

茯苓多糖的响应面提取条件优化及体外免疫活性研究

叶振梅

(廊坊卫生职业学院,河北 廊坊 065001)

摘 要:以茯苓为原料,研究了茯苓多糖的响应面提取条件优化及体外免疫活性。结果表明:茯苓多糖提取最佳工艺条件为微波功率 471.3 W,微波提取时间 8.5 min,乙醇浓度 82.3%,液料比为 19.9,在该条件下,茯苓多糖的提取率为 2.96%。茯苓多糖具有较好的刺激淋巴细胞增殖的能力,随着茯苓粗多糖浓度的增加,其刺激淋巴细胞增殖的能力也逐渐增强,当茯苓粗多糖浓度超过 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,其刺激淋巴细胞增殖的能力反而下降。

关键词:茯苓;多糖;响应面法;体外免疫活性

中图分类号:S 567.3⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)17-0135-04

茯苓为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核,是常用的传统中药,具有渗湿、健脾、利尿等功效^[1]。茯苓多糖具有抑制肿瘤生长,调节机体免疫等功效^[2]。该试验对茯苓多糖的响应面提取工艺条件进行了优化,并对其体外免疫活性进行研究,以期对茯苓的综合利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试茯苓购于当地大参林药店;葡萄糖、无水乙醇、苯酚和浓硫酸由廊坊卫生职业学院实验室提供。WD900B 微波炉(美的电器有限公司);GZX-9070 MBE 电热恒温鼓风干燥箱(惠州立升仪器有限公司);GL-21M 高速冷冻离心机(惠州立升仪器有限公司);UV-2000 紫外分光光度计(东莞市东盛仪器有限公司);BS110S 分析天平(东莞市东盛仪器有限公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 茯苓多糖提取工艺流程 茯苓→烘干、粉碎→除杂质→按液料比加入水→微波提取→过滤→离心→浓缩→3 倍于样液体积的乙醇沉淀→真空浓缩干燥→茯苓粗多糖。

1.2.2 茯苓多糖提取条件的单因素试验 液料比对茯苓多糖提取效果的影响:设定微波功率为 475 W,微波处理时间为 8 min,乙醇浓度为 80%,分别在液料比为 5、10、15、20、25、30 6 个梯度下,研究料液比对茯苓多糖提取率的影响。乙醇浓度对茯苓多糖提取效果的影响:设定微波功率为 475 W,微波处理时间为 8 min,液料比为

20,分别在乙醇浓度为 50%、60%、70%、80%、90%、100% 6 个梯度下,研究乙醇浓度对茯苓多糖提取率的影响。微波功率对茯苓多糖提取效果的影响:设定乙醇浓度为 80%,微波处理时间为 8 min,液料比为 20,分别在微波功率为 400、425、450、475、500、525 W 6 个梯度下,研究微波功率对茯苓多糖提取率的影响。微波提取时间对茯苓多糖提取效果的影响:设定乙醇浓度为 80%,微波功率为 475 W,液料比为 20,分别在微波提取时间为 2、4、6、8、10、12 min 6 个时间段下,研究微波提取时间对茯苓多糖提取率的影响。茯苓多糖的测定采用蒽酮-硫酸法^[3]。标准曲线的回归方程为: $y = 8.5671x - 0.0124$, $R^2 = 0.9992$, x 为标准品的浓度, y 为吸光度。

1.2.3 茯苓多糖提取条件的优化试验 在单因素试验的基础上,选取微波功率、微波提取时间、乙醇浓度、液料比各因素的最优试验范围,按照表 1 的因素水平表,以茯苓多糖提取率为响应值,采用响应面分析法优化茯苓多糖提取条件。

表 1 试验因素水平及编码

Table 1 Factors levels and coding

编码水平	因素			
	微波功率/W	微波提取时间/min	乙醇浓度/%	液料比
-1	450	6	70	15
0	475	8	80	20
1	500	12	90	25

1.2.4 体外刺激淋巴细胞增殖试验 无菌取脾,制备小鼠淋巴细胞悬液,于 96 孔板接种 180 μL /孔,每孔加 20 μL 样品,以 PBS 作阴性对照,PHA 溶液阳性对照,培养 72 h 后每孔加入 20 μL Alamar Blue 试剂,再培养至试剂变色,加 Alamar Blue 试剂前及变色后分别用 ELISA 自动读板仪测定 570 nm 和 600 nm 处的吸光

