

响应面法优化金刷把多糖提取工艺

刘 婷,尚 姣,王 慧,郑娟娟,赵 洁,房敏峰*

西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 西北大学生命科学学院,西安 710069

摘要:利用响应面法优化金刷把多糖的提取工艺。在单因素试验的基础上,选择提取温度、提取时间、料液比为自变量,以多糖提取率为响应值,进行 Box-Behnken 中心组合实验设计,应用响应曲面分析方法优化提取条件,得到金刷把多糖最佳提取工艺条件如下:提取温度 95 °C,提取时间 2.5 h,料液比 1:20 g/mL,此时金刷把多糖提取率的理论预测值为 4.62%,最优条件下多糖得率的实验值为 4.42%,与理论值的相对误差为 4.3%。经过响应面法优化提取工艺,提高了提取率,适用于金刷把粗多糖的提取。

关键词:金刷把;地衣多糖;响应面法

中图分类号:TS201

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.10.014

Optimization of Extraction of Polysaccharide from *Lethariella cladonioides* Using Response Surface Methodology

LU Ting, SHANG Jiao, WANG Hui, ZHENG Juan-juan, ZHAO Jie, FANG Min-feng*

Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education

The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: The objective of this study was to optimize the extraction of polysaccharide from *Lethariella cladonioides* (NyL.) Krog through response surface methodology. Based on single factor experiments, extraction temperature, extraction duration, solid-liquid ratio were selected for Box-Behnken central composite design. By means of regression analysis, the results showed that the optimal conditions to extract polysaccharide from *L. cladonioides* were as follows: extraction temperature of 95 °C, extraction duration of 2.5 h, solid-liquid ratio of 20 mL/g. Under these conditions, the extraction yield of polysaccharide reached 4.42%. Compared with the theoretical value (4.62%), the relative error was 4.3%. The results showed that the optimized process improved extraction efficiency. It can be used in practical forecasting.

Key words: *Lethariella cladonioides* (NyL.) Krog; Lichen polysaccharide; response surface methodology

金刷把为松萝科植物金丝刷 *Lethariella cladonioides* (NyL.) Krog. 的干燥枝状体^[1],具有镇静、止痛、消炎等作用,主治精神分裂、神经衰弱、头晕目眩等症^[2]。金刷把作为地衣类药材,含有地衣酸、地衣多糖等成分^[2,3],其中地衣多糖表现出良好的抗氧化、抗肿瘤活性^[4]。闫宝琦等^[5]研究发现经热水提取乙醚沉淀反复精制所得的金刷把多糖,为一组均匀多糖;管玉成等^[6]研究发现蒽酮-硫酸法适用于金刷把多糖的含量测定;王慧等^[7]研究发现金刷把多糖具有抑制 HeLa、A375 和 Hip G2 细胞体外生长增殖作用。因此,本实验在单因素试验的基础上,应用响应面法优化金刷把多糖的提取工艺,以期为

金刷把多糖的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金刷把采自太白山,经西北大学王玛丽教授鉴定。葡萄糖(中国药品生物制品检定所,批号:110833-200904);乙醇、石油醚、蒽酮、浓硫酸(科密欧化学试剂有限公司);水为蒸馏水。U-3310 紫外-可见分光光度计(日本日立公司);HG-3018 高速离心机(科大创新股份有限公司);VFD-21S 冷冻干燥仪(Heto-Holten 公司);FA2004 型电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 金刷把多糖提取及制备

取药材粉末 100 g 于圆底烧瓶中,按一定水浴温度、浸提时间和料液比在热水浴中回流提取数次,

收稿日期:2015-04-10 接受日期:2015-08-26

基金项目:国家自然科学基金(J1210063);陕西省食品药品监督管理局药材标准起草项目(2009-11);陕西省大学生创新创业训练计划(2014100697116)

