

响应曲面法优化虫草素和虫草多糖的综合提取工艺

邓黎, 王晓虹, 韩涛, 皮立, 韩发*

中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

摘要: 以冬虫夏草和人工蛹虫草为试材, 优化虫草素和虫草多糖的综合提取工艺。在提取方法比较试验以及超声波水提单因素试验基础上, 利用响应曲面法考察超声提取时间、温度和液固比对虫草素和虫草多糖综合提取率的影响, 优化提取工艺。得到最优提取工艺条件为: 提取温度 72 °C, 液固比 30 mL/g, 提取时间 77 min, 提取 2 次, 虫草素提取率的理论值可达 53.27%, 虫草多糖提取率的理论值可达 41.92%。

关键词: 虫草素; 虫草多糖; 冬虫夏草; 蛹虫草; 响应曲面法

中图分类号: S567.3

文献标识码: A

Optimization of Intergrated Extraction of Cordycepin and Polysaccharides by Response Surface Methodology

DENG Li, WANG Xiao-hong, HAN Tao, PI Li, HAN Fa*

Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

Abstract: This paper was aiming to optimize the extraction process for extracting Cordycepin and polysaccharides from *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps militaris*. On the basis of single-factor experiments, three important extraction factors, namely ultrasonic extraction time, temperature and the ratio of material to liquid were optimized using response surface methodology. The results showed that the optimal extraction conditions of cordycepin and polysaccharides were: 72 °C as extraction temperature, 30 mL/g as the ratio material to liquid, 77min as extraction time, and extracted for two times. The theoretical extraction rates of cordycepin and polysaccharides were up to 53.27% and 41.92%, respectively.

Key words: cordycepin; polysaccharide; *Cordyceps sinensis*; *Cordyceps militaris*; response surface methodology

现代科学论证冬虫夏草和蛹虫草不仅具有特殊的营养价值, 而且有明显的药用价值。其中尤以虫草素、虫草多糖、虫草酸等多种生物活性物质的药用价值最为显著^[1-4]。因此, 冬虫夏草和蛹虫草受到了广泛关注, 已有大量药品、保健食品上市, 但这些产品多数停留在粗加工水平, 缺乏市场竞争力, 因此, 要保证虫草产业能够持续稳定的发展, 就必须提高其加工产品的科技含量。因此, 研究冬虫夏草和蛹虫草中主要生物活性物质的综合提取工艺和提高其提取率具有重要的经济价值和广阔的市场应用潜力^[5-6]。

近年来, 已有研究人员对虫草素和虫草多糖的综合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^[7-8]。响应面分析法(response surface methodology, RSM) 是一种优化工艺条件的有效方法, 可检查一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, 并精确地表述因素和响应值之间的关系^[9]。因此, 本研究中将响应面分析的方法应用于虫草中虫草素和虫草多糖的综合提取工艺研究中, 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。

在比较水热回流法和超声波水提法对综合提取虫草素和虫草多糖的影响基础上, 采用超声波提取法进行初提, 经醇沉、Sevage 法除蛋白、乙醇分级沉淀后获得虫草多糖^[3], 醇沉后获得的上清液用大孔树脂和反相硅胶分离纯化, 制备型液相色谱分离制备获得虫草素^[10]。最终利用响应曲面法考察超声提取时间、温度和液固比对虫草素和虫草多糖综合提取率的影响, 得到最优提取工艺并予以验证。

收稿日期: 2012-12-19 接受日期: 2013-05-16

基金项目: 中国科学院院地合作项目(Y12B031211); 科技部人员服务企业行动项目(2009GJG20004); 中国科学院科技支撑项目(082B371211); 国家自然科学基金项目(31070475)

* 通讯作者 E-mail: yige-wxh@126.com

1 材料与方法

1.1 仪器、材料与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 色谱柱 Agilent Eclipse-XDB C18(5 μm 250 mm \times 4.6 mm), 美国安捷伦公司; N-1001 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); KQ 5200 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); METTLER TOLEDO PL 203 和 XS 204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); P70D17TL-D 5 微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司); 制备型高效液相色谱仪(LC-8A, 日本); DHG-9070 A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

野生冬虫夏草购于青海玉树, 人工培养蛹虫草 CSM-8 菌株由西宁世峰生物科技有限公司提供, 样品经微波干燥后粉碎过 60 目筛备用; 虫草素标准品、D-葡萄糖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; 实验用水均为蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 虫草素、虫草多糖提取率计算公式及含量测定方法

虫草素提取率计算公式:

$$Y = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

式中 C_1 为依据标准曲线计算出的被测液中虫草素浓度(mg/mL); C_2 为样品溶液中虫草素浓度(mg/mL)。

虫草多糖提取率计算公式:

$$Y = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

式中 C_1 为依据标准曲线计算出的被测液中虫草多糖浓度(mg/mL); C_2 为样品溶液中虫草多糖浓度(mg/mL)。

采用高效液相色谱法(HPLC)测定虫草素含量, 色谱柱为 Agilent Eclipse-XDB C₁₈ 柱; 流动相为甲醇-水(12:88); 流速 0.8 mL/min; 紫外检测波长 260 nm; 进样量 10 μL ; 室温。

