

本文引用格式:董暖,苏林洁,秦冬梅. 基于 Box-Behnken 设计优化毛菊苣药渣粗多糖酶法提取工艺[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2025, 38(1): 111-121.

Citation format: DONG Nuan, SU Linjie, QIN Dongmei. Box-Behnken design optimization of crude polysaccharide from dregs of Cichorium Glandulosum enzyme extraction process[J]. Journal of Liaocheng University(Natural Science Edition), 2025, 38(1): 111-121.

文章编号 1672-6634(2025)01-0111-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024090006

基于 Box-Behnken 设计优化毛菊苣 药渣粗多糖酶法提取工艺

董暖¹, 苏林洁², 秦冬梅¹

(1. 石河子大学 药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002;

2. 新疆医科大学 第二附属医院药学部, 新疆 乌鲁木齐 830063)

摘要 为了实现新疆特色植物药毛菊苣的药渣中有效成分毛菊苣粗多糖的高效提取与合理利用, 采用响应面法优化了毛菊苣药渣粗多糖提取工艺条件, 对提取得到的毛菊苣粗多糖运用液相色谱示差折光检测法(HPLC-RID)鉴定果糖和葡萄糖的含量, 最后考察其体外抗氧化活性。以毛菊苣根醇提后的药渣为原料, 毛菊苣粗多糖得率为考察指标, 提取温度、提取时间、料液比及酶量为主要影响因素, 在单因素试验的基础上, 采用响应面法对毛菊苣药渣粗多糖提取工艺进行优化, 运用国标检测方法 HPLC-RID 鉴定毛菊苣粗多糖中果糖和葡萄糖两种单糖的含量, 通过 1, 1-二苯基-2-苦基肼自由基(1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical, DPPH)和 2, 2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸(2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)对毛菊苣粗多糖的体外抗氧化活性进行考察。响应面试验法对毛菊苣药渣粗多糖进行优化的最优方案是提取时间 2.0 h, 酶量 2.0%, 料液比 1:40(g·mL⁻¹), 提取温度 51℃, 毛菊苣药渣使用该条件进行提取多糖的得率为(20.64±0.34)%, HPLC-RID 法在乙腈:水(75:25, V:V)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35℃条件下能够实现高效分离鉴定, 体外抗氧化试验表明毛菊苣粗多糖对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基都有较好的清除作用。本研究获得了毛菊苣药渣粗多糖酶法的最佳提取工艺, 并鉴定出毛菊苣粗多糖中果糖和葡萄糖两种单糖成分, 且证明了毛菊苣药渣粗多糖具有良好的体外抗氧化活性。

关键词 毛菊苣药渣粗多糖; 提取; 响应面; 液相色谱示差折光检测法; 抗氧化

中图分类号 R283

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Box-Behnken Design Optimization of Crude Polysaccharide from Dregs of *Cichorium Glandulosum* Enzyme Extraction Process

DONG Nuan¹, SU Linjie², QIN Dongmei¹

(School of Pharmacy, Shihezi University / Key Laboratory of Plant Pharmaceutical Resource Utilization of Ministry of Education, Shihezi 832002, China; 2. Xinjiang Medical University, Second Affiliated Hospital, Department of Pharmacy, Urumqi 830063, China)

收稿日期: 2024-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160742); 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(2023CB008-25)资助

通信作者: 秦冬梅, 女, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物及制剂, E-mail: qdm_pha@shzu.edu.cn.

Abstract In order to achieve efficient extraction and rational utilization of the active ingredient, crude polysaccharides from the residue of Xinjiang's characteristic plant medicine, *Cichorium glandulosum*, the response surface methodology was used to optimize the extraction process conditions of crude polysaccharides from *Cichorium glandulosum*. The content of fructose and glucose in the extracted crude polysaccharides was identified by High Performance Liquid Chromatography-Refractive Index Detector (HPLC-RID), and their in vitro antioxidant activity was finally investigated. Using the medicinal residue of *Cichorium glandulosum* root after alcohol extraction as the raw material, the yield of crude polysaccharides from *Cichorium glandulosum* root was used as the evaluation index, and the extraction temperature, extraction time, solid-liquid ratio, and enzyme amount were the main influencing factors. Based on single factor experiments, the response surface methodology was used to optimize the extraction process of crude polysaccharides from *Cichorium glandulosum* root. The content of fructose and glucose in the crude polysaccharides of *Cichorium intybus* was identified by HPLC-RID according to the national standard method. The in vitro antioxidant activity of the crude polysaccharides of *Cichorium glandulosum* was examined by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical, DPPH) and 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). The optimal solution for optimizing the extraction of crude polysaccharides from *Cichorium glandulosum* seed residue using the response interview method is an extraction time of 2.0 hours, enzyme content of 2.0%, solid-liquid ratio of 1 : 40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), extraction temperature of 51 °C. The yield of polysaccharides extracted from *Cichorium glandulosum* seed residue under these conditions is $(20.64 \pm 0.34)\%$. HPLC-RID method can achieve efficient separation and identification under the conditions of acetonitrile: water (75 : 25, V : V) as the mobile phase, flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and column temperature of 35 °C. In vitro antioxidant tests show that crude polysaccharides from *Cichorium glandulosum* seed have good scavenging effects on DPPH radicals and ABTS radicals. This study obtained the optimal extraction process of crude polysaccharides from *Cichorium glandulosum* by enzymatic method, and identified two monosaccharide components, fructose and glucose, in the crude polysaccharides of *Cichorium glandulosum*. It also demonstrated that the crude polysaccharides of *Cichorium glandulosum* have good in vitro antioxidant activity.

