

## 响应面优化超声波辅助 [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相提取黄秋葵多糖

何自强, 张惠玲, 杨正雄

(武汉生物工程学院 化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430415)

**摘要:** 【目的】探讨超声波辅助 [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 提取黄秋葵多糖的最佳工艺。【方法】采用浊点滴定法, 比较 [Bmim]Cl-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、[Bmim]Cl-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、[Bmim]Cl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 等 4 种双水相体系的分相能力与萃取能力, 确定 [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 为最佳双水相体系。以黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* 为原料, 采用超声波辅助 [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 提取黄秋葵多糖, 探讨 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 质量分数、提取时间、提取温度、液固比、[Bmim]Cl 质量分数等 5 个单因素对提取率的影响。在各单因素试验最佳条件的基础上, 进行响应面 Box-Behnken 设计, 优化黄秋葵多糖提取工艺。【结果】各因素对提取率影响大小依次为液固比、[Bmim]Cl 质量分数、提取温度、提取时间、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 质量分数; 最佳工艺条件为 5 mL 质量分数 71.94% 的离子液体 [Bmim]Cl, 5 mL 质量分数 22.31% 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系中, 提取时间 29.36 min, 提取温度 55.69 °C, 液固比 25.00 mL·g<sup>-1</sup>, 黄秋葵多糖提取率为 29.12%。验证平均值为 31.22%, 相对标准偏差为 3.70%。【结论】超声波辅助 [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 提取工艺具有提取率高、时间短、离子液体可回收等优点, 可用于工业化生产。图 8 表 3 参 24

**关键词:** 植物学; 黄秋葵多糖; 超声波辅助; [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相; 提取; 响应面 Box-Behnken 法; 优化

中图分类号: Q946.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2020)03-0547-09

## Extraction of polysaccharides of *Abelmoschus esculentus* using ultrasonic-assisted [Bmim] Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> aqueous two phases optimized by response surface method

HE Ziqiang, ZHANG Huiling, YANG Zhengxiong

(College of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan University of Bioengineering, Wuhan 430415, Hubei, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study attempts to explore the optimum technology of ultrasonic-assisted [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> extraction of okra polysaccharides. 【Method】 Cloud point titration was used to compare the phase separation ability and extraction ability of four aqueous two-phase systems, [Bmim]Cl-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, [Bmim]Cl-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, [Bmim]Cl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> was determined to be the best aqueous two-phase system. The polysaccharides were extracted from okra (*Abelmoschus esculentus*) by ultrasonic-assisted [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The effects of five single factors on the extraction rate were discussed: mass fraction of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, extraction time, extraction temperature, liquid-solid ratio and mass fraction of [Bmim]Cl. On the basis of the optimum conditions of each single factor experiment, the Box-Behnken design of response surface was applied to optimize the extraction process of okra polysaccharides. 【Result】 The results showed that the effects of various factors on the extraction rate ranging from large to small included liquid-solid ratio, mass fraction of [Bmim]Cl, extraction temperature, extraction time, and mass fraction of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The

收稿日期: 2019-05-29; 修回日期: 2019-10-17

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目 (B2016307)

作者简介: 何自强, 副教授, 从事天然产物研究与开发。E-mail: 1049461766@qq.com

optimum extraction conditions were aqueous two-phase system consisting of 5 mL ionic liquid [Bmim]Cl with mass fraction of 71.94%, and 5 mL  $K_2HPO_4$  with mass fraction of 22.31%, extraction time of 29.36 min, extraction temperature of 55.69 °C, and liquid-solid ratio of 25.00 mL·g<sup>-1</sup>. Under the above optimized extraction conditions, the predicted value of extraction rate was 29.12%. The validation average was 31.22%, and RSD was 3.70%. [Conclusion] Ultrasonic-assisted extraction of [Bmim] Cl- $K_2HPO_4$  has such advantages as high extraction rate, short time and recyclable ionic liquids, and can be used in industrial production. [Ch, 8 fig. 3 tab. 24 ref.]

**Key words:** botany; okra (*Abelmoschus esculentus*) polysaccharide; ultrasonic-assisted; [Bmim]Cl- $K_2HPO_4$  aqueous two-phase; extraction; response surface Box-Behnken method; optimization

