

文章编号:1001-6880(2014)3-0438-06

响应面分析法优化金蝉花多糖的提取工艺

王吉标¹,欧阳臻^{1*},赵明^{1,2},尚磊¹,王璠¹,汪愿¹,杨婧骅³¹江苏大学药学院; ²江苏大学附属医院; ³江苏大学京江学院,镇江 212013

摘要:利用响应面分析法优化金蝉花多糖的提取工艺。以金蝉花多糖得率为指标,采用单因素和响应面法对料液比、提取温度、提取时间、提取次数进行考察,优选出最佳提取工艺为:料液比 1:23(g:mL),提取温度 88 ℃,提取时间 97 min,提取 2 次,实际测得金蝉花多糖得率为 6.787%,与模型预测值基本相符。该模型可很好地预测金蝉花多糖的得率,响应面分析法对金蝉花多糖提取条件优化合理可行。

关键词:金蝉花;多糖;提取;响应面

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Cordyceps cicadae* by Response Surface Methodology

WANG Ji-biao¹, OUYANG Zhen^{1*}, ZHAO Ming^{1,2}, SHANG Lei¹, WANG Fan¹, WANG Yuan¹, YANG Jin-hua³¹School of Pharmacy, Jiangsu University; ²Affiliated Hospital of Jiangsu University;³School of Jinjiang, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: The objective of this study was to optimize the extraction process of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* by response surface methodology (RSM). Extraction temperature, extraction duration, solid-liquid ratio and times of extraction were investigated by single factor tests and RSM using the yield of polysaccharides from *C. cicadae* as index. The optimum extraction conditions of polysaccharides were optimized as follows: extraction temperature of 88 ℃, solid-liquid ratio of 1:23, extraction duration of 97 min and with two times of extraction. Under the optimized condition, the yield of polysaccharides was determined to be 6.787%, which was in line with predicted value. Hence, it was concluded that the model well predicted the yield of polysaccharides from *C. cicadae*, and RSM was applicable and feasible for the optimization of the extraction process of polysaccharides from *C. cicadae*.

Key words: *Cordyceps cicadae*; polysaccharides; extraction; response surface methodology

金蝉花为麦角菌科真菌大蝉草(*Cordyceps cicadae* Shing)及其寄主山蝉(*Cicada flammata* Dist)若虫形成的干燥复合体,其性味甘寒,具散风热,定惊镇痉作用^[1]。与冬虫夏草的无性型同属,具有调节免疫功能和脂类代谢,提升机体的营养状况和抗疲劳抗应激、解热镇痛、滋补强壮等作用^[1]。金蝉花主要含有多糖、腺苷、虫草酸、氨基酸、多球壳菌素、麦角甾醇等多种化学成分^[2]。现代药理研究表明,金蝉花多糖为其主要活性成分之一,具有明显的免疫调节^[3]、改善肾功能^[4]、抗肿瘤^[5]等药理活性,具有广泛的研究价值和应用前景。但目前对优化金蝉花多糖提取工艺的研究较少,本实验采用响应面分

析法^[6]考察关键工艺参数对金蝉花多糖得率的影响,优化其提取工艺,以期为金蝉花资源的深入开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生金蝉花,采自句容市天王镇磨盘山,由江苏大学药学院欧阳臻教授鉴定;石油醚、乙醇、浓硫酸、苯酚和葡萄糖均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;高纯水(实验室自制)。

1.2 仪器与设备

SHB-111 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;HHS-1 恒温水浴锅,上海浦东跃新科学仪器厂;MP502B 电子天平,上海精密科学仪器有限公司;1810-B 型自动双重纯水蒸馏器,上海申立玻璃仪器公司;DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱,

收稿日期:2013-04-10 接受日期:2013-06-13

基金项目:国家自然基金项目(81072985-H2801);江苏大学第十一一批学生科研立项资助项目(11A162)

* 通讯作者 E-mail:zhenouyang@ujs.edu.cn

上海恒科学仪器有限公司;UV-2102PCS型紫外可见分光光度计,上海尤尼柯分析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 金蝉花多糖提取与含量测定^[7]