Key words *Cichorium glandulosum* crude polysaccharides; extraction; response surface; HPLC-RID; antioxidant

0 引言

毛菊苣(*Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet),是一种在新疆维吾尔族地区被广泛使用的药材,属于菊苣科下的菊苣属。作为一种药食两用的植物,毛菊苣根不仅拥有丰富的营养价值,而且含有多种对人体有益的活性成分,包括多糖类、黄酮类、酚酸类、萜类、苯丙素类等,具有保肝、降血糖、抗菌、调血脂、抗肿瘤、抗炎等多种药理作用^[1-6]。中药药用物质的提取以脂溶性成分为主,提取后的中药渣多被作为燃料焚烧或垃圾丢弃,这不仅浪费了资源,也对环境造成极大污染^[7]。前期本课题组专注于毛菊苣根醇提物的活性成分,在反复使用 95%乙醇浸泡后收集浸提液做后续研究^[8-11],提取后的药渣常常作为废弃物处理,实际上在被丢弃的药渣中还存在大量的活性成分,仍然具有药用和营养价值^[12,13]。多糖就是其中之一,毛菊苣粗多糖中有小分子糖类如葡萄糖、蔗糖、低聚果糖等,还含有不同聚合度的大分子量多糖,以及蛋白、色素等杂质^[14],毛菊苣粗多糖具有提高机体免疫力、抗氧化、保护肝脏、降血脂、调节血糖等多种生物活性^[15]。目前,对多糖提取工艺的研究较多,主要有溶剂提取法、酶解提取法、超声波提取法、微波辅助提取法等^[16],这些方法都有一些问题,如费用高,过程复杂,同时也浪费了脂溶性成分。本研究以脱脂后的毛菊苣药渣为原料,利用纤维素酶破坏毛菊苣药渣粉末细胞壁,高效获得更多毛菊苣药渣粗多糖,并对酶法提取毛菊苣粗多糖工艺进行优化,以期获得一种相对简单、得率较高的提取工艺,为了鉴定毛菊苣粗多糖采用 HPLC-RID 法鉴定其中的果

糖和葡萄糖两种单糖成分,进一步通过体外抗氧化实验初步探究毛菊苣粗多糖抗氧化活性。本研究对毛菊苣资源的充分利用和毛菊苣粗多糖提取工艺的优化具有现实意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

电热恒温振荡水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司),循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);BP211D 型分析天平(德国赛多利斯,感量:0.01 mg);数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);VORTEX0 型涡旋混匀器(上海达姆实业有限公司);示差折光检测器(Watere2414, USA);FA210B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);MilliQ 超纯水机(Sigema, USA);SKY-100B 型恒温摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司);Varioskan LUX 型多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific, USA);色谱柱(Waters carbohydrate high performance, 4.6 mm × 250 mm, 4 μm)。

1.2 样品与试剂

毛菊苣购自新疆维吾尔自治区和田县,经石河子大学药学院秦冬梅教授鉴定为菊科菊苣属植物毛菊苣(*Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet)的地下根部分。浓硫酸,苯酚,葡萄糖,乙腈(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);D(-)-果糖(北京索莱宝科技有限公司);纤维素酶(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:C15676115),中速定性滤纸(湖南比克曼控股有限责任公司),95%乙醇(天津市河东区红岩试剂厂,批号:20201119),过硫酸钾(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:C15508237),2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(上海源叶生物科技有限公司,批号:JS237606),1,1-二苯基-2-苦基肼(上海源叶生物科技有限公司,批号:SO4IS224966)。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理。将使用 95%乙醇反复浸泡过的毛菊苣根药渣晒干并粉碎,粉末过 24 目筛,干燥储存备用。

1.3.2 多糖的提取。将盛有 30 mL 蒸馏水的 250 mL 锥形瓶,盖上保鲜膜防止水分蒸发,电热恒温振荡水浴锅 50 °C 预热 10 min 后,加入精密称量的毛菊苣根药渣粉末 1.00 g 及 1.5% 的纤维素酶,50 °C 恒温振荡 2 h。提取完毕后将锥形瓶放入沸水中煮沸 10 min,使纤维素酶失去活性。冷却后减压抽滤得滤液,将滤液倒入蒸发皿中置于 50 °C 的烘箱中烘干至恒重,得毛菊苣粗多糖^[17]。

1.2.3 总糖含量的测定。标准曲线的建立:总糖的含量测定使用苯酚-硫酸法,称取 1 mg 葡萄糖标准品溶于 10 mL 蒸馏水,配成 0.1 mg · mL⁻¹ 的葡萄糖标准溶液。分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 葡萄糖溶液于具塞试管中,蒸馏水补至终体积为 1.0 mL,再向各试管中加入 6% 苯酚 1 mL 和浓硫酸 5 mL,用旋涡混合器混合均匀后,静置 30 min,使用酶标仪测定其在 490 nm 处的吸光度。如图 1,根据实验结果绘制标准曲线,得到回归方程 $Y = 5.8738x + 0.1748 (R^2 = 0.9993)$ ^[18]。

毛菊苣粗多糖中总糖含量测定:配置浓度为 0.1 mg · mL⁻¹ 的毛菊苣粗多糖溶液 10 mL 作为待测液,吸取 1 mL 待测液于试管中,加入 1 mL 6% 苯酚和 5 mL 浓硫酸,用旋涡混合器混合后,静置 30 min,在 490 nm 处使用酶标仪(Thermo Fisher Scientific, USA)测定吸光度。代入葡萄糖标准曲线,根据(1)式计算样品中多糖含量

$$N_{\text{多糖}} = (C \times D / W) \times 100\%, \quad (1)$$

式中 C 为样品葡萄糖浓度/(mg · mL⁻¹); D 为样品的稀释倍数; W 为样品浓度/(mg · mL⁻¹)。

1.3.4 单因素实验。在改变一个因素,其他因素不改变的条件下,分别考察提取时间、纤维素酶含量、料液

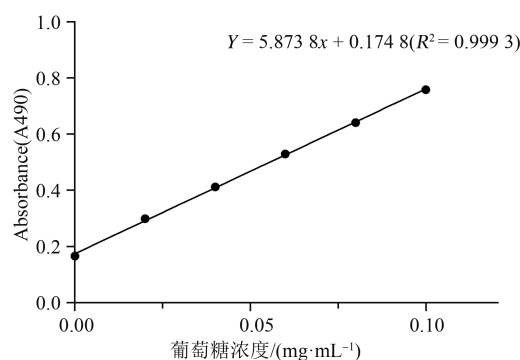


图1 总糖含量测定标准曲线

Fig. 1 Standard curve for total sugar content determination

比和提取温度对毛茛苣粗多糖得率的影响。

(1) 提取时间对多糖提取的影响。将 5 个 250 mL 盛有 30 mL 蒸馏水的锥形瓶,瓶口罩上保鲜膜防止水分蒸发,电热恒温振荡水浴锅 50 ℃ 预热 10 min 后,加入精密称量的毛茛苣根药渣粉末 1.00 g 及 1.5% 的纤维素酶,在 50 ℃ 下分别恒温振荡 1.5、1.75、2、2.25、2.5 h。提取完毕后将锥形瓶放入沸水中煮沸 10 min,使纤维素酶失去活性。冷却后减压抽滤得滤液,将滤液倒入蒸发皿中置于 50 ℃ 的烘箱中烘干至恒重,得毛茛苣粗多糖,测各条件下毛茛苣粗多糖含量^[19]。

