

· 中药工业 ·

响应面法优化柴胡多糖提取工艺[△]

邓寒霜*, 杨丽娜

(商洛学院 生物医药与食品工程学院, 陕西 商洛 726000)

[摘要] **目的:** 优化柴胡多糖提取工艺。**方法:** 采用苯酚-硫酸显色, 紫外可见分光光度法(UV)在490 nm波长处测定柴胡多糖的吸光度, 计算多糖提取率并以此为评价指标, 在单因素试验的基础之上, 选取提取温度、水料比、提取时间为考察因素, 利用 Box-Behnken 方法进行三因素三水平试验设计。**结果:** 优选出柴胡多糖的最佳提取工艺参数为提取温度 95 ℃、水料比 45:1、提取时间 1.5 h, 在上述条件下重复提取 2 次; 得多糖提取率与各试验变量间的回归方程为 $Y = 18.99 + 1.20A + 0.39B + 0.072C - 0.16AB - 0.22AC - 0.20BC - 1.22A^2 - 0.35B^2 - 0.14C^2$, $r = 0.9836$ 。**结论:** 经验证在优选条件下柴胡多糖提取率为 19.16%, 与预测值 19.39% 相近, 说明采用该工艺条件提取柴胡多糖效果较好, 试验所得回归方程可准确预测结果。

[关键词] 柴胡多糖; 提取率; 苯酚-硫酸法; 响应面分析法

Optimization of Polysaccharide Extraction from *Bupleuri Radix* Using Response Surface Methodology

DENG Han-shuang*, YANG Li-na

(College of Biopharmaceutical and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo 726000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction technology of *Bupleurum* polysaccharide. **Methods:** *Bupleurum* polysaccharide was determined by UV and phenol-sulfuric acid method at 490 nm, the extraction rate of *Bupleurum* polysaccharide was calculated. On the basis of single-factor experiments, choosing extraction temperature, water to material ratio and extraction time as independent variable, the extraction process of *Bupleurum* polysaccharide was optimized by using response surface methodology with three factors and three levels. **Results:** The optimum extraction parameters of *Bupleurum* polysaccharides were as follows: 95 ℃ of the extraction temperature, 45:1 of water to material ratio, 1.5 h of extraction time. The regression equation between the extraction rate of polysaccharides and the experimental variables was $Y = 18.99 + 1.20A + 0.39B + 0.072C - 0.16AB - 0.22AC - 0.20BC - 1.22A^2 - 0.35B^2 - 0.14C^2$, $r = 0.9836$. **Conclusion:** Under the optimum conditions, the extraction rate of *Bupleurum* polysaccharide was 19.16%, which was similar to the predicted value of 19.39%. The results showed that the extraction process of *Bupleurum* polysaccharide was better, and the regression equation could predict the result accurately.

[Keywords] *Bupleurum* polysaccharide; extraction rate; phenol sulfuric acid method; response surface methodology
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171215006

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonifolium* Willd. 的干燥根。味辛、苦, 性微寒。具有解热止痛、疏肝解郁, 以及升举脾胃清阳之气的作用^[1]。《中华人民共和国药典》以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 为指标性成分, 但柴胡皂苷并不能全面反映柴胡的药理作用。研究证明, 柴胡中所含的多糖类成分具有抗辐射、降血脂、增强免疫力等活性, 可用于治疗肝炎、肾炎、

红斑狼疮、类风湿关节炎等疾病^[2]。本文在单因素试验基础上, 采用响应面法对柴胡多糖的水提醇沉法方法进行了优化, 希望能为进一步研究柴胡中多糖类成分, 扩大柴胡药用范围提供一定的帮助。

1 材料与仪器

1.1 材料

柴胡购自商洛市药材市场, 经商洛学院张小斌

[△] [基金项目] 陕西欧珂药业有限公司专项资助科研项目(2016HXKY011)

