

响应面法优化三百棒多糖提取工艺

田瑞, 夏燕, 冯佳, 杨年安, 向阳, 陈安平, 袁林*

(湖北民族学院风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000)

摘要 [目的] 采用响应面法优化提取三百棒多糖的工艺条件。[方法] 选择料液比、提取温度、提取时间、提取次数 4 个因素进行单因素试验, 基于单因素试验结果, 使用 BBD 响应面对三百棒多糖的提取工艺进行优化, 并建立回归模型。[结果] 最佳提取工艺条件: 料液比 1:15 (g: mL), 提取温度 93 ℃, 提取时间 4 h, 提取次数 3 次, 在此条件下, 三百棒多糖的提取率为 4.75%, 与模型的预期值 4.99% 基本相符。[结论] 该优化工艺合理可行, 具有较高的应用价值。

关键词 三百棒; 多糖; 响应面; 提取工艺

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)12-0004-03

Optimization of Extracting Polysaccharide from *Toddalia asiatica* Lam. by the Response Surface Method

TIAN Rui, XIA Yan, FENG Jia et al (Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Enshi, Hubei 445000)

Abstract [Objective] Response surface methodology was used to optimize the extraction condition of polysaccharide from *Toddalia asiatica* Lam. [Method] The effects of solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and extraction times by single factor experiments were studied. Subsequently, based on the four factors, a polysaccharide yield regression model was established using the Box-Behnken design. A regression model equation was fitted. [Result] The optimum extractions were solid-liquid ratio of 1:15 (g: mL), extraction temperature of 93 ℃, extraction time of 4 h, extraction times of 3. Under the conditions, the maximum experimental polysaccharide yield was 4.75%, which was basically consistent with the predicted of 4.99%. [Conclusion] The optimized technology was feasible, and had high application value.

Key words *Toddalia asiatica* Lam.; Polysaccharide; Response surface; Extraction

三百棒 (*Toddalia asiatica* Lam.) 又名见血飞、大救驾等, 为芸香科飞龙掌血属植物的根和根皮, 主产于湖南、湖北、贵州、四川等地, 非洲东部及亚洲东南部和南部均有分布。传统医学认为, 三百棒具有活血散瘀、舒筋通络、消肿止痛的作用, 常用于治疗跌打损伤、风湿痹痛、胃痛及痛经^[1]。现代医学研究表明, 三百棒具有治疗胃肠炎、抗肿瘤、抗炎镇痛及抑菌等作用^[2-5]。

关于三百棒多糖的研究较少^[6-7]。笔者采用响应面分析方法对三百棒多糖的提取工艺进行优化, 旨在为三百棒多糖的提取工艺研究提供理论依据, 同时对三百棒多糖的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 三百棒采于湖北省恩施州咸丰县, 经湖北民族学院附属民大医院制剂室张国安主任药师鉴定为飞龙掌血 (*Toddalia asiatica* Lam.)。蒽酮、葡萄糖、三氯甲烷、正丁醇、浓硫酸均为分析纯。

1.2 仪器 BILON-W420 数显三用恒温水箱, 西安德派生物技术有限公司; 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 离心机, eppendorf 公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 冷冻干燥机 (GOLD-S2M), 上海欧蒙实业有限公司。

1.3 三百棒多糖的提取 称取一定质量的三百棒干粉, 加入适量的水, 搅拌均匀, 在一定温度下浸提一定时间, 然后离心 (3 000 r/min, 10 min), 浓缩, 醇沉 4 ℃ 过夜, 离心

(3 000 r/min, 10 min), Sevage 法脱蛋白^[8], 然后浓缩挥发掉有机溶剂, 真空冷冻干燥。

1.4 单因素试验 设定料液比 [1:5, 1:10, 1:15, 1:20 (g: mL)], 提取温度 (40、60、80、100 ℃)、提取时间 (2.0、3.0、4.0、5.0 h)、提取次数 (2、3、4、5 次) 为自变量进行单因素试验。

