

响应面法优化山麻楂粗多糖提取工艺

夏海涛, 刘玉芬, 苗文军

(淮海工学院化学工程学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 用响应面法优化野生山麻楂粗多糖的提取条件。在单因素试验基础上, 选择提取温度、提取时间、液料比三因素三水平进行Box-Behnken试验, 确定提取工艺的优化组合条件。结果表明: 提取工艺最佳条件为提取温度97℃、提取时间3.5h、液料比30.5:1(mL/g)、提取2次, 该条件下多糖得率预测值为2.226%, 验证值为2.219%。

关键词: 山麻楂; 多糖; 响应面法; 提取

Optimization of Extraction Process for Polysaccharides from Stems and Leaves of *Gypsophila oldhamiana* Miq. by Response Surface Methodology

XIA Hai-tao, LIU Yu-fen, MIAO Wen-jun

(College of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Response surface methodology was employed to optimize conditions for the extraction of polysaccharides from the stems and leaves of wild *Gypsophila oldhamiana* Miq. On the basis of single-factor experiments, temperature, time and solvent-to-solid ratio were selected out of four extraction conditions for a three-level Box-Behnken experimental design. Results showed that optimal extraction conditions were obtained using two extraction cycles at 97 °C with distilled water at a solvent-to-solid ratio of 30.5:1 (mL/g) for 3.5 h. Under these conditions, the predicted and experimental extraction yields of polysaccharides were 2.226% and 2.219%, respectively.

Key words: *Gypsophila oldhamiana* Miq.; polysaccharides; response surface methodology; extraction

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)20-0128-04

山麻楂(*Gypsophila oldhamiana* Miq.), 又名山珍菜、山蚂蚱菜、长蕊石头花、霞草等^[1-2], 是石竹科石头花属植物, 多年生草本。在民间常作为清热解毒、清热利水的中草药使用^[3], 具有清热凉血、消肿止痛、化腐生肌长骨的功效。近年来, 随着人们对山麻楂化学成分及药理作用的研究, 发现山麻楂富含氨基酸、维生素、矿物质、黄酮、糖类、皂苷、甾醇、脂肪酸等多种生物活性成分^[4-8], 除治疗阴虚久症、潮热、烦温、骨蒸、盗汗、跌打损伤、骨折、外伤等症^[9]外, 还具有抗肿瘤、抗肥胖、抗脂肪肝、抗糖尿病等作用^[10-11], 开发潜力巨大。多糖是一类重要的生物活性物质, 在临床上对肿瘤、肝炎、心脏病、神经衰弱均有一定疗效^[12]。除具有增强免疫力、抗肿瘤、抗辐射、抗疲劳、抗寄生虫、抗菌、抗病毒等生物活性外, 还具有降血糖、降血脂、延缓衰老等作用^[13-15], 甚至对艾滋病病毒也有一定的防御功能^[16]。目前多糖的应用正在由原来的医疗保健领域向其他行业如食品、石油化工、化妆品、材料、环境等领域延伸^[17-20], 具有非常广阔的发展前景。多糖提取方法有热水浸提法^[21], 酶解提

取法^[22], 微波辅助提取法^[23], 超声波提取法^[24-25], 超微粉碎技术, 超临界流体萃取法等^[26]。热水浸提法是传统的提取方法, 虽然提取时间长, 但具有提取率高、成本低廉、工艺简单、无需特殊仪器设备、适于大规模生产等优点。本实验使用热水浸提法, 以多糖提取率为考察指标, 利用响应面法对山麻楂粗多糖提取工艺条件进行优化, 旨在为山麻楂植物资源的进一步开发利用与研究提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

山麻楂嫩茎叶采自连云港市花果山, 洗净在60℃条件下于电热恒温鼓风干燥箱中烘干至质量恒定, 粉碎过40目筛。

95%乙醇、无水乙醚、丙酮、硫酸、苯酚、葡萄糖均为分析纯 上海国药集团。

1.2 仪器与设备

收稿日期: 2012-06-06

作者简介: 夏海涛(1960—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为应用化学、天然植物提取与分析。E-mail: xht161006@hhit.edu.cn

UV-2550型紫外分光光度计 日本岛津公司；RE-5285A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂；DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司；TDL-4型台式离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 多糖提取工艺

