

响应面法优化超声提取锁阳多糖工艺研究

王学喜, 张俊, 李新明
(甘肃省农业科学院 农产品贮藏加工所, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为探讨在超声波作用下锁阳多糖提取的工艺条件,以锁阳为原料,在单因素试验基础上,采用响应面法研究了超声提取时间、液料比和提取温度对锁阳多糖提取率的影响。结果表明:提取时间和液料比对多糖提取率均有显著影响,提取温度影响不显著;优化出锁阳多糖超声提取工艺条件为提取温度 97.62℃,液料比 7.75 : 1、提取时间 85.57 min,在此条件下锁阳多糖的理论提取率为 23.1%。与传统水浸法提取相比,超声提取锁阳多糖具有明显的优势,提取时间较短,液料比和温度较低,以及较高的提取率等。

关键词: 响应面; 优化; 锁阳多糖
中图分类号: R 282.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2011)06—0191—05

锁阳为锁阳科植物锁阳(*Cynomorium sogaricum* Rupr.)的干燥肉质茎,又名不老药、锈铁棒、地毛球、羊锁不拉^[1-2],多数寄生于蒺藜科白刺等植物根上,是中蒙药中的常用药。性甘温,具有补肾、益精、润肠之功效,能止泻健胃,主治肠热、胃炎、消化不良、痢疾等^[2-5]。现代医学研究证明具有清除自由基、抗血小板聚集、调节机体免疫功能、提高细胞能量代谢等作用^[6-9]。超声提取是利用超声波所产生的超声能、强烈机械振动和空化效应等作用,来缩短提取时间、提高提取效率^[10-11]。因此,利用响应面法优化超声辅助锁阳多糖的分离提取,

能更进一步提高锁阳多糖的得率,为产业化生产提供可靠依据。现在前期植物多糖研究的基础上^[12-13],利用超声波提取锁阳多糖,研究超声萃取时间、提取温度、作用时间对锁阳多糖得率的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

JBT/C-YCL400/3P(D)可调式超声波药品处理机, LGR10-4.2 高速冷冻离心机, UV-754 型紫外可见分光光度计、HH-S 型数显恒温水浴锅、SHZ-II型循环水真空泵、R-201 旋转蒸发器、PL203 分析电子天平等。葡萄糖、苯酚、无水乙醇及浓硫酸等均为分析纯。

1.2 测定方法

该试验采用苯酚-硫酸法测定多糖含量^[13-14]。

1.3 锁阳多糖的提取

锁阳烘干粉碎,过 40 目筛,80℃干燥,精密称取 10 g,在索氏提取器中加入石油醚脱脂 2 h,抽滤,滤渣用蒸馏水浸泡,超声提取,抽滤,滤液浓缩,用三氯乙酸法

第一作者简介:王学喜(1969-),男,本科,工程师,研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: wxuexi@163.com。
通讯作者:李新明(1970-),男,博士,研究方向为农产品加工。
基金项目:甘肃省农业科学院农业科技创新专项基金资助项目(2009GAAS09)。
收稿日期:2011-01-12

Study on the Chemical Composition and Medicinal Value of *Saussurea involuocrata* Kar. etkir.

LU Xin-sheng ZHANG Hai-ling GOU Ru-hu, LIU Bo-qu, WANG Ya-ling
(Nationalities Chemistry and the Life Sciences Department, Gansu Normal University, Hezuo, Gansu 747000)

Abstract: Tibet snow lotus flower has the glorious history as the medicine. The Tibetan medicine literature ‘Month Wang Yaozhen’ and ‘Four-Volume Medical Code’ was record. This article summarized the Tibet snow lotus flower’s chemical composition, the application method and for medicinal value. The *Saussurea involuocrata* chemical composition was: alkaloid, flavanone, sterol, volatile oil, 16 kind of amino acids, *Saussurea involuocrata* lactone and so on. *Saussurea involuocrata* nature is painstakingly, micro painstakingly, warm.

key word: *Saussurea involuocrata* chemical composition; medicinal value

除蛋白,离心,滤液用旋转蒸发仪浓缩5倍,加无水乙醇(使乙醇终浓度为75%)置冰箱静置过夜,离心,并用无水乙醇、丙酮依次洗涤,得精制多糖,60℃条件下烘干备用。

1.3.1 萃取时间对提取率的影响 准确称取10 g锁阳干粉,液料比7:1,超声功率为50 W,萃取温度为90℃,采用7个萃取时间(15、30、45、60、75、90和105 min)提取锁阳多糖。

