

响应面法优化一贯煎中多糖的提取工艺

魏学军¹, 林先燕¹, 冯光维¹, 李江²

(1. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558003; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 利用响应面法对一贯煎总多糖的提取工艺进行优化。方法: 在分析单因素的基础上, 以一贯煎多糖得率为响应值, 采用 3 因素 3 水平的响应面法 (RSM) 对其提取工艺进行研究。结果: 最佳工艺参数为液固比 11:1, 85% 乙醇提取 2 次, 每次 1.8 h。结论: 响应面法可在连续范围内进行分析, 具有实验周期短、精密度高的优点。优化结果可为制剂生产提供参考依据。

[关键词] 一贯煎; 多糖; 响应面法; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0022-04

Optimization of Extraction Craft of Polysaccharides in Yiguanjian by Response Surface Method

WEI Xue-jun¹, LIN Xian-yan¹, FENG Guang-wei¹, LI Jiang²

(1. Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558003, China;

2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extract process of polysaccharides for Yiguanjian by using the response surface method. **Method:** Three factors of the three levels of the response surface method (RSM) extracting process were studied on the basis of single factor analysis and the response rate of polysaccharide in Yiguanjian. **Result:** The best parameters were as follows: the ratio of solvent to material was 11:1; ethanol concentration was 85%; the extraction time was 1.8 h and extracting for 2 times. **Conclusion:** Response surface method can be used in continuous range analysis with the advantages of short experimental cycle and high precision. The optimization results can provide reference basis for production.

[Key words] Yiguanjian; polysaccharide; response surface method; extracting craft

一贯煎具有滋养肝肾, 疏泄肝气的功效。方中生地黄、枸杞子、北沙参、当归、麦冬中都含有多糖。研究文献表明, 一贯煎多糖具有明显的保肝和免疫作用^[1-2], 预示良好的应用前景。为提高药材中多糖提取率, 本文利用响应面法^[3-4]对一贯煎多糖提取工艺进行研究, 以苯酚-硫酸法对多糖的含量进行测定, 以优化多糖提取工艺。为一贯煎制剂生产提取

多糖奠定实验基础。

1 仪器和试剂

TU1800S 型紫外分光光度仪 (北京普析通用仪器有限公司), Mettler AE 240 电子天平 (瑞士); 2. 0R 大容量低速离心机 (德国)。

葡萄糖对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号 110833-200302), 试剂均为分析纯, 药材样品均购自贵州省同济堂, 经贵阳中医学院李江教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 一贯煎多糖的提取和含量测定

2.1.1 提取方法 按一贯煎处方 (北沙参 10 g、麦冬 10 g、当归 10 g、生地黄 30 g、枸杞 12 g、川楝子 5

[收稿日期] 20100709(004)

[基金项目] 黔南民族医学高等专科学校科研基金项目 (QNYZ200902)

[第一作者] 魏学军, 副教授, 从事中药质量控制研究, Tel: 0854-13765799790, E-mail: qndywxj@163.com

g)称取药材 77 g,经石油醚回流脱脂 2 次,再用 80% 乙醇浸泡过夜,回流提取 2 次。合并提取液,以纱布过滤,放冷。离心 $5 \text{ min} (2 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1})$,分取上清液,加入乙醇至不同体积分数,沉淀,静置 24 h,倾去上清液,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤,于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压干燥,得一贯煎粗多糖。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥恒重的葡萄糖对照品 20.0 mg 至 100 mL 量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀后即得 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖溶液。精密量取该葡萄糖溶液 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ mL}$ 至 10 mL 量瓶中,加水至刻度,配成 $10, 20, 30, 40, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖溶液。精密量取各溶液 2 mL 置 25 mL 刻度试管中,加入 5% 苯酚溶液 1.00 mL ,摇匀,迅速滴加浓硫酸 5.00 mL ,加水至总体积 10 mL ,摇匀,静置 5 min ,置沸水浴中加热 15 min ,再置冷水浴中 10 min ,补充失去的水分至刻度。以 2 mL 蒸馏水同法操作作为空白对照,在 490 nm 处测定吸光度。以质量浓度(X)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 0.0046 + 16.45X (r = 0.9997)$ 。试验结果表明,多糖含量以葡萄糖计,在 $20.25 \sim 101.47 \text{ } \mu\text{g}$ 与吸光度呈良好线性。

