

响应面法优化杜香多糖提取工艺

张乔会, 逢锦慧, 杨 喆, 王建中*

北京林业大学 北京林业大学林业食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083

摘要: 杜香是中国东北广泛分布的一种蕴藏量大的植物资源, 学者对其成分做了很多的研究, 但对杜香多糖的研究极少, 本文以杜香为原料, 采取水提醇沉法提取多糖, 在单因素实验基础上选取实验因素与水平, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理采用四因素三水平的响应面分析法, 得到优化提取工艺为: 提取温度为 80 °C, 提取时间为 6 h, 料液比为 1:35 (m/v), 物料粒度为 80 目, 在此条件下, 多糖提取得率可达 4.19%。利用红外和紫外分析, 提取物含多糖典型基团, 粗提物中多糖含量为 92.6%。

关键词: 杜香; 响应面; 多糖; 提取

中图分类号: TS241

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.06.030

Optimization of Extraction Conditions of Polysaccharide from *Ledum palustre* L. Using Response Surface Analysis

ZHANG Qiao-hui, PANG Jin-hui, YANG Zhe, WANG Jian-zhong*

Beijing Key Laboratory of Forest Food Processing and Safety, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: *Ledum palustre* L., is a kind of source plant widely distributed in the northeast of China. In this study, water-soluble polysaccharide extracted from *L. palustre* with high extraction yield was successfully studied by the method of water extraction and ethanol deposition. To improve the extraction yield of the *Ledum* polysaccharides, a Box-Behnken design was employed based on four factor experiments. The four independent variables, namely extraction temperature, particle size, solid-liquid ratio and extraction time on extraction yield of polysaccharides were evaluated by response surface methodology (RSM). The results showed that the optimum conditions for extracting *Ledum* polysaccharide were as follows: extraction temperature 80 °C, particle size of *Ledum* 0.178 mm, solid-liquid ratio 1:35, and extraction time 6h. Under the optimal conditions, the extraction yield achieved 4.19%. Furthermore, FT-IR and UV analyses showed that *L. palustre* extract contained typical group of polysaccharide, the content of polysaccharide in the crude extract of *L. palustre* was determined to be 92.6%.

Key words: *Ledum*; response surface methodology; polysaccharide; extraction.

杜香 (*Ledum palustre* L.) 为杜鹃花科杜香属的常绿灌木^[1], 是我国东北、内蒙古大兴安岭林区的主要森林组成树种, 其分布面积约占大兴安岭林地面积的 70%^[2]。大兴安岭杜香干叶年生产量达 536925 t/a, 小兴安岭杜香的蕴藏量可达 8776.7 t/hm² · a, 其中允收量以鲜重计为 1843.2 t/hm² · a^[3]。杜香枝叶含有多种挥发性成分^[4]、黄酮类成分、香豆素类成分等。具有抗菌消炎、透皮吸收、驱虫、抗辐射等作用^[5-7]。可以制作驱虫剂、保健品、日用品^[8]、药品等, 在食品、保健品、化妆品及医药等

领域具有广泛的应用前景。

杜香多糖的提取目前鲜见报道, 但作为天然的植物多糖, 具有广谱化学结构和生物功能。多糖的提取可采用水提取法、中性盐溶液提取法、碱提取法、蛋白酶水解提取法等^[9]。其中水作溶剂是提取植物中多糖的常用方法。植物源多糖常具有提高人体免疫力、抗肿瘤、降血糖、抗凝血、抗炎等生理活性^[10-12], 还有抑制脂类氧化、稳定蛋白等作用^[13,14]。本文以杜香为原料采用水提醇沉法提取多糖, 利用红外和紫外光谱分析多糖特征基团及含量, 并用响应面法对提取工艺进行优化, 得到最佳提取工艺。

1 材料与方法

收稿日期: 2014-03-24 接受日期: 2014-07-03

基金项目: 林业公益性行业科研专项 (201004081)