黄秋葵 *Abelmoschus esculentus*, 别名咖啡黄葵、秋葵、羊角豆、补肾菜等, 为锦葵科 Malvaceae 秋葵属 *Abelmoschus* 1 年生药食两用草本植物。目前, 全世界均有黄秋葵种植<sup>[1-3]</sup>。作为一种新型的保健蔬菜, 黄秋葵中富含多糖、黄酮、蛋白质、维生素、矿物质以及脂肪等多种生物活性成分, 具有较高的食用及药用价值<sup>[4-5]</sup>。黄秋葵多糖具有抗疲劳<sup>[6]</sup>, 抗氧化<sup>[7]</sup>, 抗菌, 抗癌<sup>[8]</sup>, 降血糖血脂, 提高机体免疫力及具有体外结合胆酸的能力等药理作用<sup>[9]</sup>。同时, 由于具有良好的增稠、乳化等性能, 黄秋葵多糖已广泛用于面制品、肉制品、饮料、冰淇淋等食品的生产中<sup>[10-12]</sup>。王炜强等<sup>[13]</sup>研究表明: 黄秋葵多糖是一种天然高分子絮凝剂, 安全无毒, 生物降解性好, 在环保领域应用前景广阔。因此, 黄秋葵多糖的开发已成为研究的热点。超声辅助提取可加快可溶性黄秋葵多糖的溶出, 能避免高温高压破坏黄秋葵多糖的成分, 且条件温和、提取时间短、提取效率高<sup>[14]</sup>。离子液体通常由无机阴离子和有机阳离子组成, 室温时呈液态, 离子液体不易挥发、稳定温度范围宽、化学稳定性较高、物质溶解性良好、酸性可调<sup>[15-17]</sup>。离子液体-无机盐双水相萃取技术同时结合了离子液体和双水相的优点, 具有分相时间短、无乳化现象、能保持生物分子活性、回收率高等优点, 是一种绿色环保的分离方法, 已用于生物大分子和天然产物的萃取分离<sup>[18-20]</sup>。本研究首先采用浊点法分别绘制离子液体 [Bmim]Cl 与  $K_2HPO_4$ 、 $Na_2HPO_4$ 、 $Na_2CO_3$ 、 $(NH_4)_2SO_4$  等 4 种无机盐组成的双水相体系相图, 筛选出 [Bmim]Cl- $K_2HPO_4$  为最佳体系; 再利用 [Bmim]Cl- $K_2HPO_4$  双水相耦合超声波提取黄秋葵多糖, 通过五因素三水平响应面 Box-Behnken 设计优化单因素试验, 确定黄秋葵多糖的最佳提取工艺条件, 以期提高黄秋葵多糖的提取率, 为黄秋葵多糖的进一步开发提供试验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

黄秋葵果: 产自山东微山; 葡萄糖标准品: 质量分数 (HPLC)  $\geq 98\%$ , 上海金穗生物科技有限公司批号 20170829; 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐 ([Bmim]Cl): 林州市科能材料科技有限公司, 分析纯; 三水合磷酸氢二钾: 西陇科学股份有限公司, 分析纯; 十二水合磷酸氢二钠: 西陇科学股份有限公司, 分析纯; 无水碳酸钠: 天津博迪化工股份有限公司, 分析纯; 硫酸铵: 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 苯酚、浓硫酸均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

AUY120 型电子天平: 日本岛津公司; SK3310HP 超声波清洗器 (53 kHz, 180 W): 上海科导超声仪器有限公司; TU-1810 型紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司; SHZ-D III 循环水式真空泵: 巩义市英峪予华仪器厂; RE-52AAA 型旋转蒸发器: 上海嘉鹏科技有限公司; TG16-WS 型台式高速离心机: 长沙湘智离心机仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线的绘制 精确称取葡萄糖标准品 0.020 2 g, 蒸馏水溶解后于 50 mL 容量瓶定容、摇匀, 即得质量浓度为 0.404 g·L<sup>-1</sup> 的葡萄糖标准溶液。精确移取 0.0、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 葡萄糖标准溶液至 6 支 10 mL 容量瓶中, 依次加入蒸馏水 1.0 mL 和质量分数为 5% 苯酚 (蒸馏, 收集 182 °C 馏

分)1.0 mL, 振荡摇匀后加 5 mL 浓硫酸, 蒸馏水定容后, 于 92 °C 水浴中加热 30 min, 流水冷却, 于 487 nm 波长处测其吸光度。用最小二乘法进行回归分析, 得到一元线性回归方程:  $y=15.316x-0.0019$ ,  $R^2=0.9990$ 。其中:  $y$  为吸光度,  $x$  为黄秋葵多糖质量浓度。

1.3.2 黄秋葵多糖提取率的计算 采用苯酚-硫酸法测定黄秋葵多糖质量。该法是先以葡萄糖作标准品做出标准曲线, 再通过多糖的显色反应(浓硫酸可使多糖降解为葡萄糖, 苯酚再与葡萄糖作用而显色)测定吸光度, 然后根据一元线性回归方程和稀释倍数先计算出上相液黄秋葵多糖质量, 再计算黄秋葵多糖提取率。

精确移取适量黄秋葵提取上相液于 10 mL 容量瓶中, 其他同 1.3.1, 测其吸光度。黄秋葵多糖提取率=黄秋葵多糖质量/黄秋葵粉质量×100%

1.3.3 单因素试验 将黄秋葵果于 60 °C 下干燥 4 h 后, 粉碎机中粉碎, 过 80 目筛, 保存备用。准确称取 0.5 g 黄秋葵粉, 置于 50 mL 碘量瓶中, 加入 5 mL 不同质量分数的 [Bmim]Cl 溶液和 5 mL 不同质量分数的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液形成的双水相体系中, 将 5 个试验因素 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 质量分数、提取时间、提取温度、液固比、[Bmim]Cl 质量分数中的 4 个固定不变, 1 个作为变量, 超声提取后抽滤, 滤液以 7 500 r·min<sup>-1</sup> 转速离心 10 min, 于分液漏斗中分相, 上相液待用。

1.3.4 响应面试验 在 5 个单因素试验得出的最佳条件基础上, 以单因素为自变量, 黄秋葵多糖提取率为响应值, 设计五因素三水平响应面中心组合试验。结果见表 1。

1.3.5 数据处理及分析 单因素试验数据采用 2010 软件处理; 响应面试验数据采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件处理, 并对数据的显著性差异进行分析。

