

# 响应面法优化委陵菜多糖提取工艺研究

李 敏<sup>1,2</sup>, 罗 益 远<sup>3</sup>, 岳 启 波<sup>1</sup>

(1. 吉林农业科技学院 中药学院, 吉林 吉林 132101; 2. 长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林 吉林 132101; 3. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023)

**摘 要:**以委陵菜为试材,以多糖的提取率为响应值,分别选取液料比、超声功率、超声温度、提取时间 4 个因素进行 Box-Behnken 中心组合设计,通过响应面分析法优化委陵菜多糖提取工艺。结果表明:委陵菜总多糖的最佳提取工艺条件为液料比 50:1 mL/g,超声温度 63℃,超声功率 500 W,提取时间 30 min。其多糖的提取率为 2.448 6%。响应面分析法用于提取工艺的优化,方法简单,具有可行性。

**关键词:**委陵菜;多糖;响应面法;提取工艺

**中图分类号:**S 636.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0147-05

委陵菜(*Potentilla chinensis* Ser.)属蔷薇科委陵菜属植物<sup>[1]</sup>,具有清热解毒、凉血、止痢等功效;主要用于热毒泻痢、血热出血等;现代药理学研究显示委陵菜水提物具有提高机体免疫力、抗疲劳、耐缺氧、止泻抑菌、抗氧化、抗应激、清除自由基等作用<sup>[2]</sup>。委陵菜多糖(PAP)是委陵菜的主要活性成分之一<sup>[3]</sup>,近年来研究发现,委

陵菜多糖 PAP 对肿瘤作用不仅能直接作用于肿瘤细胞,而且通过调动机体的免疫系统,增强免疫细胞活性,从而具有较强的抗肿瘤的作用<sup>[4]</sup>。委陵菜取材方便,研究前景可观,但关于委陵菜多糖的提取工艺鲜有报道。该试验采用超声提取方法,通过单因素试验考察了液料比、超声时间、超声温度、超声功率 4 个因素对委陵菜多糖提取率的影响,通过响应面法优化委陵菜多糖最佳提取工艺,为委陵菜的进一步研究提供理论依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试委陵菜实地采自吉林农业科技学院药用植物

**第一作者简介:**李敏(1984-),女,硕士,讲师,研究方向为天然药物化学。E-mail:limin1042004@163.com.

**基金项目:**长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室资助项目(吉农院合字 2013 第 S012 号)。

**收稿日期:**2015-01-23

## Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Protein From *Nitraria tangutorum* Bor by Response Surface Methodology

GAO Qingya<sup>1,2</sup>, ZHAO Baotang<sup>1,2</sup>, ZHANG Ji<sup>1,2</sup>, ZHAO Qingfang<sup>1</sup>, YIN Zhenxiong<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070; 2. Higher Value Application Engineering Laboratory for Gansu Distinctive Plants, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract:** Taking *Nitraria tangutorum* Bor as test material, based on single factor experiments, solvent-solid ratio, ultrasonic time, supersonic power and ultrasound tissue temperature were selected as influencing factors. The experiment mathematical model was arranged according to Box-Behnken central composite design, for protein yield as response values. The results showed that the optimum extraction conditions were that the ultrasonic time 30 minutes, ultrasonic temperature 50℃, the ratio of liquid to solid 20:1 mL/g, ultrasonic power 150 W. The protein extraction yield was (11.87±0.32)%. The mathematical model and the experimental data were consistent with response surface method; the optimization of the fruit of *Nitraria tangutorum* Bor protein extraction process was simple, provided the basis for the further development of *Nitraria tangutorum* Bor protein.

