

响应面法优化天山岩黄芪多糖提取工艺

乔丽洁¹, 王安平², 依夏古丽·巴斯卡¹, 海力茜·陶尔大洪^{1*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第二附属医院, 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 优化天山岩黄芪中多糖的提取工艺。**方法** 以多糖含量作为评价指标, 以提取时间、提取温度、液料比为考察因素, 采用单因素试验与响应面分析相结合的方法, 探讨适宜的提取工艺。**结果** 天山岩黄芪多糖的最佳提取工艺条件为: 提取料液比 1:32(*m*:*V*)、提取时间 3 h、提取温度 92 °C。在此条件下, 多糖含量的实际验证含量为 6.33%, 与预测值 6.39%接近。**结论** 所选工艺合理、可行, 可用于天山岩黄芪中多糖的提取。

关键词: 多糖; 提取工艺; 响应面分析法

Optimization of extraction technology of polysaccharides from *Hedysarum semenovii* Regelet Herd by response surface methodology

QIAO Li-Jie¹, WANG An-Ping², AYIXIAGULI Ba-Si-Ka¹, HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;
2. The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction technology of polysaccharides from *Hedysarum semenovii* Regelet Herd. **Methods** Taking the content of polysaccharide as the evaluation index, the extraction time, extraction temperature and the ratio of liquid and material as the investigation factors, the method of combining single factor test and response surface analysis was adopted and then the suitable extraction technology was discussed. **Results** The optimum extraction conditions of polysaccharides from *Hedysarum semenovii* Regelet Herd were as follows: 1:32 (*m*:*V*), 3 hours and 92 °C. Under these conditions, the actual verified content of polysaccharide was 6.33%, which was close to the predicted value of 6.39%. **Conclusions** The selected process is reasonable and feasible, and can be used for the extraction of polysaccharides from *Hedysarum semenovii* Regelet Herd.

KEY WORDS: polysaccharides; extraction process; response surface analysis

1 引言

天山岩黄芪(*Hedysarum semenovii* Regelet Herd)为豆科(Leguminosae)岩黄芪属(*Hedysarum* Linn.)植物, 分布于新疆乌鲁木齐、伊犁、阿勒泰、塔城等地区^[1]。与 2015 版

《中国药典》记载的红芪原植物多序岩黄芪为同科同属, 可作为后者代用品, 并且可药食两用^[2]。天山岩黄芪中含有多种生物活性成分, 其中皂苷、多糖、黄酮是主要的药理有效成分群而被广泛研究。多糖具有免疫调节、提高巨噬细胞活性、抗肿瘤等作用^[3,4]。经过调研和文献查阅得知,

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目(CX2018009)、自治区“十三五”重点学科建设经费支持(1007)

Fund: Supported by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (CX2018009), and the Construction of Key Disciplines in the 13th Five-Year Plan of Autonomous Region (1007)

*通讯作者: 海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: hailiqian2471@sina.com

*Corresponding author: HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong, Professor, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China. E-mail: hailiqian2471@sina.com

对天山岩黄芪中多糖的提取及含量测定鲜有报道。多糖的传统提取工艺,如水提醇沉法、薄膜浓缩法、酸碱法、酶法^[5]等,都存在工艺复杂,生产周期长,提取率低,多糖活性易破坏等缺陷^[6]。响应面分析法(response surface metllodolog, RSM),是指通过一系列确定性实验,用多项式函数来近似极限状态函数,也就是将数学与统计学相结合,采用多元二次回归方法作为函数估计的工具来拟合因素与响应值之间的函数关系,依此可对函数的响应面和等高线进行分析来寻求最佳工艺参数^[7-9]。因此,本研究拟采用单因素试验和响应面法^[10,11]结合,对天山岩黄芪中多糖的提取工艺进行优化,探索出一条简单易行、经济可靠的多糖提取技术路线,使这一资源得到充分利用,为后续研究提供基础。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

天山岩黄芪:采自乌鲁木齐南山,经过北京大学生药教研室的杨英涛教授鉴定为哈药天山岩黄芪的根茎。

三氯甲烷(分析纯,河南省新乡中原有机化工有限公司);丙酮(分析纯,中国石化有限公司);正丁醇、苯酚、浓硫酸、95%乙醇(分析纯、国药集团化学试剂有限公司);5%葡萄糖(四川科伦药业股份有限公司)。