* 通讯作者 E-mail: w62338221@163.com

1.1 主要仪器

HHS4-型恒温水浴锅:上海浦东跃新科学仪器厂;KQ-500E型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;QI-901涡旋混合器:海门市其林贝尔仪器制造有限公司;台式离心机:上海安亭科学仪器厂;RE-5203旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;METTLER TOLEDO-电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;冷冻干燥机FD-1:北京德天佑科技发展有限公司;T6紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;Tensor27型FT-IR红外光谱仪:德国Bruker公司。

1.2 试剂及材料

无水乙醇、去离子水、石油醚、浓硫酸、蒽酮、葡萄糖等,所有试剂均为分析纯。杜香(由内蒙古金河林业局2013年7月中旬采集提供,由北京林业大学植物专家鉴定为杜香)。

1.3 试验方法

1.3.1 试样的制备

将杜香枝叶切分成2~3 cm的小段后于40℃烘箱中烘干,然后用粉碎机粉碎,过20、40、60、80、100目筛,存于室内阴凉干燥处备用。

1.3.2 杜香多糖提取工艺

采用水提醇沉法。准确称取一定量的杜香枝叶粉,按一定比例加入去离子水,放入恒温水浴震荡箱中震荡一定时间,离心分离液体和固体粉末,向上清液中加入酒精至浓度为85%,放置于4℃冰箱中静置1 h,分离固液两相,固体为粗多糖。将上一步得到的样品加入一定量的石油醚处理一定时间进行脱脂,接着将上一步得到的固相溶解于一定量的去离子水中,加入酒精至浓度为85%,放置于4℃冰箱中静置1 h,然后分离固液两相,重复上述操作4次,冷冻干燥,便可得到杜香多糖成品。

1.3.3 杜香多糖定性检测

在4000~400 cm⁻¹波长范围内对水提醇沉得到的杜香多糖进行红外检测,测定分辨率为2 cm⁻¹。

1.3.4 得率计算

按以下公式计算提取得率:

$$P = m/W \times 100\%$$

式中P-得率;m-提取得到的杜香多糖的干重;W-杜香枝叶粉末的重量。

1.3.5 粗提物中多糖含量测定

杜香多糖粗提物多糖含量的测定采用蒽酮硫酸法,并以葡萄糖为参照作标准曲线。

1.3.5.1 标准曲线测定

精密称取105℃下干燥恒重的分析纯葡萄糖0.05 g,置于小烧杯中,加去离子水溶解并转移至1000 mL容量瓶中,摇匀,配制成浓度为0.05 mg/mL葡萄糖标准溶液。准确移取浓度为0.05 mg/mL葡萄糖标准溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL于10 mL比色管中,加蒸馏水补足至1 mL。在冰水浴中加入0.1%蒽酮硫酸溶液4 mL,摇匀。置于沸水浴中加热15 min后取出,自来水冷却至室温并放置10 min,以蒸馏水代替样液作空白,在最580 nm处读取吸光度。以葡萄糖含量为纵坐标、吸光度为横坐标绘制标准曲线。

1.3.5.2 杜香多糖含量的测定

准确称取提取的杜香多糖0.03 g,置于100 mL容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成0.3 mg/mL的杜香多糖贮备液。将杜香多糖贮备液稀释10倍后,取1 mL按1.3.5.1方法测定杜香多糖贮备液的吸光度,根据标准曲线方程求出此杜香多糖贮备液中含量,从而计算出杜香多糖粗提物中多糖的含量。

1.3.6 杜香多糖提取的单因素试验设计

分别以不同的提取温度、时间、物料粒度及液料比为单因素,考察各因素对杜香多糖提取得率的影响。

1.3.6.1 物料粒度

设定料液比1:20,提取温度60℃,提取时间2 h,考察物料粒度分别为20、40、60、80、100目时对多糖提取得率的影响。

1.3.6.2 料液比

设定物料粒度40目,提取温度60℃,提取时间2 h,考察料液比分别为1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35(m/v)时对多糖提取得率的影响。

