

本文引用: 李琴, 李纳新. 星点设计-响应面法优化超声波提取石榴皮多糖的工艺及抗氧化活性研究[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (3): 182-186.

【基础研究】

星点设计-响应面法优化超声波提取石榴皮多糖的工艺及抗氧化活性研究

李 琴¹, 李纳新²

(1. 新乡医学院分析测试实验室, 河南 新乡 453003; 2. 漯河市中心医院药房, 河南 漯河 462000)

摘要: **目的** 通过星点设计-响应面法优化石榴皮多糖的提取工艺及抗氧化活性。**方法** 以石榴皮多糖的含量为指标, 采用超声波辅助技术提取石榴皮多糖, 用星点设计-响应面法研究了液料比、提取时间、提取温度和超声功率对提取石榴皮多糖的影响; 观察了对二苯基苦基苯肼自由基(• DPPH)、羟基自由基(• OH)、过氧化氢(H₂O₂)的清除作用。**结果** 超声波提取石榴皮多糖的最佳工艺为: 液料比 29.98 (mL : g), 提取时间 43.72 min, 提取温度 62.79 °C, 超声功率 454.30 W, 以此工艺条件得多糖提取率为 7.03%; 石榴皮多糖对 • DPPH、• OH、H₂O₂ 有明显的清除作用。**结论** 星点设计-响应面法用于优化提取工艺具有简便合理、稳定的特点, 在优化石榴皮多糖提取条件中应用效果良好; 石榴皮多糖有明显的抗氧化作用。

关键词: 石榴皮; 多糖; 超声辅助提取; 星点设计; 响应面法

中图分类号: R282.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239 (2014)03-0182-05

Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from pomegranate peel by central composite design and response surface methodology and antioxidant activity

LI Qin¹, LI Na-xin²

(1. Analysis & Test Laboratory, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Pharmacy, Luohe Center Hospital, Luohe 462000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** Central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM) was used to optimize the extraction conditions of polysaccharides from pomegranate bark, its antioxidant activity was investigated. **Methods** The contents of polysaccharides in pomegranate bark was used as index, and the ultrasound assistive technology was used to extract the polysaccharides in pomegranate bark. CCD-RSM was used to study the effect of ratio of water to raw material, extraction time, extraction temperature, and ultrasonic power on extraction of polysaccharides in pomegranate bark. Antioxidant activity of polysaccharides from pomegranate bark to oxidants such as • DPPH, • OH, H₂O₂ was studied. **Results** The optimum extraction conditions were found to be ratio of water to raw material 29.98 (mL : g), extraction time 43.72 min, extraction temperature 62.79 °C, and ultrasonic power 454.30 W. Under these conditions, the extraction rate of polysaccharides was 7.03%. Polysaccharides from pomegranate bark has obviously clearing action of • DPPH, • OH and H₂O₂. **Conclusion** CCD-RSM is used to optimize the extraction conditions of polysaccharides from pomegranate peel is simple, rational and stable. Polysaccharides from pomegranate bark has significant antioxidant effect.

Key words: pomegranate peel; polysaccharides; ultrasonic extraction; central composite design; response surface methodology

石榴皮味涩、性温、生津止渴、收敛止泻、驱虫杀菌, 用于治疗虫积、痢疾、崩漏等症状^[1]。石榴皮含有多酚类^[2-4]、氨基酸^[5]、果胶、糖类^[6]等。石榴皮多糖具有很强的还原力和清除羟自由基的活性^[7]。超声波提取具有能耗低、效率高、不破坏有效成分等特点^[8-9]。本研究利用星点设计-响应面法, 重点考

察了液料比、提取时间、提取温度和超声功率对石榴皮多糖提取的影响, 确立了超声波法提取石榴皮多糖的工艺, 为工业化生产提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 石榴购于市场, 洗净后剥皮, 将石榴皮于 50 °C 烘干, 粉碎, 作为样品。二苯基苦基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH) 分析纯 (美国 Sigma 公司产品), 过氧化氢, 邻二氮菲铁, 葡萄糖、

