

doi:10.3969/j.issn.1672-3678.2014.05.010

# 响应曲面法优化蕨麻多糖的提取工艺

王晓虹<sup>1,2</sup>, 赵晓辉<sup>2</sup>, 皮立<sup>2</sup>, 邓黎<sup>3</sup>, 韩发<sup>2,3</sup>

(1. 中国科学院大学 北京 100049; 2. 中国科学院 西北高原生物研究所 西宁 810008;  
3. 中国科学院 西北高原生物研究所 湖州高原生物产业化创新中心 湖州 313000)

**摘要:**以藏药蕨麻为试材,优化蕨麻多糖的提取工艺。在单因素实验的基础上,利用响应曲面法考察提取时间、温度和液料比对蕨麻多糖提取得率的影响,优化提取工艺,得到最优提取工艺条件:提取温度 72 ℃、液料比 28 mL/g、提取时间 102 min。提取 2 次,验证得到蕨麻多糖提取得率可达 21.28%,接近于模型预测理论值 21.44%。

**关键词:**提取;多糖;蕨麻;响应曲面法

中图分类号:TS255.36

文献标志码:A

文章编号:1672-3678(2014)05-0057-05

## Optimization of extraction process of polysaccharides from *Potentilla Anserina L.* by response surface methodology

WANG Xiaohong<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiaohui<sup>2</sup>, PI Li<sup>2</sup>, DENG Li<sup>3</sup>, HAN Fa<sup>2,3</sup>

(1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xi'ning 810008, China; 3. Huzhou Plateau Biological Resource Centre of Innovation, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Huzhou 313000, China)

**Abstract:** The single factor test and response surface methodology were adopted to optimize the extraction process of polysaccharides from *Potentilla Anserina L.* Three factors including extraction temperature, extraction time and the ratio of liquid to material were selected with the Box-Behnken design. Response surface methodology showed that the optimal conditions of polysaccharides extraction were: extraction temperature 72 ℃, extraction time 102 min, the ratio of liquid to material 28 mL/g and twice for extraction. Under these conditions, the yield of polysaccharides was up to 21.28%, which was well matched with the predictive yield of 21.44%.

**Key words:** extraction; polysaccharides; *Potentilla Anserina L.*; response surface methodology

蕨麻学名为鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina L.*), 属蔷薇科(*Rosaceae*)委陵菜属(*Potentilla*), 为多年生草本, 是一种典型的匍匐茎克隆植物, 广泛分布于陕西、甘肃、青海和西藏等地<sup>[1-2]</sup>。全草含维生素、委陵菜苷<sup>[3]</sup>, 其膨大的块根是常见的藏药, 块根中含糖、蛋白质、脂肪、灰分、水分、鞣质、蕨麻素、野鸦椿酸、胆

碱、甜菜碱、组氨酸、琥珀酸和黄酮类化合物等, 可被大量食用, 具有生津止渴、健脾益胃、收敛止血、止咳、利痰、益气补血的功效, 在民间就有药食兼用的历史记载, 被俗称为“人参果”<sup>[4-5]</sup>。

蕨麻中含有丰富的多糖类物质, 有着较高的潜在应用价值<sup>[6-8]</sup>。已有研究者对蕨麻多糖的提取工

收稿日期:2014-04-11

基金项目:湖州市科技攻关计划(2012GN27)

作者简介:王晓虹(1989—), 女, 青海西宁人, 硕士, 研究方向:植物生理生态以及植物化学;韩发(联系人), 研究员, E-mail:hanfa@nwipb.cas.cn

艺通过单因素和或正交试验进行了改进和优化<sup>[9]</sup>, 得到热回流法多糖含量为 10.3%, 微波法多糖含量 10.8%。本研究利用响应曲面分析法(response surface methodology, RSM)确定了响应变量蕨麻多糖提取得率与实验变量之间的关系以及各实验因素及其交互作用在蕨麻多糖提取工艺中对多糖提取得率的影响, 通过对实验数据分析, 进行二次多元回归拟合得到方程, 优化选择得到较优的提取工艺条件, 以期对蕨麻多糖的开发利用提供技术参数和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、材料与试剂

