

柴胡总多糖提取工艺优化及其不同 炮制品中总多糖的含量比较

李小宁, 于欢, 龚千锋*, 龚志勇, 彭璐, 俞杰, 阳强
(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 优化柴胡总多糖的提取工艺, 比较不同炮制品中总多糖的含量差异, 为该有效部位的开发利用提供参考。
方法: 采用苯酚-硫酸法测定总多糖含量, 检测波长 485 nm。通过单因素试验与正交试验优选柴胡总多糖的提取工艺, 考察提取温度、料水比、提取时间、提取次数对总多糖得率的影响。测定柴胡不同炮制品中总多糖的含量。**结果:** 各因素对提取工艺的影响顺序为提取温度 > 提取次数 > 料液比 > 提取时间。柴胡总多糖的最佳提取工艺条件为加 50 倍量水在 100 °C 下提取 2 次, 每次 2 h。可溶性总多糖提取率最高达 19.39%, 柴胡生品、清炒柴胡、酒炙柴胡、酒拌柴胡、醋炙柴胡、醋拌柴胡、鳖血炒柴胡中总多糖质量分数 9.82% ~ 20.82%。**结论:** 优选的提取工艺合理可靠、重复性好, 为柴胡总多糖的研发提供理论依据。

[关键词] 柴胡; 鳖血; 多糖; 正交试验; 炮制; 苯酚-硫酸法

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2; R283.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0027-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140027

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160523.1036.038.html>

[网络出版时间] 2016-05-23 10:36

Optimization of Extraction Process of Total Polysaccharides in Bupleuri Radix and Its Content Difference in Different Processed Products of Bupleuri Radix

LI Xiao-ning, YU Huan, GONG Qian-feng*, GONG Zhi-yong, PENG Lu, YU Jie, YANG Qiang
(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total polysaccharides in Bupleuri Radix and compare its content difference in different processed products. **Method:** Phenol-sulfuric acid method was employed to determine the content of total polysaccharides at 485 nm. Single factor test and orthogonal test was adopted to optimize extraction process of total polysaccharides in Bupleuri Radix. **Result:** Influence of various factors on extraction process was in the order of extraction temperature > extraction times > solid-liquid ratio > extraction time. The best extraction technology conditions was as follows: extracted twice with 50 times the amount of water under 100 °C, 2 h for each time. Under these conditions, yield of soluble polysaccharides reached 19.39%, the content of total polysaccharides in different processed products of Bupleuri Radix was 9.82% -20.82%. **Conclusion:** This optimized extraction process is reasonable, reliable and suitable, which can provide theory basis for research and development of total polysaccharides in Bupleuri Radix.

[Key words] Bupleuri Radix; Trionycis Carapax blood; polysaccharide; orthogonal test; processing; phenol-sulfuric acid method

[收稿日期] 20150911(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260642)

[第一作者] 李小宁, 在读硕士, 从事中药炮制、饮片质量标准与炮制机制研究, Tel: 0791-87118852, E-mail: bravehenbane@163.com

[通讯作者] * 龚千锋, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究, Tel: 0791-87118852, E-mail: gongqf2002@163.com

皂苷类和挥发油是柴胡的主要有效成分,但二者并不能全面反映该药材的药理活性^[1]。现代药理研究表明柴胡多糖类成分具有保护胃黏膜^[2-3]、增强免疫^[4-5]、辐射防护的作用^[6]。目前,植物多糖类成分的提取方法有很多种,包括溶剂提取法、酸提法、碱提法、酶解法、超滤法、超声波法、微波法和 CO₂ 超临界萃取法等^[7]。根据柴胡多糖类成分的溶解性等特征,其目前的提取分离方法包括热水浸提法^[8]、超声波法^[9]等,但存在提取率不高等问题。本实验拟通过单因素试验与正交试验优选柴胡多糖类成分的提取工艺,为该有效部位的深入研究与开发提供参考。

