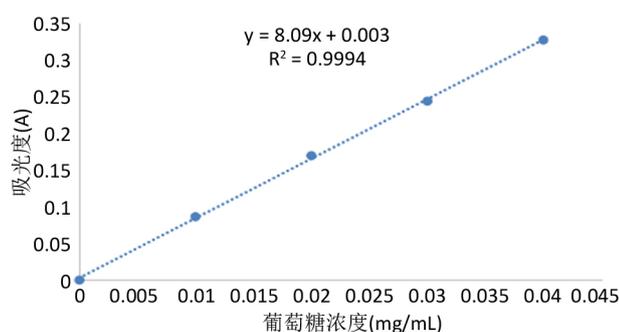


Figure 1. Glucose standard curve

图 1. 葡萄糖标准曲线

3) 多糖含量的测定

将粗多糖在烧杯中溶解, 然后倒入 100 ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度线。再从上述溶液中用吸量管准确量取出 2 ml 溶液于 50 ml 的容量瓶中, 加蒸馏水至刻度线。再从该 50 ml 的容量瓶的溶液中准确量取 2 ml 溶液于试管中, 采用苯酚-硫酸分光光度法, 在 490 nm 的波长下测量吸光度值, 根据葡萄糖的标准曲线, 可以得出黄芪多糖的提取率。

2.3. 实验设计

2.3.1. 黄芪多糖提取的单因素实验设计

超声辅助提取在实验过程中的影响因素为：液料比、超声时间、水浴时间、水浴温度。它们对提取率的影响可采用一个因素变化而其他因素不变的方法进行实验测定，并且每个因素都要进行测定。根据查阅的文献，对黄芪多糖的提取设计如表 1 的单因素和水平设计。

Table 1. Design of factors and levels in single factor design

表 1. 单因素设计中的因素和水平设计

因素	水平			
液料比(W) X_1	1:10	1:15	1:20	1:25
超声时间(min) X_2	10	15	20	25
水浴时间(min) X_3	30	40	50	60
水浴温度($^{\circ}\text{C}$) X_4	55	60	65	70

2.3.2. 二次正交旋转结合设计

二次正交旋转组合设计是国外近年应用较多的一种实验设计方法。结合了响应面优化法，并且通过统计软件对实验结果进行非线性数学模型拟合。与以往常用的正交设计、均匀设计相比，是将正交、回归、均匀和较高饱和程度融为一体的一种试验设计方法[5]。它不但具有试验次数少、计算简便、回归系数间无相关性的优点。并且还可以利用旋转性克服预测值的方差对试验点在因子空间中位置的依赖性，是一种较好的设计方案[6]。

二次正交旋转组合设计是基于单因素的实验，用于进一步优化黄芪多糖的提取方法。它的因素主要是对黄芪多糖提取工艺影响较大的因素，即液料比、超声时间、水浴时间、水浴温度 4 个主要因素。它的水平主要遵循任意两个物理量之间的差值与对应代码之间差值成等比的原则。由于该试验是四因素四水平的单因素试验，且通过该实验最优的液料比(X_1)、超声时间(X_2)、水浴时间(X_3)、水浴温度(X_4)四个因素可得到它的二次正交旋转设计为四因素五水平的二次正交旋转实验。

2.4. 黄芪多糖红外光谱检测

黄芪多糖的结构可以采用傅里叶红外光谱来鉴别它的官能团，从而判断出其结构式。测定采用溴化钾压片法，把样品与 100 mg 干燥溴化钾混合均匀研磨，然后 10 MP 下压成 1 毫米厚度的片状，在 4000~400 cm^{-1} 区间进行红外光谱扫描，测定并观察谱峰情况[7]。

2.5. 黄芪多糖的抗氧化分析-自由基的清除

2.5.1. 机理

羟基自由基是一种具有较强氧化能力的自由基。同时，它也是在目前科学发展中已知的在人体中最活泼的自由基。它是通过细胞代谢产生的具有高度活性的物质，而且它还可以诱导氧化反应引起细胞膜的损坏，降低生物酶活性，引起生物体内代谢紊乱，最终导致胞突变或坏死，诱发各种疾病如肿瘤、血管疾病等，对人体危害极大[8]。所以，清除羟基自由基对保护生命系统有着至关重要的作用。同时，羟基自由基的清除能力成为抗氧化活性能力检测评价的重要指标之一。

