

响应面法优化油菜蜂花粉核苷类成分提取工艺

孙丽萍¹, 黄兰^{1,2}, 徐响¹, 庞杰², 何伟^{1,2}, 穆雪峰^{1,2}, 沈新锋^{1,2}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002)

摘要:目的: 考察油菜蜂花粉核苷类成分的提取条件, 确定最佳提取工艺。方法: 先通过单因素试验获得油菜蜂花粉核苷类成分提取时间、提取温度及料液比的优化范围, 再利用 Box-Behnken 试验设计原理和 3 因素 3 水平的响应面分析法优化蜂花粉核苷类成分的提取工艺。结果: 3 因素的优化范围分别为 40~60min、45~65、1:60~1:80(g/mL)。结论: 最终优化条件为提取时间 53min、温度 60、料液比 1:70(g/mL), 该条件下, 油菜蜂花粉中核苷类成分总提取量为(705.2 ± 0.006)mg/100g。

关键词: 响应面法; 核苷类成分; 油菜蜂花粉; Box-Behnken; 超声波提取; 优化

Optimization of Nucleosides Extraction from Rape Bee Pollen Using Response Surface Methodology

SUN Li-ping¹, HUANG Lan^{1,2}, XU Xiang¹, PANG Jie², HE Wei^{1,2}, MU Xue-feng^{1,2}, SHEN Xin-feng^{1,2}

(1. Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Nucleosides extraction from rape bee pollen was optimized using response surface methodology. The appropriate ranges of extraction time, extraction temperature and material-to-liquid ratio were obtained by one-factor-at-a-time experiments for subsequent optimization using response surface analysis based on a three-variable, three-level central composite design. The optimal ranges of extraction time, extraction temperature and material-to-liquid ratio were 40 - 60 min, 45 - 65 and 1:60 - 1:80 (g/mL), respectively. The optimized extraction conditions were 53 min, 60, and 1:70 (g/mL). Under these conditions, the extraction rate of nucleosides from rape bee pollen was (705.2 ± 0.006) mg/100 g.

Key words: response surface methodology; nucleosides; rape bee pollen; Box-Behnken design; ultrasonic extraction; optimization

中图分类号: S896.4; TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)12-0083-06

核苷类化合物包括核苷、核苷碱基及相关衍生物, 前者主要有胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷等, 核苷碱基则主要有腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶等, 此外, 核苷衍生物有虫草素(3'-脱氧腺苷)、2'-脱氧腺苷等^[1]。研究发现, 核苷类化合物具有一定的生物活性, 如镇痛、抗炎、抗肿瘤、抗病毒及抗血栓等作用, 对中枢神经、泌尿、代谢、心血管和肿瘤等疾病的治疗有着重大意义^[2-12]。核苷类化合物普遍存在生物体内, 但关于蜂花粉中核苷类成分的报道则少见。岳兵等^[13]曾对油菜蜂花粉进行研究, 并报道其含有腺苷成分。

常见的核苷类成分提取方法为溶剂提取法, 采用的溶剂主要有纯水、一定比例的甲醇-水及乙醇-水^[14-16]。

溶剂提取法根据提取方式不同又分浸提^[17]、渗漉^[18]及回流提取^[19]。浸提为一种温和提取方式, 不易破坏目标成分, 但通常提取时间较长, 溶剂用量较大, 提取效率较低。渗漉与回流提取虽然提取效率高, 但也具有提取时间长、提取体积较大的缺点。目前, 常采用超声波辅助提取^[20-22], 超声波辅助提取为一种新式提取方法, 不仅提取时间短, 且提取效率高。本研究以胞苷、尿苷、鸟苷及腺嘌呤 4 种核苷类成分为指标测定油菜蜂花粉中核苷类成分总量, 首先对提取溶剂进行选择, 再以提取时间、提取温度及料液比为因子进行单因素试验考察, 经响应面分析法建立模型, 对这 3 个因素进行优化, 旨在获得蜂花粉核苷类成分的最佳提取工艺条件。

收稿日期: 2011-10-21

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD33B04);

