

# 响应面分析法优选南方红豆杉中多糖的提取工艺<sup>Δ</sup>

孔繁晟\*,李日许,蔡焕哲,陈泽丹,洪锐涛(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)07-0614-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.13

**摘要** 目的:优选南方红豆杉中多糖的提取工艺。方法:以多糖提取率为评价指标,以pH、提取时间、提取温度、液料比为考察因素,采用单因素试验与响应面分析相结合的方法,优选南方红豆杉中多糖的提取工艺。结果:最佳提取工艺为设定pH为5,提取时间为20 min,提取温度为60 ℃,液料比为30:1(V/V);在该工艺条件下,多糖提取率为0.68%。结论:所选工艺合理、可行,可用于南方红豆杉中多糖的提取。

**关键词** 南方红豆杉;多糖;超声提取;响应面分析法

## Optimization of the Extraction Technology of Polysaccharides from *Taxus chinensis* by Response Surface Analysis

KONG Fan-sheng, LI Ri-xu, CAI Huan-zhe, CHEN Ze-dan, HONG Rui-tao (College of Pharmaceutical Science, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of polysaccharide from *Taxus chinensis*. METHODS: The extraction technology of polysaccharide from *T. chinensis* was optimized by single factor test and response surface analysis with the extraction rate of polysaccharide as index using pH value, extraction time, extraction temperature and ratio of drug to liquid as factors. RESULTS: The optimal extraction conditions were pH value of 5, extraction for 20 min, at 60 ℃, and ratio of drug to liquid 30:1(V/V). The extraction rate of polysaccharide was 0.68% under the condition. CONCLUSIONS: The optimized technology is reasonable and feasible, and can be used for the extraction of polysaccharide from *T. chinensis*.

**KEYWORDS** *Taxus chinensis*; Polysaccharide; Ultrasonic extraction; Response surface analysis

红豆杉(*Taxus*)属裸子植物紫杉纲红豆杉科(Taxaceae)的常绿乔木,共11种,我国有4个种和1变种。南方红豆杉产于我国长江流域以南,该植物对生境温度、水分、光照等要求较严格,对森林类型选择及层间植物物种环境也有较为苛刻的要求,这使该属植物在地理分布上受到限制,制约了其种群的空间拓展<sup>[1]</sup>,因此红豆杉十分珍贵、稀少。

现今对红豆杉科的药用活性研究多集中在与紫杉醇结构类似的紫杉烷类化合物的抗癌活性方面<sup>[2]</sup>,但对其他活性成分,如黄酮、多糖的研究较少。而多糖具有广泛的药理作用<sup>[3]</sup>,如作为免疫调节剂,能激活巨噬细胞、T淋巴细胞、LAK细胞等多种免疫细胞,促进细胞因子生成,活化补体;也有抗肿瘤、抗病毒、抗感染、抗消化性溃疡、抗氧化<sup>[4]</sup>、降血糖、降血脂等多种活性,而且毒性较低,因此多糖的研究受到越来越多的重视。

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。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(Response surface method)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,是一种有突出优势的优化试验条件的数学统计方法<sup>[5-6]</sup>。

<sup>Δ</sup> 基金项目:广东省中医药局建设中医药强省立项资助科研课题(No.20121159)

\*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 高功率超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:240W,频率:40 kHz);HH-4 恒温水浴箱(江苏金坛市宏华仪器厂);TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司);752 型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);S-3D pH 计(上海雷磁磁益仪器仪表有限公司)。

### 1.2 药材与试剂

南方红豆杉枝叶,采自广州中医药大学药王山,经广东药学院中药学院腾希峰博士鉴定为南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *meirei*);石油醚、正丁醇、三氯甲烷、苯酚、浓硫酸、95%乙醇、*D*-无水葡萄糖均为市售分析级。

## 2 方法与结果

### 2.1 多糖提取率的测定

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10 mg,置于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 称取经石油醚脱脂干燥后的南方红豆杉枝叶1.0 g,热水超声提取,滤过,滤液脱蛋白<sup>[7]</sup>后浓缩定容,取滤液用80%乙醇醇沉<sup>[8]</sup>,离心(半径:10 cm,转速:4 000 r/min),60 ℃下取沉淀,烘干,用蒸馏水溶解、干燥,定容于100 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,即得。