取干燥的金蝉花 100.0 g, 经高速粉碎机粉碎, 过 80 目筛后, 置于 1000 mL 圆底烧瓶中, 加入 600 mL 石油醚回流提取 2 次, 每次 2 h, 挥干石油醚后, 在干燥箱中 40 ℃ 烘干, 得脱脂后的金蝉花干燥粉末, 备用。精密称取脱脂后的金蝉花干燥粉末 1.0 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 按照一定的料液比、提取温度、提取时间、提取次数进行回流提取, 趁热抽滤, 用少量热水洗涤滤器, 合并滤液与洗液, 放冷, 移至 250 mL 量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摆匀。根据苯酚-硫酸法测定吸光度, 计算金蝉花多糖含量, 按以下公式计算金蝉花多糖得率。

$$\text{金蝉花多糖得率}(\%) = (\text{多糖质量}/\text{药材质量}) \times 100\%$$

1.3.2 标准曲线的绘制

准确称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 114.6 mg, 将其定容至 100 mL 容量瓶中, 得到 1.146 mg/mL 的储备液。精密量取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容, 吸取上述溶液各 2.0 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL 摆匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 摆匀, 放置 5 min, 水浴加热 15 min, 冷却至室温, 用 2 mL 纯水同法操作做空白, 于 490 nm 处测定吸光度。以对照品溶液浓度为横坐标 x, 吸光度测定值为纵坐标 y, 绘制标准曲线。用最小二乘法计算得到回归方程为 $y = 0.0134x + 0.0111$, $r = 0.9996$ 。在 11.46 ~ 68.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间葡萄糖对照品浓度与吸光度呈良好的线性关系。

1.3.3 单因素试验设计

1.3.3.1 提取温度的选择。

以金蝉花多糖得率为指标, 在固定提取时间 60 min, 料液比 1:20, 提取次数 2 次的条件下, 考察不同提取温度(60、70、80、90、100 ℃)的提取效果。以得率为纵坐标, 提取温度为横坐标作图。

1.3.3.2 提取时间的选择。

以金蝉花多糖得率为指标, 在固定提取温度 90 ℃, 料液比 1:20, 提取次数 2 次的条件下, 考察不同提取时间(30、60、90、120、150 min)的提取效果。以得率为纵坐标, 提取时间为横坐标作图。

1.3.3.3 料液比的选择。

以金蝉花多糖得率为指标, 在固定提取温度 90 ℃, 提取时间 90 min, 提取次数 2 次的条件下, 考察不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)的提取效果。以得率为纵坐标, 料液比为横坐标作图。

1.3.3.4 提取次数的选择。

以金蝉花多糖得率为指标, 在固定提取温度 90 ℃, 提取时间 90 min, 料液比 1:20 的条件下, 考察不同的提取次数(1、2、3、4 次)的提取效果。以得率为纵坐标, 提取次数为横坐标作图。

1.3.4 响应面试验设计

依据单因素试验结果确定因素水平范围, 利用 Design-Expert Software 8.0.6 为辅助手段设计响应面试验。根据中心组合设计原理, 以提取温度、提取时间、料液比 3 个因素为自变量, 多糖的得率为响应值, 设计了 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验, 其中 12 个为析因试验, 5 个为中心试验, 其因素水平分析选取见表 1。

表 1 响应面因素水平编码

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素 Factor	代码 Code	编码水平 Coding level		
		-1	0	1
提取温度(℃) Extraction temperature	A	80	90	100
提取时间(min) Extraction duration	B	60	90	120
料液比(g:mL) Solid-liquid ratio	C	1:10	1:20	1:30

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取温度对多糖得率的影响。

由图 1 可知, 随着提取温度的升高, 金蝉花多糖的得率逐渐增大, 但提取温度超过 90 ℃ 后, 多糖得率反而略显下降, 这可能是因为温度的升高导致多糖部分水解, 使其得率有所下降。因此选择温度为 90 ℃ 左右为宜。

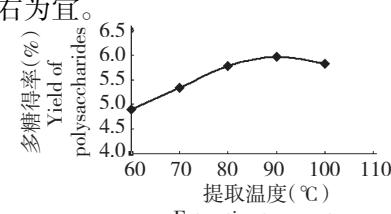


图 1 提取温度对多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on the extraction yield of polysaccharides

2.1.2 提取时间对多糖得率的影响。

由图2可知,在90 min之前,随着提取时间延长,多糖得率逐渐上升,超过90 min,多糖得率缓慢下降。这可能是随着提取时间的延长,其它成分也同时被提取出,这也会影响到金蝉花多糖的得率。因此选择提取时间为90 min左右较适宜。

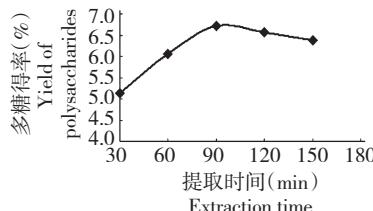


图2 提取时间对多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction duration on the extraction yield of polysaccharides