1.3.6.3 提取时间

设定物料粒度40目,料液比1:20,提取温度60℃,考察提取时间分别为1、2、3、4、5 h时对多糖提取得率的影响。

1.3.6.4 提取温度

设定物料粒度40目,料液比1:20,提取时间2 h,考察提取温度分别为20、40、60、80、100℃时对多糖提取得率的影响。

1.3.7 杜香多糖提取工艺的试验设计

在单因素试验的基础上,运用Design expert 7.1软件程序,根据Box-Behnken中心组合实验设计原

理^[5,15],采用四因素三水平的响应面分析法,以提取温度(A)、提取时间(B)、料液比(C)、物料粒度(D)为自变量,以杜香多糖的提取率为响应值,通过响应

曲面分析(response surface analysis, RSA)对提取条件进行优化。

表1 响应面试验因素水平设计表

Table 1 Analytical factors and levels for RSA

水平 Levels	因素 Factors			
	A 温度 Temperature(°C)	B 时间 Time(h)	C 料液比 Solid: liquid ratio(m/v)	D 物料粒度 Size of material(目)
-1	60	3	1: 25	40
0	80	4	1: 30	60
1	100	5	1: 35	80

2 结果与分析

2.1 杜香多糖红外检测结果

杜香多糖红外谱图在 3389、1156-1024、1024、2889 cm^{-1} 的尖峰以及 1567 ~ 1370、1648、1648、903 cm^{-1} 等处具有强弱不同的吸收峰。在 3389 cm^{-1} 和 1156 ~ 1024 cm^{-1} 的峰分别为 O-H 和 C-O 的伸缩振动,1024 cm^{-1} 的较强吸收也说明了杜香多糖中可能有葡萄糖结构,2889 cm^{-1} 的尖峰以及 1567 ~ 1370 cm^{-1} 的不太尖的峰分别为 C-H 的伸缩振动和变角振动,1648 cm^{-1} 处出现吸收峰,推测该峰为醛基中 C = O 的伸缩振动引起的,谱图在 1648 cm^{-1} 波数处还出现一个较强的吸收峰,说明杜香多糖中可能有酰氨取代基,谱图在 903 cm^{-1} 波数处还出现吸收峰,说明杜香多糖可能含有 β -型糖苷键。总之,杜香水提醇沉物具有多糖的一般吸收峰,证明杜香水提醇沉物为杜香多糖。

2.2 杜香多糖粗提物中多糖含量测定结果

在葡萄糖含量为 0.000 ~ 0.100 mg/mL 的范围内,葡萄糖含量与吸光度线性关系良好。经线性回

归,标准曲线方程为 $y = 9.790x - 0.002$,回归系数 $R^2 = 0.9955$ 。测得杜香粗提物的吸光值为 0.272,从而计算出杜香多糖粗提物中多糖的含量为 92.6%。

2.3 杜香多糖提取单因素实验结果

从图 1-A 可以看出,在提取时间、提取温度、料液比一定的时候,材料粒度的大小对杜香多糖的提取得率的影响呈正相关。物料越细,提取得率越大,且随着物料目数的增大,杜香多糖的提取得率以稳定的趋势上升。但由于将物料粉碎过细会影响下一步分离,且能耗大不环保,故只考虑至 100 目。

从图 1-B 看出,料液比从 1:10 增加到 1:20 时,杜香多糖提取得率稳步上升,可能是因为随着料液比增大,目的提取物会更易溶于提取溶剂中;料液比在 1:20 至 1:30 之间时,提取得率增加变缓,可能是因为一定比例的溶剂已经将有效成分大部分溶出;料液比在 1:30 至 1:35 之间时,提取得率受到的影响不大,可能是由于足够的溶剂已经将多糖全部溶解,再加大料液比会使杂质更多溶出,从而造成多糖提取得率下降。因此选择 1:30 作为优选料液比。