* [通信作者] 邓寒霜, 讲师, 研究方向: 中药材质量控制研究; E-mail: dhsf1@foxmail.com

教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。苯酚(天津科密欧化学试剂开发中心)、浓硫酸(西安化学试剂厂)、三氯甲烷(西安化学试剂厂)、正丁醇(西安化学试剂厂)、95%乙醇(西安化学试剂厂); D-无水葡萄糖对照品(上海金穗生物科技有限公司)。

1.2 仪器

紫外-可见分光光度计(岛津 UV-PC2800S); 电子天平(丹佛 S-144); 旋转蒸发器(陕西爱信 EYE-LA-N-1100)等。

2 方法

2.1 样品的制备

将柴胡干燥后粉碎, 过 60 目筛, 备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取无水葡萄糖对照品 100 mg 放置于 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度线处, 摇匀, 既得浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液。分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL 放置于 10 mL 容量瓶中, 分别加水补至 10 mL 容量瓶刻度线处, 摇匀。

2.3 标准曲线的制备

精确称取 3 g 苯酚(重精馏), 放置于 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度线处, 摇匀, 即得浓度为 6% 的苯酚溶液。用 1 mL 移液管分别吸取 2.2 项下不同浓度的葡萄糖对照品溶液各 1 mL 置于具塞比色管中, 加入 1 mL 的 6% 苯酚溶液, 并迅速加入 5 mL 浓硫酸, 静置 10 min, 放在 30 °C 的水浴锅中 30 min。以水作为空白对照, 在 490 nm 处测定吸光度 $A^{[3]}$ 。以对照品浓度为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 得到回归方程 $Y=0.7431X+0.0016$, $r=0.9994$ 。试验结果表明浓度在 $0.0 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内曲线线性良好。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取 2.0 g 柴胡粉末放进圆底烧瓶中, 加入 25 倍量的 95% 乙醇, 在微沸条件下回流 2 h 进行脱脂, 减压回收乙醇。在一定温度下, 向滤渣内加入一定量的水进行回流, 每提取 10 min 搅拌 1 min 中, 提取一段时间后, 趁热抽滤, 反复抽提数次, 合并滤液, 将滤液浓缩为水料比 1:1 倍量的溶液。待溶液冷却后, 快速搅拌溶液并缓慢地向溶液中加入

95% 乙醇, 使溶液含醇量达 90%, 密闭静置 24 h。将溶液放置在离心机中进行离心 ($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 弃去上清液, 得柴胡粗多糖。用 20 mL 的蒸馏水将粗多糖沉淀全部溶解, 再向溶液里加入等量的 Sevage 试剂, 剧烈振摇 30 min, 离心(同上)。吸取上清液, 加入上清液体积 1/4 的 Sevage 试剂, 振摇 30 min 后离心(同上), 反复操作数次, 直至将变性蛋白层除完, 即得柴胡多糖溶液。用移液管吸取 1 mL 柴胡多糖溶液, 置于 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度线处, 既得柴胡多糖供试品溶液^[4-8]。按式(1)计算多糖提取率(%):

$$\text{提取率}(\%) = (\text{多糖浓度} \times \text{稀释因子} \times \text{滤液体积}) / \text{原料干重} \times 100\% \quad (1)$$

2.5 方法学试验

2.5.1 精密度试验 对葡萄糖对照品溶液进行 5 次平行测定, 计算吸光度 A 的 RSD 值为 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 对同一组供试品溶液分别在密闭冷藏 1、3、5、7、9、11 后测定吸光度 A , 计算 RSD 值为 0.9%, 表明供试液在 11 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 按 2.4 项下的方法在相同条件下制备 5 份柴胡多糖供试液, 测定吸光度 A , 计算 RSD 值为 1.2%, 表明试验重复性良好。

2.5.4 加样回收率试验 精密称取已知含量(19.16%)的柴胡样品粉末 6 份, 每份 2.0 g, 分别精密加入无水葡萄糖对照品 10.0 mg, 按 2.4 项下方法制备供试品溶液, 测定吸光度, 计算柴胡多糖的回收率为 97.9%、RSD 值为 2.7%。

2.6 技术路线

本文在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken Design 方法的设计原理, 以多糖提取率为响应值, 以单因素试验所得最适值为中心点, 采用 Design-Expert 8.05 进行响应面法进行优化, 确定柴胡多糖的最佳工艺条件。技术路线如图 1 所示。