2.5.2. 芬顿法

检测方法：依次向 50 mL 容量瓶中加入 2 mmol/mL 邻二氮菲溶液 10.00 mL，缓冲溶液 5 mL，硫酸

亚铁铵溶液 10.00 mL, 1.00 mL 的某一浓度的黄芪提取液, 3%过氧化氢溶液 1.00 mL, 用蒸馏水补充体积, 每加一次试剂均需立即摇匀, 反应液在 37℃ 恒温水浴槽中保温 60 min, 于 536 nm 波长下测定吸光度, 平行三次, 根据公式, 计算提取液对羟基自由基的清除率。

$$\text{清除率 } I_1 \% = [(A_2 - A_1) / (A_0 - A_1)] \times 100$$

A_2 ——加黄芪提取液及过氧化氢溶液后混合液的吸光度。

A_1 ——未加黄芪提取液, 只加过氧化氢溶液的吸光度。

A_0 ——未加黄芪提取液及过氧化氢溶液的吸光度[9]。

2.5.3. 水杨酸法

检测方法: 分别配制 1 mg/mL 黄芪多糖溶 3 组于玻璃试管中, 依次加入 9 mmol/L FeSO_4 溶液 1 mL、9 mmol/L 水杨酸 - 乙醇溶液 1 mL、蒸馏水 6 mL, 摇匀, 用保鲜膜封住试管口[10]。以等体积的蒸馏水代替样品溶液作空白对照(A_0), 以蒸馏水代替 H_2O_2 溶液测得吸光度(A_c)。最后加入 1 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液启动反应, 37℃ 恒温水浴 1 h, 在 510 nm 波长处测定吸光度(A_x)。实验结果用清除率(I_2)表示, 则

$$I_2 \% = [A_0 - (A_x - A_c)] / A_0 * 100$$

$I_2\%$ ——羟自由基清除率。

A_x ——多糖 + FeSO_4 + 水杨酸 + H_2O_2 。

A_c ——多糖 + FeSO_4 + 水杨酸 + 蒸馏水。

A_0 —— FeSO_4 + 水杨酸 + H_2O_2 + 蒸馏水。

3. 结果与分析

3.1. 黄芪多糖超声提取的单因素实验

3.1.1. 液料比对多糖提取率的影响

取 5 g 干粉置于锥形瓶中, 根据固液比(1:10, 1:15, 1:20, 1:25, m/V, g/mL)加入蒸馏水。在单槽式超声清洗机中超声 15 min 后, 将锥形瓶置于 HH-2 数显恒温水浴锅中, 在 60℃ 的温度下水浴提取 40 min。水浴提取后, 用纱布过滤掉大部分滤渣, 收集提取液。将提取液于 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液。向上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇进行沉淀, 放置过夜。次日以 4000 r/min 离心 10 min, 取沉淀在烘箱内 50℃ 烘干, 得到粗多糖。将该粗多糖溶解于 100 ml 容量瓶中稀释后进行分光光度的测量。结果如图 2 数据表所示:

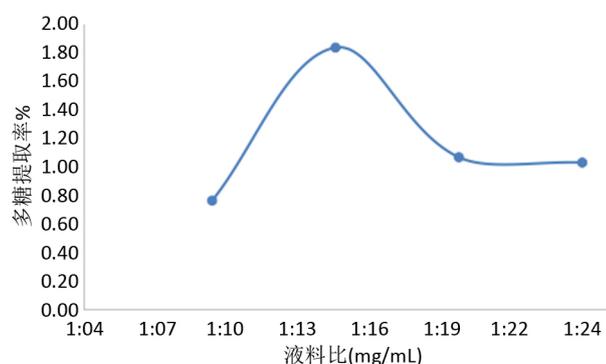


Figure 2. Relation between extraction rate of polysaccharide and liquid material ratio

图 2. 多糖提取率与液料比关系图

由图 2 的结果分析,由于不同比例的液料比的影响,多糖含量的提取率出现了先增加后减少的趋势。黄芪多糖从黄芪细胞到溶剂是一个由浓度差推动的扩散过程。溶剂用量越多,将会导致外部溶剂与黄芪细胞内部的浓度差越大。这样使得推动力越大,扩散到溶剂里的多糖就越多。增加溶剂的用量在一定程度上能通过增大浓度差来促进多糖的提取。但是随着溶剂的增加,溶液的粘度增加,导致向内部组织扩散距离的延长,从而提取率减小[11]。从实验结果显示,当液料比在 1:15 时,多糖提取率最高。

3.1.2. 超声时间对多糖提取率的影响

取 5 g 干粉置于锥形瓶中,根据固液比 1:15 加入蒸馏水。在单槽式超声清洗机中超声(10, 15, 20, 25 min)后,将锥形瓶置于 HH-2 数显恒温水浴锅中,在 60℃ 的温度下水浴提取 40 min。水浴提取后,用纱布过滤掉大部分滤渣,收集提取液。将提取液于 4000 r/min 离心 10 min,取上清液。向上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇进行沉淀,放置过夜。次日以 4000 r/min 离心 10 min,取沉淀在烘箱内 50℃ 烘干,得到粗多糖。将该粗多糖溶解于 100 ml 容量瓶中稀释后进行分光光度的测量。结果如图 3 数据表所示:

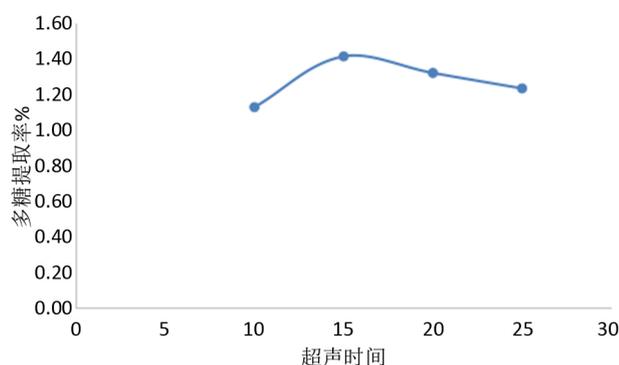


Figure 3. Relation between extraction rate of polysaccharides and ultrasonic time