2.1.3 料液比对多糖得率的影响。

由图3可知,随料液比的增加,多糖得率逐渐增加,当料液比为1:20时出现了峰值,随后就趋于平缓,并伴有下降趋势。这可能是因为金蝉花多糖几乎被全部溶出后,过多加水增大了其他杂质的大量溶出,还会使浓缩过程中多糖损失增大,从而导致金蝉花多糖得率有所降低。因此选择料液比1:20为宜。

2.1.4 提取次数对多糖得率的影响。

由图4可知,随着提取次数的增加,多糖得率逐渐增加。提取2次后,金蝉花多糖得率不再明显增加,这说明提取2次后,金蝉花多糖已经基本提取完全。提取次数越多,有效成分得率就越高,但是相对

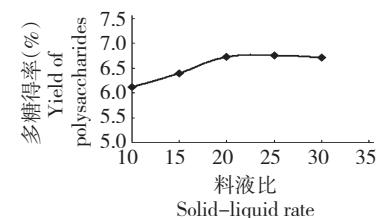


图3 料液比对多糖得率的影响

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

成本提高,综合考虑选择提取次数为2次比较合适。

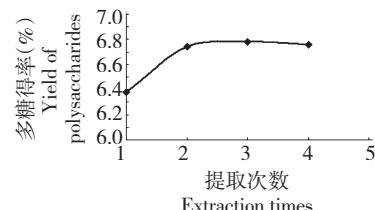


图4 提取次数对多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of times of extraction on extraction yield of polysaccharides

2.2 响应面试验设计结果

2.2.1 建立模型方程与显著性检验。

按照“1.3.4”进行响应面分析试验,方案与结果见表2。用Design-Expert(8.0.6版本)软件对表2中的数归拟合得提取温度(A)、提取时间(B)、料液比(C)与金蝉花多糖之间的二次多项回归方程: $Y = 6.80 - 0.11A + 0.061B + 0.31C - 0.065AB + 0.10AC - 0.048BC - 0.75A^2 - 0.23B^2 - 0.48C^2$ 。

表2 响应面分析试验结果

Table 2 Design and results of response surface methodology test

试验序号 No.	编码水平 Coding level			多糖得率 Yield of polysaccharides(%)
	A	B	C	
1	-1	1	0	6.02
2	0	0	0	6.82
3	1	0	-1	5.05
4	1	-1	0	5.75
5	0	-1	-1	5.63
6	1	0	1	5.90
7	0	0	0	6.80
8	1	1	0	5.64
9	0	0	0	6.87
10	0	1	1	6.46
11	-1	-1	0	5.87

12	0	-1	1	6.33
13	0	0	0	6.78
14	-1	0	1	5.89
15	0	1	-1	5.95
16	0	0	0	6.74
17	-1	0	-1	5.44

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of the regression model

来源 Source	平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F	P(Pr > F)
Model	4.88	9	0.54	114.61	<0.0001 ***
A	0.097	1	0.097	20.47	0.0027 **
B	0.030	1	0.030	6.35	0.0399 *
C	0.79	1	0.79	166.52	<0.0001 ***
AB	0.017	1	0.017	3.57	0.1006
AC	0.040	1	0.040	8.46	0.0227 *
BC	9.025E-003	1	9.025E-003	1.91	0.2096
A^2	2.38	1	2.38	503.81	<0.0001 ***
B^2	0.22	1	0.22	47.00	0.0002 **
C^2	0.97	1	0.97	204.91	<0.0001 ***
残差 Residual	0.033	7	4.729E-003		
失拟项 Lack of Fit	0.024	3	7.942E-003	3.42	0.1328
纯误差 Pure Error	9.280E-003	4	2.320E-003		
总离差 Cor Total	4.91	16			

注: *** $P < 0.001$ 为极显著, ** $P < 0.01$ 为高度显著, * $P < 0.05$ 为显著。

Note: *** $P < 0.001$ means extremely significant, ** $P < 0.01$ means highly significant, * $P < 0.05$ means significant.