2.2 仪器与设备

AK-100A 型植物样品粉碎机(温岭奥力中药器材有限公司);TU-18 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);HWS-28 型水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司)、SHB-III 型抽滤泵(上海旌派仪器有限公司)、TDL-4 型离心机(上海安亭科学仪器有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

将天山岩黄芪根切成均匀薄片,60℃干燥,再粉碎至粉末状,过40目筛,粉末备用。

2.3.2 天山岩黄芪中多糖的提取

精密称取天山岩黄芪粉末5g,放置在250mL圆底烧瓶中,以1:30(m:V)的料液比加入蒸馏水,70℃水浴2h后过滤,滤液浓缩至原来的1/3,除蛋白(具体操作为氯仿:戊醇或丁醇4:1(V:V)与多糖溶液的量为5:1(V:V),振摇,离心15min将两界面白色浑浊除去,直到两界面无白色浑浊,除蛋白结束,考虑到多篇文献报道除蛋白对多糖的损失,结合文献确定本次试验除蛋白次数为3次),用以浓缩液3倍体积的95%乙醇进行醇沉,加入乙醇,放置4℃冰箱中过夜,过滤得沉淀,沉淀用95%乙醇、丙酮洗涤,自然干燥,得粗多糖称重,待用。将所得粗多糖再次加入适量蒸馏水水浴70℃加热使完全溶解,过滤,得滤液定容进行多糖含量测定^[12-15]。

2.3.3 苯酚-浓硫酸法测定天山岩黄芪中多糖含量

(1) 标准曲线的绘制

精密吸取5%葡萄糖0.2mL置于100mL容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,精密移取葡萄糖溶液0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mL分别置于带刻度具塞试管中,加水至2mL,每瓶依次加入5%苯酚1.0mL,浓硫酸5mL,煮沸15min,室温放置30min,以2mL蒸馏水、1.0mL苯酚、5.0mL浓硫酸定容至刻度的溶液做空白,在490nm测吸光度,以吸收度A为纵坐标,葡萄糖浓度C为横坐标进行回归分析,绘制标准曲线。

(2) 测定多糖含量

将提取处理好的天山岩黄芪粗多糖溶液精密移取2.0mL,置于带刻度具塞试管中,加入苯酚1.0mL,浓硫酸5.0mL,煮沸15min,室温放置30min,在490nm处测吸光度,所得A值带入标准曲线中,得出多糖含量。

2.3.4 提取条件的优化

依据2.3.2的提取过程,先后对提取温度、提取时间、料液比进行单因素试验,选择最佳水平进行下一步试验,提取温度设4个水平:70、80、90、100℃;提取时间设4个水平:1、2、3、4h;料液比设4个水平:1:10、1:20、1:30、1:40。以上3个单因素的每个水平做3组平行,测定提取所得天山岩黄芪中多糖的含量。

2.3.5 响应面法

根据Box-Behnken中心组合实验的设计原理,在单因素实验基础上,利用Design-Exper8.05软件设计以影响最大的3个因子为自变量,多糖含量为响应值,以单因素实验结果为参考进行筛选确定因素范围,作三因素三水平的响应面分析实验^[7-10]。

3 结果与分析

3.1 5%葡萄糖的标准曲线

按照2.3.3项下进行操作,以吸收度A为纵坐标,葡萄糖浓度C为横坐标进行回归分析,绘制标准曲线,如图1所示。

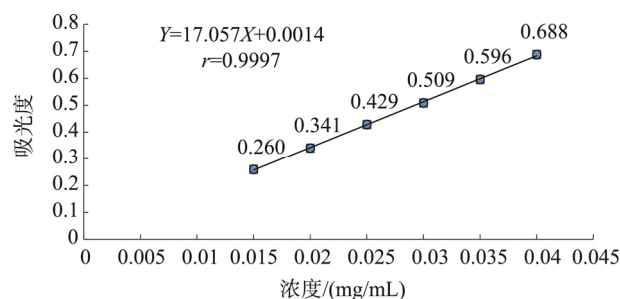


图 1 5%葡萄糖的标准曲线

Fig.1 The standard curve for 5% glucose

线性关系与标准曲线结果相同, 所得曲线方程 $Y=17.057X+0.0014$, $r=0.9997$, 线性范围在 0.015~0.04 mg/mL, 表明 5%葡萄糖溶液在线性范围内与吸光度呈良好的线性关系。

3.2 方法学考察

(1) 精密性实验

精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.6 mL, 6 份, 置带刻度试管中, 按标准曲线制备项下操作, 重复测定吸光度 6 次, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.8%, 说明仪器精密性良好。

