

正交试验优化川党参总核苷的提取工艺

张静, 丁博, 张华, 祁俊生, 周浓*, 陈秀红, 刘骆
(重庆三峡学院 生命科学与工程学院, 重庆 404000)

[摘要] 目的: 优选川党参中核苷类成分的提取工艺条件, 为该有效部位的开发提供基础资料。方法: 采用超声波提取川党参中核苷类成分, 以胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的总提取量为评价指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察不同因素对川党参中核苷类成分提取量的影响。运用 HPLC 测定胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的含量, 流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min, 1%~5% A; 10~15 min, 5%~15% A; 15~22 min, 15%~17% A; 22~26 min, 17%~20% A; 26~32 min, 20%~24% A), 检测波长 260 nm。结果: 各因素对核苷类成分提取量的影响顺序为甲醇体积分数 > 提取次数 > 料液比 > 提取时间, 最佳提取工艺为加 10 倍量水提取 2 次, 每次 30 min, 川党参中 4 种核苷类成分总提取量 $1.523 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 建立的 HPLC 检测川党参中核苷类成分的含量方法准确可靠。优选的提取工艺稳定可行, 具有节约成本、快速、高效等优点。

[关键词] 川党参; 超声提取法; 核苷类; 胞苷; 尿苷; 鸟苷; 腺苷

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0034-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110034

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160415.1007.014.html>

[网络出版时间] 2016-04-15 10:07

Optimization of Extraction Technology for Total Nucleosides from *Codonopsis tangshen* by Orthogonal Test

ZHANG Jing, DING Bo, ZHANG Hua, QI Jun-sheng, ZHOU Nong*, CHEN Xiu-hong, LIU Luo
(College of Life Science & Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction conditions of total nucleosides in *Codonopsis tangshen*. **Method:** Ultrasonic method was adopted to extracting total nucleosides in *C. tangshen*. Taking the contents of total nucleosides (cytidine, uridine, guanosine and adenosine) as index, based on single factor tests, orthogonal test was designed to optimize extraction conditions of total nucleosides in *C. tangshen*. HPLC was employed to determine the contents of cytidine, uridine, guanosine and adenosine with mobile phase of methanol-water for gradient elution and detection wavelength at 260 nm. **Result:** The influence of various factors on the extraction rate of total nucleosides was on order of volume fraction of methanol > extraction times > solid-liquid ratio > extraction time. Optimal parameters was as follows: extracted twice with 10 times the amount of water for 30 min of each time. Under these conditions, extracting amount of total nucleosides was $1.523 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** This established HPLC method is accurate and reliable to detect contents of total nucleosides. At the same time, this optimized extraction technology is stable and feasible with the advantages of energy-saving, rapidity, efficient and so on.

[Key words] *Codonopsis tangshen*; ultrasonic extraction; nucleosides; cytidine; uridine; guanosine; adenosine

[收稿日期] 20150727(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260622)

[第一作者] 张静, 在读硕士, 从事药用植物栽培与生态环境调控研究, Tel:023-58102290, E-mail:435280513@qq.com

[通讯作者] *周浓, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物栽培与质量控制研究, Tel:023-58102522, E-mail:erhaizn@126.com

川党参被 2015 年版《中国药典》收载为党参的原植物之一,具有补脾益肺、养血生津等功效,为我国常用的药食两用中药之一^[1-2]。重庆市奉节县、巫溪县、巫山县等地是川党参的主要产区和分布中心,具有悠久的栽培历史,产自巫溪县的称大宁党、巫山县的称庙党、奉节县的称夔党,为渝产大宗、道地药材品种之一^[3]。临床广泛用于冠心病、高脂血症、胃肠功能紊乱、肿瘤、低血压和功能性子官出血等患者的保健和治疗^[4]。而党参药材及其制剂在 2015 年版《中国药典》一部中收载了以党参炔苷为对照成分的薄层鉴定方法,尚未收载指标性成分的含量控制方法^[1]。据报道,党参中含有腺苷^[5]、尿嘧啶^[6]等核苷类物质,而核苷类物质具有调节免疫功能、调节血糖、促进肠道修复、降低血压、抗心律失常、抗缺血性损伤等生物活性^[7],且核苷类成分易溶于水,推测其含量水平的高低可能会影响党参制剂的疗效和质量。本实验拟建立川党参中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的定量分析方法,以 4 者的总提取量为考察指标,采用正交试验优选川党参中核苷类化合物的提取工艺,以期开发川党参综合利用的新途径,为其在医药保健、食品工业等相关领域的广泛应用提供实验依据。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),DZF-6050MBE 型电热恒温真空干燥箱(上海博讯实业有限公司),TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司),CP225D 型分析天平(德国 Sartorius 公司)。

