

忍冬藤多糖的提取工艺优化及 清除亚硝酸盐阻断亚硝胺合成的研究

李振^{1,2}, 李萍³

(1. 临沂大学药学院, 山东临沂 276005) (2. 山东省鲁南中药材资源开发工程技术研究中心, 山东临沂 276005)
(3. 临沂市人民医院, 山东临沂 276003)

摘要: 本研究对忍冬藤多糖进行提取、分离和纯化, 测定了其清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的作用。试验以忍冬藤多糖得率为指标, 采用响应面法优化超声辅助提取多糖工艺, 通过 Sevag 法脱蛋白、醇沉, 真空干燥得到多糖, 在模拟胃酸的条件下, 探讨了忍冬藤多糖对清除亚硝酸盐阻断亚硝胺合成的影响。结果表明, 忍冬藤多糖最佳提取条件为: 液料比为 30:1, 提取时间为 40 min, 超声功率为 210 W, 提取温度 70 ℃, 在此条件下, 忍冬藤多糖得率理论值为 8.53%, 验证试验结果多糖得率为 8.46%, 在质量浓度为 500 μg/mL 时, 对亚硝酸盐的清除率为 90.44%, 对亚硝胺合成的阻断率为 71.24%。因此, 采用响应面法优化超声辅助提取忍冬藤多糖工艺预测性良好, 忍冬藤多糖具有清除亚硝酸盐与阻断亚硝胺合成的作用, 本研究为忍冬藤进一步利用和开发其衍生生物活性多糖产品提供了理论依据。

关键词: 忍冬藤; 多糖; 提取工艺; 响应面法; 亚硝酸盐; 亚硝胺

文章编号: 1673-9078(2019)04-130-139

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.019

Optimization of the Extraction of the Polysaccharides from *Caulis Lonicerae* and Their Abilities of Scavenging Nitrite and Blocking Nitrosamine Synthesis

LI Zhen^{1,2}, LI Ping³

(1.College of Pharmacy, Linyi University, Linyi 276005, China)(2.Shandong Lunan Chinese Medicinal Materials Resources Development Engineering Technology Research Center, Linyi 276005, China)
(3.Linyi People's Hospital, Linyi 276003, China)

Abstract: In this research, the extraction, isolation and purification of the polysaccharides from *Caulis Lonicerae* were performed, and their functions to removing nitrite and block the synthesis of nitrosamine were determined. The ultrasound-assisted polysaccharide extraction was optimized using the yield of polysaccharides from *Caulis Lonicerae* as the index, and the response surface method. The extracted polysaccharides was deproteinized using the Sevag method, precipitated using alcohol, and vacuum dried, before the examinations on their abilities of scavenging nitrite and blocking nitrosamine synthesis under simulated gastric acid conditions. The results indicated the optimal extraction conditions: the ratio of liquid to material, 30:1; extraction time, 40 min; ultrasonic power, 210 W; extraction temperature, 70 ℃. Under the optimal conditions, the theoretical yield of polysaccharides was 8.53%, while the experimental value was 8.46%; at a concentration of 500 μg/mL, the polysaccharide extract had a nitrite-scavenging rate of 90.44% and a blocking rate of 71.24% for nitrosamine synthesis. Therefore, the response surface method, which was used to optimize the ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Caulis Lonicerae*, provided good quality predictions. The obtained polysaccharides were capable of removing nitrite and blocking the synthesis of nitrosamines. This research provides a theoretical basis for further utilization of *Caulis Lonicerae* and development of derived bioactive polysaccharide products.

Key words: *Caulis Lonicerae*; polysaccharide; extraction technology; response surface methodology; nitrite; nitrosamines

收稿日期: 2018-12-24

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2015PH029); 临沂大学博士科研启动基金项目 (LYDX2016BS082)

作者简介: 李振 (1971-), 男, 副教授, 研究方向: 天然产物研究与开发

亚硝胺是一类强化学致癌物质,在发现的近 300 种 N-亚硝基化合物中,约 90%以上被证实具有动物致癌性,这类化合物一次或多次过量摄入,可损伤肝脏和破坏血小板,导致急性中毒;长期食用含有亚硝胺类物质的食品,则会造成慢性中毒,可诱发机体多种器官组织恶性肿瘤^[1-4]。正常情况下,人们直接从食物中摄入的亚硝胺很少,在人体胃酸环境中,大多由亚硝酸盐和胺类化合物反应生成,从而危害人类健康。因此,清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺类化合物的生成是防癌抗癌的有效措施,已成为研究的热点^[5]。国内外学者对食品中亚硝胺的阻断作用研究表明,对亚硝酸盐残留量具有清除作用的一些添加物对可阻断亚硝胺的合成,如维生素 C、E 等^[6]。研究发现,植物多糖也具有一定的清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺作用。郭小鹏等向 25 mL 模拟胃液中加入用木瓜蛋白酶-sevag 法脱蛋白后的黄参多糖 50 mg,反应时间为 15 min,对亚硝酸盐的清除率最高可达 86.6%^[7]。冯丽丹等报道,当蕨菜多糖溶液浓度为 20 mg/mL 时,50 °C 条件下加热 15 min,对亚硝酸盐清除率为 41.10%^[8]。邢增威用超声辅助提取红菇多糖,当多糖溶液浓度为 1 mg/mL 时,对亚硝酸盐清除率为 48.15%^[9]。吕伟彤等模拟两种胃液在 37 °C 的实验条件下,百合多糖在浓度为 0.05%时对亚硝酸盐清除率达到最大,在浓度为 0.50%时,对亚硝胺合成阻断能力最大^[10]。忍冬藤(*Caulis Lonicerae*)是忍冬科植物忍冬的干燥藤茎,产于我国大部分地区,目前,国内外学者主要针对忍冬藤的化学成分进行了系统的研究,发现其主要含有有机酸、挥发油、黄酮类、三萜类、环烯醚萜苷类等活性成分^[11-17],具有清热解毒,疏风通络之功效,主要用于温病发热,热毒血痢,痈肿疮疡,风湿热痹,关节红肿热痛等病症。现代药理学研究表明,忍冬藤提取物具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、保肝以及调节免疫等药理作用^[18-20]。目前,关于忍冬藤多糖的提取工艺优化及清除亚硝酸盐、阻断亚硝胺合成的研究未见报道。本实验通过单因素试验和响应面法对忍冬藤中多糖的提取工艺进行优化,探讨其清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成作用,为忍冬藤作为亚硝酸盐清除剂和亚硝化反应抑制剂的开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

