

# 基于均匀设计的白术总多糖提取工艺优选

盛云杰, 张永生\*

(浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

**[摘要]** 目的: 优选白术总多糖的浸提工艺。方法: 以总多糖质量分数为指标, 采用均匀试验考察加水量、浸提时间和温度对提取工艺的影响。采用 UV 测定总多糖含量, 检测波长 491 nm。结果: 最佳提取工艺参数为加 8 倍量水于 90 ℃ 浸提 60 min; 白术水提液中总多糖质量分数 6.20%。结论: 优选的总多糖浸提工艺稳定可行, 建立的含量测定方法准确可靠。

**[关键词]** 白术; 浸提工艺; 均匀设计; 紫外分光光度法; 方法学考察

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0020-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100020

## Optimization of Extraction Technology of Total Polysaccharides from *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* Based on Uniform Design

SHENG Yun-jie, ZHANG Yong-sheng\*

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of total polysaccharides from *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*. **Method:** With the content of total polysaccharides as index, effects of the amount of water, extraction time and temperature on extraction technology were investigated by uniform design. UV was adopted to determine the content of total polysaccharides by detection wavelength was 491 nm. **Result:** Optimum extraction technology was as following: extracted 60 min with eight times the amount of water at 90 ℃; The content of total polysaccharides in water extract of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* was 6.20%. **Conclusion:** Optimized extraction process was stable and feasible, this established determination was accurate and reliable.

**[Key words]** *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*; extraction technology; uniform design; ultraviolet spectrophotometry; methodological study

白术始载于《神农本草经》, 具有补气健脾、燥湿利水、止汗安胎的功效, 以浙江于潜、安徽皖南山区等地为道地<sup>[1]</sup>。近年研究发现白术水溶性多糖具有降血脂、治疗肝脏纤维化、保护肝细胞线粒体损

伤等重要生理活性<sup>[2]</sup>。目前, 白术总多糖的提取常采用煎煮法和超声波提取法, 前者的弊端为温度过高对多糖活性有所影响<sup>[3]</sup>; 后者的弊端在于对大分子物质具有击碎作用<sup>[4]</sup>, 超声能降解多糖, 还能加快糖类化合物的糖基化反应、缩醛化作用、氧化作用、C-杂原子键和 C-C 键形成, 得到的多糖将是一些分解产物。本实验采用浸提法, 以总多糖质量分数为评价指标, 通过均匀设计<sup>[5]</sup> 优选白术总多糖的提取工艺, 为其成分分析提供参考。

### 1 材料

BP-211D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司), LXJ-IIIB 型低速离心机(上海安亭), 759 型紫外-可见分光光度计(上海菁华), FZ102 型微型植物

**[收稿日期]** 20131226(005)

**[基金项目]** 浙江省科技厅重点创新团队项目(2012R10044-03); 浙江中医药大学校级课题(2009ZY05)

**[第一作者]** 盛云杰, 学士, 实验师, 从事中药质量标准及抗肝纤维化研究, Tel: 0571-86613606, E-mail: belemi123@163.com

**[通讯作者]** \*张永生, 博士, 副研究员, 从事抗肝纤维化研究, Tel: 0571-86613756, E-mail: alex.yszhang@zcmu.edu.cn

粉碎机(天津泰斯特)。白术购自浙江中医药大学饮片厂,经浙江中医药大学鉴定教研室陈锡林副教授鉴定为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎;无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-200904),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 白术药材粉碎过 4 号筛,于 60 ℃ 烘 24 h。精密称取白术粉末 10 g,共 9 份,按试验设计方案进行热提,过滤,加入 10% 硫酸锌溶液 4 mL,加氢氧化钡 30 mL 沉淀蛋白,搅拌 5 min,静置过夜,过滤并定容至 200 mL。精密移取 2 mL 置于离心管内,加入无水乙醇 8 mL,于 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃去上清液,沉淀加水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,即得。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取于 105 ℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 0.024 2 g,加水溶解并定容至 200 mL 量瓶中,摇匀,即得。

