

# 星点设计-响应面法优化五味子多糖的酶提工艺

张楠楠\*,朱志军#,蒋亚超,邓浩,高松,李莹丽(河南中医学院药学院,郑州 450008)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3142-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.35

**摘要** 目的:优化五味子多糖的酶提工艺。方法:采用星点设计-响应面法,以溶液pH、酶用量、提取温度为响应因子,以五味子多糖的提取率为响应值,在单因素试验的基础上,采用3因素5水平星点设计进行试验;同时进行验证试验。结果:优化的最佳提取工艺条件为酶提溶液pH 5.7、酶用量1.3%、提取温度53℃;验证试验中五味子多糖的提取率为14.30% (RSD=1.84%, n=6)。结论:优化的提取工艺简便、合理、稳定,可用于五味子多糖的提取。

**关键词** 五味子多糖;酶法提取;星点设计-响应面法

## Optimization of Enzymatic Extraction Technology of Polysaccharides from *Schisandra chinensis* by Central Composite Design-response Surface Methodology

ZHANG Nannan, ZHU Zhijun, JIANG Yachao, DENG Hao, GAO Song, LI Yingli (College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize enzymatic extraction technology of polysaccharide from *Schisandra chinensis*. METHODS: Using pH value of enzymatic extraction solution, the amount of enzyme, extraction temperature as response factor, *S. chinensis* polysaccharide as response value, on the basis of single-factor experiments, 3-factor, 5-level central composite experimental design was adopted for the experiment. Validation test was also conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was as pH value of 5.7, enzyme dosage of 1.3%, extraction temperature of 53℃. In validation test, the extraction rate of *S. chinensis* polysaccharide was 14.30% (RSD=1.84%, n=6). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology is simple, reasonable and stable, and can be used for the extraction of polysaccharide from *S. chinensis*.

**KEYWORDS** *Schisandra chinensis* polysaccharide; Enzymatic extraction technology; Central composite-response surface methodology

五味子,习称北五味子,为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>。五味子多糖是从五味子中提炼出来的混合物,其药理作用主要体现在保护肝脏<sup>[2]</sup>、增强免疫<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗疲劳<sup>[5]</sup>、抗超敏反应<sup>[6]</sup>等方面。五味子多糖的提取方法主要有溶剂提取法、微波提取法、超声提取法、酶提取法等<sup>[7]</sup>。本研究是课题组关于生脉散剂型转化的前期研究,因此,五味子多糖后续纯化不仅要求工艺方便快捷,还要避免提取过程中的损失,以为后续工业化生产提供条件。目前,工业化生产中五味子多糖的提取方法普遍采用水提法,但是水提法提取率相对较低,且耗费时间和能源<sup>[7-9]</sup>,例如孟宪军等<sup>[8]</sup>采用水提法得到五味子多糖的提取率仅为(10.99±0.33)%。因此,本研究拟采用其他提取方法辅助水提法提取多糖。研究显示,超声提取过程中多糖易分解<sup>[7]</sup>、微波提取能否提高多糖提取率仍存在争议<sup>[10]</sup>,且这2种方法在大规模工业生产中使用不方便。酶法提取具有条件温和、提取率高<sup>[11]</sup>、后续步骤易处理、可用于工业化生产等优点,故笔者采用目前常用的响应面法对酶提取法提取五味子多糖的工艺进行优化<sup>[12]</sup>,以为五味子多糖的工业化生产提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

T6新世纪型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);SHA-C型水浴振荡器(巩义市予华仪器设备有限公司)

\* 硕士。研究方向:中药新剂型、新技术与新药研究。E-mail: 865250821@qq.com

# 通信作者:副主任药师,硕士生导师,硕士。研究方向:中药新剂型、新技术与新药研究。E-mail: zzjun63@126.com

限公司);5439R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf股份公司);UPH系列超纯水机(四川优普超纯科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