* 通讯作者 E-mail: fmf885@126.com

冷却后过滤,合并上清液;上清液中加入一定体积95%乙醇沉淀。沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,干燥后得金刷把多糖粗品。将金刷把多糖粗品溶于水制成多糖溶液,TCA + Sevag 法除蛋白,重复多次,直至多糖中无蛋白沉淀为止。取50 mL去除蛋白后的多糖溶液置于三角瓶中,向其中加入预处理的D101树脂2 g,在磁力搅拌下吸附1 h后过滤,分别收集滤液和树脂。滤液用乙醇沉淀后再用乙醇和丙酮洗涤,冷冻干燥,得到脱蛋白、脱色的金刷把多糖。

1.2.2 多糖标准曲线的绘制

称取105℃干燥至恒重的葡萄糖10 mg于100 mL容量瓶中,蒸馏水定容至刻度后摇匀,即得葡萄糖标准溶液,分别吸取该溶液0、0.2、0.4、0.8、1 mL。蒸馏水定容至1 mL,分别取配制好的溶液1 mL于带塞试管中,加入2%硫酸-蒽酮试剂4 mL,摇匀,沸水浴10 min显色,待温度降为常温,以蒸馏水为空白对照,于620 nm处测定吸光值。以葡萄糖溶液的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,得 $Y=0.0425X+0.0147$, $R^2=0.9991$,结果表明两变量有很强的线性相关性。

1.2.3 多糖得率的测定

采用蒽酮-硫酸比色法,精密量取多糖溶液1 mL,按上述步骤于620 nm处测定吸光值,根据标准曲线计算多糖含量。多糖得率(%) = 提取得到的多糖质量/药材粉末重量×100%

1.2.4 单因素试验

分别选取提取温度、提取时间、料液比、提取次

数四因素做单因素试验,取三次重复的平均值,考察各因素对金刷把粗多糖得率的影响。

1.2.4.1 提取温度对多糖得率的影响

选取提取温度分别为50、60、70、80、90℃,在料液比1:20 g/mL,提取时间2 h,提取2次的条件下,考察提取温度对多糖得率的影响。

1.2.4.2 提取时间对多糖得率的影响

选取提取时间分别为0.5、1、2、3、4 h,在料液比1:20 g/mL,提取温度90℃,提取2次的条件下,考察提取时间对多糖得率的影响。

1.2.4.3 料液比对多糖得率的影响

选取料液比分别为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL,在提取温度90℃,提取时间2 h,提取2次的条件下,考察料液比对多糖得率的影响。

1.2.4.4 提取次数对多糖得率的影响

选取提取次数分别为1次、2次、3次、4次、5次,在料液比1:20 g/mL,提取温度90℃,提取时间2 h的条件下,考察提取次数对多糖得率的影响。

1.2.5 响应面设计

综合单因素实验结果,根据Box-Behnken中心组合实验设计原理,选取提取温度、提取时间、料液比3个因素为自变量,多糖提取率为响应值,设计3因素3水平的二次回归方程来拟合自变量多糖提取率之间的函数关系,采用响应面分析方法优化提取工艺。实验设计的因素水平见表2,共15个实验点,其中12个为析因点,3个为零点。各因素水平及编码见表1。

表1 响应面分析因素与水平表

Table 1 Factors and levels of RSM analysis

因素 Factor	编码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
提取温度 Extraction temperature (℃)	X1	85	90	95
提取时间 Extraction duration (h)	X2	1.5	2	2.5
料液比 Solid to liquid ratio (g/mL)	X3	1:10	1:20	1:30

1.2.6 数据分析处理

用Design-Expert 8.0.6软件对实验数据分析,并对各因素间的交互作用做回归分析。

2 实验结果

2.1 单因素试验结果

提取温度对多糖得率的影响如图1(A),结果

表明:随着温度的升高,地衣多糖的得率呈不断增加的趋势,但考虑操作的可行性与安全性,最终选择最佳温度为90℃。

提取时间对多糖得率的影响如图1(B),结果表明:多糖得率与时间密切相关,在时间低于2 h多糖得率有所提高,2 h以后趋于平缓。原因可能为时间短,产物不充分溶解;时间过长,可能引起产物结

