

张 志,高 畅,付玲玲. 基于星点设计法优化马齿苋多糖的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):207-212.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.039

# 基于星点设计法优化马齿苋多糖的提取工艺

张 志,高 畅,付玲玲

(吉林农业科技学院生物与制药工程学院,吉林吉林 132101)

**摘要:**旨在用星点设计-响应面法优化马齿苋多糖的提取工艺。采用超声辅助提取法提取马齿苋多糖,以多糖提取率为评价指标,通过提物温度、提取时间、料液比、提取次数等单因素结合星点设计法-响应面试验进一步优化提取工艺条件。结果表明,最佳提取工艺为提取温度 70 ℃、提取时间 43 min、料液比 1 g : 23 mL、超声功率 230 W,在该条件下,马齿苋多糖提取率的预测值为 6.419%,实测平均值为 6.524%。由结果可知,该方法模型的预测性良好,提取条件稳定,提取过程简便合理、可靠。

**关键词:**马齿苋;多糖;超声提取;响应面-星点设计;提取率

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)08-0207-06

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.),别称马苋、五行草、长命菜等,属于一年生肉质类草本植物。《本草纲目》记载“其叶并比如马齿,而性滑利似苋,故名马齿苋”<sup>[1]</sup>。马齿苋是被世界卫生组织提名的最有用的药用植物之一,也是药食同源的野生植物之一<sup>[2]</sup>。目前,市场上研发的主要是马齿苋食用产品,如功能饮料,此外还有含有马齿苋的化妆品等,而作为药品使用的马齿苋的利用率较低。马齿苋的活性成分主要有多糖、黄酮、有机酸、生物碱等,目前对于马齿苋多糖的研究主要集中在药理活性方面,对马齿苋多糖的相关研究显示,其药理活性主要是降低血糖数值,也可以降低血脂,同时具有抗氧化、抗病毒等功效,具备很好的药用功能<sup>[3-6]</sup>。

近年来,关于马齿苋多糖提取工艺的研究也陆续有不少报道,大多数采用传统的水提醇沉的提取方法,但是由于水的极性大,容易将马齿苋中溶于水的其他成分一起浸提出来,给后续的分离纯化增加了难度<sup>[7]</sup>。因此,本试验采用星点响应面法优化马齿苋多糖的超声提取工艺,以期实现马齿苋多糖提取的新突破,从而为后续马齿苋多糖的药用价值开发奠定一定的物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

具有根、茎、叶的新鲜马齿苋全株采摘于花期前,采摘地点为吉林省吉林地区,经吉林农业科技学院鉴定确认。

### 1.2 试验试剂

D-葡萄糖(分析纯),天津市恒兴化学试剂制造有限公司;苯酚(分析纯),天津基准化学试剂有限公司;石油醚、丙酮、乙醚(分析纯),天津市致远化学试剂有限公司。

收稿日期:2019-04-01

基金项目:吉林农业科技学院青年基金(编号:吉农院合字[2018]第3004号)。

作者简介:张 志(1981—),男,黑龙江哈尔滨人,硕士,讲师,主要从事药物有效成分提取及药物制剂研究。Tel:(0432)63509964;  
E-mail:zz004@163.com。

[8]林德伯格绑架案[J]. 陈俊强,译. 海外英语,2012(11):48-49.

[9]罗 莎. 四种红木抽提物的 FTIR 与 GC-MS 指纹图谱鉴别研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2013.

[10]杨 柳,方崇荣,于海霞,等. 顶空/气质联用鉴别交趾黄檀与微凹黄檀[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(12):151-156.

[11]朱 涛. 基于 GC-MS 技术不同进样方式的红木识别研究及其指纹图谱构建[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.

[12]薛晓明,谢春平,孙小苗,等. 樟和楠木的木材解剖结构特征和红外光谱比较研究[J]. 四川农业大学学报,2016,34(2):178-184.

