

响应面分析法优化当归多糖提取工艺

王艳艳¹, 王团结^{2,*}, 丁琳琳³

(1.江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏 连云港 222006;

2.江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001; 3.天津红日药业股份有限公司, 天津 301700)

摘要:目的: 优选当归多糖的提取工艺。方法: 以当归多糖为评价指标, 通过响应面分析法优化当归多糖的提取工艺, 并对最佳提取工艺进行验证实验。结果: 当归多糖的最佳提取工艺为每次提取时间 2.15h、料液比 1:8.27(g/mL)、提取 3 次。结论: 采用响应面分析法优化对当归多糖提取条件进行优化合理可行。

关键词: 响应面; 当归; 多糖; 提取工艺

Optimization of Polysaccharide Extraction from *Angelica sinensis* Using Response Surface Methodology

WANG Yan-yan¹, WANG Tuan-jie^{2,*}, DING Lin-lin³

(1. Lianyungang Branch of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222006, China;

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;

3. Tianjin Chasesun Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 301700, China)

Abstract: Objective: To research the optimal extraction conditions of polysaccharide from *Angelica sinensis*. Methods: Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the best extraction conditions, and then verified the optimal conditions. Results: The optimal conditions were as follows: the time for 2.15 h, solid-liquid ratio at 1:8.27, and extraction times for 3 times. Conclusion: It is feasible to optimize the extraction processing of polysaccharide from *Angelica sinensis* by RSM.

Key words: response surface methodology; *Angelica sinensis*; polysaccharide; extraction

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0146-04

当归为伞形科植物当归[*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels]的干燥根, 性温味甘, 归肝、心、脾经, 为中医传统常用补血药, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^[1]。当归中含有内酯类、生物碱类、有机酸类、挥发油类、多糖类等。现代研究表明当归多糖对机体免疫系统、血液系统有明显作用, 可以促进小鼠淋巴细胞增殖, 提高荷瘤小鼠巨噬细胞吞噬能力, 增加外周血细胞、白细胞、血红蛋白及骨髓有核细胞数, 并且有抗肿瘤、抗辐射损伤及镇痛的良好功效^[2-6]。目前, 国内外对于当归多糖提取工艺的研究报道较少, 本实验主要探讨回流法提取当归中多糖的工艺研究, 考察提取时间、料液比、提取次数 3 因素对当归多糖得率的影响。在单因素试验的基础上进行响应面法优化试验, 以提取率为指标研究当归多糖的最佳提取工艺, 为开发利用当归资源提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

当归产自甘肃, 烘干, 备用; 95% 酒精、浓硫酸(95%~98%)、蒽酮均为分析纯; 双蒸水(自制)。

UV-9600 型紫外-可见分光光度计 北京瑞利分析仪器有限公司; BC-R5001 旋转蒸发器 上海贝凯生物化工设备有限公司; HHS-1 型电热恒温水浴锅 上海浦东荣丰科学仪器有限公司; CT-C 热风循环烘箱 南京千方臭氧设备厂; LD5-2A 型离心机 北京医用离心机厂; B3200S 超声清洗机 必能信超声上海有限公司。

1.2 方法

1.2.1 多糖含量测定标准曲线

称取 50.00mg 蒽酮用 76% 稀硫酸(76mL 浓硫酸加入 30mL 水中)定容到 50mL 备用。称取 105℃ 干燥至质量恒定的葡萄糖 25.00mg, 加蒸馏水定容于 25mL, 配成 1mg/mL 的标准溶液备用。精密吸取标准液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mL 于 25mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容摇

收稿日期: 2011-04-18

作者简介: 王艳艳(1981—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为药剂学、制药设备、分析化学。E-mail: wyy8127@163.com

* 通信作者: 王团结(1986—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为中药效应物质基础。E-mail: union_wang@163.com

匀,再分别吸取各质量浓度葡萄糖溶液 1mL,加 5mL 蒽酮试液,立即放入冰水浴中摇匀后,置沸水浴中煮 10min,取出用水冲洗 2min 冷却,静置 10min 后于波长 624nm 处测定吸光度,以蒸馏水 1.0mL 作空白对照。以葡萄糖质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标做回归处理,得回归方程为 $y = 0.0047x + 0.0325$, $R = 0.9991$,线性范围 20~120 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.2 当归多糖的提取方法^[7-15]

当归粉碎,过 40 目筛,称取 5.0g 当归至 250mL 圆底烧瓶,加 100mL 乙醇(80%),于 80℃ 水浴中加热回流 1.5h,抽滤,弃去滤液,得滤渣,至 250mL 圆底烧瓶,加入蒸馏水,于 80℃ 水浴中加热回流,滤液至 250mL 容量瓶中,定容,取 4mL 定容到 100mL 容量瓶中,用作标准曲线的方法测吸光度,计算提取率。