无水乙醇、95%乙醇、丙酮、乙醚、浓硫酸、柠檬酸、柠檬酸钠(天津登科化学试剂科技有限公司);重蒸酚(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,编号:NEP039);无水葡萄糖标准品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:20140324,纯度:≥98%);纤维素酶(成都普菲德生物技术有限公司,批号:20140721,活力:50 U/mg);五味子(安徽易元堂中药饮片科技有限公司,批号:130303),经过河南中医学院董诚明教授鉴定为北五味子的干燥成熟果实。

## 2 方法与结果

### 2.1 五味子多糖的含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取5g过三号筛的五味子粉末于500ml锥形瓶中,加入一定量的纤维素酶(纤维素酶的用量以药材质量的百分数表示),再加入料液比为1:15、一定pH值的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液,在一定温度的水浴振荡器中(100 r/min)提取0.5 h。锥形瓶取出后在水浴锅中灭酶20 min,离心(3 500 r/min,离心半径为7.5 cm,下同)10 min除去药渣。提取液在水浴锅上浓缩至20 ml,置于室温(25℃)后加入95%乙醇至体积分数达到80%,静置过夜。取沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗涤3次,离心5 min得到粗多糖沉淀并挥去溶剂。将得到的粗多糖定容至100 ml量瓶中,再取1 ml定容至100 ml量瓶中,用于多糖含量测定。多糖提取率(%)=多糖质量/药材质量×100%。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取干燥至恒质量的无水葡萄

糖对照品 10.33 mg,加蒸馏水定容至 10 ml 量瓶中,制成质量浓度为 1.033 mg/ml 的对照品溶液。精密量取对照品溶液 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 ml 分别置于 10 ml 量瓶中,加蒸馏水至刻度,得到不同质量浓度的对照品溶液。各取 1 ml 置于具塞试管中(空白组采用蒸馏水),再加入用蒸馏水配制 5% 的重蒸酚溶液 1 ml,摇匀,迅速加入 5 ml 浓硫酸,摇匀,40 ℃ 恒温水浴 30 min。取出后冰水浴 5 min,并于 490 nm 波长处测吸光度。以无水葡萄糖质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归。结果,无水葡萄糖的回归方程为  $y=0.0087x$  ( $r=0.9991$ ),表明其在 10.33~82.64 μg/ml 范围内与吸光度呈良好的线性关系,可用于多糖提取率的分析。

2.1.3 精密度试验 精密量取“2.1.2”项下对照品溶液 1 ml,按照“2.1.2”项下方法重复测定 5 次。结果,对照品溶液吸光度的 RSD=0.2394% ( $n=5$ ),表明本方法精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 精密称取五味子粉末 5 g,按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.2”项下方法分别于 0、0.5、1.0、1.5 h 时测定吸光度值。结果,供试品溶液吸光度的 RSD=1.1739% ( $n=4$ ),表明供试品溶液在 1.5 h 内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液 6 份,按照“2.1.2”项下方法测定吸光度值。结果,供试品溶液吸光度的 RSD=0.4390% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.1.6 加样回收试验 精密称取已知含量的五味子粉末 5 g,共 6 份,精密加入质量浓度为 82.64 μg/ml 的葡萄糖标准品溶液 1 ml,按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.2”项下方法测定吸光度值,计算加样回收率。结果,平均加样回收率为 98.16%,RSD=1.3746% ( $n=6$ ),表明本方法准确度较好。

## 2.2 单因素考察

2.2.1 溶液 pH 的考察 精密称取过三号筛的五味子粉末 5 g,共 6 份,分别加入纤维素酶 1%,加入料液比为 1:15,pH 为 3.7、4.3、4.9、5.5、6.1、6.7 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液于锥形瓶中,置于 50 ℃ 恒温水浴振荡器中(100 r/min)0.5 h,按照“2.1.2”项下方法测定多糖含量,计算提取率。结果,多糖的提取率分别为 3.62%、3.91%、5.80%、7.03%、5.29%、5.07%,pH 为 5.5 时提取率最高,故选择 pH 为 5.5 作为星点设计的节点。

