

王莹,王华,丁宁,等. 响应曲面法优化水溶性银杏叶多糖提取工艺[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):268-270.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.089

# 响应曲面法优化水溶性银杏叶多糖提取工艺

王莹<sup>1</sup>,王华<sup>2</sup>,丁宁<sup>1</sup>,贾纪萍<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院动物药学院,江苏泰州 225300; 2. 南京理工大学泰州科技学院化工学院,江苏泰州 225300)

**摘要:**采用银杏叶作为原料,通过水提醇沉法从银杏叶粉中提取可溶性银杏叶多糖,并以多糖提取率为指标,研究提取时间、料液比和提取温度等因素的影响,根据 Box-Behnken 中心组合方法设计试验进行响应面分析,得到的优化工艺条件为:提取时间 3.2 h、料液比 1 g:25 mL、提取温度 83 ℃,此时多糖提取率达 71.42%。

**关键词:**银杏叶;多糖;提取;响应曲面法

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0268-03

银杏是我国特有的老树种之一,除黑龙江、吉林、西藏等气候极端的地区外,我国其他地区均有分布。银杏叶、果和外种皮等皆具有丰富的药用价值,20 世纪 80—90 年代起,银杏的医疗保健和绿化作用引起世人的重视,开发了大量含银杏提取物的药物及保健品,其有效成分主要为黄酮及银杏内酯类化合物<sup>[1-3]</sup>。近年来,相关研究表明银杏叶多糖有多种生物活性,具有广泛的药用价值和医药开发前景<sup>[4-7]</sup>。本研究以银杏叶为原料,以水作为提取剂,采用单因素试验研究不同因素对银杏叶多糖提取的银杏,并通过响应曲面法对提取工艺条件进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

银杏叶采自江苏农牧科技职业学院校内;D-无水葡萄糖,中检所-110833;其余试剂均为市售分析纯。

TE124S 电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;XFB-200 微型高速粉碎机,湖南省吉首市中诚制药机械厂;722N 可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;HH-1 数显恒温水浴锅、78-1 磁力加热搅拌器,江苏省金坛市杰瑞尔电器有限公司。

### 1.2 试验方法

采用蒽酮比色法测定银杏的多糖含量<sup>[8]</sup>。

**1.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制** 精确称取于 105 ℃ 烘干至恒质量的无水葡萄糖 25 mg,溶解并定容至 250 mL,移取 0.00、0.40、0.80、1.20、1.60、2.00 mL 葡萄糖溶液于 10 mL 具塞试管中,分别加蒸馏水至 2 mL,再加入蒽酮-浓硫酸试剂 8 mL 充分混匀,于 100 ℃ 恒温水浴锅中保温 10 min,室温冷却,在 620 nm 波长下测吸光度,以吸光度  $D_{620\text{ nm}}$  对葡萄糖浓度  $C$  绘制标准曲线,进行线性回归,得标准曲线方程(图 1)。

**1.2.2 银杏叶中多糖的提取及含量测定** 将采集的银杏叶晾晒干,粉碎机粉碎,50 ℃ 干燥后放入干燥皿备用。称取 10 g

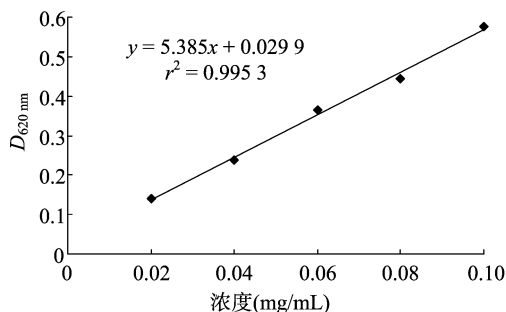


图1 葡萄糖标准曲线

银杏叶粉,按照一定的料液比加入蒸馏水,恒温提取,抽滤,收集滤液。银杏叶提取液中加入适量的乙醚,振荡 10 min,置于分液漏斗中静置分液,收集下层的多糖溶液,以除去脂溶性杂质。使用 Sevag 法<sup>[9]</sup>除多糖中的蛋白质,将脱脂后的银杏叶提取液与 Sevag 试剂以 3:1 混合,充分振荡 20 min,置于分液漏斗中静置分液,取上层溶液,得银杏叶多糖提取液。在装有多糖溶液的烧杯中加入 3 倍体积的 95% 乙醇,静置过夜;将沉淀后的多糖进行抽滤,收集滤饼,用无水乙醇洗涤数次,干燥,获得银杏叶多糖粗品。