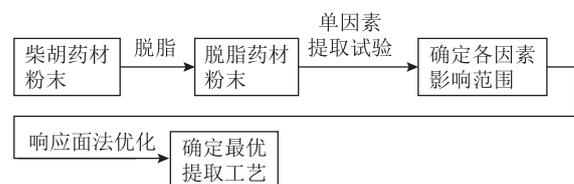


图 1 柴胡多糖提取工艺优化技术路线

3 结果与分析

3.1 单因素试验

3.1.1 提取温度 精密称取柴胡粉末 2.0 g, 加入 95% 乙醇在 80 °C 的条件下回流 2 h, 弃去乙醇。滤渣加入水料比 10:1 量的蒸馏水, 分别在 60、70、80、90、100 °C 下回流提取, 每提取 10 min 搅拌 1 min, 0.5 h 后趁热抽滤, 浓缩溶液, 加入 Sevage 试剂, 除尽蛋白, 在紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度 A, 计算柴胡多糖提取率。

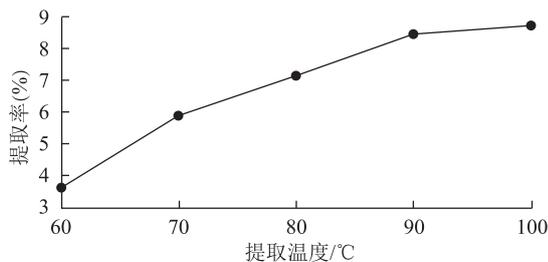


图2 提取温度对柴胡多糖提取率的影响

从图2上可以看出随着提取温度的升高, 柴胡多糖的提取率也一直在升高, 在90 °C的时候提取率增长开始变缓慢。造成这种变化的原因可能是高温下多糖类成分会变得不稳定, 长时间在高温下提取, 反而可能引起多糖提取下降, 所以确定最优提取温度为90 °C。

3.1.2 水料比 精密称取柴胡粉末 2.0 g, 加入 95% 乙醇在 80 °C 的条件下回流 2 h, 弃去乙醇。滤渣分别加入水料比 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 量的蒸馏水, 在 90 °C 下回流提取, 每提取 10 min 搅拌 1 min, 0.5 h 后趁热抽滤, 浓缩溶液, 加入 Sevage 试剂, 除尽蛋白, 在紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度 A, 计算柴胡多糖提取率。

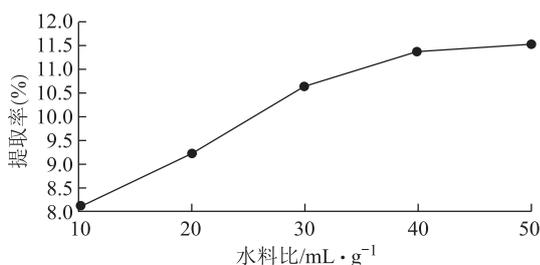


图3 水料比对柴胡多糖提取率的影响

从图3上可以看出随着水料比的升高, 提取率也一直在升高, 在水料比为30:1的时候提取率增长开始变缓慢。分析造成这种变化的原因可能是越多

的溶剂越有利于多糖成分的溶出, 但当溶剂量达到一定水平后, 多糖成分已经充分溶出, 再增加提取溶剂无助于增加多糖提取率, 所以确定最优水料比为30:1。

3.1.3 提取时间 精密称取柴胡粉末 2.0 g, 加入 95% 乙醇在 80 °C 的条件下回流 2 h, 弃去乙醇。滤渣加入水料比 30:1 量的蒸馏水, 在 90 °C 下回流提取, 每提取 10 min 搅拌 1 min, 分别在 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 后趁热抽滤, 浓缩溶液, 加入 Sevage 试剂, 除尽蛋白, 在紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度 A, 计算柴胡多糖提取率。