表 4 回归方程可信度分析

Table 4 Credibility analysis of regression equations

项目 Item	变异系数 c. v. %	拟合系数 R-Squared	校正拟合系数 Adj R-Squared	预测拟合系数 Pred R-Squared	信噪比 Adeq Precision
	1.12	0.9933	0.9846	0.9194	33.288

对上述回归模型进行显著性检验, 表 3 方差分析结果可知, 一次项中, C(料液比)对多糖得率的线性效应极显著($P < 0.001$), A(提取温度)对多糖得率的线性效应高度显著($P < 0.01$), B(提取时间)对多糖得率的线性效应显著($P < 0.05$), 二次项中, A^2 、 B^2 、 C^2 影响均极显著($P < 0.001$), AC 影响显著($P < 0.05$), AB 和 BC 影响不显著($P > 0.05$), 表明各个影响因素与响应值不是简单的线性关系。在该试验设计范围内, 该模型显著性检测 $P < 0.001$, 极显著, 模型的复相关系数为 0.9933, 说明该模型能

解释 99.33% 响应值的变化, 即该模型与实际试验拟合良好, 试验误差小, 证明应用响应曲面法优化的提取工艺提取金蝉花多糖是可行的。同时, 由 F 值的大小可以推断, 在所选择的试验范围内, 3 个因素对多糖提取得率影响的排序为料液比(C) > 提取温度(A) > 提取时间(B)。方差分析及回归系数显著性检验结果见表 3, 回归方程可信度分析见表 4。

2.2.2 响应曲面分析

根据回归方程, 作出响应面和等高线, 考察拟合响应面的形状, 分析提取温度、提取时间、料液比对

金蝉花多糖提取得率的影响。各因素及其相互作用对相应值的影响可以通过各图直观反应出来。De-

sign-Expert Software 8.0.6 软件处理后三维响应面和等高线图见图 5~7。

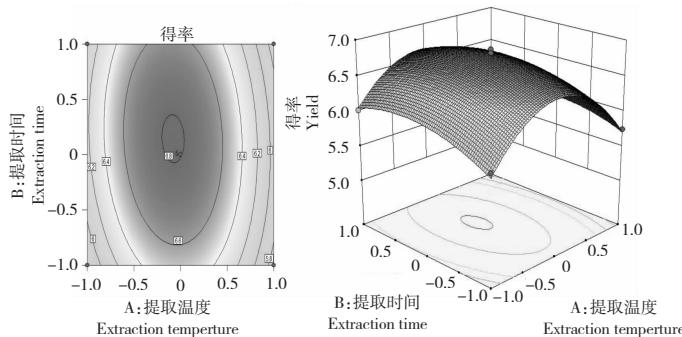


图 5 提取温度、提取时间的等高线和响应面图

Fig. 5 Contour plot and response surface plot for interactive effect of extraction temperature and extraction time on extraction yield of polysaccharides

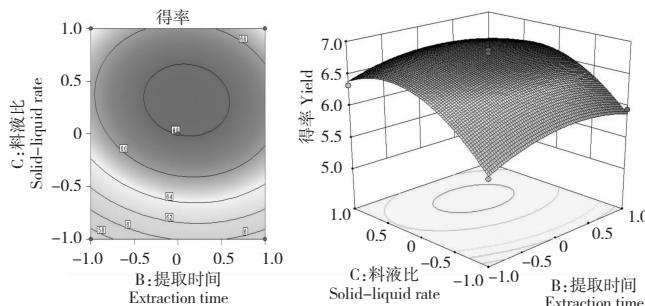


图 6 提取时间、料液比的等高线和响应面图

Fig. 6 Contour plot and response surface plot for interactive effect of extraction time and solid-liquid ratio on extraction yield of polysaccharides

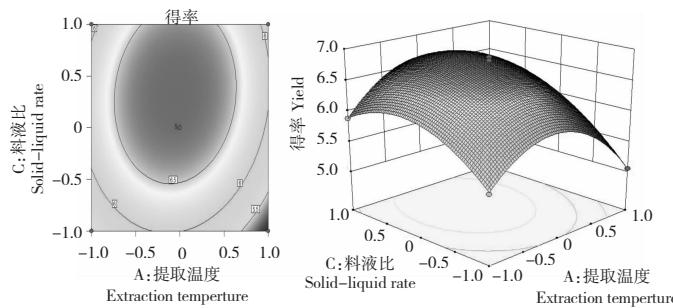


图 7 提取温度、料液比的等高线和响应面图

Fig. 7 Contour plot and response surface plot for interactive effect of extraction temperature and solid-liquid ratio on extraction yield of polysaccharides

从响应面的最高点和等高线可以看出在所选的范围内存在极值,响应面的最高点同时也是等值线中的最小椭圆的中心点。图 5~7 表明,3 因素对金蝉花多糖的提取都有显著的影响,料液比的影响最为显著,随加水量的增加,多糖得率随之增大,表现为曲面陡峭;提取温度的影响相对显著,表现为曲

