响应面法优化核桃分心木中多糖的提取工艺

杨 飞 1#, 阿吉然姆·阿布拉 2#, 木巴拉克·伊明江 2, 海力茜·陶尔大洪 2*

(1. 新疆维吾尔自治区分析测试研究院,乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011)

摘 要:目的 优化核桃分心木中多糖的提取工艺。方法 采用超声提取法对核桃分心木中多糖进行提取, 以多糖含量为考察指标, 在单因素实验的基础上, 研究超声提取温度、超声提取时间、料液比对核桃分心木多糖含量的影响, 并采用响应面法优化核桃分心木多糖含量的提取工艺。结果 核桃分心木中提取多糖的最佳工艺参数为:超声提取温度为 60 ℃、超声提取时间为 40 min、料液比为 1:15(m/V)。采用此条件此方法提取核桃分心木中多糖,含量为 17.42%,相对标准偏差为 0.273%。结论 采用响应面优化法得到的提取条件参数准确可靠,具有实际应用价值。

关键词:核桃分心木;多糖;超声提取;响应面法

Optimization of extraction process of polysaccharide from *Diaphragma* juglandis Fructus by response surface method

YANG Fei^{1#}, AJIRANMU·A-Bu-La^{2#}, MUBALAKE Yi-Ming-Jiang², HAILIQIAN·Tao-Er-Da-Hong^{2*}

(1. Xinjiang Institute of Analysis and Testing, Urumqi 830011, China; 2. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of polysaccharide from *Diaphragmajuglandis Fructus*. **Methods** Polysaccharide were extracted from *Diaphragma juglandis* Fructus by ultrasonic extraction. Taking the polysaccharide content as an index, the effects of ultrasonic extraction temperature, ultrasonic extraction time and feed-liquid ratio on the extraction process of polysaccharide from *Diaphragma juglandis* Fructus were studied on the basis of single-factor experiment, and the extraction process of polysaccharide from *Diaphragma juglandis* Fructus was optimized by response surface method. **Results** The optimum extraction parameters of polysaccharide from *Diaphragma juglandis* Fructus were as follow: ultrasonic extraction temperature was 60 °C, ultrasonic extraction time was 40 min, the soild liquid ratio was 1:15(m/V). Under these condition, the polysaccharide content increased to 17.42%, and relative standard deviation was 0.27%. **Conclusions** The parameters obtained by response surface optimization method are accurate and reliable, and have practical application value.

KEY WORDS: Diaphragma juglandis Fructus; polysaccharides; extraction parultrasons; response surface

基金项目: 自治区'十三五'重点学科建设(1007)

Fund: Supported by the Key Disciplines Construction in the 13th Five-Year Plan of the Autonomous Region (1007)

[&]quot;杨飞、阿吉然姆·阿布拉为共同第一作者。

^{*}YANG Fei and AJIRANMU A-Bu-La are co-first authors.

^{*}通讯作者: 海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: hailiqian2471@sina.com

^{*}Corresponding author: HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong, Professor, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: hailiqian2471@sina.com

1 引言

核桃隔膜中医又称核桃分心木(Diaphragma juglandis Fructus), 简称分心木[1]。药理研究表明其对遗精、淋病、 血尿、带下、泻痢等疾病[2]有良好的作用。目前, 国内外 对核桃属植物其他部位药用性研究较多, 从核桃仁、青皮、 壳枝叶等部位发现抗肿瘤、抗氧化活性成分[3,4]。近年来新 疆医科大学朱青梅[5]对新疆地区核桃品种的核桃分心木研 究发现, 多糖是核桃隔膜主要有效成分之一。然而未有 核桃分心木多糖提取工艺的优化,造成资源浪费。多糖 具有提高机体免疫力、抵抗细菌、抵抗病毒、防止衰老、 抵抗肿瘤、抗突变[6];同时对细胞毒性极小,作为药物对 治疗多种免疫缺损疾病和自身免疫疾病有显著的效果[7], 而且糖的结构也影响到与其相连的蛋白质的功能[8]。目 前涉及多糖主要的提取方法有超声提取法、酶提取法、 红外辐射法、水提醇沉法等。超声提取法具有操作时间 短,受热均匀,试剂用量少,易于控制等特点,是一种 高效可行的提取方法[9,10]。本研究通过采用单因素实验 和响应面法结合[11-16],对核桃分心木中多糖的提取工 艺进行优化, 为其药材质量的评价及其开发利用提供科 学的理论依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