忍冬藤(经临沂大学生命科学学院王文房教授鉴定),采自临沂大学校园;Vc,购自 Sigma 公司;葡萄糖标准品、苯酚、硫酸、无水乙醇、磷酸氢二钠、

三氯甲烷、正丁醇、亚硝酸钠、柠檬酸、无水对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、二甲胺、碳酸钠及 α -萘胺等所用试剂均为国产分析纯。

1.2 试验仪器

FA2004N 电子天平,上海精密仪器仪表有限公司;WK-150 型超微粉碎机,青州市精诚医药装备制造有限公司产品;DHG-9035A 电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;KQ-300DE 数控超声波清洗器,江苏昆山市超声仪器有限公司;DZF-6050 台式电热真空恒温箱,上海东麓仪器设备有限公司;TU-1810sp 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;RE52-99 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;SHK-III 循环水式多用真空泵,郑州科泰实验设备有限公司;TDI-80-2B 离心机,上海安亭科学仪器厂;HH-S8 数显恒温水浴锅,江苏金怡仪器科技有限公司;ZF7-C 三用紫外仪,上海安亭科学仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 忍冬藤多糖的制备

忍冬藤粉碎后过 60 目筛→加热超声提取→抽滤→滤液→旋蒸、浓缩→Sevage 法脱蛋白→乙醇沉淀→过夜→滤液离心→沉淀物→真空干燥→忍冬藤多糖

1.3.2 葡萄糖标准曲线的绘制

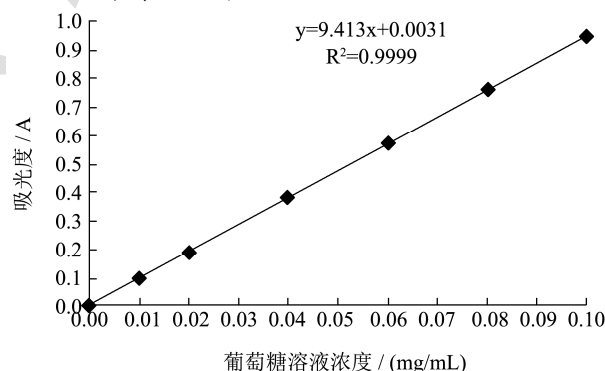


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of polysaccharide

采用苯酚-硫酸法测定忍冬藤多糖含量。即精密称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 20.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,蒸馏水定容,配制质量浓度为 0.20 mg/mL 葡萄糖标准品储备液。取其适量,稀释,依次制成 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 葡萄糖标准品溶液。取各浓度葡萄糖标准品溶液 1.0 mL,置于试管中,加入 1.50 mL 5%苯酚和 5 mL 浓硫酸溶液,混匀,50 °C 水浴 30 min,冷却至室温,空白对照用蒸馏水代替样品,在 490 nm 波长处测定其吸光度值,以葡萄糖标准品溶液质量浓度为横坐标,吸光度值为

纵坐标, 绘制葡萄糖溶液的标准曲线, 模拟回归方程。

以葡萄糖质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制葡萄糖标准曲线 (见图 1), 由图 1 可知, 葡萄糖质量浓度在 0~0.10 mg/mL 范围内, 与其吸光度呈良好的线性关系, 二者进行相关回归, 所得回归方程 $Y=9.413x+0.0031$, $R^2=0.9999$ 。

1.3.3 忍冬藤多糖得率的测定

称取忍冬藤粉末适量, 按照 1.3.1 法制备样品溶液, 在 490 nm 处测定样品溶液的吸光度, 带入 1.3.2 回归方程, 求得样品溶液中多糖的质量浓度, 按公式

(1) 计算忍冬藤多糖得率。

$$\text{忍冬藤多糖得率}(\%)=C \times V/W \times 100\% \quad (1)$$

式中: C: 提取液中多糖的质量浓度(mg/mL); V: 提取液体积(mL); W: 忍冬藤样品质量(mg)。

1.3.4 单因素试验

以忍冬藤多糖得率为考察指标, 分别考察液料比、提取时间、超声功率和提取温度对多糖得率的影响。每个试验平行做 3 次, 求其平均值。

1.3.4.1 液料比对忍冬藤多糖得率的影响

称取 5.00 g 忍冬藤粉末样品, 按其质量加入 10、15、20、25、30、35 倍体积蒸馏水, 提取温度为 60 °C、超声功率为 180 W, 提取 30 min, 抽滤, 取其滤液, 按 1.3.3 方法测定忍冬藤多糖得率。

1.3.4.2 提取时间对忍冬藤多糖得率的影响

称取 5.00 g 忍冬藤粉末样品, 按其质量 20 倍体积加入蒸馏水, 提取温度为 60 °C, 超声功率为 180 W, 分别超声提取 20、30、40、50、60、70 min, 抽滤, 取其滤液, 按 1.3.3 方法测定忍冬藤多糖得率。

1.3.4.3 超声功率对忍冬藤多糖得率的影响

称取 5.00 g 忍冬藤粉末样品, 按其质量 20 倍体积加入蒸馏水, 提取温度为 60 °C, 超声功率分别在 120、150、180、210、240、270 W 的条件下提取 30 min, 抽滤, 取其滤液, 按 1.3.3 方法测定忍冬藤多糖得率。

1.3.4.4 提取温度对忍冬藤多糖得率的影响

称取 5.00 g 忍冬藤粉末样品, 按其质量 20 倍体积加入蒸馏水, 超声功率为 180 W, 提取温度分别在 40、50、60、70、80、90 °C 的条件下提取 30 min, 抽滤, 取其滤液, 按 1.3.3 方法测定忍冬藤多糖得率。

1.3.5 响应面法优化忍冬藤多糖的提取条件

在以上单因素试验筛选的基础上, 以忍冬藤多糖得率为响应值, 以液料比 (A)、提取时间 (B)、超声功率 (C) 和提取温度 (D) 4 个因素为响应面法设计的自变量, 运用 Design Expert 8.0.6 软件中的 Box-Behnken 对忍冬藤多糖提取工艺进行优化试验设计 (见表 1)。

1.3.6 忍冬藤多糖的纯化

按 1.3.5 优化工艺制备忍冬藤多糖提取液, 采用旋转蒸发仪 60 °C 下, 减压浓缩至原体积的 1/10, 活性炭脱色, 用 Sevag 法脱蛋白^[21,22], 加入 4 倍体积的无水乙醇, 过夜, 滤液离心, 将沉淀物真空干燥, 得到多糖, 按公式 2 计算其纯化后得率。

$$\text{忍冬藤多糖得率}(\%) = \frac{\text{纯化后多糖质量}}{\text{忍冬藤样品质量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.7 忍冬藤多糖清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究