1.5 三百棒多糖含量的测定

1.5.1 标准曲线的制作。 采用蒽酮硫酸法^[9]测定三百棒多糖含量。准确称取干燥恒重的葡萄糖标准品 100 mg, 定容于 200 mL 容量瓶, 即得 0.5 mg/mL 葡萄糖标准溶液。分别吸取 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mL 标准葡萄糖溶液, 用蒸馏水补足至 2.0 mL, 以 2.0 mL 蒸馏水为空白, 然后各自加入 0.5 及 5.0 mL 浓硫酸, 摇匀, 沸水浴 1.0 min, 630 nm 处测定吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得标准曲线。标准曲线的回归方程为 $Y = 0.0080X + 0.0008$, $R^2 = 0.9992$ 。

1.5.2 样品多糖含量的测定。 脱蛋白后, 取 5.0 mL 定容于 10.0 mL, 量取 0.5 mL, 用蒸馏水补足至 2.0 mL, 按照“1.5.1”的步骤测定吸光度。以标准曲线计算三百棒多糖含量。

1.6 三百棒多糖提取的中心组合试验^[10-11] 在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计, 用响应面软件 Design Expert 8.05b 分析料液比、提取温度、提取时间、提取次数 4 因素中影响较大的 3 水平, 分别以 -1、0、1 表示, 具体设计见表 1。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果 由图 1 可知, 随着料液比的增加, 三百棒多糖的得率快速增加, 当料液比达 1:15 后, 三百棒多糖的得率增加缓慢, 可见增大料液比有利于三百棒多糖的提取, 但增大到一定程度后, 三百棒多糖的得率基本趋于稳定。

基金项目 国家自然科学基金项目 (81360672); 湖北省民委项目 (HBMW2012027)。

作者简介 田瑞 (1987—), 女, 湖北鹤峰人, 初级药师, 硕士, 从事天然产物开发与利用研究。* 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, 博士, 从事民族医药研究。

收稿日期 2018-01-08

表 1 Box-Benhnken 试验设计因素与水平

Table 1 Levels for factors used in Box-Benhnken experiments

水平 Level	因素 Factor			
	料液比(X_1) Solid-liquid ratio g: mL	提取温度(X_2) Extraction temperature// $^{\circ}$ C	提取时间(X_3) Extraction time//h	提取次数(X_4) Extraction times//次
1	1:15	100	4	4
0	1:10	80	3	3
-1	1:5	60	2	2

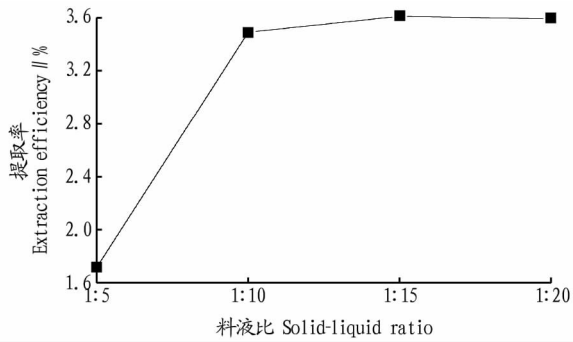


图 1 料液比对三百棒多糖提取率的影响

Fig. 1 Effects of solid liquid ratio on extraction efficiency of *Toddalia asiatica* Lam. polysaccharides

由图 2 可知,随着温度增加,多糖的得率快速增加,温度达 80 $^{\circ}$ C 后稍有下降,可能是由于高温条件下一部分多糖发生水解^[12],导致多糖损失,另外温度过高会使许多杂质含量增加,造成三百棒多糖的分离困难。由此可知,三百棒多糖的提取温度以 80 $^{\circ}$ C 最好。

