

响应面法优化刺五加根废弃物多糖提取工艺的研究

于淼^{1,2,4}, 王冰³, 付叶珊¹, 王树巍¹, 季宇彬^{1,2*}

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

4. 哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 通过响应面法研究和优化刺五加根废弃物多糖的提取工艺。方法 采用苯酚-硫酸法对刺五加根废弃物多糖进行定量分析, 在单因素实验的基础上, 运用响应面法设计对刺五加根废弃物多糖的提取工艺进行优化。结果 响应面优化所得最好条件分别为温度 80 ℃、提取时间 1.5 h、液料比 21, 在最优条件下多糖的平均提取率为 10.14%。结论 响应面法对刺五加根废弃物多糖的提取条件优化合理, 为后续刺五加根废弃物的再资源化开发利用提供一定的理论基础。

关键词: 响应面; 刺五加根废弃物; 多糖; 提取条件; 资源化开发

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)07-1610-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.017

Reaserch on extraction technology of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* waste residue by response surface methodology

YU Miao^{1,2,4}, WANG Bing³, FU Ye-shan¹, WANG Shu-wei¹, JI Yu-bin^{1,2}

1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Engineering Research Center of Natural Anti-tumor Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

3. School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

4. Post-doctoral Research Center of Drugs Research Institute, Harbin 150076, China

Abstract: **Objective** To study and optimize the extraction technology of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* (AS) waste residue by response surface methodology (RSM). **Methods** Phenol-sulfuric acid method was used to quantitatively analyze polysaccharides from AS waste residue. Based on single factor, the extraction process factors of polysaccharides from AS waste residue were optimized by RSM. **Results** The best conditions for the response surface optimization were as follows: extraction temperature was 80 ℃, extracting time was 1.5 h, and liquid-material ratio was 21. The extraction rate of polysaccharide was 10.14% under the optimal conditions. **Conclusion** The extraction conditions of the polysaccharide from AS are optimized by response surface method. This data can provide a theoretical basis for the further exploitation and utilization of the subsequent waste residue of AS.

Key words: response surface; *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms waste residue; polysaccharides; extraction conditions; resource development

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 系五加科植物, 又称坎拐棒子、老虎潦、一百针^[1]。刺五加根废弃物多糖是从刺五加根废弃物提取所得的多糖, 是刺五加中活性成分之一^[2]。刺五加为我国的传统中药, 也是北药重点开

发的药物, 应用量极大, 每年会产生大量的刺五加药渣, 医药行业一般以焚烧的形式将其处理, 这严重的影响了经济的发展并对环境造成了污染^[3-6]。刺五加的主要有效成分为苷类, 刺五加根废弃物中含有大量的多糖未被利用, 研究显示, 刺五加多糖可

收稿日期: 2018-12-29

基金项目: 中国博士后科学基金 (2015M581467); 黑龙江省博士后特别资助 (LBH-TZ1613); 黑龙江省博士后科学基金 (LBH-Z15107); 哈尔滨市青年科技创新人才专项基金 (2013RFQXJ150); 黑龙江省青年创新人才培养计划 (UNPYSCT-2015017); 哈尔滨商业大学校级科研项目 (17XN061); 哈尔滨商业大学研究生创新科研基金项目 (YJSCX2018-544HSD)

作者简介: 于淼 (1982—), 男, 副研究员, 博士, 从事抗肿瘤药物研究。E-mail: yumiao913@163.com

***通信作者** 季宇彬 (1956—), 男, 教授, 博士, 从事抗肿瘤药物研究。E-mail: jyb@hrbcu.edu.cn

以通过下调 survivin 蛋白表达进而诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡,刺五加注射液对小鼠脑缺血-再灌注损伤具有一定保护作用^[7-10],此外,刺五加多糖对肿瘤细胞具有显著的抑制作用,还可以抑制细胞的衰老,调节细胞分裂^[11-13]。响应面法与正交法相比具有实验次数少和时间短等优点,对实验数据的分析也更加全面^[14]。据文献报道,刺五加根废弃物中含有大量多糖,故本实验主要以刺五加根废弃物为研究对象,以单因素实验为基础,应用响应面法优化刺五加根废弃物多糖的提取条件^[15-16],为刺五加根废弃物的工艺研究和刺五加根废弃物再资源化提供理论基础,为促进中药产业向科技型和节约型转变,实现健康可持续发展提供技术支撑。

