

响应面法优化车前草多糖超声工艺及抗氧化研究

邱曼榆, 丘振文, 谭汉添 (广州中医药大学第一附属医院, 广东广州 510405)

摘要 [目的]通过响应面法优化车前草多糖的超声提取工艺,并评价其抗氧化能力。[方法]以车前草多糖(PLP)含量为评价指标,结合单因素试验和 Box-Behnken 响应面法对车前草多糖提取工艺进行优化,获取最优技术参数;此外,对车前草多糖进行 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除能力的考察以对其抗氧化活性进行评价。[结果]车前草多糖最佳超声提取工艺条件为提取温度 $61\text{ }^\circ\text{C}$ 、超声时间 68 min 、料液比 $1:34$,在此条件下,PLP 含量可达 $12.25\%\pm 0.18\%$ ($n=3$),与理论值仅相差 0.12% ;此外,当车前草多糖浓度为 1 mg/mL 时,其对 $\text{O}_2\cdot^-$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别为 $75.46\%\pm 0.54\%$ 和 $70.17\%\pm 0.94\%$ 。[结论]基于响应面法优化的车前草多糖超声提取工艺准确可行,可用于车前草多糖的提取;车前草多糖具有一定的抗氧化能力。

关键词 车前草;多糖;响应面法;超声提取工艺;抗氧化活性

中图分类号 R284

文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)23-0214-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.055



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Ultrasonic Technology of Polysaccharide of *Plantago asiatica* by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity Study

QIU Man-yu, QIU Zhen-wen, TAN Han-tian (The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405)

Abstract [Objective] To optimize the ultrasonic extraction process of polysaccharide of *Plantago asiatica* by response surface methodology and evaluate its antioxidant capacity. [Method] Taking the content of polysaccharide of *Plantago asiatica* as the evaluation index, combining single factor test and Box-Behnken response surface method to optimize the extraction process of *Plantago asiatica* polysaccharide to obtain the best technical parameters. In addition, the scavenging ability of *Plantago asiatica* polysaccharides on $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ free radicals was investigated to evaluate their antioxidant activity. [Result] The optimal ultrasonic extraction process conditions for polysaccharide of *Plantago asiatica* were: extraction temperature $61\text{ }^\circ\text{C}$, ultrasonic time 68 min , and solid-liquid ratio $1:34$. Under this condition, the PLP content could reach $12.25\% \pm 0.18\%$ ($n=3$), which was only 0.12% different from the theoretical value. In addition, when the polysaccharide of *Plantago asiatica* was 1 mg/mL , the removal rate of $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ free radicals were about $75.46\%\pm 0.54\%$ and $70.17\%\pm 0.94\%$, respectively. [Conclusion] The ultrasonic extraction process of *Plantago asiatica* polysaccharide optimized based on response surface method is accurate and feasible, and can be used for the extraction of *Plantago asiatica* polysaccharide; *Plantago asiatica* polysaccharide has a certain antioxidant capacity.

Key words *Plantago asiatica*; Polysaccharide; Response surface method; Ultrasonic extraction process; Antioxidant activity

车前草是车前科植物车前(*Plantago asiatica* L.)或平车前(*Plantago depressa* Willd.)的干燥全草,具有清热利尿通淋、祛痰、凉血、解毒之功效,用于治疗热淋涩痛、水肿尿少、暑湿泄泻、痰热咳嗽、吐血衄血、痈肿疮毒^[1]。车前草全草主要含有黄酮类、多糖类及三萜类等多种化合物^[2]。现代药理研究表明,车前草多糖(polysaccharide of *Plantago asiatica*, PLP)对高脂饮食和链脲佐菌素诱导的2型糖尿病大鼠具有治疗作用,其抗糖尿病作用可能与调节肠道菌群和增加 SCFA 水平有关^[3]。此外,PLP 还具有抗氧化和提高免疫力等药理作用^[4-6]。然而,目前关于 PLP 提取工艺的研究较少。