将银杏叶多糖粗品用少量蒸馏水溶解后定容至 1 000 mL,精确移取 10.00 mL 多糖溶液于 100 mL 容量瓶中定容,摇匀。精确移取 2.00 mL 银杏叶多糖稀释液于 10 mL 具塞试管中,再加入蒽酮-硫酸溶液 8 mL,振摇均匀,100 ℃ 保温 3 min,取出于室温下冷却 10 min,在 620 nm 下测定其吸光度,通过葡萄糖标准曲线进行分析计算,从而得出银杏叶提取液中多糖的质量。

$$m = (D_{620\text{ nm}} - 0.0299) / 5.385 \times 10 \times 1\,000$$

式中: $m$  为银杏叶多糖粗品中多糖的质量,mg; $D_{620\text{ nm}}$  为稀释后的多糖溶液在 620 nm 下的吸光度;10 为稀释倍数;1 000 为银杏叶多糖溶液体积,mL。

**1.2.3 银杏叶多糖提取率的计算** 分别称取 3 份 10 g 干燥银杏叶粉,用水溶液反复提取,直至提取液中经分光光度法测量不到银杏叶多糖的存在,合并所有提取液,浓缩后,按“1.2.2”节的方法除脂、脱蛋白后测算出银杏叶的多糖含量,经计算,10 g 干燥银杏叶粉中多糖类化合物的平均含量为 962.303 mg。

收稿日期:2014-05-30

基金项目:江苏农牧科技职业学院青年基金(编号:NSFQN1305)。

作者简介:王莹(1983—),女,江苏泰州人,硕士,讲师,主要从事天然产物的提取分离研究。E-mail:wonderful899@126.com。

银杏叶多糖提取率 = 提取出的多糖质量 / 银杏叶粉中可溶性多糖总质量 × 100% =  $m/962.303 \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 浸提时间对银杏叶多糖提取率的影响 分别称取 5 份 10 g 干燥银杏叶粉于 250 mL 三颈烧瓶中,料液比为 1 g : 15 mL,80 ℃,分别浸取 2、3、4、5、6 h 后,抽滤,收集滤液,按照“1.2”节中的方法分别测量计算不同提取温度下的多糖提取率,结果见图 2。

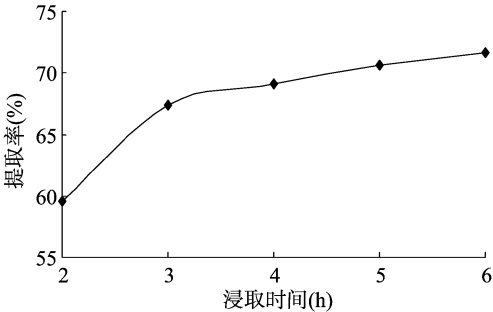


图2 不同浸提时间对银杏叶多糖提取率的影响

由图 2 可知,随着浸提时间的延长,多糖的提取率逐渐增大。当提取时间由提取 2 h 增加到 3 h,提取率由 59.6% 增加到 67.4%,提取率增加了 7.8 百分点;但当浸提时间大于 3 h 时,提取率增加幅度较小,这是由于银杏叶粉中的可溶性多糖扩散到水溶液中的速度与二者中的多糖浓度差成正比<sup>[10]</sup>,当水提液中多糖的浓度与银杏叶细胞中浓度趋于平衡时,多糖的溶出较少。