表 1 Box-Behnken 试验因素与水平

| 因素  | 水平   |      |      |
|---|------|------|------|
|   | -1   | 0    | 1    |
| A. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 质量分数/% | 20   | 23   | 26   |
| B. 提取时间/min                               | 25   | 30   | 35   |
| C. 提取温度/°C                                | 55   | 60   | 65   |
| D. 液固比/(mL·g <sup>-1</sup> )              | 15   | 20   | 25   |
| E. [Bmim]Cl质量分数/%                         | 70.0 | 72.5 | 75.0 |

## 2 结果与讨论

### 2.1 最大吸收波长的确定

分别精确移取葡萄糖标准溶液 0.4 mL、黄秋葵提取上相液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶, 其他操作同 1.3.1, 可见光区 400~800 nm 光谱扫描。图 1 表明: 葡萄糖标准溶液和黄秋葵提取上相液在 487 nm 处均有最大吸收, 故选择检测波长为 487 nm。

### 2.2 双水相体系的选取

2.2.1 双水相体系分相能力的考察 采用浊点滴定法绘制各双水相体系相图, 考察离子液体 [Bmim]Cl 与 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等 4 种无机盐形成双水相体系的分相能力<sup>[21-23]</sup>。室温 20 °C 下, 分别准确称取一定质量的无机盐于 4 支试管中, 加蒸馏水溶解, 再加入一定质量的 [Bmim]Cl, 直至溶液浑浊, 胶头滴管逐滴滴加蒸馏水至澄清, 称其质量, 反复以上操作。计算每次出现浑浊时, 无机盐和 [Bmim]Cl 的质量分数。分别以无机盐的质量分数为横坐标, [Bmim]Cl 的质量分数为纵坐标, 绘制相图。

图 2 的 4 条曲线均为双节线, 曲线上的点为临界点, 曲线下方为单相区, 不分层, 曲线上方为两相区。由图 2 可知, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的分相能力较差, 仅有 3 个浊点, 继续滴加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 不再出现浑浊, 不能与 [Bmim]Cl 形成稳定的双水相体系; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 与 [Bmim]Cl 能形成稳定的双水相体系, 但 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的溶解度受温度变化影响较大, 分相范围较窄, 持续时间较短, 而 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 分相范围广且持续时间较长。

2.2.2 双水相体系萃取能力的考察 通过相比、分配系数及提取率等物理量, 考察 [Bmim]Cl-无机盐双水相体系对黄秋葵提取液的萃取能力。准确称取一定质量的黄秋葵粉, 分别加入到 5 mL 一定质量分数的 4 种无机盐 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHPO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 溶液和 5 mL 一定质量分数的 [Bmim]Cl 形成的双水相体系中, 60 °C 水浴中超声提取(超声功率 180 W)30 min, 抽滤, 滤液离心后, 在分液漏斗中分

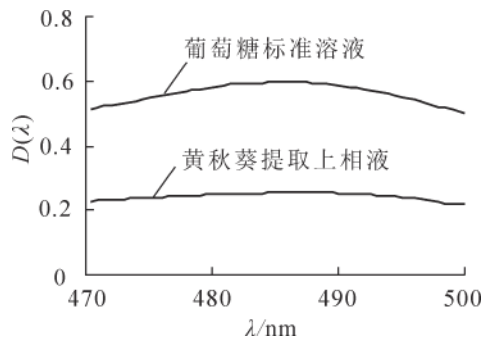


图1 最大波长的确定

Figure 1 Determination of maximum wavelength

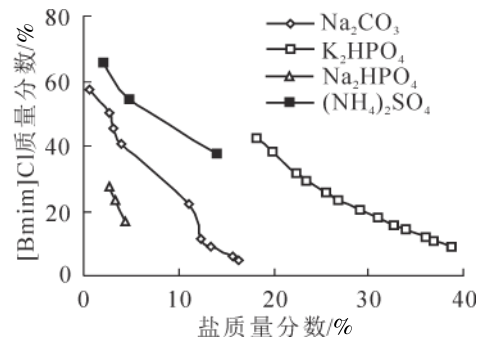


图2 双水相体系相图

Figure 2 Phase diagram of two-phase aqueous system

相。测定上相和下相中黄秋葵多糖的吸光度，计算4种双水相体系的相比( $R$ )、分配系数( $K$ )及提取率。

$$R = \frac{V_t}{V_b}; \quad (1)$$

$$K = \frac{C_t}{C_b}. \quad (2)$$

式(1)~(2)中： $V_t$ 、 $V_b$ 分别为上相、下相溶液体积(mL)； $C_t$ 、 $C_b$ 分别为上相、下相中黄秋葵多糖质量浓度( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

由表2可知：在[Bmim]Cl-( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和[Bmim]Cl- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 双水相中，提取液不分相；[Bmim]Cl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和[Bmim]Cl- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 中，提取液分相，但相较而言，[Bmim]Cl- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 双水相提取率较大，且黄秋葵多糖主要分布在上相。

综合以上分析，[Bmim]Cl- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 双水相有较强的分相能力与萃取能力，因此，选择[Bmim]Cl- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 为本试验的双水相体系。

