

邓黎,周同永,皮立,等. 用响应面法优化人工蛹虫草子实体中虫草素的超声提取工艺[J]. 江苏农业科学 2012, 40(5): 225-228.

用响应面法优化人工蛹虫草子实体中 虫草素的超声提取工艺

邓黎^{1,2},周同永^{1,2},皮立^{1,2},韩发¹

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室/中国科学院西北高原生物研究所,青海西宁 810008;

2. 中国科学院研究生院,北京 100049)

摘要: 为优化人工蛹虫草子实体中虫草素的超声提取工艺,在单因素试验基础上,利用响应曲面法考察提取温度、超声提取时间以及液料比对虫草素提取率的影响,并对提取工艺进行优化。结果表明:人工培养蛹虫草子实体中虫草素超声提取的优化工艺条件为超声温度 50 ℃,超声提取时间 47 min,液料比 30 mL/g,提取次数 3 次。在此工艺条件下,虫草素提取率的理论值为 1.057%。

关键词: 蛹虫草; 虫草素; 超声提取; 响应曲面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2012)05-0225-04

蛹虫草(*Cordyceps militaris*) 又称北虫草,属于囊菌亚门、麦角菌科、虫草属。蛹虫草中虫草素含量较冬虫夏草高约 3~6 倍^[1]。虫草素(Cordycepin) 是 3'-脱氧腺嘌呤核苷或 3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine),为腺苷的类似物,分子量 251 u,碱性,针状或片状结晶,熔点 230~231 ℃,最大吸收波长为 259 nm^[2-4]。它是虫草的重要活性成分,具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌等作用,具有细胞毒性及免疫调节作用^[2-4]。目前在国际市场上虫草素纯品的价格为 25 000 美元/g,因此,研究虫草素的提取工艺和提高其得率具有重要的经济价值和广阔的市场应用潜力^[5]。近年来,研究人员对虫草素的提取进行了工艺改进和优化,但是所得到的优化工艺均是在单因

素或正交试验条件下获得的^[6-11]。响应面分析法(response surface methodology, RSM) 是一种优化工艺条件的有效方法,可检查 1 个或多个响应变量与一系列试验变量之间的关系,确定试验因素及其交互作用在工艺过程中对指标响应值的影响,精确表述因素和响应值之间的关系^[12-13]。因此,将响应面分析方法应用于人工培养蛹虫草子实体中虫草素超声提取工艺的研究中,建立得率与考察因素之间关系的数学模型,为工业化生产提供技术参数和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人工培养蛹虫草由西宁世峰生物科技有限公司提供,样品于自然干燥后研成粉末备用。虫草素标准品由国家标准物质研究中心提供。甲醇为色谱纯,其余化学试剂均为分析纯。试验用水均为超纯水(18.2 MΩ/cm)。

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司生产),色谱柱 Agilent Eclipse-XDB C₁₈(5 μm, 250 nm × 4.6 mm),N-1001 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司生产),KQ5200DE 型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司生产),METTLER TOLEDO PL203 和 XS204 电子天平

收稿日期: 2012-02-15

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31070475); 科技部人员服务企业行动项目(编号: 2009GJG20004); 中国科学院科技支青项目(编号: 082B371211)。

作者简介: 邓黎(1984—),女,博士研究生,研究方向为植物生理生态及植物化学。E-mail: designdl@163.com。

通信作者: 韩发,研究员,从事高原植物生理生态及特色生物资源开发和利用研究。E-mail: hanfa@nwipb.ac.cn。

(上接第 224 页)

[3]王春台,刘学群,徐同. GA₃ 和 BR 对离体苜蓿叶片 SOD 活性的影响[J]. 植物生理学通讯,1995,31(4): 273-275.

[4]杨芳,李启任. 表油菜素内脂对月季切花衰老的影响[J]. 植物生理学通讯,2006,42(5): 891-893.