1 材料与试剂

1.1 材料

刺五加根切片购于药材市场,经黑龙江省药品检验所王清华教授鉴定为五加科五加属植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms 干燥根;苯酚(批号 20161107)、浓硫酸(批号 20160211)、无水乙醇,广州市虎傲化工有限公司;葡萄糖对照品,批号 20171219,质量分数 $\geq 98\%$,西安裕华生物科技有限公司;所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

HWS-11 恒温水浴锅,上海梅香仪器有限公司;电子天平,沈阳龙腾公司;旋转蒸发器,济南腾览仪器有限公司;紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取

根据《中国药典》2015 年版,称取一定量刺五加根切片,70%乙醇加热回流提取 1 h,将提取后的刺五加根药渣干燥即得刺五加根废弃物。取刺五加根废弃物 20 g,加入一定体积的蒸馏水,加热回流提取 2 h,浓缩,烘干,得刺五加根废弃物多糖 371.35 mg,得率为 1.86%。

2.2 多糖含量的测定

2.2.1 标准曲线的绘制(苯酚-硫酸法^[17]) 精密量取葡萄糖对照品 0.100 g,置于 100 mL 量瓶中,蒸馏水定容,精确量取葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,蒸馏水补足至 1 mL,依次加入 1 mL 的 5%苯酚溶液、5 mL 浓硫酸,100 ℃水中持续加热 0.25 h,20 ℃水中冷却 0.5 h,紫外分光光度计于 490 nm 处测定其吸光度(A),

采用 Excel 软件对各组质量浓度(横坐标)所对应的 A 值(纵坐标)进行数据处理,得回归方程为 $Y=10.775 X+0.106 9$, $r^2=0.993 4$,表明多糖的质量浓度与 A 值具有良好的线性关系。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取样品 100 mg 置于 100 mL 量瓶中,蒸馏水定容,准确量取 0.20 mL 于 10 mL 量瓶中,按“2.2.1”项下操作测定 A 值,计算多糖提取率。

多糖提取率=多糖提取物中经测定得到多糖的质量/原药渣经多糖测定所含的多糖质量

2.2.3 精密度试验 取葡萄糖对照品溶液,进行连续 6 次试验,求得其 RSD 为 1.4%,显示仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 准确量取“2.2.2”项下供试品溶液 6 份,按“2.2.1”项下操作测定其 A 值,求得 RSD 为 1.5%,显示本法重复性好。

2.2.5 稳定性试验 依次在 0、10、20、30、40、50、60 min 测定供试品溶液的 A 值,得 RSD 为 0.8%,证明其在 1 h 内非常稳定。

2.2.6 加样回收率试验 准确量取 6 份同批次已知浓度的刺五加根废弃物多糖溶液,向其中分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg 葡萄糖对照品,依次加入 1 mL 的 5%苯酚溶液,5 mL 浓硫酸,100 ℃水中持续加热 0.25 h,20 ℃水中冷却 0.5 h,紫外分光光度计于 490 nm 处,测定各组 A 值,求得平均回收率为 99.1%,RSD 为 1.3%,显示本法加样回收率良好。