国家现代农业(蜂)产业技术体系建设专项(CARS-45KXJ18); 科技部农业科技成果转化资金项目(2009GB23260456)

作者简介: 孙丽萍(1963—), 女, 研究员, 硕士, 研究方向为蜂产品功能因子的分离与纯化。E-mail: caasun@126.com

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

油菜蜂花粉由中国农科院蜜蜂研究所提供, 经研钵研碎, 于 -20℃ 下保藏。

腺嘌呤(adenine, 99%) 美国 Sigma 公司; 胞苷(cytidine, 99%)、尿苷(uridine, 99%)、鸟苷(guanosine, 99%) 美国 Amresco 公司; 甲醇(色谱纯) 美国 Fisher 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

AL204 电子天平 梅特勒-托利多(上海)公司; KH2200DE 台式数控超声波清洗器 昆山禾创超声仪器有限公司; 5417R 小型台式冷冻型离心机 德国艾本德股份公司; 1200 HPLC 色谱仪 美国安捷伦仪器公司。

1.3 标准品溶液的配制及核苷含量的测定

精密称取胞苷、尿苷、鸟苷、腺嘌呤标准品 6.2、5.5、5.2、5.1mg, 分别加纯水溶解定容至 10mL 制成标准品溶液, 其中鸟苷溶液中滴加数滴 10% KOH 溶液以保持稳定^[14]; 取各标准品溶液 1mL, 混合均匀, 制成胞苷、尿苷、鸟苷、腺嘌呤质量浓度分别为 88.57、78.57、74.29、72.86 μg/mL 的混合标准品溶液, 低温避光保存。

以胞苷、尿苷、鸟苷及腺嘌呤 4 种核苷类成分为指标, 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)建立标准品峰面积与质量浓度的回归曲线来计算样品中目标成分的含量, 并以胞苷、尿苷、鸟苷及腺嘌呤 4 种核苷类成分总含量为核苷类总含量。

1.4 方 法

1.4.1 蜂花粉核苷类成分提取工艺单因素试验

分别精密称取油菜蜂花粉样品 0.5000g, 加 30mL 纯水(料液比 1:60), 于 45℃ 条件下超声波提取(超声功率 100W)30min, 样液离心(10000r/min、15min, 10℃)后过 0.45 μm 滤膜, 待测。选取乙醇体积分数, 提取时间、提取温度、料液比为考察因素, 研究某一因素变化对核苷类成分的影响。各因素水平为: 乙醇体积分数: 0%、5%、15%、25%、35%、45%; 提取时间: 10、20、30、40、50、60、70min; 提取温度: 25、35、45、55、65、75℃; 料液比: 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80(g/mL)。

1.4.2 响应面设计^[23-24]

在单因素试验基础上, 以核苷类成分总量为响应值, 以提取时间、提取温度、料液比 3 个因素为自变量, 设计 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验, 优化蜂花粉提取工艺条件。

1.5 数据处理及分析

利用 Minitab 15 软件中的多元线性回归分析程序, 拟合二阶多项式方程, 对回归方程的系数进行显著性比较, 研究提取时间、提取温度、料液比对样液中蜂花粉核苷类成分含量的影响, 再将获得的二阶多项式方程转化为响应曲面, 进一步分析试验因素及水平对响应值的影响。

1.6 HPLC 分析条件

色谱柱: ultimate AQ-C₁₈(250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 水(A)- 甲醇(B); 梯度洗脱: 0~3min, 8%B; 3~15min, 8%~15%B; 15~20min, 15%~20%B; 20~30min, 20%~40%B; 30~35min, 40%~8%B; 35~50min, 8%B; 检测波长: 254nm; 柱温: 30℃; 流速: 1mL/min; 进样量: 5 μL。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取剂的确定

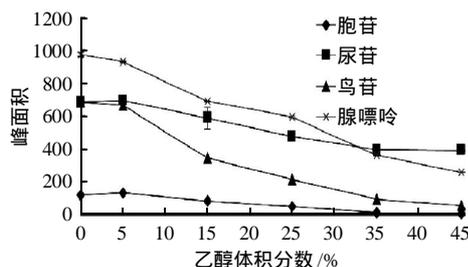


图 1 乙醇体积分数对油菜蜂花粉核苷类成分提取的影响

Fig.1 Effect of alcohol concentration on the extraction rate of rape bee pollen nucleosides