1.3.2 料液比对提取率的影响 准确称取10 g锁阳干粉,超声功率为50 W,萃取时间为80 min,萃取温度为90℃,采用7个液料比(1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1)提取锁阳多糖。

1.3.3 萃取温度对提取率的影响 准确称取10 g锁阳干粉,超声功率为50 W,萃取时间为80 min,液料比为7:1,采用7个萃取温度(40、50、60、70、80、90、100℃)提取锁阳多糖。

1.4 Box-Behnken 响应面试验优化

采用Box-Behnken法,该方法确定3个关键因素对响应值有重要影响,每个因素取3个水平,以-1、0、1编码,根据相应的试验表进行试验后,对数据进行二次回归拟合,得到包括一次项、平方项和交互项的二次方程,分析各因素的主效应和交互效应,最后在水平范围内求取最佳值。结合单因素初步优化,确定了3个显著因素的浓度范围,对这3个因素及其水平编码见表1。以提取时间(X1)、液料比(X2)和提取温度(X3)为自变量,以锁阳多糖提取率作为响应值,试验设计及结果见表2。

表 1 响应面分析因素水平			
因素	低	中	高
提取时间/min (X1)	-1 (70)	0 (80)	1 (90)
液料比(X2)	-1 (6:1)	0 (7:1)	1 (8:1)
提取温度/℃ (X3)	-1 (80)	0 (90)	1 (100)

表 2 试验设计和响应值					
试验号	提取时间 X1	液料比 X2	提取温度 X3	提取率 Y1 / %	
				试验值	预测值
1	-1	-1	0	17.57	17.56
2	-1	1	0	21.40	21.43
3	1	-1	0	21.61	21.53
4	1	1	0	21.56	23.54
5	0	-1	-1	20.88	20.92
6	0	-1	0	21.39	21.40
7	0	1	-1	22.50	22.52
8	0	1	1	22.39	22.41
9	-1	0	-1	18.91	18.85
10	1	0	-1	23.42	23.41
11	-1	0	1	19.55	19.54
12	1	0	1	22.74	22.78
13	0	0	0	23.89	23.87
14	0	0	0	23.74	23.78
15	0	0	0	23.79	23.81

2 结果与分析

2.1 浸提时间对锁阳多糖提取率的影响

由图1可知,锁阳多糖提取率随着提取时间的延长而增长,当提取时间为80 min时,锁阳多糖提取率最高,为23.2%;此后多糖提取率随浸提时间的延长没有显著变化。该试验选择浸提时间80 min。

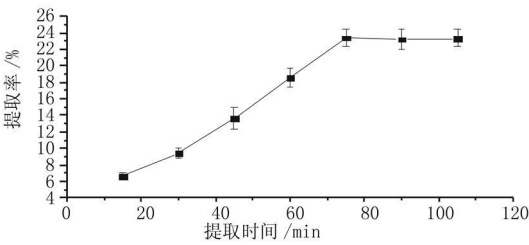


图 1 浸提时间对锁阳多糖提取率的影响

2.2 液料比对锁阳多糖提取率的影响

由图2可知,当液料比从2:1增加到7:1时,锁阳多糖的提取率为23%,之后,随液料比的增加,锁阳多糖提取率不再明显增加。结果表明,液料比为7:1时,锁阳多糖的提取率最高。

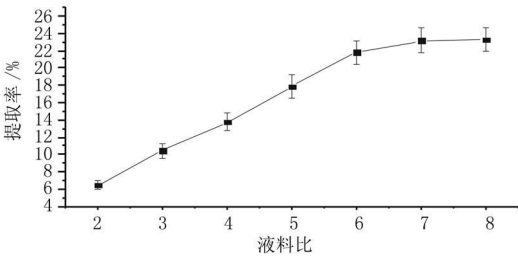


图 2 液料比对锁阳多糖提取率的影响

2.3 提取温度对锁阳多糖提取率的影响

由图3可知,当提取温度从40℃增加到90℃时,锁阳多糖的提取率为23.9%,之后,随提取温度的增高,锁阳多糖提取率不再明显增加反而略有下降,结果表明,提取温度为90℃时,锁阳多糖的提取率最高。