响应面法由于具有优化时间短、应用可信度高等优点而越来越多地用于工艺优化研究中^[7-9],而基于响应面法优化 PLP 的超声提取工艺鲜见报道。为了更好地利用车前草的多糖资源,该研究在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 试验设计方案,研究各个因素之间对 PLP 提取率的影响,并作出响应面图,对超声法提取 PLP 工艺进行条件优化。

1 材料与方法

1.1 试验材料 UV-1900 型双光束紫外可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司);TG16 台式高速离心机(上海卢湘

仪离心机仪器有限公司);梅特勒 LE204E 万分之一电子天平(梅特勒-托利多国际有限公司);车前草全草(广东康美药业有限公司,批号 20190309);D-无水葡萄糖对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 B20966)。

1.2 试验方法

1.2.1 PLP 含量的测定。

1.2.1.1 D-无水葡萄糖标准品的配制。精确称取 10.05 mg 葡萄糖对照品于 100 mL 容量瓶中,加入蒸馏水配制成 0.1005 mg/mL 的对照品母液。

1.2.1.2 PLP 溶液的制备。将车前草干燥后粉碎成粗粉,精密称取 5.0 g 粉末置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入蒸馏水适量,在规定的温度下超声设定的时间,分次于 5000 r/min 离心 20 min ,获取上清液,上清液缓慢加入无水乙醇,搅拌,至混合液乙醇浓度为 80% , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,分次于 5000 r/min 离心 20 min ,弃上清液。多糖沉淀加入 100 mL 蒸馏水复溶,即得 PLP 溶液。

1.2.1.3 标准曲线绘制。分别移取“1.2.1.1”对照品母液 0.05 、 0.10 、 0.20 、 0.40 、 0.80 、 1.00 mL 于比色管中,加水至 2.0 mL ;精密加入苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL ,在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴条件下静置 20 min 后,取出后立即置于冰水浴中进行冷却处理,然后于 490 nm 处测定吸光度。空白对照为蒸馏水。绘制以葡萄糖浓度为横坐标、吸光度为纵坐标的标准

作者简介 邱曼榆(1990—),女,广东普宁人,中药师,从事用药指导与监护工作。

收稿日期 2020-04-29

曲线。

1.2.1.4 方法学考察。方法学考察参考文献[10]进行操作,分别计算得精密度、重复性、12 h 内稳定性的 RSD。

1.2.1.5 PLP 含量的测定。精密移取“1.2.1.2”中 PLP 溶液 2 mL 于 5 mL 容量瓶中,用蒸馏水补至刻度线并摇匀。精密吸取该稀释液 2.0 mL,按照“1.2.1.3”自“加入苯酚溶液 1.0 mL”开始同法操作,根据标准曲线法测定 PLP 含量。

1.2.2 PLP 的提取工艺单因素考察。

1.2.2.1 提取温度对 PLP 含量的影响。在料液比、提取时间、提取功率分别为 1:20(g:mL)、30 min、300 W 的条件下,考察温度为 30、40、50、60、70、80 ℃ 时对 PLP 含量的影响。

1.2.2.2 提取时间对 PLP 含量的影响。在料液比、提取温度、提取功率分别为 1:20、60 ℃、300 W 的条件下,考察提取时间分别为 30、40、50、60、70、80 min 时对 PLP 含量的影响。

1.2.2.3 料液比对 PLP 含量的影响。在提取温度、提取时间、提取功率分别为 60 ℃、60 min、300 W 的条件下,考察料液比分别为 1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45 时对 PLP 含量的影响。

1.2.3 响应面试验。在单因素试验的基础上,参考 Box-Behnken 的试验设计原则,选取超声提取温度(X_1)、提取时间(X_2)和料液比(X_3)3 个影响因素,以 PLP 含量为考察指标,进行 3 因素 3 水平的响应面设计并根据试验结果作出响应面图,试验因素水平详见表 1。并采用 Design Expert 7.0 数据处理软件对得到的数据进行分析。

