

响应面分析法优化牛蒡根多糖提取工艺

李瑾*, 侯淑珍, 王景媛, 王娜
(陕西中医学院药学院, 西安 712046)

[摘要] 目的:优化牛蒡根多糖的提取工艺。方法:采用水提醇沉法提取多糖,以多糖得率为考察指标;采用响应面分析法研究影响牛蒡根多糖测定的因素,以多糖提取率为响应值作响应面和等高线。结果:牛蒡多糖提取工艺的最佳条件为料液比 1:14.43,浸提温度 84.85 ℃,浸提时间 3.81 h。此条件下,牛蒡多糖的提取率为 6.16%。结论:该优选工艺稳定、可行。

[关键词] 牛蒡根;多糖;提取;响应面分析法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0021-04

Optimization of Extraction Technology for Polysaccharide from Roots of *Arctium lappa* by Response Surface Methodology

LI Jin*, HOU Shu-zhen, WANG Jing-yuan, WANG Na

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of polysaccharide from roots of *Arctium lappa*. **Method:** Polysaccharide was extracted by water extraction and alcohol precipitation method with yield of polysaccharide as index; Response surface methodology was used to study on influencing factors of determination of polysaccharide from roots of *A. lappa*, response surface and contour were made with extract ratio of polysaccharide as response value. **Result:** Optimum extraction technology conditions were solid-liquid ratio of 1:14.43, extraction temperature 84.85 ℃, extracting time 3.81 h. Under these conditions, yield of polysaccharide from roots of *A. lappa* was 6.16%. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible.

[Key words] roots of *Arctium lappa*; polysaccharide; extraction; response surface methodology

牛蒡为菊科牛蒡属二年生草本植物^[1],牛蒡根是指其肉质直根,在 2010 年版《中国药典》中尚未收载,但在古代医学典籍中,对牛蒡根具有消渴、活血化瘀的功效已有记载。近几年,牛蒡根药用食用价值在欧美、日本等地愈来愈受重视^[2],研究发现牛蒡根中富含氨基酸、矿物质、黄酮和多糖等活性物质,具有抗衰老、降血糖、抗氧化、增强免疫等多种生理功能^[3-4]。响应面分析法采用多元二次回归,将多因素指标的相互关系用多项式近似拟合,通过对函数响应面和等高线的分析,能够精确的研究各因

子与响应值的关系,近年来作为一种优良的科学手段被广泛应用^[5]。本文以多糖得率的指标,采用响应面分析法优选牛蒡根多糖的提取工艺。

1 材料

SHIMADZU 型分析天平(昆山托普电子有限公司),LD4-2 型离心机(美特仪器有限公司),721 型紫外分光光度计(上海精密仪器有限公司),葡萄糖对照品(上海楚定分析仪器有限公司,批号 C14027000),牛蒡根经陕西中医学院生药教研室胡本祥教授鉴定为菊科牛蒡属二年生草本植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的肉质直根。水为蒸馏水,所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺

2.1.1 工艺流程 牛蒡根→乙醚脱酯^[6]→药渣→水提取→水提液→70%醇沉→沉淀复溶于水→联合

[收稿日期] 20111221(004)

[基金项目] 陕西中医学院科研基金项目(2009XJ-04)

[通讯作者] *李瑾,硕士,讲师,从事中药的提取分离及应用研究, Tel: 029-38185165, E-mail: 75933298@qq.com

法脱蛋白^[7]→水浴法干燥→多糖粗品。

2.1.2 提取^[8] 精确称取牛蒡根粗粉 10 g, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加乙醚 100 mL 加热(50 ℃)回流 3 h, 过滤, 残渣加水提取 2 次, 合并滤液, 浓缩至 100 mL, 70% 乙醇冷藏沉淀 24 h, 干燥, 取适量蛋白酶溶于水, 加入多糖水溶液中, 于 60 ℃ 水浴中, 静置, 恒温 6 h。按多糖和三氯甲烷溶液 5:1 比例加 Sevage 试剂(三氯甲烷-正丁醇 4:1)混合, 搅拌 30 min, 离心(4 000 r·min⁻¹, 10 min), 将有机溶剂层和变性蛋白与水层分离, 保留水层, 继续用 Sevage 法除蛋白, 并测量每次水层在 490 nm 波长处得吸光度, 直到吸光度基本恒定。