[13]Xu B, Zhu T, Li J, et al. Identification of wood between *Phoebe zhennan* and *Machilus pingii* using the gas chromatography-mass spectrometry direct injection technique[J]. European Journal of Mass Spectrometry, 2013, 19(3): 187-193.

[14]王天石,时 浩,陶相宇,等. 基于 GC-MS 技术的桢楠化学辅助鉴定[J]. 东北林业大学学报,2017,45(6):57-60.

### 1.3 仪器与设备

KQ-50DA 型数控超声波提取机, 昆山市超声仪器有限公司; 725N 紫外-可见分光光度计, 上海精科仪器有限公司; R1001-VN 旋转蒸发仪, 郑州长城科工贸有限公司; AUY220 电子分析天平, 日本岛津公司。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 马齿苋多糖的超声提取及含量检测<sup>[8]</sup>

(1) 标准曲线的制备。采用苯酚-硫酸法, 精确称取 1 g 于 105 ℃ 干燥至恒质量的葡萄糖标准品, 以蒸馏水为溶剂, 溶解定容于 100 mL 容量瓶中, 摇匀后从中量取 1 mL 溶液, 定容于 100 mL 容量瓶中并摇匀, 即得 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液。分别准确量取上述溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 5 个 10 mL 容量瓶中, 再各加 1.0 mL 6% 苯酚试剂摇匀, 之后迅速加入 5 mL 浓硫酸溶液, 将试管放入沸水中显色 15 min, 冷却至室温定容。以水为空白, 用紫外-可见分光光度计于 490 nm 波长处测吸光度, 得到葡萄糖标准曲线回归方程。

(2) 马齿苋的前期处理。将新鲜马齿苋全株用自来水冲洗以去除表面杂质, 将冲洗后的马齿苋在阴凉干燥处晾至无水分, 放入 55 ℃ 干燥箱中烘干。将干燥后的马齿苋用粉碎机粉碎, 过 40 目筛后于密封袋中保存。称取适量马齿苋干品置于索氏提取器中, 用 5 倍石油醚连续回流脱脂 2 次, 再用 5 倍 95% 乙醇回流提取 2 次, 以除去马齿苋干品中的单糖、低聚糖、苷类等杂质, 将滤渣于通风处晾干。经上述处理后, 将所得马齿苋粉末于 65 ℃ 恒温干燥箱中干燥至恒质量, 用于多糖的提取。

(3) 马齿苋多糖的超声提取。称取一定量经上述方法处理的马齿苋粉末, 放置在 100 mL 圆底烧瓶中, 以水作为提取溶剂, 按照不同提取温度、提取时间、超声功率、料液比进行提取, 将所得提取液趁热抽滤, 减压浓缩, 离心去除杂质, 加入无水乙醇沉淀, 静置 24 h 后过滤, 用 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤数次, 在 60 ℃ 干燥箱中干燥至恒质量, 即得马齿苋多糖粗品。

(4) 样品液中多糖含量的测定。称取上述试验制得的马齿苋多糖粗品 1 g, 用蒸馏水溶解。按照步骤(1)的方法, 采用苯酚-硫酸法测定马齿苋粗多糖中的多糖含量。测定样品吸光度, 根据葡萄糖标准曲线与回归方程, 计算样品中的葡萄糖含量, 马齿苋多糖提取率的计算公式如下:

$$\text{马齿苋多糖提取率} = \text{样品中的多糖含量} \times \text{粗多糖质量} / \text{原材料质量} \times 100\%$$

1.4.2 单因素的考察 (1) 提取温度对马齿苋多糖提取率的影响。分别准确称取 5 份经“1.4.1”节步骤(2)的方法处理后的马齿苋干品 2 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 按照 1 g : 25 mL 的料液比加入蒸馏水, 在超声功率为 200 W、提取时间为 50 min、提取温度为 40、50、60、70、80 ℃ 的条件下进行 2 次提取试验。所得提取液经离心处理后, 弃去残渣。将上清液浓缩醇沉后定容至 100 mL 容量瓶中, 用移液管精确吸取 3 mL 稀释液加入比色皿中, 再通过苯酚-硫酸法测定其中的多糖含量。

