

# 响应面法优化商洛百合多糖的提取工艺研究

高洁<sup>1,2</sup>, 武晓磊<sup>1</sup>, 孔爽<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</sup>

(1. 陕西国际商贸学院 医药学院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西省中药绿色制造技术协同创新中心, 陕西 咸阳 712000)

**摘要:**采用响应面法优化商洛百合多糖的工艺条件。以百合多糖提取率为考察指标, 选择提取温度、液料比、提取时间三个因素, 经过响应曲面法进行优化, 得到最佳提取工艺条件。试验结果: 提取时间为 3 h, 液料比 20 : 1 mL/g, 提取温度 60 °C, 百合多糖的提取率最高可达 26.131 %, 与预测值无显著差异。

**关键词:**百合; 多糖; 响应面法

**中图分类号:** R284.1; R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 0488-5368(2022)05-0068

-05

## Optimization of Extraction Technology for *Lilium brrownii* Polysaccharides from Shangluo by Response Surface Method

GAO Jie<sup>1,2</sup>, WU Xiaolei<sup>1</sup>, KONG Shuang<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>

(1. College of Medical, Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 2. Collaborative Innovation Center of Green Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine of Shaanxi Province, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

**Abstract:** The Box-Behnken design principle was applied to optimize the extraction conditions of *Lilium brrownii* polysaccharide from Shangluo. On the basis of single factor level determination, the major factors that included extraction temperature, liquid/material ratio and extraction time were optimized by response surface method. The optimum technology condition were as follows: extraction time 1h, liquid/material 20 : 1mL/g, the extraction temperature 60°C. Under above conditions, the highest yield of polysaccharide was up to 26.131 %, which were not significantly different from the predicted values.

**Key words:** *Lilium brrownii*; Polysaccharide; Response surface

百合, 为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb. 的干燥肉质鳞叶<sup>[1]</sup>。百合作为国家首批批准通过的药食两用植物, 不仅作为保健食品, 而且还具有很高的药用价值<sup>[2,3]</sup>。百合中含有皂苷, 多糖, 生物碱, 蛋白质, 多种维生素、微量元素等成分, 具有养阴、滋阴、润肺, 清心安神的功效<sup>[4]</sup>。

百合多糖是一种混合多糖, 现代医学在对百合的研究过程中发现百合多糖是百合中的主要功能成分之一, 具有润肺止咳, 抗氧化, 提高免疫力, 抗肿瘤等作用<sup>[5,6]</sup>。目前国内提取百合多糖常用的方法有: 微波辅助提取法、水提法、超声波提取法、酶法, 溶剂法等<sup>[7~9]</sup>。水提法具有较多优点, 因此仍作为百合多糖的主要提取方法, 但水提法提取百合多糖的响应面优化报道较为少见, 笔者对水提法

提取百合多糖进行响应面工艺优化, 旨在提高百合多糖的提取率, 为百合的药食应用开发提供一定的研究基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜百合(购于商洛百合种植户, 经陕西中医药大学雷国莲教授鉴定为百合); D-无水葡萄糖标准品(中国药品生物制品鉴定所); 试验所用化学试剂均为分析纯。

### 1.2 实验设备

分析天平; 可见分光光度计; 低速离心机; 高速粉碎机; 电热恒温鼓风干燥箱; 旋转蒸发仪; 循环式多用真空泵; 数显恒温水浴锅。

收稿日期: 2021-01-25 修回日期: 2021-02-20

基金项目: 2020 年国家级大学生创新创业项目(S202013123004); 2020 年陕西省大学生创新创业项目(S202013123034); 2020 年陕西省大学生创新创业项目(S202013123007)。

第一作者简介: 高洁(1984-), 女, 陕西咸阳人, 副教授, 硕士研究生, 主要从事与天然产物活性成分研究。

### 1.3 提取工艺路线

干燥百合→粉碎→回流→离心→浓缩→除蛋白→含量测定

### 1.4 试验方法

1.4.1 标准曲线制备 称取葡萄糖标准品 10 mg,加水溶解后定容至 100 mL,稀释至不同浓度于容量瓶中标,再分别精确吸取 1.0 mL 到试管内,加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,室温条件下静置 40 min,同时取 1.0 mL 蒸馏水、1.0 mL 苯酚溶液、5 mL 浓硫酸溶液,摇匀混合作为空白组,将不同浓度标准液及空白液在波长 490 nm 处,测其吸光度 A,并且绘制标准取消,并得出线性回归方程: $Y=3.6944X+0.1879$ , $R^2=0.9991$

