

Box-Behnken设计-效应面法优化 连钱草多糖提取工艺

姜宁¹, 刘晓鹏^{1,2,*}, 张俊霞¹, 江亚东³, 丁振国³, 李力²

(1.湖北民族学院生科院, 湖北恩施 445000;

2.南京医药股份有限公司, 博士后工作站, 江苏南京 210012;

3.南京同仁堂洪泽中药材科技有限公司, 江苏洪泽 223200)

摘要:对连钱草多糖进行提取, 并通过单因素及响应面实验对提取的四个因素: pH、液固比、提取温度和提取时间进行了优化。结果表明: 当提取工艺为pH7.2、液固比33:1(mL/g)、提取温度89℃、提取时间160min时, 多糖提取率最高, 可达3.40%±0.05%, 与理论值3.39%接近。此研究为连钱草多糖的进一步开发和利用提供了理论依据。

关键词:连钱草, Box-Behnken设计, 效应面法, 多糖, 提取

Optimization of extraction process of polysaccharides from *Glechoma longituba* by Box-Behnken design-response surface method

JIANG Ning¹, LIU Xiao-peng^{1,2,*}, ZHANG Jun-xia¹, JIANG Ya-dong³, DING Zhen-guo³, LI Li²

(1.School of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China;

2.Postdoctoral Research Station, Nanjing Medical Co., Ltd., Nanjing, Nanjing 210012, China;

3.Nanjing Tongrentang Hongze Chinese Herbal Science & Technology Co., Ltd., Hongze 223200, China)

Abstract: Polysaccharides from *Glechoma longituba* were extracted in the present study, and four factors including pH, liquid-solid ratio, extraction temperature and time were optimized by univariate tests and response surface methodology. The results showed that the highest yield of polysaccharides extracted from *Glechoma longituba* reached 3.40%±0.05% when the process was pH7.2, liquid-solid ratio 33:1(mL/g), temperature 89℃ and extraction time 160min. This research might provide a theoretical basis for the further development and utilization.

Key words: *Glechoma longituba*; Box-Behnken design; response surface method; polysaccharides; extraction

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)14-0279-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.14.056

连钱草为唇形科活血丹属植物活血丹[*Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.]干燥地上部分, 晒干; 或鲜用。连钱草性味凉辛, 微苦, 微寒。归肝、肾、膀胱经^[1], 具有降血糖^[2]、利尿利胆^[3]、抑菌^[4]等功效。临床上主要用于利小便, 治疗膀胱结石、肾结石、输尿管结石、肾炎水肿、湿热黄疸、胆囊炎、胆石症、腮腺炎、烧伤等^[5]。我国连钱草资源丰富, 除西北、内蒙古外, 各地均有栽培。

研究表明植物多糖尤其是药用植物多糖具有抗氧化^[6]、免疫调节^[7]、抗肿瘤^[8]、抗炎^[9]等功能, 但目前对连钱草化学成分的研究主要集中在有机酸^[10]、生物碱^[11]、苷^[12]、黄酮^[13]、挥发油^[14]等方面, 尚无连钱草多糖研究的报道。本研究采用响应面分析优化了热水浴

提取连钱草多糖的工艺, 以期为连钱草这一传统中药的进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

连钱草 南京同仁堂洪泽中药材科技有限公司提供, 经刘晓鹏副教授鉴定为唇形科活血丹属植物活血丹[*Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.]; 葡萄糖、无水乙醇、萘酮、硫酸 分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

TU-1810型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; RT-02A型多功能粉碎机 弘荃机械企业有限公司; BECKMAN COUCTER型离心机 美国BECKMAN公司; HHS型恒温水浴锅 上海

收稿日期: 2014-09-12

作者简介: 姜宁(1968-), 女, 在读博士, 副教授, 研究方向: 生物工程。

* 通讯作者: 刘晓鹏(1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物工程。

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI04B04); 江苏省“企业博士后集聚计划”项目(2011033); 2013年湖北省战略性新兴产业(支柱产业)人才培养(生物工程)项目。