[5]潘堂. 我国切花的发展[J]. 浙江农业科学,2001(2): 40-45.

[6]王爱国,罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯,1990(6): 55-57.

[7]林植芳,李双顺,林桂珠,等. 衰老叶片和叶绿体中 H₂O₂ 的累积与膜脂过氧化物的关系[J]. 植物生理学报,1988,14(1): 16-22.

[8]薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社,1985: 67-70.

[9]赵生杰,许长成,邹琦,等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进

[J]. 植物生理学通讯,1994,30(3): 207-210.

[10]周倩萍,蔡世英,邓小江,等. 橡胶种子超氧化物歧化酶及其同工酶的研究[J]. 热带作物学报,1987,8(1): 35-44.

[11]陈金峰,王官南,程素满. 过氧化氢酶在植物胁迫响应中的功能研究进展[J]. 西北植物学报,2008,28(1): 188-193.

[12]罗红艺,景红娟,李菊容,等. 不同保鲜剂对香石竹切花的保鲜效果[J]. 植物生理学通讯,2003,39(1): 27-28.

[13]宋纯鹏. 植物衰老生物学[M]. 北京: 北京大学出版社,1998: 50-55.

[14]Palulis K P, Thompson J E. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membrane of senescing cotyledons[J]. Plant Physiology,1984,75(4): 1152-1157.

(瑞士梅特勒-托利多公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 蛹虫草子实体中虫草素的提取及测定 用电子天平准确称取干燥后的子实体粉末 1.00 g,加入适量的超纯水后超声提取、离心、抽滤,浓缩后定容至 10 mL,静置,得到待测液。

HPLC 测定虫草素含量: 色谱条件: Symmetry C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) 色谱柱,流动相为甲醇-水,流速 0.8 mL/min,检测波长 260 nm,进样量 10 μL,室温。

标准曲线: 精确称取虫草素标准品 2 mg,用超纯水溶解并定容至 20 mL,依次稀释,得系列浓度标准品溶液, HPLC 测定虫草素含量。经回归分析得回归方程为 $y = 35\ 115x - 16.898$, $r^2 = 0.999\ 6$ 。标准品曲线图见图 1。

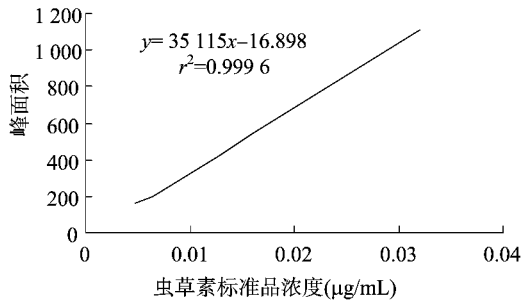


图1 虫草素浓度与峰面积的标准曲线

1.2.2 人工蛹虫草子实体中虫草素提取率的计算 虫草素提取率计算公式为:

$$Y = \frac{m_1 V_2}{m_2 V_1 \times 1\ 000\ 000} \times 100\%$$

式中: m_1 为依据标准曲线计算出的被测液中虫草素的含量 (μg) m_2 为称取的子实体粉末的质量 (g) V_1 为待测液分取的体积 (mL) V_2 为待测液的总体积 (mL)。

1.3 试验设计

1.3.1 单因素试验 主要考察提取次数、提取温度、液料比以及超声时间等因素对人工蛹虫草子实体中虫草素提取率的影响。按照“1.2.1”方法提取虫草素,并计算提取率。

1.3.2 响应曲面法试验设计 在单因素试验的基础上选择对响应值(虫草素提取率)有显著影响的因素,利用 Design Expert 软件对试验数据进行回归分析。每一变量的低、中、高水平分别以 -1、0、1 进行编码 模型选用二次方程:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2$$

其中: Y 为响应值(虫草素提取率) $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ 为方程系数 x_1, x_2, x_3 为自变量编码值。