2.1.2 料液比对银杏叶多糖提取率的影响 称取 6 份 10 g 干燥银杏叶粉于三颈烧瓶中,分别按照料液比 1 g : 10 mL、1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL、1 g : 30 mL、1 g : 35 mL 加入 100、150、200、250、300、350 mL 的蒸馏水,80 ℃ 提取 3 h,抽滤,收集滤液,按照“1.2”节中的方法分别测算不同料液比下的多糖提取率,结果见图 3。

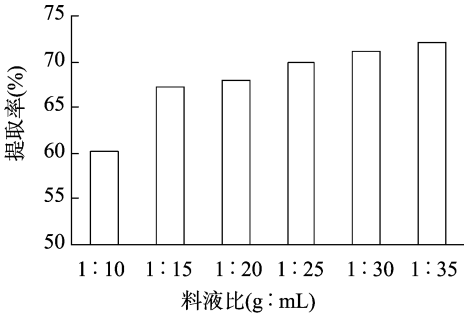


图3 不同料液比对银杏叶多糖提取率的影响

由图 3 可知,溶剂越多,银杏叶多糖的提取率越高,这是因为溶剂的量增加可以提高银杏叶粉与水溶液间的多糖浓度差,有利于多糖向水提液中扩散,从而提高多糖的提取率<sup>[11]</sup>;但是,当料液比达到 1 g : 20 mL 后,提取率增幅较小,继续增加溶剂会使提取过程更加繁琐,不易浓缩。

2.1.3 浸提温度对银杏叶多糖提取率的影响 称取 6 份 10 g 干燥银杏叶粉于三颈烧瓶中,料液比 1 g : 15 mL,分别置于 65、70、75、80、85、90 ℃ 的水浴中浸取 3 h,抽滤,收集滤液,

按照“1.2”节中的方法分别测量计算不同提取温度下的多糖提取率,结果见图 4。

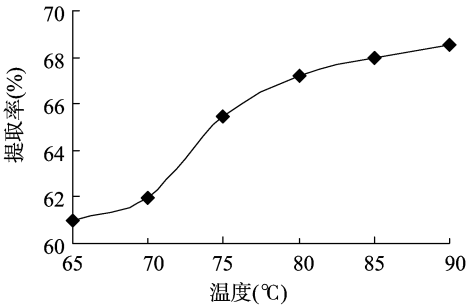


图4 不同浸提温度对银杏叶多糖提取率的影响

由图 4 可知,随着温度的升高,银杏叶粗多糖的提取率增加,当温度从 70 ℃ 增加到 80 ℃ 时,多糖提取率增加幅度最大;温度高于 80 ℃ 时,提取率增幅趋缓。这是由于温度的升高,分子运动加剧,多糖从银杏叶细胞中的溶出速率增加;但是温度过高,使得溶剂挥发加快,影响多糖的提取,且长时间高温浸提可能会影响多糖活性<sup>[12]</sup>。

2.2 响应曲面法优化提取工艺

2.2.1 响应曲面优化试验设计 根据上述单因素试验结果,选择对多糖提取率有显著影响的提取温度、提取时间、料液比 3 个因素,分别以 A、B、C 为代表,以可溶性多糖提取率为响应值(Y),采用 Box - Behnken 试验设计法对银杏叶可溶性多糖提取工艺进行进一步优化。分析因素及水平编码表见表 1,试验方案及结果见表 2。

表 1 不同因素对银杏叶多糖提取率影响的 Box - Behnken 中心组合设计编码水平

编码水平	A:提取温度 (℃)	B:提取时间 (h)	C:料液比 (g : mL)
-1	75	2	1 : 15
0	80	3	1 : 20
1	85	4	1 : 25

