

# 响应面法优化阳春砂多糖的超声辅助提取工艺

李世杰,张丹雁\*,严娅娟,曹曼

(广州中医药大学中药学院,广州 510006)

[摘要] 目的:优选阳春砂多糖的超声提取工艺条件。方法:以阳春砂多糖提取率为评价指标,在单因素试验基础上,选定提取温度、时间及料液比为考察因素,通过三因素三水平 Box-Behnken 中心组合试验建立多糖提取率的二次多项式回归方程,经响应面回归分析得到优化组合条件。采用紫外分光光度法测定多糖含量。结果:最佳提取工艺条件为提取温度 78 ℃,超声时间 71 min,料液比 1:39,多糖提取率实测值(13.04 ± 0.36)%,与预测值(13.22%)较为接近。结论:与传统水提取法相比,超声辅助法具有省时、高效的优点,为阳春砂多糖的后续产品研发提供实验依据。

[关键词] 阳春砂;多糖;超声辅助提取;响应面分析法;紫外分光光度法

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)22-0047-05

[doi] 10.11653/syfy2013220047

## Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Technology of Polysaccharides from *Amomum villosum* by Response Surface Methodology

LI Shi-jie, ZHANG Dan-yan\*, YAN Ya-juan, CAO Man

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrasound-assisted extraction technology of polysaccharides from *Amomum villosum* by response surface analysis. **Method:** On the basis of single-factor tests, with yield of polysaccharides from *A. villosum* as index, quadratic polynomial regression equation of polysaccharides yield was established by a three-factor and three-level Box-Behnken Design with solid-liquid ratio, extraction time and temperature as factors, then the established model was analyzed by response surface methodology to obtain optimum extraction process. The content of polysaccharides was determined by UV. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: extracting time 71 min, solid-liquid ratio 39:1 and extraction temperature 78 ℃. Under these conditions, the estimated and observed values of yield of polysaccharides were 13.22% and (13.04 ± 0.36)%, respectively. **Conclusion:** Compared with traditional water extraction, ultrasound-assisted method had advantages of time-saving and efficient, this study could provide experimental basis for the follow-up research and development of polysaccharides in *A. villosum*.

[Key words] *Amomum villosum*; polysaccharides; ultrasound-assisted extraction technology; response surface methodology; UV

阳春砂为我国著名的“四大南药”之一,具有化湿开胃、湿脾止泻、理气安胎的功效,临床主要用于湿浊中阻、脘痞不饥、脾胃虚寒、呕吐泄泻、妊娠恶

阻、胎动不安等症<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,多糖具有抗炎、抗氧化、抗癌、调节免疫、降低血压等功效<sup>[2-6]</sup>。阳春砂富含多糖类成分,但目前关于阳春

[收稿日期] 20130423(022)

[基金项目] 国家科技部“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAI01B02)

[第一作者] 李世杰,硕士,从事中药质量标准研究及中药化学研究,Tel:15902030757,E-mail:lisj666@163.com

[通讯作者] \*张丹雁,教授,硕士生导师,从事中药品种真伪鉴别和质量标准研究,Tel:020-86361431,E-mail:danyan64@21cn.com

砂多糖的研究报道较少<sup>[7]</sup>,其提取工艺优选尚未见报导。响应面法通过多元二次回归方程拟合影响因素与响应值之间的函数关系,对回归方程进行分析得到优化的工艺参数,与正交试验设计相比,能研究几种因素之间的交互作用,现被越来越广泛地应用于解决多变量问题<sup>[8]</sup>。本实验采用超声辅助提取阳春砂多糖,通过响应面法优化相关工艺参数,为阳春砂多糖的开发利用提供理论参考。

## 1 材料

FA2004 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司),501-A 型超级恒温器(上海实验仪器厂有限公司),DL-6000B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),UV-360 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