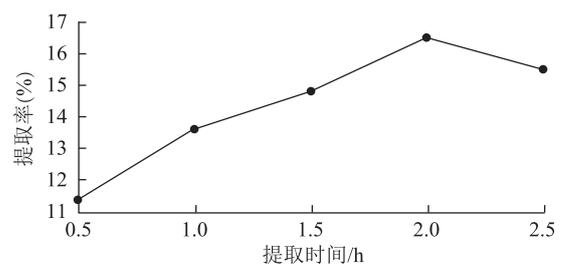


图4 提取时间对柴胡多糖提取率的影响

从图4上可以看出随着提取时间的升高, 提取率也一直在升高, 在2.0 h的时候提取率最高, 超过2.0 h后提取率开始降低。分析造成这种变化的原因可能是随着提取时间的增加, 多糖成分可以更加充分的溶出, 但当时间超过2.0 h, 在一定温度下过长的提取时间导致多糖类成分被破坏, 所以确定最优提取时间为2.0 h。

3.1.4 提取次数 精密称取柴胡粉末 2.0 g, 加入 95% 乙醇在 80 °C 的条件下回流 2 h, 弃去乙醇。滤渣加入水料比 30:1 量的蒸馏水, 在 90 °C 下回流提取, 每 10 min 搅拌 1 min, 2.0 h 后分别重复浸提 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次, 浓缩溶液, 加入 Sevage 试剂, 除尽蛋白, 在紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度 A, 计算柴胡多糖提取率。

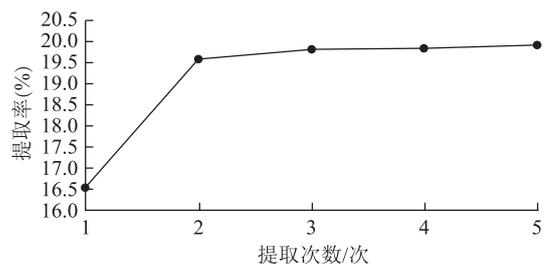


图5 提取次数对柴胡多糖提取率的影响

从图5可以看出提取2次之后, 提取率变化不

大。考虑到实际应用中要注意溶剂用量和浓缩滤液的问题,所以确定最优提取次数为2次。

3.2 响应面试验

3.2.1 试验设计 根据单因素试验结果,2次提取后,柴胡中大部分多糖成分已充分溶出。因此,在进行响应面试验时将提取次数固定为2次,不再进行考察,以柴胡多糖提取率为响应值,选取提取温度、水料比、提取时间三个影响因素进行三因素三水平的试验,因素水平设计见表3^[9-14]。

表3 响应面试验的因素水平

水平	因素		
	A 提取温度/℃	B 水料比	C 提取时间/h
-1	80	30:1	1.5
0	90	40:1	2.0
1	100	50:1	2.5

运用 Design-Expert. 8.05 软件,进行响应曲面法设计优化试验的方案,得到17组试验方案,具体结果见表4。

表4 试验方案和结果

编号	A 提取温度/℃	B 水料比	C 提取时间/h	提取率(%)
1	90	40:1	2.0	18.95
2	80	40:1	2.5	16.95
3	90	40:1	2.0	19.02
4	100	40:1	1.5	18.75
5	100	50:1	2.0	19.25
6	100	40:1	2.5	18.41
7	100	30:1	2.0	18.49
8	80	50:1	2.0	16.69
9	80	40:1	1.5	16.42
10	90	30:1	2.5	18.56
11	90	40:1	2.0	18.97
12	80	30:1	2.0	15.27
13	90	50:1	1.5	18.85
14	90	40:1	2.0	18.98
15	90	50:1	2.5	18.64
16	90	30:1	1.5	17.96
17	90	40:1	2.0	19.01

3.2.2 试验结果分析 利用响应面软件处理数据可

得方差分析结果(具体结果见表5),以及试验变量与响应值间的回归方程 $Y = 18.99 + 1.20A + 0.39B + 0.072C - 0.16AB - 0.22AC - 0.20BC - 1.22A^2 - 0.35B^2 - 0.14C^2$ 。所得模型对响应值影响极显著 ($P < 0.01$),具有较高的可信度;相关系数 $r = 0.9836$,校正系数 $R^2 \text{Adj} = 0.9254$,说明该模型能解释92.54%的响应变化,即模型与实际情况拟合较好。三个因素中提取温度对响应值具有极显著影响,对试验结果的影响最大,其次为水料比,影响最小的是提取时间。