1.4.2 百合多糖的提取 供试品制备:取 5 g 百合粉末置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入水,回流提取 4 h,冷却,离心分离,浓缩到原体积的 1/3,加入 95% 乙醇醇沉后,复溶,加入 sevag(氯仿:正丁醇=1:4)试剂反复多次去除蛋白,将所得百合多糖溶解后于 490 nm 处测其吸光度,计算百合多糖含量。

多糖提取率:提取率(%)=(样品多糖含量×稀释倍数)/样品干重×100%

1.4.3 单因素试验 单因素试验以百合多糖提取率作为主要考核指标,采用 1.4.2 的提取方法,选择液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 mL/g),提取时间(1h、2h、3h、4h、5h),提取温度(50℃、55℃、60℃、65℃、70℃)三个因素进行单因素试验,考察最佳提取水平范围。

1.4.4 响应面优化试验 通过对于单因素试验结果的考察,以提取温度(X<sub>1</sub>)、液料比(X<sub>2</sub>)、提取时间(X<sub>3</sub>)作为响应面试验的自变量,百合多糖提取率为因变量,通过响应面软件进行试验组别的设计,见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

编码	因素		
	X <sub>1</sub> 提取温度/℃	X <sub>2</sub> 液料比 mL/g	X <sub>3</sub> 提取时间/h
-1	55	10	2
0	60	20	3
+1	65	30	4

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素

2.1.1 提取温度对百合多糖提取率的影响 如图 1 所示:回流温度与百合多糖的提取率所呈现出先正比后反比的趋势走向,反应的初始阶段百合多糖

的提取率伴随着温度的增大而增大,当提取温度达到 60℃ 时,百合多糖的提取率最大。温度较低时无法使多糖更好的提取出来,但温度过高多糖糖苷键易发生断裂,从而使提取率下降。

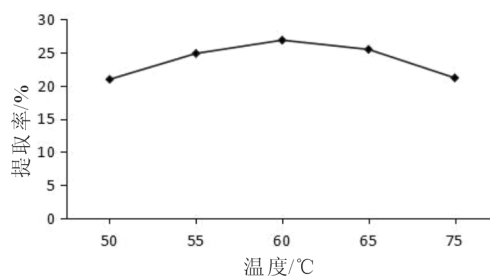


图 1 提取温度对百合多糖提取率的影响

2.1.2 液料比对百合多糖的影响 如图 2 所示:当液料比小于 20:1 mL/g 时,百合多糖的提取率与液料比成正比,在 20:1 mL/g 处达到最佳提取率,再升高液料比时,提取率明显下降。液料比较小原料提取不充分,但是随着液料比的提升会导致药液体积增大,提取速率逐渐变慢,提取的效果会较差。

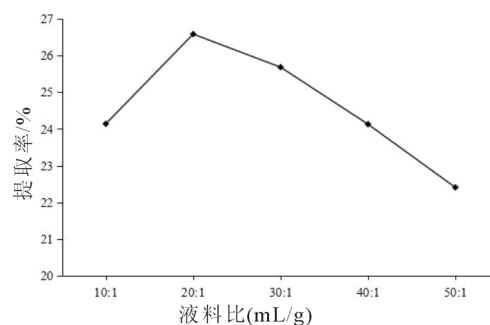


图 2 液料比对百合多糖提取率的影响

2.1.3 提取时间对百合多糖提取率的影响 图 3 可知当提取时间为 3 h 时,提取率达到最大值。当提取时间较小时,百合提取液还未达到适合温度,并且液料相互作用不充分,因此多糖提取率较低。但随着时间的延长,药液内部温度过高使百合多糖结构变性,活性降低,提取效果变差。