2.1.1 实验仪器

UV-2700 型紫外分光光度仪(日本岛津公司); SK8210HP 型超声清洗仪(上海科导超声清洗仪有限公司); DK-S24 水浴锅(上海市力辰实验设备有限公司); FW-100 型高速万能粉碎机、TDL-5A 型离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司); XPE 型分析天平[0.0001 g, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

2.1.2 样品与试剂

核桃分心木来自新疆沙雅县核桃中的隔膜,由新疆 医科大学生药教研室帕丽达·阿不力孜教授鉴定为核桃分 心木(Diaphragma juglandis Fructus)。

苯酚、浓硫酸(分析纯, 天津市天新精细化工厂); 乙醇、氯仿、正丁醇、丙酮(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

葡萄糖对照品溶液^[14]:精密称取葡萄糖对照品10.00 mg,用水溶解并定容于100 mL容量瓶,摇匀,最终得0.100 g/L的葡萄糖对照品溶液。

苯酚溶液的制备: 精密取苯酚 5.0 g, 加水定容至到 100 mL, 即得。

2.2.2 供试品配制

取核桃分心木适量,按照一定的料液比,在一定温度下超声提取一定时间。过滤,浓缩,除蛋白(氯仿:正丁醇=4:1, V/V),共5次,石油醚脱脂,加乙醇调至溶液醇量为80%,4℃静置过夜,过滤,沉淀用乙醇洗涤1次,再用丙酮洗涤1次,干燥多糖密封备用[11]。精密称取干燥至恒重的核桃分心木多糖5mg,定容至100mL容量瓶。

2.2.3 检测波长的确定

精密取对照品溶液、供试品溶液适量于具塞试管中,依次加入定量的水、5%(V/V)苯酚-浓硫酸溶液^[12,13],于95°C水浴恒温加热 15 min,冷却至室温,在可见光波长300~800 nm 范围内扫描,最终确定其得最大吸收波长为490 nm。同法配制分心木多糖样品溶液,测定最大波长为490 nm^[11]。

2.2.4 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL于具塞试管中,加入一定量的水、5%(V/V)苯酚-浓硫酸溶液,于 95 °C水浴恒温加热 15 min,冷却至室温,冷却至室温,在最大吸收波长处分别测定吸光度,以 A 值为纵坐标(Y),以浓度(mg/mL)为横坐标(X),绘制标准曲线。

2.2.5 单因素实验

选择超声提取时间、超声提取温度、料液比 3 个因素,超声提取时间采用 20、30、40、50 min 4 个水平;超声提取温度 50、60、70、80 $^{\circ}$ C 4 个水平;料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25 (g/mL) 4 个水平,确定其适宜的提取范围,每组实验重复 3 次。

3 结果与分析

3.1 方法学考察

3.1.1 线性关系

在 $2.90\sim14.30 \,\mu\text{g/mL}$ 范围内,葡萄糖标准曲线方程为 Y=51.654X+0.0372, $r^2=0.9997$ 。葡萄糖对照品溶液测得的吸光度值呈良好的线性关系(见图 1)。

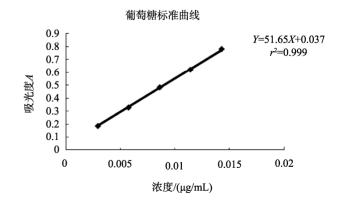


图 1 葡萄糖对照品标准曲线 Fig.1 Standard curve of glucose control substance

3.1.2 仪器精密度

精密量取 0.4 mL 5 份样品葡萄糖对照品溶液,按水 -5%(V/V)苯酚-浓硫酸方法处理,于最大吸收波长处连续测定吸光度,计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.90%(n=5),表明仪器精密度良好。