苯酚、浓硫酸、乙醇等均为国产分析纯,水为重蒸水。

JY92-IIN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),T6 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),FA2104 电子天平(上海力衡仪器仪表有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 超声波提取石榴皮多糖的工艺 准确称取 5.0 g 过 40 目筛的石榴皮粉末,乙醚回流 2 次以去除脂类,体积分数 75% 的乙醇回流 2 次以去除单糖、低聚糖。然后加入适量蒸馏水,充分浸透,于水浴锅内预热到一定温度,然后置于超声波仪器内,按一定功率进行超声提取,一定时间后对提取液进行抽滤,浓缩滤液,冷冻干燥,即得石榴皮粗多糖。

1.2.2 石榴皮多糖含量和提取率的测定 精密称取干燥至恒重葡萄糖粉末 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,得葡萄糖标准溶液。精密量取葡萄糖标准溶液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL 分别置于试管中,加水补至 2 mL,分别加 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀,置沸水中水浴加热 15 min,取出冷却至室温,在 490 nm 处测定其吸光度,得回归方程 $y = 13.127x + 0.017$,相关系数 $r = 0.9998$,线性范围为 $10 \sim 60\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

准确称取 5.0 g 过 40 目筛的石榴皮粉末,按 1.2.1 方法操作,得石榴皮粗多糖。将石榴皮粗多糖溶于蒸馏水中,在 250 mL 量瓶中定容。精密吸取供试品溶液 1 mL 置 50 mL 量瓶中,加水定容至刻度,精密量取 1 mL,按苯酚-硫酸法^[10]测定石榴皮多糖含量。多糖提取率 = $(y_{\text{样品}} \times \text{稀释倍数} \times \text{样品溶液体积}) / \text{样品质量} \times 100\%$ 。公式中: $y_{\text{样品}}$ 为石榴皮样品浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 液料比对多糖提取率的影响 精密称取 5.0 g 干燥至恒重过 40 目筛的石榴皮粉末,按 1.2.1 方法操作,提取 1 次,其中超声温度为 50 ℃,超声时间为 30 min,超声功率为 300 W,液料比采用 5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1 ($\text{mL} : \text{g}$),分别提取多糖,测定多糖提取率。

1.2.3.2 提取时间对多糖提取率的影响 精密称取 5.0 g 干燥至恒重过 40 目筛的石榴皮粉末,按 1.2.1 方法操作,其中超声温度为 50 ℃,超声功率为 300 W,液料比采用 20 : 1 ($\text{mL} : \text{g}$),提取 1 次,提取时间分别采用 10、20、30、40、50、60 min,测定多糖提取率。

1.2.3.3 提取温度对多糖提取率的影响 精密称取 5.0 g 干燥至恒重过 40 目筛的石榴皮粉末,按 1.2.1 方法操作,其中超声时间为 30 min,超声功率为 300 W,液料比采用 20 : 1 ($\text{mL} : \text{g}$),提取温度分别采用 40、50、60、70、80、90 ℃,最后测定多糖提取率。

1.2.3.4 超声功率对多糖提取率的影响 精密称取 5.0 g 干燥至恒重过 40 目筛的石榴皮粉末,按 1.2.1 方法操作,其中超声温度为 50 ℃,超声时间为 30 min,液料比采用 20 : 1 ($\text{mL} : \text{g}$),超声功率分别选择 100、200、300、400、500、600 W,测定多糖提取率。

1.2.3.5 提取次数对多糖提取率的影响 精密称取 5.0 g 干燥至恒重过 40 目筛的石榴皮粉末,按 1.2.1 方法操作,其中液料比采用 20 : 1 ($\text{mL} : \text{g}$),超声时间为 30 min,提取温度为 50 ℃,超声功率采用 300 W 的条件下,考察提取次数对多糖提取率的影响。

1.2.4 星点设计试验 根据星点设计-响应面法的原理,结合单因素预试验结果,安排星点设计试验,以石榴皮多糖提取率为响应值对提取工艺进行优化。

1.2.5 体外抗氧化活性

1.2.5.1 石榴皮多糖对 DPPH 自由基清除作用的测定 按文献[11]方法,取石榴皮多糖溶液 2 mL 及 2 mL 浓度为 $1.2 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液,置于具塞试管中,室温 30 min,以蒸馏水为空白调零于 517 nm 测定其吸光度为 A_1 ;测定 2 mL 浓度为 $1.2 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水混合液的吸光度为 A_0 ;测定 2 mL 多糖样品溶液与 2 mL 无水乙醇混合液的吸光度为 A_2 。按照下列公式计算清除率,根据不同浓度多糖溶液对 DPPH 自由基的清除率作图。DPPH 自由基抑制率 = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。