1.2.4 PLP 抗氧化功能研究。取 1.0 mL 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的 PLP 样品溶液按照参考文献[11]方法进行 PLP 清除 $O_2\cdot^-$ 和 $\cdot OH$ 自由基能力的测定。

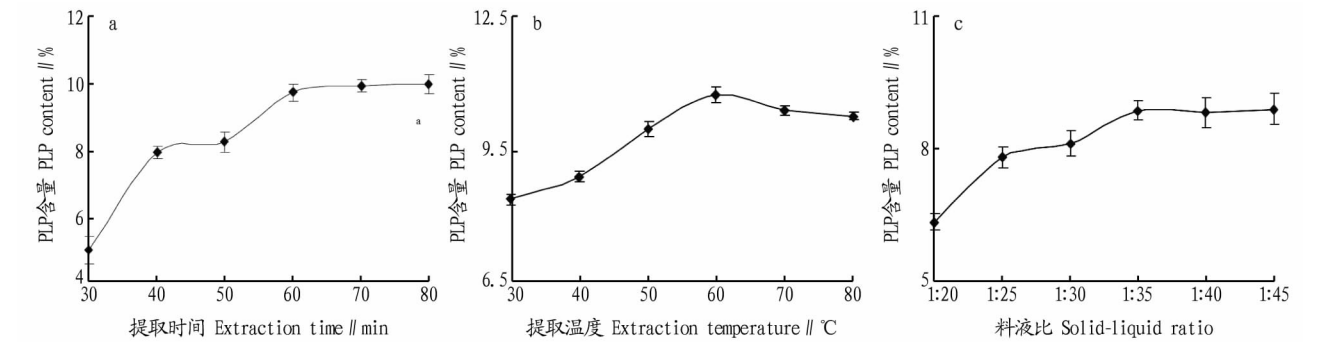


图 1 提取时间(a)、提取温度(b)和料液比(c)对 PLP 含量的影响

Fig. 1 Effects of extraction time(a), extraction temperature(b) and material-to-liquid ratio(c) on PLP content

2.4 响应面试验 按“1.2.3”方法操作,试验结果见表 2。分析获得 PLP 含量(Y)回归方程为 $Y = -188.1 + 1.579235X_1 + 2.9450286X_2 + 1.3724X_3 - 0.010002X_1X_2 - 0.00500X_1X_3 + 0.00301X_2X_3 - 0.00701X_1^2 - 0.01799X_2^2 - 0.01189X_3^2$ 。经方差分析可知,该回归模型 P 值小于 0.01,表明模型具有显著性,试验方法准确可靠;另外,方程失拟项远大于 0.05,回归系数远大于 0.9,充分表明模型具有较好的拟合度,与实测值相关度好。

为了确定影响 PLP 含量的最大因素,该研究基于回归方程再次使用 Design-Expert 7.0 软件绘制响应面图(图 2)。

表 1 响应面分析因素与水平设计

Table 1 The factors and level design of response surface analysis

水平 Level	因素 Factor		
	提取温度 Extraction temperature (X_1)/℃	提取时间 Extraction time (X_2)/min	料液比 Solid-liquid ratio (X_3)
-1	50	50	1:25
0	60	60	1:35
1	70	70	1:45

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制 按“1.2.1.3”方法操作,得到的标准曲线方程为 $Y = 0.0630X + 0.0290$ ($r = 0.9997$),表明葡萄糖浓度在 0.6343~12.6800 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度具有良好的线性关系。

2.2 方法学考察 按“1.2.1.4”方法操作,计算得精密度 RSD 为 2.45%,重复性 RSD 为 2.67%,12 h 内稳定性 RSD 为 3.12%,表明该多糖含量测定方法准确、可靠,可作为后续测定不同工艺提取 PLP 含量的方法。