阳春砂(采自阳春市砂仁试验示范场,样品经广州中医药大学中药鉴定教研室张丹雁教授鉴定为姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实,样品保存在广州中医药大学中药鉴定教研室备查),无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110833-200904),水为去离子水,试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 阳春砂多糖的提取** 将阳春砂去壳取种子团,恒温干燥后粉碎过 40~60 目筛,得阳春砂粉末。取阳春砂粉末 4.0 g,用石油醚 300 mL 加热至 60 ℃,索氏回流 4 h,回收石油醚,脱脂后的粉末使用 95% 乙醇 300 mL 加热(80 ℃)回流除去部分低聚糖及色素,回收乙醇,将预处理后所得粉末置于 500 mL 锥形瓶中,加入适量去离子水,于选定温度下超声提取一定时间后,于 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,回收上清液,将下层残渣按上述方法进行 2 次提取。合并 2 次离心所得上清液,于 65 ℃ 真空浓缩至约 100 mL,加入 Sevage 试剂(三氯甲烷-正丁醇 4:1)20 mL 混合,充分震荡,离心,除去变性蛋白质层及有机溶剂层,水层继续加入 Sevage 试剂 20 mL 脱蛋白,直到溶液中无变性蛋白层出现,将水层定容至 1 L,即得阳春砂多糖提取液。

### 2.2 多糖提取率的测定

**2.2.1 标准曲线的绘制** 精密称取于 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 20.6 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得葡萄糖对照品贮备液。精密吸取该贮备液 1,2,4,8,10 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水定容至刻度,得系列对照品溶液。分别取系列对照品溶液 2.0 mL,各加入苯酚

溶液 1.0 mL,摇匀,加入浓硫酸 5.0 mL,使用涡流发生器震荡 5 min,放置冷却至室温。取水 2.0 mL,按相同方法处理,作为空白对照溶液。于 490 nm 处测定吸光度(A),以 A 为横坐标,质量浓度为纵坐标,得回归方程  $Y = 7.923X - 0.0041$  ( $r = 0.9997$ ),表明对照品质量浓度在 20.6~206 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**2.2.2 稳定性考察** 取 2.1 项下提取液 2.0 mL,按 2.2.1 项下方法自“各加入苯酚溶液 1.0 mL”至“放置冷却至室温”制成供试品溶液,于 490 nm 处测定 A,随行水作空白,每 1 h 测定 1 次,连续测定 8 次,结果表明供试品溶液在 7 h 内基本稳定,RSD 0.45%。

**2.2.3 精密度考察** 取对照品溶液 2.0 mL,按 2.2.1 项下方法自“各加入苯酚溶液 1.0 mL”至“放置冷却至室温”处理,于 490 nm 处测定 A,随行水作空白,重复测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.30%,表明精密度良好。

**2.2.4 重复性试验** 精密称取阳春砂粉末 6 份,按 2.1 项下方法配制提取液,按 2.2.1 项下方法自“各加入苯酚溶液 1.0 mL”至“放置冷却至室温”制成供试品溶液,于 490 nm 处测定 A,随行水作空白,结果 A 的 RSD 0.83%,证明该方法重复性较好。

**2.2.5 多糖含量的测定** 取阳春砂多糖提取液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密吸取 2 mL,按 2.2.1 项下方法自“各加入苯酚溶液 1.0 mL”至“放置冷却至室温”制成供试品溶液,于 490 nm 处测定 A,代入回归方程计算多糖溶液质量浓度( $C_0$ ),计算多糖提取率。

$$\text{多糖提取率} = C_0 V_1 V_2 / V_3 M$$

式中  $V_1$  为供试品溶液体积, $V_2$  为样品溶液体积, $V_3$  为移取体积(2.0 mL), $M$  为所称阳春砂粉末质量(4.0 g)。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 提取温度** 固定料液比 1:30,提取时间 60 min,提取功率 320 W 的条件下,分别于 40,50,60,70,80,90 ℃ 超声提取 2 次,按 2.2 项下方法计算多糖提取率分别为 4.93%,7.87%,8.20%,9.69%,9.91%,9.82%,故提取温度宜选在 70 ℃ 左右。

**2.3.2 超声时间** 在料液比 1:30,提取温度 70 ℃,提取功率 320 W,提取数 2 次的条件下,分别提取 40,50,60,70,80,90 min,按 2.2 项下方法计算多糖提取率分别为 7.85%,8.36%,9.44%,10.21%,