1.2.3 样品多糖含量及得率测定

按照 1.2.1 节方法测定其吸光度,计算样品中多糖含量和样品中多糖得率。

$$\text{多糖得率}/\% = \frac{\text{粗多糖质量}}{\text{药材质量}} \times 100$$

1.2.4 单因素试验

分别以不同的提取时间(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h),不同提取次数(1、2、3、4、5 次),选择不同的料液比(1:6、1:7、1:8、1:9、1:10)为单因素,考察不同单因素对多糖得率的影响。

1.2.5 响应面优化试验

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,综合单因素试验结果,选取对当归多糖得率有较显著影响的 3 个因素,即提取时间、料液比、提取次数。在单因素试验的基础上,设计三因素三水平的响应面分析试验方案,因素及水平见表 1。其中编码值与真实值换算关系,提取时间 $X_1 = (T - 2)/0.5$; 料液比 $X_2 = (V - 40)/5$ (注:料液比 1:8 时加液为 40mL); 提取次数 $X_3 = (n - 2)/1$ 。

表 1 响应面分析因素与水平编码表
Table 1 Factors and levels of response surface analysis

水平	因素		
	X_1 提取时间/h	X_2 料液比(g/mL)	X_3 提取次数
-1	1.5	1:7	1
0	2.0	1:8	2
1	2.5	1:9	3

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

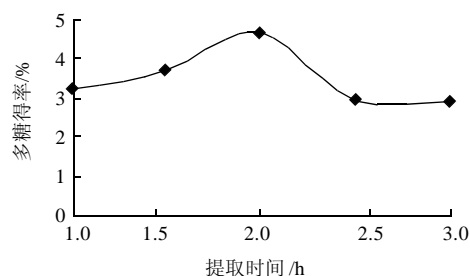


图 1 提取时间对多糖得率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on extraction yield of polysaccharide

图 1 表明,提取时间在 2h 内,多糖得率有所增加,但 2h 后多糖得率降低,因此将提取时间应控制在 2h 左右。这种现象的发生提示在提取过程中提取时间太长会使多糖在高温提取过程中的时间过长,而使部分多糖破坏和降解,多糖得率降低,有待进一步证实^[16]。

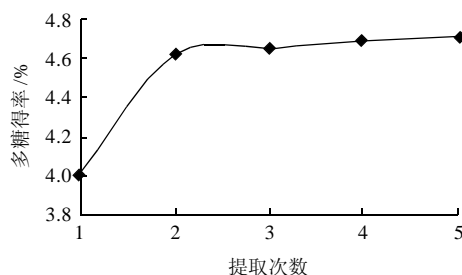


图 2 提取次数对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of times of extraction on extraction yield of polysaccharide

图 2 表明,提取次数为 2 次时,多糖得率较高,考虑到提取次数越多,消耗越大且浓缩时损耗也较大,因此选择提取次数 2 次最佳。

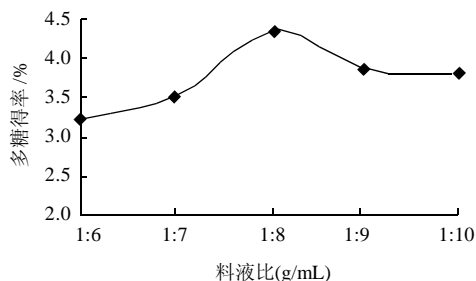


图 3 料液比对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on extraction yield of polysaccharide

图 3 表明,不同料液比对得率多糖量的影响较大,料液比在 1:8 时,多糖得率最高^[17]。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计及结果

采用表1设置的三因素三水平, 根据测得的正交试验数据和验证实验数据, 进行12组试验, 其中1~9是析因试验, 10~12是中心试验, 用来估计试验误差。结果见表2。

表2 当归多糖提取工艺优化响应面试验设计及结果

Table 2 Trials of response surface analysis and experimental results

试验号	X ₁ 提取时间	X ₂ 料液比	X ₃ 提取次数	吸光度	多糖得率/%
1	-1	-1	-1	0.269	3.15
2	-1	0	0	0.341	4.10
3	-1	1	1	0.380	4.22
4	0	-1	0	0.363	4.40
5	0	0	1	0.397	4.85
6	0	1	-1	0.317	3.79
7	1	-1	1	0.375	4.56
8	1	0	-1	0.293	3.46
9	1	1	0	0.338	4.06
10	0	0	0	0.387	4.71
11	0	0	0	0.385	4.69
12	0	0	0	0.390	4.75

