

响应面法优化百部多糖提取条件研究

王明艳, 杨 凡, 李 燕, 马卫兴
(淮海工学院化学工程学院, 江苏 连云港 222005)

摘 要: 在百部多糖提取体系中, 利用响应面分析法(response surface methodology)对在单因素试验基础上选取的提取温度、液料比、提取时间三个主要因素, 以百部多糖得率为响应值, 对其工艺进行了优化。得出百部多糖水提取的最佳工艺条件为: 提取温度 83℃, 液料比 33:1(V/m), 提取时间 200min, 百部多糖的实际提取率为 3.74%, 比单因素试验最高提取率高出 11.31%。

关键词: 百部多糖; 提取; 响应面分析

Optimization of Extraction Technology of *Radix stemonae* Polysaccharides by Response Surface Methodology

WANG Ming-yan, YANG Fan, LI Yan, MA Wei-xing
(School of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: On the basis of single-factor tests, extraction temperature, ratio of hot water to crushed raw material, extraction time affecting extraction rate of *Radix stemonae* polysaccharides (RSP) were optimized using response surface methodology (RSM). The results showed that the optimum temperature, ratio of liquid to solid, time of RSP extraction are 83 °C, 33:1 and 200 min, respectively. Under these conditions, the extraction rate of RSP is up to 3.74%, which is higher 11.31% than the highest one in single-factor tests.

Key words: *Radix stemonae* polysaccharides (RSP); extraction; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)06-0080-04

百部又称为嗽药、百条根、野天门冬、百奶、九丛根、九虫根、一窝虎、九十九条根、山百根、牛虱鬼^[1]。为百部科植物蔓生百部、直立百部或对叶百部等的块根, 味先甜而后苦, 是我国传统的中药。药理作用和临床研究表明, 百部内服能润肺止咳、治风寒咳嗽、百日咳、肺结核、老年咳喘, 外用可灭虱杀虫, 具止痒作用^[2]。百部多糖(PRS)是从百部中提取的一种多糖, 是百部中重要的活性成分之一。目前, 多糖的提取多采用热水提取工艺, 但对提取工艺中的各项参数对提取效果的影响的报道相对较少。本实验选择江苏产直立百部为原料, 研究热水提取过程中料液比、提取温度、提取时间和提取次数对百部多糖提取率的影响。在此基础上, 利用响应面分析法对其提取工艺参数进行优化, 得出百部多糖水提法的最佳工艺条件, 为百部资源的开发利用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

直立百部(*Radix stemonae*)产于江苏。

无水乙醇、盐酸、浓硫酸、苯酚和葡萄糖等均为分析纯。

1.2 仪器

UV-722S 分光光度计、电子天平、旋转蒸发仪、SHZ-CD 型循环水式真空泵、800B- 离心机、DF-1 型集热式磁力搅拌器。

1.3 方法

1.3.1 百部多糖的提取工艺

工艺流程: 百部→清洗→粉碎→除蛋白→热水提取→离心→上清液→浓缩→醇析→过滤→洗涤→粗多糖。

操作要点: 将百部在 50℃ 恒温烘干至恒重, 粉碎, 过 0.55mm 筛, 采用 Sevage 法反复脱蛋白三次, 称取百部粉末 3g, 热水回流提取, 收集提取液离心分离, 上清液浓缩至约 80ml, 加入约 3 倍体积的乙醇进行醇沉,

收稿日期: 2008-04-21

基金项目: 江苏省教育厅海洋重点实验室基金资助项目(2007HS009); 淮海工学院化工系自然科学基金项目(2008HG XK001)

作者简介: 王明艳(1974-), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为生物活性物质提取和电分析化学。

E-mail: mingyanlyg@hotmail.com

放置过夜后, 过滤, 沉淀分别用乙醇、丙酮反复洗涤, 将其冷冻干燥, 得粗百部多糖。

1.3.2 百部多糖含量及其提取率测定^[3-4]

采用苯酚-硫酸法以葡萄糖为标准品制作标准曲线, 得回归方程为: $Y = 51.0860X + 0.1282$, $R^2 = 0.9991$ 。

采用 DNS 法测定还原糖含量, 制作标准曲线, 得回归方程为: $Y = 11.2904X + 0.0584$, $R^2 = 0.9994$ 。

多糖含量及提取率分别按照下式计算: 多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量; 多糖提取率 = (多糖干品质量 / 原料质量) × 100%。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