由图 1 可见, 在不同乙醇体积分数条件下, 4 种核苷类成分的提取效果各不相同。胞苷在纯水与 5% 乙醇条件下提取效果相近, 但随着乙醇体积分数的进一步增加而呈递减趋势; 尿苷在纯水及 5% 乙醇条件下的提取效果亦相近, 在 5%~35% 内呈递减趋势, 而在 35%~45% 内提取效果基本不变; 鸟苷在 0%~45% 乙醇条件下呈递减趋势, 且在 5%~45% 段递减趋势强烈; 同样, 腺嘌呤随着乙醇体积分数的递增而提取效果亦明显递减。总之, 随着乙醇体积分数的增加, 溶剂极性逐渐降低, 从而更加有利于一些较低极性的醇溶成分的提取; 核苷类成分为大极性化合物, 在纯水(0% 乙醇)条件下提取效果最好, 同时有助于能源节约及环境的保护, 因此选择纯水作为蜂花粉核苷类成分的提取剂。

2.1.2 提取时间对核苷类成分提取的影响

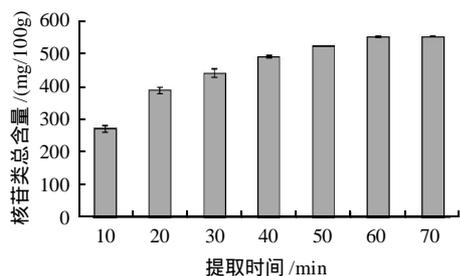
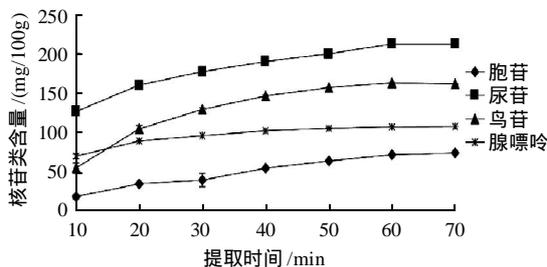


图2 提取时间对油菜蜂花粉核苷类成分提取的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the extraction rate rape bee pollen nucleosides

由图2可见,在10~60min内样液中尿苷、鸟苷、腺嘌呤及胞苷含量均随着时间增加而增加,到70min时基本稳定。其中尿苷与鸟苷含量在10~20min内增长较快,在20~60min内则增长较缓慢;腺嘌呤与胞苷含量在10~20min内增长速率相近,且比在20~60min内的增长速率要大,但均小于尿苷与鸟苷含量在该时间段内的增长速率,其中腺嘌呤含量增长速率甚小。从4种核苷类成分总量来看,其变化趋势亦随着提取时间增加呈递增趋势,到70min时基本稳定;在20~40min时间段,总含量增长较快,40~60min增长较缓,原因可能是随着提取时间的延长,蜂花粉中其他水溶性成分逐渐溶出并影响核苷类成分的溶解速率,因此检测出的核苷类成分总量增加变缓。此处选择40~60min作为提取时间的优化范围。

2.1.3 提取温度对核苷类成分提取的影响

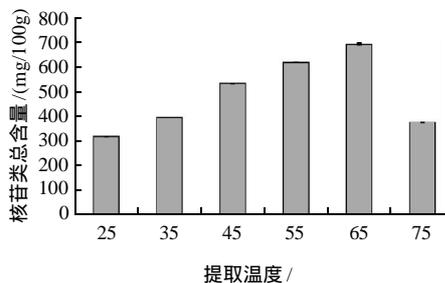
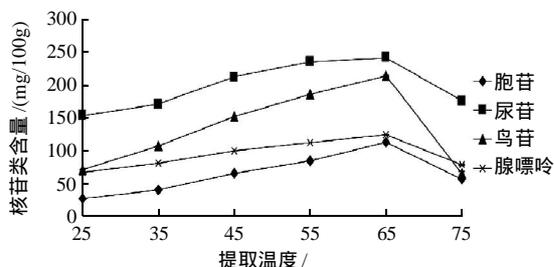