(2) 提取次数对马齿苋多糖提取率的影响。根据“1.4.2”节的试验步骤(1), 设定提取温度为 60 ℃, 进行 1、2、3、4、5 次重复提取试验, 测定所得提取液中的多糖含量。

(3) 提取时间对马齿苋多糖提取率的影响。参照“1.4.2”节的试验步骤(1), 设定提取温度为 60 ℃, 提取时间分别为 20、30、40、50、60 min, 进行 2 次提取试验, 测定所得提取液中的多糖含量。

(4) 料液比对马齿苋多糖提取率的影响。参照“1.4.2”节的试验步骤(1), 设定提取温度为 60 ℃, 提取时间为 40 min, 分别选取料液比为 1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL、1 g : 30 mL、1 g : 35 mL, 进行 2 次提取试验, 测定所得提取液中的多糖含量。

(5) 超声功率对马齿苋多糖提取率的影响。参照“1.4.2”节的试验步骤(1), 设定提取温度为 60 ℃, 提取时间为 40 min, 料液比为 1 g : 25 mL, 分别选取超声功率为 100、200、300、400、500 W, 进行 2 次提取试验, 测定所得提取液中的多糖含量。

1.4.3 响应面优化 以上述单因素预试验结果为基础, 选取马齿苋多糖得率( $y$ )为因变量, 以提取温度( $A$ )、提取时间( $B$ )、料液比( $C$ )和超声功率( $D$ )为自变量。采用响应面-星点设计对试验数据进行拟合, 选择的各水平及其对应的编码值见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄糖标准曲线<sup>[8]</sup>

参照“1.4.1”节的方法, 以吸光度( $D_{490\text{ nm}}$ )为纵坐标、浓度( $C$ )为横坐标, 绘制葡萄糖标准曲线。如图 1 所示, 葡萄糖在 0.02 ~ 0.10 mg/mL 的浓度范围内呈良好的线性关系, 其回归方程如下:  $y = 6.695x + 0.1301$ ,  $r^2 = 0.9937$ 。

表 1 响应面 - 星点设计分析因素与水平

变量值	实际变量				编码值			
	A:提取温度 (℃)	B:提取时间 (min)	C:料液比 (g : mL)	D:超声功率 (W)	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	Z <sub>4</sub>
上水平	70	50	1 : 20	300	1	1	1	1
零水平	60	40	1 : 25	200	0	0	0	0
下水平	50	30	1 : 30	100	-1	-1	-1	-1
上极值	80	60	1 : 15	400	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
下极值	40	20	1 : 35	0	- <i>r</i>	- <i>r</i>	- <i>r</i>	- <i>r</i>
标准差	10	10	1 : 5	100	0	0	0	0