### 2.3 单因素试验结果

**2.3.1  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数对黄秋葵多糖提取率的影响** 称取0.5 g黄秋葵粉于50 mL碘量瓶中，在5 mL质量分数为70%的[Bmim]Cl溶液、液固比 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、提取温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、提取时间30 min，5 mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数分别为20%、21%、23%、25%、27%的条件下进行超声提取(超声功率180 W)。由图3可知：随着 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数的增大，黄秋葵多糖提取率先增大后减小，质量分数23%时最大。随着盐量的增加，富集盐的下相结构性逐渐增强，容纳黄秋葵多糖的空腔形成越困难，而富集离子液体的上相结构性逐渐减弱，容纳黄秋葵多糖的空腔越易形成，黄秋葵多糖提取率不断增大；但质量分数超过23%时，产生盐效应，黄秋葵多糖提取率逐渐降低。因此，选取23%为 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 适宜的质量分数。

#### 2.3.2 提取时间对黄秋葵多糖提取率的影响

称取0.5 g黄秋葵粉于50 mL碘量瓶中，在5 mL质量分数为70%的[Bmim]Cl溶液，5 mL质量分数为23%的 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 溶液，液固比 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ，提取温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ，分别在20、30、40、50、60 min的条件下进行超声提取(超声功率180 W)。由图4可知：随提取时间增长，黄秋葵多糖提取率增大，30 min时达到最大，但30 min后提取率下降，并趋于平缓。提取时间增长，

表2 不同[Bmim]Cl-无机盐双水相体系萃取能力的比较

Table 2 Comparison of extraction ability of different [Bmim]-Cl-inorganic salts in aqueous two-phase system

| 双水相体系   | [Bmim]Cl质量分数(%) / 盐质量分数(%) | $R$  | $K$  | 上相提取率/% |
|---|----------------------------|------|------|---------|
| [Bmim]Cl-( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 55/40                      | -    | -    | -       |
| [Bmim]Cl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$                      | 70/20                      | 0.21 | 1.72 | 4.80    |
| [Bmim]Cl- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                     | 60/7                       | -    | -    | -       |
| [Bmim]Cl- $\text{K}_2\text{HPO}_4$                      | 50/75                      | 0.45 | 1.54 | 19.40   |

说明：“-”表示不分相

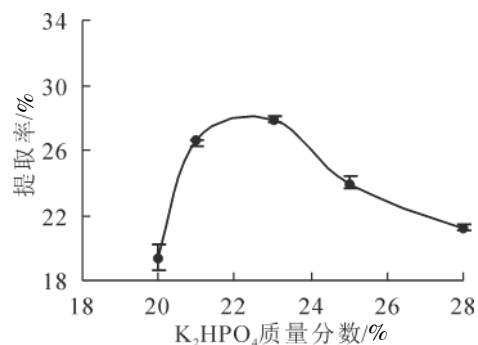
图3  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数对黄秋葵多糖提取率的影响

Figure 3 Effect of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  mass fraction on the extraction rate of okra polysaccharide



上相液黏度增大, 导致黄秋葵多糖的提取越困难。因此, 选取 30 min 为适宜的提取时间。

2.3.3 提取温度对黄秋葵多糖提取率的影响 称取 0.5 g 黄秋葵粉于 50 mL 碘量瓶中, 在 5 mL 质量分数为 70% 的 [Bmim]Cl 溶液, 5 mL 质量分数为 23% 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液, 液固比 20 mL·g<sup>-1</sup>, 提取时间 30 min, 提取温度分别为 30、40、50、60、70 °C 的条件下进行超声提取 (超声功率 180 W)。由图 5 可知: 温度升高, 促进了黄秋葵多糖的溶出, 提取率增大; 但温度过高, 杂质溶出相应增多, 提取率反而下降。因此, 选取 60 °C 为适宜的提取温度。

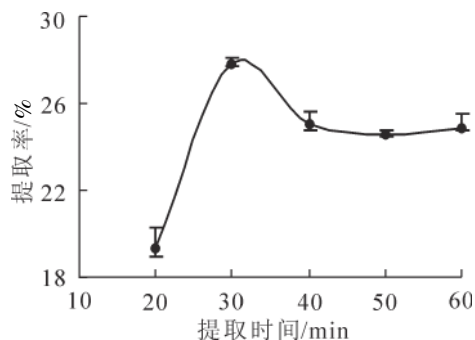


图 4 提取时间对黄秋葵多糖提取率的影响

Figure 4 Effect of extraction time on the extraction rate of okra polysaccharide

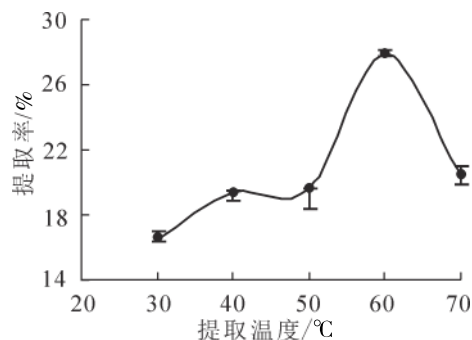


图 5 提取温度对黄秋葵多糖提取率的影响

Figure 5 Effect of extraction temperature on the extraction rate of okra polysaccharide

