

响应面法优化蒙古黄芪多糖提取工艺

郭宏,张竞男,姜丽丽,苑红,薛昕,马春丽,徐宋瑶,邓凤,薛慧婷,扈瑞平*

内蒙古医科大学 基础医学院,呼和浩特 010110

摘要:现代研究证实,黄芪多糖是蒙古黄芪的主要成分,具有调节人体免疫功能、加强细胞代谢能力等功效。为了最大限度地优化黄芪中黄芪多糖的提取率。本实验以蒙古黄芪为原料,黄芪多糖提取率为检测指标,分别考察液料比、提取温度、乙醇浓度和提取时间以上4个不同因素对蒙古黄芪多糖提取率的影响。利用Box-Behnken构建响应面的方法,综合4种因素的影响,分析优化蒙古黄芪多糖的提取工艺,并对提取率进行预测。通过验证,蒙古黄芪多糖最佳提取工艺为液料比为11:1(mL:g),提取温度80℃,乙醇浓度95%,提取时间100min,在此优化条件下蒙古黄芪多糖的提取率可达3.48%与最佳提取率的预测值较为接近,说明采用响应面分析法对蒙古黄芪多糖提取工艺进行优化合理可靠。

关键词:蒙古黄芪;多糖;提取工艺;响应面法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0078-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.012

Optimization of extraction technology of polysaccharides from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by response surface methodology

GUO Hong, ZHANG Jing-nan, JIANG Li-li, YUAN Hong,

XUE Xin, MA Chun-li, XU Song-yao, DENG Feng, XUE Hui-ting, HU Rui-ping*

College of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: Astragalus polysaccharide is the main component of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, which has the functions of regulating human immune function and enhancing cell metabolism. In order to investigate the optimum extracting conditions of polysaccharides from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, the effects of liquid-solid ratio, extraction temperature, ethanol concentration and extraction time on the yield of *Astragalus membranaceus* polysaccharides were investigated by single factor experiment. Box-behnken central composite design and response surface analysis were used to optimize the extraction process of *Astragalus membranaceus* polysaccharides. The results showed that the optimal condition for polysaccharides of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* was liquid-solid ratio 11:1 (mL:g), extraction temperature 80℃, ethanol concentration 95% and extraction duration 100 min. Under such optimal conditions, the polysaccharides extraction efficiency was 3.48%, which was very close to the predicted value, indicating that the response surface analysis method was reasonable and reliable optimize.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; polysaccharides; extraction technology; response surface methodology

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或

膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1]。研究证实,黄芪中含有多糖、苷类、黄酮等有益于人体健康的物质,并且药食同源^[2],主要成分中含有水溶性的黄芪多糖,其药理作用广泛,有调节人体免疫功能、加强细胞代谢能力、降低血糖血压,以及抗炎保护肝脏等功效^[3]。近期研究发现,黄芪多糖还可以减缓肺纤维化进程^[4],在肠道中诱

收稿日期:2021-09-14 接受日期:2021-12-06

基金项目:国家自然科学基金(32060217);内蒙古科技计划(2019GG160);内蒙古自然科学基金项目(2019BS08013);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY19100);内蒙古蒙医药协同创新项目(MYYXT201901)

*通信作者 Tel:86-018686048895;E-mail:15131390165@163.com

导抗炎反应^[5],并且还可以缓解高脂肪饮食导致的代谢紊乱^[6],缓解帕金森病情的发展^[7]。又因有道地药材“离其本土,则质同而效异”之说^[8],故本实验选取内蒙古地区地道药材蒙古黄芪为原材料进行研究。

近年来黄芪多糖的提取工艺有酶解法、微波辅助提取法^[9]、超声辅助提取法^[10]等新技术,但对设备要求较高且操作复杂。本次实验采用简便易行的水提乙醇沉淀法提取多糖,使用 Design-Exper11 软件进行响应面实验设计,采用多元二次回归方程拟合各因素与响应值之间的函数关系^[11],模拟得到最佳提取率对应的提取条件。结合实际情况、方便性和可行性分析并优化黄芪多糖的提取工艺。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