**Keywords:** *Nitraria tangutorum* Bor; protein; response surface methodology; ultrasonic extraction

种源圃,样品经吉林农业科技学院奚广生教授鉴定为蔷薇科委陵菜属植物委陵菜 *Potentilla amurensis* Ser. 的干燥全草。

752 紫外可见分光光度计(上海奥谱勒仪器有限公司);CP114 电子天平(奥豪斯仪器有限公司);DHG-9035A 电热鼓风干燥箱(上海源长实验仪器设备厂);HC-5B 数控超声波提取机(济宁天仪器);恒温水浴箱(HH-S,巩义市英裕予华仪器厂)。

葡萄糖(批号:F20100926,国药集团化学试剂有限公司)、3,5-二硝基水杨酸( $C_7H_4N_2O_7$ )、氢氧化钠、酒石酸甲钠、苯酚等均为分析纯。试验用水为二次蒸馏水。

## 1.2 试验方法

1.2.1 对照品溶液的配制 精密称取在 105℃ 干燥恒重的葡萄糖标准品 100 mg,加水溶解定容至 100 mL 容量瓶中,定容摇匀,即得葡萄糖对照品溶液。

1.2.2 DNS 试剂的配制 准确称取酒石酸甲钠 18.2 g,溶于 50 mL 蒸馏水中,加热,趁热依次加入 3,5-二硝基水杨酸 0.63 g、NaOH 2.1 g、苯酚 0.5 g,搅拌至溶,冷却后用蒸馏水定容至 100 mL,贮于棕色瓶中,室温保存备用。

1.2.3 标准曲线的绘制 分别移取葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 比色管中,依次加水 2 mL、DNS 试剂 1.5 mL,加热 5 min 取出,加蒸馏水定容至 10 mL。冷却后在 490 nm 下,以试剂空白作为对照,测定吸光度。以吸光度  $A$  对浓度  $C$  做线性回归,得回归方程  $A=1.360 0C-0.008 3$ ;  $r=0.997 4$ 。葡萄糖在 0.02~0.10 mg/mL 具有较好的线性关系。

1.2.4 供试品溶液的配制 称取干燥恒重样品 1.0 g (60 目)于 50 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 蒸馏水,超声提取 30 min,取出冷却至室温,过滤,滤液移至 50 mL 量瓶中,用蒸馏水定容至 50 mL,摇匀备用,即得到供试品溶液。

1.2.5 单因素试验设计 液料比对委陵菜多糖提取率的影响:固定超声温度 50℃、超声时间 20 min、超声功率 500 W,分别选取液料比 20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 mL/g 进行提取。超声时间对委陵菜多糖提取率的影响:固定超声温度 50℃、液料比 20:1 mL/g、超声功率 500 W,分别选取超声时间 5、10、20、30、40 min 进行提取。超声功率对委陵菜多糖提取率的影响:固定超声温度 50℃、液料比 20:1 mL/g、超声时间 20 min,分别选取超声功率 200、300、400、500、600 W 进行提取试验。超声温度对委陵菜多糖提取率的影响:固定液料比 20:1 mL/g、超声提取时间 20 min、超声功率 500 W,分别以超声温度 40、50、60、70、80℃ 进行提取。测定各因素对多糖提取率的影响。

1.2.6 响应面优化试验设计 在单因素试验的基础上,

以液料比(A)、超声温度(B)、超声功率(C)和超声时间(D)为参数,利用 Design-Expert 8.0.4 软件中的 Box-Behnken 优化委陵菜总多糖的提取条件。以委陵菜多糖得率为响应值,进行了响应面分析试验。以 A、B、C、D 为自变量,以总多糖的提取率为响应值(Y)进行试验设计,各试验因素水平设计见表 1。

表 1 响应面设计优化试验因素与水平

Table 1 The factor and level of response surface optimization experiment

水平 Level	A 液料比 Liquid-solid ratio /(mL · g <sup>-1</sup> )	B 超声温度 Ultrasonic temperature /℃	C 超声时间 Ultrasonic time /min	D 超声功率 Ultrasonic power /W
-1	30	55	20	300
0	40	60	25	400
1	50	65	30	500

## 1.3 项目测定

准确吸取供试品溶液 2 mL 于 20 mL 具塞试管,根据“1.2.3”方法测定吸光度,根据线性回归方程,计算得到多糖的含量。

## 1.4 数据分析

试验数据采用 Excel、Design-Expert 8.0.6 软件进行处理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