2.3.4 液固比对黄秋葵多糖提取率的影响 称取 0.5 g 黄秋葵粉于 50 mL 碘量瓶中, 在 5 mL 质量分数为 70% 的 [Bmim]Cl 溶液, 5 mL 质量分数为 23% 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液, 提取时间 30 min, 提取温度 60 °C, 液固比分别为 17、20、25、30、34、50 mL·g<sup>-1</sup> 的条件下进行超声提取 (超声功率 180 W)。由图 6 可知: 随着液固比的增大, 黄秋葵粉与 [Bmim]Cl-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相接触面积增加, 黄秋葵多糖不断溶出。液固比超过 20 mL·g<sup>-1</sup>, 黄秋葵多糖提取率下降, 可能液固比过大, 浓缩等操作时间延长, 导致黄秋葵多糖损失较多, 提取率下降<sup>[24]</sup>。因此, 选取 20 mL·g<sup>-1</sup> 为适宜的液固比。

2.3.5 [Bmim]Cl 质量分数对黄秋葵多糖提取率的影响 称取 0.5 g 黄秋葵粉于 50 mL 碘量瓶中, 在 5 mL 质量分数为 23% 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液, 提取时间 30 min, 提取温度 60 °C, 液固比 20 mL·g<sup>-1</sup>, [Bmim]Cl 质量分数分别为 65.0%、67.5%、70.0%、72.5%、75.0% 的条件下进行超声提取 (超声功率 180 W)。由图 7 可知: 随着 [Bmim]Cl 量的增大, 黄秋葵多糖在上相的富集增多, [Bmim]Cl 质量分数 72.5% 时最大, 之后提取率下降, 黄秋葵多糖在上相的富集达到饱和。因此, 选取 72.5% 为 [Bmim]Cl 适宜的质量分数。

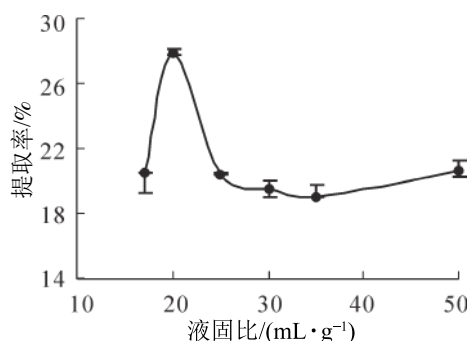


图 6 液固比对黄秋葵多糖提取率的影响

Figure 6 Effect of liquid-solid ratio on the extraction rate of okra polysaccharide

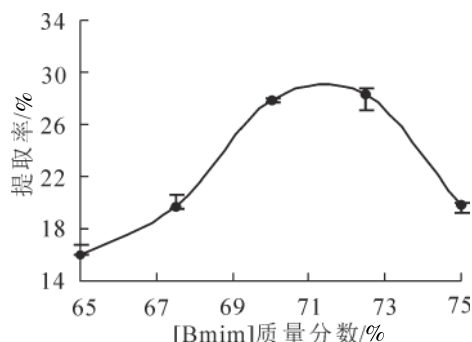


图 7 [Bmim]Cl 质量分数对黄秋葵多糖提取率的影响

Figure 7 Effect of [Bmim]Cl mass fraction on the extraction rate of okra polysaccharide

## 2.4 响应面优化试验结果

五因素三水平响应面试验共 46 组, 包括析因试验 (40 组) 和中心试验 (6 组)。析因试验各不相同, 6 组因素水平均相同的中心试验, 是重复 6 次以估算试验误差。

对试验数据进行回归拟合,得到各单因素与黄秋葵多糖间的二次多元方程:  $y=27.27-0.13A+0.17B-0.35C+2.99D-1.26E+2.62AB-0.063AC-1.14AD+0.64AE+3.29BC+2.06BD+0.95BE-3.77CD+0.98CE+0.21DE-3.68A^2-5.53B^2-2.75C^2-3.04D^2-4.85E^2$ 。

分析表3数据可知:模型  $P<0.0001$ (差异极显著),模型对黄秋葵多糖的提取有显著影响,失拟项  $P=0.9097>0.0500$ (差异不显著),说明模型拟合程度较好;各单因素与黄秋葵多糖提取率之间呈良好线性关系( $R^2=0.9742$ ),模型能解释95.35%的黄秋葵多糖提取率的变化( $R^2_{Adj}=0.9535$ );变异系数为4.31%,数据分散程度较小,试验结果可信,因此该模型可分析和预测黄秋葵多糖的提取结果。由  $F$  值大小可推断5个单因素对黄秋葵多糖提取率显著性影响的顺序: $D(\text{液固比})>E([\text{Bmim}]\text{Cl} \text{质量分数})>C(\text{提取温度})>B(\text{提取时间})>A(\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{质量分数})$ ;由  $P$  值大小可推断:一次项中, $D$ 、 $E$ 对提取率影响极显著;二次项中, $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$ 、 $E$ 对提取率影响均极显著;交互项中, $AB$ 、 $BC$ 、 $BD$ 、 $CD$ 之间作用对提取率的影响极显著, $AD$ 、 $BE$ 、 $CE$ 之间作用对提取率的影响显著。图8为各因素交互作用对黄秋葵多糖提取率显著影响的响应面图。

通过回归模型可预测黄秋葵多糖提取的最佳工艺条件为: $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数22.31%,提取时间29.36 min,提取温度55.69  $^{\circ}\text{C}$ ,液固比25.00  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ,离子液体 $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ 质量分数71.94%。在此条件下,黄秋葵多糖提取率可达29.12%。