图 3. 多糖提取率与超声时间关系图

由图 3 的结果分析,由于不同的超声时间的影响,多糖含量的提取率出现了先增加后减少的趋势。由于超声波可能引起植物的声空化和细胞壁破裂,气泡的破裂将促进渗透将溶剂溶解到植物细胞中,溶解多糖[12],从而使多糖的含量增加。但是当超声时间增加到一定值时,多糖的溶解会受到抑制的影响,导致含量降低。从实验结果显示,当超声时间为 15 min 时,多糖提取率最高。

3.1.3. 水浴时间对多糖提取率的影响

取 5 g 干粉置于锥形瓶中,根据固液比 1:15 加入蒸馏水。在单槽式超声清洗机中超声 15 min 后,将锥形瓶置于 HH-2 数显恒温水浴锅中,在 60℃ 的温度下水浴提取(30, 40, 50, 60 min)。水浴提取后,用纱布过滤掉大部分滤渣,收集提取液。将提取液于 4000 r/min 离心 10 min,取上清液。向上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇进行沉淀,放置过夜。次日以 4000 r/min 离心 10 min,取沉淀在烘箱内 50℃ 烘干,得到粗多糖。将该粗多糖溶解于 100 ml 容量瓶中稀释后进行分光光度的测量。结果如图 4 数据表所示。

由图 4 的结果分析,由于不同的水浴时间的影响,多糖含量的提取率出现了先增加后减少的趋势。水浴提取时间的增加能让黄芪中的多糖在水中充分溶解,使多糖含量增加。但过了一定时间后,水浴提取时间的延长不再使多糖产量得到提高。可能是多糖提取达到动态平衡,因此不会使提取率提高。随着时间的增加,多糖甚至会分解,导致含量降低。实验结果显示,当水浴时间为 40 min 时,多糖提取率最高。

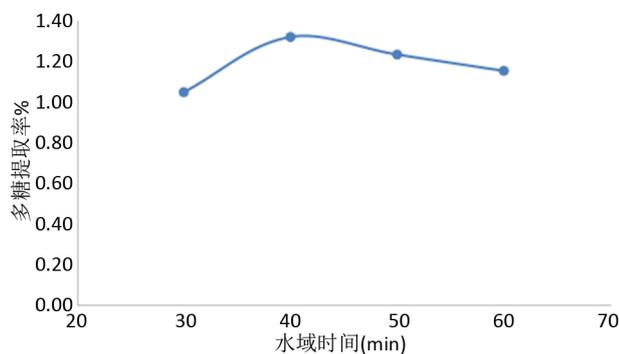


Figure 4. Relation between extraction rate of polysaccharide and water bath time

图 4. 多糖提取率与水浴时间关系图

3.1.4. 水浴温度对多糖提取率的影响

取 5 g 干粉置于锥形瓶中, 根据固液比 1:15 加入蒸馏水。在单槽式超声清洗机中超声 15 min 后, 将锥形瓶置于 HH-2 数显恒温水浴锅中, 在(55℃, 60℃, 65℃, 70℃)的温度下水浴提取 40 min。水浴提取后, 用纱布过滤掉大部分滤渣, 收集提取液。将提取液于 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液。向上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇进行沉淀, 放置过夜。次日以 4000 r/min 离心 10 min, 取沉淀在烘箱内 50℃ 烘干, 得到粗多糖。将该粗多糖溶解于 100 ml 容量瓶中稀释后进行分光光度的测量。结果如图 5 数据表所示:

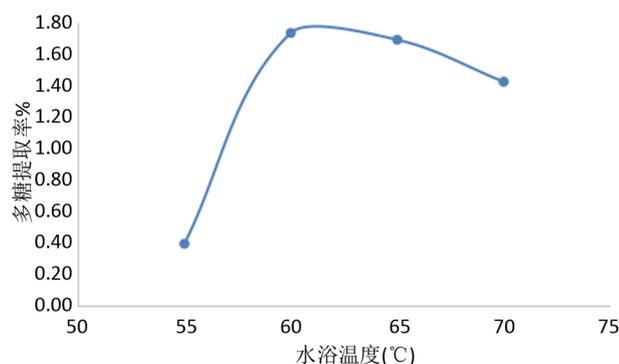


Figure 5. Relationship between extraction rate of polysaccharide and water bath temperature

图 5. 多糖提取率与水浴温度关系图

由图 5 的结果分析, 由于水浴温度的不同, 多糖含量的提取率出现了先增加后减少的趋势。当温度过低的时候, 多糖在水中的溶解能力会降低, 导致在低温下溶解多糖的量降低。由于温度的升高, 分子的动能也会增加。溶剂的渗透力和溶解力也会随之提高, 促进了多糖溶解在提取溶剂中。但随之温度升高到一定值时, 多糖不再溶解。反而因温度的过高而导致多糖的分解, 从而使含量降低。实验结果显示, 当水浴温度为 60℃ 时, 多糖提取率最高。

