

正交实验法优化紫蛇尾皂苷提取工艺研究

王荣镇, 党永龙, 冯建荣, 王全会, 代 鹏, 郭承华

(烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 以紫蛇尾(*Ophiopholis mirabilis*)皂苷溶液吸光度为指标, 采用单因素实验法考察乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数、提取温度等因素对紫蛇尾皂苷提取效果的影响, 通过正交实验确定最佳工艺条件。结果表明, 紫蛇尾皂苷的最佳提取工艺为 60℃水浴, 料液比 1:40 (W/V), 每次 3 h, 提取 4 次。按照最佳工艺条件所得蛇尾皂苷平均产率为 1.77%, 表明此最佳工艺可用于紫蛇尾皂苷的制备。

关键词: 紫蛇尾(*Ophiopholis mirabilis*); 蛇尾皂苷; 正交实验法; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)02-0046-04

紫蛇尾(*Ophiopholis mirabilis*), 属于棘皮动物门(Echinodermata), 蛇尾纲(Ophiuroidea), 颚蛇尾亚目(Gnathophiurina), 辐蛇尾科(Ophiactidae), 紫蛇尾属(*Ophiopholis* Muller et Troschel), 在黄海中部和北部, 大连, 旅顺, 海洋岛, 长岛, 烟台和青岛外海大量分布^[1]。据报道, 已从棘皮动物门海星纲、海参纲多个科属中提取分离得到具有降血压、抗肿瘤、抗真菌、抗炎和抗糖尿病作用等生理功能的皂苷类化合物^[2-6], 但对蛇尾纲动物皂苷的研究未见报道。目前测定皂苷含量的主要方法有溶血指数法、香草醛-高氯酸比色法、高效液相色谱法等, 而紫蛇尾皂苷经过颜色反应鉴定为甾体皂苷, 可以参照文镇等测定甾体海星皂苷的实验方法进行测定^[7]。

本研究首次从黄渤海交汇处长岛海域的紫蛇尾(整体)中提取皂苷并确定检测方法和最佳提取工艺, 为紫蛇尾皂苷进一步制备、纯化研究提供理论基础。

1 材料、仪器与试剂

紫蛇尾, 2009年4月采集于黄渤海交汇处的长岛海域, 洗净泥沙后自然风干、粉碎, 备用。Rotavapor R-220(BUCHI); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); T6 新世纪型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司); TU1900 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); DZF-6020 型真空干燥箱(上海博迅公司)。标准皂苷(Serva 进口分装, 北京化工厂), 甲醇、乙醇、浓硫酸等均为分析纯。

2 方法

2.1 紫蛇尾皂苷检测波长确定

自制皂苷样品配成 0.50 g/L 的甲醇溶液, 取 1 mL 溶液于 10 mL 比色管中, 挥干溶剂, 加入 2 mL 浓硫酸, 60℃水浴显色 60 min, 冰水浴冷却, 用甲醇定容至 10 mL 比色管, 200~800 nm 扫描波长, 20% 硫酸-甲醇($H_2SO_4:CH_3OH = 1:4, V/V$)溶液随行空白, 标准皂苷做对比。通过扫描, 在 276 nm 处有最大吸收峰。

2.2 标准曲线制作

精密移取标准皂苷甲醇溶液(1.067 g/L)0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 比色管中, 挥干溶剂, 加入 2.0 mL 浓硫酸, 60℃水浴锅显色反应 60 min, 冰水浴冷却, 将甲醇定容至 10 mL 比色管并混匀、冷却, 20% 硫酸-甲醇溶液随行空白, 在 276 nm 处测定吸光度。以标准溶液体积为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

2.3 单因素实验

紫蛇尾皂苷采用传统溶剂法提取, 影响皂苷提取产率的因素有乙醇体积分数、提取温度、提取时

收稿日期: 2010-12-16; 修回日期: 2011-03-09

基金项目: 山东省研究生教育创新计划项目(SDY09086); 山东省自然科学基金资助项目(Y2008E05); 烟台大学学生科技创新基金立项资助项目(No.090503, 100503)

作者简介: 王荣镇(1984-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要研究海洋生物活性物质, E-mail: xinshiyifan@126.com; 郭承华, 通信作者, 电话: 0535-6903551, E-mail: gch@ytu.edu.cn