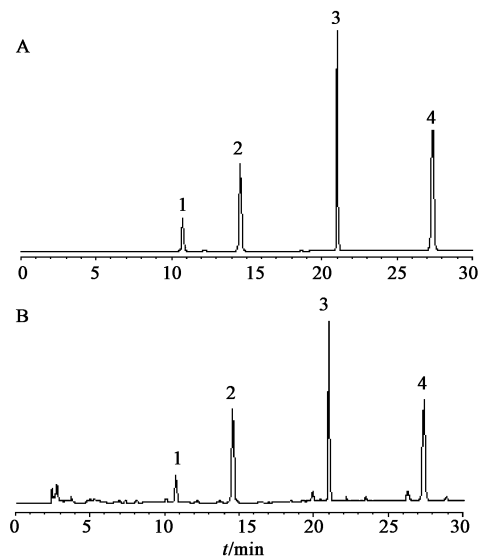
川党参新鲜根采集于重庆市巫溪县中梁乡栽培基地,采集 30 株成熟植株根以保证样品代表性,经重庆三峡学院周浓副教授鉴定为桔梗科植物川党参 *Codonopsis tangshen* 的干燥根。党参根自来水清洗后,于 35 °C 烘干,按分析要求分别粉碎过 3 号筛,备用;留样凭证存放于重庆三峡学院生物与食品基础实验教学中心。尿苷、腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110887-200202, 110879-200202),胞苷、鸟苷对照品(南京都莱生物技术有限公司,批号分别为 PHA0053, PHA0064, 经 HPLC 峰面积归一化法计算,纯度均 > 98%),水为娃哈哈纯净水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的含量分析

2.1.1 色谱条件 Venusil MP C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-水(B)梯度

洗脱(0 ~ 10 min, 1% ~ 5% A; 10 ~ 15 min, 5% ~ 15% A; 15 ~ 22 min, 15% ~ 17% A; 22 ~ 26 min, 17% ~ 20% A; 26 ~ 32 min, 20% ~ 24% A), 检测波长 260 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL, 柱温 35 °C。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 胞苷; 2. 尿苷; 3. 鸟苷; 4. 腺苷

图 1 川党参 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Codonopsis tangshen*

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取减压干燥至恒重的胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷对照品适量,加水溶解并制成质量浓度分别为 0.58, 0.55, 0.55, 0.59 g · L⁻¹ 的对照品贮备液,备用。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取各对照品贮备液适量,加水定容至 25 mL,得混合对照品溶液(胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷质量浓度分别为 58.0, 66.0, 110.0, 59.0 mg · L⁻¹),置于 4 °C 冰箱内,临用前经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。逐级稀释,得系列不同质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程分别为 $Y = 38\ 717X - 10\ 660$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 46\ 771X + 7\ 432.7$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 44\ 764X + 25\ 825$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 62\ 835X + 15\ 674$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围依次为 0.58 ~ 58.00, 0.66 ~ 66.00, 1.10 ~ 110.00, 0.59 ~ 59.00 mg · L⁻¹。

2.2 单因素试验考察 精密称取川党参粉末(过 3 号筛)1.0 g,置于 100 mL 锥形瓶中,精密加入水 20 mL,混匀,室温下超声提取 30 min(功率 300 W, 频率 40 kHz),放至室温,摇匀,于 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算川党参中 4 种核苷类成分的含

量。分别选取甲醇体积分数(0, 15%, 30%, 50%, 70%, 100%), 提取时间(15, 30, 45, 60 min), 料液比(1:10, 1:20, 1:30, 1:40)和提取次数(1, 2, 3, 4 次)为分析因素, 研究某一因素变化对川党参核苷类成分的影响, 见图 2。