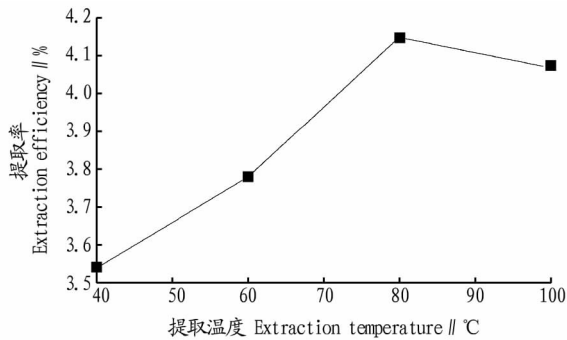


图 2 提取温度对三百棒多糖提取率的影响

Fig. 2 Effects of extraction temperature on extraction efficiency of *Toddalia asiatica* Lam. polysaccharides

由图 3 可知,在一定提取时间内,三百棒多糖的得率随着时间的增加而增加,在 4.0 h 时达到最高,当提取时间达 5.0 h 时,多糖得率稍有下降,可能是因为时间过长导致三百棒多糖部分降解^[13],由此可知,三百棒多糖的提取时间以 4 h 最好。

由图 4 可知,三百棒多糖的得率随着提取次数的增加逐渐增加,但当提取次数达 3 次后,多糖的得率趋于稳定,并稍有下降,可见三百棒多糖的提取次数宜选择 3 次。

2.2 响应面试验结果 结合单因素试验结果,采用 Box-Benhnken 中心组合试验法,选取料液比、提取温度、提取时间、提取次数因素中影响较大的 4 因素,进行 4 因素 3 水平的中心组合试验,以三百棒多糖得率为响应值,通过响应面

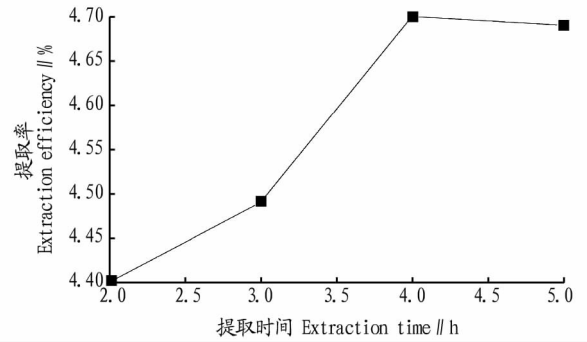


图 3 提取时间对三百棒多糖提取率的影响

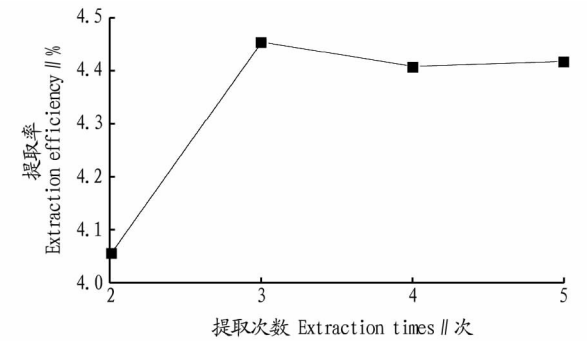
Fig. 3 Effects of extraction times on extraction efficiency of *Toddalia asiatica* Lam. 's polysaccharides (TALP)

图 4 提取次数对三百棒多糖提取率的影响

Fig. 4 Effects of extraction times on extraction efficiency of *Toddalia asiatica* Lam. 's polysaccharides

分析优化三百棒多糖的提取工艺条件(表 2)。

表 2 Box-Benhnken 试验设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Benhnken experiments

编号 No.	X_1	X_2	X_3	X_4	提取率 Extraction efficiency (Y)//%
1	1	0	1	0	4.69
2	-1	0	0	1	4.17
3	0	0	1	1	4.63
4	-1	-1	0	0	3.40
5	1	0	-1	0	4.30
6	0	0	0	0	4.38
7	0	1	0	1	4.60
8	0	-1	0	1	3.74
9	0	-1	1	0	3.48
10	0	0	0	0	4.57
11	1	1	0	0	4.55
12	-1	1	0	0	4.00
13	0	1	1	0	4.46
14	0	1	0	-1	3.79
15	1	-1	0	0	3.20
16	0	0	0	0	4.55
17	1	0	0	1	4.67
18	0	0	0	0	4.59
19	0	0	1	-1	3.90
20	0	0	-1	1	4.29
21	-1	0	0	-1	3.35
22	0	0	0	0	4.59
23	0	1	-1	0	3.99
24	0	-1	0	-1	3.16
25	-1	0	1	0	4.16
26	0	-1	-1	0	3.14
27	-1	0	-1	0	4.05
28	1	0	0	-1	3.60
29	0	0	-1	-1	3.50