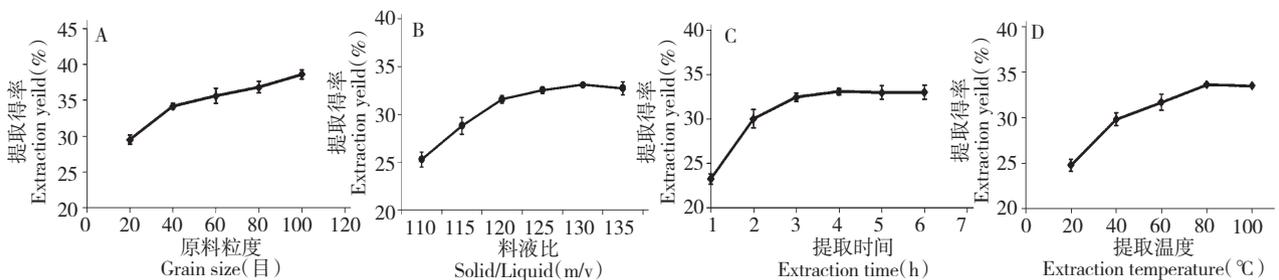


图1 物料粒度(A)、料液比(B)、时间(C)、温度(D)对杜香多糖提取得率的影响

Fig. 1 Effects of particle size of Ledum (A), solid:liquid ratio (B), time (C), temperature (D) on extraction yield of Ledum polysaccharide

从图 1-C 可以看出,提取时长 4 h 以内,随着提取时间的增加,杜香多糖的提取得率逐渐增大,但提取 2 h 后提取得率增加逐渐减缓。提取 4 h 后,提取得率随时间基本没有变化,可能是物料中能溶解的多糖已经基本溶出。因此确定优选提取时间为 4 h。

从图 1-D 可以看出,温度的高低对杜香多糖的提取有较大的影响。随着温度的升高,提取得率增大,当温度达到 80 ℃ 时提取得率最大,之后提取得

率随温度的增加基本没有变化。所以确定优选提取温度为 80 ℃。

2.4 响应面模型的建立及结果

2.4.1 响应面模型回归分析

以 A(提取温度)、B(提取时间)、C(料液比)、D(物料粒度)为变量,以杜香多糖的提取得率为响应值,按响应面软件 Design expert 7.1 提供设计的组合进行试验,得到结果见表 2。

表 2 响应面分析的试验结果

Table 2 Program and experimental results of RSA

试验序号 No.	A	B	C	D	提取得率 Extraction yield(%)
1	1	0	-1	0	0.3573
2	1	0	1	0	0.3651
3	0	1	0	-1	0.1937
4	-1	1	0	0	0.3707
5	0	0	0	0	0.3811
6	-1	0	1	0	0.3803
7	0	0	1	-1	0.1870
8	-1	-1	0	0	0.3502
9	-1	0	-1	0	0.3519
10	0	-1	1	0	0.3664
11	0	-1	0	1	0.3724
12	-1	0	0	-1	0.1722
13	1	1	0	0	0.3718
14	1	-1	0	0	0.3515
15	0	-1	-1	0	0.3698
16	0	0	0	0	0.3824
17	0	0	-1	1	0.3921
18	0	-1	0	-1	0.1875
19	1	0	0	1	0.3798
20	-1	0	0	1	0.3514
21	0	0	0	0	0.3735
22	0	0	-1	-1	0.1835
23	0	1	-1	0	0.3717
24	0	1	1	0	0.3815
25	0	0	1	1	0.3978
26	0	1	0	1	0.4102
27	1	0	0	-1	0.1743

采用 Design expert 7.1 软件程序对试验数据进行回归分析,得出杜香多糖提取得率的回归方程如

下: $Y = 0.38 + 1.925E-003 \times A + 8.483E-003 \times B + 4.317E-003 \times C + 0.10 \times D - 5.000E-005 \times AB -$

$$5.150E-003 \times AC + 6.575E-003 \times AD + 3.300E-003 \times BC + 7.900E-003 \times BD + 5.500E-004 \times CD - 0.017 \times A^2 - 1.912E-003 \times B^2 - 1.038E-003 \times C^2 - 0.089 \times D^2$$