2.1.3 多糖得率的测定 精密称取 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重的粗多糖 20.0 mg ,置 100 mL 量瓶中,以蒸馏水溶解并稀释至刻度。精密吸取供试品溶液 2 mL ,按 2.1.2 项下方法操作并测定吸光度,由二点法计算多糖含量。

2.2 影响多糖得率的单因素考察

2.2.1 液固比的确定 按一贯煎处方称取药材 77 g ,固定温度,在液固比分别为 $6:1, 8:1, 10:1, 12:1, 14:1$ 的条件下提取,测定多糖得率。结果随液固比的增加,多糖得率增长显著。当液固比在 $10:1$ 后,提取率缓慢升高后呈下降趋势,液固比 $10:1, 12:1$ 的提取率差异性不显著,见图 1。

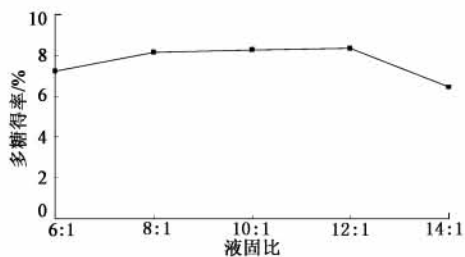


图 1 液固比对多糖得率的影响

考虑生产上缩短浓缩时间需要,故选择液固比在 $10:1$ 左右为宜。

2.2.2 乙醇体积分数的确定 按一贯煎处方称取药材 77 g ,液固比 $10:1$,固定温度下提取,用于沉淀的乙醇浓度分别为 $70\%, 75\%, 80\%, 85\%, 90\%$,测定多糖得率。结果随乙醇浓度的不断升高,多糖得率逐渐增加。在 85% 左右达到最高,以后呈下降趋势,故选择 85% 左右的醇沉浓度为宜,见图 2。

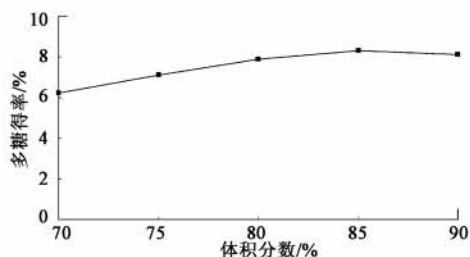


图 2 乙醇浓度对多糖得率的影响

2.2.3 提取时间的确定 按一贯煎处方药材 77 g ,在液固比 $10:1$,固定温度,醇沉浓度 85% 条件下,分别提取 $1, 2, 3, 4, 5 \text{ h}$,提取 1 次。测定多糖得率。结果提取时间超过 2 h ,多糖得率变化不大,超过 4 h 后,呈下降趋势,可能是长时间提取使部分多糖分解所致。故选择 2 h 左右,见图 3。

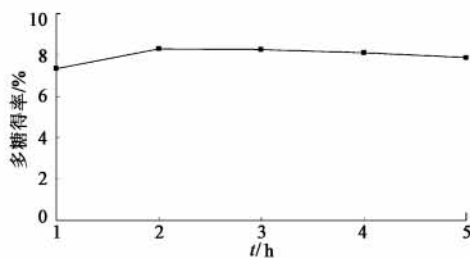


图 3 提取时间对多糖得率的影响

2.2.4 提取次数的确定 按一贯煎处方称取药材 77 g ,在液固比 $10:1$,固定温度,醇沉浓度 85% ,提取时间 2 h 条件下,连续提取 5 次。测定多糖得率。结果提取超过 2 次,多糖提取率呈直线下降,提取次数 5 时,多糖提取率几乎为零。从缩短生产周期、节约能源考虑,提取次数以 2 次为宜。见图 4。

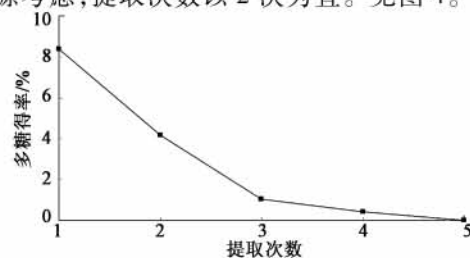


图 4 提取次数对多糖得率的影响

2.3 响应面法优化工艺

2.3.1 响应面法因素水平的选取 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,综合单因素实验影响结果,选取液固比、醇沉浓度、提取时间对一贯煎多糖提取率有显著影响的 3 个因素,在单因素实验基础上采用 3 因素 3 水平响应面方法,实验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面因素和水平