利用 Design Expert 8.05b 软件对试验数据进行二次多元回归拟合,以料液比(X_1)、提取温度(X_2)、提取时间(X_3)、提取次数(X_4)为自变量,三百棒多糖提取率(Y)为响应值。其回归方程:

$$Y = 4.540 + 0.140 X_1 + 0.440 X_2 + 0.170 X_3 + 0.400 X_4 + 0.190 X_1 X_2 + 0.070 X_1 X_3 + 0.062 X_1 X_4 + 0.033 X_2 X_3 + 0.057 X_2 X_4 - 0.015 X_3 X_4 - 0.200 X_1^2 - 0.530 X_2^2 - 0.150 X_3^2 - 0.290 X_4^2$$

利用 Design Expert 8.05b 软件对响应面结果进行回归拟合分析,并对回归方程的系数进行显著性检验。

方差分析结果表明,4个因素对三百棒多糖提取率的影响由大到小依次为提取温度、提取次数、提取时间、料液比,其中提取温度的一次项和二次项 P 值都小于 0.000 1,达极显著水平,说明提取温度对三百棒多糖的提取率影响极显著,提取温度和料液比的交互作用也显著;总模型的 P 值小于 0.000 1,表明试验所得的二次多项式模型显著性较高,能

对相关试验数据进行较好的拟合,表明该试验方法可靠,其中失拟项的 P 值为 0.120 8,因此该模型能够应用于实际值; $R_{\text{adj}}^2 = 0.918 5$,可以解释该模型中 91.85% 的响应值变化,同时调整决定系数 $R^2 = 0.959 2$,进一步说明该试验模型的拟合度较好。 $R_{\text{pred}}^2 = 0.782 9$, $R_{\text{adj}}^2 = 0.918 5$,二者差异合理,说明该模型具有较好的回归性。Adeq Precision 的值为 16.287 > 4.000,进一步表明模型的合理性。

2.3 最佳条件优化及验证试验 根据回归模型的分析结果,得到三百棒多糖提取的最佳工艺条件:料液比 1:14.87,提取温度 93.16 °C,提取时间 3.85 h,提取次数 3.83 次,在该条件下三百棒多糖提取率的预测值为 4.99%。考虑到实际操作情况,将最佳提取工艺修正为料液比 1:15,提取温度 93 °C,提取时间 4 h,提取次数 3 次,在此条件下,三百棒多糖提取率为 4.75%。预测值和实际值很接近,偏差较小,因此此响应面法优化得到的模型参数准确可靠(图 5)。