3.1.3 方法稳定性

精密量取 0.4 mL 供试品溶液, 按精密量取 0.4 mL 5 份样品葡萄糖对照品溶液, 按水-5%(V/V)苯酚-浓硫酸方法进行处理, 在室温分别放 0、30、60、90、120 min 分别测定吸光度。计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.28%(n=5),表明供试品溶液在 120 min 之内稳定性良好。

3.1.4 方法回收率与精密度

取已知多糖的含量的供试品溶液 9 份,每份各 0.2 mL,接低、中、高浓度依次加入对照品 0.04、0.06、0.08 mL 各 3 份,测定回收率,计算 RSD,结果如表 1 所示。该方法低、中、高浓度回收率平均值分别为 97.30%、100.03%、98.70%,方法准确性好,回收率良好。

表 1 回收率实验测定结果(n=9)
Table 1 Experimental results of recovery (n=9)

对照品加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.04	96.5		
0.04	99.7	97.3	
0.04	95.7		
0.06	100.1		
0.06	99.8	100.0	1.67
0.06	100.2		
0.08	99.7		
0.08	97.8	98.7	
0.08	98.6		

3.2 单因素实验结果

3.2.1 超声提取温度对核桃分心木中多糖类物质提取的 影响

从图 2 可知,提取温度低于 60 ℃时,随着温度的升高,多糖的含量不断提高;超过 60 ℃时,多糖的含量逐渐下降。在 60 ℃时,多糖的含量最高,为 15.23%。这可能是由于随着体系温度的升高,植物多糖在溶剂体系中的溶解度以及扩散系数均会随之增大。然而当体系温度过高,则会导致部分多糖降解,从而降低多糖的含量。故选择 60 ℃为最适提取温度。

3.2.2 超声提取时间对核桃分心木中多糖类物质的提取的影响

从图 3 可知, 提取时间在 40 min 之内, 随着时间的增

加多糖含量逐步增加,在 40 min 时多糖含量达到 15.62%,之后稍有下降趋势。故选择 40 min 为最适提取时间。

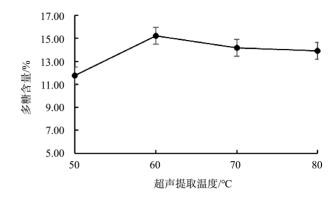


图 2 超声提取温度与核桃分心木中多糖含量的关系(n=3) Fig.2 The relationship between ultrasonic extraction temperature and the content of polysaccharide of walnut distraction(n=3)

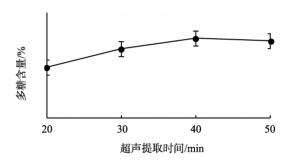


图 3 超声提取时间与核桃分心木中多糖含量的关系(n=3) Fig.3 The relationship between ultrasonic extraction time and the content of polysaccharide of *Diaphragma juglandis* Fructus(n=3)

3.2.3 料液比核桃分心木中多糖类物质提取的影响

从图 4 可知,料液比在 1:15(m/V)时,所得核桃分心木中多糖的含量最高为 14.72%,而料液比增高时,核桃分心木中多糖的含量呈下降趋势,可能是因为料液比在1:15(m/V)时多糖类物质已达到饱和,提高料液比反而会促进其他杂质溶出,造成提取溶剂的浪费。操作难易以及后期的浓缩,纯化等因素,最终选取料液比为 1:15(m/V)。

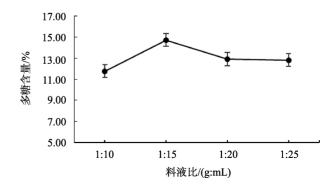


图 4 料液比与核桃分心木中多糖含量的关系(n=3)

Fig. 4 The relationship between the ratio of feed to liquid and the content of polysaccharide of *Diaphragma juglandis* Fructus(*n*=3)

3.3 响应面实验

3.3.1 实验设计及结果

根据单因素试验结果,选取超声提取温度 $A(^{\circ}C)$ 、超声提取时间 $B(\min)$ 、料液比 C(g/mL)为自变量,多糖含量

为响应值,设计 3 因素 3 水平对核桃分心木中多糖的提取工艺进行优化。响应面实验设计因素水平表见表 2。通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平的响应面分析,所得试验组合和结果如表 3 所示。