博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 连钱草多糖的提取 将连钱草60℃烘干、粉碎,过60目筛。称取一定量的连钱草粉末,加适量的一定pH的缓冲液,水浴提取。将浸提液离心(8000r/min, 20min),将无水乙醇缓缓加入上清液中,边加边搅拌,使乙醇终浓度为80%。将醇沉液离心(8000r/min, 20min),将入蒸馏水溶解沉淀。按多糖溶液:三氯甲烷:正丁醇三者体积比25:5:1混合,振荡20min,离心(8000r/min, 20min)。蒽酮-浓硫酸法^[15]测上清液中的多糖,按下列公式计算提取率:

$$\text{多糖提取率}(\%) = \frac{c \times \text{稀释倍数} \times V}{m} \times 100$$

式中:c为测定样液的质量浓度(mg/mL);V为提取体积(mL);m为连钱草质量(mg)。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 pH对连钱草多糖提取的影响 称取一定量的连钱草粉末,在液固比30:1(mL/g)、水浴温度90℃和提取时间120min下,分别以pH6.0、6.5、7.0、7.5、8.0缓冲液提取多糖,考察不同pH对连钱草多糖提取的影响。实验重复三次。

1.2.2.2 液固比对连钱草多糖提取的影响 称取一定量的连钱草粉末,加入pH7.0的缓冲液,90℃水浴,提取120min,分别按液固比10:1、20:1、30:1、40:1、50:1(mL/g),考察不同液固比对连钱草多糖提取的影响。实验重复三次。

1.2.2.3 提取温度对连钱草多糖提取的影响 称取一定量的连钱草粉末,按液固比30:1(mL/g)加入pH7.0的缓冲液,分别置于60、70、80、90、98℃水浴,提取时间均为120min,考察不同温度下连钱草多糖提取率的变化。实验重复三次。

1.2.2.4 提取时间对连钱草多糖提取的影响 称取一定量的连钱草粉末,于pH7.0、液固比30:1(mL/g),提取温度90℃条件下分别提取60、90、120、150、180min,计算多糖提取率,以考察不同提取时间对连钱草多糖提取的影响。实验重复三次。

1.2.3 Box-Behnken实验 根据单因素实验结果,采用Design-Expert 8.0软件进行Box-Behnken实验设计,以pH、液固比、提取温度和提取时间为自变量,多糖提取率为响应值优化连钱草多糖的提取工艺。实验因素水平设计见表1。

表1 因素水平表

Table 1 Levels and factors table

水平	因素			
	A pH	B 液固比(mL/g)	C 提取温度(℃)	D 提取时间(min)
-1	6.5	20:1	85	120
0	7.0	30:1	90	150
1	7.5	40:1	95	180

1.2.4 数据分析 单因素实验数据用Origin 8.0统计软件进行单因素方差分析,数据以平均数±标准误(SE)表示,组间差异比较采用Tukey实验。Box-Behnken

实验设计和结果分析采用Design-Expert 8.0软件。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 pH对连钱草多糖提取的影响 不同pH对连钱草多糖提取的影响如图1所示。由图1可以得知:当提取液的pH为7.0时,连钱草多糖的提取率最高,并与其他pH条件时的提取率差异极显著($p < 0.01$)。说明连钱草多糖在pH7.0时,溶解性及稳定性最好,过酸过碱的提取条件可能会降低连钱草多糖的溶解性能或增加其水解。

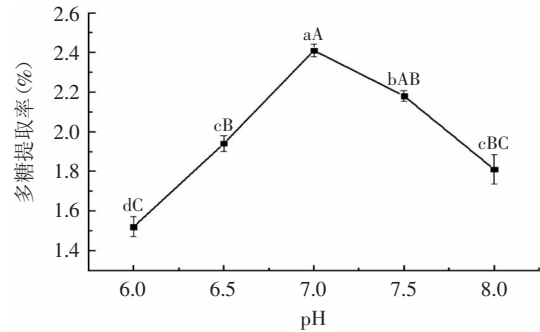


图1 pH对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of pH on polysaccharides yield