注:*r*、-*r* 分别表示上极值、下极值对应的编码值。

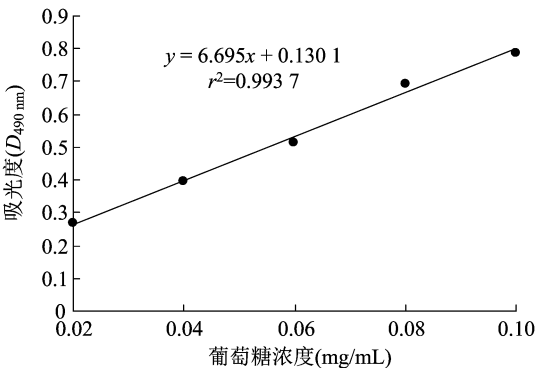


图1 葡萄糖对照品的标准曲线

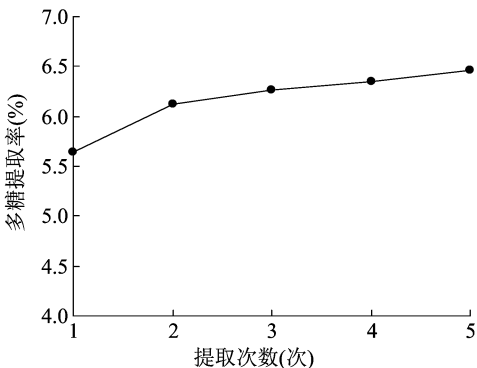


图3 提取次数对马齿苋多糖提取率的影响

2.2 单因素考察结果与分析

2.2.1 提取温度对马齿苋多糖提取率的影响 由图 2 可知,马齿苋多糖提取率随提取温度的增大呈逐步上升的趋势。在 60℃ 时曲线首次达到较高点,当温度继续升高时,曲线趋于水平,由此可见,当温度超过 60℃ 后多糖提取率的变化不明显。

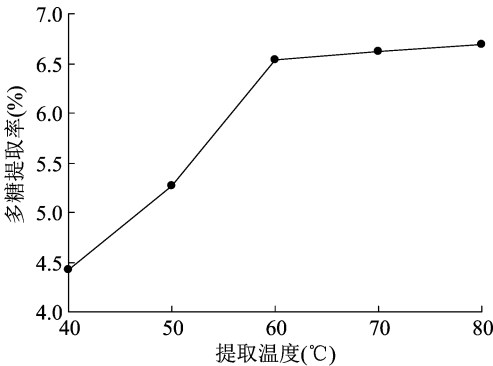


图2 提取温度对马齿苋多糖提取率的影响

2.2.2 提取次数对马齿苋多糖提取率的影响 从图 3 可以看出,提取次数对马齿苋多糖提取率影响的曲线整体趋于水平,可见提取次数对多糖提取率的影响不大。提取次数越多,多糖提取率越高,但是考虑到具体试验操作的可行性和实际性,将提取次数定为 2 次。由于提取次数对多糖提取率的影响不显著,不将其列入星点设计的考察因素中。

2.2.3 提取时间对马齿苋多糖提取率的影响 由图 4 可知,当提取时间为 40 min 时,多糖提取率达到最大值;当提取时间小于 40 min 时,曲线呈明显的上升趋势,多糖提取率升高;当提取时间超过 40 min 时,曲线呈下降趋势,多糖提取率降低。

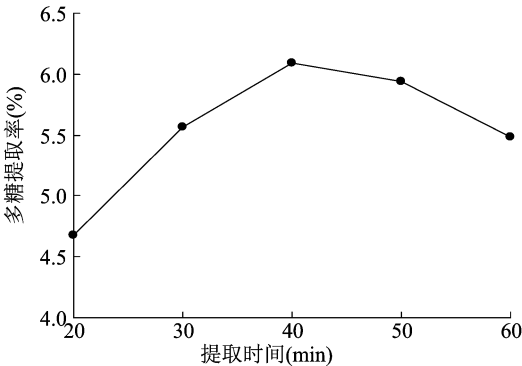


图4 提取时间对马齿苋多糖提取率的影响

2.2.4 料液比对马齿苋多糖提取率的影响 由图 5 可知,当料液比为 1 g : 25 mL 时,多糖提取率高于 6.0%;当料液比超过 1 g : 25 mL 时,虽然多糖提取率随着料液比的增加而继续提高,但多糖提取率的提高幅度逐渐降低;当料液比小于 1 g : 25 mL 时,多糖提取率的提高幅度逐渐上升,可见最初的多糖提取率与料液比呈正相关关系。