2.1.3 标准曲线的制备 分别吸取葡萄糖对照品溶液2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml,置10 ml量瓶中,蒸馏水定容,用移液管各吸取1.0 ml,置试管中,在冰水浴中缓慢的加入5%苯酚溶液

1.0 ml, 摇匀, 迅速加入浓硫酸溶液 5.0 ml, 混匀, 沸水浴 10 min 后冷却至室温。以 1.0 ml 蒸馏水为空白, 同法操作, 在 490 nm 波长处测定吸光度 ( $A$ )。以  $A$  为纵坐标, 葡萄糖质量浓度 ( $c$ ) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为  $c=10.896A-0.0044$  ( $r=0.9998$ )。

2.1.4 多糖提取率的测定 采用苯酚-硫酸法<sup>[9]</sup>测定多糖提取率。取 2.0 ml 供试品溶液, 按“2.1.3”项下方法测定  $A$ , 并按下式计算多糖提取率: 多糖提取率 = 多糖提取物质量/红豆杉枝叶质量  $\times 100\%$ 。

## 2.2 单因素试验

2.2.1 液料比对多糖提取率的影响 设定提取时间为 15 min, 超声功率为 280 W, 温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 提取溶剂去离子水 pH7, 乙醇体积分数为 80%, 考察液料比 ( $V/V$ ) 分别为 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 时多糖提取率的变化。结果, 多糖提取率随液料比的增加而增加, 当液料比高于 20:1 ( $V/V$ ) 后, 增加趋势平缓, 考虑到提取成本及实际操作, 将以上 5 个液料比比例作为响应面分析中的 5 个水平。液料比对多糖提取率的影响见图 1。

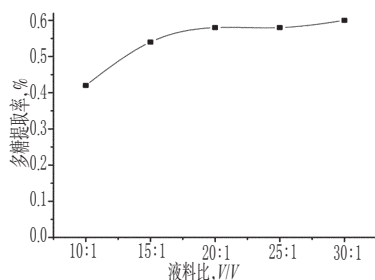


图1 液料比对多糖提取率的影响

Fig 1 Effects of ratio of drug to liquid on the extraction rate of polysaccharide

2.2.2 提取温度对多糖提取率的影响 设定提取时间为 15 min, 超声功率为 280 W, 液料比为 25:1 ( $V/V$ ), 提取溶剂去离子水 pH7, 乙醇体积分数为 80%, 考察提取温度分别为 25、35、45、55、65  $^{\circ}\text{C}$  时多糖提取率的变化。结果, 多糖提取率随着温度的升高而增加, 但温度高于 45  $^{\circ}\text{C}$  后, 增加趋势逐渐平缓, 所以选择 25、35、45、55、65  $^{\circ}\text{C}$  作为响应面分析中的 5 个水平。提取温度对多糖提取率的影响见图 2。

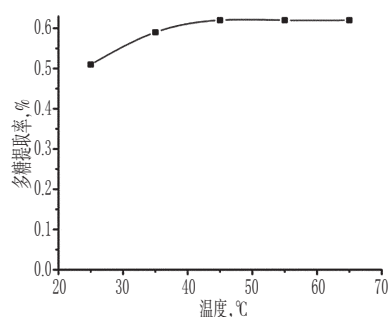


图2 提取温度对多糖提取率的影响

Fig 2 Effects of extracting temperature on the extraction rate of polysaccharide

2.2.3 提取时间对多糖提取率的影响 设定提取温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 超声功率 280 W, 液料比为 25:1 ( $V/V$ ), 提取溶剂去离子水 pH7, 乙醇体积分数为 80%, 考察提取时间分别为 5、10、15、20、25 min 时多糖提取率的变化。结果, 多糖的提取率随着提取时间的延长而增加, 在 15~25 min 之间趋于平缓, 所以选择