注:大、小写字母分别表示0.01、0.05水平上的差异显著;图2~图4同。

2.1.2 液固比对连钱草多糖提取的影响 不同液固比会显著影响连钱草多糖的提取率(图2)。随着液固比的增加,提取率随之增加,当液固比达到30:1(mL/g)时,提取率的增加不再显著($p > 0.05$),当液固比为50:1(mL/g)时,多糖的提取率反而有所下降。这是因为随着液固比增加,多糖的溶出会增加,但过大的液固比会使后续操作体积过大从而增加损耗,反而使提取率下降。

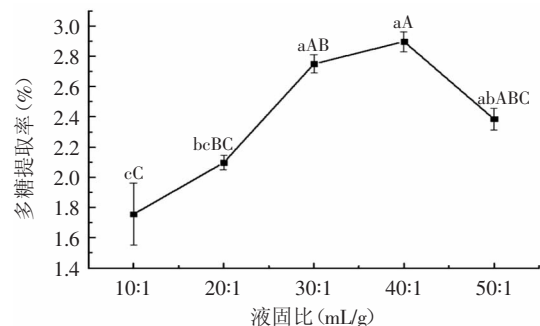


图2 液固比对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of liquid-solid ratio on polysaccharides yield

2.1.3 提取温度对连钱草多糖提取的影响 如图3所示,提取温度对连钱草多糖提取有着显著影响。提取温度为98℃时提取率最高,但与90℃水浴提取相比,差异不显著($p > 0.05$)。这可能是因为提高温度会使植物细胞内的多糖溶出增加,但过高的温度会增加多糖的降解。

2.1.4 提取时间对连钱草多糖提取的影响 如图4所示,随着提取时间的延长,连钱草多糖的提取率也显

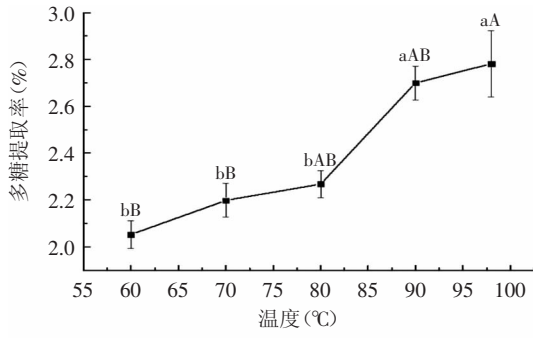


图3 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on polysaccharides yield

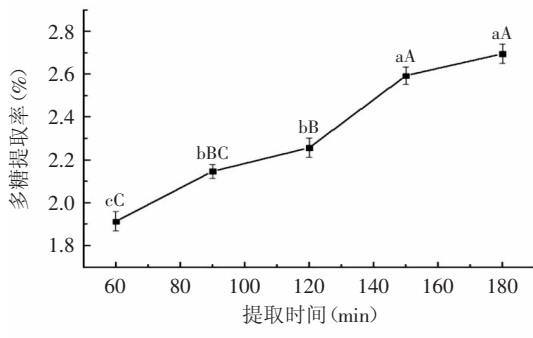


图4 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on polysaccharides yield

著增加,但当提取时间达到150min后,提取率的增加不再显著。这是因为随着加热时间的延长,连钱草多糖溶出增加,细胞内外的多糖浓度梯度降低,最终达到平衡,溶出的多糖不再显著增加。