2.2.5 超声功率对马齿苋多糖提取率的影响 由图

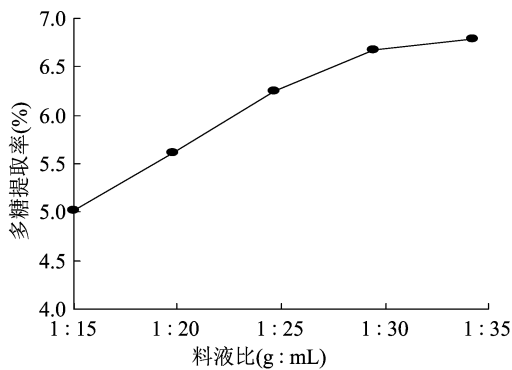


图5 料液比对马齿苋多糖提取率的影响

6 可知,当超声功率为 200 W 时,多糖提取率达到最大值;当超声功率大于 200 W 时,曲线开始急剧下降,多糖提取率降低,说明超声功率过大时,对多糖提取率有较大影响。

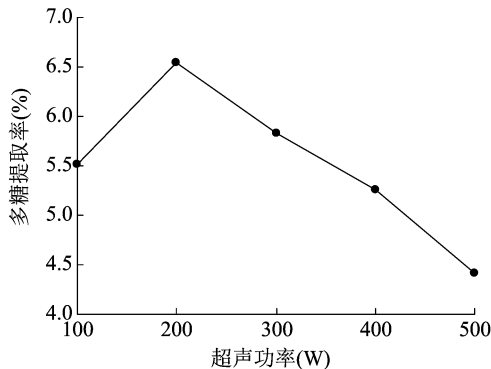


图6 超声功率对马齿苋多糖提取率的影响

2.3 响应面 - 星点设计数据的记录与处理

综合上述单因素试验结果,以马齿苋多糖提取率( $y$ )作为响应值,以提取温度( $A$ )、提取时间( $B$ )、料液比( $C$ )和超声功率( $D$ )作为提取因素进行多元回归拟合,试验结果见表 2。

采用 Design - Expert 10 软件对表 2 中的一些数据进行响应面分析与拟合,以多糖提取率( $y$ )作为响应值,然后对因素  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$  作多元线性回归,并利用二项式方程进行拟合,模型如下:

$$Y = 6.13 + 0.22A + 0.10B + 0.039C + 0.34D - 0.051AB + 0.025AC - 0.032AD - 0.060BC + 0.070BD + 0.041CD - 0.58A^2 - 0.11B^2 - 0.038C^2 - 0.49D^2 \quad (R^2 = 0.9142).$$

为了检验二项式拟合方程的有效性,对所得模型进行了方差分析。由表 3 中的数据可以直观地看出,这个模型有着极高的显著性特点( $P < 0.0001$ ),从失拟项中可以看出,多糖提取率的  $F = 1.89$  ( $P = 0.2152$ ),失拟项不显著,表明这个模型对于多糖提取率的干扰是不显著的,该回归方程与实际的拟合

表 2 响应面 - 星点设计分析组合及试验结果

编号	编码值				多糖提取率 (%)
	A	B	C	D	
1	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	4.82
2	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	5.56
3	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	5.34
4	1.00	1.00	-1.00	-1.00	4.98
5	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	4.82
6	1.00	-1.00	1.00	-1.00	5.35
7	-1.00	1.00	1.00	-1.00	4.64
8	1.00	1.00	1.00	-1.00	5.72
9	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	4.96
10	1.00	-1.00	-1.00	1.00	5.75
11	-1.00	1.00	-1.00	1.00	5.79
12	1.00	1.00	-1.00	1.00	6.15
13	-1.00	-1.00	1.00	1.00	5.74
14	1.00	-1.00	1.00	1.00	5.82
15	-1.00	1.00	1.00	1.00	5.67
16	1.00	1.00	1.00	1.00	5.91
17	-2.00	0.00	0.00	0.00	5.47
18	2.00	0.00	0.00	0.00	6.34
19	0.00	-2.00	0.00	0.00	5.43
20	0.00	2.00	0.00	0.00	5.97
21	0.00	0.00	-2.00	0.00	5.83
22	0.00	0.00	2.00	0.00	6.14
23	0.00	0.00	0.00	-2.00	3.28
24	0.00	0.00	0.00	2.00	5.11
25	0.00	0.00	0.00	0.00	6.11
26	0.00	0.00	0.00	0.00	6.09
27	0.00	0.00	0.00	0.00	5.95
28	0.00	0.00	0.00	0.00	6.21
29	0.00	0.00	0.00	0.00	6.19
30	0.00	0.00	0.00	0.00	6.24