5、10、15、20、25 min 作为响应面分析中的 5 个水平。提取时间对多糖提取率的影响见图 3。

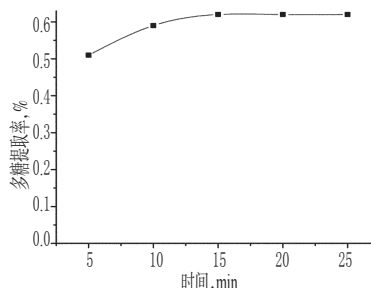


图3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig 3 Effects of extracting time on the extraction rate of polysaccharide

2.2.4 pH 对多糖提取率的影响 设定提取温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 提取时间为 15 min, 液料比为 25:1 ( $V/V$ ), 提取功率为 280 W, 乙醇体积分数为 80%, 考察提取溶剂去离子水 pH 分别为 5、6、7、8、9 时多糖提取率的变化。结果, pH6 时多糖提取率最高, 之后, 随着 pH 增大, 多糖提取率有所下降, 故选择 pH 分别为 5、6、7、8、9 作为响应面分析中的 5 个水平。pH 对多糖提取率的影响见图 4。

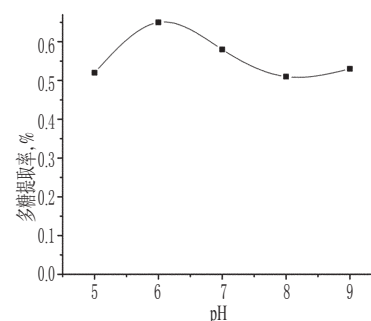


图4 pH对多糖提取率的影响

Fig 4 Effects of pH value on the extraction rate of polysaccharide

## 2.3 响应面分析法优化南方红豆杉多糖超声提取工艺

2.3.1 试验设计与数据统计 在单因素试验基础上, 根据 Central-Composite 的中心组合原理<sup>[10]</sup>, 选定 4 个主要影响因素: pH ( $X_1$ )、提取时间 ( $X_2$ )、提取温度 ( $X_3$ )、液料比 ( $X_4$ ), 每个因素选取 5 个水平, 以多糖提取率为评价指标, 采用响应面分析法优选工艺。因素与水平见表 1; 响应面分析方案与结果见表 2; 模型的方差分析与显著性检验结果见表 3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	$X_1$	$X_2, \text{min}$	$X_3, ^{\circ}\text{C}$	$X_4, V/V$
-2	5	5	25	10:1
-1	6	10	35	15:1
0	7	15	45	20:1
1	8	20	55	25:1
2	9	25	65	30:1

由表 2、表 3 可知, 由于各因素对多糖提取率的影响不是简单的线性关系, 故以多糖提取率为响应值 ( $Y$ ), 采用 SAS9.2 统计软件对表 2 中数据进行多元回归分析, 得到如下回归方程:  $Y=0.612857-0.007083X_1+0.00375X_2+0.01375X_3+0.0087X_4-$

$$0.007\ 902X_1^2+0.001\ 875X_1X_2-0.010\ 625X_1X_3-0.001\ 875X_1X_4-0.006\ 652X_2^2+0.001\ 875X_2X_3+0.005\ 625X_2X_4-0.001\ 652X_3^2+$$

表2 响应面分析方案与结果

Tab 2 Scheme and results of response surface analysis

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	多糖提取率, %
1	6	10	35	15:1	0.58
2	6	10	35	25:1	0.57
3	6	10	55	15:1	0.62
4	6	10	55	25:1	0.65
5	6	20	35	15:1	0.59
6	6	20	35	25:1	0.58
7	6	20	55	15:1	0.61
8	6	20	55	25:1	0.66
9	8	10	35	15:1	0.59
10	8	10	35	25:1	0.56
11	8	10	55	15:1	0.57
12	8	10	55	25:1	0.58
13	8	20	35	15:1	0.58
14	8	20	35	25:1	0.57
15	8	20	55	15:1	0.57
16	8	20	55	25:1	0.63
17	5	15	45	20:1	0.57
18	9	15	45	20:1	0.59
19	7	5	45	20:1	0.58
20	7	25	45	20:1	0.59
21	7	15	25	20:1	0.59
22	7	15	65	20:1	0.62
23	7	15	45	10:1	0.57
24	7	15	45	30:1	0.63
25	7	15	45	20:1	0.61
26	7	15	45	20:1	0.62
27	7	15	45	20:1	0.62
28	7	15	45	20:1	0.61
29	7	15	45	20:1	0.61
30	7	15	45	20:1	0.60
31	7	15	45	20:1	0.62