### 2.5 验证试验

为实际操作方便,在 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数22%,提取时间29 min,提取温度56  $^{\circ}\text{C}$ ,液固比25.00  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ,离子液体 $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ 质量分数72%的条件下进行验证试验。5次平行试验的黄秋葵多糖提取率为:30.28%、32.48%、30.24%、32.47%、30.64%,平均值为31.22%,相对标准偏差为3.70%。

## 3 结论

室温下分别绘制离子液体 $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ 与4种无机盐 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ]形成的双水相体系相图,通过比较提取后黄秋葵多糖在各体系中的相比、分配系数和提取率,确定 $[\text{Bmim}]\text{Cl}-\text{K}_2\text{HPO}_4$ 为本实验的双水相体系。离子液体-无机盐双水相体系对环境无污染,是一种新型绿色的分析方法。

选取5个因素: $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数、提取时间、提取温度、液固比和离子液体 $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ 质量分数进行单因素试验,以单因素最佳提取条件为基础进行响应面试验,超声波辅助 $[\text{Bmim}]\text{Cl}-\text{K}_2\text{HPO}_4$ 双水相提取黄秋葵多糖的最佳工艺可由回归模型预测。在5 mL离子液体 $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ 质量分数为71.94%,5 mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量分数为22.31%的双水相体系中,提取时间为29.36 min,提取温度为55.69  $^{\circ}\text{C}$ ,液固比为25.00  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 的最佳提取条件下,黄秋葵多糖的提取率为29.12%。在该预测最佳工艺基础上进行5次验证试验,黄秋葵多糖提取率平均值为31.22%,相对标准偏差为3.70%。

表3 方差分析表

| Table 3 Variance analysis table |        |     |        |        |         |     |
|---------------------------------|--------|-----|--------|--------|---------|-----|
| 方差来源                            | 平方和    | 自由度 | 均方     | $F$    | $P$     | 显著性 |
| 模型                              | 726.72 | 20  | 36.34  | 47.14  | <0.0001 | **  |
| $A$                             | 0.26   | 1   | 0.26   | 0.33   | 0.5684  |     |
| $B$                             | 0.46   | 1   | 0.46   | 0.59   | 0.4492  |     |
| $C$                             | 1.93   | 1   | 1.93   | 2.50   | 0.1266  |     |
| $D$                             | 143.28 | 1   | 143.28 | 185.88 | <0.0001 | **  |
| $E$                             | 25.40  | 1   | 25.40  | 32.95  | <0.0001 | **  |
| $AB$                            | 27.46  | 1   | 27.46  | 35.52  | <0.0001 | **  |
| $AC$                            | 0.016  | 1   | 0.016  | 0.020  | 0.8879  |     |
| $AD$                            | 5.20   | 1   | 5.20   | 6.74   | 0.0155  | *   |
| $AE$                            | 1.64   | 1   | 1.64   | 2.13   | 0.1573  |     |
| $BC$                            | 43.30  | 1   | 43.30  | 56.17  | <0.0001 | **  |
| $BD$                            | 17.06  | 1   | 17.06  | 22.13  | <0.0001 | **  |
| $BE$                            | 3.65   | 1   | 3.65   | 4.73   | 0.0393  | *   |
| $CD$                            | 56.70  | 1   | 56.70  | 73.56  | <0.0001 | **  |
| $CE$                            | 3.88   | 1   | 3.88   | 5.03   | 0.0339  | *   |
| $DE$                            | 0.17   | 1   | 0.17   | 0.22   | 0.6446  |     |
| $A^2$                           | 118.50 | 1   | 118.50 | 153.73 | <0.0001 | **  |
| $B^2$                           | 266.53 | 1   | 266.53 | 345.90 | <0.0001 | **  |
| $C^2$                           | 65.99  | 1   | 65.99  | 85.61  | <0.0001 | **  |
| $D^2$                           | 80.51  | 1   | 80.51  | 104.45 | <0.0001 | **  |
| $E^2$                           | 204.92 | 1   | 204.92 | 265.84 | <0.0001 | **  |
| 残差                              | 19.27  | 25  | 0.77   |        |         |     |
| 失拟项                             | 12.36  | 20  | 0.62   | 0.45   | 0.9097  |     |
| 误差项                             | 6.91   | 5   | 1.38   |        |         |     |
| 总和                              | 745.99 | 45  |        |        |         |     |

$R^2=0.9742$ ,  $R^2_{Adj}=0.9535$

说明:\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ );\*表示差异显著( $P<0.05$ )