其决定系数 $R^2 = 0.9952$, 说明回归方程适用于提取杜香多糖的理论预测值。对回归方程做显著性检验与方差分析, 结果见表 3。

表 3 二次响应面回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model analysis of variance table

方差来源 Variance source	平方和 Sum of Squares	自由度 DF Degree of freedom	均方 Mean Square	F 值 F Value	Prob > F p-value	显著性 Significance
模型	1.723×10^{-1}	14	1.230×10^{-6}	178.01	< 0.0001	* *
A-提取温度	4.447×10^{-5}	1	4.447×10^{-5}	0.64	0.4385	
B-提取时间	8.636×10^{-4}	1	8.636×10^{-4}	12.47	0.0041	* *
C-提取液料比	2.236×10^{-4}	1	2.236×10^{-4}	3.23	0.0975	
D-物料粒度	1.210×10^{-1}	1	1.210×10^{-1}	1749.31	< 0.0001	* *
AB	1.000×10^{-8}	1	1.000×10^{-8}	0	0.9906	
AC	1.061×10^{-4}	1	1.061×10^{-4}	1.53	0.2394	
AD	1.729×10^{-4}	1	1.729×10^{-4}	2.50	0.1400	
BC	4.356×10^{-5}	1	4.356×10^{-5}	0.63	0.4430	
BD	2.496×10^{-4}	1	2.496×10^{-4}	3.61	0.0819	
CD	1.210×10^{-6}	1	1.210×10^{-6}	0.02	0.8970	
A ²	1.500×10^{-3}	1	1.500×10^{-3}	22.33	0.0005	* *
B ²	1.951×10^{-5}	1	1.951×10^{-5}	0.28	0.6052	
C ²	5.741×10^{-6}	1	5.741×10^{-6}	0.08	0.7783	
D ²	4.210×10^{-2}	1	4.210×10^{-2}	608.17	< 0.0001	* *
Residual	8.307×10^{-4}	12	6.923×10^{-5}			
Lack of Fit	7.845×10^{-4}	10	7.845×10^{-4}	3.39	0.2489	
Pure Error	4.622×10^{-5}	2	2.311×10^{-5}			
Cor Total	1.734×10^{-1}	26				

注: * 代表 5% 显著水平, ** 代表 1% 显著水平。

Note: * Significant at $P < 0.05$ level, ** Significant at $P < 0.01$ level.

2.4.2 响应面与等高线

根据回归方程, 作出响应面和等高线图, 考察拟合响应曲面的形状, 分提取温度、提取时间、料液比和物料粒度对杜香多糖提取得率的影响, 如图 2 ~ 7 所示。等高线的形状可以反映出交互作用的强弱, 椭圆形表示两因素交互作用显著, 而圆形则与之相

反^[16]。由二次响应面回归模型方差分析可知, 物料粒度对杜香多糖提取得率的影响最大, 提取温度、料液比、提取时间的影响相对小一些, 具体为: 物料粒度(D) > 提取温度(A) > 液料比(B) > 提取时间(C)。即达到一定的料液比和提取时间后, 料液比和提取时间对提取得率的影响十分微小。