面相对较陡峭;提取时间的影响次之,表现为曲面较平缓,且随其数值的增加或减少,响应值变化较小。从图 5、6 可以看出,A 与 B、B 与 C 交互作用并不显著,它们对 Y 值的影响规律并不会随着另一因素的改变而有明显变化。图 7 表明 A、C 交互作用显著,在所选范围内,A 取不同的编码值 C 对 Y 的影响表

现出不同的规律;同样,C 取不同的编码值时 A 对 Y 的影响规律也呈一定的变化趋势。3 个因素对 Y 值的影响以及各因素之间的交互影响与表 3 方差分析结果一致。

2.2.3 最优条件的确定

根据所得到的模型,可预测在稳定状态下的最大响应值为 $Y = 6.858\%$,对响应面结果利用软件进行优化分析,以多糖得率为评价指标,得到金蝉花多糖相应的提取工艺优化条件为:提取温度 $88.43\text{ }^{\circ}\text{C}$,料液比 $1:23.15$,提取时间 96.29 min 。为检验响应面分析法所得结果的可靠性,采用上述优化条件进行金蝉花多糖的提取试验,考虑到实际情况,将修正后的最佳提取条件定为提取温度 $A = 88\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间 $B = 97\text{ min}$,料液比 $C = 1:23$,提取 2 次,共进行 3 次平行试验,得到金蝉花多糖平均得率为 6.787% ($\text{RSD} = 0.97\%$),与理论预测值 6.858% 的相对误差为 -0.96% 。此结果与预测值接近,说明此模型可靠,适用于金蝉花多糖提取工艺的优化。

3 结论

本实验采用单因素试验和响应面分析法优化金蝉花多糖的最佳提取工艺为提取温度 $A = 88\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间 $B = 97\text{ min}$,料液比 $C = 1:23$,提取 2 次,此条件下金蝉花多糖平均提取得率为 6.787% 。回归分析和验证试验结果表明,模型可较好地预测金蝉花多糖得率,从而也说明了采用响应面分析法对金蝉花多糖提取条件优化合理可行,具有实际应用价值。

参考文献

- Wang CL (王春雷), Lu BZ (芦柏震), Hou GL (侯桂兰). The research progress of Chinese *Cordyceps cicadae*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2006, 41: 244-247.
- Xu HJ (徐红娟), Mo ZH (莫志宏), Yu JW (余佳文), et al. Research progress on active ingredients of *Cordyceps cicadae*. *China Pharm* (中国药业), 2009, 18(4): 19-20.
- Jin LQ (金丽琴), Lv JX (吕建新), Yang JZ (杨介钻), et al. The active effects of PCPS on the immune inhibition of macrophage in rats. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 1217-1220.
- Jin ZH (金周慧), Chen YP (陈以平). The Mechanism study of *cordyceps sobolifera* mycelium preventing the progression of glomerulosclerosis. *Chin J Chin-west Nephropath* (中国中西医结合肾病杂志), 2005, 6: 132-136.
- Chen PK (陈柏坤), Yang JZ (杨介钻), Zhuo J (卓佳). The modulating effects of PCPS on proliferative activity of mono-nuclear cell and leukemic cell line U937 and K562 in human peripheral blood. *J Wenzhou Med Coll* (温州医学院学报), 2006, 36: 341-344.
- He YF (何彦峰), Yang RM (杨仁明), Hu N (胡娜), et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from Fenugreek by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1463-1467.
- China Pharmacopoeia Committee (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: Chemistry Industry Press, 2010. Vol I, 232-233.

(上接第 418 页)

- Yu F (余凡), Lei Y (雷迎), Ren JR (任坚忍), et al. Study on extraction and stability of pigment from *Lagerstroemia indica* flowers. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33: 231-234.
- Tang KH (唐克华), Yu HZ (于华忠), Gong J (龚剑), et al. Microwave-assisted extraction techniques and some properties of anthocyanidin in *Loropetalum chinense* var. *rubrum* Flowers. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2005, 25: 568-574.
- Wang Z (王璋), Xu SY (许时婴), Tang J (汤坚). *Food Chemistry* (食品化学). Beijing: China Light Industry Press, 1999. 288-291.
- Yu J (余杰), Guo HM (郭慧敏), Chen MZ (陈美珍). Study on the physicochemical properties and extraction process of red pigment from *He Dong Black Wheat*. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2002, 28(11): 12-16.