间、提取次数和料液比 5 个因素。通过单因素实验分析 5 个因素对紫蛇尾皂苷提取的影响力大小以及各主要影响因素的水平。以温度因素为例, 流程如下:

取紫蛇尾样品 10.00 g 于烧杯中, 加入 85%乙醇 200 mL, 30 °C(或者 40、50、60、70 °C)水浴加热提

取 3 h, 合并上清液并过滤, 将滤液减压蒸干, 用甲醇溶解后定容至 100 mL 容量瓶。取 0.2 mL 置于 10 mL 比色管中, 按照标准曲线做法测定 276 nm 处吸光度, 空白对照也同标准曲线做法。做出温度对吸光度变化曲线图。

表 1 因素及水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素				
	A 提取温度(°C)	B 提取次数	C 提取时间(h)	D 料液比 (W/V)	E 乙醇体积分数 (%)
1	30	1	1	1:10	55
2	40	2	2	1:20	65
3	50	3	3	1:30	75
4	60	4	4	1:40	85
5	70	5	5	1:50	95

2.4 正交实验

通过单因素实验, 确定影响紫蛇尾皂苷提取产率的四个主要因素以及各因素的三个水平。采用 L9(3⁴)正交实验法确定最佳提取工艺。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线

如图 1 所示, 标准曲线线性回归方程: $y = 1.4017x - 0.0162$, $R^2 = 0.9986$

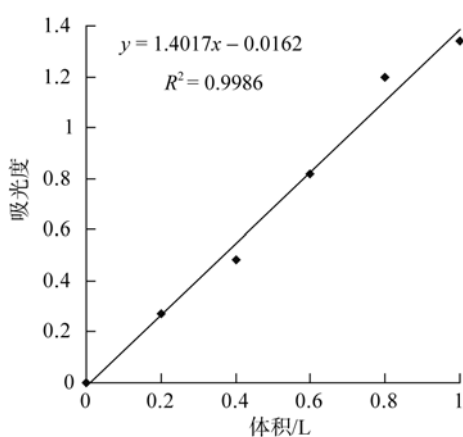


图 1 皂苷标准曲线

Fig. 1 Curve of standard saponin

3.2 单因素实验结果

3.2.1 乙醇体积分数的影响

由图 2 看出, 乙醇体积分数 85%时吸光度最大,

也即皂苷产率最大, 而体积分数小于 85%或者大于 85%时吸光度减小, 同时考虑到乙醇体积分数减小会从样品中溶解更多的无机盐、糖类杂质, 对后续分离纯化工作增加难度, 出于综合考虑, 选择体积分数 85%乙醇作为提取溶剂。这与本项目组以前研究中提取砂海星皂苷、海燕皂苷时所用的乙醇体积分数相同^[8]。

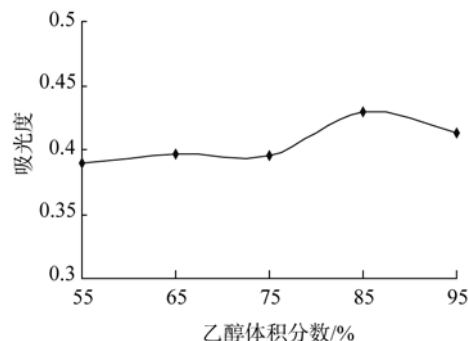


图 2 乙醇体积分数对吸光度影响

Fig. 2 Influence of ethanol concentration on the absorbance

3.2.2 提取温度的影响

图 3 表明, 在温度 50 时, 皂苷产率最大, 超过 50 产率开始下降, 在保证产率的前提下, 为减少乙醇挥发, 确定温度的三个水平为 40, 50 和 60。

