

文章编号:1001-6880(2015)6-1099-06

响应面法优化蕨麻多糖的提取工艺

高丹丹*, 杨璐璐, 祁高展

西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030

摘要:采用水提醇沉法对蕨麻多糖进行提取,并对提取工艺条件进行了研究。在单因素实验的基础上,以多糖提取率为评价指标,选取液料比、浸提时间、浸提温度三个因素作为响应因子,用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理优化蕨麻多糖的提取工艺。最后得到蕨麻多糖热水浸提的最佳工艺条件为:液料比 20.3:1, 浸提时间 4.37 h, 浸提温度 82 ℃。在此条件下蕨麻多糖的实际提取率可达到 $24.53 \pm 0.24\%$ 。

关键词:蕨麻;多糖;提取;响应面;优化

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.029

Optimization of Extraction Conditions of Polysaccharide from *Potentilla anserina* by Response Surface Methodology

GAO Dan-dan*, YANG Lu-lu, QI Gao-zhan

College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China

Abstract: The extraction technology of the water-soluble polysaccharide from *Potentilla anserina* was studied in this paper. The influences of liquid-solid ratio (V/W), extraction time and temperature on the extraction yield were investigated. On the basis of single factor tests, a Box-Behnken design (BBD) was used to study the influence of the 3 independent variables on the extraction yield. The results showed that the optimal extraction parameters were as follows: the liquid-solid ratio was 20.25:1, extraction time was 4.37 h and extraction temperature was 82 ℃. The extraction yield of polysaccharide was $24.53 \pm 0.24\%$.

Key words: *Potentilla anserine*; polysaccharide; extraction; response surface; optimization

蕨麻是鹅绒委陵菜 (*Potentilla anserina* L.) 的原变种, 属于薔薇科 (Rosaceae) 委陵菜属 (*Potentilla*)。我国主要分布东北、华北、西北及西南等地。甘肃主产于甘南藏族自治区, 其中以夏河、卓尼、临潭三县所产的蕨麻享誉最高。蕨麻无论是叶片还是地下部分的块根都含有多种生物活性物质, 都可以被广泛的应用于医药、食品、饲料、皮革等行业^[1]。白术杰、吴莉莉^[2]等人的研究表明蕨麻多糖具有抗氧化作用、抗缺氧作用、补血作用、抗疲劳作用、降低血脂、抗乙型肝炎病毒活性、增强免疫等作用, 在食品保健和临幊上具有极大的发展前景^[3]。随着社会的进步, 人们已经开始致力于对蕨麻保健功能的研究, 蕨麻多糖的提取已经引起了人们的注意。目前为止, 对于多糖的提取其方法有:热水提取法、酸提法、碱提法、酶提法、微波^[4] 和超声波^[5] 辅助提取法等。

近几年来对于蕨麻多糖提取方法的工艺优化都是在单因素或正交试验条件下获得的。响应面法, 是利用响应面法拟合的回归方程模型和绘制的响应面及等高线, 从而得出最优工艺参数^[6]。确定响应面实验设计因素和水平的方法有很多种, 本研究是在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理来分析不同提取条件对蕨麻多糖提取率的影响, 优化多糖提取过程中的关键参数, 为以后对蕨麻多糖更深一步的研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蕨麻, 产于甘肃甘南地区, 购于兰州市国芳综超; 95% 乙醇, 济南市历城区远拓化工; 苯酚, 天津市福晨化学药剂厂; 浓硫酸, 武汉市新兴永发化工有限公司; 乙醚, 广东省广州市嘉俊; 丙酮, 南昌市西湖区龙玉化工; 葡萄糖, 济南嘉裕化工有限公司

1.2 仪器与设备

FZ102 微型植物试样粉碎机(北京科伟永兴仪

器有限公司);JA2003N 电子天平;HHS1-NI 电热恒温水浴锅(北京长安科学-仪器厂);TG16-WS 台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司);722E 可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)