2.2 牛蒡多糖含量和提取率的测定^[9]

2.2.1 标准曲线的绘制 精密称取 105 ℃ 下干燥至恒重的葡萄糖对照品 100 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得葡萄糖对照品溶液, 将其稀释 5 倍, 配制成葡萄糖标准溶液。精密吸取葡萄糖标准溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水使成 2.0 mL, 加入苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀后置于 40 ℃ 水浴中加热 15 min, 取出置于冷水中冷却 10 min。同时用 2.0 mL 蒸馏水中加入苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀后置于 40 ℃ 水浴中加热, 做空白对照。于 490 nm 波长处测定吸光度(A), 进行线性回归, 得回归方程 $C = 0.036A - 0.0073 (r = 0.9995)$, 表明葡萄糖质量浓度在 7.5 ~ 22.5 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2.2 样品测定 精密吸取样品溶液 1 mL 置于 100 mL 量瓶中, 加水稀释并定容。精密量取 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 加水 1.0 mL, 加 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀后置 40 ℃ 水浴中加热 15 min, 取出置冷水中冷却 10 min, 同时以 2.0 mL 蒸馏水加与样品同样量的试剂作空白对照, 用分光光度计在 490 nm 波长处测定吸光度^[10]。

多糖提取率 = (比色液浓度 × 比色液体积 × 定容体积 × 粗多糖溶液体积) / (定容体积 × 供试样品体积 × 供试样品质量) × 100%

2.3 水提取工艺单因素考察

2.3.1 提取温度考察 精确称取牛蒡根粗粉 10 g, 按 2.1.2 项下方法进行试验, 其他条件固定, 选取水提取温度分别为 80, 83, 85, 87, 90 ℃, 结果多糖提取率依次为 4.56%, 5.26%, 6.15%, 3.10%, 2.26%。故选用 85 ℃ 进行多糖提取。

2.3.2 料液比考察 精确称取牛蒡根粗粉 10 g, 按 2.1.2 项下方法进行试验, 其他条件固定, 分别加 5, 8, 12, 15, 18 倍量水, 结果多糖提取率依次为 4.92%, 5.57%, 5.22%, 4.65%, 4.13%。故选用加水 8 倍量。

2.3.3 提取时间考察 精确称取牛蒡根粗粉 10 g, 按 2.1.2 项下方法进行试验, 其他条件固定, 水提取时间分别为 1, 2, 3, 4, 5 h, 结果多糖提取率分别为 2.85%, 3.12%, 4.41%, 3.91%, 2.91%。即提取 2 h 时效果最佳。

2.4 响应面分析法优化工艺 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[11], 选取提取温度、料液比和提取时间为考察因素, 在单因素试验基础上, 采用三因素三水平响应面分析方法, 因素水平见表 1, 实验方案与结果见表 2。

表 1 牛蒡根多糖提取工艺响应面因素水平

编码水平	X ₁ 提取温度 /℃	X ₂ 提取时间 /h	X ₃ 料液比 /g·mL ⁻¹
-1	80	2	1:5
0	85	3	1:10
1	90	4	1:15

表 2 牛蒡根多糖提取工艺响应面实验安排与结果

No.	X ₁	X ₂	X ₃	多糖得率/%
1	80	4	10	5.7
2	90	2	10	4.2
3	90	3	15	5.5
4	85	4	5	5.6
5	85	3	10	5.7
6	85	3	10	5.7
7	80	3	5	4.9
8	80	2	10	4.8
9	85	4	15	6.1
10	90	4	10	5.5
11	85	2	5	4.1
12	80	3	15	5.6
13	85	2	15	5.3
14	85	3	10	5.7
15	85	3	10	5.7
16	90	3	5	4.6
17	85	3	10	5.8

使用 Design-Expert-8.05 b 软件对表 2 进行二元多次回归拟合得到提取温度(X₁), 提取时间(X₂) 料液比(X₃)与牛蒡根多糖之间的二元多次回归方程 $Y = 5.70 - 0.15X_1 + 0.41X_2 + 0.56X_3 + 0.05X_1X_2 +$