3.2.3 提取时间的影响

图 4 可以看出, 随着时间延长吸光度呈增加趋势, 4 h 后趋于平缓, 因此选择 2, 3, 4 h 作为提取时间的三个水平。

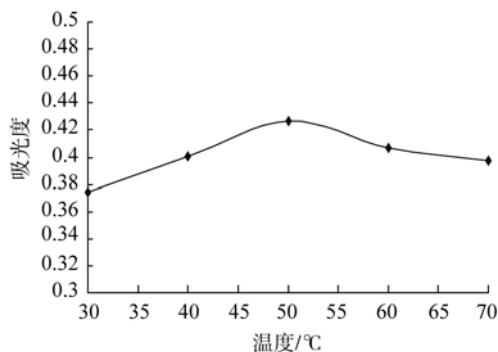


图 3 温度对吸光度影响

Fig. 3 Influence of temperature on the absorbance

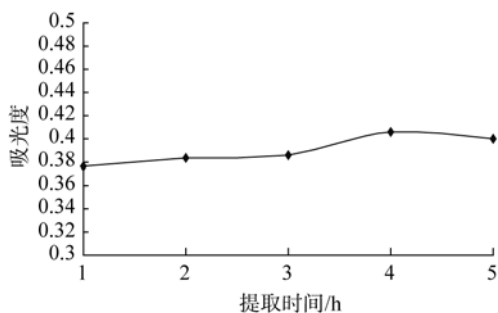


图 4 提取时间对吸光度影响

Fig. 4 Influence of extraction time on the absorbance

3.2.4 提取次数的影响

随着提取次数增加, 吸光度增大, 但是第 4 次、第 5 次增加趋于平缓, 从综合减小能耗角度考虑, 选择 2 次、3 次、4 次作为三个水平(图 5)。

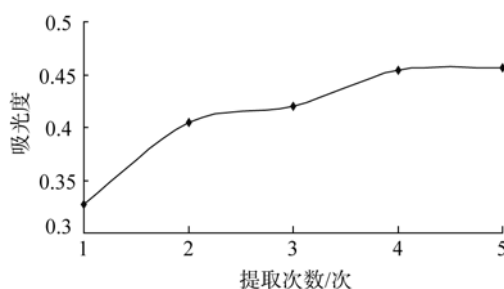


图 5 提取次数对吸光度影响

Fig. 5 Influence of extraction times on the absorbance

3.2.5 料液比的影响

图 6 所示, 随着料液比增加, 吸光度呈增加趋势, 料液比 1:50 (W/V)与 1:40 (W/V)变化不大, 因此选择料液比 1:20(W/V), 1:30(W/V), 1:40 (W/V)作为三个水平。

综上所述, 选择提取温度(40, 50, 60), 提取次数(2, 3, 4 次), 提取时间(2, 3, 4 h), 料液比[1:20

(W/V), 1:30 (W/V), 1:40 (W/V)], 作为正交实验的因素及水平。

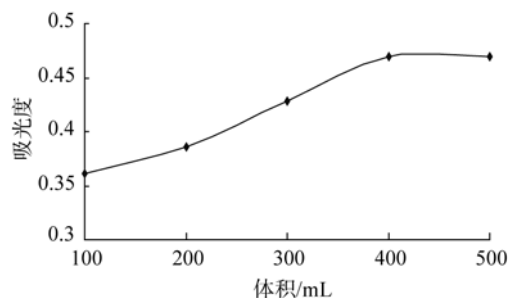


图 6 料液比对吸光度影响

Fig. 6 Influence of solid to liquid ratio on the absorbance

3.3 正交实验结果

正交实验表及各组实验的皂苷产率如表 2 所示, 对结果进行极差分析, 可以看出 A 因素(提取温度)极差最大, C 因素(提取时间)极差最小, 也即影响紫蛇尾皂苷提取工艺的因素大小为: 提取温度 > 料液比 > 提取次数 > 提取时间。根据极差分析, 得到紫蛇尾皂苷提取的最佳工艺条件是 A3B3C2D3, 即 60 水浴, 料液比 1:40 (W/V), 提取 4 次, 每次 3 h。按照最佳工艺条件重复提取三组, 所得平均产率为 1.77%。

3.4 多元线性回归模型(MLR)的建立

对于正交实验确定的自变量(X_i)和相应的因变量(Y), 通过 SPSS 软件进行逐步回归, 建立紫蛇尾皂苷产率和相关影响因素之间的线性模型:

$$y = 1.279 + 0.007T + 0.053N + 0.005t - 4.943r$$

公式中: T 为提取温度, N 为提取次数, t 为提取时间, r 为料液比。该模型的 $R^2 = 0.914$, $F = 10.585$, 说明紫蛇尾皂苷的产率和提取工艺相关因素有显著的相关关系。