构的改变,从而导致得率降低。故多糖最佳提取时间为 2 h。

料液比对多糖得率的影响如图 1(C),结果表明:料液比对多糖得率也有影响,金刷把在料液比为 1:20 g/mL 时,其多糖提取率出现最大值,之后多糖提取率变化不明显,故多糖得率最佳料液比为 1:20

g/mL。

提取次数对多糖得率的影响如图 1(D),结果表明:多糖得率并没有随提取次数的增加而呈显著上升趋势,故提取次数对多糖得率影响并不突出。考虑到操作的简便性,提取次数定为 2 次。

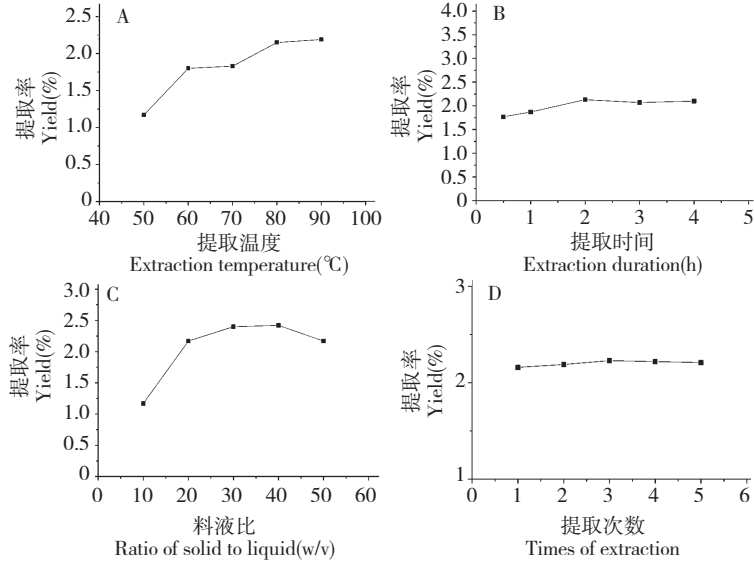


图 1 提取温度 (A)、提取时间 (B)、料液比 (C) 及提取次数 (D) 对金刷把多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature (A), extraction duration (B), solid to liquid ratio (C) and times of extraction (D) on extraction yield of polysaccharide from *L. cladonioides*

2.2 响应面分析法优化金刷把多糖提取工艺

2.2.1 回归方程建立与方差分析

采用 Design Expert 8.0.6 软件设计响应面方案见表 2, 对表 2 数据进行处理和分析, 得到金刷把多糖提取率的二元多次回归方程为:

$$Y = 4.06 + 0.73X_1 + 0.68X_2 + 0.24X_3 - 0.05X_1X_2 - 0.097X_1X_3 - 0.045X_2X_3 - 0.47X_1^2 - 0.39X_2^2 - 0.37X_3^2$$

对二次回归方程的响应面模型方差分析结果如表 3 所示, 从表 3 可以看出, 模型 $P < 0.01$, 表明该模型达到极显著水平, 试验方法可靠。回归方程失拟项极显著, 说明未知因素对试验结果干扰比较大。

复相关系数 $R^2 = 0.9464 > 0.9909$, 说明该模型变量与自变量之间的关系显著, 回归方程与实际情况拟合度高, 校正决定系数 $R_{adj}^2 = 0.9744$, 说明该模型能解释 97.44% 响应值的变化, 仅有总变异的 2.56% 不能用此模型来解释, 变异系数 $CV = 4.02\% < 5\%$, 说明模型的重现性较好, 其实验设计是合理的, 试验具有很高的可信度和准确性, 可以用于多糖得率的预测。

回归方程各项的方差分析表明: X_1 、 X_2 、 X_3 均达到极显著水平, 二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对多糖提取率的影响极显著, 说明二次项响应值影响极大。因此, 利用该回归方程确定的最佳提取工艺是可用的。

表 2 响应面实验方案设计及结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

试验号 No.	X1	X2	X3	多糖提取率 Yield (%)	预测值 Predicted value
1	1	1	0	4.42	4.56
2	0	1	1	4.29	4.18
3	0	-1	1	2.82	2.90

