

# 星点设计-效应面法优化陈皮多糖提取工艺

刘荣, 韦正, 银玲, 樊丹青, 杨丽, 陈鸿平, 刘友平\*

(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:**采用星点设计-效应面法优化陈皮多糖的提取工艺。**方法:**在单因素试验基础上,选取料液比、提取温度、提取时间为自变量,陈皮多糖提取率为因变量,利用星点设计模型对 3 个自变量各水平二项式进行拟合,确定陈皮多糖的最佳提取工艺。**结果:**优选的提取工艺为料液比 1:49,提取温度 92 ℃,回流提取时间 150 min,陈皮多糖提取率达 14.77%,与预测值的偏差 0.61%。**结论:**星点设计-效应面法优化的陈皮多糖提取工艺简便可靠,为陈皮多糖的开发利用奠定基础。

**[关键词]** 陈皮; 多糖; 星点设计-效应面法; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0023-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013180023

## Optimization of Extraction Technology for Polysaccharides from Citri Reticulatae Pericarpium by Central Composite Design-Response Surface Methodology

LIU Rong, WEI Zheng, YIN Ling, FAN Dan-qing, YANG Li, CHEN Hong-ping, LIU You-ping\*

(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Breeding Base of State Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines Co-constructed by Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China and Sichuan Province, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of polysaccharides from Citri Reticulatae Pericarpium by central composite design-response surface methodology. **Method:** Based on single-factor tests, with solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time as independent variables and yield of polysaccharides from Citri Reticulatae Pericarpium as dependent variable, multiple linear regression and binomial fitting was adopted by central composite design model, and determine optimum extraction technology. **Result:** The best extraction process was as following: ratio of solid to liquid 1:49, extraction temperature 92 ℃, reflux extraction time 150 min. Yield of polysaccharides from Citri Reticulatae Pericarpium was up to 14.77%, deviation of the predictive value and the measured value was 0.61%. **Conclusion:** This optimized extraction process was simple and reliable, it could laid a certain foundation for development and utilization of polysaccharides from Citri Reticulatae Pericarpium.

**[Key words]** Citri Reticulatae Pericarpium; polysaccharides; central composite design-response surface methodology; extraction process

陈皮具有理气健脾、降逆止呕、调中开胃、燥湿化痰之功效<sup>[1-2]</sup>,含有挥发油、黄酮类、多糖等化学

成分<sup>[3]</sup>。其中多糖类成分含量较高,具有抑制成纤维细胞生长因子的信号转导<sup>[4-5]</sup>和脂多糖诱导的炎

**[收稿日期]** 20130227(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072991);四川省教育厅自然科学重点项目(09ZA033)

**[第一作者]** 刘荣,在读硕士,从事中药化学成分与质量标准化研究,Tel:15928667250,E-mail:liurong2007@126.com

**[通讯作者]** \*刘友平,研究员,博士生导师,从事中药质量标准化及药效物质基础研究,Tel:028-61800158,E-mail:lyp@edutem.edu.cn

症反应<sup>[6]</sup>,并能预防肿瘤生长和转移<sup>[7-9]</sup>,陈皮果胶还可作为结肠靶向药物的理想载体<sup>[10]</sup>。陈皮多糖提取工艺的优选多采用正交试验法<sup>[11]</sup>,存在试验精密度不够、建立的数学模型可预测性不强等缺点。本实验以陈皮多糖提取率为指标,采用星点设计-效应面法优选陈皮多糖的提取工艺<sup>[12-14]</sup>,为陈皮的药用价值研究提供参考。

## 1 材料

UV-1100 型紫外-可见分光光度计(上海天美科技有限公司),DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),BP211D 型 1/10 万、BP121S 型 1/万电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。无水葡萄糖对照品(成都市科龙化工试剂厂,批号 20110331),陈皮(购于成都荷花池中药材市场,采购日期 2012 年 6 月,经成都中医药大学药学院严铸云教授鉴定为芸香科植物橘的栽培变种红橘 *Citrus tangerina* Hort. et Tanaka 的干燥成熟果皮),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 陈皮多糖的含量测定