$0.10X_1X_3 - 0.18X_2X_3 - 0.39X_1^2 - 0.16X_2^2 + 0.26X_3^2$ 。对上述回归模型进行显著性检验见表3。由表3结果可知,一次项中提取温度、提取时间、料液比对多糖提取率均有极显著影响;二次项中提取温度、料液比和提取时间对提取率有显著性影响;各因子间,时间和料液比交互作用影响较显著。

表3 多糖得率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
X_1	0.18	1	0.98	30.00	0.000 9
X_2	2.65	1	2.65	440.83	<0.000 1
X_3	1.44	1	1.44	240.83	<0.000 1
X_1X_2	0.040	1	0.040	6.67	0.036 4
X_1X_3	0.01	1	0.01	1.67	0.237 7
X_2X_3	0.090	1	0.090	15.00	0.006 1
X_1^2	0.74	1	0.74	123.79	<0.000 1
X_2^2	0.31	1	0.31	51.16	0.000 2
X_3^2	0.12	1	0.12	20.28	0.002 8
残差	0.042	7	0.006		
失拟项	0.03	3	0.01		
误差	0.012	4	0.003		
总离差	5.74	16			
模型	5.70	9	0.63	105.50	<0.000 1

由图1~3可知,3个因素对多糖的提取率均有显著性影响。为验证牛蒡根总多糖提取模型方程的适用性,对回归方程求导,并令其等于零,可得到曲面的最大点,即3个主要因素的最佳平均值,转换后得到牛蒡多糖的最佳提取条件为提取温度84.85

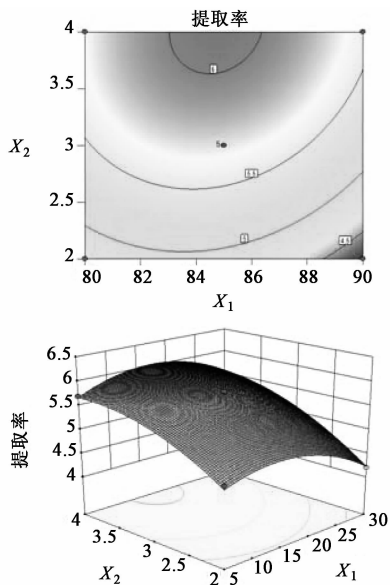


图1 提取温度和提取时间的等高线和响应面

℃,料液比1:14.43,提取时间3.81 h,预测提取率6.16%。

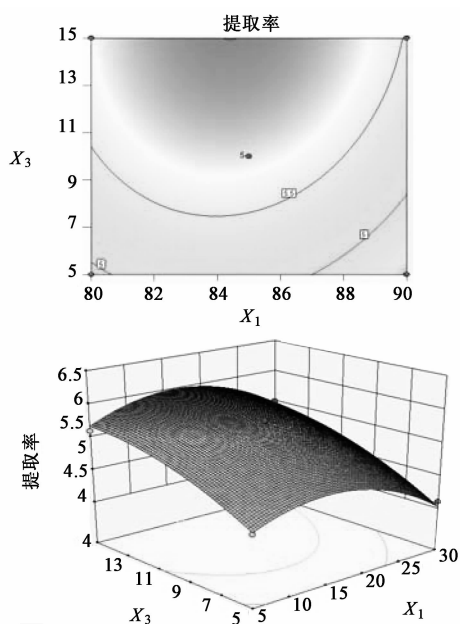


图2 提取温度和料液比的等高线和响应面

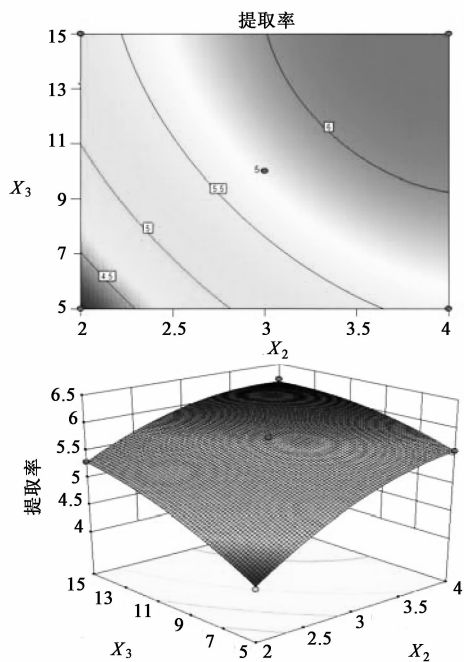


图3 提取时间和料液比的等高线和响应面

3 讨论

本研究将单因素试验与响应面分析法结合对多糖工艺条件进行优选,当提取温度在80~85℃,多糖含量随提取温度升高而增加;在85~90℃时多糖含量有下降趋势,可能是多糖在高温条件下水解或被破坏。