苯酚-硫酸法测定虫草多糖含量, 样品溶液多糖含量的测定在标准曲线项下操作, 测定 OD 值并得出样品中虫草多糖含量。

1.2.2 虫草素和虫草多糖综合提取分离工艺研究

1.2.2.1 提取方法比较实验

比较水热回流法和超声波水提法对综合提取虫草素和虫草多糖的影响。

水热回流提取法: 精确称取 0.10 g 冬虫夏草和 1.00 g 预处理后的 CSM-8 子实体粉末, 按液固比 30 mL/g 加入蒸馏水热回流提取 6h, HPLC 测定虫草素含量, 苯酚-硫酸法测定虫草多糖含量并计算提取率, 实验重复 3 次。

超声波水提取法: 精确称取 1.00 g 预处理后的 CSM-8 和 0.10 g 冬虫夏草子实体粉末, 按液固比 30 mL/g 加入蒸馏水超声波提取 30 min, 温度 55 $^{\circ}\text{C}$, HPLC 测定虫草素含量, 苯酚-硫酸法测定虫草多糖含量并计算提取率, 实验重复 3 次。

1.2.2.2 超声波提取单因素实验

分别考察超声温度(5、30、55、80、90 $^{\circ}\text{C}$)、超声提取时间(20、40、60、80、100 min)及液固比(10、20、30、40、50 mL/g)、超声提取次数(1次、2次、3次、4次、5次)对人工蛹虫草 CSM-8 菌孢子实体干粉中虫草素和虫草多糖含量的影响。

1.2.2.3 响应曲面法实验设计

在单因素实验的基础上选择对响应值(虫草素和虫草多糖提取率)有显著影响的因素, 利用 Design Expert 软件对实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(虫草素和虫草多糖提取率), $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ 为方程系数, x_1, x_2, x_3 为自变量编码值。

通过 Box-Behnken 设计和响应面分析来进一步考察超声提取时间、提取温度和液固比之间的相互影响, 并确定超声波法综合提取子实体中虫草素和虫草多糖的最佳工艺参数。

称取 1.00 g CSM-8 菌孢子实体粉末和 0.10 g 冬虫夏草子实体粉末, 分别按最佳提取工艺参数进行验证实验, HPLC 测定虫草素含量, 苯酚-硫酸法测定虫草多糖含量, 并计算提取率, 实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 虫草素和虫草多糖综合提取分离工艺研究

2.1.1 提取方法比较实验结果与分析

比较水热回流法和超声波水提法综合提取虫草素和虫草多糖的提取效果, 结果表明(表 1): 超声波

水提法优于水热回流法,这是因为超声波使菌丝细胞破碎,有利于细胞内物质的溶出,使提取效果更好。故选择超声波水提法为综合提取虫草素和虫草多糖的方法。

表1 提取方法与虫草素、多糖提取率的关系(n=3)

Table 1 Comparison of extraction results using water reflux method and Ultrasonication method(n=3)

提取方法 Methods	CSM-8 菌株 cultured <i>C. militaris</i> CSM-8		冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	
	虫草素提取率 Cordycepin yield(%)	虫草多糖提取率 Polysaccharide yield(%)	虫草素提取 Cordycepin yield(%)	虫草多糖提取率 Polysaccharide yield(%)
水热回流提取法 Water reflux extraction	23.85	51.62	23.28	50.14
超声波水提法 Ultrasonic water extraction	45.47	39.36	43.55	36.79

2.1.2 超声波提取单因素实验结果与分析

2.1.2.1 超声温度对虫草多糖和虫草素含量的影响

在超声时间 60 min、液固比 7.5 mL/g、超声提取次数 2 次的条件下考察微波功率对人工蛹虫草子实体中虫草多糖、虫草素含量的影响,结果见表 2。确定较优草上提取温度范围为 30 ~ 80 °C。

表2 超声温度对人工蛹虫草 CSM-8 菌孢子实体干粉中虫草多糖、虫草素含量的影响

Table 2 Effect of extraction temperature on the content of polysaccharides, cordycepin in powdered fruit body of CSM-8

超声温度(°C) Ultrasonic temperature	虫草多糖(%) Polysaccharides	虫草素(%) Cordycepin
5	4.66	0.48
30	6.21	0.89
55	7.10	1.10
80	8.10	1.36
90	6.92	0.79

2.1.2.2 超声时间对虫草素和虫草酸含量的影响

在超声温度为 55 °C、液固比 7.5 mL/g、提取次

表3 超声时间对人工蛹虫草 CSM-8 菌孢子实体干粉中虫草多糖、虫草素含量的影响

Table 3 Effect of ultrasonic time on the content of polysaccharides, cordycepin in powdered fruit body of CSM-8