2.2.2 纤维素酶用量的考察 精密称取过三号筛的五味子粉末 5 g,共 6 份,分别加入纤维素酶 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%,加入料液比为 1:15,pH 为 5.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液于锥形瓶中,置于 50 ℃ 恒温水浴振荡器中(100 r/min)0.5 h,按照“2.1.2”项下方法测定多糖含量,计算提取率。结果,多糖的提取率分别为 4.92%、8.21%、10.11%、10.15%、10.16%、10.15%,随酶用量增加而增加,但酶用量超过 1.5% 时增幅不明显。故选择 1.75% 作为星点设计的节点。

2.2.3 提取温度的考察 精密称取过三号筛的五味子粉末 5 g,共 6 份,分别加纤维素酶 1%,加入料液比为 1:15,pH 为 5.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液于锥形瓶中,置于温度为 45、50、55、60、65、70 ℃ 的恒温水浴振荡器中(100 r/min)0.5 h,按照“2.1.2”项下方法测定多糖含量,计算提取率。结果,多糖的提取率分别为 6.60%、6.90%、7.51%、7.47%、7.23%、6.09%,随提取温度的升高而增加,但 55 ℃ 和 60 ℃ 差别不太明显,超过 60 ℃ 提取率开始下降。故选择 57.5 ℃ 作为星点设计的节点。

## 2.3 响应面设计

应用 Minitab 15 软件,根据单因素试验结果,采用响应面法星点设计,以溶液 pH(A)、酶用量(B)、提取温度(C)3 个因素为响应因子,以五味子多糖提取率(%)为响应值进行试验安排。设计因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	提取条件	水平				
		-α	-1	0	1	α
A	溶液 pH	4	4.6	5.5	6.4	7
B	酶用量, %	0.5	1	1.75	2.5	3
C	提取温度, ℃	45	50	57.5	65	70

## 2.4 模型建立与方差分析

星点设计试验安排与结果见表 2,多糖提取率的估计回归系数见表 3,方差结果分析见表 4。

表 2 星点设计试验结果

Tab 2 Results of central composition design

试验号	A	B	C	多糖提取率 %
1	0	0	0	13.82
2	0	0	0	14.51
3	-1	-1	-1	13.50
4	α	0	0	12.87
5	0	0	0	14.48
6	-1	-1	1	10.14
7	0	0	α	13.22
8	1	-1	1	14.00
9	-1	1	1	11.10
10	0	-α	0	13.86
11	1	-1	-1	14.30
12	1	1	-1	13.22
13	0	0	0	13.91
14	-1	1	-1	14.07
15	1	1	1	14.07
16	0	0	0	14.25
17	0	0	0	14.48
18	-α	0	0	11.24
19	0	0	-α	13.47
20	0	α	0	13.79

表 3 多糖提取率的估计回归系数

Tab 3 Estimated regression coefficient of extraction rate of polysaccharide

项	系数	系数标准误	T	P
常量	14.240 0	0.199 8	71.274	0.000
A	0.697 6	0.132 6	5.262	0.000
B	0.030 2	0.132 6	0.228	0.824
C	-0.453 6	0.132 6	-3.422	0.007
A <sup>2</sup>	-0.763 1	0.129 0	-5.913	0.000
B <sup>2</sup>	-0.137 3	0.129 0	-1.064	0.313
C <sup>2</sup>	-0.307 9	0.129 0	-2.386	0.038
AB	-0.319 0	0.173 2	-1.842	0.095
AC	0.859 2	0.173 2	4.961	0.001
BC	0.192 5	0.173 2	1.112	0.292