(2) 纤维素酶量对多糖提取的影响。将 5 个 250 mL 盛有 30 mL 蒸馏水的锥形瓶,瓶口罩上保鲜膜防止水分蒸发,电热恒温振荡水浴锅 50 ℃ 预热 10 min 后,分别加入称取毛茛苣根粉末 1.00 g,1%、1.5%、2%、2.5%、3% 的纤维素酶,在 50 ℃ 下分别恒温振荡 2 h。提取完毕后将锥形瓶放入沸水中煮沸 10 min,使纤维素酶失去活性。冷却后减压抽滤得滤液,将滤液倒入蒸发皿中置于 50 ℃ 的烘箱中烘干至恒重,得毛茛苣粗多糖,测各条件下毛茛苣粗多糖含量。

(3) 料液比对多糖提取的影响。将 5 个 250 mL 锥形瓶分别倒入 20、30、40、50、60 mL 蒸馏水,瓶口罩上保鲜膜防止水分蒸发,电热恒温振荡水浴锅 50 ℃ 预热 10 min 后,加入精密称量的毛茛苣根药渣粉末 1.00 g 及 1.5% 的纤维素酶,在 50 ℃ 下分别恒温振荡 2 h。提取完毕后将锥形瓶放入沸水中煮沸 10 min,使纤维素酶失去活性。冷却后减压抽滤得滤液,将滤液倒入蒸发皿中置于 50 ℃ 的烘箱中烘干至恒重,得毛茛苣粗多糖,测各条件下毛茛苣粗多糖含量。

(4) 温度对多糖提取的影响。将 5 个 250 mL 盛有 30 mL 蒸馏水的锥形瓶,瓶口罩上保鲜膜防止水分蒸发,电热恒温振荡水浴锅分别在 42、46、50、54、58 ℃ 下预热 10 min 后,加入精密称量的毛茛苣根药渣粉末 1.00 g 及 1.5% 的纤维素酶,分别在 42、46、50、54、58 ℃ 下恒温振荡 2 h。提取完毕后将锥形瓶放入沸水中煮沸 10 min,使纤维素酶失去活性。冷却后减压抽滤得滤液,将滤液倒入蒸发皿中置于 50 ℃ 的烘箱中烘干至恒重,得毛茛苣粗多糖,测各条件下毛茛苣粗多糖含量。

1.3.5 响应面实验设计。根据上述单因素试验结果,本次响应面实验选取提取时间(A)、纤维素酶含量(B)、料液比(C)和提取温度(D)4 个对毛茛苣粗多糖提取率有影响的提取因素,采用 4 因素 3 水平响应面实验方法,以毛茛苣粗多糖得率(Y)为考察指标,对毛茛苣药渣粗多糖提取工艺进行了优化。

1.3.6 统计与分析。使用 Design-Expert 13 软件对响应面实验结果进行响应面模拟和方差分析,由 GraphPad Prism 8 统计软件对得到的数据进行统计处理。

1.3.7 毛茛苣粗多糖的单糖测定。(1) RID 色谱条件。色谱柱(Waters carbohydrate high performance, 4.6 mm × 250 mm, 4 μm);检测器:示差折光检测器;柱温 35 ℃;流动相为乙腈:水=75:25(V:V);流速:1 mL·min⁻¹;检测器池温度:35 ℃;进样量:10 μL。(2) 标准溶液的配制。果糖、葡萄糖标准储备液:精密称取 2.5 g 果糖、葡萄糖的标准物质,用 30 mL 纯水溶解,用乙腈定容到 50 mL,离心,过滤,即得。果糖、葡萄糖标准曲线制作:分别吸取 10、8、6、4、2、1 mL 的上述果糖、葡萄糖标准储备液,用 6 mL 纯水溶解,用乙腈定容到 10 mL,离心,过滤,即得。(3) 样品处理。准确称取 5 g 毛茛苣粗多糖置于 100 mL 烧杯中,加入适量水,微量超声使样品完全溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,然后用蒸馏水:乙腈(60:40)润洗定容,混匀,作为供试品,备用。(4) 精密度试验。从(2)项下标准储备溶液取果糖(C=50 mg·mL⁻¹)、葡萄糖(C=50 mg·mL⁻¹)溶液测定 6 次。(5) 稳定性试验。从(3)项下制备供试品溶液,在 0、2、4、8、12、16 h,精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪。(6) 重复性试验。从(3)项下制备供试品溶液 6 份,测定并计算。(7) 加样回收率。精密量取不同毛茛苣粗多糖的 9 份已知含量的同批样品作为本底,分别加入不同的果糖(由于果糖在毛茛苣粗多糖含量最高,故以果糖为代表)对照品溶液高中低浓度各 3 份,用 HPLC-RID 测定,记录峰面积,计算回收率。(8) 样品测定。按(3)项下方法制备样品溶液并测定。

1.3.8 毛茛苣粗多糖体外抗氧化活性。(1) 毛茛苣粗多糖对 DPPH 自由基清除作用。精密称取 1.00 mg DPPH,将其溶于体积分数为 95% 的乙醇至 10 mL,使用旋涡混合器混匀并使用数控超声仪超声溶解,避光保存。将毛茛苣粗多糖和阳性对照分别配制成浓度为 1、2、3、4、5 mg·mL⁻¹ 的溶液,将待测液和 DPPH 溶

液按 1 : 4 的比例混合,在室温暗反应 20 min,用酶标仪测定其在 517 nm 处的吸光度。本实验使用的阳性对照为 L-抗坏血酸,使用(2)式计算样品自由基清除率^[20]

$$\rho_{\text{DPPH清除率}}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中 A_0 为 DPPH 在 517 nm 处的吸光度; A_1 为待测液在 517 nm 处的吸光度。