表 2 不同因素对银杏叶多糖提取率影响的 Box - Behnken 试验方案与结果

试验 编号	A:温度 (℃)	B:提取时间 (h)	C:料液比 (g : mL)	提取率 (%)
1	80	2	1 : 25	68.9
2	80	3	1 : 20	68.4
3	75	3	1 : 15	57.4
4	80	3	1 : 20	68.8
5	75	4	1 : 20	58.1
6	85	2	1 : 20	69.5
7	80	3	1 : 20	68.3
8	85	4	1 : 20	69.0
9	80	4	1 : 15	65.0
10	85	3	1 : 15	65.9
11	85	3	1 : 25	71.5
12	80	4	1 : 25	69.6
13	75	3	1 : 25	59.4
14	80	2	1 : 15	65.6
15	80	3	1 : 20	68.9
16	75	2	1 : 20	57.6
17	80	3	1 : 20	68.7

据表 2 试验结果,通过 Design - Expert 8.0.6 软件拟合得到影响银杏叶水溶性多糖提取率的回归方程: $Y = 68.62 + 5.43A + 0.013B + 1.94C - 0.25AB + 0.9AC + 0.32BC - 4.4A^2 - 0.67B^2 - 0.67C^2$ 。银杏叶水溶性多糖提取率二次多项回归模型方差分析结果见表 3。二次模型中回归系数的显著性检验结果表明,一次项  $A$ 、 $C$  和二次项  $AC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对多糖的提取率影响极显著,回归模型的复相关系数  $R^2 = 0.9975$ ,模型也是极显著的,表明该回归方程可以较好地描述各因素与响应值(提取率)之间的真实关系,可用来预测响应值。

表 3 不同因素对银杏叶多糖提取率影响的方差分析结果					
变异来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	358.12	9	39.79	314.55 **	<0.000 1
$A$	235.44	1	235.44	1 861.23 **	<0.000 1
$B$	$1.25 \times 10^{-3}$	1	$1.25 \times 10^{-3}$	$9.88 \times 10^{-3}$	0.923 6
$C$	30.03	1	30.03	237.4 **	<0.000 1
$AB$	0.25	1	0.25	1.98	0.202 6
$AC$	3.24	1	3.24	25.61 **	0.001 5
$BC$	0.42	1	0.42	3.34	0.110 3
$A^2$	81.42	1	81.42	643.66 **	<0.000 1
$B^2$	1.90	1	1.9	15.05 **	0.006 1
$C^2$	1.90	1	1.9	15.05 **	0.006 1
残差	0.89	7	0.13		
失拟项	0.62	3	0.21	3.07	0.153 3
纯误差	0.27	4	0.067		
总误差	359	16			

注: \*\* 表示影响极显著 ( $P < 0.01$ )。

2.2.2 银杏叶水溶性多糖提取率的响应面分析由图 5 可知,温度对试验结果的影响最大,表现为曲面最陡,料液比的影响次之,提取时间的影响最小,与上述方差分析结果一致。此外,由方差分析及图 5 可知, $A$ 、 $B$ 、 $C$  三因素之间的交互作用很小, $AB$ 、 $BC$  间的互作对试验结果影响很小。经 Design - Expert 8.0.6 软件分析得出的最佳理论提取方案为:提取温度 83.58 ℃,提取时间 3.12 h,料液比 1 g : 25 mL,银杏叶可溶性多糖的理论提取率为 72.17%。

2.2.3 模型验证 考虑到试验操作的可控性,对上述最佳试验条件进行适当的修正,即提取温度为 83 ℃、提取时间为 3.2 h、料液比为 1 g : 25 mL,进行 3 组平行试验,其实际测得的银杏叶可溶性多糖平均提取率为 71.42%,与预测值 72.17% 较接近,验证了响应面法回归模型的合理性。

3 结论

通过 Design Expert 软件,将响应面分析法应用到银杏叶可溶性多糖的提取工艺上,优化后的银杏叶可溶性多糖提取工艺为提取温度 83 ℃、提取时间 3.2 h、料液比 1 g : 25 mL,在此条件下,银杏叶可溶性多糖提取率达 71.42%。

参考文献:

[1]林 协. 银杏产品开发与市场前景展望[J]. 林业科技开发, 2003,17(4):13-15.