1.3.7.1 忍冬藤多糖清除亚硝酸盐研究

精密称取忍冬藤多糖适量, 置 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水溶解, 定容。分别配制质量浓度为 10、20、50、100、200、500 μg/mL 溶液, 取 1 mL 于比色管中, 模拟胃酸环境, 分别加入柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 (pH=3.0)、5 mg/mL 的 NaNO₂ 标准液各 0.20 mL, 37 °C 恒温水浴 1.5 h, 加入 0.40% 对氨基苯磺酸 0.2 mL, 摇匀、静置 5 min, 再加入 0.1 mL 0.20% 盐酸萘乙二胺, 加蒸馏水至 5 mL, 摇匀、静置 15 min, 以蒸馏水作空白对照, 在 540 nm 处测其吸光度 A_x, 同时测不加样品的空白对照吸光度值 A₀ 与样液本底吸光度值 A^[5,10], 计算忍冬藤多糖对亚硝酸盐清除率, 以 Vc 作试验对照, 求其 3 次平均值。

$$\text{亚硝酸盐清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A)}{A_0} \times 100\%$$

式中: A₀ 为不加忍冬藤多糖时 NaNO₂ 吸光度值; A_x 为加入忍冬藤多糖后 NaNO₂ 吸光度值。

1.3.7.2 忍冬藤多糖阻断亚硝胺合成的研究

准确吸取 1.3.7.1 配制的取忍冬藤多糖溶液各 1 mL 于比色管中, 分别加入 1 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 (pH=3.0)、0.10 mL NaNO₂ 溶液 (1 mmol/L)、0.1 mL 二甲胺溶液 (1 mmol/L), 用蒸馏水稀释至 2.50 mL, 37 °C 恒温水浴 1.5 h, 取 1.0 mL, 加入 0.5 mL 0.5% Na₂CO₃ 溶液, 在 254 nm 波长处, 用紫外分析仪照射 15 min, 加入 1.50 mL 1% 对氨基苯磺酸, 摇匀、静置 3 min, 再加入 1.50 mL 0.10% α-萘胺、蒸馏水 0.50 mL, 摇匀、静置 15 min。以蒸馏水作为空白对照, 在 525 nm 处测其吸光度值 A_x, 同时测定不加样品的空白对照吸光度值 A₀ 与样液本底吸光度值 A^[5,10], 计算忍冬藤多糖对亚硝胺合成的阻断率, 以 Vc 作对照试验, 求 3 次平均值。

$$\text{亚硝胺阻断率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A)}{A_0} \times 100\%$$

式中: A₀ 为不加忍冬藤多糖时 NaNO₂ 的吸光度值; A_x 为加入忍冬藤多糖后 NaNO₂ 的吸光度值。

1.3.8 数据统计分析

研究每个实验重复 3 次, 数据结果以平均值±标

准方差 (means $\pm$ SD) 表示, 利用软件 Excel 2007 和 SPSS 18.0 对所测定的数据进行整理、分析并制图。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 液料比对忍冬藤多糖得率的影响

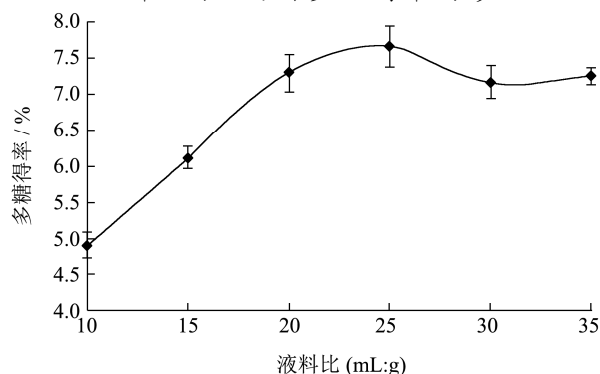


图2 液料比对多糖得率的影响

Fig.2 Effects of liquid-solid ratio on polysaccharide yield

由图2可知, 在提取温度为 60℃、超声功率为 180 W 的条件下, 提取 30 min, 忍冬藤多糖得率随着液料比例的增大而升高, 在液料比为 25:1 时, 多糖得率最高, 为 7.66%; 此后, 随着提取蒸馏水的增加, 多糖得率有所下降。此结果可能是由于液料比较小时, 忍冬藤多糖不能够全部转移到溶剂中, 造成提取不完全, 多糖得率较低, 随着液料比的增加使内部的植物细胞和外部溶剂之间产生较大浓度差, 使多糖能迅速地扩散溶出, 提高了忍冬藤多糖的溶出, 使其得率增加; 但随着液料比的继续增加, 过多的溶剂会增加超声波破碎细胞的阻力, 使细胞破碎程度下降, 降低多糖的溶出量^[23,24]。因此, 忍冬藤多糖提取的液料比为 25:1 为宜。

2.1.2 提取时间对忍冬藤多糖得率的影响

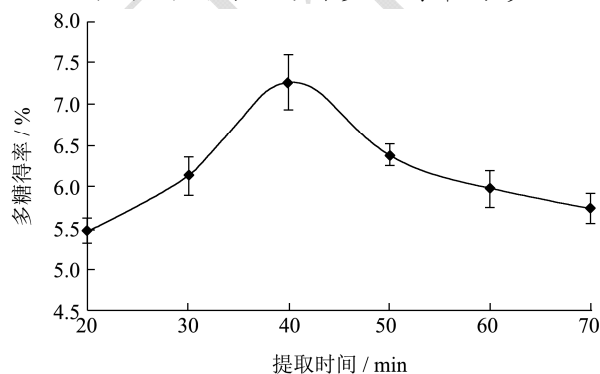


图3 提取时间对多糖得率的影响

Fig.3 Effects of extraction time on polysaccharide yield

由图3可知, 在固定液料比为 20:1、提取温度为 60℃、超声功率为 180 W 的条件下, 忍冬藤多糖提取

得率随着提取时间的延长, 呈先上升后下降的趋势, 在 40 min 左右达到最高, 多糖得率为 7.25%, 继续增加提取时间, 多糖得率呈现下降趋势。原因可能是多糖从忍冬藤扩散到溶液中需要一定时间, 提取初始多糖转移到水中的浓度较低, 随着时间增加, 多糖释放到溶液中的量增加, 但超声波具有较强的机械剪切作用, 长时间的超声导致多糖的糖苷键断裂、降解, 使多糖得率下降^[25-28]。因此, 忍冬藤多糖的超声提取时间以 40 min 左右为宜。