N-1001 型旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; UV-759 紫外-可见分光光度计、METTLER TOLEDO PL203 和 XS204 型电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司。

蕨麻采自海拔 4 000 m 的青海省玉树地区, 葡萄糖标准品由国家标准物质研究中心提供; 苯酚、浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、石油醚、乙醇(AR), 上海展云化工有限公司; 三氯甲烷(AR), 无锡东晶化学试剂厂; 实验用水均为超纯水。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 标准曲线的制作、多糖含量的测定

精确称取葡萄糖标准品 20 mg, 纯水定容至 500 mL。分别吸取 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6、1.8 和 2.0 mL, 依次以纯水补至 2.0 mL, 然后分别加入质量分数为 5% 的苯酚 1 mL 及浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mL, 静置 10 min, 混匀, 室温放置 20 min 后于 490 nm 波长下测定吸光度值。以 2.0 mL 水为空白, 按上述同样显色操作程序, 参照张泽生等<sup>[9]</sup>、何彦峰等<sup>[10]</sup>的方法, 以多糖质量浓度( $\rho$ )为横坐标, 吸光度值( $A$ )为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程  $A = 11.857\rho + 0.0717$  ( $R^2 = 0.9988$ )。

#### 1.2.2 蕨麻多糖的提取及含量测定

称取干燥的蕨麻块根粉, 使用石油醚索氏提取 3 次进行脱脂, 每次 2 h, 挥干石油醚后在干燥箱中烘干, 备用。精确称取处理好的蕨麻块根粉末 1.0 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 按照一定的液料比、提取温度、提取时间和提取次数进行加热回流提取, 提取完成后以 3 500 r/min 离心 15 min, 上清液用 seavage 法去蛋白 3 次, 再用 3 倍体积的 95% 乙醇

4 °C 沉淀 24 h, 然后将沉淀溶解定容至 250 mL 容量瓶, 按照 1.2.1 中的步骤测定多糖的吸光度<sup>[9, 11]</sup>, 代入标准曲线方程计算蕨麻多糖含量, 并以下式计算蕨麻多糖提取得率:

$$\text{蕨麻多糖提取得率} = w(\text{蕨麻块根粉多糖}) / m(\text{蕨麻块根粉}) \times 100\% \quad (1)$$

### 1.3 实验设计与数据分析方法

#### 1.3.1 单因素实验

分别考察提取温度(50、60、70、80 和 90 °C)、提取时间(30、60、90、120 和 150 min)及液料比(15、20、25、30 和 35 mL/g)、提取次数(1、2、3、4 和 5 次)对蕨麻多糖提取得率的影响。

#### 1.3.2 响应曲面法实验设计

在单因素实验的基础上选择对响应值(蕨麻多糖提取得率)有显著影响的因素, 利用 Design Expert 软件对实验数据进行回归分析。每一变量的低、中、高水平分别以 -1、0、1 进行编码, 回归拟合分析选用二次方程:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$ , 其中  $Y$  为响应值(蕨麻多糖提取得率),  $\beta_0$ 、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$ 、 $\beta_{12}$ 、 $\beta_{13}$ 、 $\beta_{23}$ 、 $\beta_{11}$ 、 $\beta_{22}$ 、 $\beta_{33}$  为方程系数,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  为自变量编码值。实验因素及水平编码见表 1。

表 1 实验因素水平及编码

Table 1 Levels and codes of variable chosen for Box-Behnken design

因素	编码	水平		
		-1	0	1
提取温度/°C	$X_1$	60	70	80
提取时间/min	$X_2$	60	90	120
液料比/(mL·g <sup>-1</sup> )	$X_3$	20	25	30