2.3 PLP 的提取工艺单因素考察

2.3.1 提取温度对 PLP 含量的影响。由图 1a 可知,PLP 含量在 60 ℃ 时达到最大。因此,提取温度宜选在 60 ℃ 左右。

2.3.2 提取时间对 PLP 含量的影响。由图 1b 可知,PLP 含量的峰值出现在提取时间为 60 min,因此,最终确定提取时间在 60 min 左右。

2.3.3 料液比对 PLP 含量的影响。由图 1c 可知,PLP 在料液比为 1:35 时提取含量最高,因此,料液比宜选取在 1:35 左右。

由图 2 可知,各因素之间的响应面均较陡峭,说明各因素之间的交互作用均较强。根据所得到的模型,预测最优工艺条件为提取温度 61.4 ℃、提取时间 68.3 min、料液比为 1:34.3,在此条件下 PLP 含量理论上可达 12.48%。根据实际情况,最终确定最佳工艺为提取温度 61 ℃、提取时间 68 min、料液比为 1:34,在此条件下,PLP 含量可达 12.25%±0.18% ($n=3$),与理论值仅相差 0.12%,结果表明根据响应面法优化的 PLP 提取工艺准确可行。

2.5 PLP 抗氧化功能研究 从图 3 可以看出,当浓度为 1 mg/mL 时,PLP 对于 $O_2\cdot^-$ 和 $\cdot OH$ 的清除率分别为 (75.46±

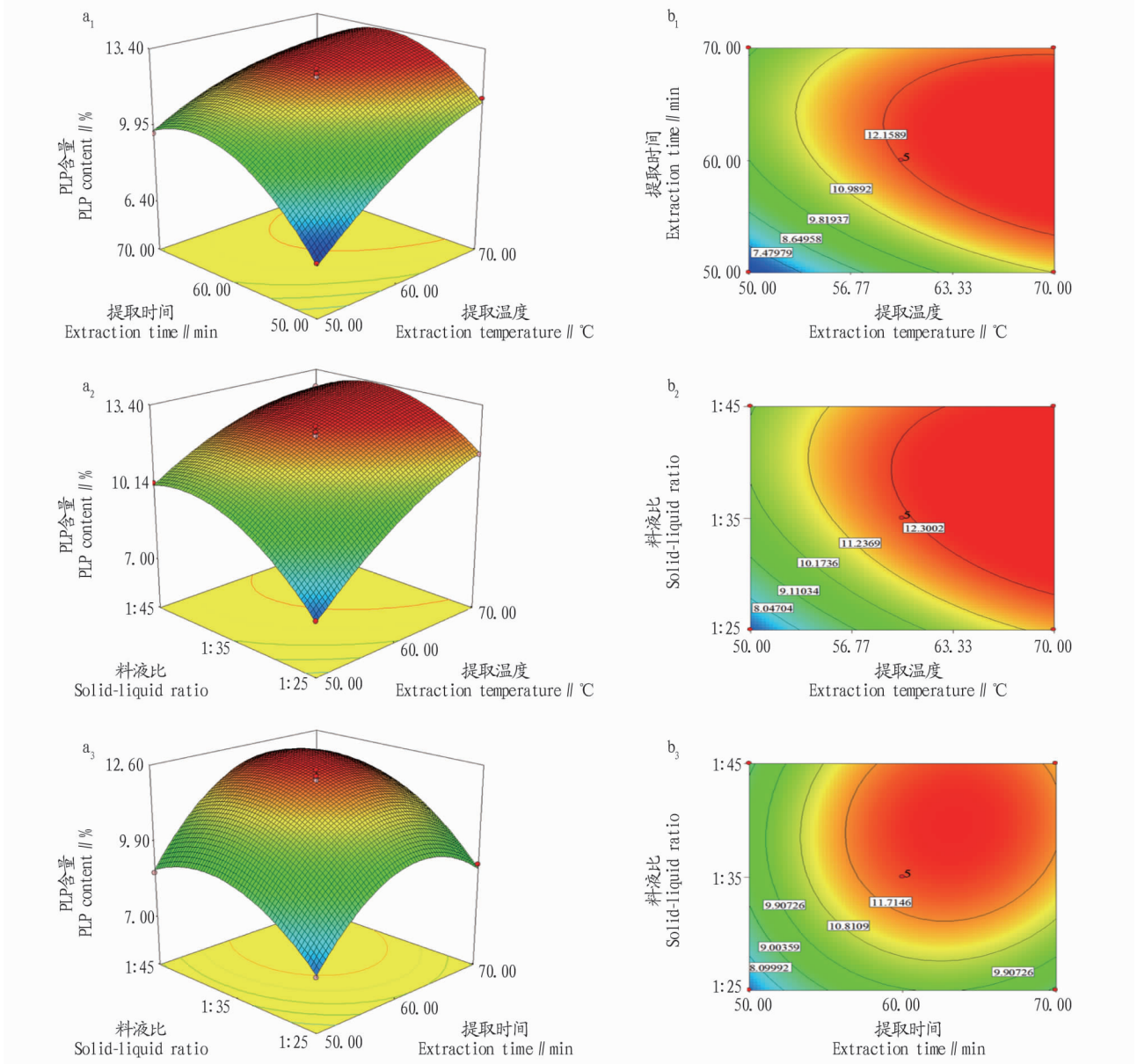


图 2 不同因素对 PLP 含量影响的响应面(a)和等高线(b)

Fig. 2 Response surface(a)and contour(b)of the effect of different factors on PLP content

表 2 PLP 超声提取的响应面试验结果 (n=3)				