超声时间(min) Ultrasonic time	虫草多糖(%) Polysaccharides	虫草素(%) Cordycepin
20	3.66	0.22
40	5.50	0.66
60	7.12	1.27
80	8.96	1.98
100	6.87	0.96

数 2 次条件下考察超声时间对人工蛹虫草子实体中虫草素、虫草多糖含量的影响,结果见表 3。确定较佳超声时间范围为 40 ~ 80 min。

2.1.2.3 液固比对虫草素和虫草多糖含量的影响

在超声温度 55 °C、超声时间 60 min、超声提取次数 2 次条件下考察液固比对人工蛹虫草子实体中虫草多糖、虫草素含量的影响,结果见表 4。确定较优液固比范围为 20 ~ 40 mL/g。

表4 液固比对人工蛹虫草 CSM-8 菌孢子实体干粉中虫草多糖、虫草素含量的影响

Table 4 Effect of Water/material ratio on the content of polysaccharides, cordycepin in powdered fruit body of CSM-8

液固比 Water/material ratio (mL/g)	虫草多糖 Polysaccharides(%)	虫草素 Cordycepin(%)
10	6.31	0.47
20	7.56	0.69
30	7.78	1.26
40	7.75	1.15
50	7.69	1.04

表5 提取次数对人工蛹虫草 CSM-8 菌孢子实体干粉中虫草多糖、虫草素含量的影响

Table 5 Effect of times of extraction on the content of polysaccharides, cordycepin in powdered fruit body of CSM-8

提取次数(次) Times of extraction	虫草多糖(%) Polysaccharides	虫草素(%) Cordycepin
1	6.31	0.47
2	7.67	0.69
3	7.78	1.26
4	7.75	1.15
5	7.69	1.04

2.1.2.4 超声提取次数对虫草素和虫草酸含量的影响

在超声温度 55 °C、超声时间 60 min、液固比 30 mL/g 条件下考察超声次数对人工蛹虫草子实体中虫草多糖、虫草素含量的影响 结果见表 5。确定较优提取次数为 2 次。

2.1.3 响应曲面实验结果与分析

2.1.3.1 响应曲面法分析因素的选取及分析方案

在单因素实验的基础上固定提取次数为 2 次, 采用 Box-Behnken 设计方案 分别以提取温度、提取时间和液固比对应 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。

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

对自变量进行编码(表 6)。式中 x_i 为变量的编码值 X_i 为变量的真实值 X_0 为实验中心点变量的真实值 ΔX 为单变量增量,虫草素和虫草多糖提取率 Y 为响应值,实验方案及结果见表 6 和 7。

表 6 实验因素水平及编码

Table 6 Levels and codes of variable chose for Box-Behnken design

因素 Independent variables	编码 Symbols	编码水平 Coded levels		
		-1	0	1
提取温度 Extraction temperature(°C)	x_1	30	55	80
提取时间 Time(min)	x_2	40	60	80
液固比 Water/material ratio(mL/g)	x_3	20	30	40

2.1.3.2 结果分析

Box-Behnken 设计方案及虫草素和虫草多糖提取率的测定结果见表 7。利用 Design Expert 软件对表 7 数据进行二次多元回归拟合,得到回归方程为:

$$Y_1 = 47.70 + 17.65 x_1 + 2.46 x_2 + 6.03 x_3 + 4.16 x_1 x_2 - 1.75 x_1 x_3 + 3.27 x_2 x_3 - 10.99 x_1^2 - 7.94 x_2^2 - 7.15 x_3^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 37.75 + 10.31 x_1 + 4.83 x_2 + 3.38 x_3 + 6.69 x_1 x_2 - 2.58 x_1 x_3 + 2.64 x_2 x_3 - 8.34 x_1^2 - 9.57 x_2^2 - 9.45 x_3^2 \quad (2)$$

表 7 Box-Behnken 设计方案及虫草素和虫草多糖提取率的测定值

Table 7 Box-Behnken design and the responses of the total polysaccharide and cordycepin yield

实验号 No.	提取温度 Extraction temperature	提取时间 Time	液固比 Water/material ratio	虫草素提取率 Cordycepin yield	虫草多糖提取率 Polysaccharides yield
	x_1 (°C)	x_2 (min)	x_3 (mL/g)	Y_1 (%)	Y_2 (%)
1	0	0	0	50.93	39.95
2	1	-1	0	39.25	17.65
3	0	-1	1	33.05	15.27
4	1	0	-1	43.38	30.17
5	0	0	0	46.21	33.63
6	1	1	0	52.73	41.62
7	0	0	0	48.24	39.36
8	-1	-1	0	13.11	11.45
9	0	0	0	45.76	37.91
10	-1	0	-1	3.72	3.37
11	0	0	0	47.34	37.91
12	0	-1	-1	27.50	13.43
13	-1	1	0	9.97	8.65
14	1	0	1	51.91	31.4
15	-1	0	1	19.23	14.9
16	0	1	1	44.25	29.3
17	0	1	-1	25.62	16.89