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验结果

#### 2.1.1 提取温度对蕨麻多糖提取得率的影响

在提取时间 120 min、液料比 25 mL/g、提取次数 2 次的条件下考察提取温度对蕨麻多糖提取得率的影响, 结果见图 1。由图 1 可知: 当提取温度不超过 80 °C 时, 随着温度升高多糖提取得率逐渐增加, 并在 80 °C 时达到最大, 为 11.58%, 之后逐渐减少。这种变化可能是由于大于 80 °C 的高温逐步破坏了蕨麻多糖的结构, 或是过高温易引起多糖降解, 使得大量的小分子糖类未能醇沉进而导致提取得

率降低。故确定较优蕨麻多糖提取温度范围为 60 ~ 80 °C。

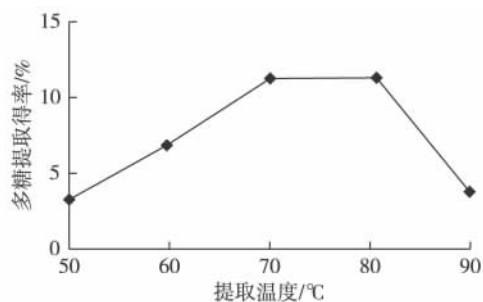


图1 提取温度对蕨麻多糖提取得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on extracting yield

### 2.1.2 提取时间对蕨麻多糖提取得率的影响

在提取温度为 80 °C、液料比为 25 mL/g、提取次数 2 次的条件下考察提取时间对蕨麻多糖提取得率的影响,结果见图 2。由图 2 可知:随着时间的逐步增加,蕨麻多糖得率随之增加,当提取时间接近 120 min 时,多糖提取得率最大,为 11.06%,之后随着时间增加,多糖提取得率降低。这可能是长时间的提取使得试材中其他化合物成分被提取出来,或多糖发生分解,进而使蕨麻多糖提取得率降低。考虑到提取时间可导致实验成本增加等因素,故确定较佳提取时间范围为 60 ~ 120 min。

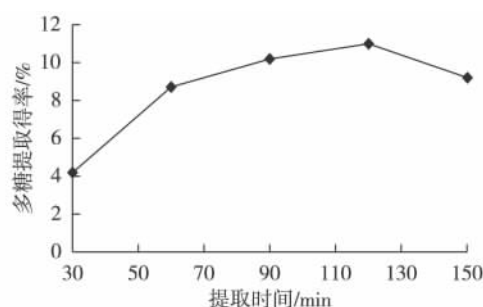


图2 提取时间对蕨麻多糖提取得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on extracting yield

### 2.1.3 提取次数对蕨麻多糖提取得率的影响

在提取温度 80 °C、提取时间 120 min、液料比为 25 mL/g 条件下考察提取次数对蕨麻多糖提取得率的影响,结果见图 3。由图 3 可知:提取次数为 2 次时,蕨麻多糖的提取得率为 10.68%,超过 2 次后提取得率并没有明显增加,综合提取效率及实验成本因素,确定提取次数为 2 次。

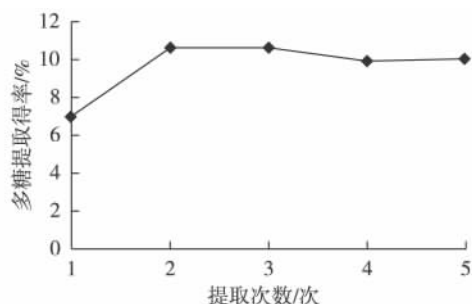


图3 提取次数对蕨麻多糖提取得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction times on extracting yield

### 2.1.4 液料比对蕨麻多糖提取得率的影响

在提取温度 80 °C、提取时间 120 min、提取 2 次的条件下考察液料比对蕨麻多糖提取得率的影响,结果见图 4。由图 4 可知:在一定的液料比范围内,随着液料比的增加,蕨麻多糖的提取得率逐渐增加;当液料比大于 25 mL/g 时,多糖提取得率反而呈降低趋势,这可能是由于较大的液料比条件有利于蕨麻中其他化合物成分的提取,进而使得多糖的提取得率下降导致。同时,由于过大的液料比会在一定程度上增加实验成本,后续的浓缩工作量加大,综合考虑提取效率和实验成本,确定较优液料比范围为 20 ~ 30 mL/g。