影响百部多糖提取率的因素有很多, 其中提取温度、提取时间、液料比三个因素影响显著。本研究在进行响应面分析前, 先通过单因素试验确定试验因素与水平。

2.1.1 提取温度对多糖提取率的影响

固定多糖的提取液料比(V/m)为 30:1, 提取时间为 3h, 以提取温度对多糖提取率做单因素试验。设计提取温度为 40、50、60、70、80、90、100℃, 结果见图 1。

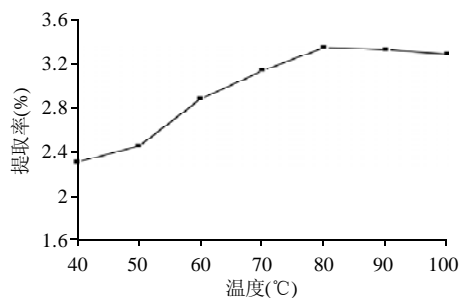


图1 不同提取温度对百部多糖提取率的影响

Fig.1 Effects of extraction temperature on RSP extraction rate

由图 1 可知, 随着温度升高, 在 40~80℃之间, 多糖提取率增加显著, 但在 85℃之后, 多糖提取率有下降趋势。其原因可能与多糖本身的稳定性有关, 本实验中 3h 的高温提取可能会导致多糖的分解, 从而引起多糖提取率的下降。单因素试验的结果显示, 提取温度应在 80~90℃之间。

2.1.2 液料比对多糖提取率的影响

固定多糖提取温度为 80℃, 提取时间为 3h, 以液料比对多糖提取率做单因素试验。设计液料比为 5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1, 结果见图 2。

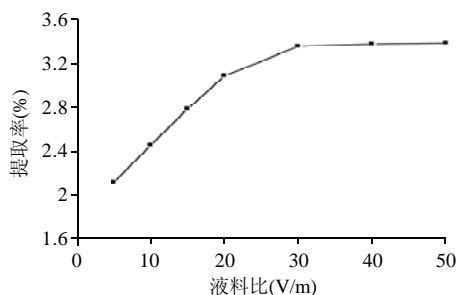


图2 不同料液比对百部多糖提取率的影响

Fig.2 Effects of ratio of hot water to crush raw material on RSP extraction rate

由图 2 可知, 液料比的增大对提高多糖提取率的效果较为明显, 在 5:1~30:1 之间, 多糖提取率几乎直线上升, 而在 30:1~50:1 之间多糖提取率没有明显变化。百部多糖需要吸收较多水分, 才能充分溶胀, 有利于多糖的溶出。但当液料比达到 30:1 时, 多糖溶出至饱和, 所以再增加溶剂比例后, 多糖提取率没有明显变化。单因素试验结果表明, 液料比应在 30:1~40:1 之间。

2.1.3 提取时间对多糖提取率的影响

固定多糖的液料比为 30:1, 提取温度为 80℃, 以提取时间对多糖提取率做单因素试验。设计提取时间为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4h, 结果见图 3。

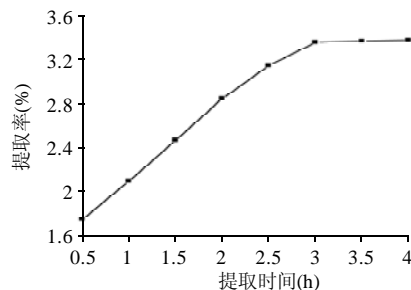


图3 不同提取时间对百部多糖提取率的影响

Fig.3 Effects of extraction time on RSP extraction rate

由图 3 可知, 在液料比为 30:1, 提取温度为 80℃的条件下, 随提取时间的延长, 多糖提取率不断增加, 在提取 3h 内前期提取率的增加非常明显, 后期趋于平缓。因此, 提取时间选择在 2.5~3.5h 之间。

2.2 采用响应面法优化百部多糖提取工艺

2.2.1 多糖提取试验方案和因素水平

表 1 百部多糖提取响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of central composite design test on RSP extraction conditions

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 温度(℃)	70	80	90
X ₂ 液料比(ml/g)	20:1	30:1	40:1
X ₃ 提取时间(h)	2.5	3	3.5

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 综合单因素试验所得结果, 选取提取温度、提取时间、液料比三个因素, 采用三因素三水平的响应面分析方法^[5], 因素水平设计表见表 1。