图3 提取温度对油菜蜂花粉核苷类成分提取的影响

Fig.3 Effect of temperature on the extraction rate of rape bee pollen nucleosides

由图3可见,样液中尿苷、鸟苷、腺嘌呤及胞苷含量在25~65内均递增,65后均减少。其中尿苷含量在25~45内增长较快,在45~65段增长较缓;鸟苷含量于25~65内的增长速率较腺嘌呤及胞苷要大,腺嘌呤含量的增长速率最小。从核苷类成分总量来看,其在25~65内也呈递增趋势,特别是从25~45,其增加速率较大,之后增加速率减小,原因可能是在25~45段,提高温度加强了分子间作用力,从而加强了核苷类成分的溶解速率;而45~65段温度对核苷类成分影响相对较小,其溶解率减慢。65后溶解量减少,可能因为高温导致其他水溶成分的溶解,从而影响了核苷类成分的溶解量,或者可能因为温度太高导致核苷类成分的分解。因此,选择45~65作为提取温度的优化范围。

2.1.4 料液比对核苷类成分提取的影响

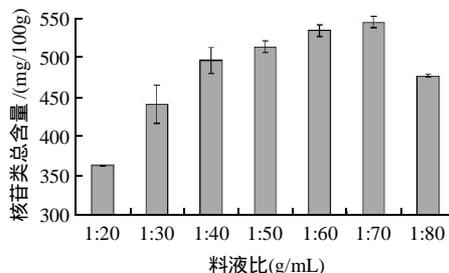
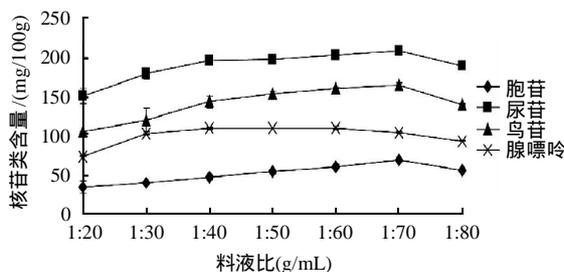


图4 料液比对油菜蜂花粉核苷类成分提取的影响

Fig.4 Effect of material-to-liquid ratio on the extraction rate of rape bee pollen nucleosides

由图4可见,在料液比1:20~1:70随着提取剂体积增加,样液中尿苷、鸟苷及胞苷的含量呈增加趋势,1:70g/mL以后递减;腺嘌呤在料液比1:20~1:40时含量递增,在料液比1:40~1:60内含量基本不变,但从料液比1:60开始少量减少。从核苷类成分总量来看,其在料液比1:20~1:70呈递增趋势,其中料液比1:20~1:40增加较快,1:40~1:70增加较缓,原因可能是开始水量增大,核苷类成分与水的接触面积增大,加快了核苷类成分的扩散传质;之后水体积的增大对核苷类成分扩散传质影响减小,因此核苷类成分溶解量的增加速率降低;在料液比1:70处总量达最大值,之后减少,原因可能为其他水溶成分的溶出,影响了核苷类成分溶解。此处选择1:60~1:80(g/mL)作为料液比的优化范围。

2.2 响应面法优化提取工艺条件

2.2.1 响应面试验设计与结果

在单因素试验的基础上,固定提取溶剂为纯水,利用Box-Behnken试验设计原理,以提取时间、提取温度及料液比3个因素为自变量进行响应面试验,因素水平编码见表1,试验设计及结果见表2。

表1 油菜蜂花粉核苷类成分提取工艺优化响应面试验设计因素及水平编码

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

因素	编码	水平		
		-1	0	1
提取时间/min	x_1	40	50	60
提取温度/	x_2	45	55	65
料液比(g/mL)	x_3	1:60	1:70	1:80