误差很小,完全能够用来进行预测和分析,非常适合用于分析马齿苋超声提取多糖的流程和工艺优化。由  $P$  值可以看出,  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$ 、 $AB$ 、 $AC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  这几个变量对于多糖提取率都有不同程度的干扰作用。

2.4 响应面参数优化与最佳工艺条件的预测

2.4.1 最佳工艺条件的预测 根据上述回归分析结果,将多糖提取率与影响因素  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$  及其交互作用拟合为三维曲面图,以拟合目标函数为数学模型,绘制因素间的等高线和三维(3D)响应图,以期确定马齿苋多糖提取的最佳工艺条件。图 7 中的颜色变化越快、坡度越大、三维图的倾斜率越高,对试验结果的影响越显著。在选定的范围内,等高线中最小椭圆中心位置的点,既是极值,也是 3D 响应

面的最高点。等高线呈圆形,表示 2 个因素的交互作用不明显,等高线呈椭圆形则相反。对马齿苋多糖提取率影响最大的因素是超声功率,其次是提取温度和料液比,而提取时间的影响最小。由图 7 还可以看出,除了提取时间和超声功率外,各因素间

均有比较明显的交互作用。

2.4.2 最佳提取工艺的确定及验证试验 通过 Design - Expert 10 软件对二项式模型进行相关预测后,笔者获取了最佳工艺流程:提取温度为 70 ℃,时间为 42.7 min,料液比为 1 g : 23 mL,超声功率为

表 3 马齿苋多糖提取工艺与模型的显著性分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	11. 01	14	0. 95	48. 52	<0. 000 1	***
A	4. 87	1	4. 87	157. 11	<0. 000 1	***
B	1. 91	1	1. 91	58. 96	<0. 000 1	***
C	0. 54	1	0. 54	35. 36	0. 000 2	**
D	3. 82	1	3. 82	108. 96	<0. 000 1	***
AB	0. 16	1	0. 16	11. 84	0. 010 2	*
AC	0. 11	1	0. 11	6. 82	0. 047 7	*
AD	0. 087	1	0. 087	4. 42	0. 083 4	
BC	0. 092	1	0. 092	5. 04	0. 055 3	
BD	0. 067	1	0. 067	3. 28	0. 105 8	
CD	0. 040	1	0. 040	2. 16	0. 136 5	
A <sup>2</sup>	0. 31	1	0. 31	25. 44	0. 000 4	**
B <sup>2</sup>	2. 15	1	2. 15	128. 52	<0. 000 1	***
C <sup>2</sup>	0. 28	1	0. 28	16. 80	0. 002 8	*
D <sup>2</sup>	1. 61	1	1. 61	90. 08	<0. 000 1	***
残差	0. 19	15	0. 018			
失拟性	0. 13	5	0. 022	1. 89	0. 215 2	
纯误差	0. 056	5	0. 016			
总差	12. 05	29				

注:\*\*\* 表示差异极显著( $P<0.000\ 1$ );\*\* 表示差异高度显著( $P<0.001$ );\* 表示差异显著( $P<0.05$ )。

