

响应面分析法优选番石榴果实中多糖的超声提取工艺

孔繁晟*, 明建斌, 黄志鹏, 韩 灏, 张培颖 (广东药学院药科学院, 广州 510006)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1382-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.13

摘要 目的: 优选超声提取番石榴果实中多糖的工艺。方法: 通过单因素试验考察超声提取的时间、功率、温度、液料比对超声提取番石榴果实中多糖提取率的影响。在此基础上, 进行 Box-Behnken 中心组合设计, 以多糖提取率为响应值, 采用响应面分析法研究提取温度、提取时间和提取功率及其交互作用对番石榴果实中多糖提取率的影响。结果: 最佳超声提取工艺为超声温度 45 ℃、超声功率 280 W、超声时间 30 min。在此条件下, 多糖平均提取率为 2.28%。结论: 所选工艺合理、可行, 可用于番石榴果实中多糖的超声提取。

关键词 番石榴; 多糖; 超声辅助提取; 响应面分析法

Optimization of Ultrasonic Extraction Technology of Polysaccharides from the Fruit of *Psidium guajava* by Response Surface Analysis

KONG Fan-sheng, MING Jian-bin, HUANG Zhi-peng, HAN Hao, ZHANG Pei-ying (College of Pharmaceutical Science, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize ultrasonic extraction technology of polysaccharides from the fruit of *Psidium guajava*. METHODS: Single factor experiment was adopted to investigate the effects of ultrasonic extract time, power, temperature and solid-liquid ratio on the extract rate of polysaccharide from the fruit of *P. guajava*. On this basis, by Box-Behnken center composite design, with the extract rate of polysaccharide the fruit of *P. guajava* as the response value, response surface analysis method was adopted to research the effects of extract temperature, extract time, extract rate and interaction on the extract rate of polysaccharide from the fruit of *P. guajava*. RESULTS: The optimal ultrasonic extraction technology was as follows: ultrasonic temperature of 45 ℃, ultrasonic power of 280 W, ultrasonic time of 30 min. Under the above conditions, the average extraction rate of polysaccharide was 2.28%. CONCLUSIONS: The technology is reasonable and feasible, and can be used for the ultrasonic extraction of polysaccharide from the fruit of *P. guajava*.

KEYWORDS *Psidium guajava*; Polysaccharides; Ultrasonic assisted extraction; Response surface analysis

番石榴为桃金娘科番石榴属植物, 是常绿小乔木或灌木。品种有台湾新世纪、珍珠、水晶、胭脂红、七月红、柿蒂等十余种, 具有较高的营养价值和保健功效。番石榴果味独特、鲜美, 富含有益于人体的各种营养成分, 既可鲜食、煮熟吃、酿酒, 又可加工成果汁、果酱、罐头等系列产品, 还具有药用和保健作用。国内、外民间常用其治疗糖尿病^[1-2], 疗效较好。我国民间用番石榴叶的水煎液治疗腹泻、止血、肠炎、呕吐等疾病。

超声辅助提取技术^[3]由于具有操作简便、节能、省时等特点被广泛用于天然药物的浸提。传统的工艺设计方法, 如正交设计、均匀设计等, 都有各自的局限性, 不能全面地优化工艺。响应面分析法采用多元二次回归方法作为函数估计的工具, 研究因子与响应面之间、因子与因子之间的相互关系, 该方法试验次数少、周期短、求得的回归方程精度高、能研究几种因素间的交互作用, 是一种具有突出优势的优化试验条件的数学统计方法^[4-7]。

本研究探讨超声辅助提取番石榴果实中多糖成分, 通过响应面法确定最优提取工艺, 旨在最大限度地提高番石榴这种药食两用资源的综合利用性, 为其进一步的活性研究和工业化生产提供参考依据。

* 高级实验师, 主管药师。研究方向: 天然药物制剂、制药工程。
电话: 020-39352118。E-mail: kmkfs@163.com

1 材料

1.1 仪器

KH-400KDB 高功率超声器(昆山禾创超声仪器有限公司, 功率: 240 W, 频率: 40 kHz); HH-4 恒温水浴箱(金坛市宏华仪器厂); TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 752 紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); PHS-3D pH 计(上海雷磁创益仪器仪表有限公司)。

1.2 药材

番石榴, 购自广东番禺长洲水果市场, 经广东药学院中药学院腾希峰博士鉴定为桃金娘科(Myrtaceae)番石榴属植物珍珠番石榴 *Psidium guajava* L. 的果实。