蒙古黄芪由内蒙古自治区中医药研究所提供。苯酚(批号:P815406,北京天威达科技有限公司);葡萄糖(批号:D810594,陕西圣瑞医药科技有限公司)。浓硫酸、无水乙醇(JDA59、E-032,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

QE-1000 克屹立摇摆式高速万能粉碎机(浙江屹立工贸有限公司);DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);Maltiskan GO 微量紫外可见分光光度计(赛末飞世尔科技公司);TD5M 型多管架自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);SHHW21.600A II 型三用恒温水箱(天津泰斯特仪器有限公司);PX224ZH 型电子天平(奥豪斯仪器(常州)有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 提取工艺流程

蒙古黄芪经粉碎机粉碎后,使用 60 目筛子过筛以确定颗粒大小均匀,65 ℃ 烘干,精密称取 10 g 黄芪粉末,按相应液料比、温度及时间进行热水浸提,黄芪粉末浸提液以转速 3 000 r/min 离心 10 min 取上清液,用足量的 95% 乙醇与上清液混匀,静置 12 h 后以转速 3 000 r/min 离心 2 min,丢弃上清液留取沉淀,并用适量无水乙醇洗涤沉淀,待乙醇自然挥发后即得黄芪粗多糖。

1.3.2 葡萄糖标准曲线绘制

将葡萄糖在 105 ℃ 的烘箱中干燥至恒重。取 0.1 g 葡萄糖溶解于纯水中,制备 100 mL 葡萄糖标准溶液。使用移液管分别移取标准葡萄糖溶液 0、

0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mL,加水稀释至 100 mL。取上述 8 种不同浓度的葡萄糖溶液 2 mL,加入 1.0 mL 苯酚(6%)溶液,5.0 mL 浓硫酸,立即混匀并置于 40 ℃ 水浴锅中 40 min,待冷却至室温后,使用微量紫外可见分光光度计($\lambda = 490$ nm),检测不同浓度溶液吸光度。以葡萄糖浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)作为横坐标,吸光度值作为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线。

1.3.3 苯酚-硫酸法测定蒙古黄芪中多糖质量

取 200 μL 待测蒙古黄芪多糖溶液于干燥试管中,分别加入 1 800 μL 纯水、1.0 mL 苯酚(6%)溶液和 5 mL 浓硫酸混匀,于 40 ℃ 水浴锅中 40 min,待冷却至室温后,使用可见微量紫外可见分光光度计($\lambda = 490$ nm)测吸光度。将所得吸光度数值代入葡萄糖标准曲线,通过换算得到待测蒙古黄芪多糖质量。上述待测蒙古黄芪多糖的质量与溶解时所用黄芪的质量,二者比值即为蒙古黄芪粗多糖的提取率。

1.3.4 单因素实验

分别评估液料比(5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1, mL:g),提取温度(50、60、70、80、90、100 ℃),乙醇醇沉浓度(75%、80%、85%、90%、95%、100%)和提取时间(30、60、90、120、150、180 min)以上 4 个因素对蒙古黄芪多糖提取率的影响。以上每个条件设置 3 组平行对照且相互独立。

1.3.5 响应面法优化实验设计

结合单因素实验研究结果,利用 Box-Behnken 中心因子组合法设计的基本原理,使用 Design-Exper11 软件拟合 4 因素 3 水平的响应面,评估液料比、提取温度、乙醇浓度和提取时间 4 个主要影响因素,对蒙古黄芪多糖提取率的影响,并确定最佳提取条件。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线及回归方程