2.2.2 响应面分析方案及结果

对百部多糖提取工艺进行响应面分析, 其具体试验方案见表 2。

表 2 百部多糖提取响应面分析方案及结果

Table 2 Design scheme and results of central composite test on RSP extraction conditions

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	多糖提取率(%)
1	-1	-1	0	1.74
2	-1	1	0	2.56
3	1	-1	0	2.19
4	1	1	0	2.53
5	0	-1	-1	1.37
6	0	-1	1	1.97
7	0	1	-1	2.03
8	0	1	1	3.12
9	-1	0	-1	1.67
10	1	0	-1	2.59
11	-1	0	1	2.98
12	1	0	1	3.56
13	0	0	0	3.35
14	0	0	0	3.37
15	0	0	0	3.36

各因素经回归拟合后, 解得回归方程为:

$$Y = 3.3600 + 0.240X_1 + 0.3713X_2 + 0.4963X_3 - 0.2638X_1^2 - 0.1200X_1X_2 - 0.0850X_1X_3 - 0.8413X_2^2 + 0.1225X_2X_3 - 0.3963X_3^2$$

式中, Y 为多糖得率(%), X₁ 为提取温度(°C), X₂ 为液料比(ml/g), X₃ 为提取时间(h)。

表 3 百部多糖提取参数数学回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis of RSP extraction conditions

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F
X ₁	1	0.4608	0.4608	9.51	0.0274
X ₂	1	1.1026	1.1026	22.79	0.0050
X ₃	1	1.9701	1.9701	40.65	0.0014
X ₁ ²	1	0.1148	0.1148	2.37	0.1844
X ₁ X ₂	1	0.0576	0.0576	1.19	0.3254
X ₁ X ₃	1	0.0289	0.0289	0.60	0.4749
X ₂ ²	1	2.4416	2.4416	50.38	0.0009
X ₂ X ₃	1	0.0600	0.0600	1.24	0.3164
X ₃ ²	1	0.5797	0.5797	11.96	0.0181
模型	9	6.8162	0.7574	15.63	0.0037
线性	3	3.5335	1.1778	24.32	0.0113
平方	3	3.1316	1.0454	21.57	0.0630
交互	3	0.1465	0.0488	1.01	0.3722
残差	5	0.2403	0.04806		
纯误差	2	0.0002	0.0001		
总离差	14	7.0585			

当“Prob>F”值小于 0.05 即表示该项指标显著, 从表 3 的分析结果来看, 整体模型的“Prob>F”值小于 0.01, 表明该模拟二次方程高度显著, 说明这种实验方法是可靠的, 使用该方程模拟真实的三因素三水平的分析是可行的。由表 3 的 p 值可以知道, 在所选的各因素水平范围内, 对结果的影响排序为: 提取时间>液料比>提取温度。其中, X₂、X₃ 和 X₂² 对 Y 的影响非常显著, X₁ 和 X₃² 对 Y 的影响显著。可见, 试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系, 二次项对响应值也有很大的影响, 交互项作用的影响较小。这与模拟回归中线性和平方项影响显著相对应。

图 4~9 直观地反映了各因子交互作用的响应面的 3D 和等值线分析图。比较两组图响应面最高点和等值线可知, 在所选范围内存在极值, 即响应面最高点, 同时也是等值线最小椭圆的中心点。

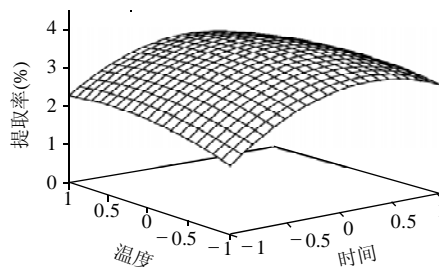


图 4 提取温度和时间对多糖得率影响的响应面图

Fig.4 Response surface plot for effects of extraction temperature and extraction time on response value of RSP extraction yield

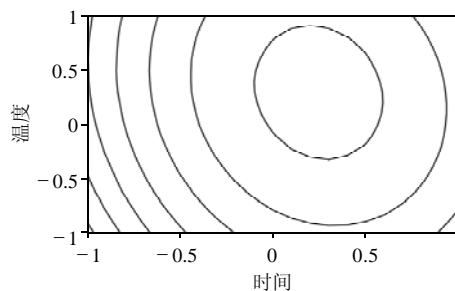


图 5 提取温度和时间对多糖得率影响的等值线图

Fig.5 Contour plot for effects of extraction temperature and extraction time on response value of RSP extraction yield