2.1.3 超声功率对忍冬藤多糖得率的影响

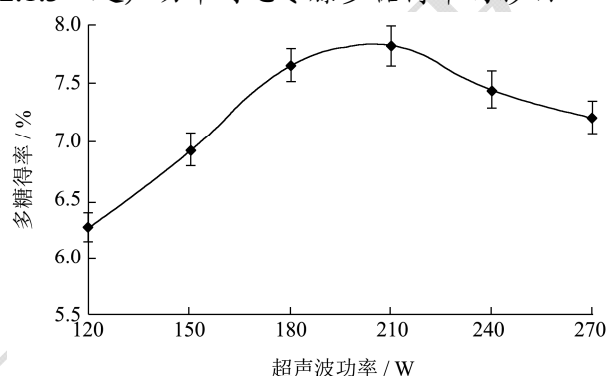


图4 超声功率对多糖得率的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic power on polysaccharide yield

由图4可知, 在固定液料比为 20:1、提取温度为 60℃、提取时间为 30 min 的条件下, 超声功率在 120~210 W 范围内, 随着超声功率的升高, 多糖得率增加, 在超声功率为 210 W 时, 多糖得率最高, 继续提高超声功率, 得率呈现下降趋势。这可能因为超声波的空化效应, 随着超声功率的增大, 对细胞壁的破碎作用增强, 使细胞内温度迅速上升, 多糖分子运动速率加快, 利于多糖的溶出, 得率随之增加, 达到一定功率, 多糖得率最大; 但超声功率过高, 会导致多糖结构的破坏, 呈现降低的趋势^[29]。因此, 忍冬藤多糖提取的超声功率为 210 W 左右。

2.1.4 提取温度对忍冬藤多糖得率的影响

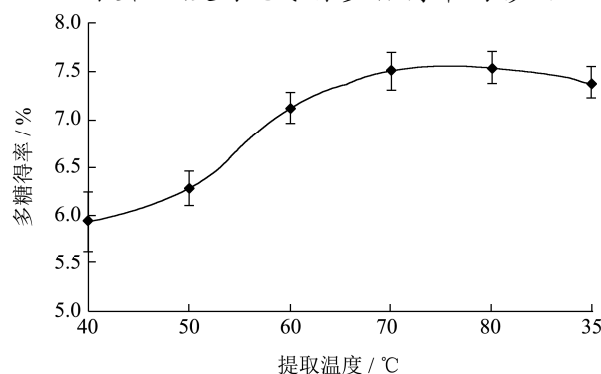


图5 提取温度对多糖得率的影响

Fig.5 Effects of extraction temperature on polysaccharide yield

由图5可见, 在固定液料比为 20:1、提取时间为

30 min、超声功率为 180 W 的条件下,忍冬藤多糖得率随着提取温度的升高而升高,温度升高,分子运动速度加快,细胞间的摩擦作用使得细胞破裂,多糖溶解及扩散速度加快,得率提高^[30];当达到 70 ℃以后,略有下降的趋势,这可能是由于温度过高导致多糖结构破坏,使部分多糖有效成分被氧化分解,使得多糖得率变低^[31]。因此,忍冬藤多糖提取温度以 70 ℃左右为宜。

2.2 响应面法优化忍冬藤多糖的提取条件

2.2.1 响应面法优化忍冬藤多糖的试验结果

响应面法优化忍冬藤多糖得率的试验结果见表 2。使用 Box-Behnken 设计模型数据分析系统中的 ANOVA 对试验数据进行多元回归拟合,以忍冬藤多糖得率(Y)为因变量,液料比(A)、提取时间(B)、超声功率(C)、提取温度(D)为自变量,建立了响应面回归方程:忍冬藤多糖得率 $Y=8.35+0.36A+0.20B+0.19C+0.19D-0.040AB+0.12AC-0.015AD-0.27B^2-0.35BD-0.27CD-0.23A^2-0.73B^2-0.57C^2-0.64D^2$,对回归方程进行方差分析和显著性检验结果见表 3。

由表 3 可知,该回归模型 $p<0.0001$,失拟项($p=0.1003$) >0.01 ,相关系数 $R^2=0.9971$,说明该回

归方程模型极显著,试验误差小,回归模型与实际提取试验拟合程度好,试验设计方法可靠,适用于优化忍冬藤多糖提取工艺条件。对各项影响因子的偏回归系数进行检验分析结果表明:所选取的 4 个因素的一次线性项对多糖得率的有极显著的影响,影响因素的大小依次为液料比(A)>提取时间(B)>提取温度(D)>超声功率(C);因素交互项 AC、BC、BD、CD 对多糖得率的影响极显著,说明液料比与超声功率、提取时间与超声功率、提取温度以及超声功率与提取温度之间交互作用分别对忍冬藤多糖提取得率影响显著;从二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对多糖得率响应值来看($p<0.0001$),说明液料比、提取时间、超声功率、提取温度的二次项对其多糖得率的影响也达到极显著水平。但其他各项的影响差异不显著。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Experimental design of response surface methodology

因素			
A 液料比 (mL/g)	B 提取时间 (min)	C 超声 功率/W	D 提取 温度/℃
20:1	30	180	60
25:1	40	210	70
30:1	50	240	80

表 2 响应面试验设计及试验结果

Table 2 Experimental design and results of response surface methodology

试验序号	A	B	C	D	多糖得率/%	试验序号	A	B	C	D	多糖得率/%
1	30	40	210	80	7.98±0.16	16	20	30	210	70	6.75±0.25
2	30	50	210	70	7.95±0.20	17	25	40	210	70	8.38±0.18
3	30	30	210	70	7.62±0.14	18	25	40	210	70	8.37±0.15
4	25	30	210	60	6.28±0.09	19	25	40	240	80	7.27±0.14
5	20	40	210	60	6.93±0.11	20	25	40	180	60	6.45±0.10
6	20	40	210	80	7.35±0.06	21	25	50	180	70	7.37±0.15
7	25	50	240	70	7.12±0.10	22	25	30	210	80	7.33±0.11
8	30	40	210	60	7.62±0.15	23	25	50	210	80	7.01±0.08
9	25	40	180	80	7.41±0.21	24	20	50	210	70	7.24±0.19
10	25	50	210	60	7.36±0.24	25	20	40	240	70	7.32±0.22
11	25	30	180	70	6.42±0.12	26	30	40	180	70	7.57±0.13
12	25	40	210	70	8.32±0.19	27	25	40	210	70	8.33±0.17
13	25	40	240	60	7.39±0.08	28	20	40	180	70	7.11±0.20
14	25	30	240	70	7.26±0.13	29	30	40	240	70	8.25±0.12
15	25	40	210	70	8.34±0.15						

表 3 响应面试验结果方差分析

Table 3 Variance analysis on experimental results of response surface methodology

项目	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
模型	10.03	14	0.72	347.22	< 0.0001**