2 结果与分析

2.1 单因素对虫草提取率的影响

2.1.1 提取次数对蛹虫草子实体中虫草素提取率的影响 在提取温度 60 ℃、超声提取时间 40 min、超声功率 100 W、液料比为 20 mL/g 的条件下,考察提取次数对虫草素提取率的影响,结果见图 2。确定最优提取次数为 3 次。

2.1.2 提取温度对蛹虫草子实体中虫草素提取率的影响 在超声功率为 100 W、液料比为 20 mL/g、超声提取时间为 40 min、提取 3 次的条件下,将温度设定在 20 ~ 80 ℃ 之间,研

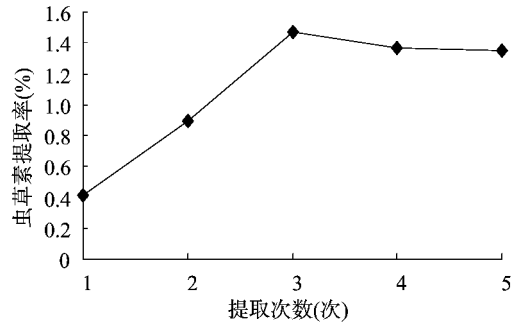


图2 提取次数对虫草素得率的影响

究温度对虫草素提取率的影响,结果如图 3 所示。由图 3 可见,随着温度的提高,虫草素提取率增加显著,但温度过高虫草素提取率稍有下降。因此,选择温度 40 ~ 70 ℃ 作为以下试验的条件。

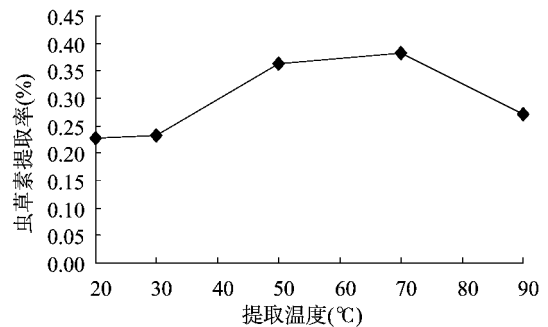


图3 提取温度对虫草素得率的影响

2.1.3 液料比对蛹虫草子实体中虫草素提取率的影响 在提取温度 60 ℃、超声提取时间 40 min、超声功率 100 W、提取 3 次的条件下,考察液料比对虫草素提取率的影响,得到液料比与虫草素提取率的关系如图 4 所示。由图 4 可知,随着液料比的增大,虫草素提取率逐渐增加,液料比超过 30 mL/g 后,虫草素的提取率稍有下降并趋于平缓,说明虫草素提取率达到最大,因此选择液料比为 20 ~ 40 mL/g 进行下一步试验。

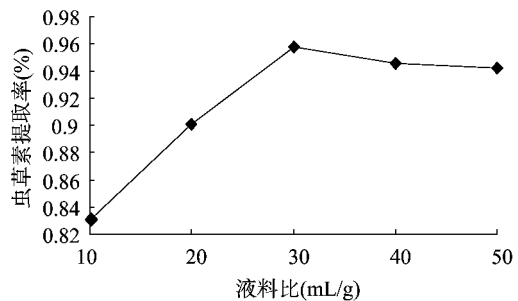


图4 液料比对虫草素得率的影响

2.1.4 超声提取时间对蛹虫草子实体中虫草素提取率的影响 固定提取温度 60 ℃、超声功率为 100 W、液料比为 20 mL/g,提取 3 次,研究不同超声提取时间对虫草素提取率的影响,结果见图 5。从图 5 可见,在超声提取时间低于 60 min 时,虫草素提取率迅速增加,超过 60 min 则迅速下降。表明超声提取时间对虫草素提取率有明显的影响,时间较短溶解不充分,时间过长则会引起虫草素结构的变化而使提取率降低。因此选择超声提取时间以 40 ~ 60 min 为宜。