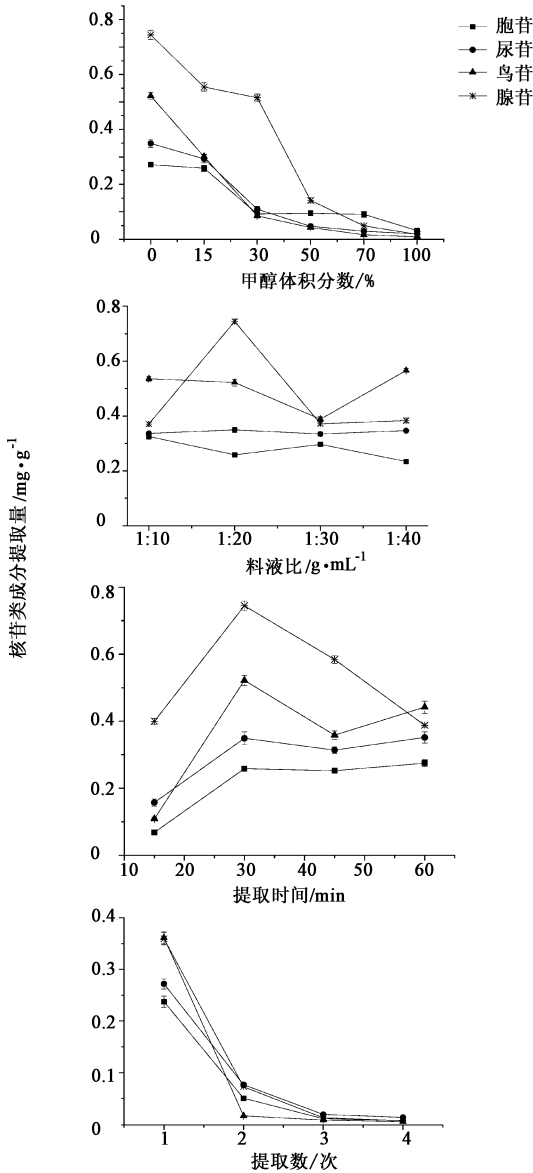


图 2 甲醇体积分数、提取时间、料液比、提取次数对川党参中核苷类成分提取量的影响

Fig. 2 Effect of factors on extracting amount of total nucleosides in *Codonopsis tangshen*

结果显示随甲醇体积分数的增加, 核苷类成分提取量呈明显的下降趋势。其中甲醇体积分数在 0 ~ 50% 时下降趋势较快, 体积分数 > 50% 时下降趋势较缓。这可能是因为核苷类化合物极性大, 易溶于水而难溶于有机溶剂^[11]。故正交试验中甲醇体积分数选择 0 ~ 50%。当提取时间 > 30 min 时, 核苷类成分提取量逐渐下降, 原因主要是在超声提取

过程中随着时间的延长, 川党参细胞的破碎度增强, 核苷类成分溶出量逐渐增加, 提取率提高; 但时间过长, 细胞进一步破碎, 药材中其他水溶性成分逐渐溶出并影响了核苷类成分的溶出速率, 导致检测出的核苷类成分增加变缓, 故提取时间选择 15 ~ 45 min。当液料比 > 20 mL · g⁻¹ 时, 核苷类成分的提取量变化不大, 说明川党参核苷已经基本提出。超声提取 2 次基本已经达到了基本提取完全的效果, 从经济合理性方面考虑, 选择超声提取 2 次为佳。

2.3 正交试验优选^[8] 在单因素试验基础上, 以胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷 4 种核苷类成分提取量为评价指标, 选取甲醇体积分数、提取时间、料液比、提取次数为考察因素。分别精密称取川党参粉末(过 3 号筛) 1.0 g, 每组试验平行 3 份, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 川党参中核苷类成分提取工艺优化正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of total nucleosides in *Codonopsis tangshen*

No.	A 甲醇体积分数/%	B 提取时间 /min	C 料液比 /g · mL ⁻¹	D 提取次数 /次	核苷类成分提取量 /mg · g ⁻¹
1	0	15	1:10	1	1.361
2	0	30	1:20	2	1.388
3	0	45	1:30	3	1.165
4	30	15	1:30	3	0.393
5	30	30	1:20	1	0.392
6	30	45	1:10	2	0.561
7	50	15	1:30	2	0.105
8	50	30	1:10	3	0.114
9	50	45	1:20	1	0.118