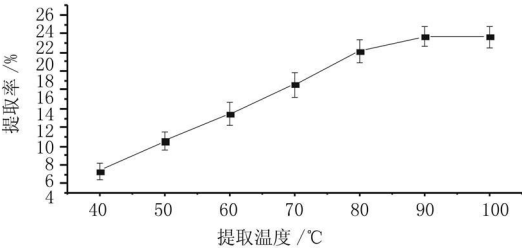


图 3 提取温度对锁阳多糖提取率的影响

2.4 响应面法优化结果分析

根据表2的试验数据,利用SAS 8.0软件对表2的数据进行回归分析,拟合后得到X1、X2、X3的二次多项回归模型为:

$$Y1 = 23.82 + 1.735X1 + 1.06125X2 + 0.05375X3 - 1.73625(X1)^2 - 0.465X1X2 - 0.33X1X3 - 1.06875(X2)^2 - 0.1475X2X3 - 0.93875(X3)^2 \quad (3)$$

对以上回归分析结果数据分析可得, 模拟一次项 $X1$ ($P < 0.0004$) 和 $X2$ ($P = 0.0037$) 极显著, 二次项 $X11$ ($P = 0.0023$), $X22$ ($P = 0.0173$), $X33$ ($P = 0.0277$) 显著。交互项均不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

对模型方程进行方差分析表明, 该方程显著, 结果见表 4。通过校正决定系数 R^2_{adj} 和相关系数 R 来验证。此处 $R^2_{adj} = 0.9584$, 表明大约有 95% 的得率变异分布在所研究的 3 个相关因素中, 其总变异度仅有 5% 不能由该模型来解释; 相关系数 R 为 0.9845, 表明得率的实测值和预测值间有很好的拟合度; 二次响应曲面回归方程能够很好的拟合该试验所得的结果, 自变量与响应值之间线性关系显著, 该模型可以用于得率试验的理论预测。

表 3 各因素的方差分析				
Effect	Estimate	Std Error	t Ratio	P Value
$X1$	1.735	0.20752	8.3605	<0.0004
$X2$	1.0613	0.20752	5.1139	0.0037
$X3$	0.05375	0.20752	-0.25901	0.8060
$X1 \times X1$	-1.7362	0.30546	-5.684	0.0023
$X1 \times X2$	-0.465	0.29348	-1.5844	0.1739
$X1 \times X3$	-0.33	0.29348	-1.1244	0.3119
$X2 \times X2$	-1.0687	0.30546	-3.4988	0.0173
$X2 \times X3$	-0.1475	0.29348	-0.50259	0.6366
$X3 \times X3$	-0.93875	0.30546	-3.0732	0.0277

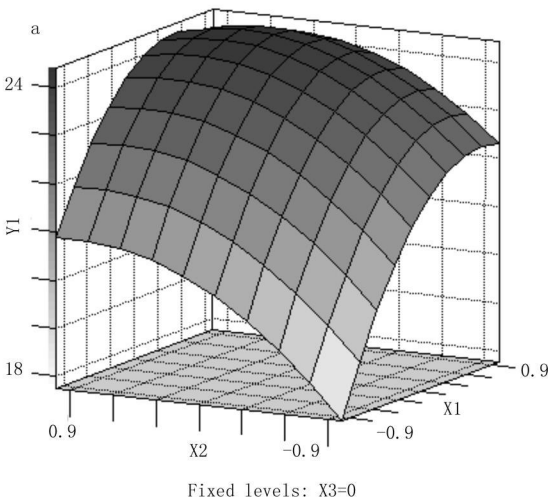


表 4 回归模型方差分析		
	Master Model	Predictive Model
Mean	21.82333	21.82333
R-square	97.73%	97.73%
Adj. R-square	95.84%	95.84%
RMSE	0.586963	0.586963
CV	2.68961	2.68961

