

中图分类号: R932; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)11-0054-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.11.011



索尼娅石斛多糖亚临界水提取工艺优化研究*

王娜^{1,2}, 邹恺平¹, 刘顺¹, 刘炜^{1△}

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 优化索尼娅石斛多糖(DSP)亚临界水提取工艺。方法 以DSP提取率为考察指标,选择提取温度、提取压力和液料比为考察因素进行单因素试验,采用Box-Behnken响应面法优选最佳提取工艺。结果 优选的提取工艺为提取压力1.4 MPa,提取温度145℃,液料比25:1(mL/g)。按此工艺制备3批样品的多糖提取率分别为6.03%,6.14%,6.09%。结论 优选的DSP亚临界水提取工艺稳定、可靠,可用于DSP的提取。

关键词:索尼娅石斛;多糖;亚临界水提取法;Box-Behnken响应面法

Optimization of the Extraction Process of Polysaccharides from *Dendrobium Sonia*

WANG Na^{1,2}, ZOU Kaiping¹, LIU Shun¹, LIU Wei¹

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210029; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210023)

Abstract: Objective To optimize the subcritical water extraction process of polysaccharides from *Dendrobium Sonia* (DSP). **Methods** The single-factor experiment was conducted with DSP extraction rate as the evaluation index, and with the extraction temperature, extraction pressure, and liquid-solid ratio as the evaluation factors. The Box-Behnken response surface method was used to optimize the optimal extraction process. **Results** The optimal extraction process was as follows: the extraction pressure was 1.4 MPa, the extraction temperature was 145℃, and the solid-liquid ratio was 25:1 (mL/g). The polysaccharide extraction rates of three batches of samples prepared by the optimal process were 6.03%, 6.14%, and 6.09%, respectively. **Conclusion** The optimal DSP subcritical water extraction process is stable and reliable, which can be used for the extraction of DSP.

Key words: *Dendrobium Sonia*; polysaccharide; subcritical water extraction method; Box-Behnken response surface method

石斛为兰科石斛属 *Dendrobium* Sw. 植物,其新鲜或干燥茎常被收作药用。《神农本草经》将石斛列为上品,具有滋阴清热、抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力等作用^[1-2]。多糖类成分是石斛属植物的主要成分,具有促进免疫和抗肿瘤作用^[3-5],常以多糖含量的高低来判断石斛药材质量的优劣^[6]。目前,国产石斛属植物由于生长环境特殊、生长周期长、年生长量有限、有性繁殖困难等因素,产量已远不能满足中药石斛药材及复方制剂生产的原料供应^[7]。同时,石斛药食同源,人们在广泛使用过程中往往会忽略其潜在的毒副作用^[8]。索尼娅石斛 *Dendrobium Sonia* 作为兰科石斛属人工培育品系,具有开花时间长、花多、枝长、采后保鲜期长等特点,但目前对其药用价值和安全性的研究非常有限。前期研究中发现,索尼娅石斛多糖(DSP)具有很好的免疫调节活性^[9]。本研究中为了获得高效的DSP提取方法,优化了亚临界水提取工艺^[10-13],以期对DSP成药性提供理论基础。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AF-16A型粉碎机(温岭市奥力中药机械有限公司)

司);BP-211D型电子分析天平(德国Sartorius公司,精度为十万分之一);AX224ZH/E型水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型循环式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);FreeZone. 2.5型冻干机(美国Labconco公司);Evolution 201型紫外分光光度计(美国Thermo Fisher公司);亚临界萃取机由南京林业大学提供;Direct-Q3型超纯水机(德国Merck Millipore公司)。

1.2 试药

索尼娅石斛干燥茎(南京金陵药业股份有限公司,批号为20151103);石油醚(60~90℃分析纯,成都市科龙化工试剂厂);无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);浓盐酸(分析纯,上海久亿化学试剂有限公司);浓硫酸、固体氢氧化钠,均为分析纯,购于南京化学试剂股份有限公司;苯酚(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);D(+)-无水葡萄糖对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为S08J6G1,纯度≥98%);其余试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取方法