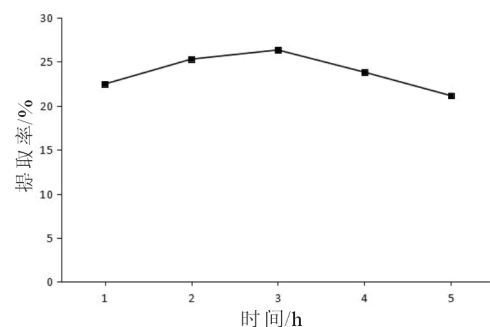


图 3 提取时间对百合多糖提取率的影响

## 2.2 响应面法优化工艺条件

选定提取温度( $X_1$ )、液料比( $X_2$ )、提取时间( $X_3$ )3 个因素为影响因素,根据单因素试验确定的

水平杆位,结合百合多糖的提取率,进行响应面提取工艺优化,结果如表 2,表 3 所示。

表 2 响应面试验结果

实验号	编码水平			百合多糖提取率/%
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	-1	0	1	25.78
2	1	0	1	25.98
3	0	-1	-1	25.34
4	-1	-1	0	25.51
5	0	0	0	26.44
6	1	-1	0	25.66
7	1	0	-1	25.64
8	0	-1	1	25.71
9	1	1	0	25.97
10	0	1	-1	25.94
11	-1	0	-1	25.56
12	0	1	1	26.13
13	0	0	0	26.34
14	0	0	0	26.43
15	0	0	0	26.38
16	0	0	0	26.39
17	-1	1	0	25.8

表 3 回归统计分析结果

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.01	9	0.22	54.39	<0.000 1	* *
$X_1$	0.045	1	0.045	10.95	0.01 3	*
$X_2$	0.33	1	0.33	79.82	<0.000 1	* *
$X_3$	0.16	1	0.16	38.15	0.000 5	* *
$X_1 X_2$	1.00E-04	1	1.00E-04	0.024	0.880 4	
$X_1 X_3$	3.60E-03	1	3.60E-03	0.88	0.380 5	
$X_2 X_3$	8.10E-03	1	8.10E-03	1.97	0.203 1	
$X_1^2$	0.52	1	0.52	125.86	< 0.000 1	* *
$X_2^2$	0.41	1	0.41	98.77	< 0.000 1	* *
$X_3^2$	0.39	1	0.39	95.61	< 0.000 1	* *
残差	0.029	7	4.11E-03			
失拟项	0.022	3	7.42E-03	4.55	0.0887	不显著
纯误差	6.52E-03	4	1.63E-03			
总和	2.04	16				

多元回归方程为:

$$Y = 26.40 + 0.075X_1 + 0.20X_2 + 0.14X_3 + 5.000E-003X_1X_2 + 0.030X_1X_3 - 0.45X_2X_3 - 0.35X_1^2 - 0.31X_2^2 - 0.31X_3^2$$

由表 3 可知,模型极显著( $p < 0.001$ ),失拟项不显著( $p = 0.0887 > 0.05$ ),说明这个模型的拟合

情况较好,并且误差小,所以此模型可用。

通过表 3 的方差分析表又可以看出, $X_2$ (液料比)、 $X_3$ (提取时间)、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  都是极显著的( $P < 0.01$ ),而  $X_1$ (提取温度)为显著,所以各因素交互作用是不显著,并且对响应值百合多糖的提取率影响的显著性分析后顺序为:液料比( $X_2$ ) > 提

取时间( $X_3$ ) $>$ 提取温度( $X_1$ )。

2.2.1 响应面结果分析 由图4可看出,根据液料比的曲线陡峭幅度较大,提取温度的曲线变化幅度是较小,所以液料比对多糖提取率的影响还是较提取温度显著,但是它的交互作用曲面还是较为陡峭,因此二者具有一定的交互作用。