(2) 毛菊苣粗多糖对 ABTS 自由基清除作用。将浓度为 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 溶液 2.5 mL 与浓度为 $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸钾溶液 44 μL 混合后用旋涡混合器混匀,室温暗反应 15 h 得到 ABTS 储备液。稀释 ABTS 储备液,吸光度在 0.7 ± 0.2 即可使用。将毛菊苣粗多糖和阳性对照分别配制成浓度为 1、2、3、4、5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,与稀释后的 ABTS 储备液按 1 : 9 的比例混合,室温暗反应 8 min,使用酶标仪测定其 734 nm 处的吸光度。本实验使用的阳性对照为 L-抗坏血酸。按公式(3)计算样品自由基清除率^[21]

$$\rho_{\text{ABTS清除率}}(\%) = \frac{A_a - A_b}{A_a} \times 100\%, \quad (3)$$

式中 A_a 为 ABTS 在 734 nm 处的吸光度; A_b 为待测液在 734 nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取时间对多糖提取的影响。由图 2 可知,随着毛菊苣粗多糖提取时间的增加,多糖得率逐渐上升,提取时间达到 2 h,毛菊苣粗多糖的得率达到 19.95%,2 h 后的多糖得率开始下降。原因可能是毛菊苣粗多糖需要一定的时间才能从粉末中扩散到水里,因此在多糖提取的 2 h 内,水中多糖浓度较低。提取时间超过 2 h,水中的毛菊苣粗多糖达到饱和,增加提取时间毛菊苣粗多糖得率也不再增加,并且随着时间的增加纤维素酶活性逐渐降低,内容物发生粘连或降解,导致毛菊苣粗多糖得率降低^[22]。从能耗和效率两方面考虑,选取提取时间 2 h 开展后续研究。

2.1.2 纤维素酶量对多糖提取的影响。如图 3 可知,在纤维素酶量增加的情况下,毛菊苣粗多糖得率呈现先升后降的趋势。毛菊苣粗多糖的得率在添加 2% 的纤维素酶后达到顶峰,其得率为 20.34%,此后逐渐降低;纤维素酶量影响多糖提取率的原因可能有以下几个方面:纤维素酶量较低的情况下主要作用于细胞壁,使细胞壁被破坏,释放出细胞壁中的物质。当纤维素酶过量时,会使底物完全被酶分子饱和而不利于其活性的发挥,从而使底物的水解速度下降,使得毛菊苣粗多糖得率降低^[23]。从能耗和效率两方面考虑,选取纤维素酶量 2% 开展后续研究。

2.1.3 料液比对多糖提取的影响。由图 4 可知,随着料液比的增大,毛菊苣粗多糖得率呈现先升高后降低的趋势,当料液比达到 1 : 40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)时,多糖得率达到最大值为 20.00%。

导致此结果的原因可能是:大量的水会增大毛菊苣细胞内液和外液的浓度差,使溶液加速向毛菊苣细胞内扩散,从而使多糖溶出量增加,毛菊苣粗多糖得率增大。然而,在提取过程中若水分含量过高,便会导致溶解的物质种类繁多且混杂不清。这些杂质可能影响到多糖的有效释放和充分利用,影响毛菊苣粗多糖的得率。从能耗和效率两方面考虑,选取料液比 1 : 40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)开展后续研究。

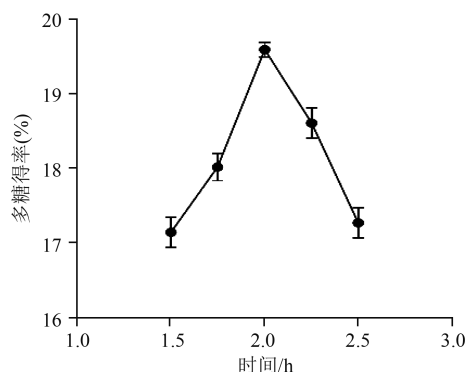


图2 提取时间对多糖提取的影响

Fig. 2 The effect of extraction time on polysaccharide extraction

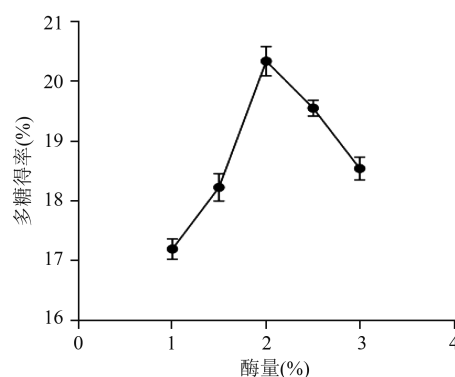


图3 纤维素酶量对多糖提取的影响

Fig. 3 Effect of cellulase content on polysaccharide extraction

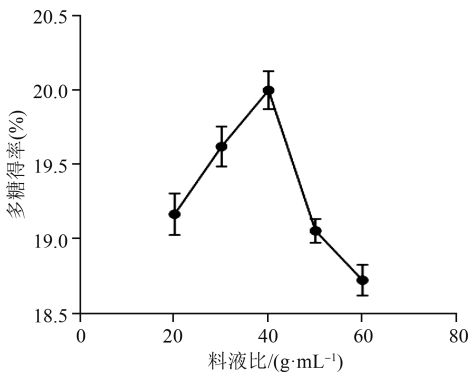


图 4 料液比对多糖提取的影响

Fig. 4 The effect of liquid to material ratio on polysaccharide extraction

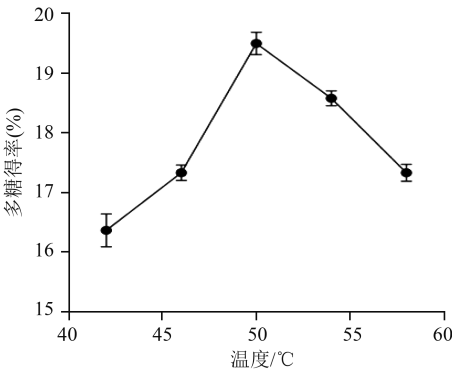


图 5 提取温度对多糖的提取的影响

Fig. 5 The effect of extraction temperature on polysaccharide extraction

2.1.4 提取温度对多糖提取的影响。如图 5 所示,随着提取温度的增加,毛茛苣粗多糖提取率先增加后减少。毛茛苣粗多糖的提取温度为 50 ℃时,提取率达到最大,得率为 19.50%;提取温度为 50 ℃时,提取率达到峰值,随后逐渐降低。这表明纤维素酶在 50 ℃左右能够发挥最佳提取效率,在温度高于 50 ℃时,纤维素酶的活性会显著下降,从而无法有效地分解纤维素,影响了毛茛苣粗多糖的得率。从能耗和效率两方面考虑,选取提取时间 50 ℃开展后续研究。