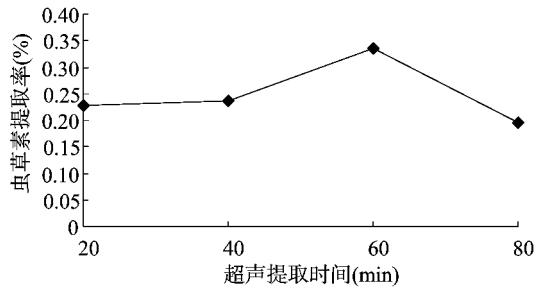


图5 超声提取时间对虫草素得率的影响

2.2 响应曲面试验结果与分析

2.2.1 响应曲面法分析因素的选取以及分析方案 在单因素试验的基础上,固定提取次数为3次,采用 Box - Behnken 设计方案,分别以提取温度、超声提取时间和液料比对应3个独立变量 X_1 、 X_2 、 X_3 ,并以 -1、0、1 分别代表变量的水平。

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X}$$

式中: x_i 为变量的编码值 X_i 为变量的真实值 X_0 为试验中心点变量的真实值 ΔX 为单变量增量,虫草素提取率 Y 为响应值。对自变量进行编码(表1),试验方案及结果见表2。

表1 试验因素水平及编码

因素	编码	编码水平		
		-1	0	1
提取温度(°C)	x_1	30	45	60
超声时间(min)	x_3	30	45	60
液料比(mL/g)	x_2	20	30	40

表2 Box - Behnken 设计方案及虫草素提取率的测定值

试验号	提取温度(°C)	超声提取时间(min)	液料比(mL/g)	虫草素提取率(%)
1	-1	-1	0	0.629
2	1	-1	0	0.859
3	-1	1	0	0.842
4	1	1	0	0.94
5	-1	0	-1	0.787
6	1	0	-1	0.883
7	-1	0	1	0.745
8	1	0	1	0.971
9	0	-1	-1	0.768
10	0	1	-1	0.795
11	0	-1	1	0.766
12	0	1	1	0.888
13	0	0	0	1.091
14	0	0	0	1.096
15	0	0	0	1.061
16	0	0	0	1.093
17	0	0	0	1.061

利用 Design Expert 软件对表2数据进行二次多元回归拟合,得到回归方程为:

$$Y = 1.08 + 0.081x_1 + 0.055x_2 + 0.017x_3 - 0.033x_1x_2 + 0.033x_1x_3 + 0.024x_2x_3 - 0.11x_1^2 - 0.15x_2^2 - 0.13x_3^2$$

对回归方程进行显著性检验及方差分析,结果见表3。由表3可以得出:模型的 $P < 0.0001$,表明模型极显著且模拟失拟项不显著($P = 0.1557 > 0.05$),相关系数 $r^2 = 0.9875$,说明模型拟合程度很好。模型的调整确定系数为 0.9715,

说明该模型能解释 97.15% 的响应值的变化,可以用此模型对超声提取人工培养蛹虫草子实体中虫草素提取率进行分析及预测。

表3 回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.33	9	0.037	61.53	<0.0001	***
A	0.053	1	0.053	89.02	<0.0001	***
B	0.025	1	0.025	41.35	0.0004	**
C	-0.02346	1	-0.02346	3.95	0.0871	
AB	-0.04356	1	-0.04356	7.34	0.0302	*
AC	-0.04225	1	-0.04225	7.12	0.0321	*
BC	-0.02256	1	-0.02256	3.80	0.0921	
A2	0.051	1	0.051	86.38	<0.0001	***
B2	0.098	1	0.098	165.21	<0.0001	***
C2	0.064	1	0.064	108.38	<0.0001	***
残差	0.18	7	0.026			
失拟度	0.14	3	0.046	3.04	0.1557	
纯误差	0.040	4	0.010			
总离差	0.33	16				

