

响应面法优化诺丽多糖提取工艺*

李 戈, 赵俊凌[△]

(西双版纳州傣药南药重点实验室, 中国医学科学院药用植物研究所云南分所, 云南 景洪 666100)

摘要: 目的 采用响应面法对诺丽多糖的提取工艺进行优化。方法 在单因素实验的基础上, 以提取温度、液料比、提取时间为自变量, 总多糖含量为响应值, 研究各因素及其交互作用对总多糖得率的影响。结果 最优工艺条件为, 液料比为 $1:40\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 提取温度为 100°C , 浸提时间为 4h, 提取实际值为 $9.677\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论 采用响应面法优化诺丽总多糖提取工艺是合理可行的, 实验结果将为诺丽多糖新产品研发提供物质基础。

关键词: 诺丽; 总多糖; 提取工艺; 响应面法; 海巴戟

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)02-0021-04

诺丽(Noni)又名海巴戟(*Morinda citrifolia* L)、海滨木巴戟、橘叶巴戟、檄树和印桑椹, 属茜草科巴戟属植物, 广泛分布于太平洋南部诸岛至亚洲中南半岛的地区, 我国台湾、海南等地也有分布^[1]。诺丽在民间作为保健及药用饮料已有两千年的历史, 特别是在太平洋南部岛屿, 例如塔希提岛的波利尼亚, 马来西亚, 澳大利亚, 和夏威夷的土著民中, 海巴戟都是必不可少的日常保健品。几千年来民间将其茎、根、皮、叶和果实作为药物治疗多种疾病, 它被用于治疗多种疾病, 其中包括腹泻、肠寄生虫、胃疾患等消化道疾病; 咳嗽肺部感染、结核等呼吸道疾病; 结膜炎、咽喉炎、扁桃体炎、牙痛、皮肤感染、脓肿、外伤等^[2]。近年来, 诺丽在许多方面表现出良好的保健功效, 成为国外保健食品市场上的开发热点, 开发前景广阔。

目前, 从诺丽植株中共分离出 160 余种成分, 包括大量的多糖类、黄酮类、酚类、蛋白质、脂肪、矿物质、维生素、萜烯、香豆素等。多糖是诺丽的主要的功效成分之一, 具有多种活性。诺丽中的多糖是由岩藻糖、木糖、甘露糖、半乳糖和果糖等单糖组成的杂多糖^[3], 具有很强的清除超氧自由基和羟自由基的作用, 具有一定的抗衰老活性^[4]。Hirazumi^[5-6]等研究结果表明, 诺丽多糖抗癌活性主要通过以下 3 个

方面实现: ①增强小鼠腹腔渗出细胞杀死癌细胞的能力; ②诱导小鼠腹腔巨噬细胞产生一氧化氮、白介素 21、肿瘤坏死因子 2α 、白介素 212 等细胞因子; ③抑制淋巴细胞产生白介素 24, 同时明显诱导 $\gamma 2$ 干扰素的产生。

本文采用响应面法对影响诺丽多糖提取的 3 个因素进行了研究, 为诺丽产品的加工工艺提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

诺丽(Noni)采自云南省景洪市, 切片干燥, 粉碎, 过 60 目筛备用; 旋转蒸发器 R-210 (瑞士布奇)、TU-1901 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、分析天平 AB135-S、PL203(METTLER TOLEDO 上海有限公司); 葡萄糖(对照品, 中国食品药品检定研究院)、硫酸(分析纯)、苯酚(分析纯)、无水乙醇(分析纯)。

1.2 方法^[7-10]

1.2.1 标准溶液的制备

精密称取葡萄糖标准品 10.00mg, 置 100mL 容量瓶中, 溶解, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 浓度为 0.1mg/mL 。

1.2.2 标准曲线的制备

* 基金项目: 云南省景洪市科技局 2014 年科技三项(2136981)

收稿日期: 2014-12-24

作者简介: 李戈(1980-), 男, 江西吉安人, 助理研究员, 主要从事药用植物栽培研究。

[△]通信作者: 赵俊凌, E-mail: zhao_19810810@163.com.