药材前处理:将索尼娅石斛干燥茎粉碎成粗粉,加

*基金项目:南京中医药大学附属医院2020年度院级创新发展基金专项课题[Y2020CX75]。

第一作者:王娜,女,硕士研究生在读,主管药师,研究方向为中药制剂开发及质量标准,(电子信箱)250051446@qq.com。

△通信作者:刘炜,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药制剂及药理学,(电子信箱)269560856@qq.com。

6倍量石油醚,浸泡2 h脱脂后滤过,室温放置样品残渣,挥干溶剂后置4℃冰箱,备用。

常规回流提取:称取药材前处理项下样品残渣100 g,加20倍量溶剂进行水提取(超纯水)、酸提取(0.2 mol/L盐酸)和碱提取(0.2 mol/L氢氧化钠),100℃加热回流3 h,滤过。

亚临界水提取:称取药材前处理项下样品残渣100 g,加20倍量超纯水进行亚临界水提取(压力为1.4 MPa,温度为140℃),滤过。

2.2 多糖制备

取常规回流提取和亚临界水提取项下滤液,调pH至6~7,加无水乙醇至醇浓度为80%,醇沉48 h,弃去溶剂得多糖沉淀,加水溶解,冻干(压力为3.0 Pa,温度为-40℃),即得多糖冻干粉末。

2.3 多糖含量与提取率测定

硫酸-苯酚比色法测定多糖含量^[14]:取葡萄糖对照品25.0 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加超纯水溶解并定容,摇匀,即得葡萄糖对照品贮备液(质量浓度为1.0 mg/mL)。分别精密吸取0.5,1,1.5,2,2.5,3 mL葡萄糖对照品贮备液,置10 mL容量瓶中,加超纯水定容,摇匀,即得质量浓度分别为50,100,150,200,250,300 μg/mL的系列葡萄糖对照品溶液。分别精密量取各质量浓度葡萄糖对照品溶液200 μL(空白样品以等量超纯水代替),置10 mL具塞试管中,分别加入超纯水800 μL、5%苯酚溶液1 mL,沿试管壁迅速加入浓硫酸5 mL,振荡,摇匀,室温下静置20 min至冷却。于490 nm波长处测定吸光度,以葡萄糖质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、吸光度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.0076X + 0.1282$ ($r = 0.9988, n = 6$)。结果表明,葡萄糖对照品质量浓度在50~300 μg/mL范围内与吸光度线性关系良好。

多糖提取率测定:收集各提取条件下多糖冻干粉末,分别溶解并定容至相同体积,即得多糖样品溶液。采用硫酸-苯酚比色法^[15]测定,按公式计算多糖提取

率。多糖提取率(%) = (多糖浓度 × 提取液体积) / 100 × 100%。由图1可知,亚临界水提取法的DSP提取率高于水提取多糖法。

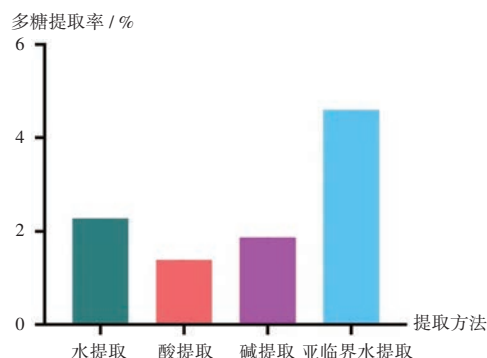


图1 不同提取方法的索尼娅石斛多糖提取率

Fig. 1 Comparison of extraction rates of *Dendrobium Sonia* with different extraction methods