1.3 试剂

d-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110833-200302, 纯度 ≥ 95%); 苯酚、浓硫酸、95% 乙醇等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖含量的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取 105 ℃ 下干燥至恒质量的 *d*-无水葡萄糖对照品 10.2 mg, 置 100 ml 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得葡萄糖对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 番石榴果实经削皮、去核、烘干、

打粉等处理,精密称取粉末 2.0 g,经蒸馏水超声辅助提取,滤过,滤液浓缩至 100 ml,摇匀,即得。

2.1.3 标准曲线的制备 分别吸取对照品溶液 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml,置 10 ml 量瓶中,蒸馏水定容,用移液管各取 1.0 ml 于试管中,在冰水浴条件下缓慢加入 5% 苯酚溶液 1.0 ml,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0 ml,混匀,沸水浴 10 min 后冷却至室温。以 1.0 ml 蒸馏水按同样操作为空白,在 490 nm 波长处测量吸光度(A)。以 A 为纵坐标,质量浓度(c)为横坐标,制备标准曲线,得回归方程为 $c=10.896\ 0A-0.004\ 4$ ($r=0.999\ 4$)。结果表明,葡萄糖对照品的质量浓度在 20~60 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.1.4 多糖提取率的测定 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量,取 2.0 ml 供试品溶液,按“2.1.3”项下方法操作,测得的 A 代入回归方程计算多糖质量浓度,再按下式计算多糖提取率:多糖提取率=多糖提取质量/番石榴果实样品质量 $\times 100\%$ 。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取温度对多糖提取率的影响 固定提取时间为 30 min、超声波功率为 280 W、液料比为 25:1(V/m)、去离子水 pH 为 7,考察提取温度分别为 20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 时多糖提取率的变化。提取温度对多糖提取率的影响见图 1。

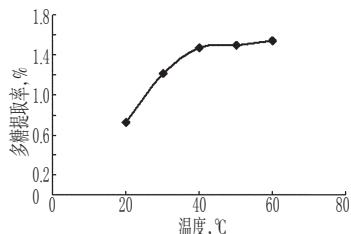


图 1 提取温度对多糖提取率的影响

Fig 1 Effects of extract temperature on the extract rate of polysaccharide

由图 1 可知,总体上,随着温度的升高,多糖提取率也逐步上升,当温度高于 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,多糖提取率趋于稳定,当提取温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,提取率最高。升高温度有利于提取率的提高,一般来说,温度升高,溶剂的表面张力系数及黏滞系数下降,蒸气压升高,超声空化阈值下降,有利于空化泡的产生;但是另一方面,由于蒸气压的增大,导致空化强度或空化效应下降,从而不利于提取过程的强化。

2.2.2 提取时间对多糖提取率的影响 固定提取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率为 280 W、液料比为 25:1(V/m)、去离子水 pH 为 7,考察提取时间分别为 20、25、30、35、40 min 时多糖提取率的变化。提取时间对多糖提取率的影响见图 2。

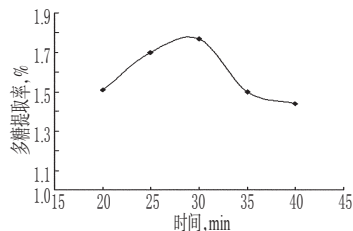


图 2 提取时间对多糖提取率的影响

Fig 2 Effects of extract time on the extract rate of polysaccharide

由图 2 可知,随着提取时间的延长,多糖提取率不断增高,提取 30 min 时达到最大值,30 min 后呈下降趋势。作用时间

在 25~30 min 时,多糖的提取效果较好。由于番石榴多糖主要存在于细胞间和细胞壁中,超声处理时间太短不足以破碎细胞,释放多糖;时间太长,则超声波的机械剪切力对多糖有一定的降解和破坏作用;而且随着提取时间的延长会升高水温促使多糖的水解速度加快,增加杂质含量,降低多糖含量。

2.2.3 提取功率对多糖提取率的影响 固定提取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 30 min、液料比为 25:1(V/m)、去离子水 pH 为 7,考察提取功率分别为 200、240、280、320、360 W 时多糖提取率的变化。提取功率对多糖提取率的影响见图 3。