表5 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	20.34	9	2.26	23.04	0.0002	**
A	11.45	1	11.45	116.76	<0.0001	**
B	1.24	1	1.24	12.64	0.0093	**
C	0.042	1	0.042	0.43	0.5335	
AB	0.11	1	0.11	0.11	0.3269	
AC	0.19	1	0.19	1.93	0.2074	
BC	0.16	1	0.16	1.67	0.2369	
A ²	6.22	1	6.22	63.45	<0.0001	**
B ²	0.5	1	0.50	5.13	0.580	
C ²	0.080	1	0.080	0.82	0.3959	
残差	0.69	7	0.098			
失拟误差	3.32×10^{-3}	4	8.30×10^{-4}			
总和	21.02	16				

注: *. $P < 0.05$ 为显著; **. $P < 0.01$ 为极显著。

响应面法可以比较直观的反应出各个试验因素对试验结果影响的大小以及各试验因素之间的关系,具体见图6~8。

由图6~8可以看出,提取温度与水料比、提取温度与提取时间、水料比与提取时间的交互作用对提取率具有显著性影响。分析图6、图7可知,温度曲线的变化比水料比、时间曲线剧烈,说明温度因素对试验的影响大于其它两因素;分析图8可知,水料比曲线的变化比时间曲线剧烈,表明水料比因素对试验的影响大于时间因素。结果与由表5所得结论相符。

利用响应面软件中的 Numerical 选项卡对回归方程式2进行偏导数分析,可知柴胡多糖的最佳提取工艺为提取温度95.02℃、水料比46.27:1、提取时间1.7h,预测最大提取率为19.39%。