2 实验方法

2.1 蕨麻粗多糖的提取

将蕨麻用微型植物粉碎机粉碎,过 50 目筛,筛下物放-20 ℃保存备用。称取 2 g 蕨麻粉加入一定体积的水放入恒温水浴锅中水浴浸提一定时间后取出,冷却至室温,装入离心管中,于 5000 rpm 离心 20 min 后取上清液测定多糖含量,弃去沉淀物。在上清液中加入 3 倍体积的 95% 的乙醇沉淀^[7],于 4 ℃冰箱中醇沉 12 h 后离心^[8],沉淀用丙酮、乙醚进行多次冲洗,冷冻干燥,得蕨麻粗多糖。

2.2 蕨麻多糖含量的测定(苯酚—浓硫酸法^[9])

2.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

精确称取 105 ℃下干燥至恒重的葡萄糖约 100.0 mg,定容至 100 mL 的容量瓶中,摇匀,再吸取 10 mL 上述溶液,加水定容至 100 mL 容量瓶中,既得 100 μg/mL 的葡萄糖标准溶液。精确吸取葡萄糖标准溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL,分别置于比色管中,各加蒸馏水补至 2.0 mL,然后分别加入 6% 苯酚 1 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,摇匀,室温静置 20 min。于 490 nm 处测定其吸光度(A),对测得的数据进行线性回归分析。

2.2.2 样品液的制备

取水浴浸提液离心后的上清液 10 mL 定容于 100 mL 容量瓶中,吸取溶液 20 mL,再次定容至 100 mL,既得所需样品液。

2.2.3 含量与提取率的测定

精确吸取 1 mL 样品液,按照葡萄糖标准曲线绘制的方法步骤进行测定其吸光度,查回归曲线得出溶液的浓度,然后计算出多糖的含量。蕨麻多糖提取率的计算公式:

$$\text{多糖提取率}(\%) = \frac{C \times \text{稀释倍数} \times A}{M \times 10^6} \times 100\%$$

式中:C 为多糖浓度(μg/mL);A 为浸提溶液的总体积(mL);M 为蕨麻质量(g)。

2.3 单因素实验

在固定温度 80 ℃,提取时间 3 h 的条件下,比较液料比 10:1、15:1、20:1、25:1 和 30:1 mL/g 对蕨

麻多糖提取率的影响;液料比固定为 20:1 mL/g,分别在 50、60、70、80 和 90 ℃ 的恒温水浴锅中浸提 3 h,以考察提取温度对蕨麻多糖提取率的影响;在温度 80 ℃,液料比为 20:1 mL/g 的条件下,比较浸提时间 1、2、3、4、5 h 对蕨麻多糖提取率的影响;在温度 80 ℃,液料比为 20:1 mL/g 下,对物料分别进行提取,每次提取 1 h,考察提取次数对蕨麻多糖提取率的影响。

2.4 响应面实验设计

根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,综合单因素实验的结果,选取对蕨麻多糖提取率有较明显影响的 3 个因素(液料比、提取时间和温度)进行对比试验。在单因素实验的基础上,在单因素试验的基础上采用三因素三水平的响应面分析方法,试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平编码表

Table 1 Experimental design and variables levels for response surface analysis

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 液料比 Liquid-solid ratio(mL/g)	15	20	25
B 提取时间 Extraction time(h)	3	4	5
C 提取温度 Extraction temperature(℃)	70	80	90

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

以葡萄糖浓度(μg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标,得到多糖浓度 C 和吸光度 OD 值的线性回归曲线,其回归方程为: $Y = 0.0107X + 0.0250$ 。相关系数 $R^2 = 0.9932$, R^2 接近 1 说明趋势线的估计值与对应的实际数据之间的拟合程度高。

3.2 单因素实验结果

3.2.1 液料比对蕨麻多糖提取率的影响

结果见图 1 (A),蕨麻多糖的提取率开始时随着液料比的增加而增加,可是在 20:1 mL/g 时达到最高点,随后随着液料比的继续增加,蕨麻多糖的提取率有所下降。一般来说,液料比越大,即溶剂用量越大提取物质的得率越大,但当溶剂用量达到一定值后,已基本将多糖提取完全,此时继续增加溶剂量,不仅会造成单位提取液中多糖浓度的降低,而且