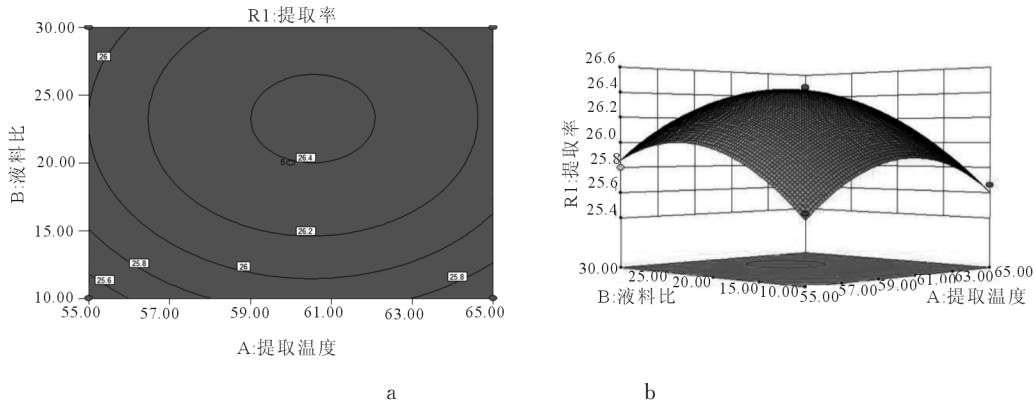


图4 提取温度和液料比对百合多糖提取率的响应面

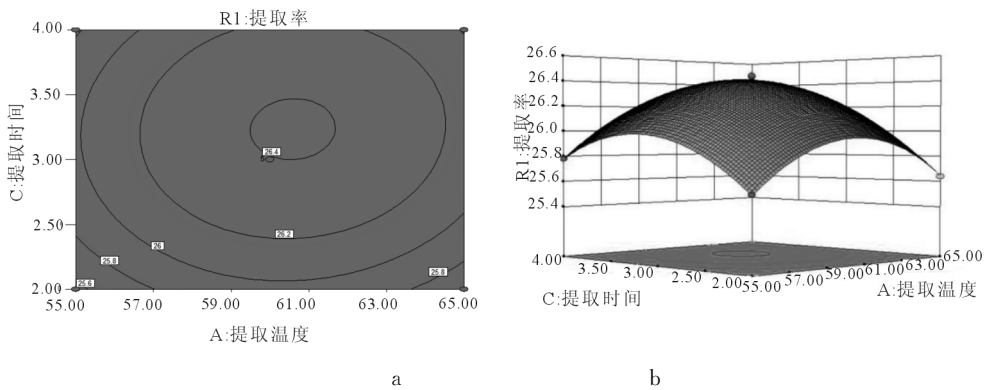


图5 提取温度和提取时间对百合多糖提取率的影响

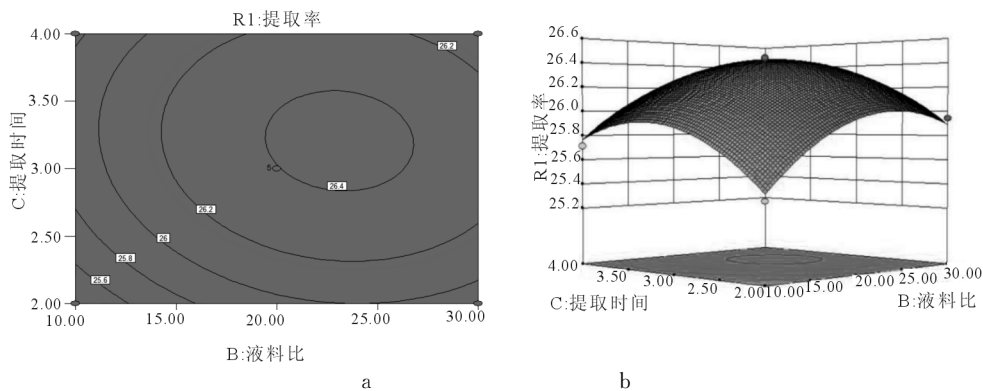


图6 液料比和提取时间对百合多糖提取率影响

由图6可看出,固定多糖的提取温度,多糖的提取率会伴随着提取时间和液料比的增加而先上升后下降,从曲面图可看出液料比曲线较提取时间陡峭,因此液料比对百合多糖提取率的影响较提取时间显著。

2.2.2 验证试验 利用响应面设计软件得出的最

佳工艺条件:提取温度为 $60.24^{\circ}\text{C}$ ,液料比为 $23.71\text{ mL/g}$ ,提取时间为 $3.21\text{ h}$ ,百合多糖在该工艺条件下提取率可达 $26.444\%$ 。

考虑降低能耗及实验的便捷性,将优化条件调整为:提取温度 $60^{\circ}\text{C}$ ,液料比 $20\text{ mL/g}$ ,提取时间为 $3\text{ h}$ ,并且再进行3次平行实验,最后得到百合

多糖的平均提取率为 26.131%，这个值和预测值的比较相对误差较小，所以说明这个模型的实用性较好。

### 3 结论

百合多糖具有广泛药理活性，如免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、抑菌等生物活性，具有较高研究价值。百合多糖的含量高低的影响因素较多，如品种、种植方法、产地、采收期及提取方法，检测方法等。研究选用水提取法为百合多糖的提取方法，水提法具有耗能低、所需设备简单、造价低、体积小、实验室操作方便等特点，试验通过响应面来优化水提百合多糖的工艺条件最佳工艺条件得出：提取温度为 60℃，液料比为 20:1 mL/g，提取时间为 3 h 时，最后百合多糖的提取率的最大值为 26.131%。通过对百合多糖的提取更加深入的了解百合多糖在现代医学临床中的应用，不断加深对作用机制的了解，为以后植物多糖的研究发展提供基础。