4	-1	0	1	2.76	2.82
5	0	-1	-1	2.22	2.33
6	1	-1	0	3.35	3.30
7	1	0	1	4.11	4.08
8	0	0	0	4.06	4.06
9	0	1	-1	3.87	3.79
10	1	0	-1	3.86	3.80
11	-1	0	-1	2.12	2.15
12	0	0	0	4.06	4.06
13	-1	1	0	3.15	3.20
14	0	0	0	4.06	4.06
15	-1	-1	0	1.88	1.74

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the regression equation

方差来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	10.13	9	1.13	60.23	0.0001	**
X1	4.25	1	4.25	227.26	0.0001	**
X2	3.73	1	3.73	199.33	0.0001	**
X3	0.46	1	0.46	24.39	0.0043	**
X1X2	1.000E-002	1	1.000E-002	0.53	0.4974	
X2X3	8.100E-003	1	8.100E-003	0.43	0.5395	
X1X3	0.038	1	0.038	2.03	0.2132	
X1 ²	0.83	1	0.83	44.33	0.0012	
X2 ²	0.55	1	0.55	29.47	0.0029	**
X3 ²	0.52	1	0.52	27.59	0.0033	**
残差 Residual	0.093	5	0.019			
失拟项 Lack of fit	0.093	3	0.031	122.30	0.001	**
纯误差 Pure error	0.0013	2	0.0006			
总和 Total	10.23	14				

注: * $P < 0.05$ 为显著; ** $P < 0.01$ 为极显著。

Note: $P < 0.05$ indicates significant difference, $P < 0.01$ indicates extremely significant different.

2.2.2 响应面以及等高线分析

在考察的区域内根据回归分析方程绘制响应面图及其等高线图可直观反应各因素和响应值及各考察因子之间的交互作用。利用 SAS 绘制各种因子对得率的响应面和等高线图,结果见如图 2。

图 2(a)可知,在试验水平范围内,随着提取温度的增加金刷把多糖得率先增加后缓慢降低的趋势,提取时间较短时提取温度的影响显著,在提取时间较长时提取温度对金刷把多糖得率影响不大。由图 2(a)及方差分析可知,提取温度要比提取时间对

多糖的提取率影响更大。

图 2(b)可知,在试验水平范围内,提取温度轴向等高线密集,变化较陡;料液比向等高线稀疏,变化较缓,表明提取温度比料液比对金刷把多糖提取得率的影响大。

图 2(c)可知,在试验水平范围内,随着提取时间的增加金刷把多糖得率先增加后缓慢降低的趋势,而料液比对多糖得率影响不明显,且料液比等高线较提取时间稀疏。由图(c)及方差分析可知,提取时间比料液比对多糖得率影响大。

综合以上分析可知,温度是影响金刷把多糖提取率的重要因素,且影响为提取温度 > 提取时间 > 料液比。

通过模型得到的最优条件为 $T = 93.54\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 2.41\text{ h}$, $g/v = 21.77\text{ (v/m, mL/g)}$,在此条件下多糖

提取率理论上可达到 4.62%。考虑到实际情况,将最优条件调整为 $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 2.5\text{ h}$, $g/v = 20\text{ (v/m, mL/g)}$,修正条件下,进行三次重复验证试验,得到实际提取率为 $4.42\% \pm 1.3\%$ ($n = 3$),说明模型能较好的预测实际提取率。