表3 模型的方差分析与显著性检验结果

Tab 3 Analysis of variance and results of significance test

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F	P
$X_1$	1	0.001 204	0.001 204	5.205 532	0.036 5
$X_2$	1	0.000 338	0.000 338	1.458 990	0.244 6
$X_3$	1	0.004 538	0.004 538	19.615 310	0.000 4
$X_4$	1	0.001 838	0.001 838	7.943 390	0.012 4
$X_1^2$	1	0.001 785	0.001 785	7.718 456	0.013 4
$X_1X_2$	1	0.000 056	0.000 056	0.243 165	0.628 6
$X_1X_3$	1	0.001 806	0.001 806	7.808 298	0.013 0
$X_1X_4$	1	0.000 056	0.000 056	0.243 165	0.628 6
$X_2^2$	1	0.001 265	0.001 265	5.469 611	0.032 7
$X_2X_3$	1	0.000 056	0.000 056	0.243 165	0.628 6
$X_2X_4$	1	0.000 506	0.000 506	2.188 485	0.158 5
$X_3^2$	1	0.000 078	0.000 078	0.337 277	0.569 5
$X_3X_4$	1	0.002 756	0.002 756	11.915 090	0.003 3
$X_4^2$	1	0.000 241	0.000 241	1.040 904	0.322 8
回归	14	0.015 983	0.001 142	4.935 147	0.001 6
残差	16	0.003 701	0.000 231		
总离差	30	0.019 684			

注:  $F_{0.05}(1, 1) = 4.49$ ;  $F_{0.01}(1, 1) = 8.53$

note:  $F_{0.05}(1, 1) = 4.49$ ;  $F_{0.01}(1, 1) = 8.53$

$0.013\ 125X_2X_4-0.002\ 902X_4^2$ 。提取温度的一次项、液料比和提取温度的交互项及回归分析对多糖提取率的影响有统计学意义( $P < 0.01$ )；pH和液料比的一次项、pH和提取时间的二次项、pH和提取温度的交互项对多糖提取率的影响有统计学意义( $P < 0.05$ )。各因素对多糖提取率影响的大小顺序为提取温度的一次项 > 提取温度和液料比的交互项 > 液料比的一次项 > pH值和提取温度的交互项 > pH值的二次项 > 提取时间的二次项 > pH值一次项。