工艺流程：山麻楂干粉→水溶液提取→离心→滤液→减压浓缩→95%乙醇沉淀→离心→洗涤沉淀物→定容→测定多糖含量。

操作方法：称取一定量山麻楂干粉，置于三口瓶中，按试验设计条件加入蒸馏水，提取2次。浓缩提取液，加入95%乙醇析出多糖，离心后沉淀物用无水乙醇、丙酮、无水乙醚交替淋洗3次，挥干溶剂，沉淀物加水定容，测定粗多糖含量。每次试验平行操作3次，分别测定粗多糖含量，计算粗多糖提取率，然后取平均值。

1.3.2 多糖含量测定

以葡萄糖为标样，按文献[27]用苯酚-硫酸法测定粗多糖含量。标准曲线回归方程为 $A=5.7871x + 0.0401$ (x 为葡萄糖质量浓度，范围为20~120mg/L， A 为吸光度)， $R=0.9991$ ，根据方程可计算粗多糖含量。

$$\text{山麻楂多糖提取率/\%} = \frac{\text{提取液中多糖含量}}{\text{原料干质量}} \times 100$$

1.3.3 单因素试验

考察提取温度、提取时间、液料比、提取次数对山麻楂多糖提取率的影响。

1.3.4 响应面优化试验

以单因素试验为基础，固定提取次数为2次，选择提取温度、提取时间、液料比为Box-Behnken设计的自变量，山麻楂多糖提取率为响应值进行响应面优化组合。因素水平设计见表1。

表1 响应面优化试验因素水平表

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

水平	因素		
	A 提取温度/℃	B 提取时间/h	C 液料比(mL/g)
-1	80	3	20:1
0	90	3.5	30:1
1	100	4	40:1

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取温度对多糖提取率的影响

在提取时间3h、液料比30:1、提取次数2次的条件下，考察不同提取温度对多糖提取率的影响，结果如图1所示。提取温度低于80℃时，随着提取温度的上升，山麻楂多糖提取率增加较快；高于80℃后，多糖提取率增

加缓慢；温度达到100℃时，多糖提取率已经渐趋平稳，变化极小。温度过高提取成本增加，多糖化学结构受到破坏，故提取温度选90℃为宜。

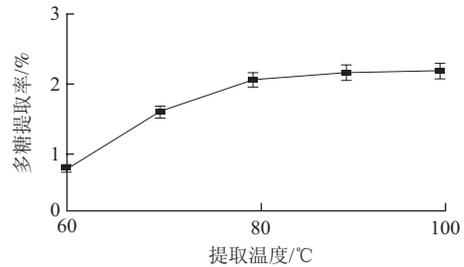


图1 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of temperature on the extraction yield of polysaccharides

2.1.2 液料比对多糖提取率的影响

其他条件同2.1.1节，选择提取温度90℃，考察不同液料比对多糖提取率的影响，结果见图2。山麻楂多糖提取率随着液料比的增加而上升，在液料比超过30:1后，多糖提取率略有下降。溶剂量过多会给后续工艺处理增加困难，因此控制液料比30:1为宜。

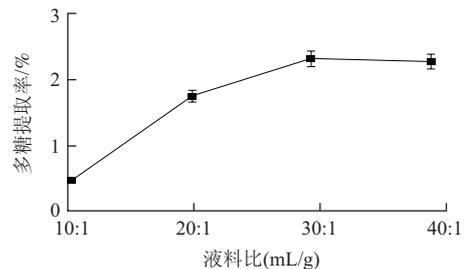


图2 液料比对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of solvent-to-solid ratio on the extraction yield of polysaccharides

2.1.3 提取时间对多糖提取率的影响

其他条件同2.1.2节，考察不同提取时间对多糖提取率的影响，结果如图3所示。多糖提取率随提取时间的增加而增大，3.5h达到最大值，继续增加提取时间，多糖提取率略有下降。因此，提取时间选3.5h为宜。

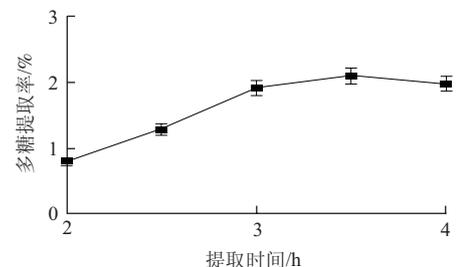


图3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the extraction yield of polysaccharides