3.2. 黄芪多糖提取的优化

3.2.1. 正交旋转中心结合设计

以单因素的实验最佳值的结果(即液料比为 1:15、超声时间为 15 min、水浴时间为 40 min、水浴温度为 60℃)为基准, 设计二次旋转正交实验优化黄芪多糖的水浴加热提取工艺。设计四因素五水平的二次旋转正交实验: 液料比(X_1), 超声时间(X_2), 水浴时间(X_3), 水浴温度(X_4)。四个因素变量从小到大被编码

成五个水平从-2 到 2, 以黄芪多糖的提取率为目标, 运用数据处理软件 SAS 得出, 整个实验 36 组。二次旋转正交实验设计具体如表 2、表 3 如下[5] [6]:

Table 2. Factor and level design in orthogonal rotating design

表 2. 正交旋转设计中的因素和水平设计

因素	标志	水平				
		-2	-1	0	1	2
液料比(W)	X ₁	1:5	1:10	1:15	1:20	1:25
超声时间(min)	X ₂	5	10	15	20	25
水浴时间(min)	X ₃	30	40	50	60	70
水浴温度(°C)	X ₄	50	55	60	65	70

Table 3. Design table of two rotating orthogonal experiment

表 3. 二次旋转正交实验设计表

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	产率(%)
1	1	1	1	1	1.64
2	1	1	1	-1	1.22
3	1	1	-1	1	1.67
4	1	1	-1	-1	0.97
5	1	-1	1	1	1.14
6	1	-1	1	-1	1.46
7	1	-1	-1	1	1.08
8	1	-1	-1	-1	0.93
9	-1	1	1	1	2.00
10	-1	1	1	-1	0.80
11	-1	1	-1	1	2.19
12	-1	1	-1	-1	0.81
13	-1	-1	1	1	2.11
14	-1	-1	1	-1	1.00
15	-1	-1	-1	1	1.46
16	-1	-1	-1	-1	0.76
17	-2	0	0	0	0
18	2	0	0	0	1.66
19	0	-2	0	0	1.03
20	0	2	0	0	1.61
21	0	0	-2	0	0.17
22	0	0	2	0	1.25
23	0	0	0	-2	0.48
24	0	0	0	2	1.46
25	0	0	0	0	1.66
26	0	0	0	0	1.92

Continued

27	0	0	0	0	1.72
28	0	0	0	0	1.73
29	0	0	0	0	1.77
30	0	0	0	0	1.90
31	0	0	0	0	1.64
32	0	0	0	0	1.68
33	0	0	0	0	1.69
34	0	0	0	0	1.74
35	0	0	0	0	1.68
36	0	0	0	0	1.73

3.2.2. 建立和回归方程试验

Table 4. Variance analysis of experimental results

表 4. 实验结果的方差分析表

因子	自由度	参数估计	标准差	t 值(F 值)	Pr > t
Intercept	1	-53.53	15.72	-3.40	0.0027
X ₁	1	17.58	6.99	2.51	0.0202
X ₂	1	-1.74	6.99	-0.25	0.8059
X ₃	1	56.44	19.40	2.91	0.0084
X ₄	1	56.27	23.96	2.35	0.0288
X ₁ ²	1	-4.14	1.50	-2.76	0.0118
X ₄ ²	1	-1.07	1.50	-0.71	0.4825
X ₃ ²	1	-28.14	8.64	-3.26	0.0038
X ₄ ²	1	-25.57	11.77	-2.17	0.0414
X ₁ *X ₂	1	0.66	2.12	0.31	0.7602
X ₁ *X ₃	1	0.44	5.09	0.09	0.9313
X ₁ *X ₄	1	-15.05	5.94	-2.53	0.0193
X ₂ *X ₃	1	-5.47	5.09	-1.08	0.2946
X ₂ *X ₄	1	9.01	5.94	1.52	0.1443
X ₃ *X ₄	1	-5.46	14.25	-0.38	0.7055

Table 5. Table of the variance analysis of two rotating orthogonal experiment (1)

表 5. 二次旋转正交实验方差分析表(1)

来源	自由度	平方和	均方	F 值	Pr>F
模型	14	7.13	0.51	4.42	0.0011
误差	21	2.42	0.12		
合计	35	9.55			

Table 6. Table of the variance analysis of two rotating orthogonal experiment (2)
表 6. 二次旋转正交实验方差分析表(2)

均方误差	因变量均值	变异系数	R ²	Adj R ²
0.34	1.38	24.57	0.75	0.58

实验数据根据 SAS 软件拟合结果表 4, 黄芪多糖的提取率 Y 与各因素变量遵循以下相关方程:

$$Y = -53.53 + 17.58X_1 - 1.74X_2 + 56.44X_3 + 56.27X_4 - 4.14X_1^2 - 1.07X_2^2 - 28.14X_3^2 - 25.57X_4^2 + 0.66X_1 * X_2 + 0.44X_1 * X_3 - 15.05X_1 * X_4 - 5.47X_2 * X_3 + 9.01X_2 * X_4 - 5.46X_3 * X_4.$$