经 Statistica 6.0 响应面分析后, 其方差分析结果见表3, Pareto 图见图4。

表3 当归多糖得率的全模型方差分析表

Table 3 Analysis of variance of regression equation for extraction efficiency of *Angelica sinensis* polysaccharide

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X ₁	0.044006	1	0.044006			
X ₁ ²	0.438672	1	0.438672	47.1488	0.020558	*
X ₂	0.020672	1	0.020672	470.0060	0.002121	**
X ₂ ²	0.092450	1	0.092450	22.1488	0.042305	*
X ₃	0.364089	1	0.364089	99.0536	0.009945	**
X ₃ ²	0.172086	1	0.172086	390.0952	0.002554	**
X ₁ X ₂	0.037408	1	0.037408	184.3810	0.005380	**
X ₁ X ₃	0.035208	1	0.035208	40.0804	0.024053	*
X ₂ X ₃	0.006533	1	0.006533	37.7232	0.025499	*
回归	3.231500					
误差	0.001867	2	0.000933	7.000	0.118083	
总和	3.233367	11				

注: *.显著(P < 0.05); **.极显著(P < 0.01)。

由表3可看出, 除了料液比与提取次数的共同作用项的 P > 0.05, 其他各项 P < 0.05, 其中 X₁²、X₂²、X₁X₃、X₂X₃ 影响显著, X₂、X₃、X₃²、X₁X₂ 影响极显著。回归方程相关系数 R = 0.99942, 说明响应值的

变化有 99.942% 来自于所选变量。由图4可知, 所选因素的影响次序为提取次数 > 提取时间 > 料液比。但是当3个因素联合作用时, 对得率的影响都比较显著。

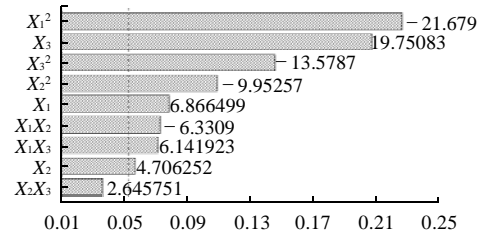
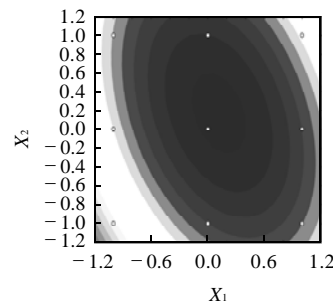
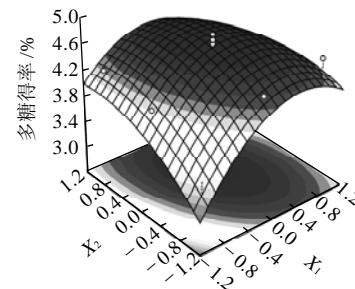


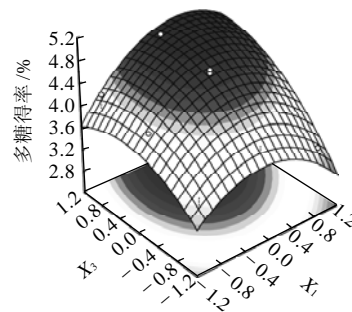
图4 当归多糖提取回归分析结果

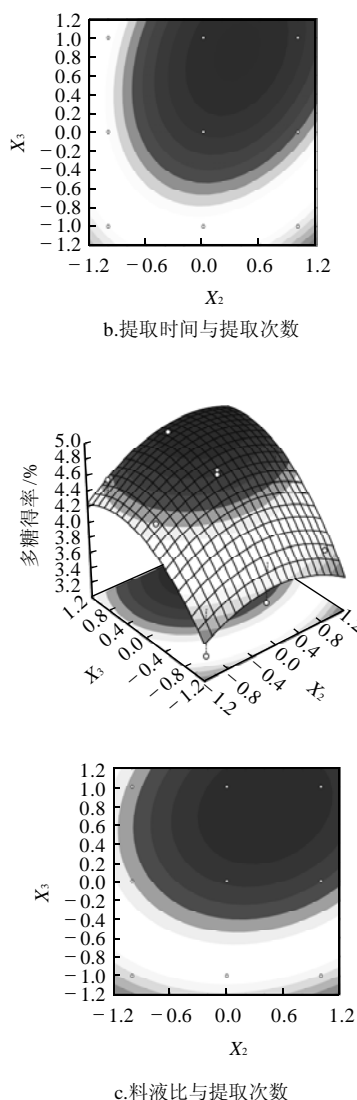
Fig.4 Analysis of variance of regression for extraction result of *Angelica sinensis* polysaccharide