对回归方程进行显著性检验及方差分析,结果见表8。由表8得出:两个模型的 P 均 < 0.0001 ,表明两个模型都极显著且失拟项不显著(模型1 $P = 0.9388 > 0.05$;模型2, $P = 0.3796 > 0.05$)。相关系数 $R^2 = 0.9955$ 、 $R^2 = 0.9888$,说明两个模型拟合

程度都很好。模型的调整确定系数 $AdjR^2 = 0.9897$ 、 $AdjR^2 = 0.9745$,说明模型1能解释98.97%的响应值的变化,模型2能解释97.45%的响应值的变化,可以用模型1、2对超声波水提法综合提取虫草素和虫草多糖提取率进行分析及预测。

表8 回归模型的方差分析

Table 8 ANOVA analysis for response surface quadratic model

来源 Source	自由度 Degree of freedom	虫草素 Cordycepin			虫草多糖 Polysaccharides		
		平方和 Sum of squares	F-value	p-value	平方和 Sum of squares	F-value	p-value
模型 model	9	4056.27	171.00	<0.0001***	2539.97	68.97	<0.0001***
A	1	2493.59	946.11	<0.0001***	850.16	207.77	<0.0001***
B	1	48.31	18.33	0.0036**	186.82	45.66	0.0003***
C	1	290.65	110.28	<0.0001***	91.19	22.29	0.0022**
AB	1	69.06	26.20	0.0014**	179.16	43.78	0.0003***
AC	1	12.18	4.62	0.0686 ⁻	26.52	6.48	0.0383*
BC	1	42.77	16.23	0.0050**	27.93	6.83	0.0338*
A ²	1	508.36	192.88	<0.0001***	292.51	71.49	<0.0001***
B ²	1	265.65	100.79	<0.0001***	385.82	94.29	<0.0001***
C ²	1	215.13	81.62	<0.0001***	376.41	91.99	<0.0001***
失拟度 Lack of fit degree	3	1.61	0.13	0.9388 ⁻	4.10	0.22	0.8761 ⁻
纯误差 Pure error	4	16.84			24.54		
R ²		0.9955			0.9872		
Adj-R ²		0.9897			0.9706		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $P > 0.05$

模型1回归方程的系数显著性检验如下:一次项A($P < 0.0001$)、C($P < 0.0001$),二次项A²($P < 0.0001$)、B²($P < 0.0001$)均达到极显著水平,一次项B($P = 0.0036 < 0.01$)达到显著水平,表明提取温度、超声提取时间、液固比对虫草素提取率有显著影响;二次项AB($P = 0.0014 < 0.0001$)、BC($P = 0.0050 < 0.001$),表明提取温度与超声提取时间、提取时间与液固比间的交互作用对虫草素提取率的影响极显著。

模型2回归方程的系数显著性检验如下:一次项A($P < 0.0001$)、B($P = 0.0003 < 0.001$),二次项A²($P < 0.0001$)、B²($P < 0.0001$)、C²($P < 0.0001$)均达到极显著水平;一次项C($P = 0.0020 < 0.01$)达到显著水平,表明提取温度、超声提取时间、液固比对虫草多糖提取率有显著影响;二次项

AB($P = 0.0003 < 0.001$)、AC($P = 0.0383 < 0.05$)、BC($P = 0.0348 < 0.05$),表明提取温度与超声提取时间、提取温度与液固比以及提取时间与液固比的交互作用对虫草多糖提取率的影响显著。

利用Design Expert 7.0.0软件对表4数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程 Y_1 的响应面及其等高线见图1、2和3。

从图1可知,虫草素提取率随提取时间的延长先升高后下降,呈抛物线趋势,当提取时间达到60 min左右时,提取率达到最大值,其原因可能是随着时间的增大,可溶性成分溶出的越多,使提取液粘度增大,在后期操作中有所损耗;提取时间和提取温度的交互作用对虫草素提取的影响显著,表现为曲面较陡,响应值随提取温度的变化率大于随提取时间的变化率,说明提取温度对提取率的影响大于超

声提取时间; 虫草素提取率随提取温度的升高而升高, 当温度达到 67.5 °C 后, 提取率随温度的升高变化不大。图 2 可知, 提取温度和液固比的交互作用对虫草素提取率的影响不显著, 表现为曲面平滑。从图 3 可知, 提取时间和液固比对提取率的影响均

成抛物线形, 即随提取时间和液固比的增大, 提取率呈先升高后降低的趋势; 提取时间和液固比的交互作用对虫草素提取的影响显著, 表现为曲面较陡平滑; 响应值随液固比的变化率大于提取时间, 说明液固比对提取率的影响大于提取时间。