其中 Y 是黄芪多糖的提取率, X₁、X₂、X₃、X₄ 变量分别为液料比、超声时间、水浴时间、水浴温度。

由表 5、表 6 所示二次旋转正交实验的方差分析, 二次回归方程的较高的 F 值(F = 4.42)以及低 P 值(P = 0.0011), 表明了该二次回归方程有比较可靠的统计学意义。该模型能够满足预测变量的范围, F 值和 P 值一般是用来检测每一个系数的意义。由表 5 的数据可以知道, X₁, X₃, X₄, X₁², X₃², X₄², X₁X₄ 的系数具有较高显著性(Pr < 0.05), 除此之外其他因子的系数均没有显著性。除去没有显著性的因子, 用 SAS 软件再拟合, 得到以下优化的方程:

$$Y = -53.53 + 17.58X_1 + 56.44X_3 + 56.27X_4 - 4.14X_1^2 - 28.14X_3^2 - 25.57X_4^2 - 15.05X_1 * X_4.$$

根据对优化后的二次回归方程求导可以得出: 最佳的条件为 X₁ (液料比) = 1:7, X₂ (超声时间) = 15 min, X₃ (水浴时间) = 50 min, X₄ (水浴温度) = 70℃。由该条件进行三次平行实验可得:

Table 7. Best conditions for parallel experimental tables
表 7. 最佳条件的平行实验表

项目	1	2	3	平均值
提取率(%)	2.09	2.21	2.11	2.14

由表 7 可知: 在该条件下得出的提取率(Y)接近预测值(Y = 2.19%), 表明了该条件为最优实验条件, 适用于黄芪多糖的提取。

如表 4 所示, 根据 F 值可以看出, 四个因素对黄芪多糖提取率的影响程度分别是 X₃ (水浴时间) > X₁ (液料比) > X₄ (水浴温度) > X₂ (超声时间)。另外, 方差分析结果显示: 除 X₂ (超声时间)对提取率没有显著影响(Pr > 0.05)外, 其他 3 个单因素对黄芪多糖的提取率都有显著的影响(P < 0.05)。

3.2.3. 响应面分析

响应面的三维空间图是对二次回归方程的解释, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 是解决多变量问题的一种统计方法[13]。它是一种用直观的方法来了解每个变量之间的关系, 从而测量两个变量之间的关系[14]。陡峭的响应面表明变量之间有统计学意义。另外, 响应面平面投影反映了两因素之间的相互作用强度, 平面投影的形状, 圆形或椭圆形反映相互作用是否明显。另外, 每一幅图都表示当两个因子在二次旋转正交实验的零水平时, 其他两个因子相互作用的情况。故使用 matlab 软件进行分析, 得到分析图排列具体如图 6~11 所示。

由图 6~11 分析可知: 液料比与超声时间, 液料比与水浴时间, 水浴时间与水浴温度对于多糖的提取率的影响比液料比与水浴温度, 液料比与水浴时间, 超声时间与水浴温度的影响要大。