Table 2 Response surface test results of PLP ultrasonic extraction				
试验号 Test No.	X ₁	X ₂	X ₃	PLP 含量 PLP content//%
1	-1	-1	0	5.35
2	1	-1	0	11.05
3	-1	1	0	9.49
4	1	1	0	11.93
5	-1	0	1	7.08
6	1	0	1	11.27
7	-1	0	1	10.37
8	0	0	1	12.16
9	0	-1	-1	7.15
10	0	1	-1	9.42
11	0	-1	1	8.79
12	0	1	1	11.33
13	0	0	0	12.48
14	0	0	0	12.01
15	0	0	0	12.71
16	0	0	0	11.87
17	0	0	0	12.58

0.54)%和(70.17±0.94)%,分别低于维生素 C(V_C)的清除率(95.73±0.40)%和(90.34±0.21)%。

3 讨论

该单因素试验考察时,发现随着提取温度和料液比的增加,PLP 含量均出现先增加后下降的趋势,表示在多糖提取过程中,温度过高(超过 70℃)可能导致多糖的降解,这可能对于其他植物多糖的提取具有一定的指导意义。

多糖的研究和开发是目前的研究热点之一。目前文献对于车前草多糖的提取包括热水浸提法和微波提取法。热水浸提法提取效率较低,仅为 7.4%^[12],而微波提取法为 9.41%^[13],低于该试验条件下的 12.25%,说明该研究基于响应面法的车前草多糖的超声提取工艺优化较为成功。然而,该试验条件下所提取的多糖为粗多糖,后续可通过对粗多糖进行脱色、除蛋白等各种纯化工艺获取精多糖,并对其结构鉴定,为后续开发利用车前草多糖资源奠定基础。