1.2.5.2 石榴皮多糖体外清除羟基自由基的作用

取石榴皮多糖溶液 2 mL,按文献[12]方法,测定对羟基自由基的清除作用。

1.2.5.3 石榴皮多糖对 H_2O_2 清除能力的测定

取石榴皮多糖溶液 2 mL,按文献[13]方法,测定对 H_2O_2 清除能力。

1.3 统计学处理 应用 Design-Expert 7 软件对所得数据进行响应面分析,以多糖提取率为响应值分别对各因素进行多元线性回归和二项式方程拟合。

2 结果

2.1 单因素试验结果 结果显示多糖提取率随液

料比的增加而增加,25:1时提取率接近最高,多糖基本提取完全,再增大液料比对多糖的提取率影响较小,同时也不利于多糖的浓缩,故选择液料比25:1(图1);提取时间为40 min时多糖提取率基本上达到最高,并且随着时间的延长提取率逐渐降低,并且还会增加能源的消耗,所以提取时间采用40 min为宜(图2);提取温度为60℃时多糖提取率达到最高(图3);结果显示超声功率为400 W时多糖提取率达到最高(图4);第1次提取率为5.69%,第2次提取后累计达6.44%,提取3次累计的得率为6.61%。综合考虑后期浓缩的困难、能耗及工时等因素,选择提取1次为宜(图5)。

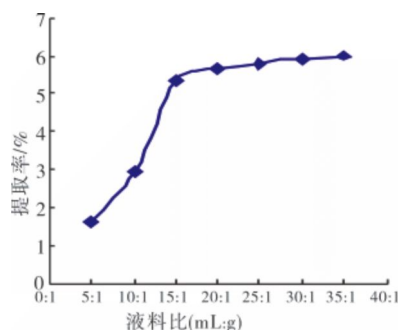


图1 液料比对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of liquid-to-solid ratio on extraction rate of polysaccharides

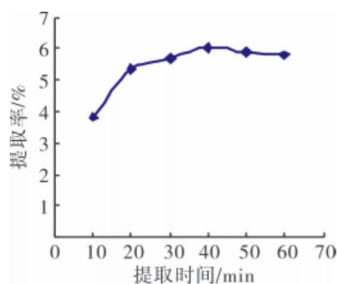


图2 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on extraction rate of polysaccharides

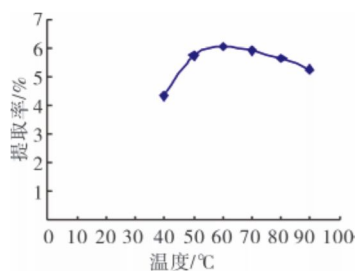


图3 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of temperature on extraction rate of polysaccharides

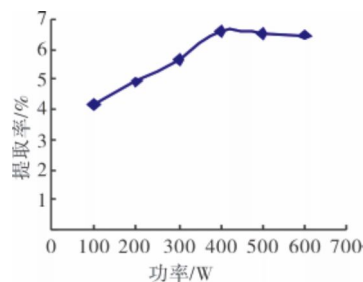


图4 超声功率对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on extraction rate of polysaccharides

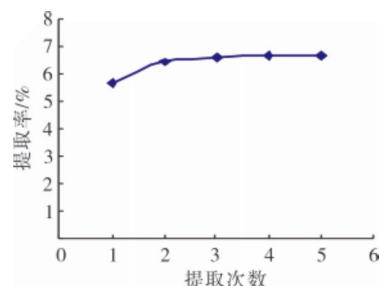


图5 提取次数对多糖提取率的影响

Fig.5 Effect of the number of repeated extraction on extraction rate of polysaccharides