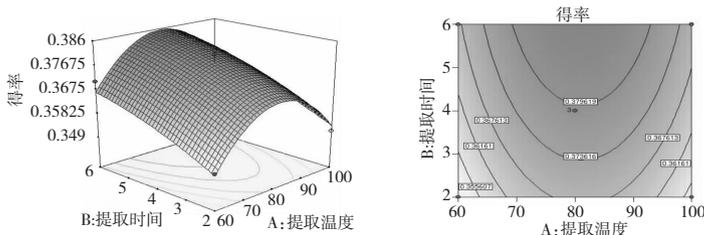


图 2 $Y = f(A, B)$ 的响应面与等高线

Fig. 2 Response surface plot and contour plot of $Y = f(A, B)$

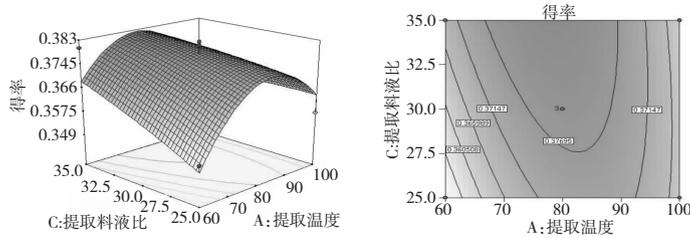


图3 $Y = f(A, C)$ 的响应面与等高线

Fig. 3 Response surface plot and contour plot of $Y = f(A, C)$

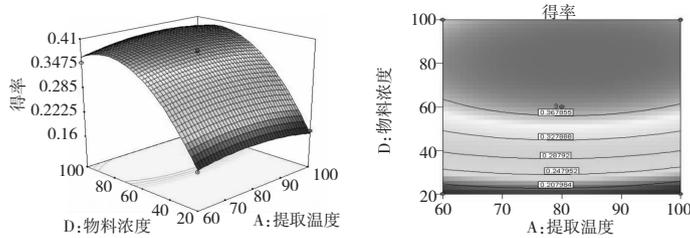


图4 $Y = f(A, D)$ 的响应面与等高线

Fig. 5 Response surface plot and contour plot of $Y = f(A, D)$

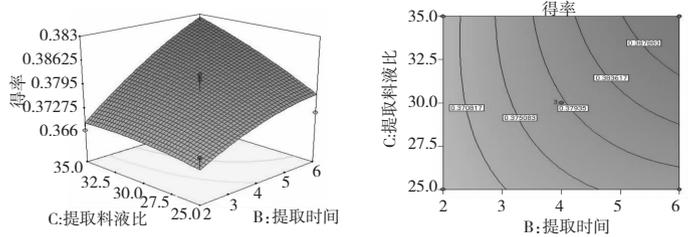


图5 $Y = f(B, C)$ 的响应面与等高线

Fig. 5 Response surface plot and contour plot of $Y = f(B, C)$

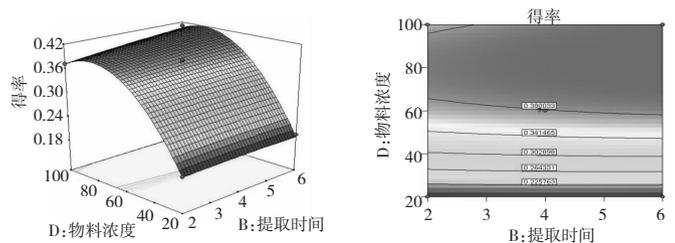


图6 $Y = f(B, D)$ 的响应面与等高线

Fig. 6 Response surface plot and contour plot of $Y = f(B, D)$

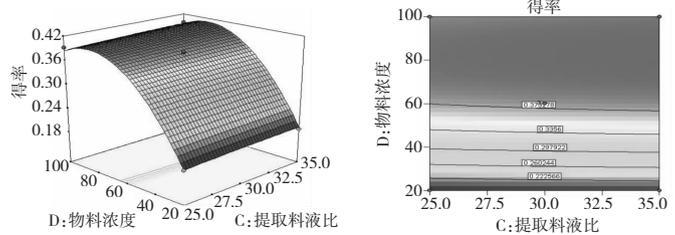


图7 $Y = f(C, D)$ 的响应面与等高线

Fig. 7 Response surface plot and contour plot of $Y = f(C, D)$

2.4.3 优化提取工艺条件的确定

为进一步确定最佳点,利用 Design expert7.1 软件程序对工艺条件进行优化,可得杜香多糖提取得率的最佳方案为:提取温度为 80.43 ℃,提取时间为 6 h,液料比为 35:1 (mL/g),物料粒度为 84.55 目。在此工艺条件下,软件程序对杜香多糖提取得率的预测值为 4.26%。为了实际的操作方便,将杜香多糖的提取工艺参数修正为:提取温度为 80 ℃,提取时间为 6 h,料液比为 1:35 (m/v),物料粒度为 80 目,在此条件下实际测得的平均提取得率为 4.19%,与理论预测值相比相对误差约为 1.64%。因此采用修正后的方法得到的提取参数准确可靠,具有实用价值。