2.1.4 提取次数对多糖提取率的影响

其他条件同2.1.3节，考察重复提取次数对多糖提取率的影响，结果见图4。提取1次后，再进行第2次提取，多糖提

取率明显下降, 考虑成本等因素, 多糖重复提取2次为宜。

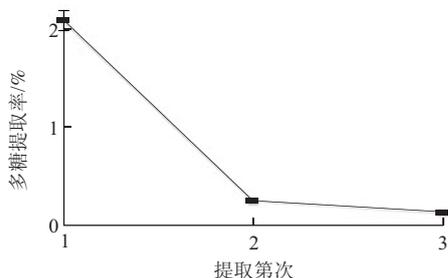


图4 提取次数对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction number on the extraction yield of polysaccharides

2.2 响应面试验结果

响应面优化山麻植多糖提取条件的结果见表2。

将所得的试验数据用Design-Expert软件处理, 得到山麻植多糖提取率对提取温度A、提取时间B和液料比C的二次多项回归方程:

$$\text{多糖提取率}/\% = 2.1002 + 0.3356A + 0.0733B + 0.0639C - 0.0463AB - 0.0590AC + 0.0563BC - 0.2301A^2 - 0.1739B^2 - 0.1951C^2$$

由表3回归模型方差分析可知, 模型 $P < 0.0001$, 表明响应回归模型达到了极显著水平。模型的校正确定系数 R^2 和修正相关系数 R^2_{Adj} 表明该模型拟合程度较好, 可用此模型对山麻植多糖的提取进行分析和预测。从回归模型方差分析可以看出, 方程交互项AB、AC、BC对山麻植多糖影响达显著水平, 方程一次项和二次项均达极显著水平。三个因素对山麻植多糖提取率的影响顺序为 $A > B > C$, 即提取温度 $>$ 提取时间 $>$ 液料比。

表2 多糖提取响应面试验设计方案及结果

Table 2 Experimental design and corresponding results for response surface analysis

试验号	A温度	B时间	C液料比	多糖提取率/%
1	0	0	0	2.065
2	-1	0	1	1.472
3	1	0	-1	1.996
4	1	0	1	2.008
5	0	1	-1	1.705
6	0	0	0	2.118
7	0	0	0	2.062
8	0	1	1	1.943
9	0	0	0	2.108
10	1	1	0	2.048
11	-1	-1	0	1.252
12	-1	0	-1	1.224
13	0	-1	1	1.645
14	0	0	0	2.148
15	1	-1	0	2.033
16	0	-1	-1	1.632
17	-1	1	0	1.452

由回归模型的响应面图(图5)可以看出, 山麻植多糖提取率随着各两因素的增加呈上升趋势, 当各两因素达到某一水平时, 多糖提取率达最大值, 随后下降。图5a显示, 当达到提取温度约97.1℃、提取时间约3.56h时, 多糖提取率达到最大值。图5b显示, 在液料比约28.8:1(mL/g)、提取温度98.5℃附近可以达到响应值最高点; 图5c表明, 当提取时间和液料比达到约3.55h和30.2:1(mL/g)时, 响应值达最大值; 由等高线图可知, 沿提取温度轴向等高线相对密集, 曲线较陡, 表明提取温度对多糖提取率的影响比时间和液料比大; 各两因素交互作用的等高线均呈椭圆形, 表明两因素有明显的交互作用, 影响显著^[28-29]。