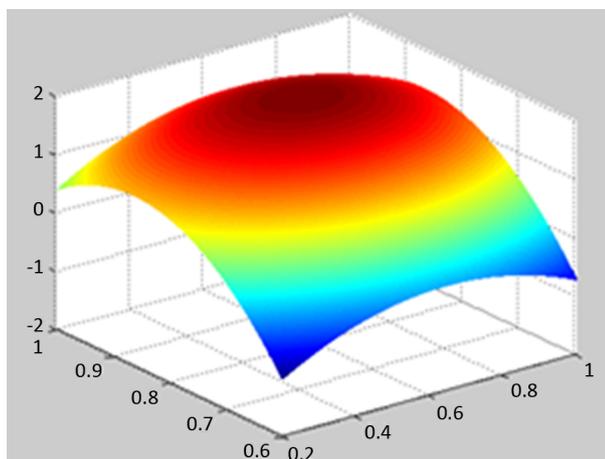


Figure 6. The relation between liquid to material ratio and ultrasonic time

图 6. 液料比与超声时间相互关系

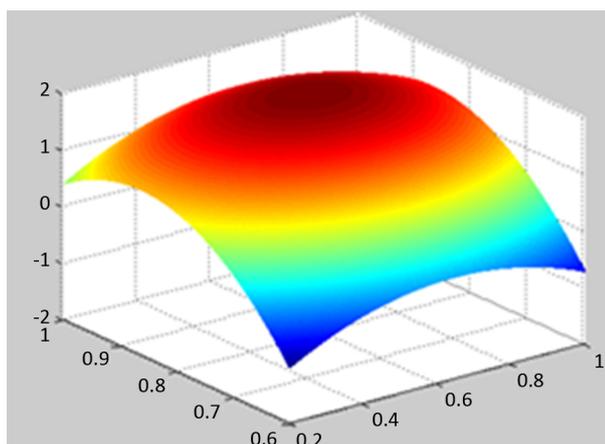


Figure 7. The relationship between liquid to feed ratio and bath time

图 7. 液料比与水浴时间相互关系

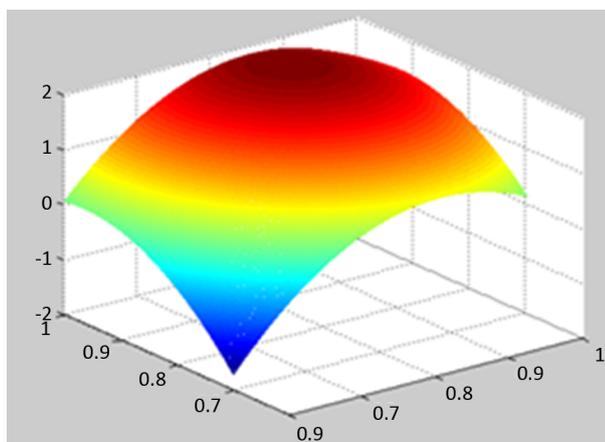


Figure 8. Relationship between water bath time and water bath temperature

图 8. 水浴时间与水浴温度间相互关系

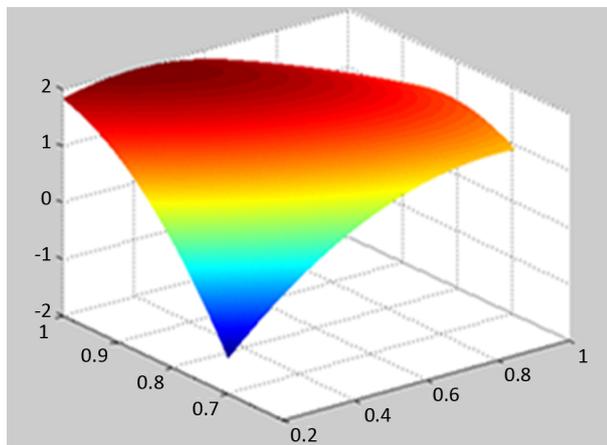


Figure 9. The relationship between liquid to feed ratio and water bath temperature

图 9. 液料比与水浴温度间相互关系

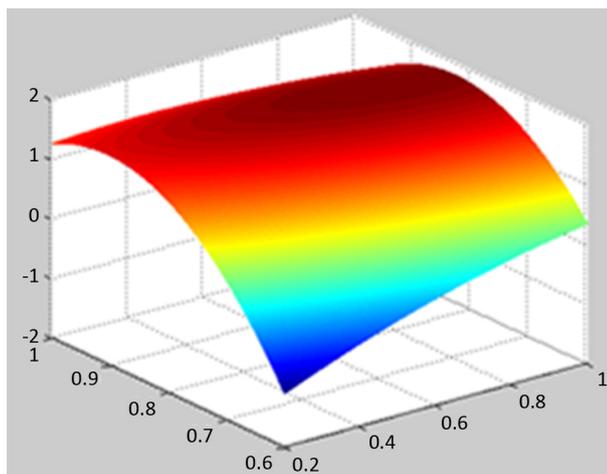


Figure 10. The relationship between liquid to feed ratio and bath time

图 10. 液料比与水浴时间相互关系

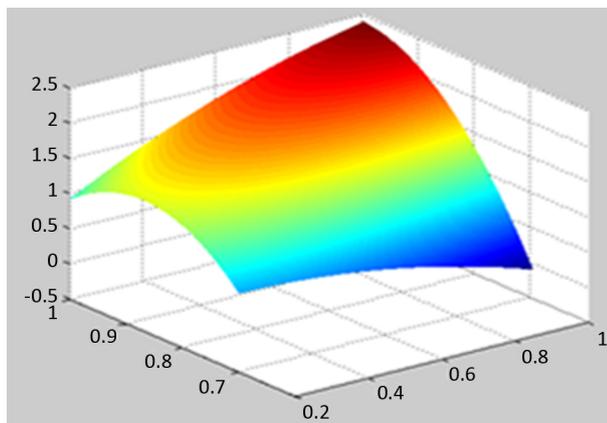


Figure 11. Relationship between ultrasonic time and water bath temperature

图 11. 超声时间与水浴温度间相互关系

3.3. 黄芪多糖的红外光谱分析

糖类通常在 $3600\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ 会出现一组宽峰,即 O-H 的伸缩振动,而且在更低的区域 $2920\sim 2990\text{ cm}^{-1}$ 会出现比较弱的吸收峰 C-H, 在这区域的两组吸收峰即为糖类的特征峰[15]。