(2) 重复性实验

精密称取 3 份 5 g 天山岩黄芪粉末, 制备供试品溶液。精密移取各供试品液 2.0 mL, 测其吸光度并计算 RSD 为 0.4%, 说明方法的重复性良好。

(3) 稳定性实验

取完全反应后的供试品, 每隔 30 min 测 1 次吸光度值, 计算吸光度的 RSD。可直接用重复性实验的供试液进行稳定性实验, 样品稳定性考察中 RSD 值为 0.8%, 说明在 3 h 内样品稳定性良好。

(4) 加样回收率实验

取已知多糖含量的供试液 9 份各 2 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 按低、中、高浓度分别加葡萄糖对照品 0.8、1.0、1.2 mL 定容至刻度, 用苯酚显色处理, 用蒸馏水定容至刻度, 在 490 nm 测吸光度并计算 RSD, 样品回收率在 95%~105%之间, RSD 为 1.1%, 小于 2%, 说明实验准确度在要求范围内。

3.3 单因素试验

3.3.1 提取温度对天山岩黄芪多糖含量的影响

图 2 为提取温度对多糖含量的影响, 从图 2 中可以看出 90 °C 时天山岩黄芪提取的多糖含量最高, 含量最高为 6.97%, 100 °C 时提取出来的多糖粘性大, 可能由于温度过高导致糖烧糊或者糖的结构被破坏, 所以天山岩黄芪多糖最佳提取温度为 90 °C。

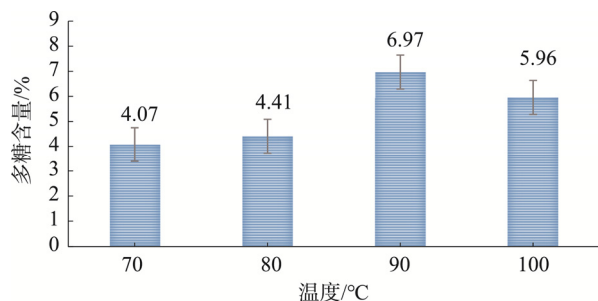


图 2 温度对多糖含量提取的影响($n=3$)

Fig.2 Effect of temperature on extraction of polysaccharides ($n=3$)

3.3.2 提取时间对天山岩黄芪多糖含量的影响

图 3 为提取时间对多糖含量的影响, 由图 3 可以看出提取时间为 3 h 提取的多糖含量最高, 最高含量为 4.95%, 提取到 4 h 的时候, 提取的多糖中杂质的含量过多而影响多糖的含量, 所以天山岩黄芪多糖最佳提取时间为 3 h。

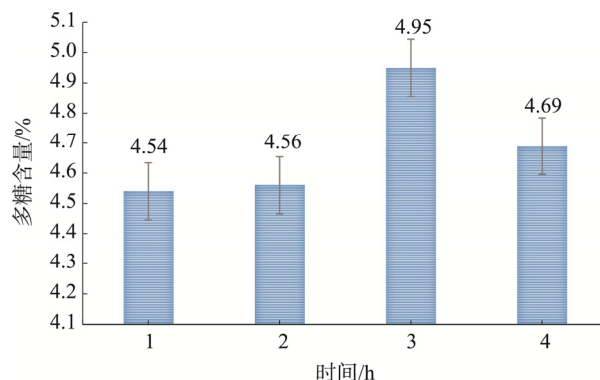


图 3 提取时间对多糖含量提取的影响($n=3$)

Fig.3 Effect of extraction time on extraction of polysaccharide content ($n=3$)

3.3.3 料液比对天山岩黄芪多糖含量的影响

图 4 为料液比对多糖含量的影响, 由图可以看出料液比为 1:30 时提取的多糖含量最高, 含量最高为 5.24%, 料液比为 1:40 时, 多糖含量变化不大甚至有小幅度下降, 可能体积偏大影响醇沉效果, 所以天山岩黄芪多糖最佳提取料液比为 1:30。

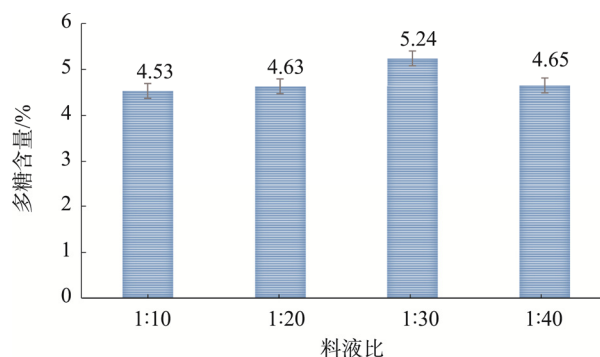


图 4 料液比对多糖含量提取的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of solid-liquid ratio on extraction of polysaccharide content ($n=3$)