表2 油菜蜂花粉核苷类成分提取工艺优化响应面试验设计与结果
Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	x_1	x_2	x_3	核苷类总量/(mg/100g)
1	-1	-1	0	485.5
2	1	-1	0	577.0
3	-1	1	0	590.1
4	1	1	0	688.0
5	-1	0	-1	495.9
6	1	0	-1	540.9
7	-1	0	1	480.5
8	1	0	1	532.5
9	0	-1	-1	490.2
10	0	1	-1	585.9
11	0	-1	1	500.1
12	0	1	1	559.5
13	0	0	0	709.9
14	0	0	0	693.0
15	0	0	0	703.4
16	0	0	0	701.7
17	0	0	0	702.4

2.2.2 方差分析和二元回归方程拟合

对表2数据进行二次多元回归拟合得到回归方程:
 $y = 702.080 + 35.8000x_1 + 46.3375x_2 - 5.03750x_3 - 69.2025x_1^2 - 47.7275x_2^2 - 120.427x_3^2 + 1.60000x_1x_2 + 1.75000x_1x_3 - 9.07500x_2x_3$,对该回归方程进行方差分析,结果如表3所示。

表3 二阶回归方程方差分析表

Table 3 Variance analysis for the fitted regression equation

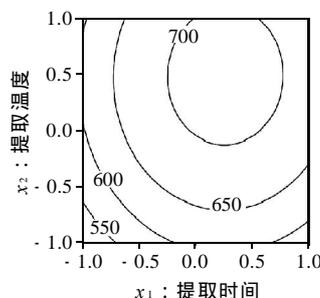
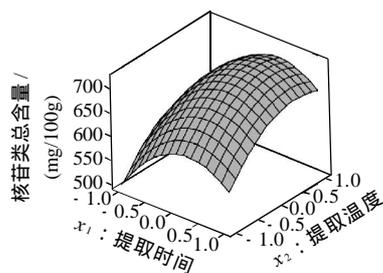
来源	自由度	平方和	均方和	F值	P值
回归	9	127520	14168.9	59.14	0.000**
线性项	3	27633	9211.1	38.45	0.000**
平方项	3	99535	33178.3	138.49	0.000**
乘积项	3	352	117.3	0.49	0.700
残差误差	7	1677	239.6		
纯误差	4	146	36.4		
合计	16	129197			

$R^2=0.9870$

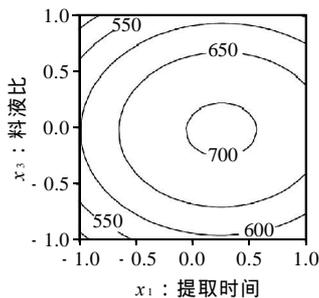
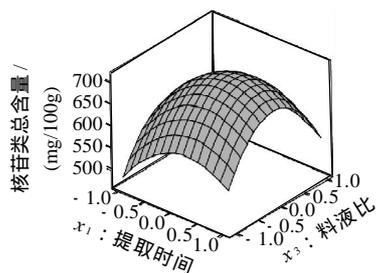
注:*.影响显著, $P < 0.05$;**.影响极显著, $P < 0.01$ 。

从表3可知,此模型 $P=0.000 < 0.01$,响应面回归模型达到极显著水平,表明该二次回归模型能够极显著拟合提取时间、提取温度、料液比对核苷类成分总量的影响;决定系数 $R^2 = 0.9870$,表明98.70%的数据可用该方程解释。线性项 $P = 0.000 < 0.01$,达极显著水平,表明提取温度、提取时间及料液比对核苷类成分总量影响极显著;同时平方项 $P = 0.000 < 0.01$,达极显著水平,表明曲线的弯曲度较高,该模型已在最优区域进行拟合。

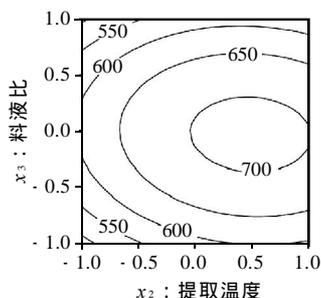
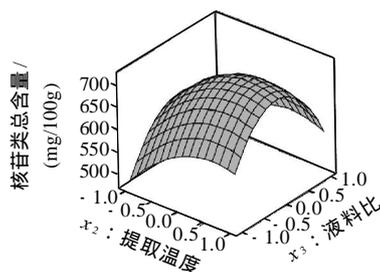
2.2.3 各两因素交互作用对核苷类成分总量的影响



a. 提取温度和提取时间



b. 提取时间和料液比



c. 提取温度和料液比

固定水平：提取时间 50min，提取温度 55℃，料液比 1:70(g/mL)。

图 5 各两因素交互作用对核苷类成分总量的影响的响应面及等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots illustrating the interactive effects of extraction parameters on the extraction rate of rape bee pollen nucleosides