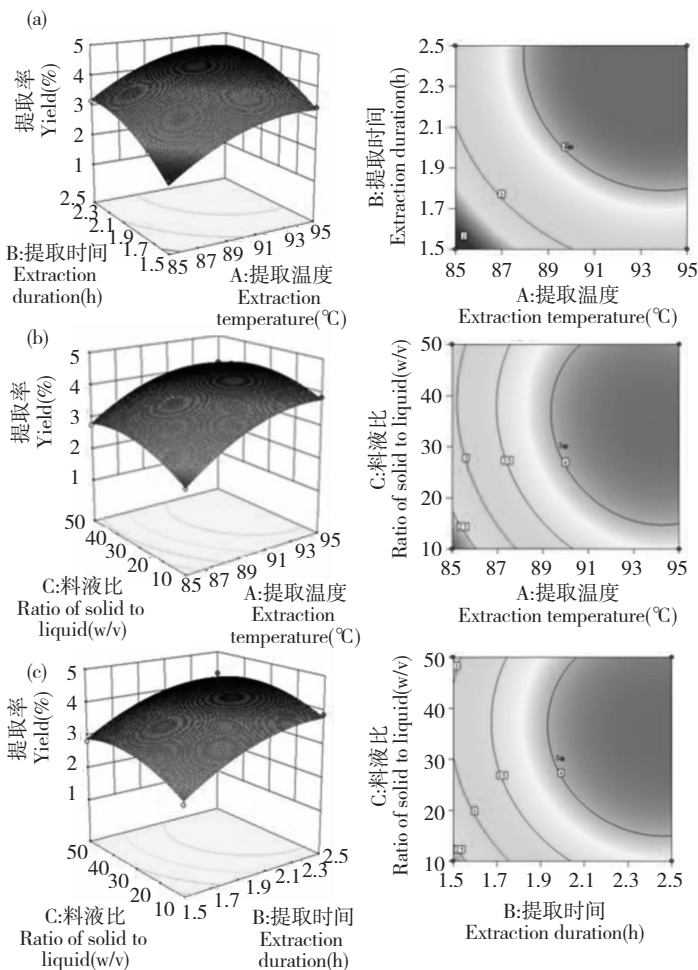


图2 因素交互作用对多糖提取率影响的响应面和等高线图

Fig. 2 Response surface plots showing the effects of extraction parameters on the extraction yield of polysaccharides

3 结论与讨论

本实验在单因素试验的基础上,采用响应面法对金刷把多糖提取工艺进行优化,实验得到的回归模型显著。依据回归分析结果得到金刷把多糖的最佳提取条件为:提取温度 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 2.5 h 、液料比 $1:20\text{ g/mL}$,在此条件下金刷把多糖提取率理论值达到 4.62%,多糖得率的实验值为 4.42%,与模型理论值的相对误差为 4.3%,所建立的模型能较好的预测多糖提取的实际提取率。

响应面法可以在更广泛的范围内考虑因素的组

合,并对响应值进行预测,从而得到更可靠的优化工艺条件。王洪政等^[8]对牡丹果荚多糖、郑林龙等^[9]对土茯苓多糖、纪鹏等^[10]对当归多糖的提取工艺条件都进行了优化,证明利用响应面分析法优化多糖提取工艺具有较高的效率、优越性及巨大的发展潜力。本试验利用响应面法对金刷把多糖提取工艺进行了优化,建立了金刷把多糖提取的技术体系,这将为研究其余地衣多糖工艺研究提供一个良好的技术平台。

金刷把主要分布于陕西、甘肃、西藏、云南和四川等地,陕西民间习用于治疗癫痫、精神分裂等

症^[11],为‘太白七药’之一,主要含有松萝酸和多糖成分,其中由松萝酸所制成的钠盐是临床广泛应用的抗菌药^[12],而金刷把多糖的生物活性有待于开发利用。因此,本实验通过响应面法优化出了金刷把多糖的提取工艺,为进一步分离纯化和生物活性研究奠定了基础。

参考文献

- 1 Wu JL (吴金陵). Lichen Iconography of China(中国地衣植物图鉴). Beijing: China Publishing House, 1987. 165.
- 2 Wang QL (王启林), Fang MF (房敏峰), Hu ZH (胡正海). Overview of germplasm resources and chemical composition of medicinal lichen in Taibai mountain. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2011, 30(4): 1-6.
- 3 Fang MF (房敏峰), Wang QL (王启林), Hu ZH (胡正海). Advances in studies on chemical constituents from lichen and their pharmacological effects. *Chin Tradit Herb Drugs* (中药学), 2011, 42: 2571-2676.
- 4 Wang XJ (王雪姣), Xu WQ (徐文清). The structure characteristics and biological activity of lichen polysaccharide. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2007, 19(2): 62-64.
- 5 Yan BQ (闰宝琦), Ding DN (丁东宁), Qi JQ (靳菊倩). A study on polysaccharide of the *Lethariella cladonioides*. *Acta Botan Boreali-Occidentalia Sin* (西北植物学报), 1993, 13: 312-315.
- 6 Guan YC (管玉成). Research on polysaccharide content de-

termination method for *Lethariella zahlbruckneri*. *Med Innov China* (中国医学创新), 2014, 11: 107-109.