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面试验设计。根据单因素的结果,选取提取时间(A)、纤维素酶含量(B)、料液比(C)和提取温度(D)4 个对毛茛苣粗多糖提取率有影响的提取因素,以多糖得率(Y)为考察指标,采用 4 因素 3 水平 Box-Behnken 响应面试验法优化毛茛苣粗多糖提取工艺。各因素及水平见表 1。对试验结果及数据进行分析,结果见表 2、表 3 和表 4。

表 1 响应面试验因素与水平

Tab. 1 Response surface test factors and levels

水平	提取时间 A/h	纤维素酶量 B(%)	料液比 C/(g·mL ⁻¹)	提取温度 D/℃
-1	1.75	1.5	1:30	46
0	2	2	1:40	50
1	2.25	2.5	1:50	54

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab. 2 Box-Behnken experimental design and results

序号	A	B	C	D	Y(%)
1	0	1	-1	0	18.26
2	-1	0	0	-1	17.35
3	0	-1	1	0	17.32
4	1	0	-1	0	19.14
5	0	0	-1	1	19.33
6	0	-1	0	-1	16.98
7	1	0	1	0	18.88
8	-1	0	-1	0	18.28
9	0	0	1	-1	17.78
10	0	1	1	0	18.94
11	-1	-1	0	0	17.00

(续)表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab. 2 Box-Behnken experimental design and results					
序号	A	B	C	D	Y(%)
12	0	−1	0	1	18.83
13	0	0	0	0	20.57
14	1	0	0	1	19.48
15	0	1	0	1	18.68
16	−1	0	1	0	17.81
17	0	0	−1	−1	18.25
18	0	0	0	0	20.42
19	1	−1	0	0	18.15
20	0	1	0	−1	18.31
21	0	−1	−1	0	18.17
22	1	0	0	−1	18.31
23	0	0	0	0	20.37
24	−1	1	0	0	18.35
25	−1	0	0	1	18.42
26	0	0	0	0	20.46
27	1	1	0	0	19.31
28	0	0	1	1	19.37

表 3 Box-Behnken 试验方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of Box-Behnken experiment					
变量	平方和	自由度	均方	F	P
模型	26.92	14	1.92	58.92	<0.000 1
A	3.07	1	3.07	93.96	<0.000 1
B	2.43	1	2.43	74.59	<0.000 1
C	0.146 0	1	0.146 0	4.48	0.054 2
D	4.22	1	4.22	129.49	<0.000 1
AB	0.008 2	1	0.008 2	0.252 6	0.623 6
AC	0.011 0	1	0.011 0	0.337 2	0.571 4
AD	0.002 9	1	0.002 9	0.089 9	0.769 1
BC	0.585 0	1	0.585 0	17.93	0.001 0
BD	0.551 1	1	0.551 1	16.89	0.001 2
CD	0.067 0	1	0.067 0	2.05	0.175 4
A ²	6.37	1	6.37	195.10	<0.000 1
B ²	10.21	1	10.21	312.99	<0.000 1
C ²	4.85	1	4.85	148.75	<0.000 1
D ²	5.48	1	5.48	167.97	<0.000 1
残差	0.424 1	13	0.032 6		
失拟值	0.402 4	10	0.040 2	5.55	0.092 5
纯误差	0.021 7	3	0.007 2		
总离差	27.34	27			

注: $P<0.01$, 差异极显著。 $R^2=0.984\ 5$; $R^2_{\text{Adj}}=0.967\ 8$ 。

表 4 回归模型误差统计分析

Tab. 4 Statistical analysis of regression model errors

统计项目	数值	统计项目	数值
标准差	0.180 6	拟合系数	0.984 5
平均数	18.66	校正拟合系数	0.967 8
变异系数	0.968 0	预测拟合系数	0.913 8
压力	2.36	信噪比	27.798 8

采用 Design-Expert 13 软件分析表中的试验数据,多糖得率(Y)与提取时间(A)、纤维素酶量(B)、料液比(C)、提取温度(D)之间的相关性拟合回归方程为 $Y=20.46+0.505\ 4A+0.450\ 3B-0.110\ 3C+0.593\ 3D-0.045\ 4AB+0.052\ 4AC+0.027\ 1AD+0.382\ 4BC-0.371\ 2BD+0.129\ 4CD-1.03A^2-1.30B^2-0.899\ 4C^2-0.955\ 7D^2$ 。