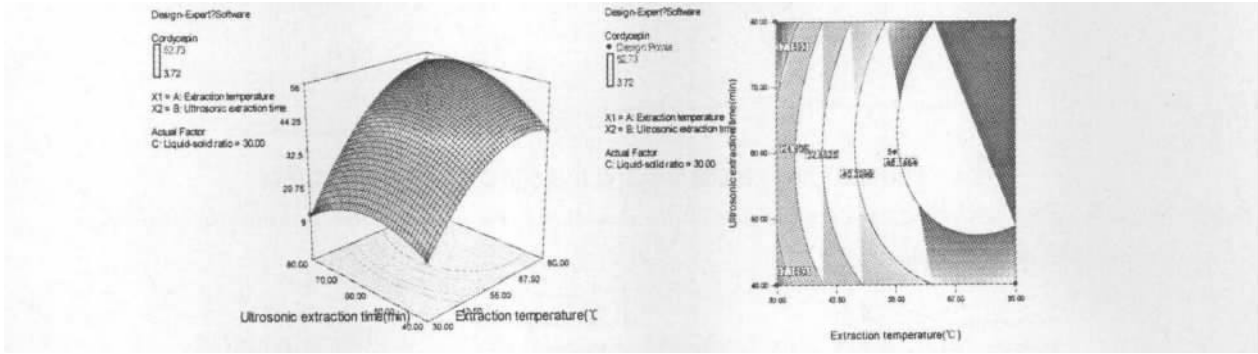


图 1 提取温度和提取时间影响虫草素提取率的等值线与响应面

Fig. 1 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables (X_1 : extraction temperature; X_2 : extraction time) on the response Y_1

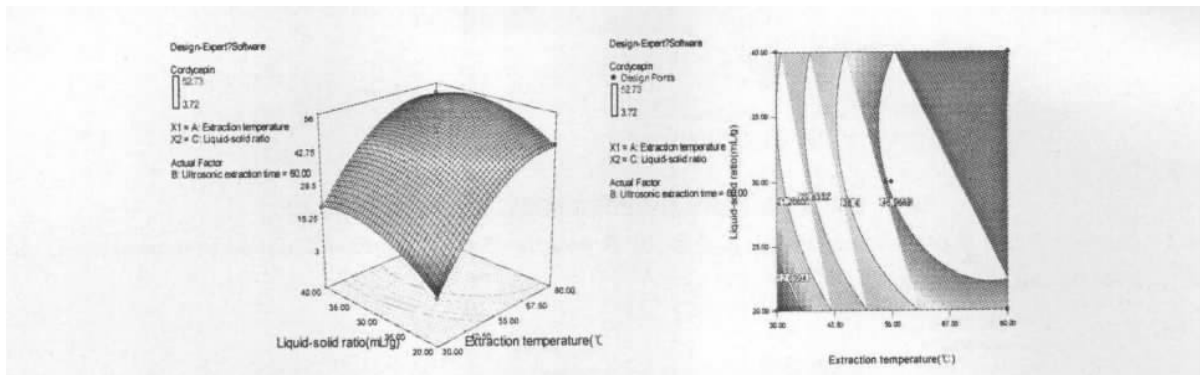


图 2 提取温度和液固比影响虫草素提取率的等值线与响应面

Fig. 2 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables (X_1 : extraction temperature; X_3 : liquid-solid ratio) on the response Y_1

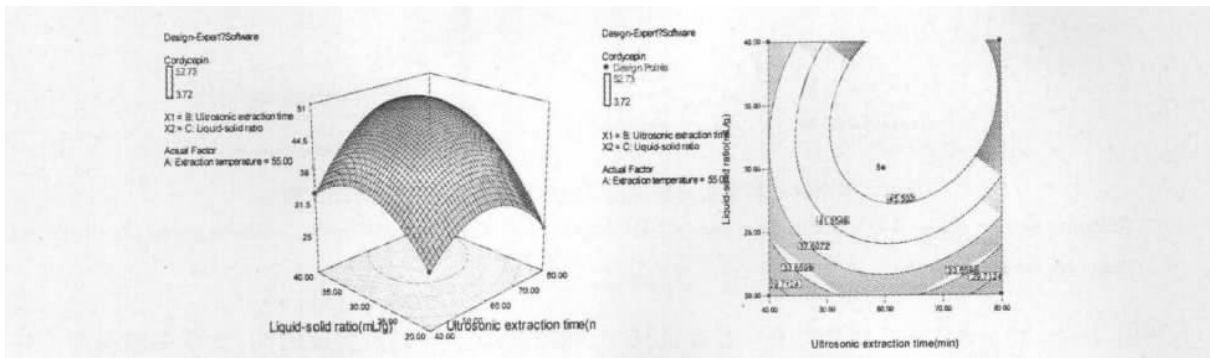


图 3 提取时间和液固比影响虫草素提取率的等值线与响应面

Fig. 3 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables (X_2 : extraction time; X_3 : liquid-solid ratio) on the response Y_1