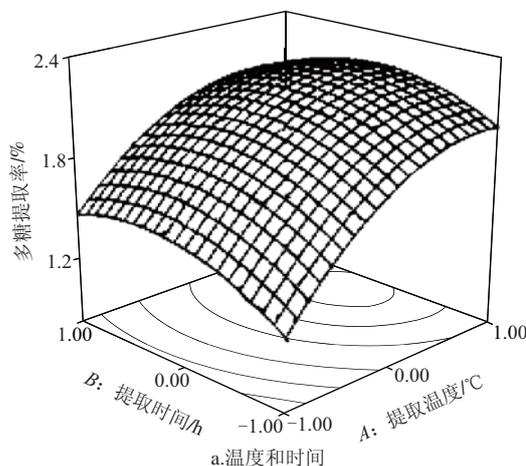
表3 回归模型的方差分析

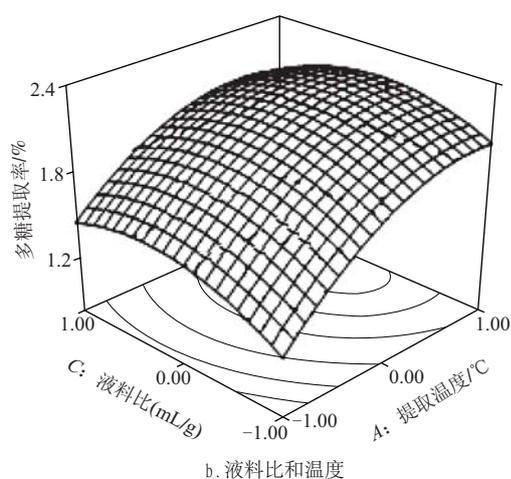
Table 3 Variance analysis for the established regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.5812	9	0.1757	136.5272	
A	0.9012	1	0.9012	700.2705	<0.0001
B	0.0429	1	0.0429	33.3559	<0.0001
C	0.0326	1	0.0326	25.3641	0.0007
AB	0.0086	1	0.0086	6.6489	0.0015
AC	0.0139	1	0.0139	10.8201	0.0365
BC	0.0127	1	0.0127	9.8349	0.0133
A ²	0.2229	1	0.2229	173.2355	0.0165
B ²	0.1273	1	0.1273	98.8902	<0.0001
C ²	0.1603	1	0.1603	124.5427	<0.0001
残差	0.0090	7	0.0013		<0.0001
失逆项	0.0036	3	0.0012	0.9071	
纯误差	0.0054	4	0.0013		0.5124
总变异	1.5902	16			
$R^2=0.9943$ $R^2_{\text{Adj}}=0.9871$ CV=1.97%					

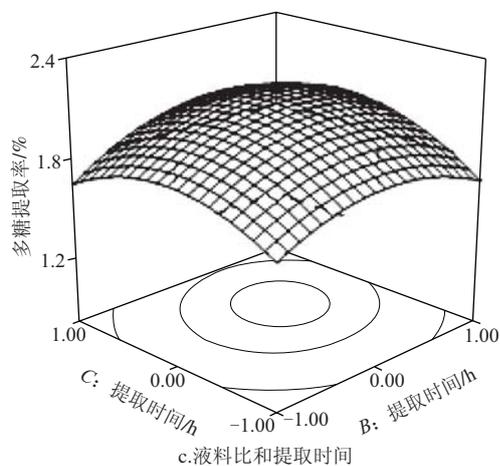
注: $P < 0.05$, 差异显著; $P < 0.01$, 差异极显著。

通过软件Design-Expert求解回归方程, 得到山麻植多糖的最佳提取工艺条件为提取温度97.07℃、提取时间3.56h、液料比30.76:1(mL/g), 山麻植多糖提取率可达2.226%。考虑实际操作, 将试验条件修正为提取温度97℃、提取时间3.5h、液料比30.5:1(mL/g)。在此条件下提取2次进行3组平行试验, 测定实际提取率2.219%, 与预测值的相对误差(0.31%)较小。说明回归方程模型用于优化筛选山麻植多糖提取工艺可行。





b. 液料比和温度



c. 液料比和提取时间

固定水平: A 提取温度90℃; B 提取时间3.5h; C 液料比30:1(mL/g)。

图5 各两因素交互作用对多糖提取率影响的响应面图

Fig.5 Response surface plot showing the interactive effects of three extraction parameters on the extraction yield of polysaccharides

3 结论

在单因素试验基础上, 利用响应面法建立山麻楂中多糖提取率与温度、时间、液料比之间关系的二次多项回归模型。优化得到的最佳提取工艺修正条件为提取温度97℃、提取时间3.5h、液料比30.5:1(mL/g), 在此条件下得到的实际多糖提取率与预测值的相对误差仅为0.31%, 说明该模型拟合程度高, 准确有效, 用于山麻楂中多糖提取工艺的优化筛选可行。

参考文献:

[1] 中国科学院. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 434-435.
 [2] 王康涛. 食疗保健山野菜: 长蕊石头花[J]. 特种经济动植物, 2009(2): 41.
 [3] 罗建光, 何丽丽, 孔令义. 丝石竹的化学成分[J]. 中国天然药物, 2006, 4(5): 382-384.
 [4] 孙敬勇, 仲英, 尹俊亭, 等. 霞草中三萜化合物的分离与结构鉴定[J]. 中草药, 2005, 36(5): 644-646.