- 7 Wang H (王慧), Wang QL (王启林), Tian J (田娇), et al. Antioxidant and anticancer activities of extracts derived from four kinds of lichen. *Plant Sci J* (植物科学学报), 2014, 32: 181-188.
- 8 Wang HZ (王洪政), Li YY (李媛媛), Liu W (刘伟), et al. Optimizing polysaccharide extraction from peony tree pod using response surface method and assessing its antioxidative activity. *Bull Botan Res* (植物研究), 2015, 35: 127-132.
- 9 Zheng LL (郑林龙), Jiang JP (蒋剑平), Xu HS (许海顺), et al. Optimization of ultrasonic extraction of *Smilax glabra* polysaccharides by response surface methodology and studies on its antioxidant activity. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2014, 29: 918-922.
- 10 Ji P (纪鹏), Zhang M (张蔓), Sun HG (孙红国), et al. Optimization of extraction process of *Angelica sinensis* polysaccharide using response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 976-981.
- 11 Revolutionary Committee of Shaanxi Province (陕西省革命委员会). Chinese Herbal Medicine of Shaanxi Province (陕西中草药). Beijing: Science Press, 1982. 192.
- 12 Liang RX (梁瑞霞), Jiang XQ (江晓倩), Li W (李稳), et al. Determination of usinic acid in lichen at different elevations by HPLC. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2011, 39: 11458.

(上接第 1699 页)

- 4 Subramanian SS, Nair AGR, Vedantham TNC. Terpenoids and flavones of *Callicarpa macrophylla* and *C. longifolia*. *Phytochemistry*, 1974, 13: 306-307.
- 5 Singh AK, Agrawal PK. 16, 17-Isopropylideno-3-oxo-phyllodane, a diterpenoid from *Callicarpa macrophylla*. *Phytochemistry*, 1994, 37: 587-588.
- 6 Talapatra SK, Polley M, Talapatra B. Calliphyllin, a new diterpene from the leaves of *Callicarpa macrophylla*. *J Indian Chem Soc*, 1994, 71: 527-532.
- 7 Chen RS, Lai JS, Wu TS. Studies on the constituents of *Callicarpa formosana* Rolfe. *J Chin Chem Soc*, 1986, 33: 329-334.
- 8 Ren FZ (任风芝), Luan XH (栾新慧), Qu HH (屈会化), et al. Studies on the chemical constituents of *Callicarpa bodinieri* (II). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36: 445-447.

- 9 Darbour N, Raynaud J. The anthocyanin aglycons of *Callicarpa bodinieri* Leveille and *Callicarpa purpurea* Juss. (Verbenaceae). *Pharmazie*, 1988, 43: 143-144.
- 10 Nagai M, Izawa K, Mizoguchi F. 4', 5, 6, 7-Tetramethoxyflavone from the leaves of *Callicarpa japonica* and its variety luxurians. *J Pharm Soc*, 1973, 93: 1087-1088.
- 11 Meng LJ (孟令杰), Qin FM (覃芳敏), Yuan HE (袁红娥), et al. Phenylpropanoid derivatives isolated from *Callicarpa macrophylla* Vahl. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 871-875.
- 12 Meng LJ (孟令杰), Qin FM (覃芳敏), Yuan HE (袁红娥), et al. Chemical constituents of *Callicarpa macrophylla* Vahl. *J Jinan Univ* (暨南大学学报), 2014, 35: 61-65.
- 13 Wang JS, Di YT, Yang XW, et al. Hydroquinone diglycoside acyl esters from the stems of *Glycosmis pentaphylla*. *Phytochemistry*, 2006, 67: 486-491.