2.1.1 液料比对委陵菜多糖提取率的影响 由图 1 可知,随着加水量的逐渐增大,多糖提取率呈上升趋势。由于水量的增加,多糖溶解在水中的量就越多,相应的多糖提取率就高。但增大到一定程度后,多糖提取率几乎不变,再增加水量则多糖的提取率反而稍有降低。所以液料比在 40:1 mL/g 左右较适宜。

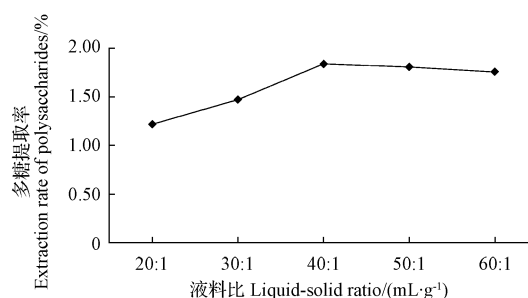


图 1 液料比对多糖提取率的影响

Fig. 1 The effect of liquid-solid ratio on the polysaccharide extraction ratio

2.1.2 超声时间对委陵菜中多糖提取率的影响 由图 2 可知,随着提取时间的增加,多糖提取率在 30 min 前增加显著,以后增加较为平缓,增大到一定时间以后多糖提取率反而有下降趋势。可见增加提取时间并不能提高多糖的提取率。但提取时间过长增加操作成本,能耗增加。考虑到经济效益选择最佳提取时间 20~

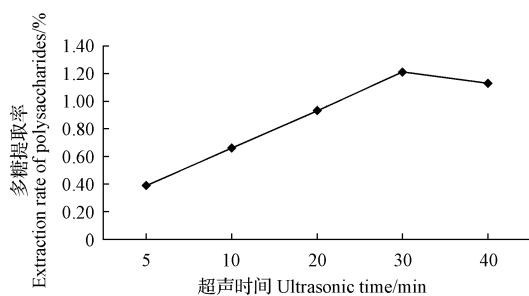


图2 提取时间对提取率的影响

Fig. 2 The effect of ultrasonic time on the polysaccharide extraction ratio

30 min.

2.1.3 超声功率对委陵菜中多糖提取率的影响 由图3可知,随着超声功率的增大,提取率呈现上升的趋势;当超声功率为500 W时,提取率达到一个较高的水平;之后,继续提高超声功率,提取率不再增加,考虑到耗能,超声功率选择500 W较适宜。

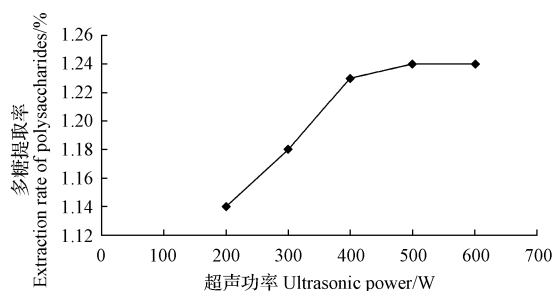


图3 超声功率对提取率的影响

Fig. 3 The effect of ultrasonic power on the polysaccharide extraction ratio

2.1.4 超声温度对委陵菜中多糖提取率的影响 由图4可知,随着提取温度的升高,多糖提取率增加不显著;在50~60℃时,提取率较高;但当温度大于60℃时提取率随增高稍有下降,这可能是随着温度的升高多糖容易分解的缘故。因此,提取温度50~60℃较为适宜。

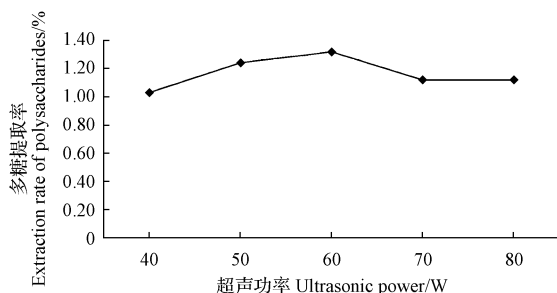


图4 超声温度对提取率的影响

Fig. 4 The effect of ultrasonic temperature on the polysaccharide extraction ratio