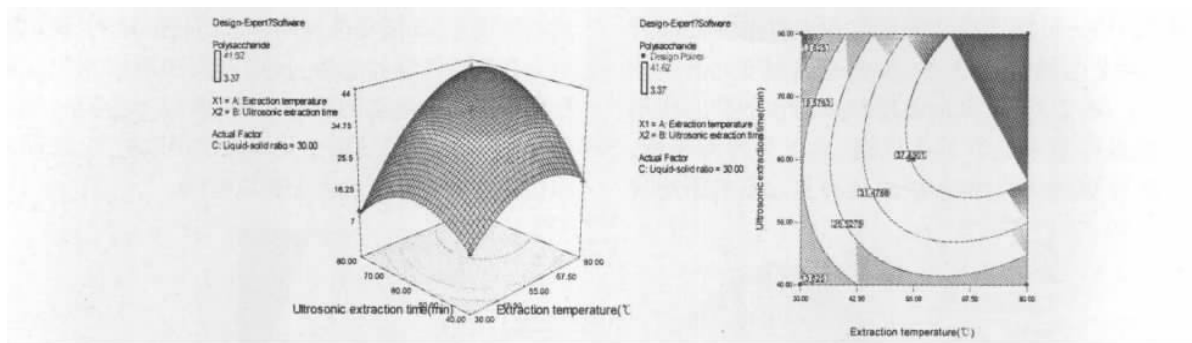


图 4 超声提取时间和提取温度影响虫草多糖提取率的等值线与响应面

Fig. 4 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables (X_1 : extraction temperature; X_2 : extraction time) on the response Y_2

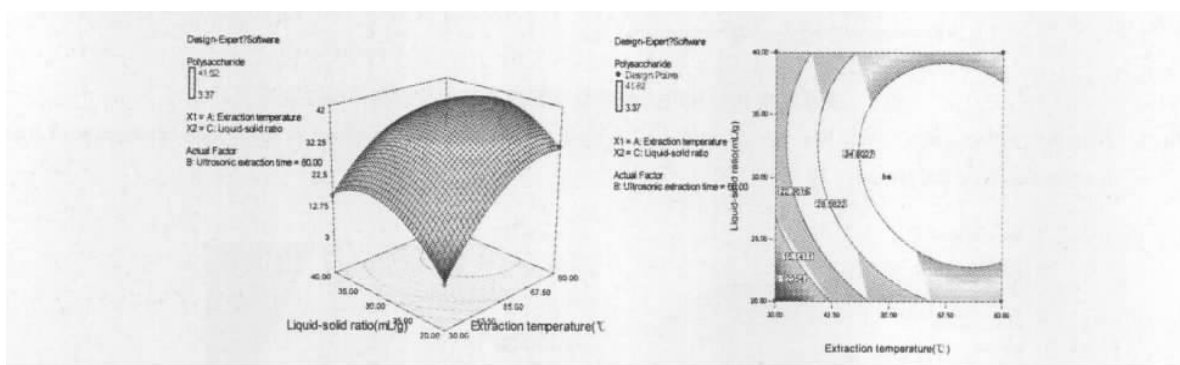


图 5 提取温度和液固比影响虫草多糖提取率的等值线与响应面

Fig. 5 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables (X_1 : extraction temperature; X_3 : liquid-solid ratio) on the response Y_2

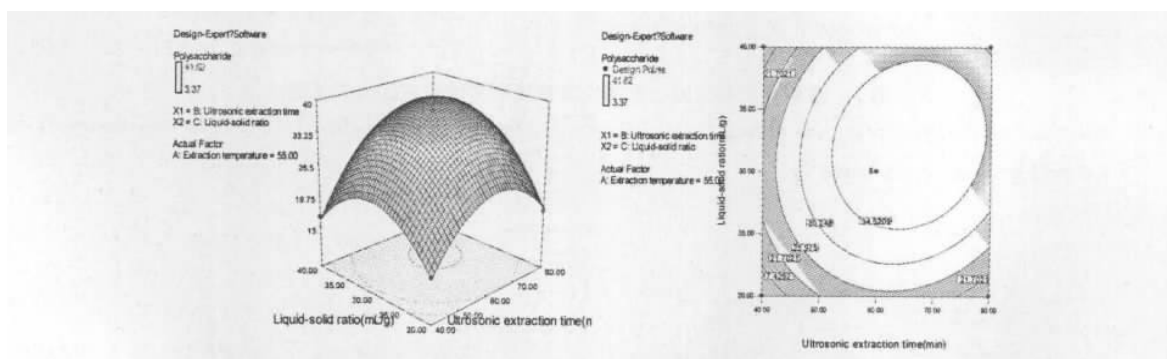


图 6 提取时间和液固比影响虫草多糖提取率的等值线与响应面

Fig. 6 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables (X_2 : extraction time; X_3 : liquid-solid ratio) on the response Y_2