作者简介:叶振梅(1967-),女,硕士,高级讲师,研究方向为妇产科与人体免疫学。

收稿日期:2013-04-10

度^[4]。计算淋巴细胞增殖率,淋巴细胞增殖率(%) = $\frac{[117\ 216 \times A_{\lambda 570}(\text{样品}) - 80\ 586 \times A_{\lambda 600}(\text{样品})]}{[117\ 216 \times A_{\lambda 570}(\text{对照}) - 80\ 586 \times A_{\lambda 600}(\text{对照})]} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 茯苓多糖提取条件的单因素试验结果

2.1.1 液料比对茯苓多糖提取效果的影响 由图 1 可以看出,液料比应控制在 20 左右较为适宜。

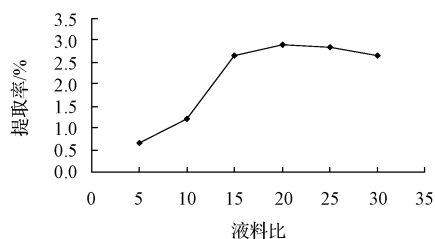


图 1 液料比对茯苓多糖提取效果的影响

Fig. 1 Influence of solution to material ratio on extraction effect

2.1.2 乙醇浓度对茯苓多糖提取效果的影响 由图 2 可以看出,乙醇浓度应控制在 80% 左右较为适宜。

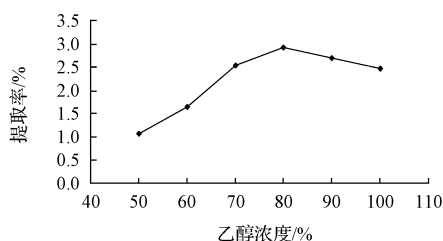


图 2 乙醇浓度对茯苓多糖提取效果的影响

Fig. 2 Influence of ethanol concentration on extraction effect

2.1.3 微波功率对茯苓多糖提取效果的影响 由图 3 可以看出,微波功率应控制在 475 W 左右较为适宜。

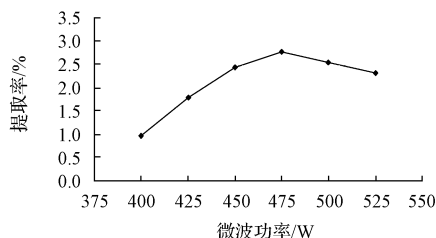


图 3 微波功率对茯苓多糖提取效果的影响

Fig. 3 Influence of microwave power on extraction effect

2.1.4 微波提取时间对茯苓多糖提取效果的影响 由图 4 可知,微波提取时间应控制在 8 min 左右较为适宜。

2.2 茯苓多糖提取条件的优化试验结果

由影应面分析法得出关于茯苓多糖提取率的二次回归拟合方程:提取率(%) = $2.90 - 0.20A + 0.23B +$

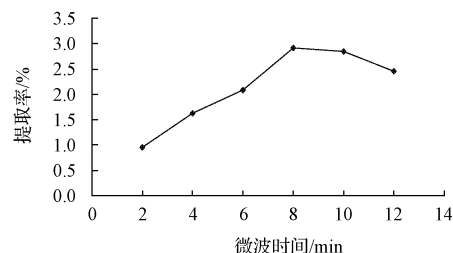


图 4 微波提取时间对茯苓多糖提取效果的影响

Fig. 4 Influence of microwave extraction time on extraction effect

$0.076C - 0.17D - 0.067AB - 0.20AC + 0.41AD - 0.100BC - 0.14BD + 0.23CD - 0.29A^2 - 0.24B^2 - 0.19C^2 - 0.39D^2$ (其中, A 为微波功率, B 为微波提取时间, C 为乙醇浓度, D 为液料比)。对茯苓多糖提取的试验结果进行多元回归分析,由表 3 可以看出,Model 的 F 值为 7 944.29, P 值为 <0.0001 , 表明 Model 极显著,同时 A(微波功率)、B(微波提取时间)、C(乙醇浓度)和 D(液料比)都是显著因素, A(微波功率)与 B(微波提取时间)、C(乙醇浓度)、D(液料比)的交互作用都显著, B(微波提取时间)与 C(乙醇浓度)、D(液料比)的交互作用也都显著, C(乙醇浓度)与 D(液料比)的交互作用也显著。而失拟项的 F 值为 6.27, P 值为 0.0585, 说明了该模型与茯苓多糖提取实际情况拟合程度比较好, 可以预测茯苓多糖提取最佳条件。