[5] 罗建光, 张洁, 孔令义. 丝石竹三萜成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 31(19): 1640-1641.
 [6] 杨尚军, 仲英, 骆宏丰. 霞草根化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(11): 680-381.
 [7] 耿敬章, 李春华, 仇农学. 霞草的成分分析及营养评价[J]. 中国食物与营养, 2005(8): 41-43.
 [8] HELLE B M, DOEHL J. Separation and characterization of oleanene-type pentacyclic triterpenes from *Gypsophila arrostii* by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 1987, 396: 157-168.
 [9] 孙敬勇, 仲英, 左春旭, 等. 霞草中化学成分分离与结构鉴定[J]. 药学学报, 2005, 40(11): 994-996.
 [10] 田桂红, 周玲, 胡志力, 等. 霞草总苷对S₁₈₀和H₂₂实体瘤的抑制作用[J]. 山东中医杂志, 2008, 27(1): 50-54.
 [11] 武海艳, 安琨, 李海波, 等. 霞草化学成分及药理活性研究进展[J]. 食品与药品, 2011, 13(5): 213-216.
 [12] 沈飞, 冯旌, 窦文轩, 等. 天然多糖类药物检验及临床应用现状[J]. 中国当代医药, 2011, 18(31): 14-15.
 [13] 庞春红. 多糖药理作用研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(4): 639-940.
 [14] 刘洁, 李文香, 王文亮, 等. 生物多糖研究进展[J]. 山东农业科学, 2011, 43(5): 98-101.
 [15] 叶涛, 叶湘漓, 贺建华. 植物多糖功能与作用机理的研究进展[J]. 农产品加工: 学刊, 2012(1): 22-23.
 [16] 袁陆, 宫江, 杨木, 等. 植物多糖的提取工艺和方法[J]. 吉林畜牧兽医, 2011, 32(2): 13-17.
 [17] 贾亮亮, 袁丁, 何毓敏, 等. 多糖提取分离及含量测定的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(3): 189-192.
 [18] 汪志好. 植物多糖的研究进展[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2007, 6(2): 86-88.
 [19] 罗志敏, 陈群伟. 多糖及多糖衍生物水处理剂的研究进展[J]. 广州化学, 2008, 33(1): 68-72.
 [20] 申利红, 王建森, 李雅, 等. 植物多糖的研究及应用进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 349-352.
 [21] YE Chunlin, JIANG Chengjun. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 495-502.
 [22] ZHANG Jiao, JIA Shaoyi, LIU Yong, et al. Optimization of enzyme-assisted extraction of the *Lycium barbarum* polysaccharides using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(2): 1089-1092.
 [23] ZHENG Xianzhe, YIN Fangping, LIU Chenghai, et al. Effect of process parameters of microwave assisted extraction (MAE) on polysaccharides yield from *Pumpkin*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 18(2): 79-86.
 [24] CHEN Ruizhan, LI Yuan, DONG Hang, et al. Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum caudatum* ait and evaluation of its biological activities[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(6): 1160-1168.
 [25] CHEN Wei, WANG Weiping, ZHANG Huashan, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis mycelia* using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 614-619.
 [26] 金迪, 梁英, 孙工兵, 等. 植物多糖提取技术的研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(5): 76-79.
 [27] 刘玉芬, 夏海涛, 张丹妮, 等. 马兰头多糖提取工艺的响应面法优化及不同部位多糖含量的测定[J]. 食品科学, 2011, 32(24): 153-157.
 [28] 张君萍, 侯喜林, 董海艳, 等. 响应曲面法优化超声波提取沙葱籽多糖工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 98-103.
 [29] 王学堂, 武心芹. 山野菜霞草人工栽培技术[J]. 中国蔬菜, 2007(2): 54.