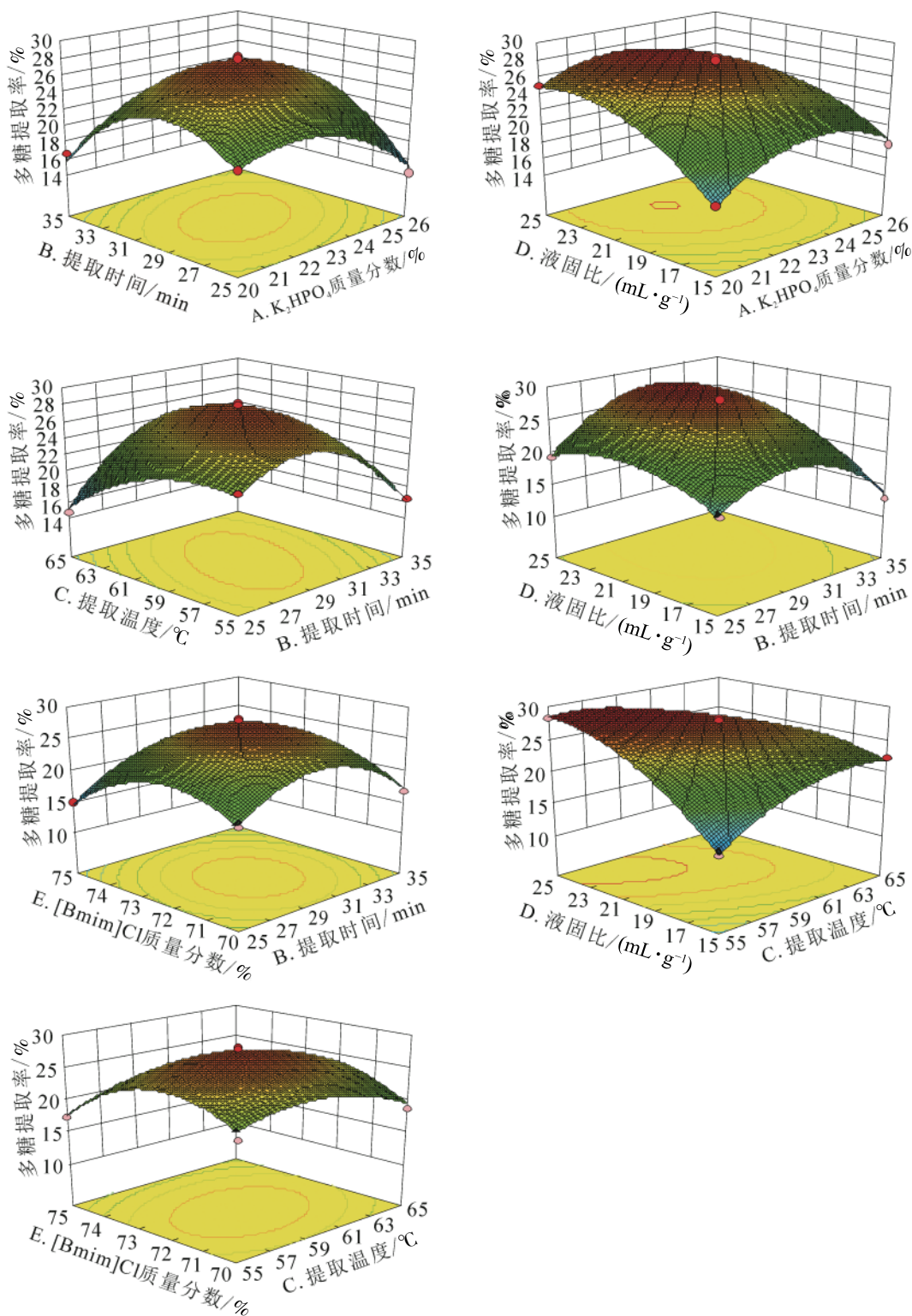


图 8 各因素交互作用对黄秋葵多糖提取率交互影响的响应面图

Figure 8 Response surface of the interaction of various factors on the extraction rate of polysaccharides from okra

#### 4 参考文献

[1] 刘怡彤, 段振华, 马华林, 等. 超声波辅助提取黄秋葵多酚和多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 247-249.  
 LIU Yitong, DUAN Zhenhua, MA Hualin, *et al.* Research of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and polysaccharides from okra [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(21): 247-249.