9.87%,9.73%,故超声时间选择 70 min。

**2.3.3 料液比** 在固定超声时间 70 min,提取温度 70 ℃,提取功率 320 W,提取数 2 次的条件下,分别考察料液比 1:25,1:30,1:35,1:40,1:45,1:50 对多糖含量的影响,按 2.2 项下方法计算多糖提取率分别为 9.06%,10.30%,10.92%,11.54%,11.68%,11.73%,故料液比取 1:40 左右。

**2.4 响应面试验设计及优化** 在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 设计原则,选取超声时间、提取温度、料液比为考察因素,采用三因素三水平的响应面分析对工艺参数进行优化,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 阳春砂多糖超声辅助提取工艺响应面分析因素水平

水平	$X_1$ 提取温度/℃	$X_2$ 提取时间/min	$X_3$ 液料比/mL·g <sup>-1</sup>
-1	60	60	35
0	70	70	40
1	80	80	45

表 2 阳春砂多糖超声辅助提取工艺响应面分析安排

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	多糖提取率/%
1	-1	-1	0	6.39
2	1	-1	0	11.15
3	-1	1	0	9.53
4	1	1	0	11.90
5	-1	0	1	7.00
6	1	0	1	11.37
7	-1	0	1	10.17
8	0	0	1	12.60
9	0	-1	-1	7.10
10	0	1	-1	9.02
11	0	-1	1	8.69
12	0	1	1	11.63
13	0	0	0	12.18
14	0	0	0	12.11
15	0	0	0	12.51
16	0	0	0	11.87
17	0	0	0	12.28

对表 2 数据采用 Design Expert 7.0 软件进行分析和处理,获得多糖提取率( $Y$ )对超声提取温度、料液比、提取时间的二次多元回归方程  $Y = -187.9 +$

$1.677\ 125X_1 + 2.961\ 375X_2 + 1.283\ 5X_3 - 0.005\ 97X_1X_2 - 0.004\ 85X_1X_3 + 0.002\ 55X_2X_3 - 0.006\ 36X_1^2 - 0.018\ 11X_2^2 - 0.012\ 69X_3^2$ 。对二次回归方程进行方差分析见表 3,结果显示模型  $P < 0.01$ ,说明该回归方差模型极其显著,该试验方法可靠。方程失拟项不显著,表明该回归模型与实测值能较好地拟合。回归系数( $R^2$ ) = 0.995 0 > 0.9,表明该模型相关度好。回归方程各项的方差分析表明除  $X_2X_3$  外,其他一次项、二次项及交互项均达到极显著水平。响应面对各因素构成的三维空间在二维平面上的等高图,可直观地反映各因素之间的相互作用,Design-Expert 7.0.0 软件处理得响应面分析结果见图 1~3。

表 3 回归系数及显著性检验

方差来源	SS	$f$	MS	$F$	$P$
模型	70.13	9	7.79	153.38	<0.000 1
$X_1$	24.26	1	24.261	477.44	<0.000 1
$X_2$	9.57	1	9.57	188.38	<0.000 1
$X_3$	9.25	1	9.245	181.98	<0.000 1
$X_1X_2$	1.43	1	1.43	28.11	0.001 1
$X_1X_3$	0.94	1	0.94	18.52	0.003 6
$X_2X_3$	0.26	1	0.26	5.12	0.058 1
$X_1^2$	1.70	1	1.70	33.55	0.000 7
$X_2^2$	13.81	1	13.81	271.89	<0.000 1
$X_3^2$	6.78	1	6.78	133.41	<0.000 1
残差	0.36	7	0.051		
失拟项	0.14	3	0.045	0.827 864	0.543 5
纯误差	0.22	4	0.055		
总离差	70.49	16			

注: $R^2 = 0.995\ 0, R_{Adj}^2 = 0.988\ 5$ 。 $P < 0.05$  表示差异显著, $P < 0.01$  表示差异极显著。

由图 1~3 可预测最优工艺条件为提取温度 78.8 ℃,超声时间 71.3 min,料液比 1:39.3,在此条件下多糖提取率理论上可达 13.22%。结合实际情况考两次,将最佳工艺修正为提取温度 78 ℃,超声时间 71 min,料液比 1:39。按修正的工艺条件进行 3 次验证试验,结果多糖提取率(13.04 ± 0.36)% ( $n = 3$ ),与理论值较为吻合,说明采用响应面法优化得到的提取工艺参数可靠。