**2.1.1 供试品溶液的制备** 称取陈皮粉末(过 3 号塞)约 50 g,置于圆底烧瓶中,加入 5 倍量石油醚(沸程 30~60℃),于 40℃ 水浴回流浸提 2 h,过滤,残渣挥干石油醚;加 20 倍药材量 80% 乙醇于 80℃ 水浴回流 2 h,过滤,残渣用 10 倍量 80% 乙醇洗涤 2 次,过滤,残渣挥干乙醇,置于 60℃ 恒温干燥箱中干燥 24 h,备用。称取干燥后陈皮残渣约 1.0 g,精密称定,加水于一定温度下回流提取一定时间,过滤,残渣用水洗涤 2 次,每次 10 mL,滤液置于 250 mL 量瓶中,用水定容,即得。

**2.1.2 线性关系考察** 精密称取 105℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 25.17 mg,置于 250 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,得对照品储备液。分别精密移取该储备液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 置于 10 mL 具塞试管中,分别加水至 2.0 mL,各加入 5.0% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸 5 mL,摇匀,置于沸水中水浴 15 min,取出置于冷水中冷却至室温,以水为空白,于 488 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 0.0599X - 0.0035 (R^2 = 0.9990)$ ,表明葡萄糖质量浓度在 2.5~12.5 mg·L<sup>-1</sup> 与 A 呈良好线性关系。

**2.2 多糖提取率的测定** 采用硫酸-苯酚法测定。精密移取供试品溶液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加

水稀释至刻。精密吸取 1.0 mL 置于 10 mL 具塞试管中,按 2.1.2 项下自“加水至 2.0 mL”起,依次显色,测定 A,计算多糖提取率。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 料液比** 称取 2.1.1 项下干燥的陈皮残渣约 1.0 g,共 5 份,精密称定,分别加入 20,30,40,50,60 倍量水,于 80℃ 水浴浸提 2 h,提取 1 次,趁热过滤,残渣用水洗涤 2 次,每次 10 mL,滤液置于 250 mL 量瓶中,待冷却后加水稀释至刻度,测定 A,计算多糖提取率分别为 7.23%,8.76%,11.55%,11.57%,11.58%,故选取料液比 1:40。

**2.3.2 提取时间** 称取 2.1.1 项下干燥的陈皮残渣 4 份,每份约 1.0 g,精密称定,分别加 40 mL 水于 80℃ 水浴浸提 1,2,3,4 h,提取 1 次,按 2.3.1 项下自“趁热过滤”起开始操作,结果多糖提取率分别为 8.13%,11.58%,10.77%,10.03%,可能是因为多糖经长时间加热后发生部分水解,而使其含量降低<sup>[13]</sup>,故选取浸提时间 2 h。

**2.3.3 提取温度** 称取 2.1.1 项下干燥的陈皮残渣 5 份,每份约 1.0 g,精密称定,分别加 40 mL 水于 60,70,80,90,100℃ 水浴浸提 2 h,提取 1 次,按 2.3.1 项下自“趁热过滤”起开始操作,结果多糖提取率分别为 7.29%,8.13%,11.52%,13.56%,13.60%,故选取浸提温度 90℃。

**2.3.4 提取次数** 称取 2.1.1 项下干燥的陈皮残渣 3 份,每份约 1.0 g,精密称定,加 40 mL 水于 90℃ 分别提取 1,2,3 次,每次 2 h,按 2.3.1 项下自“趁热过滤”起开始操作,结果多糖提取率分别为 8.86%,18.63%,18.87%,故选取提取数 2 次。

**2.4 星点设计-效应面法优选** 在单因素试验基础上,由于提取次数为非连续变量,实际操作较为困难,故确定为 2 次。选取料液比、提取时间、提取温度为自变量,陈皮多糖提取率为因变量,每个因素设计 5 个水平,分别用代码  $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha (\alpha = 1.732)$  表示,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 陈皮多糖的提取工艺优选星点试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取时间/min	C 提取温度/℃
-1.732	22.68:1	68.04	64.68
-1	30:1	90	72
0	40:1	120	82
1	50:1	150	92
1.732	57.3:1	171.96	99.32