采用苯酚硫酸法,绘制葡萄糖标准曲线,其横坐标为葡萄糖浓度,纵坐标为吸光度,得回归曲线方程 $y = 0.0155x + 0.0023$,回归系数 $R^2 = 0.9954$ 线性关系良好,如图 1 所示。

2.2 单因素实验结果及分析

2.2.1 液料比对蒙古黄芪多糖提取率的影响

设置液料分别为 5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1(mL:g),提取温度为 90 ℃,提取时间 120 min 的实验条件,水浴加热,离心取上清液,用 95% 乙醇进行醇沉得黄芪粗多糖,测定多糖含量并计算提取率,如图 2 所示。

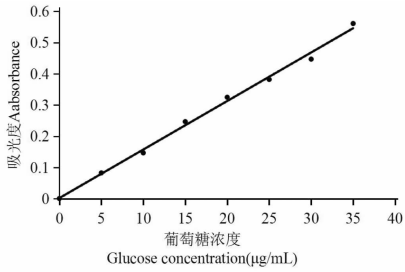


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Glucose standard curve

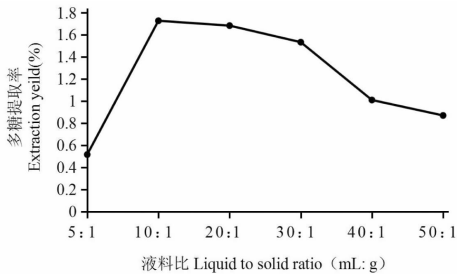


图2 液料比对蒙古黄芪多糖提取率的影响

Fig. 2 The influence of liquid to solid ratio on the extraction yield

根据实验结果可知,黄芪多糖提取率,在液料比5:1至10:1之间呈上升趋势,并在10:1时达到最大值,此后黄芪多糖提取率,随着液料比的增加反而逐渐降低。因此本实验选取的较优液料比为10:1 (mL:g)。

2.2.2 温度对蒙古黄芪多糖提取率的影响

设置提取温度50、60、70、80、90、100℃,液料比10:1 (mL:g),提取时间120 min的实验条件,水浴加热,离心取上清液,用95%乙醇对上清液进行醇沉得粗多糖,测定黄芪粗多糖含量并计算提取率,如图3所示。

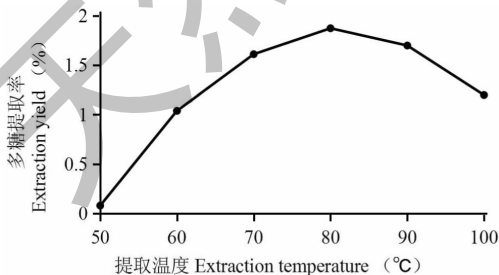


图3 提取温度对蒙古黄芪多糖提取率的影响

Fig. 3 The influence of temperature on the extraction yield

根据实验结果和图3曲线可知,在提取温度为50℃至80℃时,温度与多糖得率呈正相关,并且在

80℃时达到最大值,此后随着提取温度升高提取率反而降低。因此本实验选取80℃为较优提取温度。

2.2.3 乙醇浓度对蒙古黄芪多糖提取率的影响

使用浓度分别为75、80、85、90、95%的乙醇,在液料比为10:1 (mL:g),80℃水浴120 min条件下离心取上清液,进行醇沉得蒙古黄芪粗多糖,根据多糖含量计算提取率并绘制曲线,如图4所示。

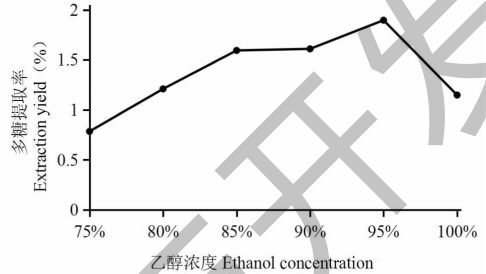


图4 乙醇浓度对蒙古黄芪多糖提取率的影响

Fig. 4 The influence of ethanol concentration on the extraction yield

根据实验结果和图4绘制的曲线可知,多糖提取率在乙醇浓度为75%至95%之间呈上升趋势,并在浓度为95%时达到提取率的最高点,此后随着乙醇浓度的增加蒙古黄芪粗多糖的提取率反而降低。因此本实验选取较优的乙醇浓度为95%。