2.3.2 响应面分析 根据上述回归方程,采用 SAS9.2 统计软件绘制各影响因素与响应值之间的三维效应面图和二维等高线图,分别见图5、图6。

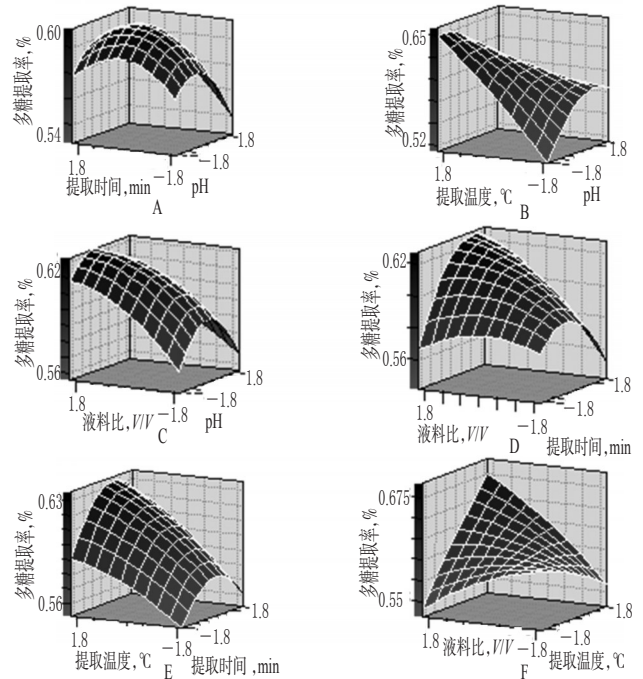


图5 三维效应面图

A.pH和提取时间对多糖提取率的影响[提取温度:45℃,液料比:20:1(V/V)];B.pH和提取温度对多糖提取率的影响[提取时间:15min,液料比:20:1(V/V)];C.pH和液料比对多糖提取率的影响(提取时间:15min,提取温度:45℃);D.提取时间和液料比对多糖提取率的影响(pH:7.0,提取温度:45℃);E.提取时间和提取温度对多糖提取率的影响[pH:7.0,液料比:20:1(V/V)];F.提取温度和液料比对多糖提取率的影响(pH:7.0,提取时间:15min)

Fig 5 three-dimensional response surface

A.Effects of pH value and extraction time on the extraction rate of polysaccharide [temperature: 45℃, ratio of drug to liquid: 20:1(V/V)]; B. Effects of pH value and extraction temperature on the extraction rate of polysaccharide [time: 15 min, ratio of drug to liquid 20:1(V/V)]; C. Effects of pH value and ratio of drug to liquid on the extraction rate of polysaccharide (time: 15 min, temperature: 45℃); D.Effects of extraction time and ratio of drug to liquid on the extraction rate of polysaccharide (pH: 7.0, temperature: 45℃); E.Effects of extraction time and extraction temperature on the extraction rate of polysaccharide [pH: 7.0, ratio of drug to liquid: 20:1(V/V)]; F.Effects of extraction temperature and ratio of drug to liquid on the extraction rate of polysaccharide (pH: 7.0, time: 15 min)

由图5、图6可知,pH与提取时间的交互作用在因素水平设置范围内,其余的都在范围外,根据多糖性质及试验条件所

限,影响因素中pH、提取温度和液料比选取边界值,而提取时间选取极值,即最佳工艺为pH5、加入料液比为30:1(V/V)的提取溶剂,在60℃下提取20min。

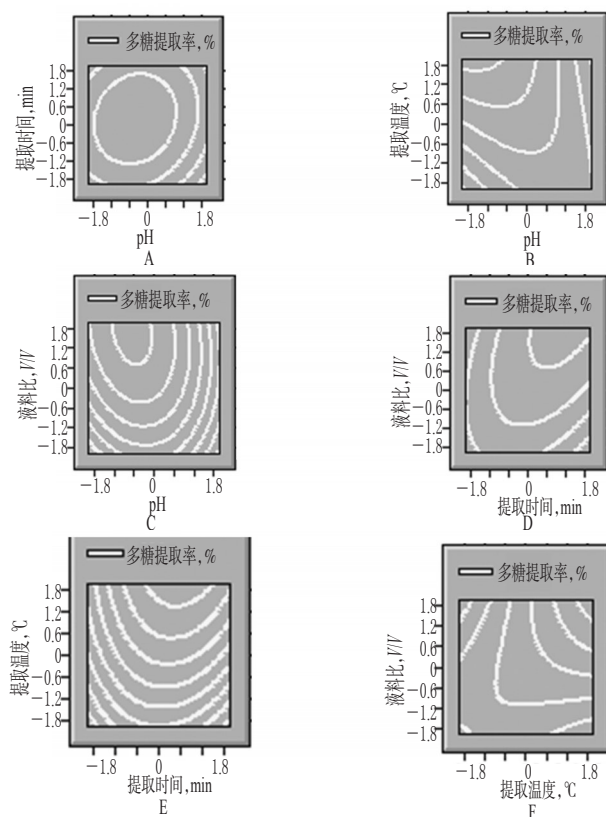


图6 二维等高线图

A. pH和提取时间对多糖提取率的影响[提取温度:45℃,液料比:20:1(V/V)]; B. pH和提取温度对多糖提取率的影响[提取时间:15min,20:1(V/V)]; C. pH和液料比对多糖提取率的影响(提取时间:15min,提取温度:45℃); D.提取时间和液料比对多糖提取率的影响(pH:7.0,提取温度:45℃); E.提取时间和提取温度对多糖提取率的影响[pH:7.0,液料比:20:1(V/V)]; F.提取温度和液料比对多糖提取率的影响(pH:7.0,提取时间:15min)