表 2 优化试验结果

Table 2 Test results of optimization

序号	微波功率 /W	微波提取时间 /min	乙醇浓度 /%	液料比	茯苓多糖提取率/%
1	450.00	6.00	70.00	15.00	1.99
2	475.00	8.00	80.00	20.00	2.90
3	475.00	8.00	80.00	11.59	2.10
4	475.00	8.00	80.00	20.00	2.90
5	475.00	8.00	80.00	20.00	2.90
6	500.00	6.00	90.00	25.00	2.01
7	500.00	10.00	90.00	15.00	1.21
8	475.00	8.00	80.00	20.00	2.90
9	517.04	8.00	80.00	20.00	1.75
10	432.96	8.00	80.00	20.00	2.43
11	450.00	6.00	90.00	15.00	2.29
12	500.00	6.00	70.00	25.00	1.59
13	450.00	10.00	70.00	25.00	1.17
14	475.00	11.36	80.00	20.00	2.60
15	475.00	4.64	80.00	20.00	1.82
16	475.00	8.00	96.82	20.00	2.49
17	475.00	8.00	80.00	28.41	1.52
18	475.00	8.00	80.00	20.00	2.91
19	500.00	10.00	70.00	15.00	2.11
20	475.00	8.00	63.18	20.00	2.25
21	450.00	10.00	90.00	25.00	1.99

表 3 回归方程各项的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P	显著性
Model	14	6.13	0.44	7 944.29	<0.0001	极显著
A(微波功率)	1	0.23	0.23	4 195.03	<0.0001	极显著
B(微波提取时间)	1	0.30	0.30	5 519.59	<0.0001	极显著
C(乙醇浓度)	1	0.080	0.080	1 447.07	<0.0001	极显著
D(液料比)	1	0.17	0.17	3 051.92	<0.0001	极显著
A×B	1	0.015	0.015	273.42	<0.0001	极显著
A×C	1	0.32	0.32	5 806.27	<0.0001	极显著
A×D	1	0.55	0.55	9 954.68	<0.0001	极显著
B×C	1	0.080	0.080	1 451.57	<0.0001	极显著
B×D	1	0.062	0.062	1 131.23	<0.0001	极显著
C×D	1	0.42	0.42	7 678.79	<0.0001	极显著
A ²	1	1.23	1.23	22 385.90	<0.0001	极显著
B ²	1	0.90	0.90	16 263.06	<0.0001	极显著
C ²	1	0.53	0.53	9 617.73	<0.0001	极显著
D ²	1	2.23	2.23	40 468.69	<0.0001	极显著
残差	6	3.307E-004	5.511E-005			
失拟项	2	2.507E-004	1.253E-004	6.27	0.0585	不显著
纯误差	4	8.000E-005	2.000E-005			
总差	20	6.13				

注: $P < 0.05$, 代表研究因素为显著因素。

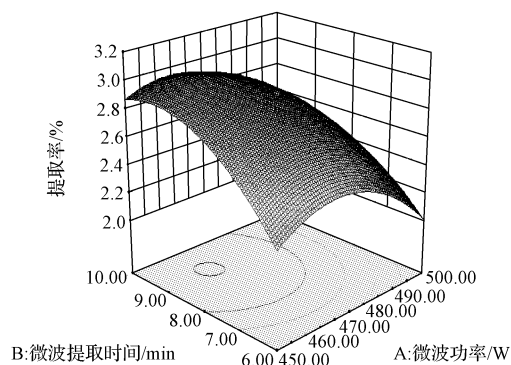


图 5 微波功率与微波提取时间交互作用对提取率影响的响应面

Fig. 5 Response surface of microwave power and microwave extraction time interaction influence on extraction rate