2.2.4 提取时间对蒙古黄芪多糖提取率的影响

水浴提取时间分别设为30、60、90、120、150、180 min,并且在液料比为10:1 (mL:g),提取温度80℃的条件下,根据设置的时间梯度进行水浴加热。离心取水浴后的上清液,用95%浓度的乙醇对其进行醇沉,得蒙古黄芪的粗多糖,测定多糖含量并计算提取率,如图5所示。

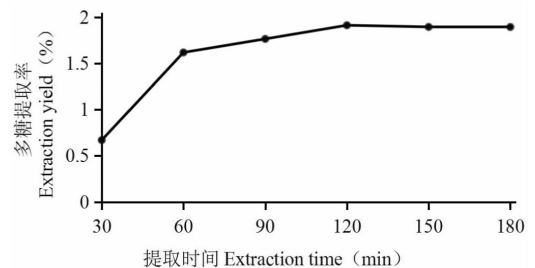


图5 提取时间对蒙古黄芪多糖提取率的影响

Fig. 5 The influence of extraction time on the extraction yield

根据实验数据和图5绘制的曲线可知,蒙古黄芪多糖提取率在水浴时间为30~120 min的梯度间呈上升趋势,并在水浴时间为120 min时达到最大值,而且增加提取时间并不会使多糖提取率增加,相

反提取率逐渐平稳。因此本实验选取较优提取时间 120 min。

2.3 响应面法优化实验设计结果

2.3.1 Box-Behnken 设计方案结果

结合上述 4 种单因素的实验数据,根据 Box-Be-

hnken 原理设计中心组合实验,以液料比(A)、提取温度(B)、乙醇浓度(C)和提取时间(D)为响应面设计因素,内蒙黄芪多糖提取率为响应值,进行 4 因素 3 水平响应面分析(见表 1)。

表 1 Box-Behnken 设计方案结果

Table 1 Box-behnken central composite design and result of extracting of polysaccharides

序号 No.	A	B	C	D	提取率 Extraction yeild (%)
	液料比 Liquid to Solid ratio (mL: g)	提取温度 Extraction temperature (°C)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	提取时间 Extraction time (min)	
1	5	70	95	120	1.121
2	15	70	95	120	2.405
3	5	90	95	120	1.444
4	15	90	95	120	1.944
5	10	80	90	90	3.409
6	10	80	100	90	3.56
7	10	80	90	150	3.066
8	10	80	100	150	3.218
9	5	80	95	90	1.516
10	15	80	95	90	3.402
11	5	80	95	150	1.254
12	15	80	95	150	3.245
13	10	70	90	120	3.136
14	10	90	90	120	3.169
15	10	70	100	120	3.054
16	10	90	100	120	2.89
17	5	80	90	120	1.115
18	15	80	90	120	2.949
19	5	80	100	120	0.78
20	15	80	100	120	3.286
21	10	70	95	90	3.006
22	10	90	95	90	3.381
23	10	70	95	150	2.843
24	10	90	95	150	3.259
25	10	80	95	120	3.467
26	10	80	95	120	3.563
27	10	80	95	120	3.228
28	10	80	95	120	3.298
29	10	80	95	120	3.035

2.3.2 拟合模型的建立及方差分析

利用 Design-Exper11 软件对实验所得的各项数

据(见表 1),进行多元回归拟合,得蒙古黄芪多糖提取率(Y)的二次多项回归模拟方程 $Y = 3.32 + 0.833$

$4A + 0.0435B - 0.0047C - 0.1158D - 0.1960AB + 0.0002CD - 1.20A^2 - 0.3048B^2 - 0.0573C^2 + 0.1330.1680AC + 0.0263AD - 0.0493BC + 0.0103BD + 6D^2, R^2 = 0.9295$ 。方差分析结果见表2。