2.2 Box-Behnken实验结果

2.2.1 回归模型的建立和检验 表2为Box-Behnken实验的结果。采用Design-Expert 8.0统计软件对实验结果进行分析,建立了四元二次回归方程:

$$R=3.32+0.13A+0.13B-0.10C+0.09D-0.01AB-0.09AC+0.14AD+0.068BC+0.15BD+0.04CD-0.28A^2-0.26B^2-0.30C^2-0.26D^2。$$

该模型的决定系数 R^2 为0.9564,校正后的 R^2 为0.9128。对实验结果进行方差分析,结果如表3所示。从中可以得知:模型显著 $p<0.0001$,失拟项不显著,说明该模型与实际情况拟合较好。根据 F 值,各因素对响应值影响大小的顺序为 $B>A>C>D$ 。除AB、BC、CD外,其余因子对提取率的影响均显著,故可将AB、BC、CD从回归方程中删除,因此,最终的回归方程为 $R=3.32+0.13A+0.13B-0.10C+0.09D-0.09AC+0.14AD+0.15BD-0.28A^2-0.26B^2-0.30C^2-0.26D^2$ 。

2.2.2 两因素间的交互作用 作用显著的两因素间的交互作用如图5~图7所示,三组图直观地反应了当其他两个因素处于最佳水平时,pH与提取温度、pH与提取时间和液固比与提取时间的交互作用对连钱草多糖提取率的影响。

图5为液固比为33.3:1(mL/g)、提取时间为160.2min时,提取液pH和提取温度对多糖得率的影响。从图5可以看出,当pH和提取温度都处于低水平时,提取率很低,随着二者的上升,提取率急剧上升,

表2 Box-Behnken实验结果

Table 2 Results of Box-Behnken experiment

实验号	A	B	C	D	R 提取率 (%)
1	-1	-1	0	0	2.58
2	1	-1	0	0	2.74
3	-1	1	0	0	2.94
4	1	1	0	0	3.06
5	0	0	-1	-1	2.88
6	0	0	1	-1	2.63
7	0	0	-1	1	2.89
8	0	0	1	1	2.82
9	-1	0	0	-1	2.66
10	1	0	0	-1	2.65
11	-1	0	0	1	2.60
12	1	0	0	1	3.14
13	0	-1	-1	0	2.80
14	0	1	-1	0	2.90
15	0	-1	1	0	2.44
16	0	1	1	0	2.81
17	-1	0	-1	0	2.55
18	1	0	-1	0	3.12
19	-1	0	1	0	2.50
20	1	0	1	0	2.70
21	0	-1	0	-1	2.72
22	0	1	0	-1	2.64
23	0	-1	0	1	2.62
24	0	1	0	1	3.14
25	0	0	0	0	3.32
26	0	0	0	0	3.24
27	0	0	0	0	3.44
28	0	0	0	0	3.28
29	0	0	0	0	3.32

表3 Box-Behnken实验结果方差分析表

Table 3 ANOVA of Box-Behnken experiment results

来源	离差平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	2.11	14	0.15	21.92	<0.0001	**
A	0.21	1	0.21	30.04	<0.0001	**
B	0.21	1	0.21	30.61	<0.0001	**
C	0.13	1	0.13	18.47	0.0007	**
D	0.088	1	0.088	12.85	0.003	**
AB	4.000E-004	1	4.000E-004	0.058	0.8130	
AC	0.033	1	0.033	4.84	0.0451	*
AD	0.076	1	0.076	10.99	0.0051	**
BC	0.018	1	0.018	2.65	0.1260	
BD	0.090	1	0.090	13.08	0.0028	**
CD	8.100E-003	1	8.100E-003	1.18	0.2963	
A ²	0.50	1	0.50	72.58	<0.0001	**
B ²	0.43	1	0.43	62.80	<0.0001	**
C ²	0.59	1	0.59	86.24	<0.0001	**
D ²	0.43	1	0.43	62.80	<0.0001	**
残差	0.096	14	6.882E-003			
失拟	0.074	10	7.395E-003	1.32	0.4241	
误差	0.022	4	5.600E-003			
总和	2.21	28				