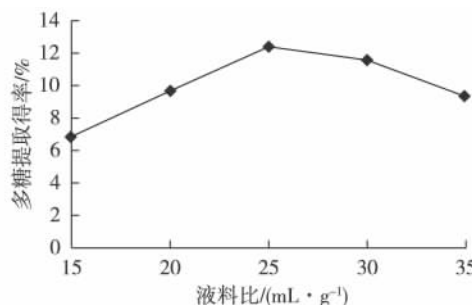


图4 液料比对蕨麻多糖提取得率的影响

ig. 4 Effect of ratio of liquid/material on extracting yield

## 2.2 响应曲面实验结果

### 2.2.1 响应曲面法分析方案及结果

Box-Behnken 设计方案及蕨麻多糖提取得率的测定结果见表 2。通过响应面分析来进一步考察提取时间、提取温度和料液比之间的相互影响,并确定提取蕨麻多糖的最佳工艺参数。利用 Design Expert 8.0.6 软件对实验数据进行二次多元回归拟合,得到二次多项式方程  $Y = 20.69 + 1.42X_1 + 0.74X_2 + 1.53X_3 - 0.88X_1X_2 - 0.84X_1X_3 + 0.92X_2X_3 - 1.26X_1^2 - 1.27X_2^2 - 1.52X_3^2$ 。

表2 多糖提取得率实验方案及结果  
Table 2 Box-Behnken design and results

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Y
1	-1	0	-1	14.05
2	1	1	0	19.71
3	1	0	-1	18.37
4	0	-1	1	17.75
5	1	0	1	20.11
6	0	-1	-1	16.90
7	-1	0	1	19.14
8	1	-1	0	19.67
9	0	1	-1	16.22
10	-1	1	0	18.41
11	-1	-1	0	14.87
12	0	1	1	20.74
13	0	0	0	20.45
14	0	0	0	21.46
15	0	0	0	20.34
16	0	0	0	20.97
17	0	0	0	20.23

对回归方程进行显著性检验及方差分析 结果见表3。由表3可以得出:方程中三因素交互项 $X_1X_2$  (提取温度与提取时间)、 $X_1X_3$  (提取温度与液料比)、 $X_2X_3$  (提取时间与液料比)对Y(蕨麻多糖提取得率)的影响呈显著影响水平( $P < 0.05$ ) 其他线性及平方项对Y的影响均呈极显著水平( $P < 0.005$ )。

表3 回归模型的方差分析

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model

参数	自由度	均方	平方和	F值	P值
模型	9	8.24	74.20	35.78	<0.000 1
$X_1$	1	16.22	16.22	70.37	<0.000 1
$X_2$	1	4.34	4.34	18.82	0.003 4
$X_3$	1	18.60	18.60	80.74	<0.000 1
$X_1X_2$	1	3.06	3.06	13.29	0.008 2
$X_1X_3$	1	2.81	2.81	12.18	0.010 1
$X_2X_3$	1	3.37	3.37	14.61	0.006 5
$X_1^2$	1	6.63	6.63	28.78	0.001 0
$X_2^2$	1	6.79	6.79	29.47	0.001 0
$X_3^2$	1	9.70	9.70	42.08	0.000 3
残差	7	0.23	1.61		
失拟项	3	0.18	0.55	0.69	0.604 0
纯误差	4	0.27	1.06		
总离差	16		75.81		
$R^2$			0.951 4		

$R^2 = 0.951 4$ ,说明拟合得到的二次多项式方程能解释95.14%的响应值的变化,可以用方程对蕨麻多糖提取得率进行分析及预测。同时由F值大小推断出,所考察的3个因素对蕨麻多糖提取得率的影响程度从大到小依次排序为: $X_3$ (液料比)、 $X_1$ (提取温度)和 $X_2$ (提取时间)。