转下页

接上页

A	1.53	1	1.53	743.26	< 0.0001**
B	0.48	1	0.48	230.69	< 0.0001**
C	0.43	1	0.43	209.94	< 0.0001**
D	0.45	1	0.45	217.37	< 0.0001**
AB	6.40E-03	1	6.40E-03	3.10	0.1000
AC	0.06	1	0.06	26.76	0.0001**
AD	9.00E-04	1	9.00E-04	0.44	0.5197
BC	0.30	1	0.30	143.95	< 0.0001**
BD	0.49	1	0.49	237.47	< 0.0001**
CD	0.29	1	0.29	141.32	< 0.0001**
A ²	0.34	1	0.34	163.05	< 0.0001**
B ²	3.41	1	3.41	1653.45	< 0.0001**
C ²	2.12	1	2.12	1026.71	< 0.0001**
D ²	2.67	1	2.67	1293.62	< 0.0001**
保留值	0.03	14	2.06E-03		
失拟项	0.03	10	2.62E-03	3.91	0.1003
纯误差	2.68E-03	4	6.70E-04		
所有项	10.06	28			
R ²					0.9971

注: **表示差异极显著 ($p<0.01$)。

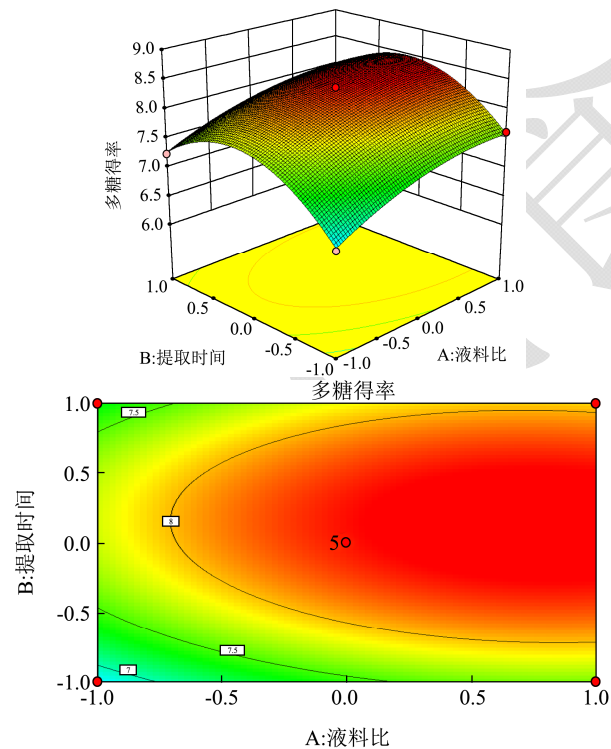


图 6 液料比与提取时间的交互作用

Fig.6 Interaction between liquid-solid ration and extraction time

2.2.2 提取条件互作对忍冬藤多糖得率的影响结果

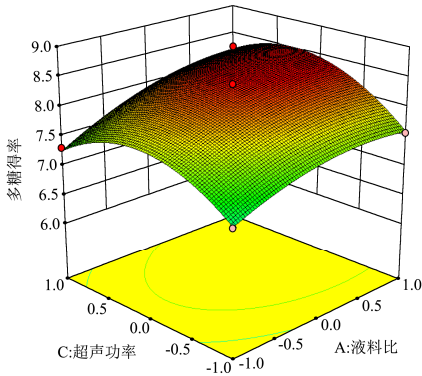
响应面直观反映了忍冬藤多糖提取各因素对响应

值的影响及各因素之间的相互作用。响应面坡陡峭程度和等高线椭圆形状反映出交互作用的强度，如果响应面坡度相对平缓，则说明受条件变化的影响不大；相反，如果坡度比较陡峭，表明响应值受条件改变的影响较大^[32,33]。若等高线呈椭圆形，表明两因素交互效应明显，呈圆形则反之。忍冬藤多糖得率各因素交互效应响应面和等高线见图 6~11。

2.2.2.1 液料比和提取时间对多糖得率的影响

由图 6 可见，液料比和提取时间对忍冬藤多糖得率的交互作用不显著，随着液料比的增大和提取时间的增高呈先升高后降低的趋势。从等高线可见，等高线的椭圆程度不高表明两者交互作用不明显，等高线集中在液料比一侧，表明液料比对多糖得率的影响大于提取时间的影响。

2.2.2.2 液料比和超声功率对多糖得率的影响



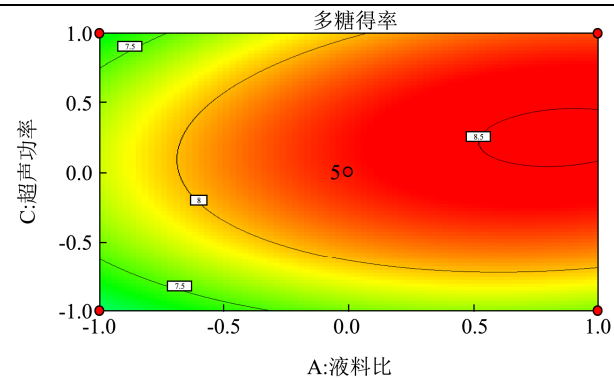


图 7 液料比与超声功率的交互作用

Fig.7 Interaction between Liquid-solid ration and ultrasonic power

由图 7 响应面和等高线情况可见，液料比和超声功率对忍冬藤多糖得率的影响交互作用明显，随着液料比和超声功率的增大呈先升高后降低的趋势，等高线集中在液料比一侧，表明液料比对多糖得率的影响大于超声功率的影响。

2.2.2.3 液料比和提取温度对多糖得率的影响

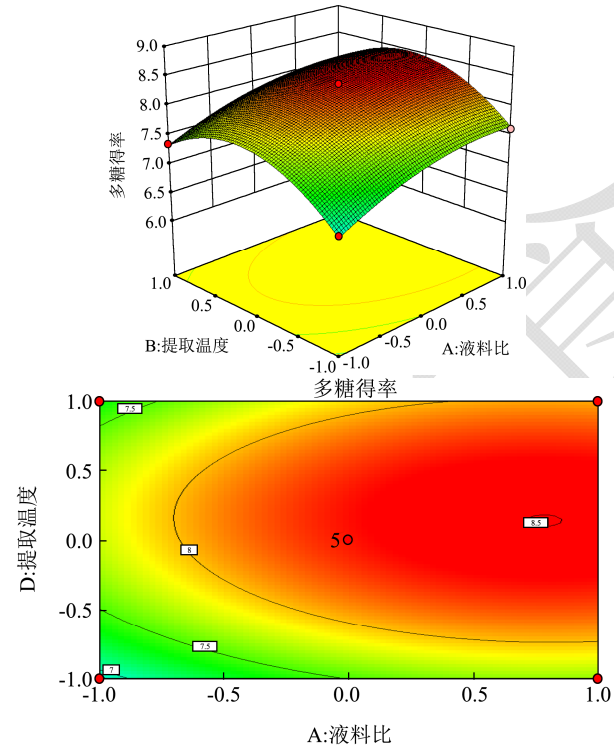


图 8 液料比与提取温度的交互作用

Fig.8 Interaction between Liquid-solid ration and extraction temperature

由图 8 响应面的陡峭程度和等高线的椭圆程度可见，液料比和提取温度二者对忍冬藤多糖得率的影响交互作用不明显，等高线集中在液料比一侧，表明液料比对多糖得率的影响大于提取温度的影响。