3.4 响应面分析法优化天山岩黄芪多糖提取工艺条件

3.4.1 影响因素与方案设计

根据 Box-Behnken 中心组合实验的设计原理, 以提取温度、提取时间、料液比为响应面设计因素, 多糖含量为响应值, 应用三因素三水平的响应面优化实验, 去除多糖含量值最低的条件, 具体设定见表 1。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

水平编码	实验因素		
	A 料液比/(g/mL)	B 时间/min	C 温度/°C
-1	1:20	2	80
0	1:30	3	90
1	1:40	4	100

利用 Design-Exper8.05 软件 Box-Benhknen 实验数据进行方差分析, 得到模型的二次多项方程:

$$R_1=+6.32+0.13A+0.056B+0.43C+0.022AB+0.065AC+0.045BC-0.42A^2-0.54B^2-0.92C^2$$

R_1 代表多糖的含量, A 代表料液比、 B 代表提取时间、 C 代表提取温度。

对所用模型进行显著性检验结果及回归模型系数显著性检验结果见表 2。从表 2 中可以得出, 模型 $F=96.65$, $P<0.0001$, 可以表明回归模型极显著, 相关系数群=0.9920, 结果接近 1, 由此说明此回归方程与实际情况吻合的比较好, 实验误差小, 可以使用该回归方程来代替实验真实点从而对实验结果进行数据分析。

表 2 Box-Benhknke 试验设计方案与结果
Table 2 Box-Benhknke test design scheme and results

运行次数	A	B	C	R_1
1	1	0	-1	4.65
2	0	-1	-1	4.39
3	-1	-1	0	5.13
4	0	-1	1	5.30
5	0	0	0	6.27
6	0	0	0	6.29
7	0	0	0	6.35
8	1	-1	0	5.41
9	1	1	0	5.64
10	-1	0	-1	4.57
11	-1	1	0	5.27
12	0	0	0	6.39
13	0	1	1	5.43
14	0	1	-1	4.34
15	1	0	1	5.52
16	-1	0	1	5.18
17	0	0	0	6.34

表 3 是对该模型进行显著性检验与回归模型系数显著性检验。

表 3 响应面方差分析二次模型方差分析表
Table 3 RSM quadratic model anova table

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P
总模型	7.81	9	0.87	96.65	<0.0001
A-A	0.14	1	0.14	15.94	0.0052
B-B	0.025	1	0.025	2.82	0.1370
C-C	1.51	1	1.51	168.61	<0.0001
AB	2.025E-003	1	2.025E-003	0.23	0.6493
AC	0.017	1	0.017	1.88	0.2124
BC	8.100E-003	1	8.100E-003	0.90	0.3738
A ²	0.75	1	0.75	84.02	<0.0001
B ²	1.22	1	1.22	135.87	<0.0001
C ²	3.57	1	3.57	397.60	<0.0001
残差	0.063	7	8.978E-003		
失拟项	0.051	3	0.017	5.70	0.0630
纯误差	0.012	4	2.980E-003		
总变异	7.87	16			

注: $P<0.05$, 认为模型或考察因素有显著影响; $P<0.01$, 认为模型或考察因素有显著影响。

本次回归中 $r^2=0.9920$, 表明因变量与所考察自变量之间的线性关系显著, 模型的 $R_{Adj}^2=0.9818$, 说明该模型能解释 98.18% 响应值的变化, 拟合度较好, 失拟项不显著($P>0.05$), 说明本试验所得的二次回归方程显著度较高, 能较好地对应值进行预测。模型的一次项 $X_1(P<0.0001)$ 、 $X_2(P=0.0068)$ 、 $X_3(P<0.0001)$ 及二次项和 $A^2(P<0.0001)$ 、 $B^2(P<0.0001)$ 、 $C^2(P<0.00001)$ 对天山岩黄芪多糖的影响显著; 交互项 $AB(P=0.6493)$ 、 $AC(P=0.2124)$ 、 $BC(P=0.3738)$