## 2.2 响应优化试验设计结果

试验设计方案与结果见表2。采用响应面法对表2试验结果进行分析,以总多糖提取率为响应值,对试验数据进行二次多项式回归拟合,得回归方程为: $Y(\%) = 2.25 + 0.18A + 0.12B + 0.11C + 0.095D - 0.050AB - 0.030AC + 0.040AD + 0.062BC - 0.017BD + 2.500 \times 10^{-3} \times CD - 0.14A^2 - 0.15B^2 - 0.023C^2 - 0.038D^2$ 。式中: $Y$ 为多糖提取率, $A$ 为液料比, $B$ 为超声温度, $C$ 为超声时间, $D$ 为超声功率。应用回归对方程和方程中各因子进行方差分析。由表3可以看出,该模型 $F$ 值=4.17( $P < 0.05$ ),说明所选模型显著。失拟项 $P = 0.6862 > 0.05$ ,失拟项差异不显著,方程对试验拟合程度较好。 $R^2$ 是0.6133,说明该模型能解释61.33%的响应值变化。对回归方程系数进行显著性检验,表明 $A$ 液料比及其二次项 $A^2$ 、 $B$ 超声温度及 $B^2$ 、 $C$ 超声时间、 $D$

表2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 The response surface analysis scheme and test results

试验编号	液料比	超声温度	超声时间	超声功率	提取率
Test	Liquid-solid ratio	Ultrasonic	Ultrasonic time	Ultrasonic	Extraction
No.	/(mL · g <sup>-1</sup> )	temperature/°C	/min	power/W	ratio/%
1	30	60	30	400	2.08
2	40	60	25	400	1.98
3	40	55	25	300	1.87
4	40	55	20	400	1.78
5	40	60	30	300	2.07
6	30	55	25	400	1.63
7	40	60	30	500	2.42
8	30	65	25	400	1.89
9	30	60	20	400	1.81
10	30	60	25	300	1.84
11	50	60	20	400	2.23
12	40	60	25	400	2.31
13	30	60	25	500	1.93
14	50	60	30	400	2.38
15	40	60	25	400	2.32
16	40	65	25	500	2.28
17	40	65	20	400	1.86
18	50	65	25	400	2.24
19	40	60	25	400	2.34
20	40	60	20	300	2.01
21	40	55	30	400	2.06
22	40	65	30	400	2.39
23	40	65	25	300	2.26
24	50	55	25	400	2.18
25	40	60	25	400	2.31
26	40	55	25	500	1.96
27	50	60	25	300	2.04
28	40	60	20	500	2.35
29	50	60	25	500	2.29