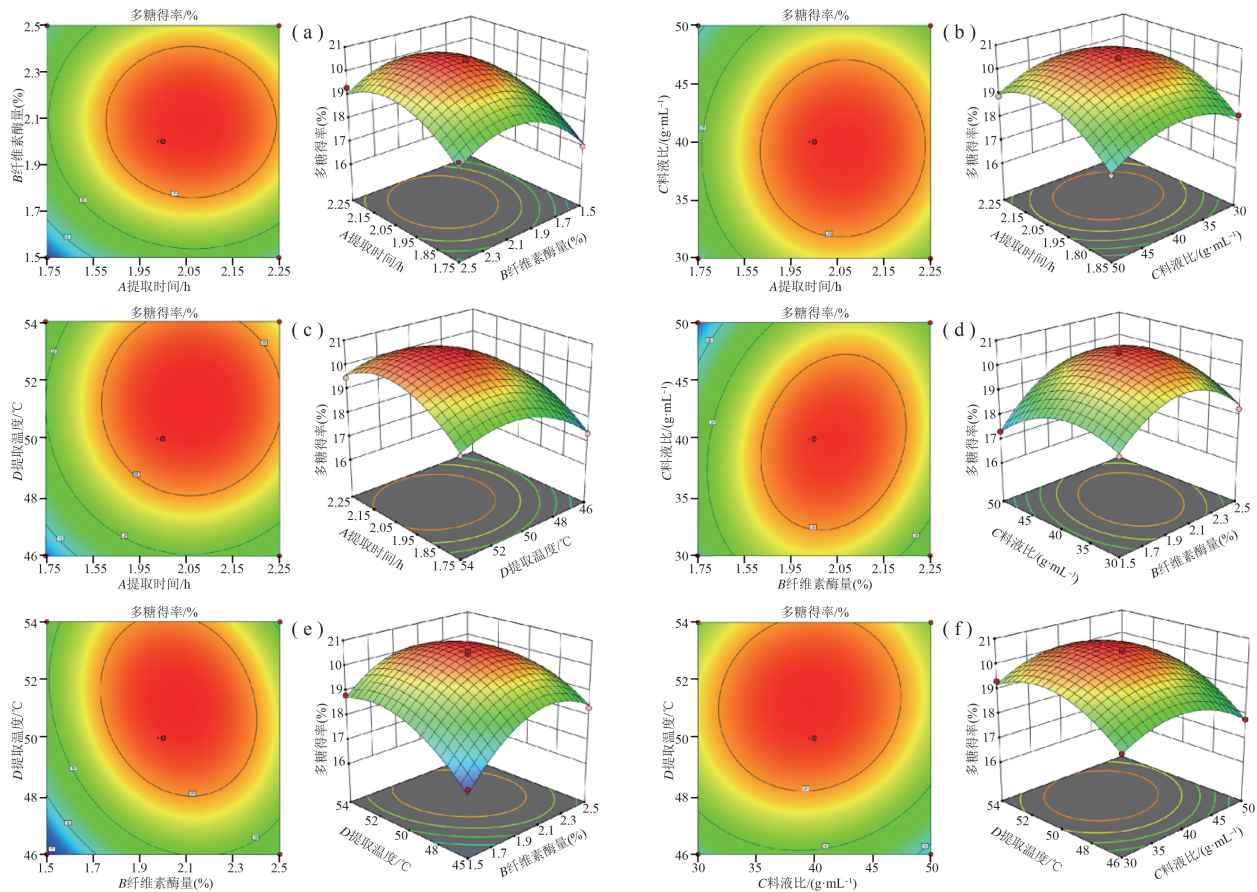


图 6 毛茛苣粗多糖各因素交互作用的等高线图和响应面图 (a) 纤维素酶量和提取时间对毛茛苣粗多糖的影响; (b) 料液比和提取时间对毛茛苣粗多糖的影响; (c) 提取温度和提取时间对毛茛苣粗多糖的影响; (d) 料液比和纤维素酶量对毛茛苣粗多糖的影响; (e) 提取温度和纤维素酶量对毛茛苣粗多糖的影响; (f) 提取温度和料液比对毛茛苣粗多糖的影响

Fig. 6 Contour map and response surface map of the interaction between various factors of polysaccharides in *C. glandulosum* (a) The effects of cellulase content and extraction time on polysaccharides from *C. glandulosum*; (b) The effects of feed to liquid ratio and extraction time on polysaccharides from *C. glandulosum*; (c) The effect of extraction temperature and extraction time on polysaccharides from *C. glandulosum*; (d) The effects of feed to liquid ratio and cellulase content on polysaccharides from *C. glandulosum*; (e) The effect of extraction temperature and cellulase content on polysaccharides from *C. glandulosum*; (f) The effect of extraction temperature and liquid to liquid ratio on polysaccharides from *C. glandulosum*

根据响应面实验结果,模型的 $P < 0.000\ 1$,显示该回归方程非常显著,试验设计可靠。失拟项 P 值为

0.092 5($P>0.05$),显示对二元多次项的回归方程有较好的拟合。变异系数为 0.968 0%,显示各变量间的离散程度较小,数据有较好的稳定。信噪比是衡量模型准确度的重要指标之一,通常信噪比大于 4,本实验所得的信噪比为 27.798 8,显示该模型拟合度较好。试验拟合系数(R^2)是 0.984 5,校正拟合系数(R^2Adj)为 0.967 8,显示各变量之间的线性关系更加密切。回归方程中的交互项 C 、 AB 、 AC 、 AD 和 CD 的 $P>0.05$,显示各交互项对多糖得率的影响并不显著,可能四个因素交互作用较弱,也可能是其他影响因素抵消了这些交互效应,使其交互作用不明显。表 3 中的 A 、 B 、 D 、 BC 、 BD 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 的 $P<0.05$,这些交互项可能会显著影响到毛菊苣粗多糖的得率。此外, A 、 B 、 C 、 D 四个因素的 F 值分别为 93.96、74.59、4.48、129.49,显示各因素对多糖得率的影响顺序为提取温度(D)、提取时间(A)、酶量(B)、料液比(C)。

2.2.2 响应面分析。使用 Design-Expert 13 软件根据模型绘制各因素的等高线与响应面(图 6)。等高线的形状是一个强有力的指标,它能够直观地揭示两个或多个因子之间交互效应的强弱。通过分析等高线,可以发现,当两个因素之间存在较强的作用时,等高线会呈现椭圆状。它们之间的相互作用越强,椭圆形的等高线接触点也会随之增多,这种现象在物理学中被称为“放大效应”。相反,如果等高线呈现圆形,说明两个因素之间的交互比较弱,或者说两个因素的独立程度比较高。此外,因素间的交互强度强弱也可以通过响应面的形状来显示。两个因素之间的交互作用越明显,对应的响应曲面也会越陡。陡峭的响应曲面可能暗示着一种双向的、非线性的相互作用模式,而平缓的曲面则可能揭示出一种单向的、线性的影响关系。从图 5 可看出, AB 、 AC 、 AD 、 CD 的响应曲面较平缓,等高线并未呈现明显的椭圆形,表明各因素间交互作用并不显著。 BC 、 BC 的响应曲面较陡峭,等高线呈现明显的椭圆形,表明各因素间交互作用显著,符合回归方程分析结果。

2.2.3 验证工艺。通过 Design-Expert 13 软件预测的毛菊苣粗多糖最优提取工艺参数为:提取时间 2.062 h,纤维素酶量 2.064%,料液比 1:39.933 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),提取温度 51.176 $^{\circ}\text{C}$ 。为了确保实验结果的准确性,我们对实验过程中的各项因素进行了调整和优化:提取时间 2.0 h,纤维素酶量 2.0%,料液比 1:40($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),提取温度 51 $^{\circ}\text{C}$ 。按此提取工艺提取毛菊苣粗多糖,测得毛菊苣粗多糖的得率为(20.598 ± 0.24)%,与预测值 20.633%相比较吻合,说明此提取工艺可靠合理。

2.3 毛菊苣粗多糖的单糖测定

2.3.1 果糖、葡萄糖标准曲线的建立。果糖与葡萄糖 HPLC-RID 法下建立的标准曲线结果见表 5,线性范围为 0.5~5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,其中果糖的回归方程为 $Y=69\,362X-27\,444$ ($R^2=0.999\,4$),葡萄糖的回归方程为 $Y=82\,514X-75\,072$ ($R^2=0.998\,5$)。