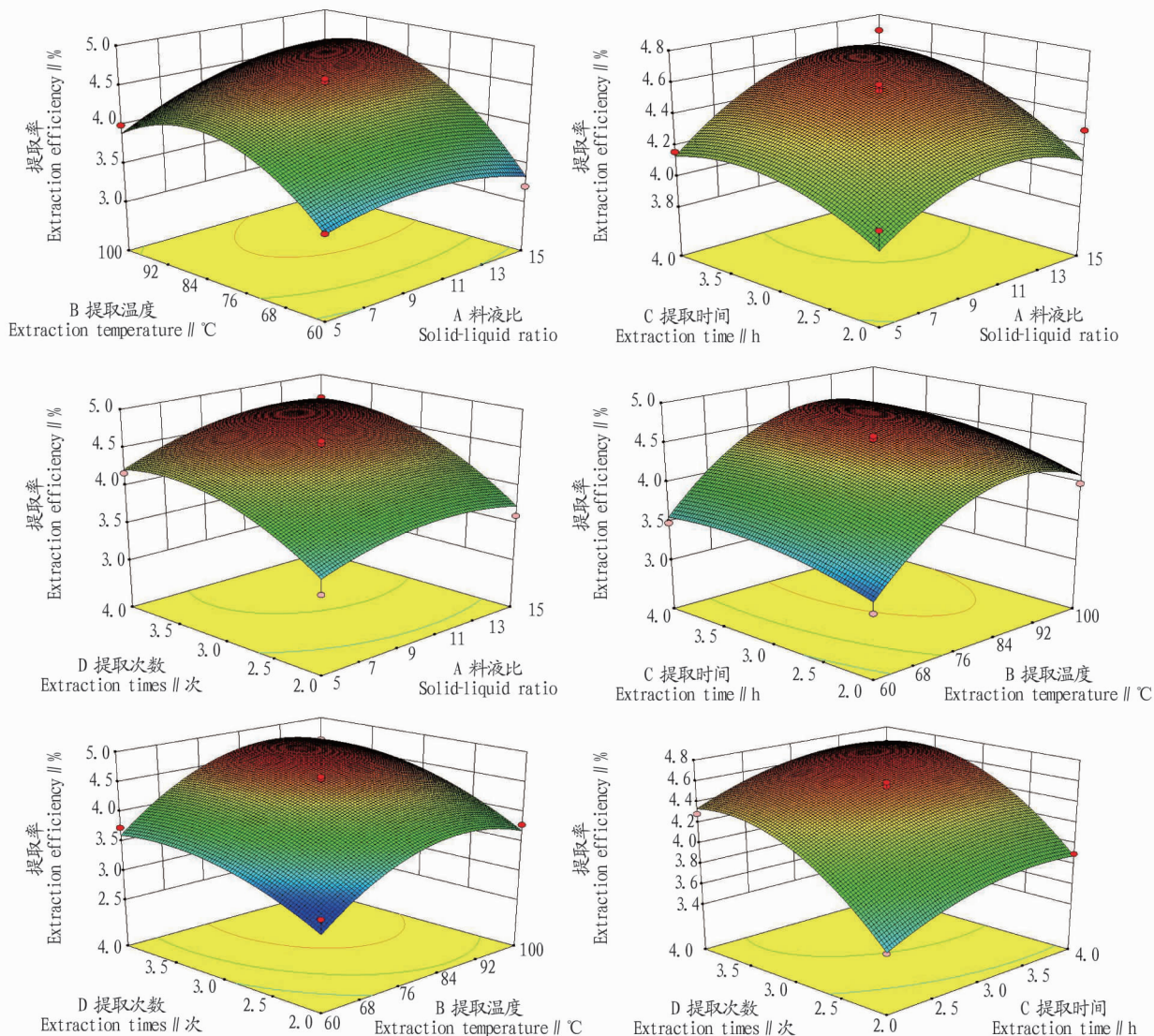


图 5 2 因素交互作用对三百棒多糖提取率的影响

Fig. 5 Interactive effects of extraction parameters on the yield of *Toddalia asiatica* Lam.'s polysaccharides

这一技术是一种间接分析技术,需要依靠复杂的化学计量学方法对所得光谱数据进行提取分析,而提取分析后的数据物理意义并不明确,因此对其最终得出的结果很难直接作出解释,需要使用精确的化学分析手段对样本的化学组分进行深入研究,以求从中找出真正影响光谱差异的因素,从而更加科学地对鉴别结果作出解释。

(4)研究系统性、深度欠缺。目前,大多数红外光谱结合化学计量学在食品检测中的研究只是进行可行性探索,研究的系统性、深入性还远远不够,而且检测抽样量比较少,还未在全球范围内建立任何关于食品产地溯源、品质鉴定、真伪鉴别等的数据库,因此还需进一步做大量的研究工作,将红外技术结合化学计量学有效地应用于食品检测中。