精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.00, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL, 分别置于 25 mL 比色管中, 准确补充水至 2.0 mL, 加入 50 g/L 苯酚溶液 1.0 mL, 在旋转混匀器上混匀, 小心加入浓硫酸 5.0 mL, 于旋转混匀器上小心混匀, 置沸水浴中 2 min, 冷却后用分光光度计在 485 nm 波长处以试剂空白溶液为参比, 测定吸光度值。以葡萄糖浓度 X 为坐标, 吸光度值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.3 样品制备

称取诺丽粉末, 置圆底烧瓶中, 加乙醇加热回流, 过滤、挥干, 加入蒸馏水, 在水浴回流提取, 残渣用适量水洗涤, 滤液定容备用。吸取定容后滤液, 加入无水乙醇, 离心得沉淀, 沉淀干燥, 用蒸馏水定容至 10 mL,

1.2.4 含量测定

精密吸取上述样品溶液 1.0 mL, 按照“1.2.2”项下的方法测定其吸光度 Y , 按回归方程计算出诺丽中的多糖含量。

1.2.5 响应面法实验^[6]

以多糖得率为指标, 分别采用料液比、提取温度及提取时间 3 个因素为自变量, 进行编码及分析, 其因素水平见表 1。

表 1 因素水平

因素	水平		
	-1	0	+1
X_1 液料比/(mL/g)	20	30	40
X_2 温度/°C	80	90	100
X_3 时间/h	2.0	3.0	4.0

试验号 1-12 是析因试验, 试验号 13-17 是中心试验。17 个试验点分为析因和零点, 其中析因点为自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点, 零点为区域的中心点, 零点实验重复 5 次, 用以估计实验误差。

1.2.6 分析方法

采用 Design-Expert V8.0.6.1 与 SPSS13.0 软件对试验数据进行回归分析。

2 结果及分析

2.1 标准曲线

以吸收度 Y 为纵坐标, 葡萄糖浓度 X 为横坐标, 一次回归方程为: $Y = 0.01731X + 0.00811$, $r = 0.9995$ (图 1)。

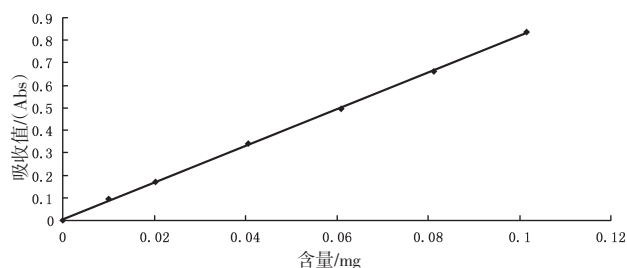


图 1 葡萄糖标准曲线

2.2 单因素实验

2.2.1 温度因素

分别称取诺丽干粉 1.000 g, 按液料比 1:40 加入蒸馏水, 分别采用 60, 70, 80, 90, 100°C, 研究不同温度对多糖提取率的影响, 结果表明, 提取温度从 60~100°C 时, 多糖提取率随温度升高而逐渐增大 (见图 2)。

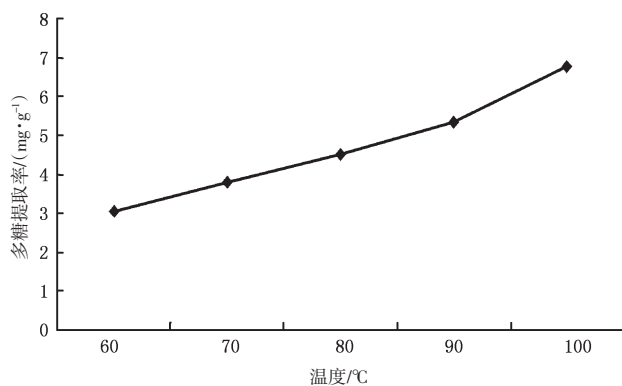


图 2 提取温度对多糖得率的影响

2.2.2 料液比因素

分别称取上述诺丽干粉 1.00 g, 采用料液比 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 100°C 水浴回流提取 2 h, 分析料液比对多糖提取率的影响。由图 3 可知, 当液料比在 1:20~1:40 范围内时, 多糖提取率不断增高; 当料液比在 1:40~1:60, 多糖提取率趋于平稳。