都对天山岩黄芪多糖多糖的含量并没有显著影响。

3.4.2 天山岩黄芪多糖提取工艺的响应面分析及优化

图 5 所示 3 组图是对实验得到的多元二次回归模型所作的响应曲面图及其等高线图, 可用于评价实验因素对天山岩黄芪多糖含量影响的两两交互作用及确定各个因素的最佳水平范围。通常等高线的形状可直观反映出交互作用的强弱, 如椭圆形的等高线表示各因素的交互作用是显著的, 而圆形等高线则表示交互作用不显著。

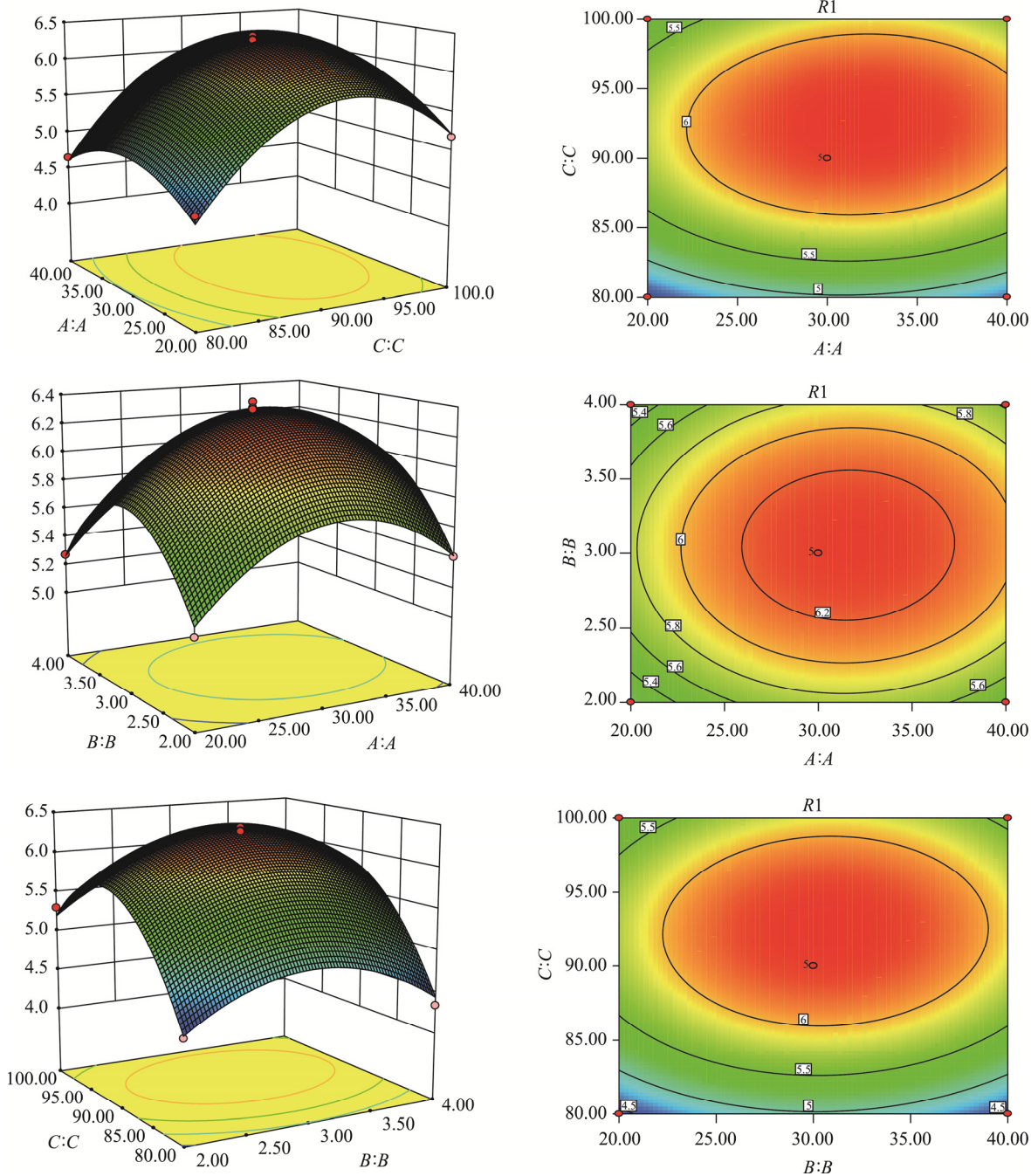


图 5 两因素交互作用对多糖含量的响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface diagram and contour diagram of two-factor interaction to polysaccharide content