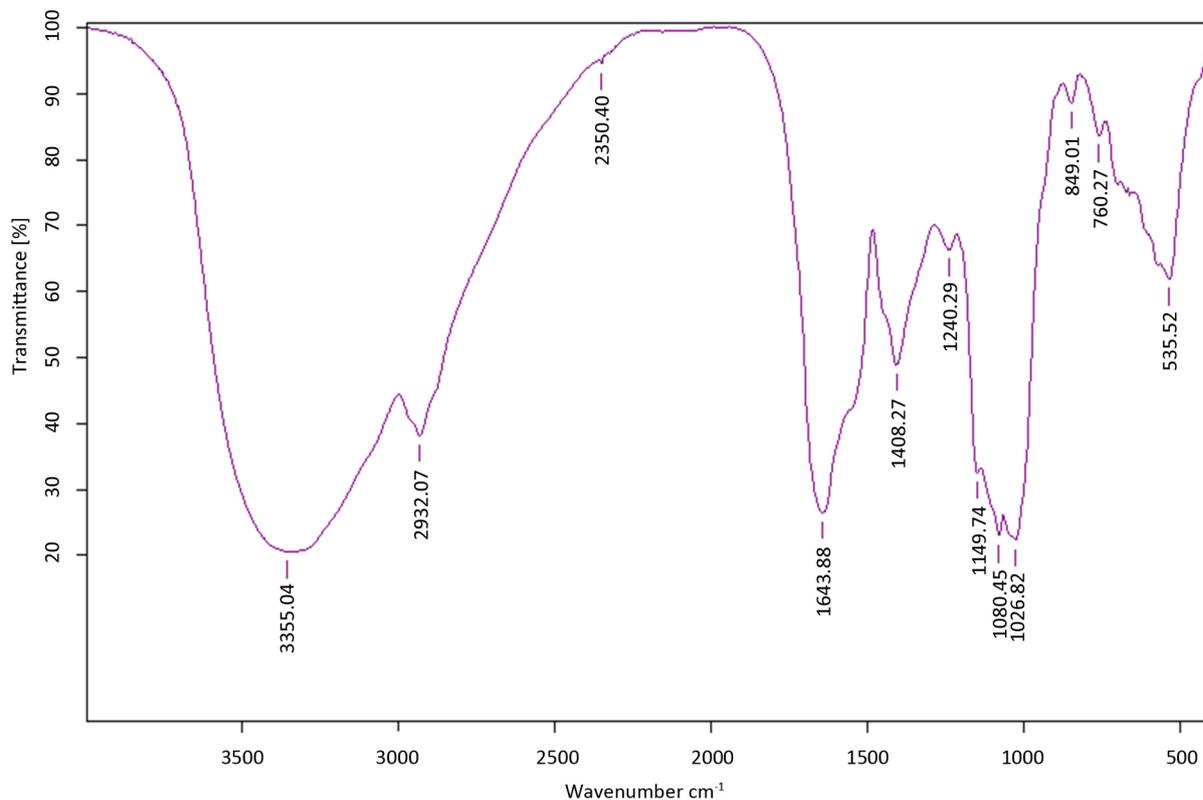


Figure 12. Fourier infrared spectrum of *Astragalus* Polysaccharides

图 12. 黄芪多糖的傅里叶红外光谱图

如图 12 所示,对黄芪多糖的红外光谱进行分析,进一步确定其含有的官能团结构。在 3355.04 cm^{-1} 出现一组宽而大的吸收峰,这是由于 O-H 的伸缩振动引起的,表明样品中应该含有-OH 基团;在 2932.07 cm^{-1} 出现比较弱的 C-H 吸收峰,而在 1643.88 cm^{-1} 处的吸收峰主要是由 CO-基团的 C=O 非对称伸缩振动引起的, 1408.27 cm^{-1} 吸收峰是由-COOH 的 C-O 伸缩振动引起的。以上分析表示实验样品的结构符合多糖的官能团结构[16]。

3.4. 黄芪多糖的抗氧化活性分析 - 自由基的清除能力

3.4.1. 芬顿法

Table 8. Measurement of absorbance results by Fenton method

表 8. 芬顿法测量吸光度结果

项目	1	2	3	平均值
A ₂	0.126	0.124	0.121	0.124
A ₁	0.114	0.110	0.111	0.112
A ₀	0.187	0.190	0.190	0.189

由表 8 可知, 根据清除率 $I_1\% = [(A_2 - A_1)/(A_0 - A_1)] * 100$ 可以算出, 在芬顿法下, 黄芪提取液浓度为 1 mg/L 时, OH-自由基清除率为 15.58%。

3.4.2. 水杨酸法

Table 9. Measurement of absorbance results by salicylic acid method

表 9. 水杨酸法测量吸光度结果

组别	A_x	A_c	A_0	羟自由基清除率	平均清除率
1	0.811	0.168		27.8	
2	0.786	0.195	0.890	33.6	33.2
3	0.768	0.218		38.2	

由表 9 可知, 根据清除率 $I_2\% = [A_0 - (A_x - A_c)]/A_0 * 100$ 可以算出, 在水杨酸法下, 黄芪多糖浓度为 1 mg/L 时, OH-自由基清除率为 33.2%。

比较文献的黄芪多糖的抗氧化活性二次正交旋转组合加上超声辅助制备的黄芪多糖其抗氧化性能相对较好, 可能是由于提取工艺相对复杂得到的产物纯度更高[17] [18] [19] [20]。