[2]王亭兰,汤 为. 银杏产业的可行性调研报告[J]. 时珍国医国药,2004,15(5):311-312.

[3]宋廷懋. 我国银杏制品市场的现状和未来[J]. 家庭医药,2012(3):30-31.

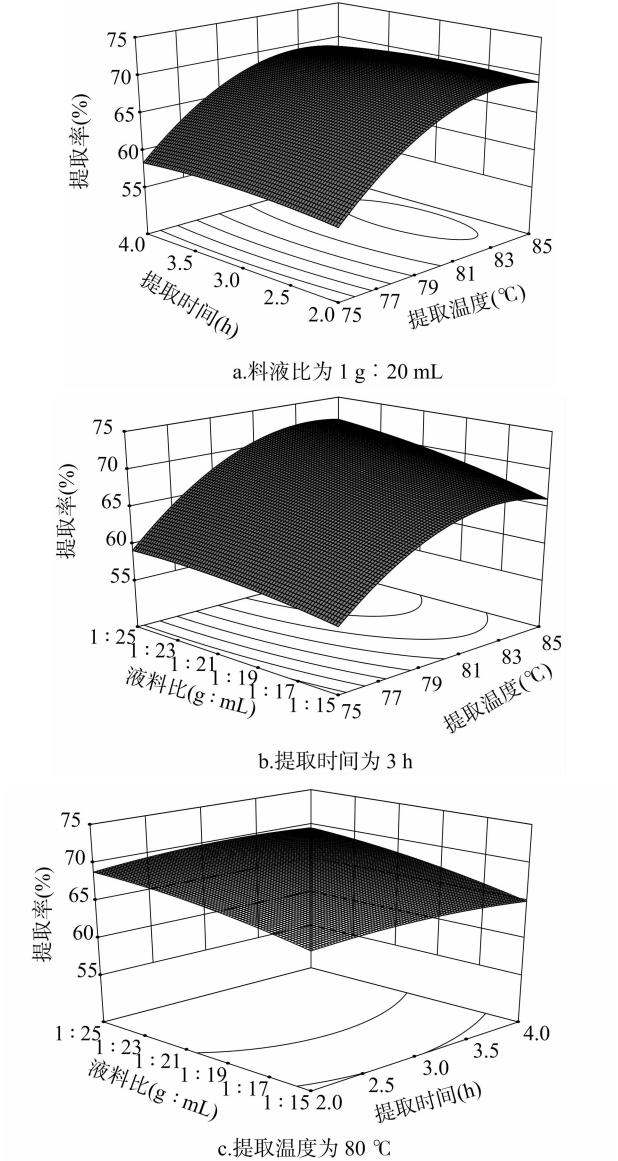


图5 基于响应曲面法不同因素及其交互作用对多糖提取率的影响

[4]张丽娇,苏志刚,佟巨慧,等. 北方春季新鲜银杏叶多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 广东农业科学,2011,38(14):108-109.

[5]侯华新,黎丹戎,黄桂宽,等. 银杏叶多糖在肿瘤放射、化学治疗中的增敏作用研究[J]. 广西医科大学学报,2005,22(1):29-31.

[6]靳菊情,丁东宁,边晓丽,等. 银杏叶多糖的化学及清除羟自由基作用[J]. 西安医科大学学报,2000,21(5):417-419.

[7]张丽娇,佟巨慧,费 瑞. 银杏叶多糖抑制人白血病细胞增殖的试验研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(10):4501-4502.

[8]张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州:浙江人民出版社,1994:12-13.

[9]宋晓凯. 天然药物化学[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社,2010:49.

[10]刘小平,李湘南,徐海星. 中药分离工程[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

[11]王 莹,王 华,王姐姐,等. 花生壳中总黄酮提取工艺的研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):245-247.

[12]李会霞. 茶树菇多糖提取工艺与生物活性关系的研究[D]. 福州:福建农林大学,2010:19.