根据响应面数据分析结合响应面所出的图可以得出, A 、 C 、二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 显著性较高, 交互项显著性水平较弱, 表明各影响因素对天山岩黄芪多糖含量的影响不是简单的线性关系, 所以可以利用回归方程来确定最佳提取工艺条件。最佳的提取工艺条件为: 提取料液比为 1:32, 提取时间为 3 h, 提取温度为 92 °C, 再进行实验验证, 最终证明在最佳提取条件下, 多糖含量为 6.33%, 与理论值 6.39% 接近, 表明该提取工艺可靠、准确。

4 结论与讨论

本研究利用 Design Expert 试验设计, 采用响应面分析法建立天山岩黄芪多糖提取工艺的二次多项式数学模型, 并对各因素对响应值的影响进行分析。结果表明最佳的提取工艺条件为: 提取液料液比为 1:32($m:V$), 提取时间为 3 h, 提取温度为 92 °C, 多糖含量为 6.39%, 实际验证含量为 6.33%, 所得多糖含量与预测值相对误差小, 说明模型拟合度较好, 可用于天山岩黄芪多糖提取工艺优化。

由于多糖具有多种药理活性且作用显著, 所以多糖的研究具有很高的药用价值和医疗意义, 国内外目前对多糖的研究都比较火热, 本实验与以前提取工艺相比, 是通过单因素与响应面相结合的方法提取多糖, 最后择优选取提取工艺条件。该实验操作简单, 提取的多糖含量更高, 为进一步开发利用天山岩黄芪多糖提供了科学合理的实验依据。

参考文献

- [1] 海力茜·陶尔大洪, 孙莲, 马合木提·买买提明, 等. 天山岩黄芪根中多糖的提取及含量测定[J]. 时珍国医国药, 2007, (3): 523–524.
- [2] 王磊, 姚军, 刘璐, 等. HPLC 法同时测定天山岩黄芪中 4 种异黄酮[J]. 中成药, 2017, 39(6): 1309–1311.
- [3] 梁宁, 杨磊, 李静. 多糖研究进展[J]. 吉林农业, 2011, (5): 321–329.
- [4] Lam Y, Ng TB, Yao RM, *et al.* Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in dendrobium plants [J]. Evid-Based Compl Alt, 2015, 2015: 1–15.
- [5] 汪志好. 植物多糖的研究进展(综述)[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2007, (2): 86–88.
- [6] 覃艳, 吴春英, 傅裕康, 等. 中药多糖新型提取方法的研究进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(11): 670–673.
- [7] 马趣环, 石晓峰, 沈薇, 等. 响应面分析法优化雪松松针多糖提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1106–1110.
- [8] 陈睿, 杨范莉, 张琳, 等. 响应面分析法优选桑寄生总黄酮的提取工艺[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(4): 367–370.
- [9] 李翠丽, 王炜, 张英, 等. 中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(19): 2700–2703.
- [10] 姚昕利, 舒文掇, 陈宗游, 等. 响应面法优化超声波辅助提取桂北金槐槐米中鞣质工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2401–2405.
- [11] 刘佳妮, 王硕, 白米雪, 等. 响应面法优化丹参药渣多糖提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 454–457.
- [12] 徐子恒, 栾祖香, 王宏军, 等. 新鲜银杏外种皮多糖提取工艺的优化及其抗菌和抗氧化活性[J]. 中成药, 2017, 39(12): 2614–2617.
- [13] 阎力君, 洪涛. 黄芪多糖水提工艺的优化及其体外抗肿瘤活性[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2045–2049.
- [14] 李红法, 郭松波, 满淑丽, 等. 乙醇分级沉淀提取黄芪多糖及其理化性

质和抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2112–2116.

Li HF, Guo SB, Man SL, *et al.* Ethanol fractional precipitation extraction of astragalus polysaccharide and its physicochemical properties and antioxidant activity [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2015, 40(11): 2112–2116.

- [15] 文喜艳, 邵晶, 王兰霞, 等. 正交设计结合 3 种比色法优选黄芪多糖提取工艺[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1562–1566.

Wen XY, Shao J, Wang LX, *et al.* Orthogonal design combined with three colorimetric methods to optimize the extraction process of astragalus polysaccharide [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2018, 33(4): 1562–1566.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



乔丽洁, 硕士研究生, 主要研究方向为天然药物研究与开发。

E-mail: 920328388@qq.com



海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然药物研究与开发。

E-mail: hailiqian2471@sina.com