Fig 6 Two-dimensional contour map

A. Effects of pH value and extraction time on the extraction rate of polysaccharide [temperature: 45℃, ratio of drug to liquid: 20:1(V/V)]; B. Effects of pH value and extraction temperature on the extraction rate of polysaccharide [time: 15min, ratio of drug to liquid: 20:1(V/V)]; C. Effects of pH value and ratio of drug to liquid on the extraction rate of polysaccharide (time: 15min, temperature: 45℃); D. Effects of extraction time and ratio of drug to liquid on the extraction rate of polysaccharide (pH: 7.0, temperature: 45℃); E. Effects of extraction time and extraction temperature on the extraction rate of polysaccharide [pH: 7.0, ratio of drug to liquid: 20:1(V/V)]; F. Effects of extraction temperature and ratio of drug to liquid on the extraction rate of polysaccharide (pH: 7.0, time: 15min)

#### 2.4 工艺验证试验

参照上述最佳工艺条件进行3次验证试验,并测定多糖提取率。结果,多糖提取率理论值为0.70%,实际测得多糖提取率为0.68%,两者的相对误差约为2.9%。根据此结论,在1.0g红豆杉叶粉末中,可得到粗多糖提取物近70mg,其中总多糖的含量为9.7%。

### 3 讨论

单因素试验发现,超声功率在200~320W之间,多糖提取率相差不大,若继续加大超声功率至360W,多糖提取率则明显降低,可能是因为超声功率过强,破坏多糖结构,造成部分多糖降解所致。

目前,关于红豆杉的研究主要集中在紫杉醇类化合物,红豆杉在提取紫杉醇之后,将作为废弃物,这大大浪费了红豆杉资源,也易破坏环境。本研究以南方红豆杉中的多糖为研究对象,可以用原先红豆杉中提取紫杉醇后的残渣,再进行多糖的提取,这对保护红豆杉资源,提高资源的综合利用有积极的意义。

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,超声提取技术的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的有效成分,收率大幅度提高。

#### 参考文献

- [1] 王亚飞,王强,阮晓,等.红豆杉属植物资源的研究现状与开发利用对策[J].林业科学,2012,48(5):117.
- [2] 包维楷,陈庆恒.中国的红豆杉资源及其开发研究现状与发展对策[J].自然资源学报,1998,13(4):375.
- [3] Zhang D, Meng H, Yang HS. Antidiabetic activity of *Taxus cuspidata* polysaccharides in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3):720.
- [4] 周林珠,杨祥良,周井炎,等.多糖抗氧化作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2002,23(4):211.
- [5] Rania Agil, Dave BOomah, Giuseppe Mazza, et al. Optimization of alkylresorcinols extraction from triticale bran using response surface methodology[J]. *Food Bioprocess technol*, 2012, 5(7):2655.
- [6] G Vázquez, A Fernández-Agulló, C Gómez-Castro, et al. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur[J]. *Industrial Crops and Products*, 2012, 35(1):126.
- [7] 吴寿金.现代中草药成分化学[M].1版.北京:中国医药科技出版社,2002:18-20.
- [8] 戴平,黄凤香,曾建红,等.不同醇沉浓度对广西莪术多糖提取率的影响[J].时珍国医国药,2012,23(10):2436.
- [9] 王宏洁,李鹏跃,刘婷,等.苯酚-硫酸法测定清开灵注射液中总多糖的提取率[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(11):3.
- [10] Kong F, Zhang M, Liao S, et al. Antioxidant activity of polysaccharide-enriched fractions extracted from pulp tissue of litchi *Chinensis* sonn[J]. *Molecules*, 2010, 15(4):2152.

(收稿日期:2013-07-13 修回日期:2013-12-01)