2.4 DSP亚临界水提取工艺优化

2.4.1 单因素试验

称取药材前处理项下样品残渣,分别考察不同提取温度、液料比和提取压力下的多糖提取率。由图2可知,多糖提取率与提取温度、液料比、提取压力呈正相关;当液料比大于30 mL/g时,提取率升高趋于平缓。

2.4.2 Box-Behnken 响应面试验

因素与水平:根据单因素试验结果和Box-Behnken响应面设计原理,以提取温度(A)、液料比(B)、提取压力(C)为考察因素。因素与水平见表1。

试验设计与结果:称取药材前处理项下样品残渣10 g,共17份,按表1进行试验,按2.3项下方法测定多糖提取率。试验设计与结果见表2,拟合回归方程的方差分析结果见表3,三维响应面图见图3。

结果分析:由表3可知,运用亚临界水提取模型分析各因素对提取工艺的影响合理($F = 31.22, P < 0.0001$)。在本试验选择区域范围内,提取温度及液料比和提取时间的交互作用对多糖提取率均有极显著影响($P < 0.01$)。所得数据采用Design-Expert 8.0.6软件进行分析,各

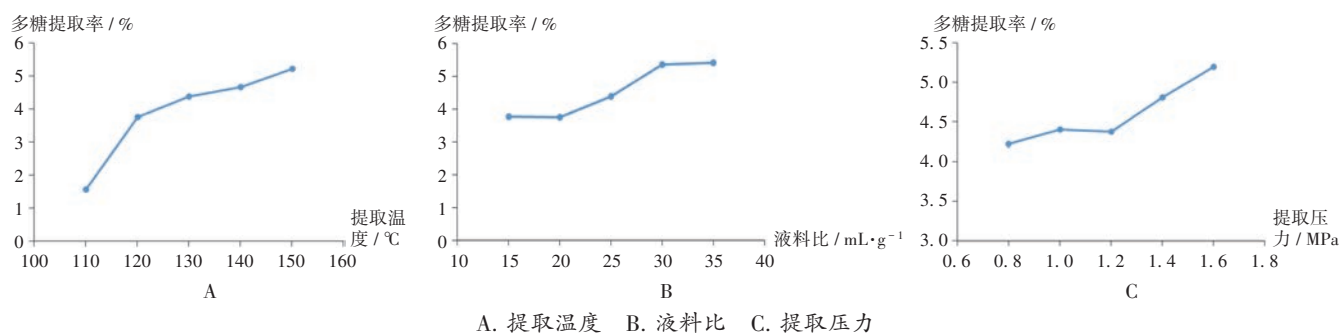


图2 索尼娅石斛多糖提取率单因素试验考察结果

A. Extraction temperature B. Liquid-to-material ratio C. Extraction pressure

Fig. 2 Results of the single-factor experiment of the extraction rate of polysaccharides from *Dendrobium Sonia*

表1 因素与水平
Tab.1 Factors and levels

水平	因素A(°C)	因素B(mL/g)	因素C(MPa)
-1	130	20	1.2
0	140	25	1.4
1	150	30	1.6

表2 Box - Behnken 响应面试验设计与结果

Tab.2 Design and results of the Box - Behnken response surface test

序号	因素			多糖提取率(%)
	A	B	C	
1	-1	-1	0	4.45
2	-1	1	0	5.01
3	1	-1	0	5.89
4	1	1	0	5.02
5	0	-1	-1	4.91
6	0	-1	1	4.75
7	0	0	-1	5.42
8	0	0	1	5.39
9	-1	0	-1	4.52
10	1	0	-1	4.80
11	-1	0	1	4.78
12	1	0	1	5.70
13	0	0	0	6.08
14	0	0	0	6.13
15	0	0	0	6.00
16	0	0	0	6.08
17	0	0	0	6.11

因素经回归拟合后得回归方程 $Y = 6.09 + 0.33A - 0.069B + 0.19C - 0.36AB + 0.16AC + 0.27BC - 0.41A^2 - 0.59B^2 - 0.72C^2$ 。根据所得模型,对响应面结果进行优化分析,可预测在稳定状态下的最大值 Y 为 6.19%;以多糖提取率为评价指标,提取工艺优化条件为提取温度 145 °C、液料比 25(mL/g)、提取压力 1.4 MPa。