注:*, $p<0.05$,显著;** $p<0.01$,极显著。

当pH和提取温度分别在7.0~7.5和85~90℃范围内时,提取率最高。

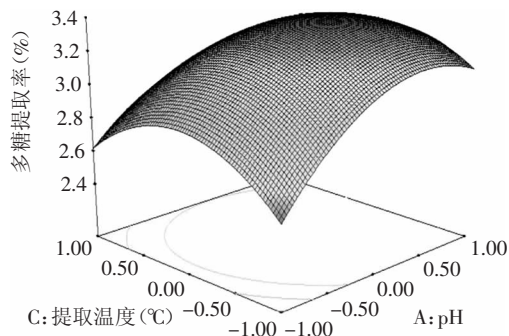


图5 pH和提取温度交互作用对多糖提取率的影响

Fig.5 Interactive effects of pH and extraction temperature on polysaccharides yield

图6表示的是当液固比33.3:1 (mL/g)、提取温度89.2℃时,pH和提取时间的交互作用对多糖提取率的影响。如图6所示,pH和提取时间的增大会显著提高连钱草多糖的得率,当pH在7.0~7.5之间、提取时间在150~180min范围时,多糖的得率达到最大值。

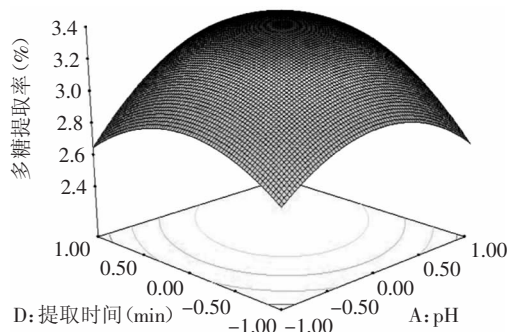


图6 pH和提取时间交互作用对多糖提取率的影响

Fig.6 Interactive effects of pH and extraction time on polysaccharides yield

当pH7.17,提取温度89.2℃时,液固比和提取时间交互作用对多糖产量的影响如图7所示。当液固比较小、提取时间较短时,多糖产量较低,随着液固比的加大、提取时间的延长,多糖产量显著增加。当液固比处于30:1~40:1 (mL/g)、提取时间150~180min时,

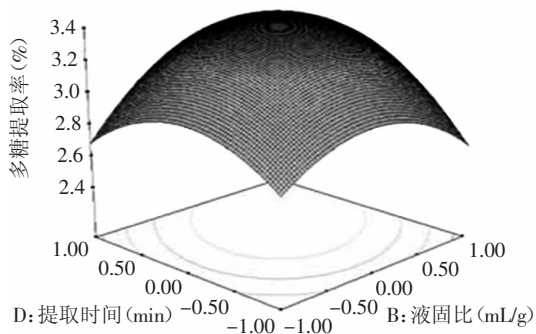


图7 液固比和提取时间对多糖提取率的影响

Fig.7 Interactive effects of liquid-solid ratio and extraction time on polysaccharides yield

多糖产量最高。

2.2.3 最佳工艺优化及验证实验 根据建立的回归方程进行各因素的优化,得到当A=0.34、B=0.33、C=-0.16、D=0.34时,R有极大值3.39%。即当连钱草多糖提取条件为pH7.17、液固比33.3:1 (mL/g)、提取温度89.2℃、提取时间160.2min时,多糖得率可达3.39%。为了方便操作,提取工艺被确定为pH7.2、液固比33:1 (mL/g)、提取温度89℃以及提取时间为160min。对优化的工艺进行三次验证,每次实验重复三次,三次的多糖提取率分别为3.26%±0.05%、3.52%±0.08%、3.41%±0.038%,平均提取率为3.40%±0.05%,说明建立的回归模型有较好的预测性,优化的工艺对生产实践具有很好的指导作用。