### 3 讨论

采用超声法从阳春砂中提取分离多糖物质,对阳春砂多糖相关药物的开发具有重要现实意义。通过响应面分析对其超声提取工艺进行优化,相比于

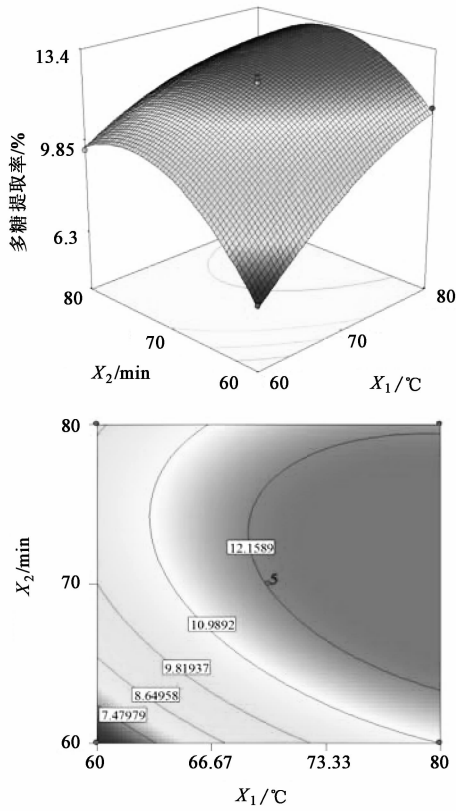


图 1 超声提取时间与提取温度对多糖提取率影响的响应面和等高线

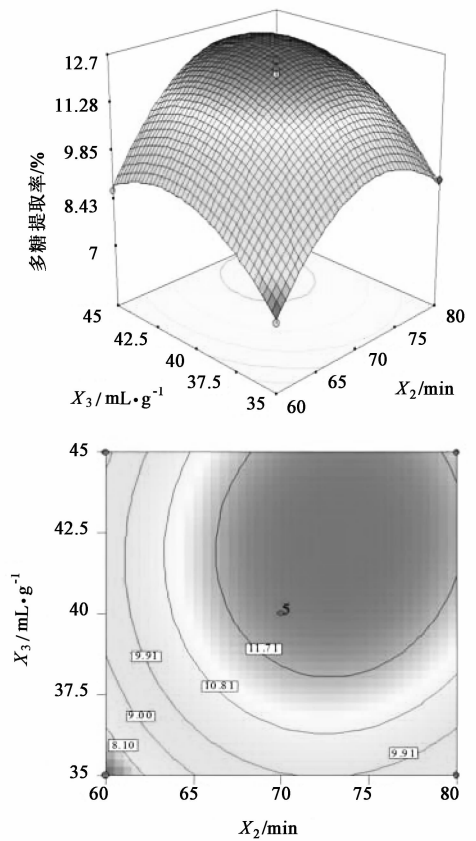


图 3 提取时间与料液比对多糖提取率影响的响应面和等高线

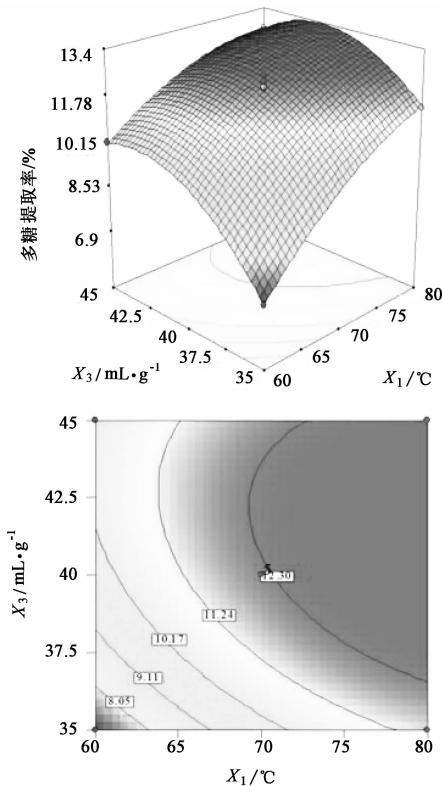


图 2 料液比与提取温度对多糖提取率影响的响应面和等高线

传统水提取方法<sup>[7]</sup>,具有提取时间短、提取温度低、提取率高的优势,主要是因为超声辅助提取利用超声波的空化效应增大介质分子的运动速度,使可溶性活性成分迅速溶出,因此超声辅助提取可节约提取时间且多糖提取率增加。通过单因素分析,发现当超声提取时间 > 70 min 时,多糖提取率反而会下降,可能是因为超声提取时间过长会导致多糖水解或结构遭到破坏。