由图 4~6 可知, 响应面开口向下, 随着每个因素的增大, 响应值增大, 当响应值增大到极值后, 随着因素的增大, 响应值开始逐渐减小。该模型有稳定点, 且稳定点是最大值。由图 4 可知, 锁阳多糖提取率随提取时间的延长及液料比的增加而明显增大, 然而, 当提取时间超过一定值时, 提取率不再增加反而稍微下降, 这可能是由于高分子化合物分解引起的, 因此, 适当的延长提取时间和增加液料比有助于锁阳多糖的提取; 由图 5 可知, 锁阳多糖提取率在一定的提取时间范围内随提取时间的增加而逐渐增大, 但当提取时间高于某值后, 其值不再明显增加。锁阳多糖提取率在一定的提取温度范围内随提取温度的增加而逐渐增大, 但当提取温度高于某值后, 其值反而有所下降; 由图 6 可看出, 提取温度的增加有助于多糖的充分溶出, 但超过某一值后提取率随温度的升高而下降, 另外, 提取温度对提取率影响较小, 表现较为平滑的曲线。综合上述分析能看出, 3 个提取因素都有 1 个适合的选值范围。而在设定的范围内, 提取率随超声功率的增加而持续增加。

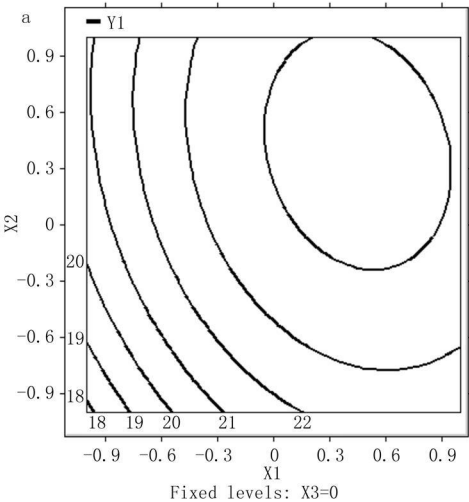


图 4 $Y=f(X2, X1)$ 响应面立体分析图和等高线图

2.5 提取工艺条件的验证

由表 4 可知 方程一次项(提取时间和液料比)、所有二次项对提取率影响都具有显著性差异。由此可见, 各具体试验因素对响应面值的影响是非简单的线性关系。同时做出等值线图 and 响应面图(图 4, 5), 进行分析计算后得出理论最佳提取工艺条件为: 提取温度

97.62℃, 液料比 7.75 : 1, 提取时间 85.57 min, 在此条件下锁阳多糖的理论提取率为 23.1%。结合实际生产条件和方差分析结果, 确定最佳提取工艺为: 加锁阳多糖 7 倍量的水, 在 97℃温度提取 85 min。以上述条件进行试验结果的验证, 重复 3 次, 实际测得的平均得率为 23.51%, 与理论预测值相比, 其相对误差约为 1.7%。