表2 方差分析结果

Table 2 ANOVA result

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value
模型 Model	19.32	14	1.38	13.19	<0.0001
A	8.34	1	8.34	79.67	<0.0001
B	0.0227	1	0.0227	0.217	0.6485
C	0.0003	1	0.0003	0.0025	0.9608
D	0.1608	1	0.1608	1.54	0.2355
AB	0.1537	1	0.1537	1.47	0.2456
AC	0.1129	1	0.1129	1.08	0.3165
AD	0.0028	1	0.0028	0.0263	0.8734
BC	0.0097	1	0.0097	0.0927	0.7652
BD	0.0004	1	0.0004	0.0040	0.9504
CD	2.5E-07	1	2.5E-07	2.39E-06	0.9988
A ²	9.40	1	9.40	89.82	<0.0001
B ²	0.6025	1	0.6025	5.76	0.0309
C ²	0.0213	1	0.0213	0.2033	0.6590
D ²	0.1158	1	0.1158	1.11	0.3106
残差 Residual	1.46	14	0.1046		
失拟项 Lack of fit	1.29	10	0.1294	3.03	0.1484
纯误差 Pure error	0.1708	4	0.0427		
总和 Cor total	20.78	28			

注: $P < 0.05$, 差异显著; $P < 0.01$, 差异极显著。

Note: $P < 0.05$, significant difference; $P < 0.01$, extremely significant difference.

由表2可知,该拟合模型 $F = 13.19$, $P < 0.0001$,表明该回归模型较为显著;失拟项 $F = 3.03$, $P = 0.1484$ 不显著,说明模型拟合相对良好。相关系数 $R^2 = 0.9295$,说明该模型模拟系数的相关性与实际情况较吻合。可用该回归方程对实验结果进行数据分析模拟。

2.4 响应面各因素交互作用分析

通过 Design-Exper11 软件分析,以 A 液料比、B 提取温度、C 乙醇浓度和 D 提取时间为显著性影响因素,任意两个因素交互作用,对蒙古黄芪多糖提取率的影响因素进行分析比较,并绘制响应曲面图和等值线图,如图6所示。响应曲面坡度越大,表明响应值对影响因素的改变越敏感,根据各种提取条件交互作用下黄芪多糖提取率的相应曲面图和等值线图的陡峭程度,可以看出液料比对总多糖提取率的

影响最为显著,与方差分析结果一致。

2.5 最佳提取条件验证分析

通过 Design-Exper11 软件结合单因素实验结果,建立的数学模型分析拟合,得到蒙古黄芪粗多糖提取率的最佳工艺条件:液料比为11.37:1 (mL:g),提取温度 80.64 °C,乙醇浓度 94.22%,提取时间 100.93 min,此优化工艺条件下黄芪多糖提取率的预测值为 3.56%。参考最佳的拟合提取条件,结合本实验室实际情况,确定最终优化提取方案为:液料比11:1 (mL:g),提取温度 80 °C,乙醇浓度 95%,提取时间 100 min,通过验证在此优化条件下蒙古黄芪多糖的提取率为 3.48%,与预测值 3.56% 非常接近。由此可见,采用响应面法优化法得到最佳提取条件是可行的,且具有一定实际应用价值。