表 2 响应面试验设计因素水平表
Table 2 Response surface test design factor level table

序号	水平	A 超声提取温度/℃	B 超声提取时间/min	C 料液比/(g/mL)
1	-1	50	30	1:10
2	0	60	40	1:15
3	1	70	50	1:20

表 3 Box-Behnken 响应面法分析实验结果 Table 3 Results of Box-Behnken response surface analysis

Table 3	Results of Box-Behnken response surface analysis			
序号	A/°C	B/min	C/(g/mL)	多糖含量/%
1	0	-1	1	14.88
2	0	1	1	15.027
3	1	1	0	15.681
4	0	0	0	17.35
5	-1	-1	0	14.344
6	-1	1	0	14.89
7	0	-1	-1	13.69
8	-1	0	-1	13.75
9	1	0	-1	14.38
10	0	0	0	17.45
11	0	0	0	17.43
12	0	1	-1	15.62
13	1	0	1	14.11
14	-1	0	1	14.22
15	1	-1	0	13.66
16	0	0	0	17.45
17	-1	1	0	15.201

3.3.2 模型的建立与统计分析

利用 Design-Expert8.0.6 软件对表 3 中的数据进行多元回归拟合,得到核桃分心木中多糖含量 Y(%)对编码自变量超声提取温度 $A(^{\circ}C)$ 、超声提取时间 $B(\min)$ 、料液比 $C(g/\text{mL}):Y=17.42+0.048A+0.61B+0.10C+0.31AB-0.19AC-0.45BC-1.70A^2-1.01B^2-1.6C^2$

3.3.3 方差分析结果

对该回归方程进行方差分析,模型项达到高度显著 (P<0.0001),失拟项不显著(P>0.05),说明该模型构建成功。 模型的决定系数 R^2 =0.9941,校正后的决定系数 R^2 adj=0.9866,说明该模型能够解释 98.66%的多糖含量的变化,可用此回归方程对桃分心木中多糖含量进行理论预

测。根据 F 值的大小可知 3 个试验因素对多糖得率影响的顺序依次为: 超声提取时间 B(min)、料液比 C(g/mL)、超声提取温度 $A(^{\circ}C)$,其中一次项 B 交互项 AB、AC 和二次项 A^{2} 、 B^{2} 、 C^{2} 对多糖得率的影响极显著 (P<0.01);其余项对指标影响不显著。

3.3.4 响应面曲面分析与优化

图 4~5 可知,超声提取温度和提取时间、超声提取温度和料液比的交互作用影响极显著,与方差分析试验结果相符合。

3.4 验证实验

通过软件 Design-Expert 8.0.6 得出最佳提取工艺条件:超声提取温度(A)为 60 °C,超声提取时间(B)为 42 min、料液比(C)1:15(g/mL)理论预测总多糖含量 17.457%。但考虑实际操作范围将此条件稍作修改,超声提取温度(A)为 60 °C,超声提取时间(B)为 40 min、料液比(C)1:15(g/mL),为了验证优化工艺条件,进行 3 次平行实验,多酚含量平均值 17.42%、RSD 为 0.273%,与理论含量预测值 17.457%相比,相差 0.037%,误差为 0.21%。因此,利用响应面法优化得到的提取条件参数准确可靠。

4 结 论

(1)拟合的多元回归方程的相关系数及变异系数均表明,模型方程能够较好地反映真实的实验值。在所选因素水平内超声提取温度 $A(^{\circ}C)$,超声提取时间 $B(\min)$ 、料液比 C(g/mL),其中一次项 B 交互项 AB、AC 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对多糖得率的影响极显著(P<0.01); (2)核桃分心木中多糖含量的最佳提取工艺条件: 提取率基本接近。因此超声提取温度(A)为 60 $^{\circ}C$,超声提取时间(B)为 40 \min 、料液比(C)1:15(g/mL),此时核桃分心木中多糖含量平均值 17.42%,与理论含量预测值 17.457%相比,相差 0.037%,误差为 0.21%。利用响应面法优化得到的提取条件参数准确可靠,为核桃分心木的开发利用提供了理论依据。