[参考文献]

[ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:236.  
[ 2 ] Ukai S, Kiho T, Hara C, et al. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. [ J ]. J Pharmacobiodyn, 1983, 6( 12 ): 983.  
[ 3 ] LI X L, ZHOU A G, HAN Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum in vitro*[ J ]. Carbohydr Polym, 2006, 66( 1 ): 34.  
[ 4 ] Topping D L. Soluble fiber polysaccharides; effects on plasma cholesterol and colonic fermentation [ J ]. Nutr Rev, 1991, 49( 7 ): 195.

## 复方必清片的提取工艺优选

常占瑛<sup>1</sup>, 刘桂花<sup>2</sup>, 高晓黎<sup>1\*</sup>, 周湘龙<sup>1</sup>

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

**[摘要]** **目的:** 优选复方必清片的提取工艺。**方法:** 在单因素试验基础上, 以薯蓣皂苷元、秋水仙碱含量和浸膏得率的综合评分为指标, 通过正交试验优选菝葜等7味药材的乙醇提取工艺; 以总多酚含量和浸膏得率为综合评价指标, 通过正交试验优选余甘子等5味药材的水提取工艺。采用HPLC测定薯蓣皂苷元和秋水仙碱的含量, 色谱条件为Cosmosil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温35℃, 流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量10 μL, 检测波长分别为203, 350 nm, 流动相分别为甲醇-水(90:10), 甲醇-水(37:63); 采用紫外分光光度法测定总多酚含量。**结果:** 菝葜等7味药材的最佳提取工艺为加10倍量70%乙醇提取2次, 每次1.0 h; 余甘子等5味药材的最佳提取工艺为加10倍量水提取3次, 每次1.0 h。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 为复方必清片的质量控制提供实验依据。

**[关键词]** 薯蓣皂苷元; 秋水仙碱; 总多酚; 正交试验; 提取工艺; 高效液相色谱; 紫外分光光度法

**[中图分类号]** R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0051-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013220051

## Optimization of Extraction Technology for Compound Biqing Tablets

CHANG Zhan-ying<sup>1</sup>, LIU Gui-hua<sup>2</sup>, GAO Xiao-li<sup>1\*</sup>, ZHOU Xiang-long<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of compound Biqing tablets. **Method:** Based on single factor tests, orthogonal design was adopted to optimize ethanol extraction technology of Smilacis Chinae Rhizoma and other six herbs with composite score of diosgenin content, colchicine content and extract yield as index; With extract yield and the content of total polyphenols as comprehensive evaluation index, water extraction technology of Phyllanthi Fructus and other five herbs was optimized by orthogonal test. The contents of diosgenin and colchicine were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Cosmosil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), column temperature 35℃, flow rate 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, injection volume 10 μL, detection wavelength at 203, 350 nm, mobile phase with methanol-water (90:10) and methanol-water (37:63); The

**[收稿日期]** 20130503(001)

**[第一作者]** 常占瑛, 硕士, 助教, 从事中药民族药的开发研究, Tel:0991-4362442, E-mail: changzhanying1983@163.com

**[通讯作者]** \*高晓黎, 博士, 教授, 从事新药及民族药的开发研究, Tel:0991-4362442, E-mail: xli\_g@sina.com

[5] Kiho T, Оокив К, Usui S, et al. Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the culture mycelium of cordyceps sinensis[J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22(9):966.

[6] Gamal-Eldeen A M, Ahmed E F, Abo-Zeid M A. In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium* [J].

Food Chem Toxicol, 2009, 47(6):1378.

[7] 樊亚鸣, 黄晓兰, 陈永亨, 等. 春砂仁多糖的提取及组分分析[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 2006, 5(4):30.

[8] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3):91.

[责任编辑 全燕]