2.2.2.4 提取时间与超声功率对多糖得率的影响

由图 9 响应面的陡峭程度和等高线的椭圆程度可

见，提取时间和超声功率对忍冬藤多糖得率的交互作用明显，随着提取时间和超声功率的增大呈先升高后降低的趋势。等高线集中在提取时间一侧，表明提取时间对多糖得率的影响高于超声功率的影响。

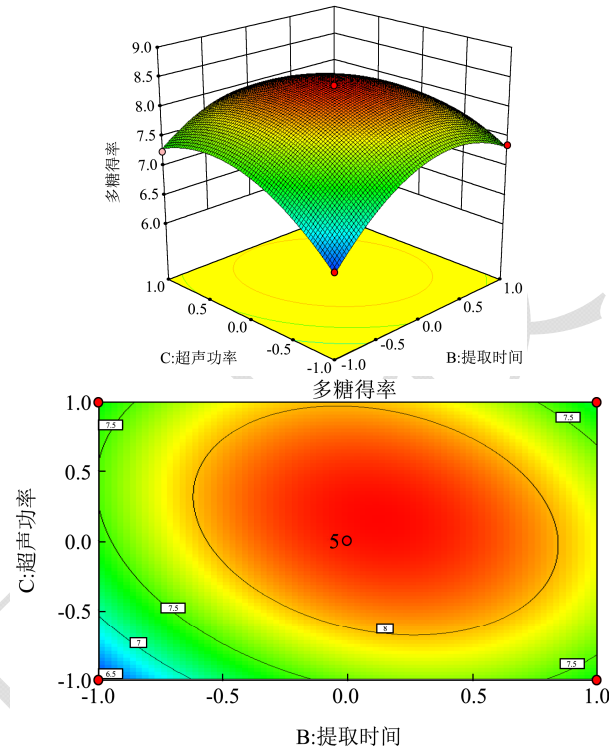


图 9 提取时间与超声功率的交互作用

Fig.9 Interaction between extraction time and ultrasonic power

2.2.2.5 提取时间与提取温度对多糖得率的影响

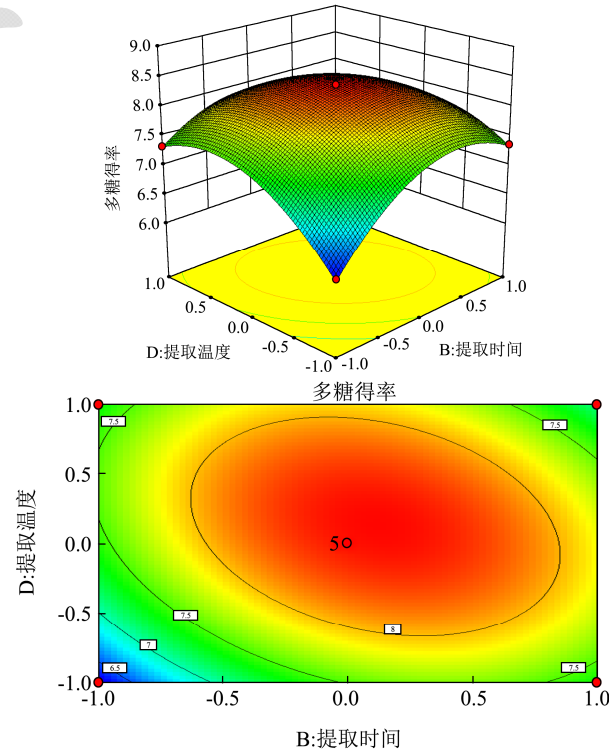


图 10 提取时间与提取温度的交互作用

Fig.10 Interaction between extraction time and temperature

由图 10 可见,提取时间和提取温度对忍冬藤多糖得率的交互作用明显,随着提取时间和提取温度的升高呈先升高后降低的趋势。提取时间和提取温度较低时,得率增大的坡度较陡,而随着其继续增大时,坡度变缓慢。

2.2.2.6 超声功率与提取温度对多糖得率的影响

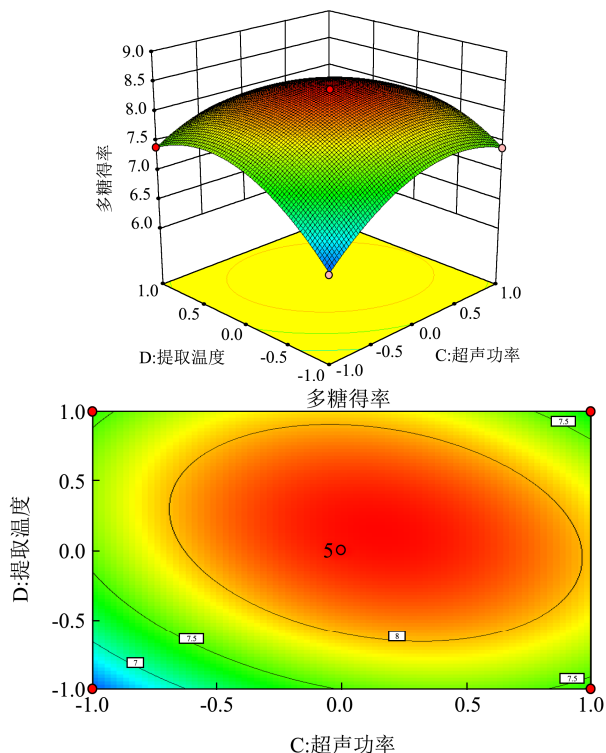


图 11 超声功率与提取温度的交互作用

Fig.11 Interaction between ultrasonic power and extraction temperature

由图 11 可见,超声功率和提取温度对忍冬藤多糖得率的交互作用明显,随着超声功率和提取温度的升高呈先升高后降低的趋势。超声功率和提取温度较低时,多糖得率增大的坡度较陡,而随着其继续增大时,坡度变缓。