2.3 单因素实验

2.3.1 提取时间对提取率的影响 分别取刺五加根废弃物 20 g、蒸馏水 400 mL 置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,分别提取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,滤过,浓缩,向浓缩液中加入 4 倍量浓缩液体积的 80%乙醇溶液醇沉过夜(预试验结果显示,以 80%乙醇溶液醇沉所得多糖的质量最大),取沉淀物烘干,采用苯酚-硫酸法于 490 nm 处检测 A 值,计算提取率。结果提取率分别为 4.18%、9.18%、7.98%、7.46%、7.13%。结果显示提取时间在 1.0~1.5 h 时提取率升高较快,1.5 h 后多糖的提取率缓慢下降,这可能是因为随着提取时间的延长,热水致使刺五加根废弃物中大分子多糖分解,导致多糖提取量略有下降。此外,提取时间过长还会使溶解的杂质增多,使多糖的纯度降低,因此最佳提取时间为 1.5 h。

2.3.2 提取温度对提取率的影响 分别取刺五加根

废弃物 20 g、蒸馏水 400 mL 置于 1 000 mL 圆底烧瓶中, 分别在 50、60、70、80、90 °C 的条件下进行提取, 滤过, 浓缩, 向浓缩液中加入 4 倍量浓缩液体积的 80%乙醇溶液醇沉过夜, 取沉淀物烘干, 采用苯酚-硫酸法于 490 nm 处检测 A 值, 计算提取率。结果提取率分别为 6.11%、6.98%、7.23%、9.03%、6.42%。结果表明提取温度在 50~80 °C 时两者呈正比关系, 80 °C 时刺五加根废弃物多糖的提取率达到峰值, 提取温度在 80~90 °C 时提取率呈递减趋势, 产生这一现象的原因可能是因为较高温度破坏了部分浸出的多糖, 蛋白质等杂质的析出也将增加, 从而使多糖的提取量略有降低。因此, 刺五加根废弃物多糖的最佳提取温度为 80 °C。

2.3.3 液料比对提取率的影响 分别取刺五加根废弃物 20 g 置于 1 000 mL 圆底烧瓶中, 分别以 10、20、30、40、50 的液料比进行提取, 滤过, 浓缩, 向浓缩液中加入 4 倍量浓缩液体积的 80%乙醇溶液醇沉过夜, 取沉淀物烘干, 采用苯酚-硫酸法于 490 nm 处检测 A 值, 计算提取率。结果提取率分别为 2.03%、9.12%、3.43%、2.87%、2.34%。结果表明液料比在 10~20 时提取率升高迅速, 液料比在 20~50 时提取率逐渐下降, 这可能是由于当溶剂体积过少时, 不利于多糖的彻底溶解。当溶剂用量越多, 随之扩散到溶剂里的多糖就越多, 并且会使其他杂质同时溶出, 从而影响刺五加根废弃物多糖的溶出。因此, 刺五加根废弃物多糖的最佳液料比为 20。

2.4 响应面实验

选取 Box-Behnken 中心组合原理对以单因素的实验基础的 3 因素 3 水平进行实验设计, 优化刺五加废弃物多糖的提取条件, 实验因子及水平见表 1。利用响应面法对以单因素实验结果为基础的提取时间 (A)、提取温度 (B)、液料比 (C) 3 个自变量, 以提取率 (Y) 为响应值进行分析, 实验结果见表 1。共有 17 组实验, 中心实验为第 1、7、9、12、17 组, 其他组为非中心实验, 三维顶点为 A 、 B 、 C 的取值, 零点是其中中心点, 共重复 5 次实验, 用来估计实验误差。ANOVA 分析结果见表 2。

3 个因子经过拟合得到的回归方程为 $Y=10.15-0.16 A-0.024 B+0.39 C+0.058 AB+0.080 AC+0.075 BC-2.61 A^2-2.87 B^2-2.74 C^2$, $r^2=0.946 9$ 。从表 2 中的分析结果可以知道 $r^2=9.588$, 显示此实验方法可靠, 表明方程分析 3 因素 3 水平是真实可行的。由表 2 中 P 值可知, 刺五加根废弃物多糖的