表 2 核苷类成分提取量方差分析

Table 2 Variance analysis of extracting amount of total nucleosides

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	6.762	2	3.381	1769.834	<0.01
B	0.028	2	0.014	7.308	>0.05
C	0.012	2	0.006	3.135	>0.05
D	0.010	2	0.005	2.681	>0.05
误差	0.025	18	0.002		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0, F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ 。

由直观分析可知, 各因素影响川党参中核苷类成分提取量的排序为 A > D > C > B。方差分析表明因素 B, C, D 各水平间无显著差异, 而因素 A 各水平间差异则有极显著性。确定超声提取川党参中核苷

类成分的最佳工艺条件为 $A_1B_2C_1D_2$, 即常温条件下加 10 倍量水超声提取 30 min, 提取 2 次。

2.4 验证试验 精密称取川党参粉末(过 3 号筛) 1.0 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 按优选的工艺条件提取, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果核苷类成分提取量分别为 1.525, 1.528, 1.515 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.4%。说明该工艺稳定、重复性较好、操作简单。

2.5 不同工艺提取效果比较 文献中多采用回流提取法(加 10 倍量水于 99 $^{\circ}\text{C}$ 提取 2 次, 每次 240 min)^[9] 和超声提取法(加 10 倍量水于 30 $^{\circ}\text{C}$, 300 W 提取 2 次, 每次 30 min)^[10], 考察这 2 种方法对川党参中核苷类成分提取量的影响, 结果提取量胞苷分别为 0.124, 0.341 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 尿苷依次为 0.168, 0.390 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 鸟苷分别为 0.251, 0.437 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 腺苷依次为 0.357, 0.356 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明超声法较回流法有较大优势, 不仅明显提高了川党参中 4 种核苷类成分的提取量, 而且大大缩短了提取时间。

3 讨论

核苷类化合物极性大, 较难分离, 本文比较了 4 种色谱柱 Innoval AQ C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Venusil XBP C_{18} (L) (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Durashell C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 和 Venusil MP C_{18} (2) (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 结果表明 Venusil MP C_{18} (2) 色谱柱对 4 种核苷类成分达到了良好的分离, 第 1 种色谱柱峰形较差, 中间 2 种色谱柱不能很好地分离 4 种核苷类成分。比较不同流动相系统(乙腈-水、甲醇-水、乙腈-甲酸水溶液和甲醇-甲酸水溶液)对样品的分离效果, 发现流动相甲醇-水的分离效果较好。在 190 ~ 400 nm 下用 PDA 检测器对混合对照品进行光谱扫描并保存全光谱, 可以观测到胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷在 260 nm 处都有较大的吸收峰, 故选择检测波长 260 nm。

本文考察了甲醇体积分数、提取时间、料液比及提取次数 4 个因素对川党参中 4 种核苷类成分提取量的影响, 以胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的总提取量为评

价指标, 通过正交试验优化提取工艺。结果表明甲醇体积分数是影响川党参核苷类成分总量的主要因素, 优选的工艺条件稳定可行, 可为川党参中核苷类成分的开发与利用提供技术支持。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 281-282.
- [2] 赵莎, 辛天怡, 侯典云, 等. 党参药材及其混伪品的 ITSITS2 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 421-428.
- [3] 胡开治, 秦静, 谢贤明, 等. 川党参生产的经济分析[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(11): 165-168.
- [4] 冯佩佩, 李忠祥, 原忠. 党参属药用植物化学成分和药理研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(4): 307-311.
- [5] Li C Y, Xu H X, Han Q B, et al. Quality assessment of Radix Codonopsis by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2124-2129.
- [6] 贺庆, 朱恩圆, 王峥涛, 等. 党参化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(1): 10-12.
- [7] 张雪梅, 杨丰庆, 夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 277-282.
- [8] 杜荣寿. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 119-139.
- [9] 周菊峰, 黄兰芳, 郭方遒. LC-ESI-MS 快速同时测定冬虫夏草中主要核苷类成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2349-2352.
- [10] Duan B Z, Wang L Z, Dai X H, et al. Identification and quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in aqueous extracts of *Fritillaria cirrhosa* D. DON. using HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS[J]. Anal Lett, 2011, 44(15): 2491-2502.
- [11] 黄林芳, 段宝忠, 王丽芝, 等. 川贝母新资源太白贝母中水溶性成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 585-588.

[责任编辑 刘德文]