表2 陈皮多糖的提取工艺优选星点试验安排

No.	A	B	C	多糖提取率/%
1	-1	-1	-1	5.54
2	1	-1	-1	5.97
3	-1	1	-1	6.69
4	1	1	-1	6.41
5	-1	-1	1	8.78
6	1	-1	1	11.88
7	-1	1	1	10.73
8	1	1	1	13.70
9	-1.732	0	0	6.18
10	1.732	0	0	11.42
11	0	-1.732	0	10.08
12	0	1.732	0	11.77
13	0	0	-1.732	5.39
14	0	0	1.732	16.35
15~20	0	0	0	10.88

将表2中数据运用 Design-Expert 7.0.0 软件进行响应面分析,以多糖提取率( $Y$ )为响应值分别对各因素进行多元线性回归二项式方程拟合,拟合模型为  $Y = 10.88 + 1.09A + 0.59B + 2.82C - 0.10AB + 0.74AC + 0.27BC - 0.98A^2 - 0.27B^2 - 0.29C^2$  ( $R^2 = 0.9342$ ),对模型采用  $F$  检验进行方差分析,结果见表3。

由表3可知,各因素对陈皮多糖提取率影响的主次顺序为  $C > A > B$ ,二项式模型达极显著水平,说明该方程与实际情况拟合度良好,且相对于多元线性拟合的  $R^2$  有所提高,具有较大可信度,预测性较好,可利用该模型分析预测最佳工艺条件。多糖提取率与任意2个因素的三维效应面曲线见图1。

运用 Design-Expert 7.0.0 软件对二项式回归模型进行预测分析,得陈皮多糖最佳提取工艺为料液比 1:49,提取时间 150 min,提取温度 92 °C,提取数

表3 陈皮多糖星点试验设计  $F$  检验方差分析

方差来源	SS	$f$	MS	$F$	$P$
模型	153.63	9	17.07	15.76	<0.0001
A	16.71	1	16.71	15.43	0.0028
B	4.91	1	4.91	4.53	0.0592
C	111.24	1	111.24	102.73	<0.0001
AB	0.088	1	0.088	0.081	0.7812
AC	4.38	1	4.38	4.05	0.0720
BC	0.59	1	0.59	0.55	0.4759
$A^2$	15.01	1	15.01	13.87	0.0040
$B^2$	1.13	1	1.13	1.04	0.3308
$C^2$	1.29	1	1.29	1.19	0.3004
残差	10.83	10	1.08		
失拟性	10.83	5	2.17		
纯误差	0.000	5	0.000		
总差	164.46	19			

2次,陈皮多糖提取率预测的最大值 14.77%。按最佳提取工艺进行3次验证试验,结果陈皮多糖平均提取率 14.68%,与预测值的偏差 0.61%,说明优选的提取工艺预测性良好。

### 3 讨论

预试验中将供试品溶液与葡萄糖对照品溶液进行苯酚硫酸显色后置于 200~600 nm 紫外灯下进行全波长扫描,发现供试品溶液在 486 nm 处有最大吸收峰,葡萄糖对照品溶液在 488 nm 处有最大吸收峰,考虑到供试品溶液中可能含有其他一些有紫外吸收的干扰物质,故选取检测波长 488 nm。在课题组前期对定点、定植株采集的陈皮、青皮中次生代谢产物(挥发油<sup>[15]</sup>、黄酮<sup>[16]</sup>、总酚酸、生物碱<sup>[17]</sup>)动态积累变化研究的基础上,采用星点设计-效应面法优选陈皮多糖的提取工艺,得到的工艺稳定可行,为阐释陈皮、青皮药效物质基础及“一体二用”的科学内涵提供参考。