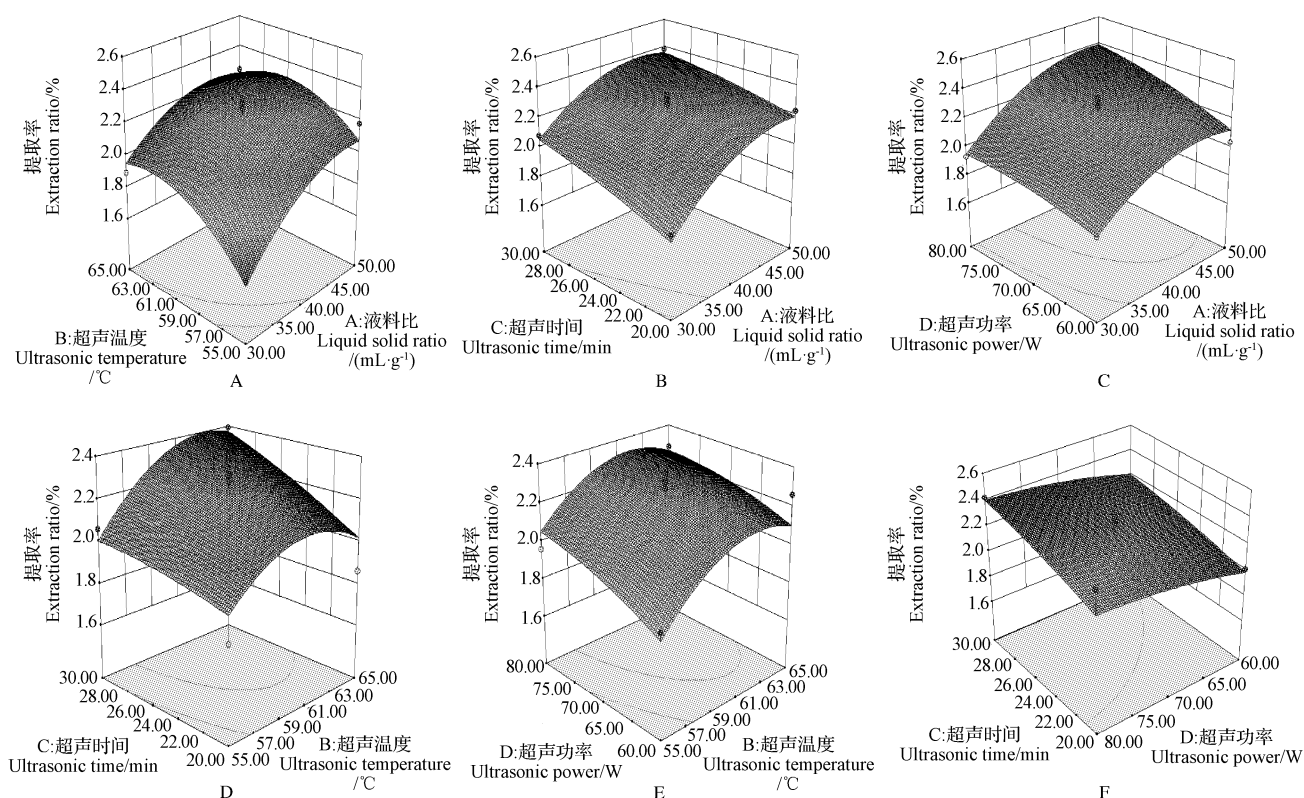
表 3

二次回归模型的方差分析

Table 3

Analysis of variance of quadratic regression model

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	F 值 F value	Pr>F	显著性 Significant
Model	1.10	14	0.079	4.17	0.0058	Significant
A	0.40	1	0.40	21.02	0.0004	
B	0.17	1	0.17	9.17	0.0090	
C	0.15	1	0.15	8.18	0.0126	
D	0.11	1	0.11	5.75	0.0310	
AB	1.000E-002	1	1.000E-002	0.53	0.4783	
AC	3.600E-003	1	3.600E-003	0.19	0.6687	
AD	6.400E-003	1	6.400E-003	0.34	0.5693	
BC	0.016	1	0.016	0.83	0.3779	
BD	1.225E-003	1	1.225E-003	0.065	0.8024	
CD	2.500E-005	1	2.500E-005	1.327E-003	0.9715	
A <sup>2</sup>	0.12	1	0.12	6.33	0.0247	
B <sup>2</sup>	0.15	1	0.15	8.07	0.0131	
C <sup>2</sup>	3.456E-003	1	3.456E-003	0.18	0.6750	
D <sup>2</sup>	9.408E-003	1	9.408E-003	0.50	0.4914	
残差	0.26	14	0.019			
失拟项	0.17	10	0.017	0.73	0.6862	No significant
纯误差	0.093	4	0.023			
总和	1.36	28				



注: A. 液料比与超声温度对多糖提取率的影响; B. 液料比与超声时间对多糖提取率的影响; C. 液料比与超声功率对多糖提取率的影响; D. 超声时间与超声温度对多糖提取率的影响; E. 超声功率与超声温度对多糖提取率的影响; F. 超声功率与超声时间对多糖提取率的影响。

Note: A. Effect of liquid-solid ratio and ultrasonic temperature on yield of polysaccharides; B. Effect of liquid-solid ratio and ultrasonic time on yield of polysaccharides; C. Effect of liquid-solid ratio and ultrasonic power on yield of polysaccharides; D. Effect of ultrasonic power and temperature on yield of polysaccharides; E. Effect of ultrasonic power and temperature on yield of polysaccharides; F. Effect of ultrasonic power and time on yield of polysaccharides.