水平	X_1	X_2	X_3
	液固比	乙醇体积分数/%	提取时间/h
-1	8:1	80	1
0	10:1	85	2
+1	12:1	90	3

2.3.2 响应面法方案及结果 对液固比 Z_1 、提取温度 Z_2 和提取时间 Z_3 作变换如下: $X_1 = (Z_1 - 10)/2$, $X_2 = (Z_2 - 85)/5$, $X_3 = (Z_3 - 2)/1$ 。以 X_1, X_2, X_3 为自变量,以多糖提取率为响应值(Y),实验方案及试验结果见表 2。

表 2 响应面法方案及实验($\bar{x} \pm s, n = 12$)

No.	X_1	X_2	X_3	多糖得率 $Y/\%$
1	-1	0	-1	6.48
2	-1	0	1	7.65
3	1	0	-1	8.36
4	1	0	1	8.07
5	0	-1	-1	7.76
6	0	-1	1	7.44
7	0	1	-1	8.33
8	0	1	1	8.28
9	-1	-1	0	6.14
10	1	-1	0	6.12
11	-1	1	0	7.43
12	1	1	0	8.46
13	0	0	0	8.23
14	0	0	0	8.32
15	0	0	0	8.41

如表 2 所示,设计 15 个试验点,1~12 为析因试验,13~15 为中心试验,用以估计试验误差,经 SAS RSREG 回归,结果见表 3。

因子经过回归拟合,得回归方程为 $Y = 8.3433 + 0.6713X_1 - 0.0800X_2 - 0.3438X_3 - 0.5979X_1X_1 - 0.2150X_1X_2 - 0.5804X_2X_2 - 0.6325X_1X_3 - 0.3100X_2X_3 - 0.1792X_3X_3$ 。

回归方程中各变量对响应值影响的显著性用 F 检验判定, P 值(概率)越小,则响应变量的显著程度越高, $P < 0.01$ 时影响极显著, $P < 0.05$ 时影响显著。

表 3 回归分析

方差来源	DF	SS	MS	F	Pr > F
X_1	1	3.6046	3.6046	32.0415	0.0024
X_2	1	0.0512	0.0512	0.4551	0.5298
X_3	1	0.9453	0.9453	8.4029	0.0338
X_1X_1	1	1.3200	1.3200	11.7336	0.0187
X_1X_2	1	0.1849	0.1849	1.6436	0.2561
X_1X_3	1	1.6002	1.6002	14.2244	0.0130
X_2X_2	1	1.2439	1.2439	11.0569	0.0209
X_2X_3	1	0.3844	0.3844	3.4169	0.1238
X_3X_3	1	0.0012	0.0012	0.0105	0.9222
回归	9	9.1679	1.0187	9.0548	0.0129
一次项	3	2.8270	0.9420	1.4600	0.2793
二次项	3	2.5360	0.8450	1.2600	0.3365
交互项	3	3.6850	1.2280	2.1600	0.1503
残差	5	0.5600	0.1100		

由表 3 的分析结果可以看出,模型回归 P 为 0.0129,说明模型回归显著可靠。液固比 X_1 对一贯煎多糖得率影响极显著($P < 0.01$);提取时间 X_3 、液固比 X_1 的平方项、乙醇浓度 X_2 的平方项、 X_1X_3 的交互项影响显著($P < 0.05$)。模型的回归系数 $R^2 = 0.9422$,说明模型响应值(一贯煎多糖得率)的变化 94.22% 来自所选因变量,即液固比、提取温度、提取时间的值。利用回归方程确定最佳提取工艺条件。对回归方程取一阶偏导数等于零,整理得到如下 3 式:

$$0.6713 - 1.1958X_1 + 0.2150X_2 + 0.6325X_3 = 0 \quad (1)$$

$$0.0800 - 0.2150X_1 + 1.1608X_2 - 0.3100X_3 = 0 \quad (2)$$

$$0.3438 - 0.6325X_1 - 0.3100X_2 + 0.3584X_3 = 0 \quad (3)$$

式(1),(2),(3)联立方程解得, $X_1 = 0.4512$, $X_2 = -0.0377$, $X_3 = -0.1956$ 。代入前述变换公式解得 $Z_1 = 10.90$, $Z_2 = 84.81$, $Z_3 = 1.80$ 。将所得值修正一贯煎多糖提取工艺最佳工艺条件为液固比 11:1,乙醇体积分数 85%,提取 1.8 h,提取 2 次。由回归方程解得一贯煎多糖提取率理论值可达 8.46%。