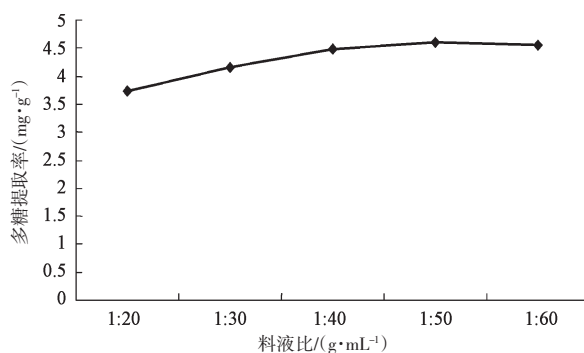


图 3 料液比对多糖得率的影响

2.2.3 时间因素

分别称取诺丽干粉 1.000g,按料液比为 1:40 加入水,100℃回流提取 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0h,比较提取时间对多糖提取率的影响。当提取时间在 1.0~3.0h 范围内,多糖提取率随着时间增加,当提取时间为 4h 时,多糖含量达到最大值(见图 4)。

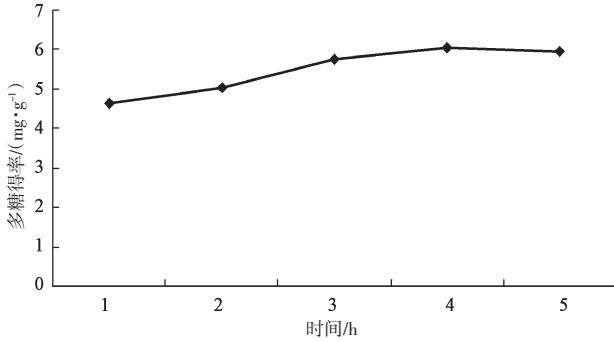


图 4 提取时间对多糖得率的影响

2.3 响应面法优化提取工艺结果

2.3.1 回归模型拟合

将所得数据进行响应面分析,以总多糖含量(Y)为响应值分别对各因素(X_1 、 X_2 、 X_3)进行线性模型拟合,结果如下: $Y = 7.34 + 1.83X_1 + 0.310X_2 + 0.060X_3 - 0.066X_1X_2 + 0.15X_1X_3 + 0.56X_2X_3 - 0.50X_1^2 - 0.38X_2^2 + 0.44X_3^2$,拟合度 $R^2 = 0.965$,二次回归得到的总多糖含量的模型与试验拟合较好(见表 2)。

表 2 响应面法实验结果

实验号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率/(mg·g ⁻¹)	
				实际值	预计值
1	-1	-1	0	4.122	4.986
2	1	-1	0	8.138	8.651
3	-1	1	0	4.904	5.615
4	1	1	0	8.658	9.280
5	-1	0	1	6.272	5.240
6	1	0	-1	9.409	8.906
7	-1	0	1	4.846	5.360
8	1	0	1	8.601	9.026
9	0	-1	-1	6.983	6.759
10	0	1	-1	6.463	7.387
11	0	-1	1	7.214	6.879
12	0	1	1	8.947	7.508
13	0	0	0	7.561	7.133
14	0	0	0	7.387	7.133
15	0	0	0	7.099	7.133
16	0	0	0	7.445	7.133
17	0	0	0	7.214	7.133