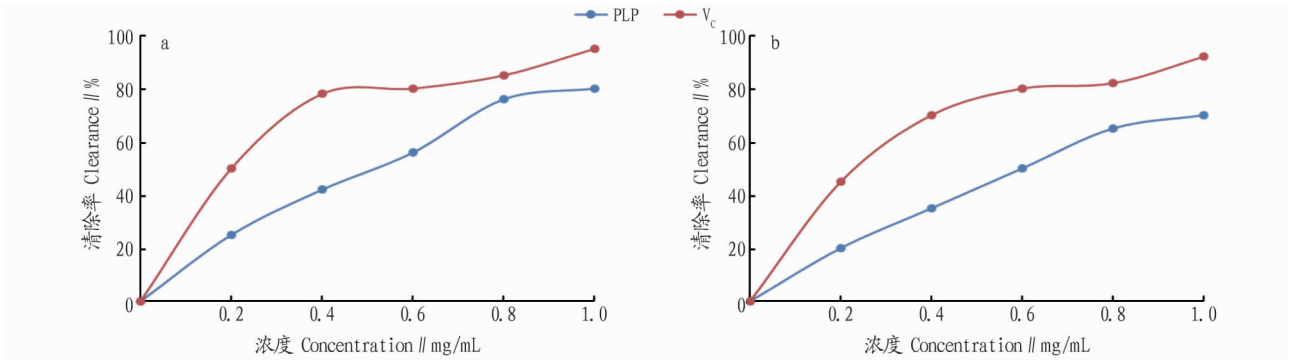


图3 不同浓度 PLP 与 VC 对 O₂·⁻(a) 和 ·OH(b) 的清除能力比较

Fig.3 Comparison of the scavenging ability of different concentrations of PLP and VC on O₂·⁻(a) and ·OH(b)

4 结论

该研究基于响应面法优化车前草多糖的最佳超声提取工艺条件为提取温度 68 ℃、提取时间 61 min、料液比为 1 : 34,在此条件下,PLP 含量可达 12.25%。该提取方法工艺稳定、操作简单、方法可行、结果可靠。另外,当车前草多糖浓度为 1 mg/mL 时,其对 O₂·⁻和·OH 自由基的清除率分别为 75.46%±0.54%和 70.17%±0.94%,具有一定的抗氧化能力。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:69.
[2] 王琪,陶河清. 车前草药理作用的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(A2):72,75.
[3] NIE Q X, HU J L, GAO H, et al. Polysaccharide from *Plantago asiatica* L. attenuates hyperglycemia, hyperlipidemia and affects colon microbiota in type 2 diabetic rats [J]. Food hydrocolloids, 2019, 86: 34–42.
[4] 董升,梁晗业,王禹捷,等. 车前草粗多糖对环磷酰胺所致免疫低下小

鼠的免疫增强作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 289–293.
[5] 陈家磊. 车前草多糖对小鼠巨噬细胞免疫功能的调节作用及机制的研究[D]. 重庆:西南大学, 2017.
[6] 肖怀秋,李玉珍. 车前草粗多糖提取及生物学活性研究[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(3): 37–40.
[7] 张意笠,程汝滨,黄真,等. 响应面法优化结香花总黄酮提取工艺及其抗氧化活性[J/OL]. 食品工业科技, 2020–04–08[2020–04–10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200408.1638.043.html>.
[8] 高雅,陈新梅,赵元,等. Box–Behnken 响应面法优化昆仑雪菊总黄酮提取工艺及抗氧化研究[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(5): 54–61.
[9] 李文莉,吴芳芳,陈路,等. 响应面法优化溪黄草的挥发油提取工艺[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(4): 50–53.
[10] 李世杰,张丹雁,严娅娟,等. 响应面法优化阳春砂多糖的超声辅助提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 47–51.
[11] 杨孝辉,郭君. 响应面法优化超高压提取枸杞多糖工艺[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 187–192.
[12] 李官浩,杨咏洁,南昌希. 车前草多糖的提取及纯化工艺研究[J]. 食品科技, 2008, 33(10): 156–159.
[13] 郭婕,胡春红,袁淑培,等. 车前草多糖微波提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(16): 223–225, 230.