2.2 星点设计实验 综合单因素实验结果,将液料比(A)、提取时间(B)、提取温度(C)和超声功率(D)作为提取因素,石榴皮多糖提取率为响应值进行优化,分析因素见表1,星点设计方案及实验结果见表2。以多糖提取率(Y)为响应值分别对各因素(A、B、C、D)进行多元线性回归和二项式方程拟合,拟合模型如下: $Y = 6.91 + 0.18A + 0.13B + 0.21C + 0.29D - 0.0050AB + 0.0075AC + 0.025AD + 0.016BC + 0.011BD - 0.00125CD - 0.045A^2 - 0.18B^2 - 0.31C^2 - 0.25D^2$ ($R^2 = 0.9134$)。为检验该方程的有效性,对该数学模型进行方差分析,结果显示该模型 $P < 0.0001$,说明方程与实际情况拟合很好,较好地反映了石榴皮多糖提取率与液料比、提取时间、提取温度和超声功率的关系。将不显著因素删除,方程简化为: $Y = 6.86 + 0.18A + 0.13B + 0.21C + 0.29D - 0.17B^2 - 0.30C^2 - 0.24D^2$ ($R^2 = 0.9056$)。

表1 多糖提取工艺星点设计因素与水平

Tab.1 Factors and levels of polysaccharide extraction in central composite design

因素	水平				
	-2	-1	0	+1	+2
液料比 (mL:g)	15:1	20:1	25:1	30:1	35:1
提取时间/min	20	30	40	50	60
提取温度/℃	40	50	60	70	80
超声功率/W	200	300	400	500	600

表2 星点实验设计及结果

Tab.2 Scheme and experimental results of central composite design

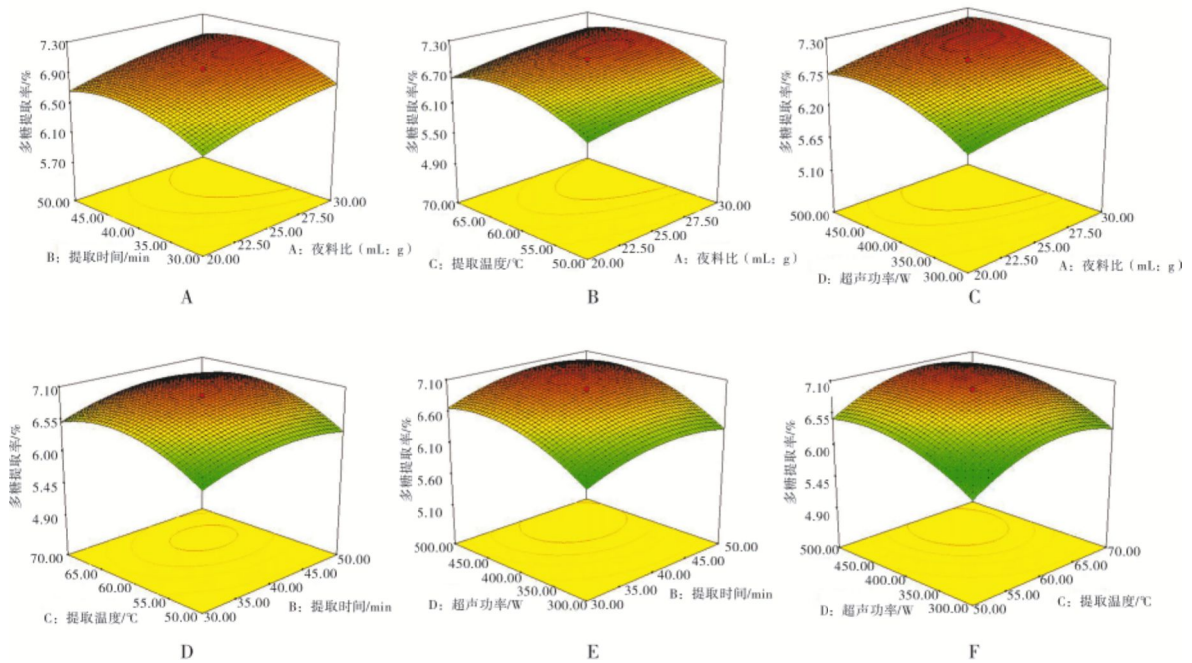
试验号	A	B	C	D	多糖提取率/%
1	0	0	2	0	6.49
2	0	0	0	0	6.67
3	-1	1	-1	-1	5.73
4	1	-1	1	-1	6.07
5	1	-1	1	1	6.53
6	1	-1	-1	1	6.31
7	-1	1	1	1	6.38
8	1	1	1	1	6.74
9	-1	-1	1	1	6.19
10	0	0	0	-2	5.15
11	-1	-1	-1	1	5.98
12	-1	-1	-1	-1	5.55
13	1	1	1	-1	6.23
14	-2	0	0	0	6.36
15	0	0	0	0	6.96
16	1	1	-1	-1	5.86
17	0	0	0	2	6.79
18	0	0	0	0	6.96
19	2	0	0	0	7.21
20	1	1	-1	1	6.51
21	1	-1	-1	-1	5.86
22	0	0	0	0	6.96
23	-1	1	1	-1	5.93
24	0	-2	0	0	5.79
25	0	0	0	0	6.96
26	0	0	0	0	6.96
27	0	2	0	0	6.73
28	-1	-1	1	-1	5.75
29	0	0	-2	0	4.96
30	-1	1	-1	1	6.08