2.3.2 主要因素分析

对回归模型及各参数的显著度进行验证,结果见表 3。以总多糖含量建立的回归整体模型为非常显著($P < 0.01$),液料比(X_1)对多糖提取率有极显著影响($P < 0.001$)。在所选择的试验范围内,3 个因素对多糖提取率影响的顺序为液料比(X_1)>提取温度(X_2)>提取时间(X_3)。模型失拟项不显著($P > 0.05$),表明模型选择是合适的。

表 3 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P(F > F_{\alpha})$
Model	31.503	9.000	3.500	7.436	0.0075**
X_1	26.872	1.000	26.872	57.088	0.0001***
X_2	0.791	1.000	0.791	1.680	0.2361
X_3	0.029	1.000	0.029	0.061	0.8113
X_1X_2	0.017	1.000	0.017	0.036	0.8540
X_1X_3	0.095	1.000	0.095	0.203	0.6661
X_2X_3	1.269	1.000	1.269	2.696	0.1446
X_1^2	1.064	1.000	1.064	2.261	0.1764
X_2^2	0.618	1.000	0.618	1.312	0.2897
X_3^2	0.828	1.000	0.828	1.760	0.2263
残差	3.295	7.000	0.471		
失拟性	3.159	3.000	1.053	30.964	0.0032**
纯误差	0.136	4.000	0.034		
总差	34.798	16.000			

注:极显著,*** $P < 0.001$;非常显著,** $P < 0.01$

2.3.3 提取工艺的优化与验证

根据最优化的工艺参数范围,把多糖提取率与两个参数拟合为三维曲面图,固定三个变量中的一个为中值,以拟合目标函数为数学模型,绘制因变量曲面图,见图 5~7。结果表明,最佳工艺参数条件为液料比 40:1(g/mL),提取温度 100℃,提取时间 4.0h。按照上述条件测定诺丽多糖提取率,以验证响