由表 3 可知,A、C、A<sup>2</sup>、AC 对提取效果的曲面效应极其显著( $P<0.01$ ),C<sup>2</sup>对提取效果的曲面效应显著( $P<0.05$ ),其他项不显著。由表 4 可知,回归项的  $P=0.000$ ,表明应该拒绝原假设,因此本模型总体来说是有效的;失拟项对应的  $P$  值为  $0.077>0.05$ ,因此本模型中不存在失拟现象。多糖提取率的回归方程为  $y=5.03366+4.72338A+1.55265B-0.193849C-0.959252A^2-0.248449B^2-0.00557415C^2-0.481158AB+0.129609AC+0.0348514BC$  ( $R^2=0.9146$ ), $R^2>0.9$ ,说明二次多项式拟合较好。

## 2.5 响应曲面图与等高线图

根据拟合方程作效应曲面图和等高线图,考察所拟合的

效应曲面形状,分析各提取因素对多糖提取率的影响,结果详见图1、图2、图3。

表4 多糖提取率的方差分析

Tab 4 Variance analysis for the extraction rate of polysaccharide

来源	n	平方和	调整平方和	调整均方差	F	P
回归	9	25.684 8	25.684 8	2.853 87	11.89	0.000
线性	3	9.468 5	9.468 5	3.156 16	13.15	0.001
平方	3	9.200 1	9.200 1	3.066 71	12.78	0.001
交互作用	3	7.016 2	7.016 2	2.338 73	9.75	0.003
残差误差	10	2.399 7	2.399 7	0.239 97		
失拟	5	1.921 2	1.921 2	0.384 24	4.01	0.077
纯误差	5	0.478 5	0.478 5	0.095 71		
合计	19	28.084 5				

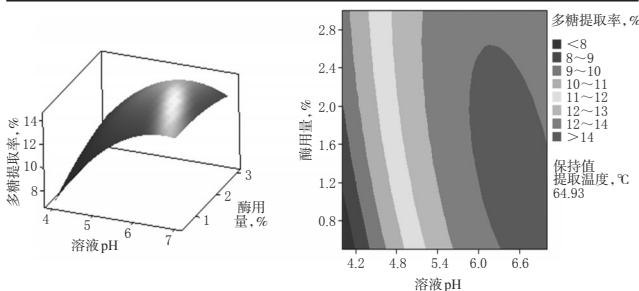


图1 溶液pH和酶用量对多糖提取率影响的三维曲面图和等高线图

Fig 1 Three-dimensional response surface plot and contour of the effect of solvent pH and enzyme dosage on the extraction rate

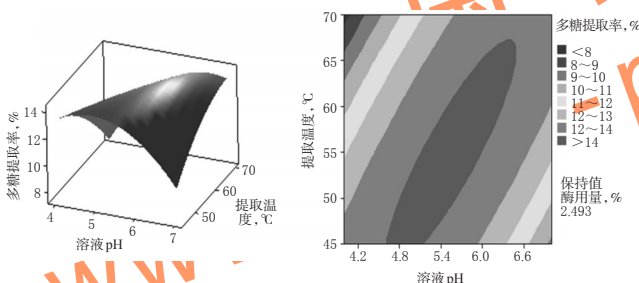


图2 溶液pH和提取温度对多糖提取率影响的三维曲面图和等高线图

Fig 2 Three-dimensional response surface plot and contour of the effect of solvent pH and extraction temperature on the extraction rate of polysaccharide

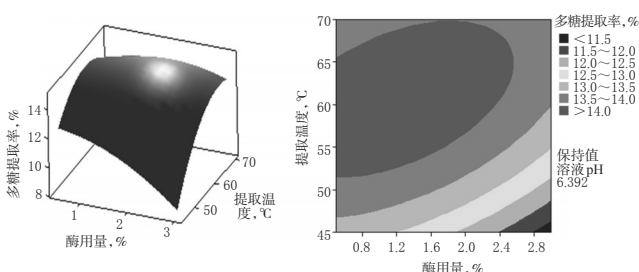


图3 酶用量和提取温度对多糖提取率影响的三维曲面图和等高线图

Fig 3 Three-dimensional response surface plot and contour of the effect of enzyme dosage and extraction temperature on the extraction rate of polysaccharide