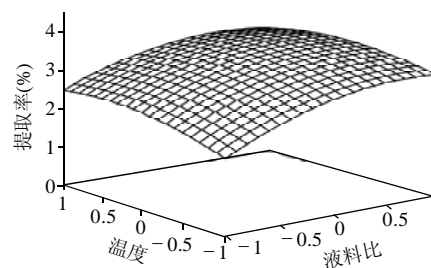


图 6 提取温度和液料比对提取率的影响响应面图

Fig.6 Response surface plot for effects of extraction temperature and liquid-solid ratio on response value of RSP extraction yield

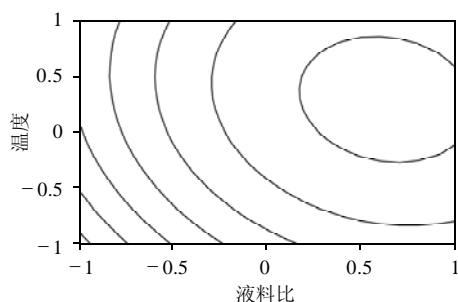


图7 提取温度和液料比对提取率的影响等值线图

Fig.7 Contour plot for effects of extraction temperature and liquid-solid ratio on response value of RSP extraction yield

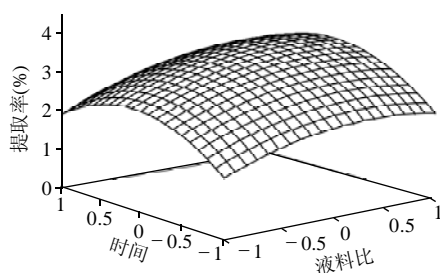


图8 提取时间和液料比对提取率的影响响应面图

Fig.8 Response surface plot for effect of extraction time and liquid-solid ratio on response value of PRS extraction yield

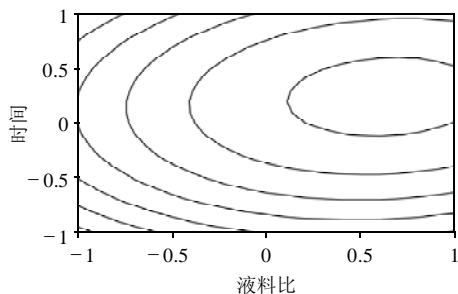


图9 提取时间和液料比对提取率的影响等值线图

Fig.9 Contour plot for effect of extraction time and liquid-solid ratio on response value of RSP extraction yield

图4、5表明, 温度过高, 时间过长可能导致多糖得率下降, 可能与时间长、温度高使多糖分解有关。图6、7表明, 提取温度和料液比的交互作用不大, 在提取温度和料液比在较大的范围内都能够得到较大的响应值, 因素料液比对响应值影响较大, 与ANOVA分析结果吻合。图8、9表明, 在提取时间过长, 导致提取率下降, 而料液比在较大范围内可以得到较高的提取率。由SAS分析得到响应值最大时 X_1 、 X_2 、 X_3 对应的编码值分别为 $X_1=0.2973$ 、 $X_2=0.2455$ 、 $X_3=0.6322$, 对应的百部多糖最佳提取条件为: 提取温度 83°C , 液料比33:1, 提取时间200min, 理论提取率为3.60%。

为了验证响应面法的可行性, 采用得到的最佳提取条件进行百部多糖提取验证实验, 三次平行实验得到实际平均提取率为3.74%, 与理论值相差0.14%, 因此, 响应面法对百部多糖提取条件的优化是可行的, 得到的多糖提取条件具有实际应用价值。

3 结论

应用响应面分析法优化了百部多糖的提取工艺, 结果显示, 百部多糖提取率的最佳提取工艺参数为: 提取温度 83°C , 液料比33:1, 提取时间200min, 多糖实际提取率为3.74%。

参考文献:

- [1] 何定杰. 本草纲目简编[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1986: 316-317.
- [2] 中华人民共和国卫生部国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 88.
- [3] 卢时勇, 钱俊青, 邹小明, 等. 响应面法优化超声提取白术有效成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 549-552.
- [4] 陈钢, 陈红兰, 苏伟, 等. 响应面分析法优化黄精多糖提取工艺参数[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 198-201.
- [5] HOU X J, CHEN W. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible Bachu mushroom by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 7: 34-41.