2.3 工艺参数优化与预测 固定3个变量中的2个为中值,把因变量多糖提取率与另2个因素拟合为三维曲面图,以拟合目标函数为数学模型,绘制因变量曲面图,确定石榴皮多糖提取的最佳工艺条件。石榴皮多糖提取率随液料比的升高而升高,随提取时间的延长、提取温度的升高、超声功率的增大表现出先升高后稍微下降的趋势;液料比、提取温度、超声功率的曲面斜率均略高于提取时间的曲面斜率,结果见图6。由简化后的二项式模型进行预测分析,得最优工艺为:液料比29.98(mL:g),提取时间43.72 min,提取温度62.79℃,超声功率454.30 W,多糖提取率为7.21%。根据最优工艺进行验证,实测提取率为7.03%,实际值比预测值低2.50%,说明了星点设计-响应面法所得到理论最佳工艺是可行的和有效的。

2.4 体外抗氧化活性情况

2.4.1 石榴皮多糖对DPPH自由基清除作用 石榴皮多糖对DPPH自由基有较为明显的清除作用,并随着多糖浓度的增加作用增强,但到1.2 g·L⁻¹时基本不再发生变化。

2.4.2 石榴皮多糖对羟基自由基的清除作用 石榴皮多糖在0.2~0.6 g·L⁻¹,对羟基自由基的清除作用随着多糖浓度的增加而增加,随着多糖浓度的继续增加清除作用增加不明显,当多糖浓度达到1.2 g·L⁻¹时清除作用达到最大,为88.0%。



A: 液料比与提取时间的交互作用;B: 液料比与提取温度的交互作用;C: 液料比与超声功率的交互作用;D: 提取时间与提取温度的交互作用;E: 提取时间与超声功率的交互作用;F: 提取温度与超声功率的交互作用。

图6 各因素间的交互作用

Fig.6 Interaction of each factor

2.4.3 石榴皮多糖对 H_2O_2 的清除能力 石榴皮多糖在 $0.20 \sim 0.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对过氧化氢的清除作用随着多糖浓度的增加而增加,随着多糖浓度的继续增加清除作用增加不明显,当多糖浓度达到 $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时清除作用达到最大,为 32.6%。

通过石榴皮多糖对 DPPH 自由基、羟基自由基、 H_2O_2 清除能力的测定,发现石榴皮多糖具有明显的抗氧化活性。

3 讨论

液料比、提取时间、超声功率对多糖提取率有极显著影响。其原因为液料比的增加有利于多糖的溶解及扩散,但过高的液料比不利于后期多糖的浓缩;而时间的延长一方面会有利于多糖的溶解,另一方面由于超声波长时间作用于多糖会导致其被破坏。

本试验通过用星点设计-响应面法研究了液料比、提取时间、提取温度和超声功率与石榴皮多糖提取率相互作用的数学模型,并预测最佳提取工艺:液料比 29.98 (mL : g),提取时间 43.72 min,提取温度 62.79°C ,超声功率 454.30 W,以此工艺条件得多糖提取率为 7.03%,与预测值相符,说明了用响应面分析法来设计最佳提取工艺是可靠的,且合理可行。

(上接第 181 页)

针刺保护肾功能的机制可能在于通过活化 PPAR γ 使其高表达,而 PPAR γ 高表达可能通过以下机制发挥着重要的抗炎、抗增生和肾脏保护作用^[10]: (1) 调控 ATP 结合转运子 A1 介导的胆固醇分泌而防止脂质沉积; (2) 抑制系膜细胞的增长; (3) 抑制血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1 的表达,限制其摄取氧化脂蛋白的能力; (4) 调节肾血流动力学和水盐转运,促进血清尿素氮和血肌酐的排出。