由图 5a 可见，响应曲面的坡度较陡，表明响应值(核苷类成分总量)对提取时间与提取温度的改变较敏感。在设定的时间范围内，随着提取时间的增加，总量增

加；在设定的温度范围内，随着提取温度的增加，核苷类成分总量增加。表明提高温度与时间能增加 4 种核苷类成分的总提取量，当提取温度在 60℃，提取时间 52min 左右时对样液中核苷类成分总量的提高最有利。

由图 5b 可见，响应曲面的坡度较陡，表明响应值对提取时间与料液比的变化较敏感，其中对提取时间的变化敏感较大。从等高线亦可看出提取时间变化比料液比变化对核苷类成分总量的影响要大。在设定的时间范围内，随着提取时间的增加，核苷类成分总量增加；在设定的料液比范围内，随着料液比的增加，总量先增加再减少。表明提高提取时间及适当提高提取料液比能增加 4 种核苷类成分的总提取量，当提取时间 52min、料液比 1:70 (g/mL) 左右时对样液中核苷类成分总量的提高最有利。

由图 5c 可见，响应曲面的坡度较陡，表明响应值对提取温度与料液比变化较敏感。从等高线亦可看出提取温度变化比提取料液比变化对核苷类成分总量的影响要大。在设定的温度范围内，随着提取温度的增加，核苷类成分总量基本增加；在设定的料液比范围内，随着料液比的增加，总量变化先增加再减少。表明提高提取时间及适当增加料液比能增加 4 种核苷类成分总提取量，当提取温度在 60℃、料液比 1:70(g/mL) 左右时对样液中核苷类成分总量的提高最有利。

2.3 最优提取工艺条件及验证实验

对二次多项回归方程求偏导得最优的提取条件为提取时间 52.6min、提取温度 59.9℃、提取料液比 1:70.4 (g/mL)。此时预测蜂花粉中 4 种核苷类成分的最大提取总含量为 718.3mg/100g。为检验响应面法优化蜂花粉核苷类成分提取条件的可靠性，进行验证实验，基于实际操作的可行性，将优化后的条件调整为提取时间 53min、温度 60℃、料液比 1:70(g/mL)。在此最佳条件下，得 4 种核苷类成分提取总含量为(705.2 ± 0.006) mg/100g，与模型预测值的误差为 1.82%，符合要求。

3 结 论

本研究考察乙醇体积分数、提取时间、提取温度及料液比 4 个单因素对油菜蜂花粉水提样中 4 种核苷类成分含量的影响，确定取条件的优化范围分别为 0% (纯水)、40~50min、45~65℃ 及 1:60~1:80(g/mL)，然后选取提取时间、提取温度及液料比为考察因素经响应面法设计并对提取条件进行优化。最优提取条件为提取时间 52.6min、提取温度 59.9℃、料液比 1:70.4(g/mL)，油菜蜂花粉中 4 种核苷类成分总提取量为 718.3mg/100g。条件最终调整为提取时间 53min、提取温度 60℃、提取料液比 1:70(g/mL)，在此最佳条件下，蜂花粉四种核苷类成分总提取量为(705.2 ± 0.006)mg/100g，与预测值的误差为 1.82%。