(上接第 187 页)

未来需要进一步扩大药剂筛选范围,如陈华等^[14]报道的乙基多杀菌素,陆道训等^[16]报道的甲维盐+虫螨脲+虱螨脲三元复配剂,吴正伟等^[17]报道的虫螨脲+甲维盐二元混剂,胡飞等^[18]报道的甲维盐和氯虫苯甲酰胺 3 : 7 混配剂,王磊等^[20]报道的甲维盐·虫螨脲二元混剂。另外,也可以尝试引入新型的增效剂进一步提高防治效果,如王芹芹等^[19]报道的对茆虫威有强烈增效作用的增效醚和顺丁烯二酸二乙酯,以便进一步提高这些药剂对草地贪夜蛾的杀虫效果。

参考文献

[1] TODDE L, POOLE R W. Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus *Spodoptera* Guenee from the Western Hemisphere[J]. Annals of the entomological society of America, 1980, 73(6): 722–738.
[2] PASHLEY D P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (*Lepidoptera*: Noctuidae): A sibling species complex? [J]. Annals of the entomological society of America, 1986, 79(6): 898–904.
[3] WESTBROOK J K, NAGOSHI R N, MEAGHER R L, et al. Modeling seasonal migration of fall armyworm moths[J]. International journal of biometeorology, 2016, 60(2): 255–267.
[4] 姜玉英,刘杰,朱晓明. 草地贪夜蛾侵入我国的发生动态和未来趋势分析[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(2): 33–35.
[5] 王国荣,李斌,黄福旦,等. 4 种杀虫剂对玉米上草地贪夜蛾的室内外活性[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(12): 70–72.
[6] 金涛,林玉英,马光昌,等. 草地贪夜蛾的产卵节律及其对不同介质的产卵选择性[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 99–103.
[7] 秦誉嘉,杨冬才,康德琳,等. 草地贪夜蛾对我国玉米产业的潜在经济

损失评估[J]. 植物保护, 2020, 46(1): 69–73.
[8] 高希武. 我国害虫化学防治现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 19–22.
[9] 强胜,陈国奇,李保平,等. 中国农业生态系统外来种入侵及其管理现状[J]. 生物多样性, 2010, 18(6): 647–659.
[10] 林玉英,金涛,马光昌,等. 15 种杀虫剂对草地贪夜蛾卵的毒力测定[J]. 植物保护, 2020, 46(1): 82–86.
[11] 宋洁蕾,李艳丽,李亚红,等. 不同杀虫剂对草地贪夜蛾的室内毒杀效果及毒力测定[J]. 南方农业学报, 2019, 50(7): 1489–1495.
[12] 尹艳琼,张红梅,李永川,等. 8 种杀虫剂对云南不同区域草地贪夜蛾种群的室内毒力测定[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 70–74.
[13] 李文静,常向前,罗汉钢,等. 草地贪夜蛾在湖北省暴发的风险及防控对策[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(22): 101–103, 113.
[14] 陈华,王凤良,卢鹏,等. 几种常见杀虫剂对玉米草地贪夜蛾的控制作用[J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(6): 1163–1168.
[15] 韩海亮,包斐,赵福成,等. 草地贪夜蛾药剂防控效果初报[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(9): 1511–1513.
[16] 陆道训,张玉美,席春虎,等. 不同药剂对草地贪夜蛾的防治效果[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(17): 132–134.
[17] 吴正伟,李运,徐进,等. 虫螨脲和甲维盐对甜玉米草地贪夜蛾的生物活性及田间防效[J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(5): 968–973.
[18] 胡飞,苏贤岩,胡本进,等. 甲维盐·氯虫苯甲酰胺组合物对草地贪夜蛾室内毒力测定及田间防治效果[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 303–307.
[19] 王芹芹,崔丽,王立,等. 茆虫威对草地贪夜蛾的毒力及解毒酶的诱导作用[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 78–81.
[20] 王磊,祝海燕,谢旭东,等. 植保无人机减量施药雾滴沉积分布及草地贪夜蛾防效评价[J]. 基层农技推广, 2019, 7(11): 29–33.
[21] 凌炎,黄芊,蒋婷,等. 两个广西草地贪夜蛾种群对常用杀虫剂的敏感性测定[J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(5): 954–960.