### 2.2.2 因素间的交互影响

根据拟合模型绘制蕨麻多糖提取得率等高线图,可直观地反映参数范围内的极值以及各因素间的相互作用对响应值的影响,故可确定最佳工艺参数范围。利用Design Expert 8.0.6软件绘制得到的响应面及等高线见图5、6和7。

从图5可以看出,在液料比一定时,蕨麻多糖提取得率在一定范围内随提取温度的升高和时间的延长而增加,但过长时间的高温提取反而不利于多糖的提取,样品中的其他物质可能会被提取出,进而导致多糖的提取得率下降;同时,二维等高线图呈明显的椭圆形,响应曲面较陡且平滑,说明该交互项 $X_1X_2$ 的交互作用显著( $P < 0.05$ )。

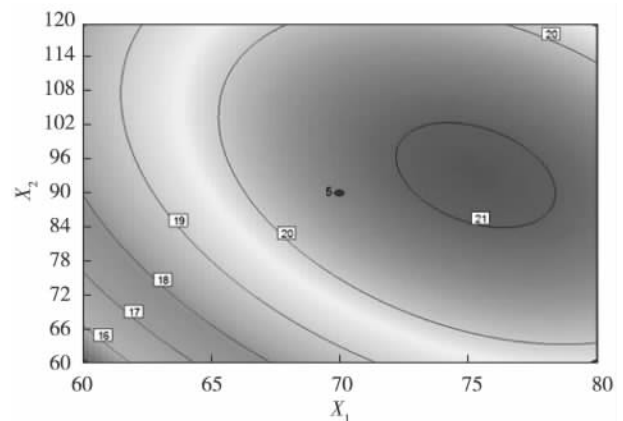


图5 提取时间和提取温度影响蕨麻多糖提取得率的等高线图

Fig.5 Contour plots (2D) showing effects of extraction time and temperature on response surface

从图6可以看出,当提取时间一定时,在提取温度和液料比较低的条件下,蕨麻多糖的提取得率较低。在一定的温度范围内,随着液料比增加多糖的提取得率升高,并在液料比为28 mL/g左右达到最高,之后过高温度和较大的液料比反而降低了多糖的提取得率,这可能是由于高温和较大液料比条件下蕨麻多糖发生了降解或者其他化合物被大量提取出来使提取得率降低。同时,二维等高线图呈明

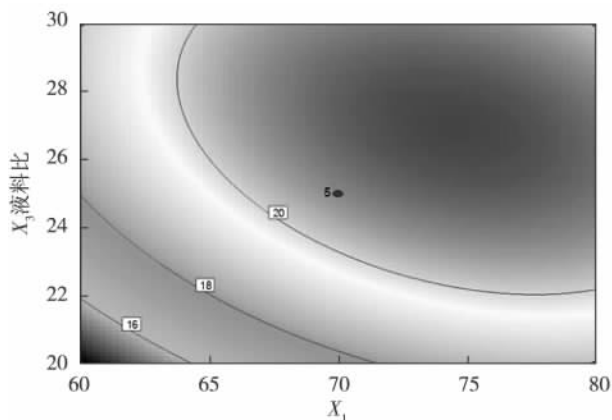


图 6 提取温度和液料比影响蕨麻多糖提取得率的等高线图

Fig. 6 Contour plots (2D) showing effects of extraction temperature and ratio of liquid to material on the response surface

显的椭圆形, 响应曲面较陡且平滑, 说明该交互项  $X_1X_3$  的交互作用显著 ( $P < 0.05$ )。

从图 7 可知, 当提取温度一定时, 在一定的时间范围内, 随液料比的增大, 多糖提取得率呈升高趋势, 并在液料比为 28 mL/g 左右达到最高; 提取时间和液料比的交互作用对蕨麻多糖提取得率的影响显著 ( $P < 0.05$ ), 表现为二维等高线图呈明显的椭圆形, 曲面较陡。