表 4 方差分析表 Table 4 Analysis of variancetable

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	30.453	9	3.384	131.572	< 0.0001	**
A-超声提取温度	0.020	1	0.020	0.777	0.4072	
B-超声提取时间	3.213	1	3.213	124.944	< 0.0001	**
C-料液比	0.079	1	0.079	3.087	0.1223	
AB	0.444	1	0.444	17.252	0.0043	**
AC	0.137	1	0.137	5.323	0.0544	
BC	0.795	1	0.795	30.904	0.0009	**
A^2	12.024	1	12.024	467.552	< 0.0001	**
B^2	4.259	1	4.259	165.617	< 0.0001	**
C^2	10.652	1	10.652	414.195	< 0.0001	**
残差	0.180	7	0.026			
失拟项	0.125	3	0.042	3.043	0.1552	
纯误差	0.055	4	0.014			
总变异	30.633	16				
$R^2 = 0.9941$	R^2 adj=0.9866					

注"*"表示 P<0.05, 差异显著; "**"表示 P<0.01, 差异极显著。

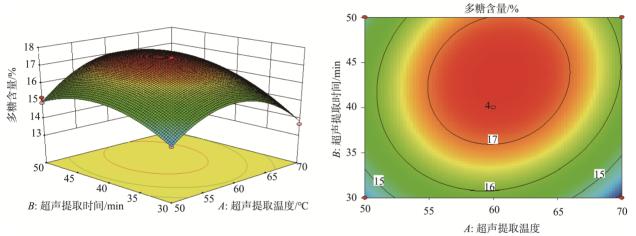


图 5 超声提取温度和提取时间的交互作用对多糖含量影响的响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots of the interaction effect of ultrasonic extraction temperature and ultrasonic extraction time on polysaccharide content

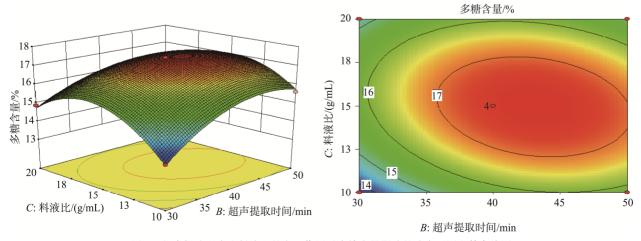


图 6 超声提取温度和料液比的交互作用对多糖含量影响的响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots of the interaction effect of ultrasonic extraction temperature and liquid-solid ratioon on polysaccharide content