利用 Design Expert 7.0.0 软件对表 4 数据进行二次多元回归拟合, 所得到的二次回归方程 Y_2 的响应面及其等高线见图 4、5 和 6。从图 4 可知, 提取时间和提取温度的交互作用对虫草多糖提取的影响较显著, 表现为曲面较陡, 响应值随提取温度的变化率大于随提取时间的变化率, 说明提取温度对提取

率的影响大于超声提取时间; 虫草多糖提取率随提取时间的延长先升高后降低, 成抛物线趋势; 虫草多糖提取率随提取温度的升高而升高, 随后趋于平缓。从图 5 可知, 提取温度和液固比的交互作用对虫草素提取的影响显著, 响应值随提取温度的变化率大于随液固比的变化率, 说明提取温度对提取率的影

响大于液固比。从图 6 可知,提取时间和液固比对虫草多糖提取率的影响均成抛物线形,即随提取时间和液固比的同时增大,提取率呈先升高后降低的趋势;提取时间和液固比的交互作用对虫草多糖提取的影响显著,表现为曲面较陡;响应值随液固比的变化率大于随提取时间的变化率,说明液固比对虫草多糖提取率的影响大于超声提取时间。

利用 Design Expert 7.0.0 软件对回归模型进行进一步的典型性分析,得到最优提取工艺条件为:提取温度 72 °C,液固比 30 mL/g,提取时间 77 min,提取 2 次,虫草素提取率的理论值可达 53.27%,虫草多糖提取率的理论值可达 41.92%。

2.2 最佳工艺验证实验

最优工艺条件的验证实验结果如表 9 所示,3 次重复实验的虫草素提取率的平均值为 50.90%,RSD = 1.09%,虫草多糖提取率的平均值为 37.28%,RSD = 1.42%,表明二次多项式建立的数学模型具有良好的预测性,所选工艺条件重现性好。

表 9 验证实验结果($n=3$)

Table 9 Verification of optimal extraction conditions for the total polysaccharide yield($n=3$)

实验编号 No.	人工蛹虫草 CSM-8 菌株子实体 Cultured <i>C. militaris</i> CSM-8	
	虫草素提取率 Cordycepin yield(%)	虫草多糖提取率 Polysaccharide yield(%)
1	50.75	37.19
2	50.79	37.38
3	50.16	37.27

2.3 超声综合提取冬虫夏草子实体中虫草素和虫草多糖

表 10 超声提取冬虫夏草子实体中虫草素和虫草多糖实验结果($n=3$)

Table 10 Extraction yields of cordycepin and polysaccharide of *C. sinensis* using the optimized ultrasonic extraction conditions($n=3$)

实验编号 No.	冬虫夏草子实体 <i>C. sinensis</i>	
	虫草素提取率 Cordycepin yield(%)	虫草多糖提取率 Polysaccharide yield(%)
1	50.54	35.46
2	50.57	36.25
3	50.48	36.06

按照响应曲面法确定的最佳提取工艺参数,称取 0.10 g 冬虫夏草子实体粉末进行超声提取,实验结果见表 10。设定提取温度 73 °C,液固比 35 mL/g,提取时间 65 min,提取 2 次,超声综合提取冬虫夏草子实体中虫草素的提取率平均值为 50.20%,RSD = 0.76%,虫草多糖的提取率平均值为 36.92%,RSD = 0.64%,表明所选工艺条件重现性好。

3 结论

综合提取虫草素和虫草多糖工艺条件和路线:采用超声波提取法进行初提,提取液浓缩、醇沉、离心,沉淀用 Savage 法除蛋白,乙醇分级沉淀获得虫草多糖,上清液用大孔树脂和反相硅胶分离纯化,制备型液相色谱分离制备获得虫草素。经响应曲面法确定的最优提取工艺条件为:提取温度 72 °C,液固比 30 mL/g,提取时间 77 min,提取 2 次。以冬虫夏草和 CSM-8 菌株为原料,按照最佳提取工艺条件进行超声提取,测得虫草素提取率平均值分别为 50.90% 和 50.20%,虫草多糖提取率平均值分别为 37.28% 和 36.92%。

参考文献

- Liu DZ(刘东泽),Chen W(陈伟),Gao XH(高新华),*et al.* Progress of research on cordycepin (3-Deoxyadenosine). *Acta Agric Shanghai* (上海农业学报),2004,20(2):89-93.
- Kim JR, Yeon SH, Kim HS, *et al.* Larvicidal activity against *Plutellaxylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Pest Manage Sci* 2002; 58:713-717.
- Yu RM, Wang L, Zhang H. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* 2004; 75:662-666.
- Cunningham KG, Manson W, Sping FS, *et al.* Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris*. *Nature*, 1950; 66:949.
- Zou XY(邹向英). Comparative analysis of effective compositions in three Cordyceps. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报) 2010; 41:139-142.
- Chen W(陈伟), Wu W(吴畏), Gao XH(高新华), *et al.* Study on continuous separation technology of active components from *Cordyceps militaris*. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报) 2007; 23(3):62-65.