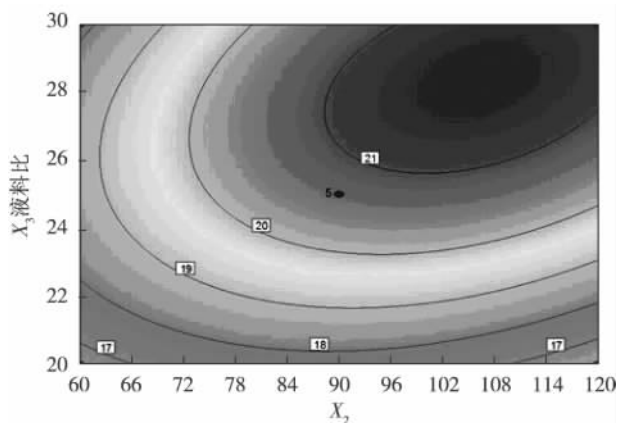


图 7 提取时间和液料比影响蕨麻多糖提取得率的等高线图

Fig. 7 Contour plots (2D) showing effects of extraction time and ratio of liquid to material on response surface

### 2. 2. 3 蕨麻多糖提取工艺条件的确定

利用 Design Expert 8. 0. 6 软件对回归模型进行

进一步的典型性分析, 得到最优提取工艺条件: 提取温度 72. 36 °C, 液料比 27. 81 mL/g, 提取时间 102. 37 min, 提取 2 次, 蕨麻多糖提取得率理论值可达 21. 44%。

### 2. 2. 4 最佳工艺验证实验

在综合考虑实验效率、成本等因素后对得到的最优工艺参数进行修改: 提取温度 72 °C, 液料比 28 mL/g, 提取时间 102 min, 提取 2 次。用该工艺条件进行 3 次重复验证实验, 结果表明蕨麻多糖提取得率的平均值为 21. 28%, 与预测理论值基本吻合, 表明回归拟合得到的二次多项式方程对实验结果具有良好的预测性, 所选工艺条件重现性好。

## 3 结 论

经响应曲面法确定的蕨麻多糖最优提取工艺条件: 提取温度 72 °C, 液料比 28 mL/g, 提取时间 102 min, 提取 2 次。按照最佳提取工艺条件进行验证提取, 得到蕨麻多糖提取得率平均值为 21. 28%, 综合回归分析结果, 发现该提取工艺有效可行, 具有实际应用价值。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987: 270.
- [2] 任燕利, 曲玮, 梁敬钰. 委陵菜属植物研究进展 [J]. 海峡药学 2010, 22(5): 1-8.
- [3] 褚良, 王立波, 张哲, 等. 藏药蕨麻的化学成分研究 [J]. 中国现代中药 2008, 10(3): 10-12.
- [4] 何桂芳. 野生地被植物蕨麻的研究进展 [J]. 北方园艺, 2010 (7): 217-219.
- [5] 孙洁, 吕加平, 薄海波. 藏药蕨麻的营养成分分析及评价 [J]. 食品科学 2008, 29(2): 411-414.
- [6] 韦薇, 李广策, 龚海英, 等. 蕨麻多糖抗缺氧作用研究 [J]. 武警医学院报 2010, 19(5): 345-347.
- [7] 王谢忠, 胡庭俊, 李晓明, 等. 蕨麻多糖的提取含量测定和理化性质分析 [J]. 中兽医医药杂志 2006, 25(2): 34-35.
- [8] 郝功元, 吴彩娥, 杨剑婷, 等. 银杏花粉粗多糖脱色工艺研究 [J]. 食品科学 2009, 19(30): 136-139.
- [9] 张泽生, 张婕, 张建平, 等. 蕨麻多糖的提取工艺研究 [J]. 食品研究与开发 2009, 30(1): 46-49.
- [10] 何彦峰, 杨仁明, 胡娜, 等. 响应面法优化葫芦巴种子多糖提取工艺 [J]. 天然产物研究与开发 2012, 24: 1463-1467.
- [11] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究 [J]. 中国药学杂志, 1996, 31: 550-553.

(责任编辑 周晓薇)