3 结论

pH、液固比、提取温度和提取时间是影响多糖提取的四个重要因素,为了研究这四个因素对连钱草多糖提取率的影响,先进行了单因素实验,并在此基础上进行了Box-Behnken响应面实验。得出提取连钱草多糖的最佳工艺是pH7.2、液固比33:1 (mL/g)、提取温度89℃、提取时间160min,并对该工艺进行了验证,连钱草多糖的提取率可达3.40%±0.05%。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010版)一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 袁春玲,王佩琪,郭伟英. 连钱草的降血糖作用及其机制研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(3):57-58.
- [3] 胡万春,郭宇,喻晓洁. 连钱草和金钱草利尿胆活性筛选与比较实验研究[J]. 中华中医药杂志,2007(增刊):234.
- [4] 陶勇,石米扬. 连钱草的抑菌活性研究[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(10):824-825.
- [5] 宋锐,张云,丛晓东,等. 连钱草的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(12):2511-2514.
- [6] 贾琳斐,郭姣,李清宇,等. 响应曲面法优化海红果水溶性多糖提取工艺及抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技,2014,35(10):252-257.
- [7] Li Y,Hu Y,Shi S,et al. Evaluation of antioxidant and immun-enhancing activities of Purslane polysaccharides in gastric cancer rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014,68(1):113-116.
- [8] Shen H,Tang G,Zeng G,et al. Purification and characterization of an antitumor polysaccharide from Portulaca oleracea L.[J]. Carbohydrate Polymers,2013 93(1):395-400.
- [9] Batista J A,Dias EGN,Brito TV,et al. Polysaccharide isolated from Agardhiella ramosissima;Chemical structure and anti-inflammation activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2014,99(1):59-67.
- [10] Kim JP,Song SB,Lee IS,et al. Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,2011,21(11):3483-3487.
- [11] Kumarasamy Y,Cox PJ,Jaspars M,et al. Isolation,structure

(下转第326页)

- [11] 董海丽,刘红. 超高压提取柿叶中熊果酸工艺条件的优化[J]. 湖北农业科学,2012,51(16):3567-3569.
- [12] 蒋珍菊,王周玉. 不同方法提取女贞子中齐墩果酸的含量[J]. 安徽农业科学,2011,39(26):15979-15981.
- [13] 李坤平,潘天玲,贲永光,等. 超声波强化溶剂提取姜味草中熊果酸和齐墩果酸[J]. 林产化学与工业,2009,29(3):111-114.
- [14] 李胜华,伍贤进,郝建平,等. 超声波提取翻白草中熊果酸工艺优化研究[J]. 食品科学,2007,28(8):160-164.
- [15] 霍文兰,范小芹,赵天聪. 超声法提取山楂果中熊果酸和齐墩果酸的工艺研究[J]. 应用化工,2013,42(10):1832-1835.
- [16] 支国. 山楂中主要成分HPLC测定方法的研究[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院,2013.
- [17] 黎海彬. 山楂中熊果酸提取分离的工艺研究[J]. 食品科学,2009,30(16):177-180.
- [18] 颜廷才,孟宪军,李江阔,等. 超声波提取刺嫩芽中齐墩果酸类皂苷的工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(5):170-173.
- [19] 张来新,赵卫星,杨琼. 从中药材女贞子中提取药效成分齐墩果酸最佳工艺研究[J]. 化学工程师,2011,193(10):10-13.
- [20] 任艳利,张相锋,赵玉. 超声波提取准噶尔山楂中的熊果酸与抗氧化研究[J]. 安徽农学通报,2012,18(1):46-48.

(上接第320页)

- elucidation and biological activity of hederacine A and B,two unique alkaloids from Glechoma hederaceae[J]. Tetrahedron, 2003,59(34):6403-6407.
- [12] Yamauchi H,Kakuda R,Yaotta Y,et al. Two New Glycosides from the Whole Plants of Glechoma hederaceae L.[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin,2007,55(2):346-347.
- [13] 杨念云,段金廛,李萍,等. 连钱草中的黄酮类化学成分[J]. 中国药科大学学报,2005,36(3):210-212.
- [14] 樊钰虎,周刚,张璐,等. 连钱草挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析.中国实验方剂学杂志,2010,16(13):41-44.
- [15] 郭晓蕾,朱思潮,翟旭峰,等. 硫酸蒽酮法与硫酸苯酚法测定灵芝多糖含量比较[J]. 中华中医药学刊,2010,28(9):2000-2002.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”优先数字出版库)独家全文收录,所以所付稿酬中已包含该网站及光盘应付的稿酬。