### 参 考 文 献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典第一部[M].

#### (上接第 50 页)

- [4] 吴新玉, 李靖, 张金娟, 等. 原阿片碱对人肝星状细胞 HSC-LX2 增殖的抑制作用及机制研究[J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3 210-3 215.
- [5] Wang L, Wang X, Zhang SL, et al. Gastroprotective effect of palmatine against acetic acid-induced gastric ulcers in rats [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2017, 71(01): 257-264.
- [6] 韩路拓, 任钧国, 刘建勋, 等. 脱氢紫堇碱对高糖培养心肌成纤维细胞 Wnt 信号通路的影响[J]. 吉林中医药, 2015, 35(11): 1 162-1 165.
- [7] Lei Y, Tan J, Michael Wink, et al. An isoquinoline alkaloid from the Chinese herbal plant *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associate protein 1 [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136: 1 117-1 121.
- [8] 方星悦, 刘启兵, 杨潇, 等. 四氢小檗碱改善血管内皮细胞损伤的研究[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(15): 1 146-1 151+1 158.
- [9] Cao F L, Shang G W, Wang Y, et al. Antinociceptive effects of intragastric dl-tetrahydropalmatine on visceral and somatic persistent nociception and pain hypersensitivity in rats [J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2011, 100(01): 199-204.
- [10] 刘玉梅, 周宇宏, 单宏丽, 等. 延胡索乙素对豚鼠单个心室肌细胞钾离子通道的影响[J]. 中国药理学

北京: 中国医药科技出版社, 2015: 132.

- [2] 唐文文, 沈易华, 王丹丹. 黔产百合多糖含量测定及降血糖活性研究[J]. 江西化工, 2020(04): 208-210.
- [3] 杨宇琴, 王丽丽, 柯尊晖, 等. 百合多糖的研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2017, 38(04): 60-64+84.
- [4] 惠和平, 金辉, 杨晓燕, 等. 兰州百合多糖 BHP-1 的化学结构与形貌分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(08): 170-175.
- [5] 罗林明, 裴刚, 覃丽, 等. 中药百合化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(06): 824-837.
- [6] 艾庆燕, 康思源, 赵豫凤. 中药百合的研究与应用[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2016, 14(02): 63-65.
- [7] 王昭璐, 刘晓风, 徐也. 兰州百合芯多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(09): 219-227+201.
- [8] 黄娟, 付亮, 李勇, 等. 百合多糖提取技术研究进展[J]. 现代农业科技, 2015(17): 317+319.
- [9] 宁娜, 韩建军, 郝建生. 百合多糖提取工艺研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(21): 64-65.
- [10] 通报, 2005(05): 599-601.
- [11] 龙全江. 中药材采收加工技术[M]. 南京: 江苏教育, 2012: 46.
- [12] 吴建国. 气候变化对 7 种乔木植物分布的潜在影响[J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(03): 335-349.
- [13] 陈士林. 中国药材产地生态适宜性区划[J]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [14] 张颖, 龙全江, 徐雪琴. 不同产地延胡索中生物碱类成分的含量测定及质量分析[J]. 中药材, 2017, 40(01): 73-76.
- [15] 张静, 周浓, 祁俊生, 等. HPLC 同时测定不同产地延胡索中的 6 种生物碱[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(04): 415-419.
- [16] 徐珂, 晋小军, 李欠, 等. 延胡索品质与土壤养分的相关性分析[J]. 中成药, 2019, 41(07): 1 635-1 639.
- [17] 徐雪琴, 龙全江. 不同产地延胡索采收加工技术调查与分析[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(06): 7-9.
- [18] 杨阳, 李茜茜, 唐藕凤, 等. 延胡索块茎中内生真菌菌群结构及其与延胡索乙素含量的相关性研究[J]. 中草药, 2020, 51(07): 1 901-1 908.
- [19] 安艳, 高普珠, 晋小军, 等. 不同产地延胡索产量品质比较[J]. 中药材, 2018, 41(01): 33-36.