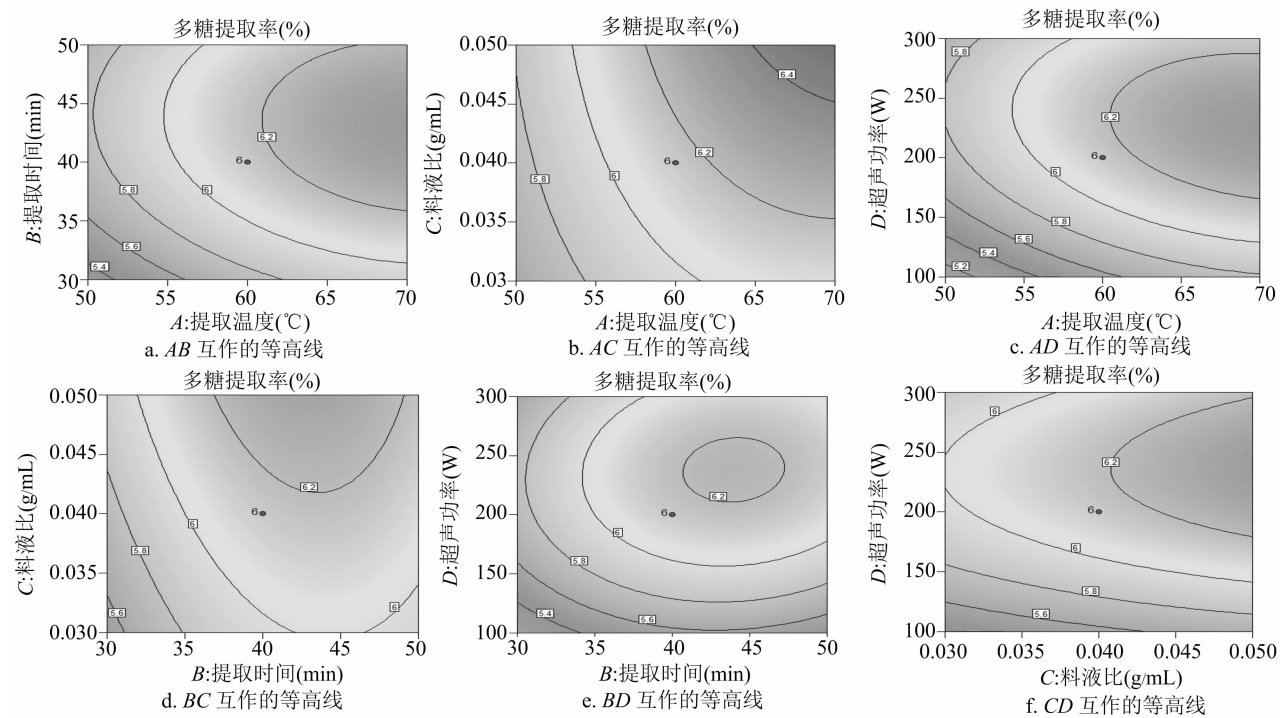


图7 A、B、C、D因素对多糖提取率影响的等高线与响应面

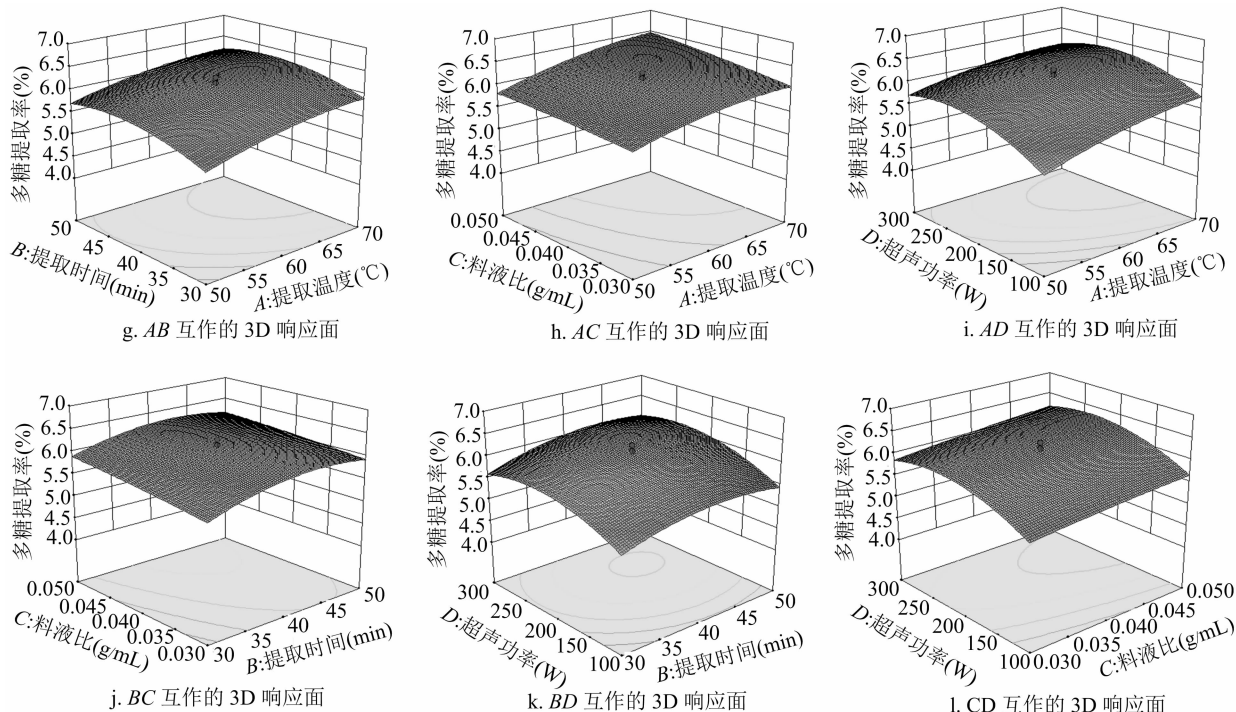


图7(续)

230 W,在该条件下,所得多糖提取率为 6.524%。考虑到试验的可操作性,将提取时间修正为 43 min。为了验证提取工艺的有效性,按照修正后的最佳提取工艺,本研究进行了 3 次平行试验,最后得到多糖提取率均值为 6.419%,实际值对于预测值的相对误差为 1.61%,说明用响应曲面法-星点分析得到的理论最佳工艺具有一定的可信度和有效性。

### 3 结论

本试验采用超声技术提取马齿苋中的多糖,以单因素试验为基础,通过响应曲面法-星点分析多元回归拟合,对影响多糖提取率的主要 4 个因素(提取温度、提取时间、料液比、超声功率)进行考察,建立相互作用的数学模型,得到的最终提取工艺条件如下:温度为 70 ℃,时间为 43 min,料液比为 1 g:23 mL,超声功率为 230 W,多糖提取率为 6.419%。结果说明,基于星点-响应面法确定的提取工艺条件相对于传统的提取方法可行,多糖提取

率有所提高。

### 参考文献:

- [1]雷红伟. 马齿苋黄酮有效部位改善胰岛素抵抗的作用机理研究[D]. 武汉:华中科技大学,2010:13.
- [2]罗开萍,李 艳,陈可宙,等. 我国马齿苋研究现状分析[J]. 现代农业科技,2010(1):110-111.
- [3]田光辉,刘存芳,赖普辉. 马齿苋多糖的超声提取及活性试验研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(2):7-10.
- [4]王晓波,刘殿武,丁月新,等. 马齿苋多糖对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能作用[J]. 中国公共卫生,2005,21(4):462-463.
- [5]朱晓霞,吴向阳,仰榴青,等. 马齿苋粗多糖的提取及清除羟自由基活性作用[J]. 江苏大学学报(医学版),2007,17(1):57-60.
- [6]崔 旻,尹 苗,安利国. 马齿苋多糖的抗肿瘤活性[J]. 山东师大学报(自然科学版),2002,17(1):73-76.
- [7]赵 宇,彭晓霞. 多糖类化合物提取工艺研究[J]. 甘肃科技纵横,2006,35(2):223-224.
- [8]高 畅,付玲玲,张 志. 马齿苋多糖的提取工艺优化[J]. 吉林农业,2018(7):52-53.