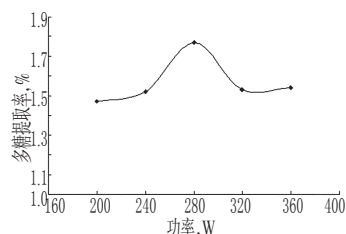


图 3 提取功率对多糖提取率的影响

Fig 3 Effects of extract power on the extract rate of polysaccharide

由图 3 可知,随着提取功率的升高,多糖的提取率随之增高,当功率为 280 W 时,多糖的提取率达到最大值。对于一定频率和一定发射面的超声来说,声强随着功率增大而增大。如果声强增大,声压幅值以及液体中压力亦增大,空化泡崩溃所需的时间将变得更短,也就是说单位时间内超声产生的空化作用的次数增多,从而有利于植物药有效成分提取率的提高。然而,当提取功率超过 280 W 时,多糖的提取率有所下降,因为高功率超声波可以产生热量,也可能对大分子的结构产生影响,从而降低多糖提取率。

2.2.4 液料比对多糖提取率的影响 固定提取时间为 30 min、提取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、提取功率为 280 W、去离子水 pH 为 7,考察液料比分别为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35(V/m) 时多糖提取率的变化。液料比对多糖提取率的影响见图 4。

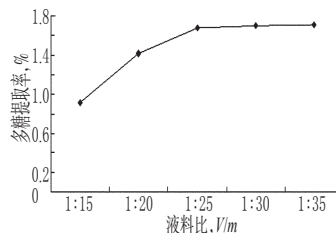


图 4 液料比对多糖提取率的影响

Fig 4 Effects of ratio of liquid to solid on the extract rate of polysaccharide

由图 4 可知,当液料比大于 1:25(V/m) 时,提取率随着液料比的增大而提高。但是,当液料比小于 1:25(V/m) 时,改变液料比对提取率的影响不大。

2.3 响应面分析法优选工艺

2.3.1 试验设计与结果 根据单因素试验结果,且为了节约物料和减少试验次数,固定多糖提取率最高时的液料比,即 25:1(V/m)。选定提取温度(X_1)、提取时间(X_2)、提取功率(X_3)为考察因素,每个因素选取 3 个水平,以多糖提取率为评价指标,根据 Box-Behnken 的中心组合原理,对多糖提取工艺进行响应面分析。因素与水平见表 1;Box-Behnken 试验设计与结果见表 2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

编码水平	因素		
	$X_1, ^\circ\text{C}$	X_2, min	X_3, W
+1	50	35	320
0	40	30	280
-1	30	25	240

表2 Box-Behnken 试验设计方案与结果

Tab 2 Box-Behnken design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率, %
1	-1	-1	0	1.61
2	-1	1	0	1.88
3	1	-1	0	2.03
4	1	1	0	2.18
5	0	-1	-1	1.73
6	0	-1	1	1.85
7	0	1	-1	1.87
8	0	1	1	1.97
9	-1	0	-1	1.69
10	1	0	-1	1.89
11	-1	0	1	1.77
12	1	0	1	2.13
13	0	0	0	2.25
14	0	0	0	2.23
15	0	0	0	2.26

2.3.2 试验分析 将表2中数据进行回归分析,并通过SAS9.2软件绘制各考察因素影响多糖提取率的三维效应面和二维等高线图。回归统计分析结果见表3;三维效应面和二维等高线图见图5。

表3 回归统计分析结果

Tab 3 Results of regression analysis

系统来源	自由度	平方和	均方	F	P
X_1	1	0.204 8	0.204 8	126.160 2	<0.000 1
X_2	1	0.057 8	0.057 8	35.605 7	0.001 9
X_3	1	0.036 4	0.036 4	22.453 8	0.005 2
X_1X_1	1	0.086 8	0.086 8	53.476 5	0.000 7
X_1X_2	1	0.003 6	0.003 6	2.217 7	0.196 6
X_1X_3	1	0.006 4	0.006 4	3.942 5	0.103 3
X_2X_2	1	0.104 6	0.104 6	64.451 1	0.000 5
X_2X_3	1	0.000 1	0.000 1	0.061 6	0.813 9
X_3X_3	1	0.184 2	0.184 2	113.448 1	0.000 1
残差	5	0.008 1	0.001 6		
失拟	3	0.007 6	0.002 5	10.928 6	0.085 0
净误差	2	0.000 5	0.000 2		
模型	9	0.636 8	0.070 8	43.589 5	0.000 3
总离差	14	0.645 0			
相关系数(R^2)		0.987 4			
调整复相关系数(R_{adj}^2)		0.964 8			