4. 结论

本文运用了超声辅助来提取黄芪多糖, 经过单因素试验以及二次旋转正交试验后, 得出了最佳工艺条件。即当液料比为 1:7, 超声时间为 15 min, 水浴时间为 50 min, 水浴温度为 70℃时, 提取率靠近最佳值为 2.19%。并且对各因素两两交互作用的响应面进行分析得出: 液料比与超声时间, 液料比与水浴时间, 水浴时间与水浴温度对于多糖的提取率的影响比液料比与水浴温度, 液料比与水浴时间, 超声时间与水浴温度的相互影响要大。通过红外光谱分析得出该样品的结构为多糖的结构, 证明提取的产物是多糖。运用了芬顿法和水杨酸法两种方法, 测定当黄芪多糖的浓度在 1 mg/mL 时, 羟基自由基清除率分别为 15.58%和 33.2%。样品有强的抗氧化性。

通过二次正交旋转超声辅助来提取黄芪多糖, 经过实验虽然确定了该工艺的最佳条件, 但实验中尚存在一些问题。由于通过该工艺得到黄芪多糖的提取率并不高, 所以在工艺上还有待改善以提高多糖提取率。并且此过程中得到的多糖为粗多糖, 经测定多糖的含量也并不高, 所以可在工艺中适当添加多糖分离及纯化的工艺, 以提高多糖的含量。

基金项目

2016 年广东省自然科学基金(2016A030313380); 2019 佛山市自筹经费类科技计划项目(1920001001104); 2019 年广东省大学生创新创业训练计划项目(XJ2019126)。

参考文献

- [1] 李金芳. 黄芪多糖的提取及抗氧化作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(4): 143-147.
- [2] 陈玉霞, 林峰, 莫娟, 等. 两种黄芪多糖提取方法比较[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(3): 20-22+30.
- [3] 吴铭, 韩丹, 郭立泉. 黄芪多糖的提取与抗氧化活性检测[J]. 湖北农业科学, 2015(17): 4263-4265.
- [4] 彭晓霞, 张振巍. 二次正交旋转组合设计法优化赤芍醇提工艺[J]. 中药材, 2010(6): 991-994.
- [5] 易军鹏, 朱文学, 马海乐, 等. 响应面法优化微波提取牡丹籽油的工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 99-104.
- [6] 蒋之坝, 黄仲青. 关于二次正交旋转组合设计试验数据的中心点处理法[J]. 安徽农学院学报, 1989(4): 290-295.
- [7] 刘薇, 王宏君, 赵建, 等. 邻二氮菲-Fe~(2+)法测定保健食品的抗氧化能力[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 333-337.

-
- [8] Ying, Z., Han, X.X. and Li, J.R. (2011) Ultrasound-Assisted Extraction of Polysaccharides from Mulberry Leaves. *Food Chemistry*, **127**, 1273-1279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.083>
- [9] Hou, X.J., Zhang, N., Xiong, S.Y., Li, S.G. and Yang, B.Q. (2008) Extraction of BaChu Mushroom Polysaccharides and Preparation of a Compound Beverage. *Carbohydrate Polymers*, **73**, 289-294. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.033>
- [10] Zheng, Q., Ren, D.Y., Yang, N.N. and Yang, X.B. (2016) Optimization for Ultrasound-Assisted Extraction of Polysaccharides with Chemical Composition and Antioxidant Activity from the *Artemisia sphaerocephala* Krasch Seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, **91**, 856-866. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.042>
- [11] 龚盛昭, 杨卓如. 微波辅助提取黄芪多糖的工艺研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2004, 32(8): 93-96.
- [12] 杜晋平, 贾陈忠, 薛翼鹏, 等. 黄芪多糖纯化和硫酸酯化及红外光谱分析[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(1): 154-158.
- [13] 王征帆. 用清除羟基自由基法评价大蒜、生姜、洋葱水提物抗氧化能力[J]. 中国调味品, 2012, 37(11): 89-90+102.
- [14] 王警, 吴妮妮, 黄静, 等. 响应面法优化龙眼肉多糖乙酰化工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 63-68.
- [15] 刁毅, 刘涛, 韩洪波. 不同地区地木耳多糖红外光谱与抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(4): 984-987+996.
- [16] 牟鲁霞, 祝路, 赵爱华. 黄芪多糖的提取及精制工艺研究[J]. 中药材, 2009, 32(11): 1741-1745.
- [17] 崔红花, 赵英日, 王淑美. 黄芪中黄芪多糖的提取富集工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2013(9): 2075-2078.
- [18] 刘永录, 张国祖, 樊克锋. 黄芪多糖的提取和纯化方法研究[J]. 河南农业科学, 2010(6): 141-143.
- [19] 李红法, 郭松波, 满淑丽. 乙醇分级沉淀提取黄芪多糖及其理化性质和抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2015(11): 2112-2116.
- [20] 李万玉, 李安荣, 李法琦. 黄芪多糖的提取方法[J]. 中国药业, 2009(11): 87-88.