图 5 三维效应面图

Fig. 5 Three-dimensional response surface



超声功率对多糖得率有显著影响( $P < 0.05$ ); A 液料比与 B 超声温度交互作用 AB、AC、AD、BC、BD、CD、 $C^2$ 、 $D^2$  对多糖提取率的影响均不显著。各因素对委陵菜多糖得率影响的大小依次为液料比、超声温度、超声时间、超声功率。

将表 2 中的试验数据进行响应面曲面分析,选择连个交互的因素对多糖提取率的影响进行分析,其它因素固定在零水平上。根据回归方程,考察拟合响应曲面的性状,分析液料比、超声时间、超声温度、超声功率 4 个因素对多糖提取率的影响。由图 5 可知,各因素对多糖提取率的影响不是很显著,但各因素对多糖提取率呈较明显的二次抛物线关系,表明回归方程拟合性较好,同时表明各交互因素在响应值(多糖提取率)存在最大值。

### 2.3 工艺优化与验证试验

经 Design-Expert 8.0.6 软件分析优化,可得到超声提取委陵菜多糖的最优条件。结果显示委陵菜多糖提取最佳提取条件为液料比 50 : 1 mL/g、超声温度 63.09℃、超声时间 29.56 min、超声功率 488 W,在此最佳条件下多糖的理论提取率为 2.456 6%。考虑到可操作性,将最优工艺条件修正为液料比 50 : 1 mL/g、超声温度 63℃、超声时间 30 min、超声功率 500 W。用此条

件进行验证试验得到多糖提取率为 2.448 6%,与理论值接近,表明数学模型对优化委陵菜多糖超声提取工艺是可行的。

### 3 讨论与结论

该研究以委陵菜为试验对象提取多糖,根据单因素试验,分别考察了液料比、超声温度、超声时间、超声功率等对多糖提取率的影响,在此基础上通过设计响应面试验和数据分析并通过验证试验进行对比,从而确定超声提取委陵菜多糖的最佳工艺条件为液料比 50 : 1 mL/g、超声温度 63℃、超声时间 30 min、超声功率 500 W,在此条件下多糖提取率为 2.448 6%,与理论值 2.456 6%相近。证明此模型是合理可靠的,可用于实际预测。

### 参考文献

- [1] 孙天航,刘玫,孙雪芹,等. 东北委陵菜属植物叶形态结构的研究及其分类学价值的探讨[J]. 草叶科学,2014,23(3):75-84.
- [2] 刘素君,成英,陈刚. 鹅绒委陵菜多糖提取及抗氧化活性的研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2103-2105.
- [3] 成英,宋九华,刘素君. 鹅绒委陵菜多糖对荷瘤小鼠细胞因子的影响[J]. 安徽农业科学,2012,40(9):5177-5178.
- [4] 刘素君,李世元,宋九华,等. 鹅绒委陵菜多糖抗肿瘤作用研究[J]. 中国现代应用药学,2011,28(3):185-188.

## Study on Optimizing Extraction Techniques of *Potentilla chinensis* Ser. Polysaccharides by Response Surface Methodology

LI Min<sup>1,2</sup>, LUO Yiyuan<sup>3</sup>, YUE Qibo<sup>1</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin, Jilin 132101; 2. Jilin Key Laboratory for Utilization and Protection of Animal and Plant Resources in Changbai Mountain, Jilin, Jilin 132101; 3. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023)

**Abstract:** Taking *Potentilla chinensis* Ser. as test material, with the index for the content of polysaccharides in *Potentilla chinensis* Ser., the effect of four factors such as solvent-solid ratio, ultrasonic power, ultrasonic temperature and extraction time were designed by Box-Behnken central composite. Extraction technic parameters of polysaccharides in *Potentilla chinensis* Ser. was optimized by response surface methodology. The results showed that the optimizing extraction conditions of polysaccharides in *Potentilla chinensis* Ser. were as follows: liquid-solid ratio was 50 : 1 mL/g, ultrasonic power was 500 W, ultrasonic temperature was 63℃ and extraction time was 30 minutes. Under the conditions the extraction rate of polysaccharides was 2.448 6%. Optimizing extraction technics by response surface methodology was reasonable, simple, and had good feasibility.

**Keywords:** *Potentilla chinensis* Ser.; polysaccharide; response surface method; extraction techniques