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

模型回归方程的系数显著性检验如下:一次项 x_1 ($P < 0.0001$),二次项 x_1^2 ($P < 0.0001$), x_2^2 ($P < 0.0001$), x_3^2 ($P < 0.0001$) 均达到极显著水平,一次项 x_2 ($P < 0.01$) 达到显著水平,表明提取温度、超声提取时间、液料比对虫草素提取率有显著影响;二次项 x_1x_2 ($P = 0.0302 < 0.05$), x_1x_3 ($P = 0.0321 < 0.05$) 表明提取温度与超声提取时间以及提取温度与液料比的交互作用对虫草素提取率的影响显著。

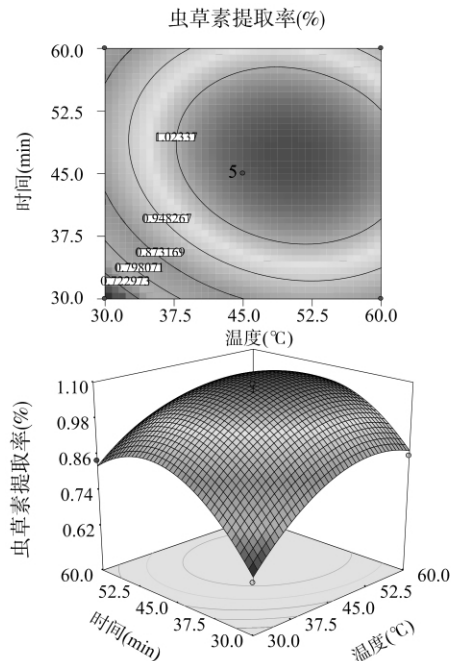


图6 超声提取时间和提取温度对虫草素提取率影响的等值线与响应面

从图6可知,提取率随提取温度的升高而升高,在60°C左右达到最高值,随后呈现下降趋势。原因是虫草素在高温条件下不稳定,易分解。提取率随提取时间的延长先升高后降低,呈抛物线趋势,当提取时间为55min左右时,提取率达到最大值。原因是随着时间的延长,可溶性成分溶出增多,但

提取液黏度增大,在后期操作中有所损耗。从图 7 可知,提取温度和料液比对提取率的影响均呈抛物线形,即随提取温度和料液比的同时增大,提取率先升高后降低的趋势,原因可能与虫草素的极性大小、稳定性有关。方差分析可知,提取温度和料液比对提取率影响的交互作用较显著。由图 8 可知,超声提取时间和料液比对提取率的影响均呈抛物线形,即随提取温度和料液比的同时增大,提取率先升高后降低的趋势。