**2.3 检测波长的确定** 准确吸取供试品溶液和对照品溶液各 1.0 mL,分别加水至 2 mL,各精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速精密加入浓硫酸 5.00 mL,放置 5 min,置沸水浴加热 15 min 后取出,置冰水中冷却 10 min;精密量取水 2 mL,同法作空白溶剂对照。于 300 ~ 600 nm 进行全波长扫描,结果供试品及对照品在 491 nm 处均具有最大吸收,故选择 491 nm 作为最大吸收波长。

**2.4 标准曲线的制备** 采用苯酚硫酸法<sup>[6]</sup>测定总多糖含量。准确吸取对照品溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置于 5 支具塞试管中,按 2.3 项下自“分别加水至 2 mL”至“同法作空白对照”操作,于 491 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程  $A = 0.053 6C - 0.014 (R^2 = 0.997 6)$ ,线性范围 3.025 ~ 15.125 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.5 精密度试验** 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.4 mL,共 6 份,按 2.3 项下方法显色,于 491 nm 处测定 A,计算 RSD 2.01%,表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取样品液 1.0 mL,按 2.3 项下方法显色,于 491 nm 处每 20 min 测定 1 次 A,结果 100 min 内 A 保持稳定,RSD 1.48%,表明供试品溶液在 100 min 内稳定性良好,可满足测试分析要求。

**2.7 回收率试验** 精密吸取同一供试品溶液 1.0 mL,共 9 份,等分为 3 组,分别精密加入葡萄糖对照品溶液 0.2,0.4,0.6 mL,按 2.3 项下方法显

色,于 491 nm 处测定 A,计算平均回收率 96.6%,RSD 2.78%,表明该法回收率良好。

**2.8 均匀试验设计**<sup>[7-12]</sup> 以白术总多糖质量分数为指标,选择加水量、浸提时间和温度为考察因素,因素水平见表 1。根据 D 值最小的原则,选用 U<sub>9</sub>(9<sup>4</sup>)表进行试验,称取白术粉末 9 份,每份约 10 g,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下方法显色,于 491 nm 处测定 A,试验安排及结果见表 2。

表 1 白术总多糖浸提工艺均匀试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 浸提时间/min	C 浸提温度/℃
1	12	120	95
2	10	90	90
3	24	60	85
4	18	130	80
5	16	100	75
6	22	70	70
7	8	140	65
8	14	110	60
9	20	80	55

表 2 白术总多糖浸提工艺均匀试验安排

No.	A	B	C	总多糖质量分数/%
1	3	7	9	4.02
2	6	4	8	6.21
3	9	1	7	5.35
4	2	8	6	5.42
5	5	5	5	5.14
6	8	2	4	4.82
7	1	9	3	5.11
8	4	6	2	5.05
9	7	3	1	4.32

采用回归分析,以总多糖质量分数为因变量,运行 SPSS 软件,选择分析-回归-线性-逐步,运算的输出结果及分析为第 1 次运行无法得出方程,通过直观分析发现第 1 个试验得到的结果明显偏低,不符合常理,结合总多糖性质的稳定性及其活性考虑,推测该项可能为误差项,暂时将其剔除,重新回归计算见表 3,4。

表 3 白术总多糖浸提工艺模型汇总

模型	R <sup>2</sup>	调整 R <sup>2</sup>	标准估计的误差
1	0.745 <sup>1)</sup>	0.703	0.294
2	0.944 <sup>2)</sup>	0.922	0.151

注:<sup>1)</sup> 预测变量为(常量)和浸提温度;<sup>2)</sup> 预测变量为(常量)、浸提温度及加水量。

表 4 白术总多糖浸提工艺模型系数

模型	非标准化系数		标准化系数	t	P
	回归系数	标准误差	试用版		
1 (常量)	2.419	0.667		3.628	0.011
浸提温度	0.038	0.009	0.863	4.188	0.006
2 (常量)	3.181	0.387		8.222	0.000
浸提温度	0.038	0.005	0.872	8.249	0.000
加水量	-0.043	0.010	-0.446	-4.218	0.008