表 5 果糖与葡萄糖回归方程、线性范围及相关系数结果

Tab. 5 Regression equation, linear range, and correlation coefficient results of fructose and glucose			
标样种类	回归方程(Y 为峰面积, X 为浓度)	线性范围($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	相关系数(R^2)
果糖	$Y=69\,362X-27\,444$	0.5~5	0.999 4
葡萄糖	$Y=82\,514X-75\,072$	0.5~5	0.998 5

表 6 毛菊苣粗多糖中果糖加标物实测结果($n=3$)

Tab. 6 Actual measurement results of fructose spiked substances in crude polysaccharides of *C. glandulosum* ($n=3$)

样品名	样品量/mg	加入量/mg	平均回收率(%)	RSD(%)
毛菊苣粗多糖	1.5	1.0	99.7	1.76
	1.5	1.5	100.2	1.61
	1.5	2.0	100.8	1.07

2.3.2 果糖、葡萄糖方法学考察。果糖、葡萄糖精密度试验测定结果的相对标准偏差(RSD)分别为 0.68%、0.72%、1.3%、0.86%,证明本方法的精密度良好;稳定性试验果糖、葡萄糖峰面积的 RSD 分别为 0.46%、0.62%证明供试品溶液在配置后 16 h 内基本稳定;重复性试验果糖测定值标准差为 1.4%、葡萄糖测定值标准差为 0.84%,证明本方法重复性较好;加样回收率结果见表 6,均获得了较理想的回收率。

2.3.3 毛菊苣粗多糖的测定。HPLC-RID 法测定毛菊苣粗多糖中果糖和葡萄糖结果如图 7 所示,其中(a)

图为果糖和葡萄糖的混合对照品(1 为果糖,2 为葡萄糖), (b) 图为毛茛苣粗多糖, 从图中来看, 标准样品中果糖、葡萄糖的保留时间分别在 5.564、6.331 min, 2 种物质完全分离, 毛茛苣粗多糖的果糖和葡萄糖也在对应的时间内出峰, 分离度较好, 周围无杂峰干扰。

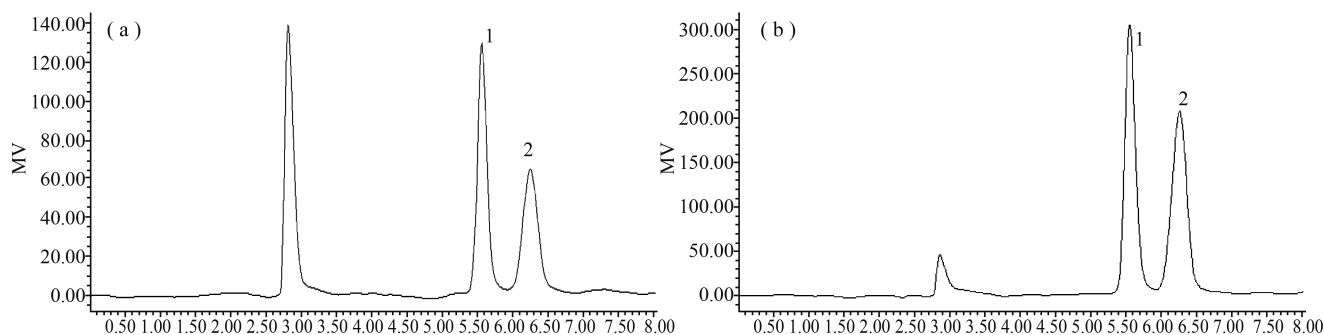


图 7 毛茛苣粗多糖与果糖、葡萄糖 HPLC-RID 图 (a) 混合对照品(1 果糖,2 葡萄糖) (b) 毛茛苣粗多糖

Fig. 7 HPLC-RID diagram of crude polysaccharides from *C. glandulosum* with fructose and glucose (a) mixed control substance (1 fructose, 2 glucose) (b) crude polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium*

2.4 毛茛苣粗多糖体外抗氧化活性

2.4.1 毛茛苣粗多糖对 DPPH 自由基清除作用。不同质量浓度的毛茛苣粗多糖对 DPPH 自由基清除率见图 8。毛茛苣粗多糖质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, DPPH 自由基的清除率达到试验浓度的最大值 64.50%, 与同浓度的抗坏血酸对 ABTS 的清除能力(96.40%)相比抗氧化能力较低, 毛茛苣粗多糖的抗氧化能力弱于抗坏血酸, 但仍显现出其具有一定的抗氧化能力。

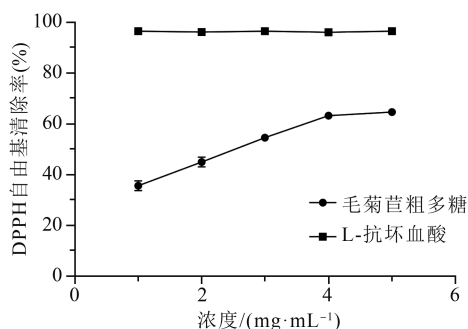


图 8 毛茛苣粗多糖对 DPPH 自由基的清除作用
Fig. 8 The scavenging effect of polysaccharides from *C. glandulosum* on DPPH free radicals

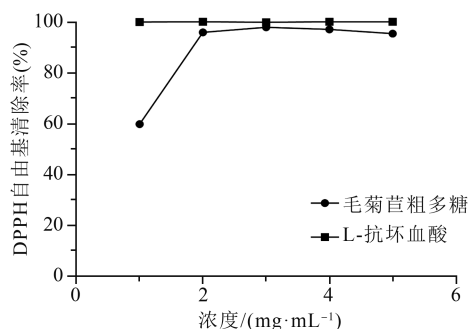


图 9 毛茛苣粗多糖对 ABTS 自由基的清除作用
Fig. 9 The clearing effect of polysaccharides from *C. glandulosum* on ABTS free radicals

2.4.2 毛茛苣粗多糖对 ABTS 自由基清除作用。不同质量浓度的毛茛苣粗多糖对 ABTS 自由基清除率见图 9。毛茛苣粗多糖质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, ABTS 自由基的清除率达到试验浓度的最大值 96.58%, 与同浓度的抗坏血酸对 ABTS 的清除能力(99.88%)相比抗氧化能力较低, 但仍显现出其具有一定的抗氧化能力。