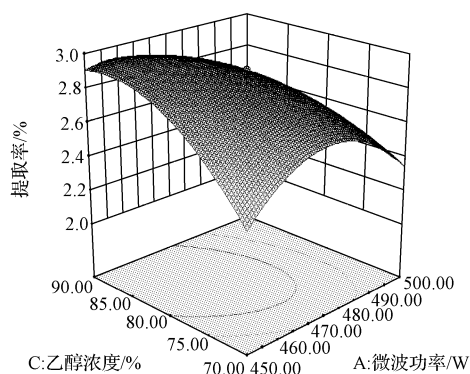


图 6 微波功率与乙醇浓度交互作用对提取率影响的响应面

Fig. 6 Response surface of microwave power and ethanol concentration interaction influence on extraction rate

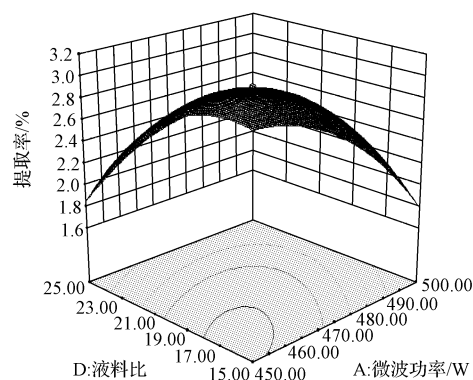


图 7 微波功率与液料比交互作用对提取率影响的响应面

Fig. 7 Response surface of microwave power and solution to material ratio interaction influence on extraction rate

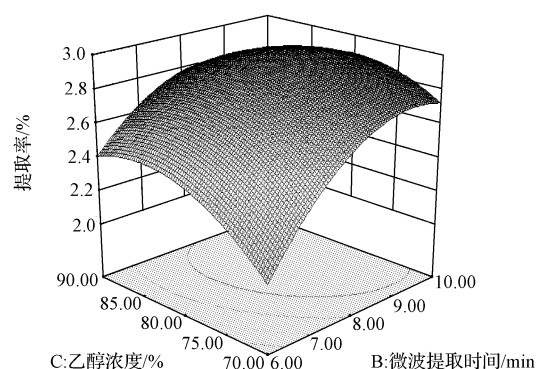


图 8 微波提取时间与乙醇浓度交互作用对提取率影响的响应面

Fig. 8 Response surface of microwave extraction time and ethanol concentration interaction influence on extraction rate

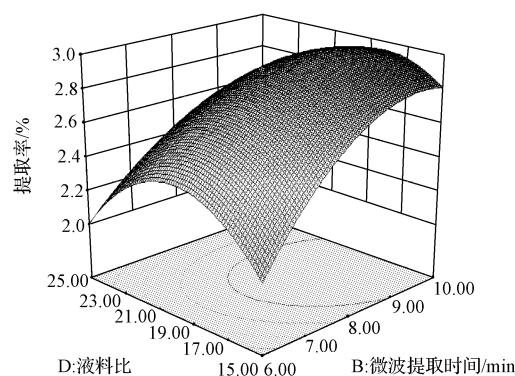


图 9 微波提取时间与液料比交互作用对提取率影响的响应面

Fig. 9 Response surface of microwave extraction time and solution to material ratio interaction influence on extraction rate

根据表 3, 作出相应曲面图(图 6~10)。根据茯苓多糖提取试验结果和回归方程各项的方差分析, 由响应面分析法优化出茯苓多糖提取最佳工艺条件, 即微波功率为 471.25 W, 微波提取时间为 8.45 min, 乙醇浓度为 82.25%, 液料比为 19.88。

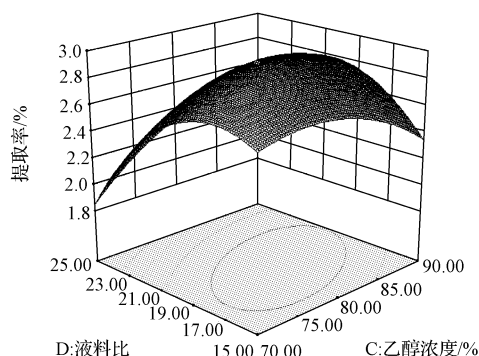


图 10 乙醇浓度与液料比交互作用对提取率影响的响应面

Fig. 10 Response surface of ethanol concentration and solution to material ratio interaction influence on extraction rate