2.3.3 响应面法分析 利用 Design Expert 7.0 软件,通过多元回归方程作出响应面图和等值线图,见图 5~7。

图 5 为提取时间为 1 h 的情况下,液固比、乙醇体积分数对多糖得率的影响。由图 5 可知,液固比的影响较乙醇体积分数的影响更为显著。这主要是与一贯煎中多糖含量较少有关,液固比大,有利于多糖的提取。对应了回归分析的结果(X_1 的 $P < 0.01$)。

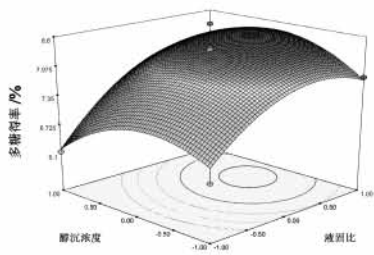


图5 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面和等高线

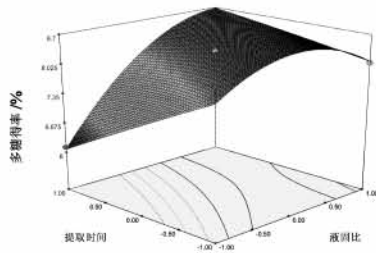


图6 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面和等高线

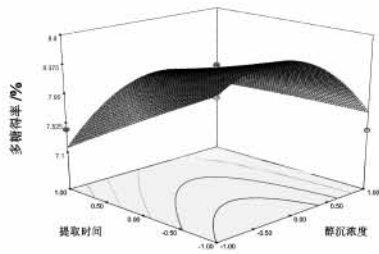


图7 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面和等高线

图6为85%乙醇的情况下,液固比、提取时间对多糖得率的影响。从图中可知,提取时间与液固比的交互作用对多糖得率的影响显著,因此曲面较陡,而液固比的影响较提取时间更为显著。这与时间过长,多糖易分解有关。对应了回归分析的结果(X_1X_3 的 $P < 0.05$)。

图7为液固比为10:1的情况下,乙醇体积分数、提取时间对多糖得率的影响。从图中可知,提取时间与乙醇体积分数的交互作用对多糖得率的影响不

显著,因此曲面平坦。对应了回归分析的结果(X_2X_3 的 $P > 0.05$)。

2.3.4 验证试验 在响应面法求得的最佳条件下,对一贯煎多糖进行5次平行提取试验,结果平均得率8.31%,实际测得率与理论得率相对误差为1.77%,RSD 1.46%。

3 结论

响应面法(RSM)是采用多元二次回归方法作为函数估计的工具,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法。它与过去广泛使用的正交实验设计法相比,具有实验周期短、精密度高,能对多种因素间的交互作用进行研究。

在单因素实验的基础上,通过设计3因素3水平响应面法实验,最终确定一贯煎多糖提取的最佳工艺参数为液固比11:1,85%醇沉,提取1.8h,提取2次。实际测得率与理论得率相对误差为1.77%,RSD 1.46%,说明此工艺是科学的、合理的。

[参考文献]

- [1] 陈永祥,王和生,靳风云,等. 一贯煎多糖对小鼠肝损伤及SOD, LPO的影响[J]. 中国药学杂志,1999(4):239.
- [2] 石林阶. 一贯煎的临床应用及药理研究进展[J]. 云南中医杂志,1993,14(2):44.
- [3] 凌静娜,陈定玲,金礼国,等. 响应面法优化超声提取八角茴香油工艺[J]. 浙江科技学院学报,2009,21(2):110.
- [4] 刘军海,任惠兰,李风风,等. 响应面分析法优化枸杞多糖提取工艺条件[J]. 时珍国医国药,2008,19(4):935.

[责任编辑 仝燕]