浪费能源,也给后续的浓缩工作带来困难,故 20: 1

mL/g 为最佳液料比。

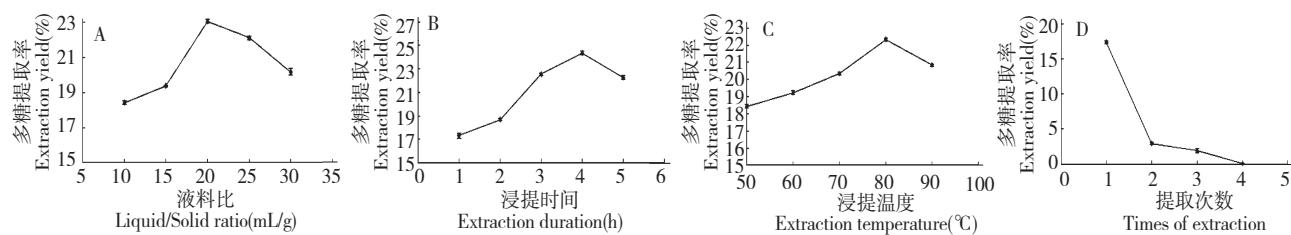


图 1 料液比(A)、浸提时间(B)、浸提温度(C)及提取次数(D)对蕨麻多糖提取率的影响

Fig. 1 Effects of liquid-solid ratio (A), extraction duration (B), extraction temperature (C) and times of extraction (D) on the extraction yield of *P. anserine* polysaccharide

3.2.2 浸提时间对蕨麻多糖提取率的影响

结果见图 1(B), 蕨麻多糖的提取率随着浸提时间的延长而增加, 当时间到达 4 h 后, 随着提取时间的延长蕨麻多糖的提取率有所下降。这可能是在经过长时间的水浴浸提后, 水溶性多糖的结构遭到了某些破坏^[10], 由此可以确定浸提时间为 4 h 左右为宜。

3.2.3 浸提温度对蕨麻多糖提取率的影响

结果见图 1(C), 随着浸提温度的增加蕨麻多糖的提取率随之增加, 浸提温度到达 80 ℃ 是提取率最高, 随后提取率随着温度的增加而有显著的降低, 造成这一现象的原因可能是过高的温度使得蕨麻多糖的结构性能有所影响^[11], 同时过高的温度会使蕨麻多糖降解。因此浸提温度为 80 ℃ 为宜。

3.2.4 提取次数对蕨麻多糖提取率的影响

结果见图 1(D), 蕨麻多糖的提取率随提取次数的增加而逐渐降低, 提取次数为 4 时蕨麻多糖的提取率几乎为零。所以从节省资源、降低能耗、成本等角度来考虑提取次数在 2 次为宜^[12]。

3.3 响应面法优化实验

3.3.1 响应面试验结果

根据 Box-Behnken 设计进行了 17 组实验, 其中 5 组中心点重复, 结果见表 2。利用 Design Expert 8.0 软件对表 2 实验数据进行多元回归拟合, 所得的回归方程为:

$$Y = 24.22 + 0.43A + 0.45B + 0.90C - 0.82AB + 0.35AC + 0.75BC - 1.87A^2 - 0.74B^2 - 3.17C^2$$

表 2 实验设计及其实验结果

Table 2 Box-Behnken design matrix and the experimental result

试验序号 No.	A	B	C	提取率 Extraction yield(%)
1	-1	-1	0	19.22 ± 0.09
2	-1	0	1	19.57 ± 0.22
3	-1	0	-1	18.37 ± 0.25
4	-1	1	0	22.71 ± 0.12
5	1	1	0	22.37 ± 0.14
6	1	0	-1	18.10 ± 0.13
7	1	-1	0	22.16 ± 0.23
8	1	0	1	20.69 ± 0.34
9	0	-1	-1	20.22 ± 0.17
10	0	-1	1	20.43 ± 0.14
11	0	1	-1	18.68 ± 0.15
12	0	1	1	21.90 ± 0.21
13	0	0	0	24.17 ± 0.12
14	0	0	0	24.32 ± 0.10