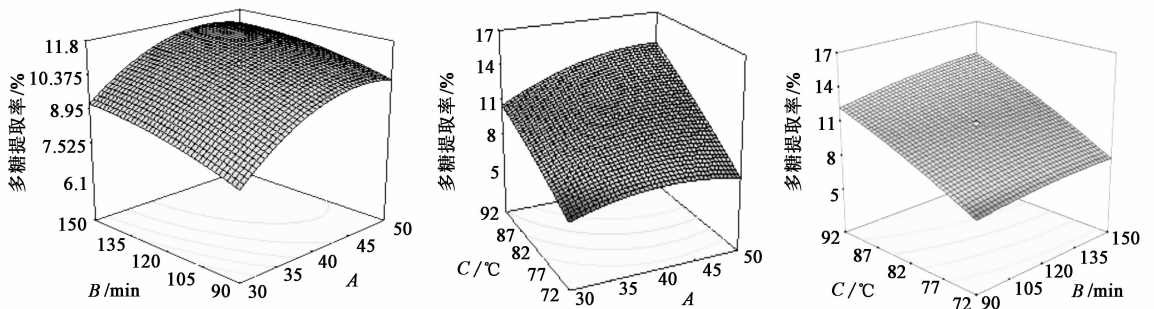


图1 各因素对陈皮多糖提取率影响的三维效应面

[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: 176.
- [2] 邵湘宁, 刘庆林. 陈皮药对的临床应用[J]. 湖南中医杂志, 2004, 20(3): 32.
- [3] 李庆耀, 梁生林. 陈皮的药用研究进展[J]. 中成药, 2008, 30(2): 246.
- [4] LIU Y, Ahmad H, LUO Y, et al. Influence of harvest time on citrus pectin and its *in vitro* inhibition of fibroblast growth factor signal transduction [J]. J Sci Food Agr, 2002, 82(4): 469.
- [5] LIU Y, Ahmad H, LUO Y, et al. Citrus pectin: characterization and inhibitory effect on fibroblast growth factor-receptor interaction [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 3051.
- [6] CHEN C H, SHUI M T, CHEN T F, et al. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(8): 1001.
- [7] Platt D, Raz A. Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin [J]. J Natl Cancer I, 1992, 84(6): 438.
- [8] Nangia M P, Hogan V, Honjo Y, et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin [J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(24): 1854.
- [9] Nangia M P, Conklin J, Hogan V, et al. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents [J]. Trends Mol Med, 2002, 8(4): 187.
- [10] Hodges L A, Connolly S M, Band J, et al. Scintigraphic evaluation of colon targeting pectin-HPMC tablets in healthy volunteers [J]. Int J Pharm, 2009, 370(1/2): 144.
- [11] 李粉玲, 蔡汉权, 李红, 等. 陈皮多糖的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(10): 38.
- [12] 刘艳杰, 向荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 455.
- [13] 陈家仪, 贾薇, 曹元儿, 等. 星点设计-响应面法优化枳实黄酮成分的提取工艺[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1267.
- [14] 王国华, 张保献, 聂其霞, 等. 星点设计-效应面法优选荷叶中荷叶碱与荷叶黄酮的提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2332.
- [15] 王坚, 韦正, 陈鸿平, 等. 源于同一植株陈皮挥发油成分动态变化规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 74.
- [16] 韦正, 杨丽, 李旻, 等. 基于 Box-Behnken 效应面法筛选和优化陈皮中橙皮苷及川陈皮素的提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 16.
- [17] 韦正, 陈鸿平, 杨丽, 等. 同一植株不同生长期橘皮中辛弗林含量动态变化规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 81.

[责任编辑 全燕]

欢迎订阅 2014 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管, 中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物, 已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”; “中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊; 并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月, 本着提高为主, 提高与普及相结合的办刊方针, 主要设置: 工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目, 交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药, 尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者, 以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊, 16 开本, 350 页, 标准刊号: ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期定价 35 元, 全年 840 元。国内外公开发行, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号: 2-417; 国外由中国国际图书贸易总公司办理发行, 代号: SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 《中国实验方剂学杂志》编辑部, 邮编: 100700, 联系电话: (010) 84076882, 电子邮件: syfjx\_2010@188.com, 网址: www.syfjxzz.com。