表 1 回流提取法响应面实验方案及结果

Table 1 Experimental scheme and results of reflux extraction for response surface

实验号	A/h	B/°C	C	Y/%
1	1.50 (0)	80.00 (0)	20.00 (0)	10.43
2	2.00 (+1)	90.00 (+1)	20.00	4.43
3	1.50	90.00	10.00 (-1)	4.21
4	1.50	70.00 (-1)	30.00 (+1)	4.73
5	2.00	70.00	20.00	4.74
6	1.50	70.00	10.00	4.04
7	1.50	80.00	20.00	9.78
8	2.00	80.00	30.00	5.01
9	1.50	80.00	20.00	10.21
10	2.00	80.00	10.00	4.13
11	1.00	80.00	10.00	4.76
12	1.50	80.00	20.00	10.15
13	1.00	80.00	30.00	5.32
14	1.50	90.00	30.00	5.21
15	1.00	90.00	20.00	4.49
16	1.00	70.00	20.00	5.03
17	1.50	80.00	20.00	10.19

表 2 响应面 ANOVA 分析结果

Table 2 Response surface of ANOVA analysis results

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	107.55	9	150.05	<0.000 1
A	0.21	1	2.16	0.150 1
B	4.512×10^{-3}	1	0.057	0.818 7
C	1.23	1	15.48	0.005 6
AB	0.013	1	0.17	0.695 8
AC	0.026	1	0.32	0.588 4
BC	0.022	1	0.28	0.611 5
A^2	28.68	1	360.10	<0.000 1
B^2	34.68	1	435.42	<0.000 1
C^2	31.55	1	396.14	<0.000 1
参差	0.56	7	—	—
交互	0.34	3	2.04	0.251 2
纯误差	0.22	4	—	—
总离差	108.10	16	—	—

提取率受 A^2 、 B^2 、 C^2 的影响十分明显, 显示平方项与响应值有很大的联系, 两者不仅是简单的线性关系。响应面法优化所得三者的 3D 图见图 1。由图 1 可知, 椭圆的中心点是原点, 由 A - B 3D 图可知, 时间与温度具有较大的交互作用, 使得时间和温度的值与提取率有反比的趋势, 这可能由于温度过高致使多糖分解。由 A - C 3D 图可知, 两者之间具有较大的影响, 实际值较大的时间和液料比使 Y 有减