15	0	0	0	24.63 ± 0.24
16	0	0	0	23.54 ± 0.08
17	0	0	0	24.45 ± 0.05

对回归模型进行方差分析,结果见表3。从表3可以知道,模型 $F = 21.50$, $P = 0.0003$ ($P < 0.01$),本次实验模型是极显著的,这说明该实验模型是可用预测蕨麻多糖的提取工艺^[13];失拟项为 $P = 0.1008$ ($P > 0.05$),因此失拟项不显著。决定系数

$R^2 = 96.51\%$,模型校正系数 $R_{Adj}^2 = 92.02\%$,表明响应值与预测值之间的拟合程度良好,实验所存在的误差较小,这进一步表明了该模型可以较好的反应各变量与响应值之间的关系,因此该模型可以用来预测蕨麻多糖提取率^[14,15]。

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源 Sources of variance	自由度 Degrees of freedom	平方和 Sum of squares	均方 The mean square	F 值 F	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	9	79.36	8.82	21.50	0.0003	**
残差 Residual	7	2.87	0.41			
失拟项 Loss of quasi item	3	2.18	0.73	4.17	0.1008	
误差项 Error term	4	0.70	0.17			
总和 Sum	16	82.23				

$$R^2 = 0.9651, R_{Adj}^2 = 0.9202, R_{Pred}^2 = 0.5635, R_{Adeq}^2 = 12.267, C. V. \% = 2.98$$

回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性,由 F 检验来判断,概率 P 的值越小,相应的变量显著程度就越高。从表4可知,用上述回归方程描述各因素中一次项 C 是极显著的,其次是二次项 AB、B² 是显著,A²、C² 是极显著,各因素对蕨麻多糖提取率影响是 C > B > A (A、B、C 分别为液料比、浸

提时间以及浸提温度),既提取温度对蕨麻多糖提取率影响最大,其次是提取时间,最后是液料比。交互项 AB 极显著,表明提取时间和液料比之间存在极显著的交互作用,因此每个实验因素对响应值的影响呈现的不是线性关系^[16]。

表4 回归方程系数显著性分析

Table 4 Analysis of the significant coefficients of regression equation

方差来源 Sources of variance	自由度 Degrees of freedom	平方和 Sum of squares	均方 The mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
A	1	1.49	1.49	3.63	0.0986	
B	1	1.65	1.65	4.02	0.0851	
C	1	6.52	6.52	15.88	0.0053	**
AB	1	2.69	2.69	6.56	0.0375	*
AC	1	0.48	0.48	1.18	0.3138	
BC	1	2.27	2.27	5.52	0.0511	
A ²	1	14.66	14.66	35.74	0.0006	**
B ²	1	2.31	2.31	5.64	0.0493	*
C ²	1	42.40	42.40	103.37	<0.0001	**

注: * 显著 ($P < 0.05$), ** 极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * Significant ($P < 0.05$), ** Extremely significant ($P < 0.01$)。

3.3.2 响应面及等高线的分析

图2是回归模型的响应面图,从图上我们可以

直观的看出各因素交互效应的显著程度,越趋向于圆形表明两个因素之间的交互效应不显著,反之,越

趋向椭圆表明交互效应显著。从图 2 可以看出:影响因素 C(浸提温度)对蕨麻多糖提取率的影响最为显著,因为其 3D 曲线是三因素中最为陡峭的,其次是因素 B(浸提时间),最后是因素 C(液料比)^[17-19]。

图 2(A)是液料比 A 与浸提时间 B 及其交互效

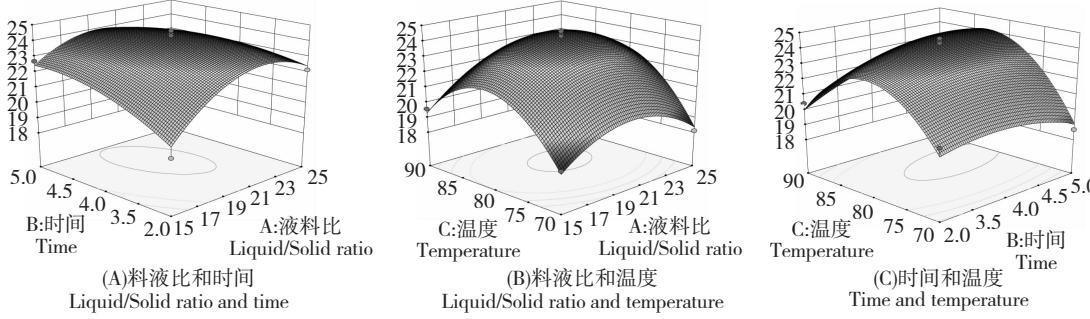


图 2 两因素交互作用对提取率的响应面图

Fig. 2 Response surface plots showing the effect of different extraction conditions on the extraction yield of polysaccharide