## 2.6 验证试验

采用Mintab 15软件的效应优化器对试验进行优化的结果为:溶液pH为5.7、酶用量为1.3%、提取温度为53.3℃,多糖提取率的预测值为14.45%。在此条件下进行验证试验,取五味子粉末100g,共6份,按照“2.1.1”项下方法进行试验,结果多糖实际提取率平均为14.30%(RSD=1.84%,n=6),与模型预测值间的偏离率为1.04%,表明模型可靠。为了方便生产,温度可设为53℃。

## 3 讨论

五味子多糖酶法提取的文献报道较少,验证试验表明五味子多糖实际提取率平均为14.30%,高于文献报道的其他提取方法,如程振玉等<sup>[13]</sup>使用超声波辅助酶法提取的五味子多糖提取率为10.54%。本研究为课题组生脉散剂型的转化研究提供了数据支持,为酶法提取五味子多糖的工业化大生产提供了数据支撑和理论依据。

本试验尚存在不足之处,例如在多糖提取之前未对药材进行热水浸泡处理,可能会降低提取率。预试验考察了纤维素酶和木瓜蛋白酶对多糖提取率的影响,结果发现纤维素酶的提取率高于木瓜蛋白酶。预试验结果提示提取时间超过0.5h后多糖的提取率有所下降,因此,在本研究中五味子多糖的提取时间为0.5h;另外在多糖的沉淀过程中发现,乙醇沉淀下来的多糖有时为絮团状,有时为稀泥状,产生稀泥状的原因可能是由于五味子药材粉末没有离心干净或者是由于醇沉的温度偏高所致,导致后续操作不便,因此在试验时需特别注意。

本研究优化的提取工艺简便、合理、稳定,可用于五味子多糖的提取,为后续生脉散的剂型转化研究提供了基础。

## 参考文献

- [1] 李霞,贾晓斌,陈彦,等.五味子提取工艺的优化研究[J].中国药房,2007,18(6):424.
- [2] 许珂玉,肖建英.五味子粗多糖提取物对大鼠肝纤维化的防治作用研究[J].中国药房,2011,22(19):1743.
- [3] 苗明三,方晓艳.五味子多糖对正常小鼠免疫功能的影响[J].中国中医药科技,2003,10(2):100.
- [4] 黄玲,陈玲,张振林.五味子多糖对荷瘤鼠瘤体抑制作用的病理学观察[J].中药材,2004,24(3):202.
- [5] 刘丽,郝枝花.五味子多糖抗疲劳作用研究[J].中国民族民间医药,2011,20(16):29.
- [6] 刘森,张朝晖,潘俊芳,等.五味子多糖抗变态反应活性新发现[J].中成药,2012,34(4):629.
- [7] 尹艳,高文宏,于淑娟.多糖提取技术的研究进展[J].食品工业科技,2007,28(2):248.
- [8] 孟宪军,李冬男,汪艳群,等.响应曲面法优化五味子多糖的提取工艺[J].食品科学,2010,31(4):111.
- [9] 金兰,张海晶,陈大忠.星点设计-响应面法优化北五味子多糖提取工艺[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2013,29(6):649.
- [10] 常双艳,蓝炎阳,王少峰.多糖提取纯化方法及其生物活性研究进展[J].福建热作科技,2013,38(4):34.
- [11] 张锦雀,黄丽英,苏聪枚.中草药多糖提取分离纯化研究进展[J].中草药,2008,31(11):1760.
- [12] 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.
- [13] 程振玉,杨英杰,刘志刚.超声波辅助酶法提取北五味子多糖工艺研究[J].中国酿造,2014,33(3):104.

(收稿日期:2015-12-11 修回日期:2016-06-12)

(编辑:刘明伟)