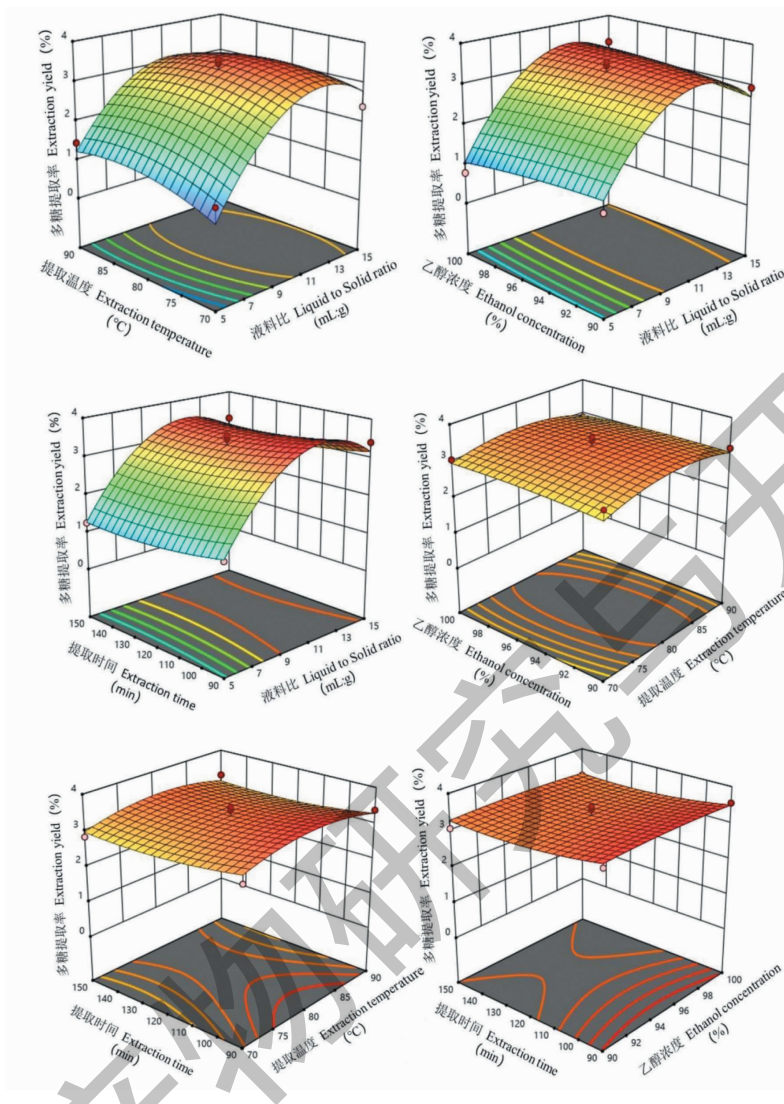


图6 各种提取条件交互作用下黄芪多糖提取率的响应曲面图和等值线图

Fig. 6 Response surface graph and contour plots of astragalus polysaccharides extraction rate under the interaction of different factors

3 结论

本文使用 Design-Exper11 软件,在单因素实验结果的基础上,应用响应面法对影响蒙古黄芪多糖提取率的条件进行优化。最终通过实验验证得到最佳提取工艺,当水与黄芪粉末的液料比为 11:1 (mL:g),水浴提取温度 80 ℃,提取时间 100 min,醇沉多糖使用的乙醇浓度为 95%,在上述优化条件下蒙古黄芪多糖的提取率为 3.48%,与预测值较为接近相对误差小,说明采用响应面方法进行分析,结合实际条件等因素对蒙古黄芪多糖提取条件的工艺优化合理可靠。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the

People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 302.

2 Chen HG, Zhou X, Zhang JZ. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Astragalus membranaceus* [J]. Carbohydr Polym, 2014, 111: 567-575.

3 Wang ZH, Yang LX, Meng XY. Study on the mechanism of astragalus polysaccharide intervention in diabetic nephropathy inflammation [J]. TCM Res (中医研究), 2020, 33(8): 1-5.

4 Zhang R, Xu LM, An XX, et al. Astragalus polysaccharides attenuate pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition and NF- κ B pathway activation [J]. Int J Mol Med, 2020, 46: 331-339.

(下转第 119 页)