综合回归模型的统计分析可知,忍冬藤多糖的最佳提取工艺参数为:液料比为 29.18:1,提取时间为 40.53 min,超声功率为 216.60 W,提取温度 70.80 °C,此条件下多糖的理论提取得率为 8.53%。为验证分析结果的可行性与可靠性,考虑到试验的可操作性,将提取多糖的工艺条件设定为:液料比为 30:1,提取时间为 40 min,超声功率为 210 W,提取温度为 70 °C,测得的多糖得率为 8.46%。测定提取得率与模型的预测值相近,其相对误差为 0.07%。因此,该模型准确、可靠,可以用于忍冬藤多糖的优化提取。

2.3 忍冬藤多糖纯化结果分析

对忍冬藤多糖提取液进行纯化,多糖后得率为

7.06%。由此可见纯化后,多糖得率有所下降,可能在脱色脱蛋白过程中部分多糖被破坏,醇沉过程中沉淀不完全等因素使多糖含量降低。

2.4 忍冬藤多糖清除亚硝酸盐阻断亚硝胺合成的试验结果

2.4.1 忍冬藤多糖清除亚硝酸盐试验

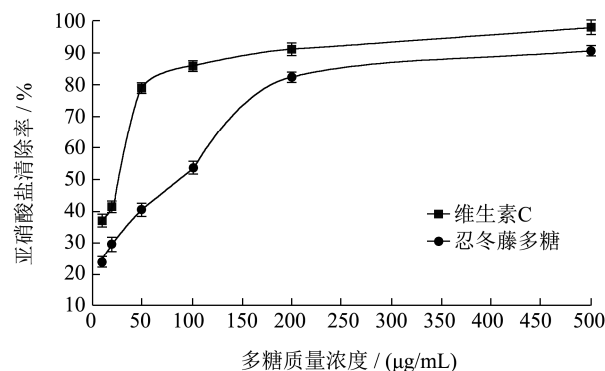


图 12 忍冬藤多糖对亚硝酸盐清除的影响

Fig.12 Effect of *Caulis Lonicerae* polysaccharide on nitrite scavenging

由图 12 可知,在模拟胃液的条件下,随着忍冬藤多糖和 Vc 质量浓度的增加,二者对亚硝酸盐清除率不断提高,忍冬藤多糖质量浓度在 10~200 $\mu\text{g/mL}$,提高比较显著,Vc 质量浓度在 10~100 $\mu\text{g/mL}$,提高比较显著,当质量浓度达到 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,对亚硝酸盐的清除率分别比为 90.44%、97.61%。

2.4.2 忍冬藤多糖阻断亚硝胺合成的研究

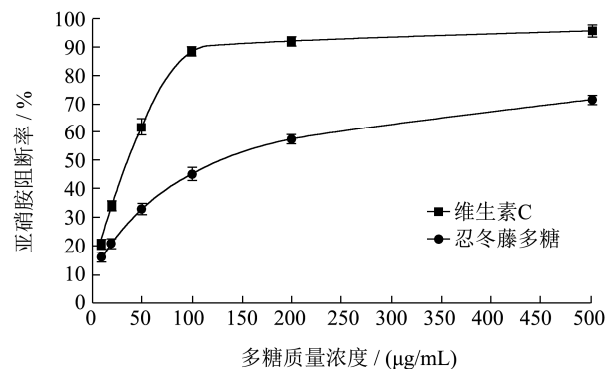


图 13 忍冬藤多糖对阻断亚硝胺合成的影响

Fig.13 Block effect of *Caulis Lonicerae* polysaccharide on nitrosamine synthesis

由图 13 可知,在模拟胃液的条件下,随着忍冬藤多糖和 Vc 质量浓度的增加,二者对亚硝胺合成的阻断率不断提高。忍冬藤多糖质量浓度在 10~200 $\mu\text{g/mL}$,提高比较显著;Vc 质量浓度在 10~100 $\mu\text{g/mL}$,提高比较显著,当质量浓度在 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,对亚硝胺合成的阻断率分别为 71.24%、95.43%。

3 结论

本研究采用超声波辅助提取忍冬藤中的多糖,在单因素试验筛选基础上,利用响应面法进行提取工艺优化,得到的最佳提取工艺条件为:液料比为30:1,提取时间为40 min,超声功率为210 W,提取温度70℃,在此条件下,忍冬藤多糖得率为8.53%,验证试验结果多糖得率为8.46%;在质量浓度为500 μg/mL时,对亚硝酸盐的清除率为90.4%,对亚硝胺合成的阻断率为71.2%,其质量浓度对亚硝酸盐的清除率和亚硝胺合成的阻断率呈较大的相关性。