参考文献

- [1] ALIAKBARZADEH G, SERESHTI H, PARASTAR H. Fatty acids profiling of avocado seed and pulp using gas chromatography-mass spectrometry combined with multivariate chemometric techniques[J]. Journal of the Iranian chemical society, 2016, 13(10): 1905-1913.
- [2] 马悦,赵乐凤,吕子燕,等. 高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析菜菔中黄酮类和多酚类物质[J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 45-51.
- [3] SHI L K, ZHANG M M, LIU Y L. Concentration and survey of phthalic acid esters in edible vegetable oils and oilseeds by gas chromatography-mass spectrometry in China[J]. Food control, 2016, 68: 118-123.
- [4] 孙兴权,赵禹,杨春光,等. 液相色谱-高分辨质谱联用技术在食品欺诈检测鉴别中的应用[J]. 色谱, 2016, 34(7): 647-656.
- [5] ZHAO W, LIU F, FENG X H, et al. Fourier transform infrared spectroscopy study of acid birnessites before and after Pb²⁺ adsorption[J]. Clay minerals, 2012, 47(2): 191-204.
- [6] MEHLTRETTER A H, WRIGHT D M, SMITH M A. Variation in duct tape products over time: Physical measurements and adhesive compositional analysis by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Forensic chemistry, 2017, 4: 1-8.
- [7] YAN R, CHEN J B, SUN S Q, et al. Rapid identification of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae Flos* by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation analysis[J]. Journal of molecular structure, 2016, 1124: 110-116.
- [8] HUANG D M, GUO C N, ZHANG M Z, et al. Characteristics of nanoporous silica aerogel under high temperature from 950 °C to 1200 °C[J]. Materials & design, 2017, 129: 82-90.
- [9] 马冬红,王锡昌,刘利平,等. 近红外光谱技术在食品产地溯源中的研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(4): 877-881.
- [10] 张宁,张德权,李淑荣,等. 近红外光谱结合 SIMCA 法溯源羊肉产地的初步研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(12): 309-312.

- [11] 朱哲燕,张初,刘飞,等. 基于中红外光谱分析技术的香菇产地识别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(3): 664-667.
- [12] 张文海,姬中伟,艾斯卡尔·艾拉提,等. FT-IR 结合 SIMCA 法识别糯米产地[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 225-228.
- [13] 李仲,刘明地,吉守祥. 基于枸杞红外光谱人工神经网络的产地鉴别[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(3): 720-723.
- [14] 黄桂东,毛健,姬中伟,等. DR-FTIR 结合 SIMCA 识别不同种类原料米酿造的黄酒[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 285-288.
- [15] 管骁,古方青,刘静,等. 近红外光谱技术的乳粉品牌溯源研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(10): 2621-2624.
- [16] 何勇,李晓丽,邵咏妮. 基于主成分分析和神经网络的近红外光谱苹果品种鉴别方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(5): 850-853.
- [17] 方慧,张昭,王海龙,等. 基于中红外光谱技术鉴别转基因大豆的方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(3): 760-765.
- [18] 牛晓颖,邵利敏,董芳,等. 基于近红外光谱和化学计量学的驴肉鉴别方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 2737-2742.
- [19] 陈学海. 傅里叶变换红外光谱结合模式识别法在食用油真伪鉴别中的实践分析[J]. 食品安全导刊, 2015(6): 94-96.
- [20] 杨志敏,丁武. 近红外光谱技术快速鉴别原料肉掺假的可行性研究[J]. 肉类研究, 2011, 25(2): 25-28.
- [21] 赵贤德,董大明,郑文刚,等. 傅里叶变换红外光谱在葡萄酒品质劣变检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 2667-2672.
- [22] 欧文娟,孟耀勇,张平丽,等. 可见-近红外光谱结合化学计量学认证有机胡萝卜、绿色胡萝卜和无公害胡萝卜[J]. 激光生物学报, 2015, 24(1): 46-54.
- [23] 刘聪. 基于近红外光谱的鲜枣品质检测及其安全判别研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [24] ALAMAR P D, CARAMÈS E T S, POPPI R J, et al. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics[J]. Food research international, 2016, 85: 209-214.
- [25] 刘崇华,黄宗平. 光谱分析仪器使用与维护[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [26] 杨家宝,杜昌文,申亚珍,等. 基于傅里叶变换中红外光谱的小白菜硝酸盐含量的快速测定[J]. 分析化学, 2013, 41(8): 1264-1268.
- [27] MAUER L J, CHERNYSHOVA A A, HIATT A, et al. Melamine detection in infant formula powder using near-and mid-infrared spectroscopy[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2009, 57(10): 3974-3980.
- [28] 吴迪,曹芳,冯水娟,等. 基于支持向量机算法的红外光谱技术在奶粉蛋白质含量快速检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(5): 1071-1075.
- [29] 方娟娟,白雪梅,强建华,等. 偏最小二乘法同时测定食醋的有效成分和防腐剂的含量[J]. 计算机与应用化学, 2010, 27(3): 351-354.
- [30] REVELOU P K, KOKOTOU M G, PAPPAS C S, et al. Direct determination of total isothiocyanate content in broccoli using attenuated total reflectance infrared Fourier transform spectroscopy[J]. Journal of food composition and analysis, 2017, 61: 47-51.
- [31] 及华,关军锋,孙玉龙,等. 不同采收成熟度黑宝石李冷藏期间品质变化的研究[J]. 保鲜与加工, 2010, 10(3): 22-25.
- [32] 牛晓颖,贾东军,王艳伟,等. 基于近红外光谱和化学计量学的李果成熟度鉴别方法研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 230-234.