由表3可知,各考察因素对工艺的影响顺序为提取温度>提取时间>提取功率,且所建模型有统计学意义($P<0.000 1$),因变量与所考察自变量之间的线性关系显著($R^2=0.987 4$)。模型的 $R_{adj}^2=0.964 8$,说明该模型能解释96.48%响应值的变化,拟合度较好,失拟项不显著($P>0.05$),说明本试验所得的二次回归方程显著度较高,能较好地对应值进行预测。一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 及二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 表现极显著,说明它们对响应值的影响较大,且所考察因素对响应值的影响不是简单的一次线性关系。

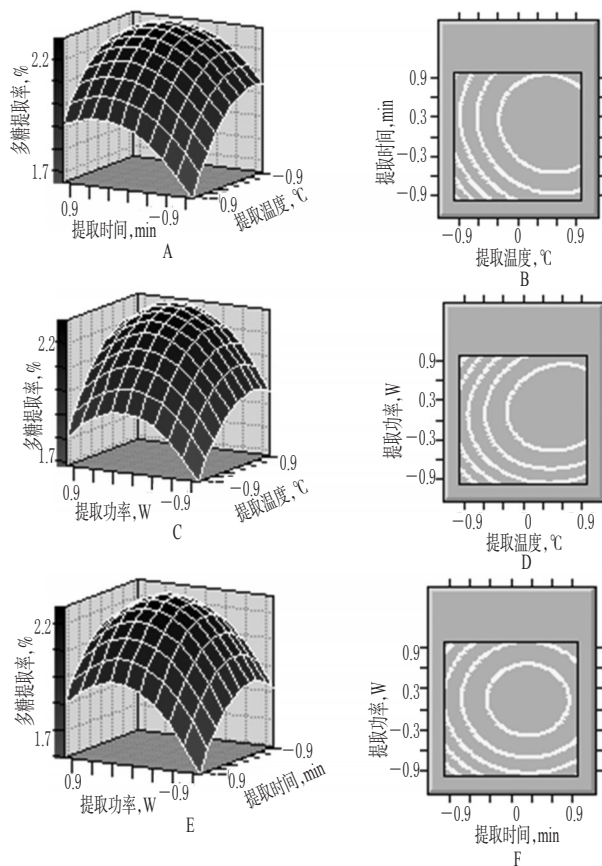


图5 三维效应面和二维等高线图

A. 提取温度和提取时间对多糖提取率影响的三维效应面; B. 提取温度和提取时间对多糖提取率影响的二维等高线; C. 提取温度和提取功率对多糖提取率影响的三维效应面; D. 提取温度和提取功率对多糖提取率影响的二维等高线; E. 提取时间和提取功率对多糖提取率影响的三维效应面; F. 提取时间和提取功率对多糖提取率影响的二维等高线

Fig 5 Three-dimensional response surface and two-dimensional contour map

A. three-dimensional response surface of the effects of extract temperature and extract time on the extract rate of polysaccharide; B. two-dimensional contour of the effects of extract temperature and extract time on the extract rate of polysaccharide; C. three-dimensional response surface of the effects of extract temperature and extract power on the extract rate of polysaccharide; D. two-dimensional contour of the effects of extract temperature and extract power on the extract rate of polysaccharide; E. three-dimensional response surface of the effects of extract time and extract power on the extract rate of polysaccharide; F. two-dimensional contour of the effects of extract time and extract power on the extract rate of polysaccharide

为了确定最佳点,再对数学回归模型 $Y=2.246 667+0.16X_1+0.085X_2+0.067 5X_3-0.153 333X_1X_1-0.03X_1X_2+0.04X_1X_3-0.168 333X_2X_2-0.005X_2X_3-0.223 333X_3X_3$ 求一阶偏导,得出优化条件为 $X_1=0.527 50, X_2=0.202 56, X_3=0.196 09$,此时 $Y=2.30$ 。利用编码公式($X_j=\frac{X_j-X_0}{\Delta_j}$)将上述编码值转变为实际参数:提取温度45.27 $^\circ\text{C}$ 、提取时间31.01 min、提取功率287.84 W。考虑到实际操作性,故调整工艺参数为提取温度45 $^\circ\text{C}$ 、提取时间30 min、提取功率280 W。

2.4 工艺验证试验

星点设计效应面法优选鱼腥草分散片的处方工艺

周爱梅*(交城县人民医院,山西 交城 030500)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1385-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.14