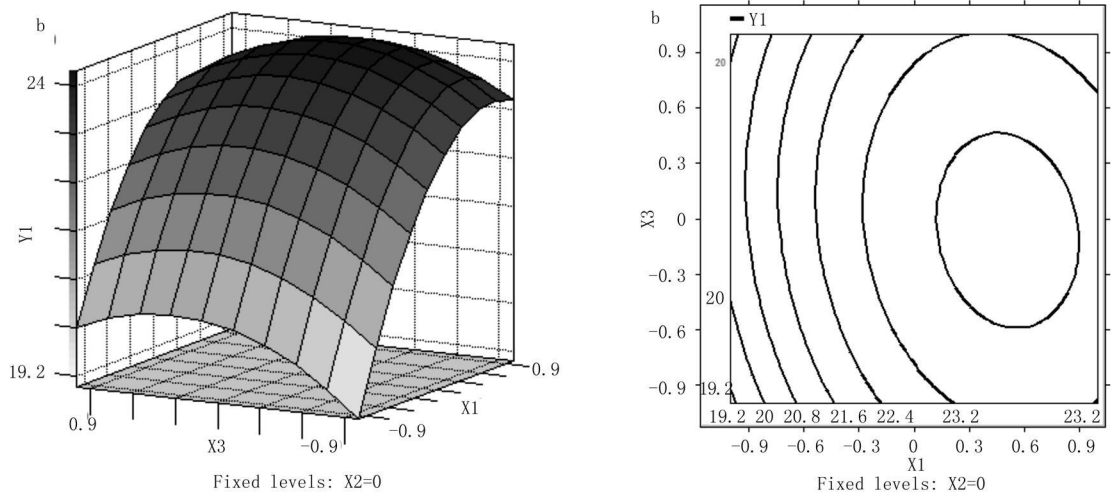


图 5 $Y=f(X3, X1)$ 响应面立体分析图和等高线图

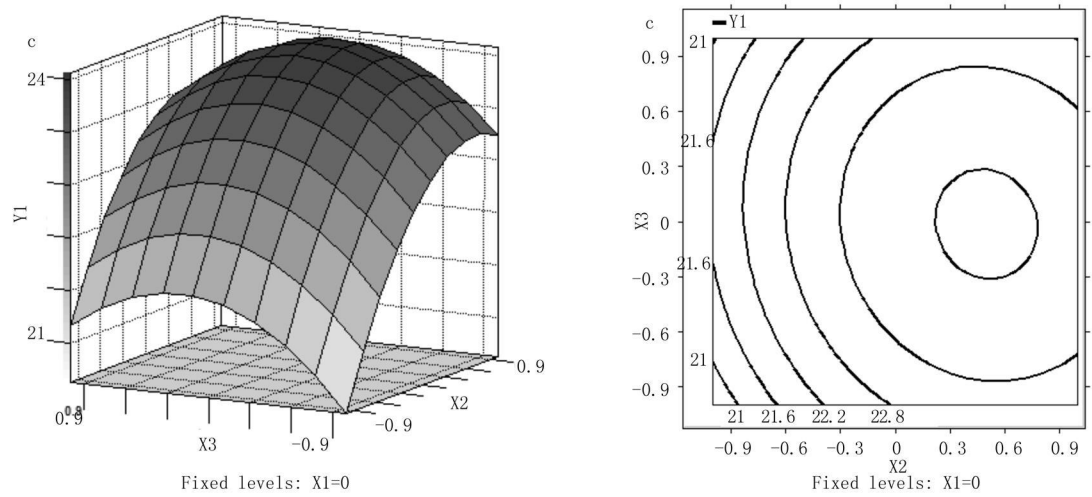


图 6 $Y=f(X3, X2)$ 响应面立体分析图和等高线图

2.6 热水浸提法与超声水提法的比较

准确称取 5 g 锁阳粉末 9 份, 按正交所得最佳热水浸提条件, 在该优化条件下, 锁阳多糖提取率为 19.56%; 与超声条件下的多糖提取率 23.51% 相比, 超声提取具有显著的优势, 例如, 较高的提取率, 较短的提取时间, 较少的溶剂使用量和较低的提取温度(表 5)。

表 5 热水浸提法与超声水提法的比较

提取方法	水提时间/min	液料比	水提温度/℃	多糖得率/%
热水浸提法	180	12:1	100	19.56
超声水提法	85	7:1	97	23.51

超声波的不同作用方式对原料有一定的破坏作用, 从而尽快地释放出多糖, 声波促使多糖运动, 有利于多糖的浸出^[10]。除空化和振动作用外, 超声波的许多次级效应, 如乳化、扩散、粉碎、化学效应等也都有利于使植物中的有效成分的转移, 并充分和溶剂混合, 促进提取的进行^[15]。

3 结论

超声提取单因素和优化试验表明, 超声萃取时间和液料比是影响提取结果的主要因素。超声提取可以在较低的温度下提取出有效成分, 避免高温破坏有效成分。提取温度对超声提取结果影响较小, 提取 85 min 即能提出所有的多糖。最佳提取工艺为: 加锁阳多糖 7 倍量的水, 在 97℃ 温度提取 85 min。在上述条件下, 锁阳多糖的提取率为 23.51%, 较常规热水浸提节省大量时间, 且锁阳多糖提取率显著增高。

参考文献

[1] Zhao G, Wang J, Qin G, W, et al. Cynomorium Songaricum Extracts Functionally Modulate Transporters of γ -Aminobutyric Acid and Monoamine [J]. Neurochemical Research, 2010, 35(4): 666-676.
[2] 张丙六, 相炎红, 周青钰. 锁阳的研究现状及开发[J]. 酿酒, 2002, 29(4): 72-73.
[3] 刘凯, 吴建军. 锁阳含药血清对骨髓间质干细胞向神经细胞分化的影响[J]. 中医研究, 2010, 23(5): 24-27.