注: <sup>1)</sup> 因变量为总多糖质量分数。

由表 3 可知, 2 号模型剔除了浸提时间的影响, 但其  $R^2$  较大, 故优先选择。由表 4 可知, 2 号模型的浸提温度、和加水量均具有极显著差异。对试验结果进行逐步回归分析, 得回归方程  $Y = 3.181 + 0.038C - 0.043A (r = 0.972)$ , 将试验 1 号数据录入方程发现其理论值与实际值的误差率达 20%, 故可确定为误差项。

**2.9 验证试验** 由回归方程可知, 因素 B 对试验结果无影响, 说明浸提 > 1 h 后对总多糖质量分数无影响, 故取下限; 因素 C 为正系数, 故取上限值, 但考虑到温度越高对多糖的活性和结构影响较大, 同时剔除了 1 号试验才得到次方程, 故选择浸提温度 90 °C; 而 A 因素为负系数, 故取下限。根据方程进行优化预测, 综合考察成本确定最佳提取工艺为加水量 8 倍, 浸提时间 60 min, 浸提温度 90 °C; 总多糖质量分数预测值 6.25%。精密称取白术粉末 10 g, 共 2 份, 按优选的工艺条件进行提取, 结果总多糖平均质量分数 6.20%。

### 3 讨论

白术总多糖的提取工艺报道较多, 常采用煎煮法提取, 但温度相对较高, 对多糖化学结构的改变和分解破坏很大, 从而影响总多糖的活性, 故准确控制浸提温度与时间为试验关键, 本文通过提前将溶液温度加热至指定温度, 同时迅速放入药材粉可很好解决该难题。

在数据分析过程中, SPSS 对均匀设计采用逐步回归的方法, 有时因为试验误差点的存在会使得到的方程回归不显著<sup>[13]</sup>。通过误差分析及直观分析,

排除了第 1 个误差项, 最终得到了线性关系较好的回归方程, 原因可能为温度过高, 多糖损失分解, 查阅文献发现多糖的温度提取曲线 90 °C 为拐点, 与本文结果相符。验证试验中白术总多糖虽未高于均匀设计的试验点, 但考虑到总多糖结构的稳定性和物质活性, 在保证提取量不显著下降的情况下, 应节约提取时间和物料。

### [参考文献]

[1] 段启, 许冬谨, 刘传祥, 等. 白术的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(5): 165.

[2] 张培建, 张杰, 卜平, 等. 白术多糖对缺血再灌注损伤大鼠肝脏的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(1): 62.

[3] 陈洁. 木蹄层孔菌多糖的提取工艺及免疫活性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011.

[4] 付杰, 郭学平, 王凤山. 超声对生物大分子的作用及其在透明质酸降解中的应用[J]. 中国生化药理学杂志, 2008, 29(1): 71.

[5] 孙晓英, 吴莹, 徐庆辉. 均匀设计及其在中药学领域中的应用[J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 822.

[6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 128.

[7] 胡长玉, 徐有志. 祁白术多糖提取工艺研究[J]. 生物学杂志, 2010, 27(4): 57.

[8] 刘胜姿, 邱细敏. 超声提取白术多糖的工艺研究[J]. 企业技术开发, 2010, 29(5): 32.

[9] 王慧, 黄聪, 杜薇. 均匀设计法优化刺梨多糖的提取工艺[J]. 中国药业, 2012, 21(13): 41.

[10] 余志雄, 林叶, 陈丽娇, 等. 浒苔多糖热水提取工艺研究[J]. 福建师大福清分校学报, 2010(5): 29.

[11] 李彬, 宁宗超, 周淑敏. 利用 SPSS 统计分析软件处理正交(均匀)设计数据[J]. 黑龙江医药, 2003, 16(1): 29.

[12] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 250.

[13] 李瑞箐. 均匀设计在药物研究开发中的应用[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2000: 87.

[责任编辑 刘德文]