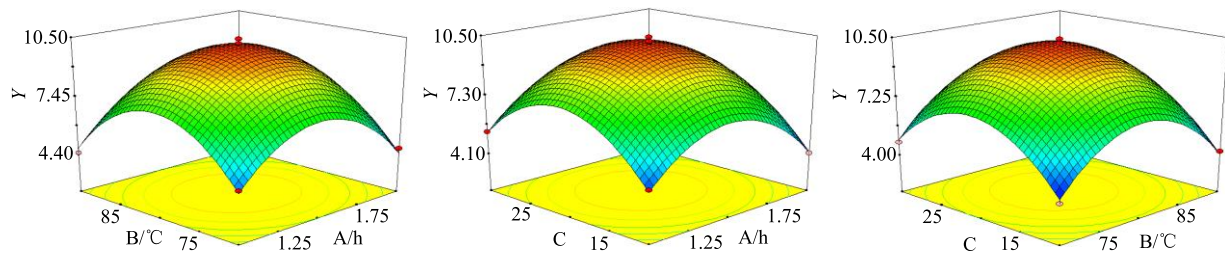


图 1 响应面 3D 图

Fig. 1 Response surface 3D map

小的倾向,可能是提取时间过长导致多糖发生降解,此外,可能有其他杂质溶出,从而影响刺五加根废弃物多糖的溶出。由 B-C 3D 图可知,两者具有较强的影响,实际值较大的液料比和温度使 Y 有减小的倾向,这种现象可能是由于热水致使刺五加根废弃物中大分子多糖分解或有其他杂质溶出,从而影响刺五加根废弃物多糖的溶出。所得刺五加根废弃物多糖的理论最优条件是提取所需的时间、温度、液料比分别为 1.49 h、79.97 °C、20.71,理论提取率为 10.17%。结合现实情况,刺五加根废弃物多糖的最优条件被确定为提取所需的时间为 1.5 h、温度为 80 °C,液料比为 21。在最佳条件下进行重复 3 次实验,实际提取率分别为 10.09%、10.23%、10.11%,平均值为 10.14%,验证结果与理论最佳提取率相近,表明所得结果准确可靠。

3 讨论

正交法是目前多糖提取工艺中,应用较为广泛的一种方法,但其只能通过因素水平组合,无法优化出最佳组合,因此本实验以单因素实验为基础,选取响应面法对刺五加根废弃物多糖的提取条件进行优化。研究结果显示,3 个因素的平方项对提取率具有较大的影响。证明其对提取率的影响不只是线性关系,回归分析和验证实验结果显示响应面法真实、合理、可行。

参考文献

- [1] 范惠霞,邓志鹏,王福文,等. 刺五加注射液在正常大鼠与脑缺血-再灌注损伤疾病大鼠体内药动学比较 [J]. 中成药, 2015, 37(6): 1215-1221.
- [2] Meng Q, Pan J, Liu Y, et al. Anti-tumour effects of polysaccharide extracted from *Acanthopanax senticosus* and cell-mediated immunity [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1694-1701.
- [3] 靳 伟,肖 锋,武均宜,等. 刺五加多糖下调 survivin 蛋白表达诱导 HeLa 细胞凋亡 [J]. 中成药, 2016, 38(4): 902-904.
- [4] 张 静,温 暖,刘阳洋,等. 响应面法优化蒲公英根

- 多糖超声辅助提取工艺 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2018, 34(2): 209-215.
- [5] 郝 颖,东 方,金莉娜,等. 响应面法优化黄芪多糖提取工艺 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2013, 29(1): 22-26.
- [6] 张婷婷,李艺丹,郑凯旋,等. 多指标综合加权评分法结合 D-最优设计响应面法优选酒川芎的炮制工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3639-3644.
- [7] 何晨阳,刘明月,时振伟,等. 响应面法优化蛇莓花色苷浸提工艺及稳定性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1829-1834.
- [8] Bräunlich P M, Inngjerdigen K T, Inngjerdigen M, et al. Polysaccharides from the South African medicinal plant *Artemisia afra*: Structure and activity studies [J]. *Fitoterapia*, 2018, 124: 182-187.
- [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): 649-652.
- [10] 张 娜,毛 迪,安柏松,等. 刺五加多糖对免疫性肝损伤 BALB/c 小鼠 IL-2、IL-4、INF- γ 细胞因子及 mRNA 表达的影响 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 557-561.
- [11] 刘喜舞,郑礼胜,谢 霞,等. 细柱五加叶多糖提取分离纯化及保湿性能研究 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1167-1173.
- [12] 张英楠. 刺五加多糖对鸡的免疫调节作用及其机理研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [13] Udoetok I A, Wilson L D, Headley J V. Self-assembled and cross-linked animal and plant-based polysaccharides: Chitosan-cellulose composites and their anion uptake properties [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2016, 8(48): 33197-33209.
- [14] 劳风云,张志斐,邢朝斌. 高效液相色谱法测定不同产地刺五加根、茎中绿原酸的含量 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(6): 930-931.
- [15] 何晨阳,刘明月,时振伟,等. 响应面法优化蛇莓花色苷浸提工艺及稳定性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1829-1834.
- [16] 孟庆龙. 长白山刺五加多糖开发的药理基础研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [17] 俞 娟,刘劲松,王 刚,等. 响应面法优化马兰多糖提取工艺研究 [J]. 中成药, 2015, 37(1): 222-225.