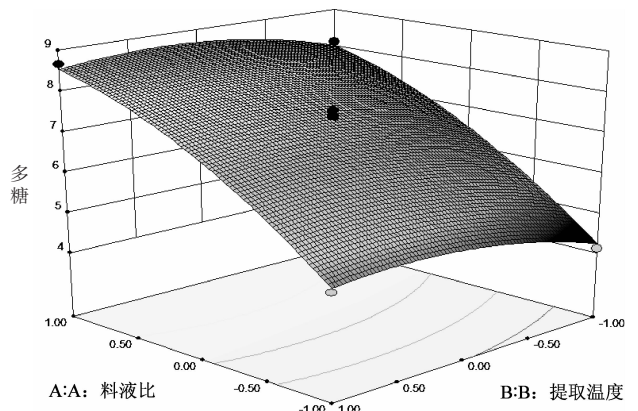


图 5 料液比和温度对多糖提取率的影响

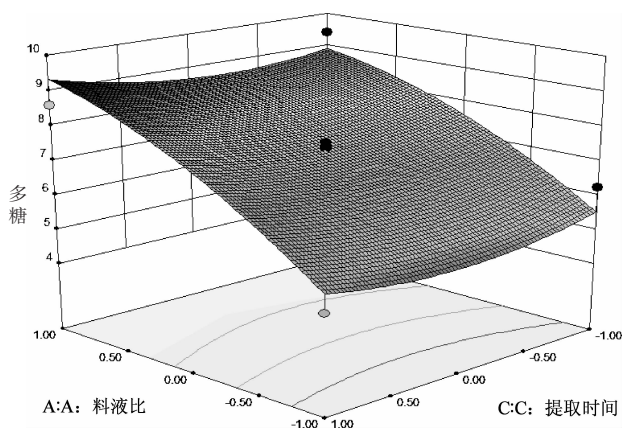


图 6 料液比和提取时间对多糖得率的影响

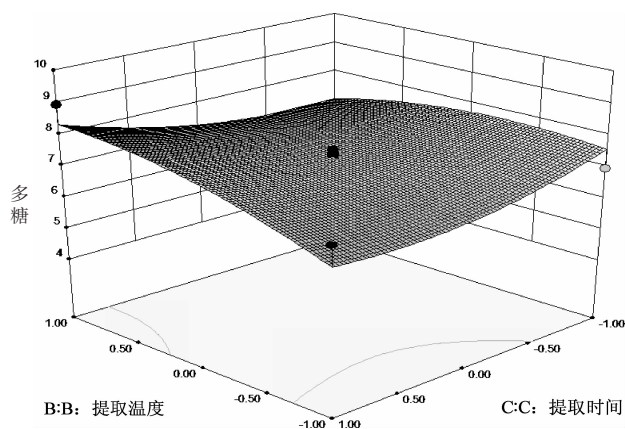


图 7 提取温度和提取时间对多糖提取率的影响

应面法的可行性。结果表明，多糖平均提取率为 9.667mg/g, 与理论预测值(9.758mg/g)吻合度较高，表明采用响应面法优化得到的诺丽多糖提取工艺对实际生产有指导价值。

3 讨论

本实验采用单因素法与响应面法相结合分别研究温度、液料比及时间对多糖提取率的影响。诺丽多糖提取的最佳工艺条件是：液料比 40:1 (g/mL), 提取温度为 100℃, 提取时间为 4h, 多糖平均提取率为 9.667mg/g, 本方法能为诺丽多糖产品开发提供理论支持与物质基础。

参考文献：

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 71 卷 2 分册.[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 182-183.
- [2] 范为宇. 诺丽在萨摩亚民间医学中的应用 [J]. 国外医学-中医中药分册, 1994, 6(3): 46.
- [3] 刘海青, 张娜, 徐剑锋, 等. 海巴戟果水提物中多糖含量的测定及组成分析[J]. 粮油食品科技, 2008, 16(5): 64-66.
- [4] 刘海青, 刘银才, 胡文婷. 海巴戟果水溶性多糖的分离纯

化及清除自由基活性[J]. 生物加工过程, 2008, 6(3): 44-47.

- [5] Hirazumi A, Furusawa E. An immune dulatory polysaccharide rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity [J]. *PhytotherRes*, 1999, 13 (15): 380-387.
- [6] Furusawa E, Hirazumi A, Story S, et al. Antitumour potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice [J]. *PhytotherRes*, 2003, 17(10): 1158-1164.
- [7] 赵俊凌, 马洁, 李戈. 兜唇石斛多糖提取及脱蛋白工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1884-1886.
- [8] 赵俊凌, 马洁, 李戈. 齿瓣石斛多糖提取及脱蛋白工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2841-2843.
- [9] 赵俊凌, 王云强, 李学兰, 等. 几种人工栽培“枫斗类”石斛的多糖含量分析 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 2001-2005.
- [10] 赵俊凌. 海巴戟总黄酮提取工艺的响应面法优化 [J]. 时珍国医国药, 2013, 42(5): 1249-1251.

(编辑: 杨阳)

Optimization of Extraction Conditions of Polysaccharide from *Morinda citrifolia* by Response Surface Methodology

LI Ge, ZHAO Jun-ling[△]

(Key Laboratory of Dai and Southern Medicine of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture, Institute of Medicinal Plant Development Yunnan Branch, Jinghong 666100, China)

ABSTRACT: **Objective** Response surface methodology was used to optimize the extraction conditions of polysaccharide from *Morinda citrifolia*. **Methods** Based on one factor test, the individual and interactive effects of ethanol concentration, material/liquid ratio, extracting temperature and extracting time on the yield of polysaccharide were studied. **Results** The experiment indicated that the optimal conditions include material/liquid ratio 1:40, extraction temperature 100℃ and extraction time 4h. Under these conditions, the yield of polysaccharide was 9.677mg·g⁻¹. **Conclusion** This exhibits the good feasibility of Response surface methodology for optimizing extracting process of polysaccharide from *Morinda citrifolia*.

KEY WORDS: *Noni*; Total polysaccharide; Extraction conditions; Response surface methodology; *Morinda citrifolia* L