摘要 目的:优选鱼腥草分散片的处方工艺。方法:以交联聚维酮(PVPP)、交联羧甲基纤维素钠(CCNa)、羧甲基淀粉钠(CMS)用量为考察因素,以崩解时限和累积溶出度为评价指标,采用星点设计效应面法优选鱼腥草分散片的处方工艺。结果:最优处方工艺为PVPP用量为19~20 mg,CCNa用量为29~37 mg,CMS用量为21~27 mg。结论:优选的处方工艺稳定、可行,可用于制备鱼腥草分散片。

关键词 星点设计效应面法;鱼腥草;分散片;处方优化

Optimization of the Formulation Technology of *Houttuynia cordata* Dispersible Tablets by Central Composite Design and Response Surface Method

ZHOU Ai-mei(Jiaocheng County People's Hospital, Shanxi Jiaocheng 030500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the formulation technology of *Houttuynia cordata* dispersible tablets. METHODS: The formulation technology of *H. cordata* dispersible tablets was optimized by central composite design and response surface method with the amount of PVPP, CCNa and CMS as factors, using disintegration time and cumulative dissolution as index. RESULTS: The optimal formulation technology was as follows: PVPP 19-20 mg, CCNa 29-37 mg, CMS 21-27 mg. CONCLUSIONS: The optimal technology is stable and feasible, which can be used for the preparation of *H. cordata* dispersible tablets.

KEYWORDS Central composite design and response surface method; *Houttuynia cordata*; Dispersible tablets; Formulation optimization

取番石榴药材适量,共3批,根据上述优选的工艺进行提取,并测定多糖提取率。结果,多糖提取率分别为2.25%、2.31%、2.28%,平均值为2.28%。而根据方程预测的多糖提取率与实际平均值仅相差0.02%,表明优选的工艺合理、可行。

3 讨论

超声辅助提取技术由于操作简便、节能、省时,近年来广泛用于天然产物的浸提^[8-9]。超声提取技术是利用超声空化效应、机械振动、热效应等多重作用,在流体内产生瞬间的高温高压场,对流体中的固体表面产生强大剪切力,同时有较大的搅动作用,从而能促进传质。已有的研究表明,超声提取技术其提取效率是常规热回流、浸渍法以及煎煮法的几倍到几十倍,单位物料的能耗较常规方法降低了50%以上,而且最大限度保留了中药及天然药物的有效成分,收率大幅度提高。但是,由本超声辅助提取多糖的试验可看出,某些因素的水平并不是越大越好,如提取频率、提取时间等。这可能是由于多糖是一类大分子和分链接的结构,在提取这样结构的物质时,过大的能量和过长的超声时间会对大分子和分链接的结构产生分解和破坏作用。因此,以超声作为提取方法时,对提取因素和水平的优化就显得特别的重要。

参考文献

[1] 杜杨吉,王三永,李春荣.番石榴叶多糖分离纯化工艺研究[J].中国食品添加剂,2011(1):156.

[2] 王波,刘衡川,洪君蓉,等.番石榴叶水提取物对糖尿病小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J].四川大学学报:医学版,2007,38(2):298.

[3] 孔繁晟,贲永光,孙爱群,等.超声法与连续回流法提取黄芪总黄酮的工艺对比研究[J].中国药房,2010,21(19):1752.

[4] Yifang Y, Jingqian F, Haiyan X, et al. Influence of different extraction and purification methods on Astragalus polysaccharides and pharmacological evaluation[J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2010, 2(1):54.

[5] 田宝成,贾昌平,杨军涛,等. Box-Behnken 效应面法优化红旱莲总黄酮提取工艺的研究[J]. 中成药, 2010, 32(3):389.

[6] 贾亮亮,袁丁,何毓敏,等.多糖提取分离及含量测定的研究进展[J].食品研究与开发,2011,32(3):189.

[7] Xia Q, Li HD, Hong L. Optimization of the ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* by response surface method[J]. *Medicinal Plant*, 2012, 3(8):78.

[8] 牛立新,李章念,李红卷,等.超声波提取卷丹鳞茎中总黄酮研究[J].中草药,2007,30(1):85.

[9] 张嘉,李多伟,王义潮,等.仙人掌中总黄酮超声萃取工艺的研究[J].中成药,2005,27(8):968.

(收稿日期:2013-05-28 修回日期:2013-09-13)

* 主管中药师。研究方向:临床药理学。电话:0358-3525233。
E-mail: jiaochengzhanghao@msn.com