综上所述,针刺可能通过提高 PPAR γ 蛋白表达抑制肾细胞凋亡,起到减轻高脂饮食对肾脏的损伤作用,从而为临床应用的可行性提供实验依据。

参考文献:

- [1] 陈雪辉,魏学娟,王涛,等. 黄芪多糖对大鼠胰岛素敏感性和脂肪细胞因子的影响[J]. 新乡医学院学报,2013,30(5):356-359.
- [2] Boini K M, Zhang C, Xia M, et al. Role of sphingolipid mediator ceramide in obesity and renal injury in mice fed a high-fat diet [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(3): 839-846.
- [3] 万荣君,李月红. 针灸治疗肾脏疾病临床应用概况[J]. 中国针灸, 2009, 29(4): 342-344.
- [4] Wu J, Sun M, Lin J C, et al. Impact of fenofibrate on NO and endo-

参考文献:

- [1] 孔阳,马养民,李彦军,等. 石榴皮粗提物抗菌活性的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(9): 199-201.
- [2] 刘延泽,李海霞. 石榴皮中的鞣质及多元酚类成分[J]. 中草药, 2007, 38(4): 502-504.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 664.
- [4] Hussein S A M, Barakat H H, Merfort I, et al. Tannins from the leaves of *Punica granatum* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(4): 819-823.
- [5] 刘家富,周家齐. 云南蒙自石榴主要成分分析[J]. 云南农业科技, 1995(6): 17-18.
- [6] 周孟清,吕寻钊. 乙醇沉淀法提取石榴皮中多糖类研究[J]. 林业科技, 2011, 36(5): 31-33.
- [7] 柯春林,王娣,邓源喜,等. 石榴皮多糖的制备及其抗氧化活性研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(4): 684-689.
- [8] 刘祥义. 超声波提取元宝枫叶总黄酮方法研究[J]. 云南化工, 2003, 30(1): 27-28.
- [9] 谢明杰,宋明,邹翠霞. 超声波提取大豆异黄酮[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 74-76.
- [10] 钱和,张添,刘长虹. 改进苯酚-硫酸法测定芦荟多糖含量[J]. 江苏食品与发酵, 2002(2): 3-6.
- [11] 张英,石雪萍,张卫明. 葱白多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 255-259.
- [12] 蔡仲军,陈仕江,尹定,等. 不同产地冬虫夏草清除羟自由基作用的研究[J]. 中草药, 2004, 35(1): 57-59.
- [13] 颜栋美,姚艾东. 金花茶多酚抗氧化性能的研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2009, 30(2): 42-45.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)

thelial VCAM-1 expression in hyperlipidemic rats [J]. *South Med Univ*, 2007, 27(12): 1872-1874.

- [5] 王永玲,郭勇,千新来,等. 针刺肥胖合并高脂血症大鼠时瘦素基因对肝细胞凋亡的影响[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(10): 1723-1725.
- [6] Li F, Wang C H, Wang J G, et al. Elevated tissue factor expression contributes to exacerbated diabetic nephropathy in mice lacking eNOS fed a high fat diet [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(10): 2122-2132.
- [7] Morena M, Patrier L, Jaussent I, et al. Reduced glomerular filtration rate, inflammation and HDL cholesterol as main determinants of superoxide production in non-dialysis chronic kidney disease patients [J]. *Free Radic Res*, 2011, 45(6): 735-745.
- [8] Waness A, Bahlas S, Al Shohaib S. Simvastatin-induced rhabdomyolysis and acute renal injury [J]. *Blood Purif*, 2008, 26(4): 394-398.
- [9] 张志华. AR/Bax/Bcl-2、PPAR γ 基因表达与小鼠糖尿病肾病关系的探讨[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2005.
- [10] Kusunoki H, Taniyama Y, Rakugi H, et al. Cardiac and renal protective effects of irbesartan via peroxisome proliferator-activated receptor γ -hepatocyte growth factor pathway independent of angiotensin II type 1a receptor blockade in mouse model of salt-sensitive hypertension [J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(2): e000103.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王燕)