参考文献：

- [1] YANG Fengqing, WANG Yitao, GAO Jianli, et al. Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and the analogues in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry(HPLC-ESI-MS/MS) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 569(2): 208-218.
- [2] DELANDER G E, WAHL J J. Behavior induced by putative nociceptive neurotransmitters is inhibited by adenosine or adenosine analogs coadministered intrathecally[J]. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1988, 246(2): 565-570.
- [3] HASKÓ G, KUHEL D G, CHEN Jiangfan, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms[J]. *The FASEB Journal*, 2000, 14(13): 2065-2074.
- [4] CHENG J J, LIN C Y, LUR H S, et al. Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus *Fomitopsis pinicola*[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(8): 829-834.
- [5] HASKÓ G, SITKOVSKY M V, CSABA S. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004, 25(3): 152-157.
- [6] BEZOMBES C, LAURENT G, JAFFREZOU J P. Implication of raft microdomains in drug induced apoptosis[J]. *CurtMed Chem Anti CnacAgents*, 2003, 3(4): 263-270.
- [7] KINAHAN J J, KOWAL E P, GRINDEY G B. Biochemical and antitumor effects of the combination of thymidine and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine against Leukemia L1210[J]. *Cancer Res*, 1981, 41(2): 445-451.
- [8] JIANG Y, WONG J H, FU M, et al. Isolation of adenosine, isosinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(2/3): 189-193.
- [9] MACHIDA H, ASHIDA N, MIURA S, et al. Anti-herpesvirus activity profile of 4-thioarabinofuranosyl purine and uracil nucleosides and activity of 1- β -D-2-fluoro-4-thioarabinofuranosyl guanine and 2,6-diaminopurine against clinical isolates of human cytomegalovirus[J]. *Antiviral Research*, 1998, 39(2): 129-137.
- [10] 刘岱琳, 曲戈霞, 王乃利, 等. 瓜蒌的抗血小板聚集活性成分研究[J]. *中草药*, 2004, 35(12): 1334-1335.
- [11] LU M K, CHENG J J, LAI W L, et al. Adenosine as an active component of *Antrodia cinnamomea* that prevents rat PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis through the activation of adenosine A(2A) receptors[J]. *Life Sciences*, 2006, 79(3): 252-258.
- [12] VERHAEGHE R H, VANHOUTTE P M, SHEPHERD J T. Inhibition of sympathetic neurotransmission in canine blood vessels by adenosine and adenine nucleotides[J]. *Circulation Research*, 1977, 40(2): 208-215.
- [13] 岳兵, 薛晓锋, 吴黎明, 等. 高效液相色谱法测定蜂花粉中的腺苷[J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(增刊 1): 62-64.
- [14] RANOGAJEC A, BELUHAN S, ŠMIT Z. Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversedphase HPLC [J]. *Liquid Chromatography*, 2010, 33(8): 1024-1033.
- [15] GU Yuxiang, WANG Zunsheng, LI Suxia, et al. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*[J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1304-1309.
- [16] 陈安徽, 胡枫林, 丁婷, 等. 古尼拟青霉小孢变种核苷类成分分析[J]. *食品科学*, 2007, 28(6): 184-187.
- [17] 董培智, 连云岚, 王新瑞. 北虫草中腺苷和虫草素的分离纯化和鉴定[J]. *山西医药杂志*, 2007, 36(10): 949-950.
- [18] 周建良, 姜艳, 毕志明, 等. 蒲圻贝母中核苷类化学成分研究[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(12): 894-896.
- [19] 张冰, 陈晓辉, 毕开顺, 等. 三七花蕾化学成分的分离与鉴定[J]. *沈阳药科大学学报*, 2009, 26(10): 775-777.
- [20] YANG Fengqing, GE Liya, YONG J W H, et al. Determination of nucleosides and nucleobases in different species of *Cordyceps* by capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 50(3): 307-314.
- [21] LIU Ping, LI Yuanyuan, LI Hongmei, et al. Determination of the nucleosides and nucleobases in Tuber samples by dispersive solid-phase extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 687(2): 159-167.
- [22] LIN Shuyu, CHEN Weihis, LIU Chuenying, et al. Nucleoside monophosphates recognition using macrocyclic polyamine bonded phase in capillary electrochromatography[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(9): 1522-2683.
- [23] 贺寅, 王强, 钟葵. 响应面优化酶法提取龙眼多糖工艺[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 79-82.
- [24] 曾哲灵, 郝纯青, 吕伟, 等. 响应面法优化玫瑰茄红色素提取工艺[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 47-51.