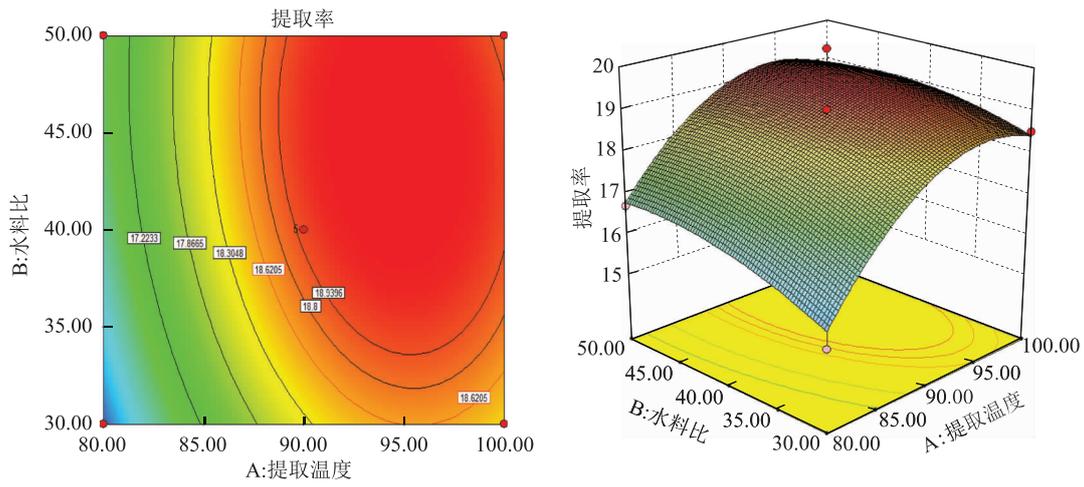


图6 提取温度与水料比交互作用的等高线与响应面

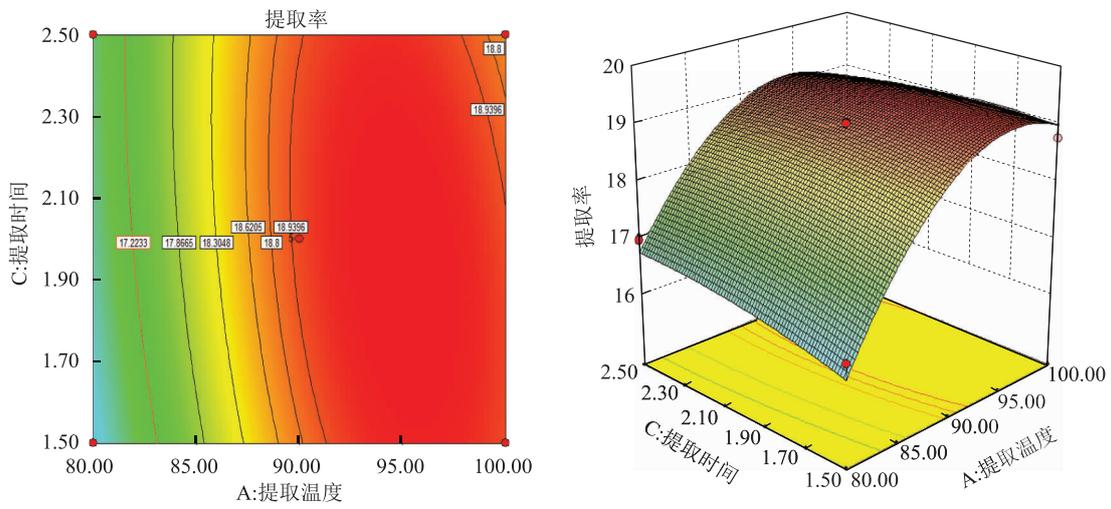


图7 提取温度与提取时间交互作用的等高线与响应面

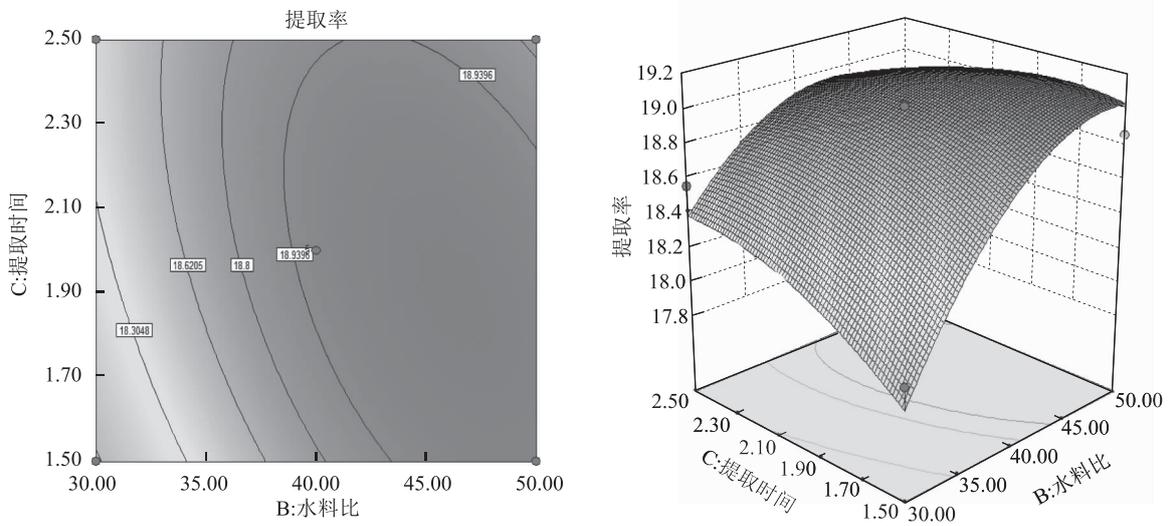


图8 水料比与提取时间交互作用的等高线与响应面

为便于操作,对上述提取工艺稍作调整,进行验证试验。在固定提取次数为2次的基础上,设定提取温度为95℃、水料比为45:1,提取时间为1.5h,进行3组平行试验,得到平均提取率为19.16%,与理论值19.39%相近,说明该模型可以很好的预测试验的实际表达情况。