(上接第6页)

3 结论

该试验通过对料液比、提取温度、提取时间、提取次数4个因素进行响应面分析,并由回归模型的方差分析结果可知4个因素的影响均显著。三百棒多糖的最佳提取工艺条件:料液比1:15,提取温度93 °C,提取时间4 h,提取次数3次。在此条件下得到的多糖提取率为4.75%,接近预测值4.99%,表明采用响应面法优化三百棒多糖的提取工艺准确可靠,科学可行,具有很好的参考价值。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- [2] 胡兴尧,曾凡波,崔晓瑞,等. 飞龙掌血乙醇提取物的镇痛抗炎作用及其毒性的研究[J]. 中国中医药科技, 2004, 7(4): 231-232.
- [3] 何小萍,任先达. 飞龙掌血水提取物对垂体后叶素所致大鼠缺血心肌的

- 保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(3): 283-285.
- [4] 张廷胜. 飞龙掌血治疗家畜胃肠炎[J]. 中兽医医药杂志, 1998, 17(1): 22-23.
- [5] 丁文,文赤夫,陈建华,等. 飞龙掌血提取物抑菌作用初步研究[J]. 生物质化学工程, 2007, 41(5): 33-35.
- [6] 田春莲,文赤夫,吴文滔. 飞龙掌血多糖提取工艺研究[J]. 中药材, 2010, 33(3): 462-464.
- [7] 王鹏,田春莲,田启建. 超声波预处理提飞龙掌血多糖的工艺优化[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(4): 108-112.
- [8] 王婉冰,徐子恒,王宏军,等. 响应面法优化海藻子种外皮水溶性多糖提取工艺及其抗菌活性[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 5-9.
- [9] 吴诗云,钟益宁,张焱,等. 熟地黄多糖含量测定方法研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(35): 154-156, 161.
- [10] 张桂春,刘玉静,解卫海,等. 响应面法优化灰树花发酵全液多糖提取工艺及其抗肿瘤活性[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 30-35.
- [11] 李加兴,李敏利,陈建伏,等. 微波辅助提取猕猴桃多糖工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 42-45.
- [12] 薛丹,黄豆豆,黄光辉,等. 植物多糖提取分离纯化的研究进展[J]. 中药材, 2014, 37(1): 157-161.
- [13] 刘颖,赵雪,柴智,等. 响应面法优化白首乌多糖提取的研究[J]. 农产品加工, 2017(1): 1-4.