表3 Box - Behnken 响应面拟合回归方程的方差分析结果
Tab.3 Results of the analysis of variance of the Box - Behnken response surface fitting regression equation

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	5.85	9	0.65	31.22	<0.000 1
A	0.88	1	0.88	42.14	0.000 3
B	0.02	1	0.02	0.98	0.355 2
C	0.21	1	0.21	10.22	0.015 1
AB	0.51	1	0.51	24.54	0.001 6
AC	0.10	1	0.10	4.92	0.062 1
BC	0.11	1	0.11	5.18	0.056 9
A ²	0.57	1	0.57	27.36	0.001 2
B ²	0.97	1	0.97	46.38	0.000 3
C ²	1.82	1	1.82	87.26	<0.000 1
残差	0.15	7	0.021		
失拟项	0.14	3	0.045	18.51	0.008 3
纯误差	9.80×10^{-3}	4	2.45×10^{-3}		
总变异	6	16			

2.5 验证试验

按最佳提取工艺条件,经3批样品验证,多糖提取率分别为 6.03%, 6.14%, 6.09%。结果表明,该提取工艺稳定、可靠。

3 讨论

本研究中曾选择不同水提取方法提取 DSP,但提取率均不理想。参考文献[16 - 17],发现亚临界水提取法的提取率远高于传统水提取法,且成本低、环保,故采用亚临界水提取法进行试验。推测是由于试验中随着温度的上升,水的介电常数降低,DSP在水中的溶解度及物质传质系数提高,提高了 DSP 的扩散速率^[18]。以 DSP 提取率为评价指标,选择提取率较高的亚临界水提取法,利用 Box - Behnken 响应面法试验考察提取温度、液料比、提取压力对 DSP 提取率的影响。结果表明,最佳提取工艺条件为提取温度 145 °C,液料比 25(mL/g),提

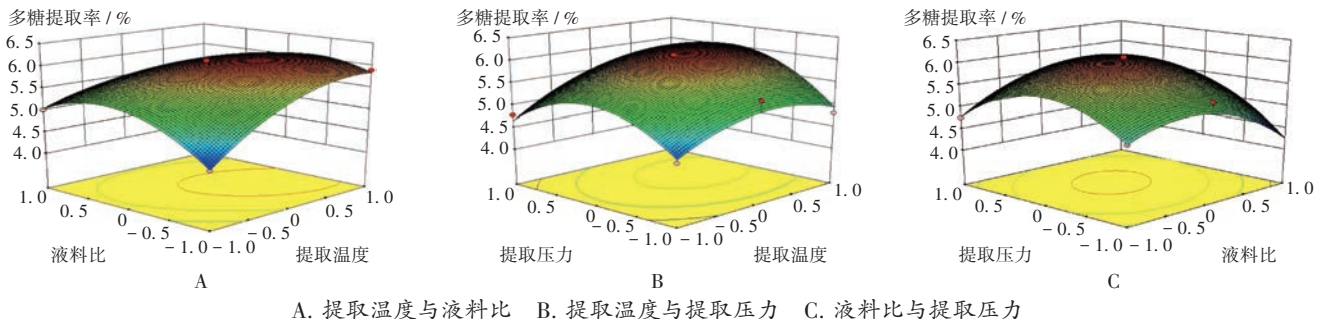


图3 各因素交互作用对索尼娅石櫨多糖提取率影响的 Box - Behnken 三维响应面图

A. Extraction temperature and liquid - to - material ratio B. Extraction temperature and extraction pressure C. Liquid - to - material ratio and extraction pressure

Fig.3 Three dimensional response diagram of the interaction of various factors on the extraction rate of polysaccharides from *Dendrobium Sonia*