- [2] ALBA K, RITZOULIS C, GEORGIADIS N, *et al.* Okra extracts as emulsifiers for acidic emulsions [J]. *Food Res Int*, 2013, **54**(2): 1730 – 1737.
- [3] 程旺开, 许月明, 张冬冬. 响应面优化黄秋葵叶多糖的提取工艺及其抗氧化活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, **23**(4): 38 – 42.  
CHENG Wangkai, XU Yueming, ZHANG Dongdong. Response surface methodology for optimization of extraction and antioxidant activities of polysaccharides from *Abelmoschus esculentus* leaves [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formula*, 2017, **23**(4): 38 – 42.
- [4] 郑云云, 郑黄楠, 周红玲, 等. 黄秋葵果荚中多糖的提取及其累积规律[J]. 福建农业学报, 2016, **31**(1): 27 – 30.  
ZHENG Yunyun, ZHENG Huangnan, ZHOU Hongling, *et al.* Polysaccharide accumulation in and extraction from okra pods [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2016, **31**(1): 27 – 30.
- [5] 王冰嵩, 张文成, 吴泽宇, 等. 响应面法优化黄秋葵多糖提取工艺研究[J]. 包装与食品机械, 2017, **35**(2): 1 – 5.  
WANG Bingsong, ZHANG Wencheng, WU Zeyu, *et al.* Optimized extraction of polysaccharides from okra by response surface methodology [J]. *Packag Food Mach*, 2017, **35**(2): 1 – 5.
- [6] TONGJAROENBUANGAM W, RUKSEE N, CHANTIRATIKUL P, *et al.* Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra(*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice [J]. *Neurochem Int*, 2011, **59**(5): 677 – 685.
- [7] SHEU S C, LAI M H. Composition analysis and immuno-modulatory effect of okra(*Abelmoschus esculentus* L.) extract [J]. *Food Chem*, 2012, **134**(4): 1906 – 1911.
- [8] ADELAKUN O E, OYELADE O J, ADE-OMOWAYE B I O, *et al.* Influence of pre-treatment on yield and antioxidant properties of a Nigerian okra seed(*Abelmoschus esculentus* Moench) flour [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, **47**(3): 657 – 661.
- [9] ZHENG Wei, ZHAO Ting, FENG Weiwei, *et al.* Purification, characterization and immunomodulating activity of a polysaccharide from flowers of *Abelmoschus esculentus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **106**: 335 – 342.
- [10] 宋思圆, 苏平, 王丽娟, 等. 响应面法优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, **38**(2): 283 – 289.  
SONG Siyuan, SU Ping, WANG Lijuan, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology and antioxidant activities of pectic polysaccharide from okra flowers [J]. *Food Sci*, 2017, **38**(2): 283 – 289.
- [11] 曾剑华, 李加兴, 李响, 等. 黄秋葵多糖超声波辅助提取工艺优化及其对·OH 体外抗氧化活性研究[J]. 农产品加工, 2017(3): 44 – 47.  
ZENG Jianhua, LI Jiaying, LI Yun, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions and study on ·OH antioxidant activity of polysaccharides from okra [J]. *Farm Prod Process*, 2017(3): 44 – 47.
- [12] 颜玉华, 严庭莉, 王蒙蒙, 等. 黄秋葵多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 金陵科技学院学报, 2016, **32**(3): 88 – 92.  
YAN Yuhua, YAN Tingli, WANG Mengmeng, *et al.* The effect of okra polysaccharide on immune function in mice [J]. *J Jinling Inst Technol*, 2016, **32**(3): 88 – 92.
- [13] 王炜强, 李本刚, 罗振扬, 等. 黄秋葵多糖提取及其絮凝性能[J]. 食品工业科技, 2017, **38**(21): 76 – 79.  
WANG Weiqiang, LI Bengang, LUO Zhenyang, *et al.* Extraction and flocculation properties of okra polysaccharide [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, **38**(21): 76 – 79.
- [14] 李炳奇, 廉宜君. 天然产物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012.
- [15] 丁明玉. 现代分离方法与技术[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2016.
- [16] DYSON P J, GELDBACH T J. *Metal Catalysed Reactions in Ionic Liquids*[M]. Berlin: Springer, 2005.
- [17] 蒋伟燕, 余文轴. 离子液体的分类、合成及应用[J]. 金属材料与冶金工程, 2008, **36**(4): 51 – 54.  
JIANG Weiyan, YU Wenzhou. Classification, synthesis and application of ionic liquid [J]. *Met Mater Metall Eng*, 2008, **36**(4): 51 – 54.
- [18] 沙永春. 离子液体双水相技术的应用进展[J]. 化学世界, 2013(11): 698 – 701.  
SHA Yongchun. The application progress of ionic liquid aqueous two-phase technology [J]. *Chem World*, 2013(11): 698 – 701.
- [19] 张锁江, 刘晓敏, 姚晓倩, 等. 离子液体的前沿、进展及应用[J]. 中国科学 B 辑: 化学, 2009, **39**(10): 1134 – 1144.  
ZHANG Suojiang, LIU Xiaomin, YAO Xiaoqian, *et al.* Frontiers, progresses and applications of ionic liquids [J]. *Sci China Ser B Chem*, 2009, **39**(10): 1134 – 1144.



- [20] 刘培元, 王国平. 离子液体/盐双水相萃取技术的研究进展[J]. 化学工程与装备, 2008(3): 113 – 118.  
LIU Peiyuan, WANG Guoping. The research development of ionic liquids/salt aqueous two-phase extraction technique [J]. *Chem Eng Equip*, 2008(3): 113 – 118.
- [21] 陈梅梅, 袁磊, 高梅, 等. 离子液体双水相提取菜籽粕蛋白及其相行为的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(6): 56 – 61.  
CHEN Meimei, YUAN Lei, GAO Mei, *et al.* Extraction of rapeseed meal protein in ionic liquid aqueous two-phase system and its application in phase behavior [J]. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2013, 28(6): 56 – 61.
- [22] 钟玲, 张越非, 李小菊, 等. 乙醇/无机盐双水相体系分离纯化黄芪总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3395 – 3399.  
ZHONG Ling, ZHANG Yuefei, LI Xiaoju, *et al.* Separation and purification of total flavonoids of *Astragalus membranaceus* with ethanol/phosphate aqueous two-phase system [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2012, 37(22): 3395 – 3399.
- [23] 池汝安, 詹斯维, 张越非, 等. 葛根总黄酮在乙醇-无机盐双水相体系中的萃取[J]. 武汉工程大学学报, 2014, 36(3): 1 – 6.  
CHI Ru'an, ZHAN Siwei, ZHANG Yuefei, *et al.* Extraction of total flavonoids from *pueraria lobata* in ethanol-inorganic salt aqueous two-phase system [J]. *J Wuhan Inst Tech*, 2014, 36(3): 1 – 6.
- [24] 徐运飞, 刘琴, 宋琮, 等. 响应面法优化黄参多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(12): 2116 – 2123.  
XU Yunfei, LIU Qin, SONG Shen, *et al.* Optimization of extraction of polysaccharide from *Sphallerocarpus gracilis* using response surface methodology and study on its antioxidant activity [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2015, 27(12): 2116 – 2123.