为了检验该回归模型的合理性, 用正交实验中的 2 号和 8 号进行预测, 并将预测值与实验值比较, 如表 3 所示, 该模型预测能力较好, 可以用于紫蛇尾皂苷产率的预判, 为蛇尾皂苷提取工艺的相关因素的选择提供依据。

4 结论

通过单因素实验和正交实验, 首次确定紫蛇尾皂苷的最佳提取工艺为 60 水浴, 料液比 1 : 40 (W/V), 每次 3 h, 提取 4 次, 并且建立了紫蛇尾皂苷

表 2 正交实验结果

Tab. 2 Results of the orthogonal experiments

试验号	因 素				皂苷产率(%)
	A(温度,)	B 次数	C(时间,h)	D(料液比, W/V)	
1	40	2	2	1 : 20	1.44
2	40	3	3	1 : 30	1.56
3	40	4	4	1 : 40	1.69
4	50	2	3	1 : 40	1.70
5	50	3	4	1 : 20	1.58
6	50	4	2	1 : 30	1.68
7	60	2	4	1 : 30	1.64
8	60	3	2	1 : 40	1.76
9	60	4	3	1 : 20	1.73
K1	4.69	4.78	4.88	4.75	
K2	4.96	4.90	4.99	4.88	
K3	5.13	5.10	4.91	5.15	
R	0.44	0.32	0.11	0.40	

表 3 MLR 模型预测结果

Tab. 3 The predicted results of the MLR model

试验号	实验值(%)	预测值(%)
2	1.56	1.57
8	1.76	1.74

产率和相关影响因素之间的多元线性回归模型。这为紫蛇尾皂苷后续的制备、纯化提供了基础，为海蛇尾资源的开发利用和研究提供科学依据。

参考文献:

[1] 廖玉麟. 中国动物志, 无脊椎动物, 第四十卷, 棘皮动物门, 蛇尾纲[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 240-242.
 [2] Casapullo A, Finamore E, Minale L, et al. Starfish

saponins, part 49 new cytotoxic steroidal glycosides from the starfish *Fromia Monilits*[J]. Journal of Natural Products, 1993, 56(1): 105-115.
 [3] 王兵, 郑意端. 海星总皂苷抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中草药, 2001, 32(3): 244-245.
 [4] 周鹏, 顾谦群, 王长云. 海星皂甙及其他活性成分研究概况[J]. 海洋科学, 2000, 24(2): 35-37.
 [5] 汤海峰, 易杨华, 张淑瑜, 等. 海星皂苷的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2004, 12(23): 48-57.
 [6] 孙鹏, 易杨华, 李玲, 等. 海参皂苷的生源分类和化学结构特征(枝手目)[J]. 中国天然药物, 2008, 6(4): 241-250.
 [7] 文镇, 朱志鑫, 申德妍, 等. 紫外分光光度法测定海星皂甙的含量[J]. 分析科学学报, 2004, 12, 20(6): 592-594.
 [8] 郭承华, 刘传琳, 张传钦, 等. 砂海星海星皂苷的制备[J]. 中国海洋药物, 1997, 1: 36-39.

Optimization of the extraction of ophiurasaponin from *Ophiopholis mirabilis* with the orthogonal design method

WANG Rong-zhen, DANG Yong-long, FENG Jian-rong, WANG Quan-hui, DAI Peng, GUO Cheng-hua

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Dec., 16, 2010

Key words: *Ophiopholis mirabilis*; Ophiurasaponin; Orthogonal experiment; Extraction process

Abstract: With the absorbance of ophiurasaponin solution from *Ophiopholis mirabilis* as index, the influence of important parameters on the extraction of ophiurasaponin were investigated by the single factor method, such as aqueous ethanol concentration, solid to liquid ratio, steeping duration, times of extraction, extraction temperature; the optimal parameters were determined by orthogonal experiment designing. The results showed that optimal process conditions were water bath temperature of 60 , solid to liquid ratio of 1:40 (W/V), four times extraction with the interval of 3 h. The corresponding average yield of ophiurasaponin is 1.77%, indicating that the optimal process fits for preparation of ophiurasaponin from *O. mirabilis*.

(本文编辑: 康亦兼)