3 结论

以杜香枝叶粉末为原料,以水为溶剂提取杜香多糖,主要受物料粒度和提取温度的影响。提取时间和料液比达到一定程度后对提取得率的影响不大。利用响应面法对杜香多糖的提取工艺进行了优化。得到的水提杜香多糖的优化工艺条件为提取温度为 80 ℃,提取时间为 6 h,料液比为 1:35 (m/v),物料粒度为 80 目,在此条件下杜香多糖的提取得率可达 4.19%。

参考文献

- China Flora Editorial Board of CAS(中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China(中国植物志), Beijing: Scientific Publishing House, 2005.
- Feng X(冯旭), Zhou Y(周勇), Guo LX(郭立新). Wild perfume plant resources and its utilization in Heilongjiang. *Terri Nat Res*(国土与自然资源研究), 1995, 2:68-72.
- Zhou LL(周以良). The Vegetation of Chinese Greater Khingan Range(中国大兴安岭植被), Beijing: Scientific Publishing House, 1991. 239.
- Wang Y(王炎), Zhao M(赵敏). Study on volatile components of *Ledum palustre* L from Greater Khingan Range area. *Chin J Chromatogr*(色谱), 2003, 6:631-632.
- Fu HT(付海田), Deng C(邓超), Wang M(王敏), et al. Extraction, structural identification and bioactivities of polysaccharide from fermented *Cordyceps*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:111-116.
- Yan XZ(严宣佐), Zhou Y(周勇), Tao JD(陶君铨). Experimental study on the development and utilization of *Ledum*- Experimental study on anti fungus and bacteria by *Ledum* oil. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 1993, 1:7-9.
- Xiao HQ(肖怀秋), Li YZ(李玉珍). Extraction and antioxidation of polysaccharides from *Lygodium japonicum*(Thumb) Sw. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:105-109.
- Liu QH(刘庆华), Fan HY(范慧颖). Preparation and application of compound *Ledum* anti-inflammatory Lotion. *J Sci Teachers Coll Univ*(高师理科学刊), 2007, 6:53-56.
- Shi L(史霖), Gong CR(宫长荣), Wu LL(毋丽丽), et al. The development of extraction, isolation and application of plants polysaccharides. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 2007, 9:192-195.
- Zhang YH(张英慧), Qu AQ(曲爱琴), Song JQ(宋剑秋), et al. Effect of fucoidan-galactosan sulfate from *Laminaria japonica* on the cytotoxicity of murine peritoneal macrophages. *Immunol J*(免疫学杂志), 2002, 5:403-404.
- Xu GH(徐国华), Han ZH(韩志红), Wu YF(吴永方), et al. Inhibitory effect of pumpkin polysaccharide and its effect on immune function of red blood cell. *J Wuhan Pro Med Coll*(武汉市职工医学院学报), 2000, 4:8-11
- Haysahi T, Haysahi K. Calcium Spirulina, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green algae *Spirulina*. *Nat Prod*, 1966, 1:83-87.
- Matsumura Y, Egami M, Satake C, et al. Inhibitory effects of peptide bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions. *Food Chem*, 2003, 1:107-119.
- Nakamura A, Furuta H, Kato M, et al. Effect of soybean soluble polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions. *Food Hydrocolloids*, 2003, 3:333-343.
- Gu X(顾欣), Li L(李莉), Hou YK(侯雅坤), et al. Optimization on extraction of protein from apricot (*Armeniaca sibirica*) kernel via response surface analysis. *Heibei J Forest Orchard Res*(河北林果科技), 2010, 6:162-168.
- Yi JP(易军鹏), Zhu WX(朱文学), Ma HL(马海乐), et al. Optimization on ultrasonic-assisted extraction technology of oil from *Paeonia suffruticosa* Andr. seeds with response surface analysis. *Trans Chin Soc Agric Mach*(农业机械学报), 2009, 6:103-110.