图 2(B)是液料比 A 与浸提温度 C 之间交互作用对蕨麻多糖提取率影响的响应面图。其等高线趋向于圆形,这表明液料比与浸提温度之间的交互作用对蕨麻多糖提取率的影响不明显。浸提温度对蕨麻多糖提取率的影响要远大于液料比对蕨麻多糖提取率的影响,过高的浸提温度同样会使蕨麻多糖提取率下降。

图 2(C)是浸提时间 B 和浸提温度 C 之间的交互效应对蕨麻多糖提取率影响的响应面图。从图中可以看出当浸提时间一定时,随着温度的升高,提取率是先增加后减少的,其变化的趋势较为陡峭;当浸提温度一定时,虽然多糖提取率也是随着浸提时间的延长而先增加后减少的但是其变化的趋势较为平缓。这说明在一定的液料比时,浸提温度对蕨麻多糖提取率的影响比浸提时间的影响明显,而这两个因素的交互作用不明显^[20]。

3.3.3 验证试验

结合实际操作得最佳提取工艺条件是:液料比 20.3:1 mL/g, 浸提时间 4.4 h, 浸提温度 82 °C。在上述工艺条件下进行实验验证,重复三次得到的蕨麻多糖提取率分别为:24.35%、24.38%、24.87%, 平均提取率为 24.53% ± 0.24%。蕨麻多糖提取率实验值 (24.53% ± 0.24%) 与模型的预测值 (24.40%) 比较相差不大,这一结果说明该模型可以较好地预测蕨麻多糖的提取率。

应对蕨麻多糖提取率影响的响应面图。从图可以看出,其等高线呈现椭圆状,表明因素 A 与因素 B 的交互效应是较为显著的。随着料液比和浸提时间的增加多糖提取率也逐步增加,但是当液料比与浸提时间达到一定值时,多糖提取率会随着料液比与浸提时间的继续增加而有所下降。

4 结论

本研究在单因素实验的基础上通过三因素上水平响应面法实验,建立了蕨麻多糖的提取率既响应值与各个因素之间的数学模型。利用 Design-Expert 软件进行回归拟合后,所得的回归方程为: $Y = 24.22 + 0.43A + 0.45B + 0.90C - 0.82AB + 0.35AC + 0.75BC - 1.87A^2 - 0.74B^2 - 3.17C^2$ 。

方差分析表明,该模型能较好的反映对各因素(液料比、浸提时间、浸提温度)和蕨麻多糖的提取率之间的关系。液料比和浸提时间对蕨麻多糖的提取率影响是不显著的 ($P > 0.05$), 浸提温度以及液料比、浸提温度、浸提时间这三个因素的二次方对响应值的影响是显著的,液料比和浸提时间之间的交互效应显著 ($P < 0.05$)。

在分析各因素的显著性及其相互间的交互效应的基础上,得到了蕨麻多糖的最佳提取条件为:液料比 20.3:1 mL/g, 浸提时间 4.4 h, 浸提温度 82 °C, 在此工艺条件下,蕨麻多糖的提取率能达到 24.40%,而经过实际试验得到的多糖提取率为 24.53 ± 0.24%,预测值与实际值两者间相差较小。因此可以证明,采用响应面分析法可以有效的对蕨麻多糖的提取工艺进行优化,具有较好的实用价值。