2.2.2 当归多糖的提取最佳工艺条件确定



a.提取时间与料液比





固定水平: X_1 提取时间 2h; X_2 料液比 1:8(g/mL); X_3 提取 2 次。

图 5 各两因素交互作用对多糖得率影响的响应面及等高线图
Fig.5 Response surface plots for the effects of cross-interaction on extraction yield of *Angelica sinensis* polysaccharide

表 4 最优值分析结果表

Table 4 Analysis results of optimal value

影响因素	试验低水平值	优化水平值	试验高水平值
提取时间	-1.00000	0.296834	1.000000
料液比	-1.00000	0.273356	1.000000
提取次数	-1.00000	0.880387	1.000000

由图 5 及表 4 分析可知, 当归多糖得率最优值 4.94%, $X_1 = 0.297$ 、 $X_2 = 0.273$ 、 $X_3 = 0.880$, 计算得本试验各因素最优值为提取时间 2.15h、料液比 1:8.27(g/mL)、提取次数 2.88(即提取次数取 3 次)。

2.2.3 验证实验

取 5.0g 当归粉末用 100mL 的 80% 乙醇在 80℃ 水浴中加热提取 1.5h, 抽滤, 弃去滤液, 得滤渣; 再用 1:8.27

的蒸馏水量, 在 80℃ 条件下, 提取 2.15h, 最后抽滤得滤液, 重复提取 3 次, 转到 250mL 的容量瓶中, 定容, 取出 4mL 定容到 100mL 容量瓶, 按绘制标准曲线的方法测其吸光度为 0.402, 即可算得提取率为 4.91%。

3 结论

本实验优化了回流法提取当归中多糖工艺, 考察提取时间、料液比、提取次数 3 个因素对当归多糖得率的影响。在单因素试验的基础上进行响应面优化试验设计, 以提取率为指标考察提取当归多糖的最佳提取工艺, 各因素对提取率的影响为: 提取次数 > 提取时间 > 料液比, 其中提取次数是影响当归多糖提取的关键因素。最佳工艺条件为提取时间 2.15h、料液比 1:8.27(g/mL)、提取次数 3 次, 此时提出率可达 4.91%。本实验优化得出的当归多糖提取工艺, 可为开发利用当归资源提供基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 中国医药科技出版社, 2010: 124-125.
- [2] ZHANG Song, HE Ben, GE Junbo, et al. Extraction, chemical analysis of *Angelica sinensis* polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides in ischemia-reperfusion rats[J]. Int J Biol Macromol, 2010, 47(4): 546-550.
- [3] SUN Yuanlin, TANG Jian, GUO Xiaohong, et al. Water-soluble polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: Preparation, characterization and bioactivity[J]. Int J Biol Macromol, 2005, 36(5): 283-289.
- [4] SUN Yuanlin, CUI S W, TANG Jian, et al. Structural features of pectic polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels[J]. Carbohydr Polym, 2010, 80(2): 544-550.
- [5] YE Y N, SO H L, LIU E S L, et al. Effect of polysaccharide from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing[J]. Life Sci, 2003, 72(8): 925-932.
- [6] CAO Wei, LI Xiaoqiang, WANG Xiang, et al. Characterizations and anti-tumor activities of three acidic polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels[J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(1): 115-122.
- [7] 孙元琳, 杨萍芳, 吴海霞, 等. 水法提取当归多糖工艺条件优化[J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 130-134.
- [8] 孙元琳, 顾小红, 李德远, 等. 当归多糖的制备及抗辐射效应研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 48-52.
- [9] 何先元, 许晋芳, 王秋霜, 等. 当归多糖的超声提取及含量测定[J]. 中国药业, 2010, 19(19): 34-35.
- [10] 邱丽萍, 吕青涛, 张发科, 等. 当归多糖的提取分离与血清指纹图谱研究[J]. 中药材, 2008, 31(1): 65-67.
- [11] 张家建. 正交试验法优选当归多糖的提取工艺[J]. 浙江中医杂志, 2008, 43(2): 117-118.
- [12] 盛小莉, 王凯平. 正交设计优化当归多糖提取工艺[J]. 中成药, 2008, 30(12): 1862-1864.
- [13] 龚盛昭, 杨卓如, 曾海宇. 微波辅助法萃取当归多糖的条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(7): 125-128.
- [14] 邱丽萍, 吕青涛, 张发科, 等. 当归多糖的提取分离与血清指纹图谱研究[J]. 食品与药品, 2008, 10(1): 22-25.
- [15] 刘云. 当归多糖的萃取及含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(1): 49-50.
- [16] 李加兴, 李敏利, 陈建伏, 等. 微波辅助提取猕猴桃根多糖工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 42-45.
- [17] 冯维希, 张永丹, 韩婷, 等. 响应面分析法优化两相溶剂系统提取葛花异黄酮工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 177-181.