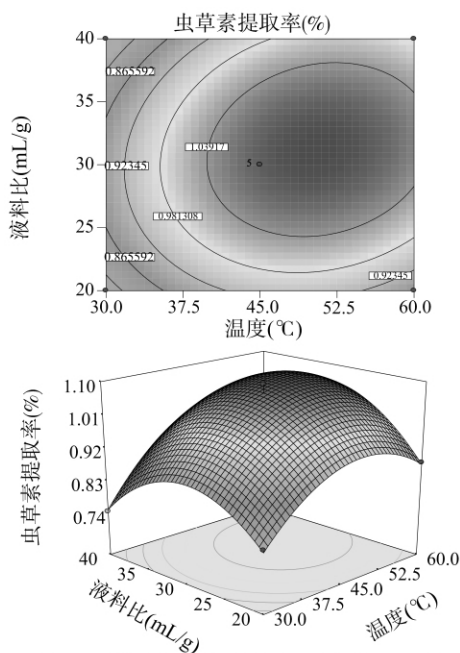


图7 提取温度和料液比对虫草素提取率影响的等值线与响应面

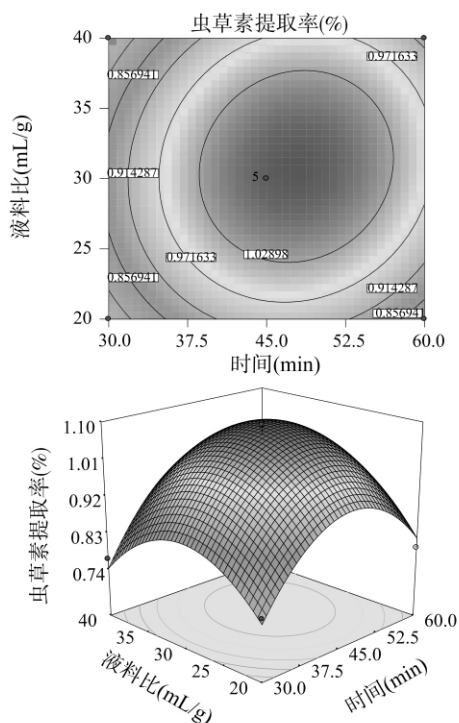


图8 超声提取时间和料液比对虫草素提取率影响的等值线与响应面

利用 Design Expert 7.0.0 对回归模型进行进一步典型性分析,得到最优提取工艺条件为:提取温度 50℃,料液比 30 mL/g,提取时间 47 min,该条件下虫草素理论提取率可达 1.057%。

最优工艺条件的验证试验结果如表 4 所示,3 次重复试验的平均值为 0.979%,略低于理论值,表明所确定的最优工艺条件稳定可靠。

表 4 最佳工艺的验证

试验编号	虫草素提取率(%)
1	0.963
2	0.997
3	0.978
平均值	0.979

3 结论

本研究根据中心组合(Box - Behnken) 试验设计原理,应用响应面分析方法优化提取温度、超声提取时间和料液比对人培养蛹虫草子实体中虫草素超声提取的工艺条件。结果表明,超声提取人培养蛹虫草子实体中虫草素的最佳工艺条件为提取温度 50℃、超声提取时间 47 min、液料比 30 mL/g、提取 3 次。在此工艺条件下虫草素提取率的理论值为 1.057%。

参考文献:

- [1]刘静明,刘岱,杨立新,等. 蛹虫草菌丝体与冬虫夏草中核苷类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,1994,19(10):615.
- [2]Cunningham K G, Manson W, Spring F S, et al. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* [J]. Nature, 1950, 66: 949.
- [3]Rich M A, Meyers P, Weinbaum G, et al. Inhibition of human tumor cells by cordycepin[J]. Biochim Biophys, 1965, 95(2):194-204.
- [4]焦彦朝,梁宗琦,刘爱英. 虫草生物活性物质研究概况[J]. 贵州农业科学,1990(3):53-54.
- [5]汪宇,于荣敏,汪晓宁,等. 利用虫草属药用真菌提取分离核苷类物质的研究进展[J]. 中国药师,2004,7(12):929-931.
- [6]凌建亚,孙迎杰,吕鹏,等. 虫草属真菌中虫草菌素的超声波提取及毛细管电泳测定[J]. 菌物系统,2002,21(3):394-399.
- [7]潘中华,贡成良,范雪峰. 蚕蛹虫草中虫草素的提取及纯化工艺研究[J]. 江苏蚕业,2003,25(2):13-15.
- [8]曹庆穗,严俊文,褚芳,等. 均匀设计优选虫草素微波辅助提取工艺的研究[J]. 江苏农业科学,2008(6):234-236.
- [9]郭澄,米杰,等. 高效液相色谱法测定人工虫草菌丝中腺苷和虫草素的含量[J]. 中国中药杂志,1998,23(4):236-237.
- [10]钟艳梅,黄志全,温凯. 人工蛹虫草固体培养残基中虫草素的提取分离研究[J]. 现代食品科技,2007,23(2):40-42.
- [11]张嘉,李多伟,任静,等. 正交试验提取虫草素的工艺研究[J]. 中国新医药,2004,3(2):34-35.
- [12]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):28-32.
- [13]吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002:135-142.