参考文献

- [1] 李治珍, 胡译文. 核桃分心木研究进展与开发现状[J]. 现代农业科技, 2017. 1(20): 138-139.
 - Li ZZ, Hu YW. Research progress and development status of walnut distraction [J]. Mod Agric Sci Technol, 2017, 1(20): 138–139.
- [2] 令狐晨. 新疆分心木体外抗肿瘤作用及其化学成分的研究[D]. 乌鲁木 齐: 新疆医科大学, 2016.
 - Ling HC. In vitro antitumor activity and chemical composition of distracted wood in Xinjiang [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2016.
- [3] 韩艳春. 维吾尔药新疆核桃分心木有效化学成分及其药理作用的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2010.
 - HanYC. Study on the active chemical constituents and pharmacological effects of Xinjiang walnut distraction wood [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2010.
- [4] 毛晓英,吴庆智,田洪磊,等. 核桃仁抗氧化作用研究进展[J]. 中国油脂,2017,48(8): 82-85.
 - Mao XY, Wu QZ, Tian HL, et al. Advances in studies on antioxidant effects of walnut rens [J]. China Oils Fats, 2017, 48(8): 82–85.
- [5] 朱青梅. 维吾尔药材核桃分心木化学成分、质量标准及其活性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学、2015.
 - Zhu QM. A study on chemical composition, quality standard and activity of walnut distraction wood from uighur medicinal materials [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2015.
- [6] 吴威. 山核桃壳的化学成分及抗结肠癌活性研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2012.
 - Wu W. Chemical constituents and anti-colorectal cancer activity of pecan shell [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2012.
- [7] 毕肯·阿不得克里木,韩艳春,阿依吐伦·斯马义. 核桃分心木化学成分的预试验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(9): 1044–1046.
 - Biken A, Han YC, Ayitulen S. A pre-test study on chemical composition of distracted wood in walnut [J]. J Xinjiang Med Univ, 2010, 33(9): 1044–1046
- [8] 吕建平,张直峰,聂倩,等. 核桃青皮多糖超声辅助提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学,2014,53(5):1148-1152.
 - Lv JP, Zhang ZF, Nie Q, *et al.* A study on ultrasonic assisted extraction technology and antioxidant activity of walnut green skin polysaccharide [J]. Hubei Agric Sci, 2014, 53(5): 1148–1152.
- [9] 吴素仪,丘泰球,范晓丹.超声波在中草药有效成分提取应用中的研究进展[J]. 江苏中医药,2008,40(7):93-94.
 - Wu SY, Qiu TQ, Fan XD. Advances in the application of ultrasound in extracting active components of Chinese herbal medicine [J] Jiangsu Tradit Chin Med, 2008, 40(7): 93–94.
- [10] 王艳, 茹仙古丽·哈斯木, 韩艳春, 等. 苯酚-硫酸法测定维吾尔药核桃 分心木多糖的含量[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(2): 35–37.
 - Wang Y, Ruxianguli·HSM, Han YC, *et al.* Determination of polysaccharide from distracted wood of Uyghur pecan by phenol-sulphuric acid method [J]. Asia Pacific Tradit Med, 2012, 8(2): 35–37.
- [11] 陈莉, 乔丽洁, 莫罕美竟也, 等. 响应面法优化库尔勒香梨中三萜类化合物提取工艺及其抗氧化活性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3170.

- Chen L, Qiao LJ, Mohan Mei, *et al.* Extracting total triterpenes from Korla pear with response surface methodology [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(10): 3170.
- [12] 罗兰,李欢欢. 汪芳. 等. 响应面法优响应面法和正交实验优化天山岩 黄芪多酚提取工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3157-3158
 - Luo L, Li HH, Wang F, et al. Optimization of the extraction and purification process of polyphenols from *Hedysarum semenovii* Regel et Herder by response surface method and orthogonal experiment method [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(10): 3157–3158.
- [13] 陆娟,常清泉,王思齐,等.响应面法优化核桃青皮粗多糖超声提取工 艺研[J].北方园艺,2015,8(22):125-129.
 - Lu J, Chang QQ, Wang SQ, *et al.* Optimization of ultrasonic extraction technology of crude polysaccharide from walnut green skin by response surface [J]. North Hortic, 2015, 8(22): 125–129.
- [14] 于翠莲, 张志华, 王红霞, 等. 核桃青皮多糖的研究进展[C]// 全国干果生产与科研进展学术研讨会, 2011.
 - Yu CL, Zhang ZH, Wang HX, *et al.* Advances in studies on polysaccharide from walnut green peel [C]// National Symposium on dry fruit production and scientific research progress, 2011.
- [15] 蒋水星, 陈雪峰, 赵天殊. 响应面法优化大枣多糖的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3652-3654.
 - Jiang SX, Chen XF, Zhao TS. A study on optimization of extraction technology of jujube polysaccharide by response surface method [J]. Anhui Agric Sci, 2011, 39(6): 3652–3654.
- [16] 陈林, 汪开拓, 王兆丹, 等. 三峡库区乌皮香核桃隔膜粗多糖的提取及 抗氧化活性[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(6): 1022-1027, 1046.
 - Chen L, Wang KT, Wang ZD, et al. Extraction and antioxidant activity of crude polysaccharide from the dissepiments of wu walnut from three gorges reservoir area [J]. Nat Prod Res Dev, 2015, 27(6): 1022–1027, 1046.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



杨 飞,高级实验师,主要研究方向 天然药物研究与开发。

E-mail: 279533257@qq.com



阿吉然姆·阿布拉,主要研究方向为天 然药物研究与开发。

E-mail: 3325517316@qq.com



海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然产物研究与开发。

E-mail: hailiqian2471@ sina.com