3 结论

单因素实验是优化提取条件的常用方法, 但其具有一定的局限性, 因无法评估变量的互作效应, 往往可能会导致实验结果存在一定的误导性。响应面法可以看作由数学和统计方法两者结合的产物, 用于模拟和分析相关响应受多个变量影响的问题, 其最终目的就是优化该响应值。它作为一种优化方法考虑了随机误差, 弥补了传统优化方法的不足。因其预测性好, 简洁高效, 现已被普遍应用于中药材有效成分的提取工艺优化中^[24]。示差折光检测器是通过连续监测参比池和测量池中溶液的折射率之差来测定试样浓度的检测器。每种物质都具有专属的折射率, RID 属于通用型检测器, 适用于毛茛苣粗多糖中果糖和葡萄糖的检测^[25]。

本课题为毛茛苣药渣粗多糖的提取工艺优化及抗氧化的研究提供基础。在单因素实验的基础上, 使用

Box-Behnken 响应面法优化了毛菊苣药渣粗多糖的提取工艺。毛菊苣粗多糖酶解提取法的最佳工艺条件为:提取时间 2.0 h,纤维素酶量 2.0%,料液比 1:40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),提取温度 51 $^{\circ}\text{C}$ 。在此提取条件下,平行 3 次试验,实测值与预测值相对偏差较小,表明此工艺条件稳定可行。运用 HPLC-RID 法实现了对毛菊苣粗多糖中果糖和葡萄糖的高效鉴定。通过 DPPH 自由基清除实验及 ABTS 自由基清除实验可知,毛菊苣药渣粗多糖具有较好的体外抗氧化作用。本研究为毛菊苣资源的开发与利用奠定了理论基础,同时也为中药资源的利用提供了思路。

参 考 文 献

- [1] YASSER S E, MOHAMED A L, MOHAMMED H, et al. Chicory (*Cichorium intybus* L.) root extract regulates the oxidative status and antioxidant gene transcripts in CCl_4 -Induced hepatotoxicity [J]. Plos One, 2015, 10(3): 1-12.
- [2] WANG R, ZHENG G J, DANG T, et al. Chemical constituents from the roots of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet (Asteraceae) [J]. Biochemical Systematics and Ecology. 2021; 96 (0):104261-104261.
- [3] JAISWAL V, LEE H J. The bioactivity and phytochemicals of muscari comosum (*Leopoldia comosa*), a Plant of Multiple Pharmacological Activities[J]. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25 (5): 2592-2592.
- [4] 秦冬梅. 毛菊苣活性成分及抗肝纤维化作用机制研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2017.
- [5] 党婷. 毛菊苣化学成分及其生物活性研究[D]. 石河子:石河子大学, 2020.
- [6] 高月锋, 秦冬梅. 毛菊苣的保肝作用及其机制[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2024, 37(6): 90-96.
- [7] 潘华峰, 邓乔丹, 冯毅骞, 等. 中药渣综合利用的可行性分析[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 2026-2027.
- [8] 胡利萍, 张钰, 秦冬梅, 等. 维药毛菊苣 95%乙醇提取物对刀豆蛋白 A 诱导小鼠免疫性肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药房, 2017, 28(34): 4830-4834.
- [9] 潘培妍, 苏林洁, 秦冬梅. 毛菊苣正丁醇部位对 CCl_4 诱导大鼠慢性肝损伤的缓解作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(10): 2566-2574.
- [10] 苏林洁, 邹楠, 赫翠, 等. 新疆毛菊苣乙酸乙酯萃取物对小鼠降糖作用的研究[J]. 医药导报, 2023, 42(10): 1429-1436.
- [11] 李聪, 邹楠, 袁今奇, 等. 毛菊苣正丁醇部位调节肠道菌群-肠-肝轴防治大鼠慢性肝病的研究[J]. 医药导报, 2022, 41(8): 1108-1115.
- [12] 曾慧婷, 戴迪, 何小群, 等. 大健康背景下药食两用药渣的资源化利用研究实践与策略[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(14): 3968-3976.
- [13] 杨明翰, 梁政亨, 兰卫. 新疆药食同源资源毛菊苣的开发研究与前景展望[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(7): 695-702.
- [14] 王文健, 耿业业, 曹珂鸣, 等. 中药渣成分分析及其在中药材种植中的应用[J/OL]. 特产研究, 1-7[2024-10-05]. <https://doi.org/10.16720/j.cnki.tcyj.2024.184>.
- [15] 李帅庚. 结球菊苣和毛菊苣粗多糖分离纯化及其寡糖的制备[D]. 沈阳:沈阳化工大学, 2023.
- [16] 占少琴. 天然植物多糖提取工艺及研究进展[J]. 中国食品工业, 2023, (21): 111-113.
- [17] ZHANG Y, HE L, LI Q, et al. Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent for the extraction of polysaccharides from *Indocalamus tessellatus* leaves and their biological studies[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2022, 30: 561-572.
- [18] MOHAMMAD K M, BATOUL C, GHASSAN N, et al. Optimization of polysaccharides extraction from a wild species of *Ornithogalum* combining ultrasound and maceration and their anti-oxidant properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 958-968.
- [19] 吴梦柯. 香蕉花水溶性多糖提取、结构分析及其生物活性研究[D]. 南宁:广西民族大学, 2023.
- [20] 辛文燕, 何劲, 汪艳群. 山桐子粕多酚提取工艺优化及抗氧化活性的研究[J/OL]. 中国粮油学报, 1-11. [2024-10-23]. <https://doi.org/10.20048/j.cnki.issn.1003-0174.000839>.
- [21] 刘永玲, 刘向炼, 陶欣, 等. 八月瓜果皮多糖提取工艺优化及其体外抗氧化、降糖活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 17-24.
- [22] YUN C, JI X C, CHEN Y W, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of *Scutellaria baicalensis* root polysaccharide and its hypoglycemic and immunomodulatory activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 227: 134-145.
- [23] 惠和平, 金辉, 赵锐明, 等. 败酱草多糖的超声波协同复合酶提取、结构分析及抗菌活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1412-1418.
- [24] 王永菲, 王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2005(3): 236-240.
- [25] 管艺同, 朱渊, 陆益红. 药品、生物制品及相关样品中蔗糖含量分析方法的研究进展[J]. 药学与临床研究, 2023, 31(5): 434-440.

(责任编辑:刘庆松)