参考文献

- et al. Determination and analysis of nutritional components of *Potentilla anserine*. *J Tradit Chin Veterin Med* (中兽医医学杂志), 2007, 3:43-44.
- 2 Bai SJ (白术杰), Wu LL (吴莉莉), Zhao CX (赵春霞), et al. The research progress of the medicine value of *Potentilla anserina* L. *China Healtheare Innov* (中国医疗前沿), 2007, 2 (14):34-36.
- 3 Shuai XH, Hu TJ, Zhang X, et al. Inhibitory action of *Potentilla anserine* polysaccharide fraction on H₂O₂-induced apoptosis of murine splenic lymphocytes. *Acta Pharm Sin*, 2010, 44:987-993.
- 4 Wang JL, Zhang J, Wang XF, et al. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method; Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydr Polym*, 2009, 80: 84-93.
- 5 Yang B, Zhao J, Wang X, et al. Optimization of tyrosinase inhibition activity of ultrasonic-extracted polysaccharides from longan fruit per carp. *Food Chem*, 2008, 110:294-300.
- 6 Zhang ZZ (张泽志), Han CL (韩春亮), Li CM (李成未). Application of response surface method in experimental design and optimization. *J Henan Insti Edu, Nat Sci* (河南教育学院学报, 自科报), 2011, 20(4):34-37.
- 7 Hao BH (郝慧博). The extraction and purification of polysaccharides from *Potentilla anserina* L. and the monosaccharide constitute of polysaccharides. Harbin: Harbin Institute of Technology (哈尔滨工业大学), MSc. 2010.
- 8 Wu YQ (吴依茜). Studies on the extraction technology, anti-radiation and anti-oxidation activity of *Potentilla anserina* polysaccharide. Lanzhou: Northwest Normal University (西北师范大学), MSc. 2008.
- 9 Li YP, Duan Q, Liang YS. Study of determination methods of polysaccharide content in *Poria cocos*. *Med Plant*, 2014, 4 (4):39-41.
- 10 Wu H (吴晖), Lai FR (赖富饶), Hu XB (胡筱波). Optimization of the extraction technology of water-soluble polysaccharides form rape pollen by responsive surfaces analysis. *Food Machine* (食品与机械), 2007, 23(5):66-73.
- 11 Ying Z (应芝), Li JR (励建荣), Han XX (韩晓祥). Optimization of the extraction technique of Morus polysaccharide via response surface analysis. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2008, 8(4):39-45.
- 12 Wang YY (王艳艳), Wang TJ (王团结), Ding LL (丁琳琳). Optimization of polysaccharide extraction from *Angelica sinensis* using response surface methodology. *Food Sci* (食品科学), 2012, 33:146-149.
- 13 Wei ZY (魏桢元), Zhong YG (钟耀广), Liu CZ (刘长江). Optimization of extraction of lentinan by response surface methodology. *Liaoning Agric Sci* (辽宁农业科学), 2010, 3(2):11-14.
- 14 Fang J (房健), Xing XP (邢晓平), Chen HX (陈洪兴), et al. Optimization of hot water extraction of polysaccharide from Rhizoma Phragmitis by response surface analysis. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2010, 38:15552-15554.
- 15 Liu HJ (刘军海), Huang BX (黄宝旭), Jiang DC (蒋德超). Optimization of extraction technique of polysaccharides from Argy Wormwood leaves via response surface methodology (RSM). *Food Sci* (食品科学), 2009, 30:114-118.
- 16 Zhong K (钟葵), Wang Q (王强). Optimization of hot-water extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Chem Ind Eng Prog* (化工进展), 2010, 29:739-744.
- 17 Luo L (罗玲), Zhou BX (周斌星), Guo W (郭威), et al. Research on the extraction technology of Pu-erh tea polysaccharide by response surface analysis. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2012, 28:263-266.
- 18 Zhao P (赵鹏), Li WH (李稳宏), Li ZH (李骤海), et al. Optimization of ultrasonic extraction for polysaccharides from *Lonicera japonica*. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30: 151-154.
- 19 Yang WG (杨文鸽), Xie GH (谢果凰), Yan WH (颜伟华), et al. Optimization of wet-salting technology for *Muraenesox Cinereus* using response surface analysis. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2010, 10:133-139.
- 20 He YF (何燕斐), Han XX (韩晓祥), Zhou LX (周凌霄), et al. Optimization of process variables in the synthesis of octyl acetate by response surface methodology. *Hans J Chem Eng Technol* (化学工程与技术), 2012, 2:29-36.