(下转第 1427 页)

3 讨论

在许多退化性神经系统疾病中,都涉及到活性氧能诱导的细胞凋亡,因此保护神经元免受氧化应激损伤,是防治该类疾病的有效手段之一。目前,治疗神经退行性疾病的主要临床药物大多为生物碱类结构,本文在构建了过氧化氢对神经细胞的氧化应激模型后,探讨了不同没食子酸酯类的抗氧化保护作用,实验结果表明大多没食子酸酯类都对神经细胞有一定的抗氧化保护作用,为神经退行性疾病的药物设计提供了一定的参考价值。

由于没食子酸正丙酯是一种广泛使用的抗氧化剂,此外它还有有抗血小板聚集、抗炎、逆转恢复受损神经细胞等作用,在医药和食品工业中得到极大的关注。然而本文从三峡流域特有濒危植物疏花水柏枝中分离到的一种天然产物,即3,4-二甲氧基-5-羟基苯甲酸甲酯,为没食子酸甲酯的衍生物,却对神经细胞显示出比没食子酸正丙酯更好的抗氧化保护作用,表明其有潜在的药用价值。

但是没食子酸正辛酯有点例外,与实验中所用的其他没食子酸酯类相比,其抗氧化保护作用很小,可能与其本生的毒性作用较大有关,因此是否由于其参与成酯的羟基较大,影响了细胞的正常生长,从而降低了它的抗氧化作用,这有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Yu J(余涓),Hu GF(胡桂芳),Weng SM(翁绳美) *et al.* Protective effects of 13-MTD on injury of SH-SY5Y neuroblastoma cells induced by hydrogen peroxide. *Chin J Clin Pharm Ther*(中国临床药理学与治疗学) 2010,15: 622-626.
- 2 Chen X(陈旭),Hu Y(胡园),LI QS(李青山) *et al.* The protective effect of EGCG on hydrogen peroxide induced SH-

SY5Y cell injury. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2011,27: 320-324.

- 3 Wu D(吴迪),Wu GR(吴桂荣),Abulizi A(阿布力孜·阿布杜拉) *et al.* Preventive effect of different ω -3 / ω -6 constituent ratio of compatibility safflower seed oil on SH-SY5Y cells against oxidative cell damage. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2011,23: 420-424.
- 4 Xu W(许玮),Feng Q(冯倩),Cao HL(曹厚利) *et al.* Effect of propyl gallate on proliferation inhibition and apoptosis induction in K562 cells. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报) 2011,17: 517-520.
- 5 Chen FQ(陈芳清),Xie ZQ(谢宗强). The physiological and biochemical responses of endangered *Myricaria laxiflora* to simulated summer flooding. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报) 2009,17: 249-253.
- 6 Harkat H,Haba H,Marcourt L *et al.* An unusual lignan sulfate and aromatic compounds from *Frankenia thymifolia* Desf. *Biochem Syst Ecol* 2007,35: 176-179.
- 7 Tu YF(涂云飞),Yang XF(杨秀芳),Kong JH(孔俊豪) *et al.* Antioxidant capability of epi-catechins and theaflavins *in vitro* by scavenging hydroxyl free radical. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2012,24: 653-659.
- 8 Liu HL(刘洪玲),Sun XH(孙向红),Jiang HQ(姜惠卿) *et al.* Protective effect of KangShouLing containing serum on damage of cultured SH-SY5Y cells *in vitro* introduced by hydrogen peroxide. *Med J Qilu*(齐鲁医学杂志) 2006,21: 223-225.
- 9 Sun FL(孙芳玲),Wang W(王文),An Y(安宜) *et al.* Morroniside inhibits H₂O₂-induced oxidative injury in SH-SY5Y neuroblastoma cell. *Chin Remed Clin*(中国药物与临床) 2008,8: 843-845.
- 10 Sun XH(孙向红),Sun W(孙伟),Li J(李静) *et al.* Effects of Haikangling in serum on cultured neuroblastoma apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Chin Pharm J*(中国药学杂志) 2008,43: 1781-1784.

(上接第1435页)

- 7 Wang YJ(王英娟),Li DW(李多伟),Wang YC(王义潮) *et al.* Integrated extracting technology of cordycepin and polysaccharides in *Cordyceps militaris*. *Acta Bot Bor-occid Sin*(西北植物学报) 2005,25: 1863-1867.
- 8 Qi B(祁波). Integrated extracting technology of cordycepin and polysaccharides in *Cordyceps militaris*. *Sci Techol Inf*(科技信息) 2009: 341-343.

- 9 Wang YF(王永菲),Wang CG(王成国). The application of response surface methodology. *J Central Univ Nation Nat Sci*(中央民族大学学报,自科版) 2005,14: 236-240.
- 10 Chen W(陈伟),Wu W(吴畏),Gao XH(高新华) *et al.* Research on separation and enrichment of cordycepin by column chromatography. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报) 2006,22(4): 69-71.