甘草总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺优选

吕子明^{1,2}, 陈凯³, 于向红², 刘晓燕², 梁俊清², 屠鹏飞^{1*}

(1. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191;

2. 北京以岭药业有限公司, 北京 100027; 3. 北京华众思康医药技术有限公司, 北京 102209)

[摘要] 目的: 优选大孔吸附树脂分离、纯化甘草总黄酮的工艺条件。方法: 以总黄酮吸附量和解吸率为考察指标, 对12种不同类型树脂进行筛选, 在此基础上对其纯化工艺条件进行优选。结果: AB-8型大孔吸附树脂对甘草总黄酮的纯化效果最好, 其最佳工艺条件为上样液质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每mL树脂最大上样量为2 mL, 吸附流速 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样液pH 6, 6 BV水以流速 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱除杂, 4 BV 70%乙醇以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱。该优选条件下, 洗脱物中甘草总黄酮纯度为38%。结论: 该优选工艺合理、可行, 适合工业生产。

[关键词] 甘草; 总黄酮; 甘草苷; 大孔吸附树脂; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0024-04

Optimization of Purification Process for Total Flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* by Macroporous Adsorption Resin

LV Zi-ming^{1,2}, CHEN Kai³, YU Xiang-hong², LIU Xiao-yan², LIANG Jun-qing², TU Peng-fei^{1*}

(1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmacy, Peking University, Beijing

100191, China; 2. Beijing Yiling Pharmaceutical Co. Ltd, Beijing 100027, China;

3 Beijing Huazhong Sikang Pharmaceutical Technology Co. Ltd, Beijing 102209, China)

[收稿日期] 20120106(012)

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2011ZX09401-020)

[第一作者] 吕子明, 工程师, 博士, 从事天然药物、中药及合成药物化学研究, Tel: 010-59705134, E-mail: aabben@163.com

[通讯作者] *屠鹏飞, 教授, 博士, 从事天然药物化学成分及其活性研究, Tel: 010-82802750, E-mail: pengfeitu@bjmu.edu.cn

[参考文献]

- [1] 江苏植物研究所. 江苏植物志: 下册 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982: 8881.
- [2] 袁昌齐, 冯熙, 王鸣, 等. 欧美植物药简况及研究和开发对策. 药用植物研究与中药现代化 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2004: 101.
- [3] 胡喜兰, 王国卫, 高英. 牛蒡根中活性成分的研究 [J]. 食品科学, 2007(28): 111.
- [4] 李玉洁, 刘树民, 李淑莲, 等. 牛蒡根抗衰老的实验研究 [J]. 食品科学, 2004, 15(9): 545.
- [5] 徐秀泉, 于荣敏, 刘柯, 等. 响应面法优化茅苍术多糖的提取工艺 [J]. 安徽农业科学, 2011, 30(20): 12082.
- [6] 魏学军, 林先燕, 冯光维, 等. 响应面法优化一贯煎中多糖的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 22.
- [7] 余微, 查文良, 梁惠敏, 等. 大蒜多糖组分 A 总多糖含量的分光光度法的测定 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 563.
- [8] 张伟杰, 王鹏, 林茜, 等. 三种多糖的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 19.
- [9] 刘万仓, 孙磊, 乔善义, 等. 不同产地枸杞药材中多糖的含量测定 [J]. 国际医药科学杂志, 2011, 38(30): 229.
- [10] 李金花, 黄锁义, 农石生. 八角茎多糖的提取及含量测定 [J]. 食品科技, 2011, 36(8): 176.
- [11] BOX G E P, Hunter W G. Statistics for experiments: An introduction to design, data analysis, and model building [M]. New York: Wiley, 1990: 250.

[责任编辑 仝燕]