根据响应面设计法优化的结果,选择茯苓多糖提取率较高的 4 个较优条件,将这 4 个试验条件和响应面设计法优化得出的较优条件一起进行验证试验。由表 4 可知,响应面设计法优化得出试验 5 的茯苓多糖提取率最高,因此茯苓多糖提取最佳工艺条件为微波功率为 471.3 W,微波提取时间为 8.5 min,乙醇浓度为 82.3%,液料比为 19.9,在此条件下,茯苓多糖的提取率为 2.96%。

表 4 验证试验结果

Table 4 Verification test result

序号	微波功率 /W	微波提取时间 /min	乙醇浓度 /%	液料比	茯苓多糖提 取率/%
1	475.0	8.0	80.0	20.0	2.92
2	475.0	11.4	80.0	20.0	2.64
3	475.0	8.0	96.8	20.0	2.52
4	433.0	8.0	80.0	20.0	2.45
5	471.3	8.5	82.3	19.9	2.96

2.3 体外刺激淋巴细胞增殖试验

由图 11 可知,茯苓多糖具有较好的刺激淋巴细胞增殖的能力。当茯苓粗多糖浓度 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 的试

验范围内,随着茯苓粗多糖浓度的增加,其刺激淋巴细胞增殖的能力也逐渐增强,呈现较好的量效关系,当茯苓粗多糖浓度超过 100 $\mu\text{g/mL}$,其刺激淋巴细胞增殖的能力反而下降。

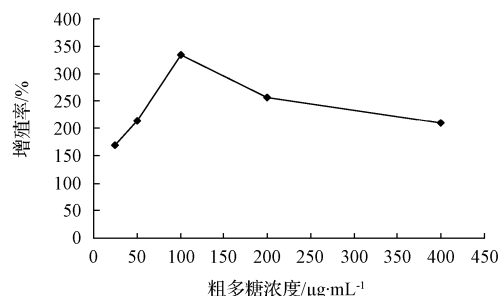


图 11 茯苓多糖对淋巴细胞的增殖作用

Fig. 11 Proliferative effect of polysaccharides from *Poria cocos* on leukomonocyte

3 结论

茯苓多糖提取最佳工艺条件为微波功率为 471.3 W,微波提取时间为 8.5 min,乙醇浓度为 82.3%,液料比为 19.9,在此条件下,茯苓多糖的提取率为 2.96%。茯苓多糖具有较好的刺激淋巴细胞增殖的能力。当茯苓粗多糖浓度为 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 时,随着茯苓粗多糖浓度的增加,其刺激淋巴细胞增殖的能力也逐渐增强,呈现较好的量效关系,当茯苓粗多糖浓度超过 100 $\mu\text{g/mL}$,其刺激淋巴细胞增殖的能力反而下降。

参考文献

- [1] 胡斌,杨益平,叶阳. 茯苓化学成分研究[J]. 中草药,2006(5):12-14.
- [2] 刘林,霍志斐,史树堂. 茯苓多糖的药理作用概述[J]. 河北中医,2010(9):23-25.
- [3] 邱绿琴,杨惊宇,吴宗彬. 茯苓多糖的提取分离方法研究[J]. 当代医学,2009(3):56-57.
- [4] 曲瑾郁,任大明. 蛹虫草多糖的化学修饰及体外抗氧化能力[J]. 食品科学,2011(15):34-35.

Study on Optimization of Extracting Technology of Polysaccharides from *Poria cocos* by Response Surface Methodology and Its Immune Activity

YE Zhen-mei

(Langfang Health Career Academy, Langfang, Hebei 065001)

Abstract: Taking *Poria cocos* as material, the extraction technology of polysaccharides from it was optimized by response surface methodology and its immune activity was studied. The results showed that the optimum extraction conditions of polysaccharides from *Poria cocos* was microwave power 471.3 W, microwave extraction time 8.5 min, ethanol concentration 82.3%, solution and material ratio 19.9, under these conditions, the polysaccharides yield could reach 2.96%. The polysaccharides from *Poria cocos* had proliferative effect on leukomonocyte. The proliferative effect strengthened gradually with the concentration of polysaccharides from *Poria cocos* increased. When its concentration exceeded 100 $\mu\text{g/mL}$, the proliferative effect decreased.

Key words: *Poria cocos*; polysaccharides; response surface methodology; immune activity