- [4] Abdel-Magied E M, Abdel-Rahman H A, Harraz F M. The effect of Aqueous Extracts of *Cynomorium Coccineum* and *Withania Somnifera* on Testicular Development in Immature Wistar rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, 75(1): 1-4.
- [5] 聂莉莎, 马丽杰, 爱民. 锁阳药性及功能的现代研究进展[J]. *中国民族民间医药* 2009 16: 17-18.
- [6] Garéa M A, Nicholson E H, Nickrent D L. Extensive Intraindividual Variation in Plastid rDNA Sequences from the Holoparasite *Cynomorium Coccineum* (Cynomoriaceae) [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2004 58 (3): 322-332.
- [7] 李东哲, 谢春雨. 锁阳煎剂对大鼠心肌组织自由基代谢的影响[J]. *浙江体育科学*, 32(1): 122-124.
- [8] MA C M, WEI Y, WANG Z G, et al. Triterpenes from *Cynomorium Songaricum* — analysis of HCV Protease Inhibitory Activity, Quantification, and Content Change under the Influence of Heating [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2009, 63(1): 9-14.
- [9] LU Y, WANG Q G, Matthias F, et al. Extracts of *Cynomorium Songaricum* Protect SK-N-SH Human Neuroblastoma Cells Against Staurosporine-induced Apoptosis Potentially Through Their Radical Scavenging Activity [J]. *Phytotherapy Research*, 2009 23(2): 257-261.
- [10] Otterbach A, Wendawiak B W. Ultrasonic/Sonohlet/supercritical fluid Extraction Kinetics of Pyrethrins from Flowers and Allethrin from Paper Strips [J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1999 365(5): 472-474.
- [11] Wheeler W B, Thompsons N B, Edelstein R L et al. Ultrasonic Extraction of Carbofuran Residues from Radishes [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1979 21(1): 238-242.
- [12] LI X M, MA Y L, LIU X J. Effect of the *Lycium Barbarum* Polysaccharides on Age-related Oxidative Stress in Aged Mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007 111(3): 504-511.
- [13] LI X M, LI X L, ZHOU AG. Evaluation of Aantioxidant Activity of the Polysaccharides Extracted from *Lycium Barbanum* fruits *in vitro* [J]. *European Polymer Journal*, 2007, 43(2): 488-497.
- [14] LUO Q, CAI Y Z, YAN J et al. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects and Antioxidant Activity of Fruit Extracts from *Lycium Barbanum* [J]. *Life Sci*, 2004, 76: 137-149.
- [15] Velikovi D T, Milenovi D M, Ristic M S, et al. Ultrasonic Extraction of Waste Solid Residues from the *Salvia* sp. Essential Oil Hydrodistillation [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008 42(1): 97-104.

Optimization of the Ultrasonic Extraction of Polysaccharides from *Cynomorium coccineum* L. Using Response Surface Methodology

WANG Xue-xi ZHANG Jun, LI Xin-ming

(Institute of Agricultural Product Storage and Processing, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070)

Abstract: To determine the optimum ultrasonic extraction conditions for polysaccharides from *Cynomorium coccineum* L. *Cynomorium coccineum* L. were taken as raw material. On the basis of single-factor test, a 3-level-3-factor Box-Behnken design (BBD) and response surface methodology (RSM) were employed to evaluate the effects of extraction time, ratio of water to sample and extraction temperature on percent yield of *cynomorium coccineum* polysaccharides. The results showed that extraction time and ratio of water to sample significantly affected percent yield of *Cynomorium coccineum* L. polysaccharides, whereas extraction temperature did not. A model for extraction of *Cynomorium coccineum* L. polysaccharides was established. Based on ridge max analysis, the optimum condition for extraction of *Cynomorium coccineum* L. polysaccharides was predicted to be extraction time 85.57 min, ratio of water to sample 7.75 : 1, and extraction temperature 97.62 °C. An experiment was performed under this optimal condition and percent extraction yield of 23.1% was obtained. Compared with conventional water extraction method, ultrasonic extraction of *cynomorium coccineum* polysaccharides possess a manifest superiority, e.g. shorter extraction time, lower ratio of water to sample and extraction temperature, and higher extraction yield.

Key words: response surface methodology; optimization; polysaccharides of *Cynomorium coccineum* L.