4 结论与展望

本文在单因素试验基础上结合响应面法,重点研究了提取时间、水料比、提取温度三个因素对柴胡多糖提取率的影响。经优化后提到柴胡多糖的最佳提取工艺参数为:提取温度为95℃、水料比为45:1、提取时间为1.5h,重复提取2次。

植物多糖因其具有多种生理活性,近年来成为植物成分提取方面研究的热点。但因植物多糖中含有较多脂质、蛋白质、色素、盐类等其它物质^[15],对其分离纯化工艺要求较高。在今后的研究中,我们将对柴胡多糖的纯化工艺做进一步研究,以期柴胡多糖的开发利用奠定一定的基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2015:280-281.
- [2] 叶方,杨光义,王刚,等. 柴胡多糖的研究进展[J]. 医药导报,2012,31(8):1042-1045.
- [3] 关皎,朱鹤云,刘洋,等. 紫外分光光度法测定柴胡中多

糖含量[J]. 吉林医学院学报,2016,37(6):413-415.

- [4] 杜柯. 柴胡多糖的结构分析和抗氧化活性的研究[D]. 西安:陕西师范大学,2011.
- [5] 赵香妍,刘长利. 中药柴胡的研究概况与发展趋势[J]. 时珍国医国药,2015,26(4):963-966.
- [6] 潘莹. 冬枣多糖水提醇沉工艺研究[J]. 食品工业,2015,36(1):124-125.
- [7] 陈丽叶,网林冲,吴皓,等. 正交试验优化文蛤水溶性多糖的水提醇沉工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):241-242.
- [8] 李小宁,于欢,龚千锋,等. 柴胡总多糖提取工艺优化及其不同炮制品中总多糖的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):27-31.
- [9] 黄新仁. 响应面法在生物过程优化中的应用[D]. 长沙:湖南大学,2011.
- [10] 王明艳,张小杰,王涛,等. 响应面法优化香椿叶多糖的提取条件[J]. 食品科学,2010,31(4):106-108.
- [11] 陈炼红,杨丽珠,索化夷,等. 响应面法优化松茸多糖酶法提取工艺及其体外抗氧化分析[J]. 食品科学,2014,35(16):23-25.
- [12] 杨玉娜. 响应面法优化β-环糊精微球固化香精工艺的研究[D]. 西安:陕西科技大学,2013.
- [13] 张艳,李永哲. 响应面法及其在药学领域中的应用[J]. 吉林化工学院学报,2012,29(7):20-24.
- [14] 侯学敏,李林霞,张直峰,等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学,2013,34(06):26-37.
- [15] 邓寒霜. 穿山龙多糖提取、纯化工艺及其体外抗氧化活性研究[D]. 西安:西北大学,2015.

(收稿日期 2017-12-15)

(上接第741页)

- [5] 张健,赵自刚,牛春雨,等. 夏至草醇提物对急性微循环障碍大鼠血液流变性异常的干预作用[J]. 中国血液流变学杂志,2008,18(4):461-464.
- [6] 晁怀宇,万向军,马文波,等. 夏至草醇提物对急性微循环障碍大鼠器官损伤的干预作用[J]. 微循环学杂志,2008,18(2):19-21.
- [7] 张静,庞道然,黄正,等. 夏至草的黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(16):3224-3228.
- [8] 刘海鸥,虎春艳,赵声兰,等. 滇黄芩总黄酮酶解超声提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国酿造,2016,35(1):110-114.
- [9] 吕丹,王海波,邸学,等. 桑叶药材中总黄酮含量的测

定[J]. 中国药房,2016,27(6):844-845.

- [10] 王飞,樊金拴,冯慧英,等. 青扞针叶总黄酮超声提取及抗氧化活性[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):243-249.
- [11] 张黎明,李瑞超,郝利民,等. 响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2014,30(4):233-239.
- [12] 林建原,季丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. 中国食品学报,2013,13(2):83-90.
- [13] 侯学敏,李林霞,张直峰,等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学,2013,34(6):124-128.

(收稿日期 2017-11-12)