参考文献

- [1] Li Z M, Qing X N, Chang F F. N-nitrosamine compounds and food safety [J]. Prod Proc, 2006, 12: 8-11
- [2] Swann P F. The toxicology of nitrate, nitrite and n-nitroso compounds [J]. J Sci. Food Agri., 1975, 26(11): 1761-1770
- [3] Lundberg J O, Gladwin M T, Ahluwalia A, et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics [J]. Nat Chem. Biol., 2009, 5(12): 865-869
- [4] Liu C, Russell R M. Nutrition and gastric cancer risk: an update [J]. Nutr Rev, 2008, 66(5): 237-249
- [5] 黄晓冬,李裕红,戴聪杰,等.红树植物桐花树提取物清除亚硝酸盐与阻断亚硝胺合成的体外评价[J].中国食品学报,2015,15(9):15-20
HUANG Xiao-dong, LI Yu-hong, DAI Cong-jie, et al. Evaluation *in vitro* of scavenging effect on nitrite and interdicting effect on nitrosamine synthesis of extract from *Aegiceras corniculatum* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(9): 15-20
- [6] Vladimiro C, Maria T R, Fabio C, et al. Oxidative stability of pork meat lipids as related to high-oleic sunflower oil and vitamin E diet supplementation and storage conditions [J]. Meat Science, 2011, 88(2): 271-279
- [7] 郭小鹏,田呈瑞,高春燕,等.黄参粗多糖脱蛋白工艺以及对亚硝酸盐清除作用的研究[J].食品工业科技,2011,32(2): 274-276
GUO Xiao-peng, TIAN Cheng-rui, GAO Chun-yan, et al. Study on removal process of proteins from crude *Sphallerocarpus gracilis* polysaccharides and its scavenging capability to nitrite [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(2): 274-276
- [8] 冯丽丹,艾对元,张银彩,等.蕨菜粗多糖对亚硝酸盐清除作用的研究[J].中国果菜,2014,34(4):59-61
FENG Li-dan, AI Dui-yuan, ZHANG Yin-cai, et al. Study on nitrite scavenging of bracken polysaccharide [J]. China Fruit and Vegetable, 2014, 34(4): 59-61
- [9] 邢增威.红菇多糖的提取及体外抗氧化抗癌性质研究[D].广州:华南理工大学,2013
XING Zeng-wei. Research of antioxidant activities, antitumor, and extraction method of *Russula* polysaccharide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [10] 吕伟彤,谭强,黄相如.兰州百合多糖模拟胃液条件下清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成[J].西北民族大学学报(自然科学版),2017,38(2):46-49
LYU Yi-tong, TAN Qiang, HUANG Xiang-ru. Nitrite scavenging activity and nitrosamine interdicting of the polysaccharides in *Lilium davidii* var. *unicolor* salisb in simulated gastric fluid [J]. Journal of Northwest Minzu University (natural science edition), 2017, 38(2): 46-49
- [11] 张聪,殷志琦,叶文才,等.忍冬藤的化学成分研究[J].中国中药杂志,2009,34(23):3051-3053
ZHANG Cong, YIN Zhi-qi, YE Wen-cai, et al. Chemical constituents from stems of *Lonicera japonica* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(23): 3051-3053
- [12] 贾献慧,王晓,张永清.忍冬藤酚酸类化学成分分离[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(5):69-71
JIA Xian-hui, WANG Xiao, ZHANG Yong-qing. Phenolic acids of *Lonicerae Japonicae Caulis* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(5): 69-71
- [13] Vukovic N, Kacaniovic M, Hleba L, et al. Chemical composition of the essential oils from the flower, leaf and stem of *Lonicera japonica* [J]. Nat Prod Commun, 2012, 7(5): 641-644
- [14] 王书妍,翁慧,张力,等.忍冬藤挥发油化学成分 GC/MS 分析[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2011,26(1):18-20
WANG Shu-yan, WENG Hui, ZHANG Li, et al. GC-MS analysis of volatile oil components from *Caulis Lonicerae Japonicae* [J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities, 2011, 26(1): 18-20
- [15] Son K H, Park J O, Chung K C, et al. Flavonoids from the aerial parts of *Lonicera japonica* [J]. Archives of Pharmacology, 1992, 15(4): 365-370
- [16] Son K H, Jung K Y, Chang H W, et al. Riterpenoid saponins from the aerial parts of *Lonicera japonica* [J]. Phytochemistry, 1994, 35(4): 1005-1008
- [17] Kwak W J, Han C K, Chang H W, et al. Loniceroside C, an anti-inflammatory saponin from *Lonicera japonica* [J]. Chem Pharm-Bull (Tokyo), 2003, 51(3): 333-335

- [18] 马荣,殷志琦,张聪,等.忍冬藤正丁醇萃取部位的化学成分[J].中国药科大学学报,2010,41(4):333-336
MA Rong, YIN Zhi-qi, ZHANG Cong, et al. Chemical constituents from nbutanol extract of the stems of *Lonicera japonica* [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2010, 41(4): 333-336
- [19] 刘蕾,刘富岗,杨云,等.忍冬藤多糖抗氧化活性研究[J].中华中医药杂志,2014,29(6):1826-1829
LIU Lei, LIU Fu-gang, YANG Yun, et al. Study on antioxidant activity of the polysaccharide ingredient extracted from *Lonicera japonica* Thunb [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2014, 29(6): 1826-1829
- [20] 鲁思爱.忍冬藤的化学成分及其药理应用研究进展[J].临沂大学学报,2012,34(3):132-134
LU Si-ai. The chemical composition of the *Caulis Lonicerae* and pharmacological application research progress [J]. Journal of Linyi University, 2012, 34(3): 132-134
- [21] 董英,张艳芳,孙艳辉,等.水飞蓟粗多糖脱蛋白方法的比较[J].食品科学,2007, 28(12): 82-84
DONG Ying, ZHANG Yan-fang, SUN Yan-hui, et al. Comparison of deproteinization methods for milk thistle crude polysaccharide [J]. Food Science, 2007, 28(12): 82-84
- [22] 刘阳,张岩,谢文兵,等.东北菱粗多糖的提取和纯化方法的评价[J].吉林大学学报(医学版),2015,41(2):420-424
LIU Yang, ZHANG Yan, XIE Wen-bing, et al. Evaluation on extraction and purification of raw polysaccharide in northeast water chestnut [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2015, 41(2): 420-424
- [23] Virot M, Tomao V, Bourvellec C L, et al. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2010, 17: 1066-1074
- [24] 张迅捷,王捷,谢宝贵,等.响应面法优化樟芝多糖提取工艺的研究[J].中国食品学报,2008,8(1):49-54
ZHANG Xun-jie, WANG Jie, XIE Bao-gui, et al. Optimization of the extraction technology of *Antrodia Camphorata* polysaccharide using response surface Method [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(1): 49-54
- [25] Ying Z, Han X X, Li J R. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves [J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1273-1279
- [26] Li J W, Ding S D, Ding X L. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Jin si xiao zao [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80: 176-183
- [27] 郑少泉,姜帆,高慧颖,等.超声波法提取龙眼多糖工艺研究[J].中国食品学报,2008,8(3):76-79
ZHENG Shao-quan, JIANG Fan, GAO Hui-ying, et al. Studies on ultrasonic extraction technology of polysaccharides in *Longan (Dimocarpus longan* Lour.) [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(3): 76-79
- [28] Tian S Y, Hao C C, Xu G K, et al. Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 25(4): 766-775
- [29] 王萍,李德海,孙莉洁,等.超声波辅助法提取滑菇多糖的工艺研究[J].中国食品学报,2008,8(2):84-88
WANG Ping, LI De-hai, SUN Li-jie, et al. Studies on ultrasound supplementary extraction technology of *Nameko Philiota* polysaccharide [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(2): 84-88
- [30] 张伟唯,代春华,熊锋,等.菜籽蛋白加工废液中多酚和多糖同步提取工艺优化[J].农业工程学报,2017,33(7):302-309
ZHANG Wei-wei, DAI Chun-hua, XIONG Feng, et al. Extraction processing optimization of polyphenols and polysaccharides from rapeseed protein processing waste liquor [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 3(7): 302-309
- [31] Lin L H, Xie J H, Liu S C, et al. Polysaccharide from *Mesona chinensis*: extraction optimization, physicochemical characterizations and antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 665-673
- [32] 魏然,陈义伦,邹辉,等.超声波提取条件对圆铃大枣多糖提取率的影响[J].食品与发酵工业,2013,39(11):253-257
WEI Ran, CHEN Yi-lun, ZOU Hui, et al. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Yuanlingdazao [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(11): 253-257
- [33] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在实验设计与优化中的应用[J].实验室研究与探索,2015,34(8):41-45
LI Li, ZHANG Sai, HE Qiang, et al. Application of response surface methodology in experiment design and optimization [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2015, 34(8): 41-45