1 材料

UV-8000S 型双光束紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),CP214 型电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司),DFY-400 型摇摆式高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司),LD5-2A 型高速离心机(北京医川离心机厂)。柴胡药材(批号 20150114)购于河北省保定市博野县种植基地,中华鳖(批号 20150324)购于江西省军山湖甲鱼养殖基地,经江西中医药大学中药鉴定学科组范崔生教授鉴定,分别为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* 的根茎和鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* 的背甲;黄酒(浙江塔牌绍兴酒有限公司),米醋(山西紫林醋业股份有限公司),鳖血柴胡饮片、醋炙柴胡饮片、酒炙柴胡饮片均由本实验室自制,D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-201205),苯酚、浓硫酸(国药集团化学试剂有限公司),试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 柴胡饮片 取柴胡药材,除去杂质和残茎,洗净泥沙,用湿纱布润透,切段(1 cm 左右),40 ℃ 低温干燥,筛去灰屑,备用^[10-12]。

2.1.2 鳖血柴胡 将新鲜中华鳖的四肢固定,颈动脉取血,加入适量黄酒拌匀,备用。取适量柴胡饮片置于烧杯中,加入适量鳖血,拌匀,待鳖血吸尽后于铜锅中文火炒干^[7-9]。

2.1.3 醋炙柴胡 取柴胡饮片,加入定量的米醋拌匀,闷润至醋被吸尽,置铜锅内文火炒干^[7-9]。

2.1.4 酒炙柴胡 取柴胡饮片,加入定量的黄酒拌匀,闷润至黄酒被吸尽,置铜锅内文火炒干^[7-9]。

2.2 显色液的配制 精确称取重蒸苯酚 30 g,置于 500 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀。将浓硫酸

500 mL 缓缓加入 100 mL 的 6% 苯酚溶液中,搅拌,混匀,配成显色液,冷却至室温,备用。

2.3 柴胡总多糖的含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 将柴胡粉碎后,过四号筛,精密称定 2.0 g,加 20 倍量无水乙醇在微沸状态下回流提取 2 h,提取液减压回收乙醇后,弃去。滤渣加水在一定温度下浸提一段时间,重复抽提数次,合并上清液,得总多糖粗提液。浓缩柴胡总多糖粗提液,搅拌下加入无水乙醇至乙醇体积分数达 90%,静置 2 h,离心(8 000 r·min⁻¹,5 min,下同),弃去上清液^[13],将粗多糖置于 20 mL 水中,采用 Sevage 法除蛋白,加入等体积 Sevage 试剂[三氯甲烷-正丁醇(4:1)],置具塞离心管中,振摇 30 min,离心,水相与三氯甲烷层分开,除去蛋白层,反复多次,直至蛋白完全除尽,得柴胡总多糖溶液^[14]。精密量取柴胡总多糖溶液 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得供试品溶液。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取于 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 92.92 mg 溶于 100 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀。分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6,1.8,2.0 mL 置于量瓶中,各加水补至 2.0 mL,加入显色液 6.0 mL,振荡摇匀,置沸水浴中加热 15 min,取出,冷却至室温,同时用 2.0 mL 水作为空白对照,在 485 nm 处测定吸光度 A。以葡萄糖质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得线性回归方程 $Y = 0.6755X + 0.0364$ ($R^2 = 0.9993$),线性范围 185.84 ~ 1 858.40 mg·L⁻¹。

2.3.3 精密度试验 取葡萄糖对照品溶液,按 2.3.2 项下条件显色,连续测定 6 次,计算柴胡总多糖 A 的 RSD 0.6%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温密闭放置,分别在制备后 0,2,4,6,8,12 h 测定,结果柴胡总多糖 A 的 RSD 0.9%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一样品粉末 6 份,按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.2 项下条件测定,计算柴胡总多糖 A 的 RSD 0.9%,表明本方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 6 份,每份约 0.5 g,各精密加入无水葡萄糖对照品 54.50 mg,按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.2 项下条件测定,计算平均加样回收率 99.74%,RSD 1.1%。

2.4 提取工艺的单因素试验考察

2.4.1 提取温度 精密称定柴胡粉末 2.0 g,加 20 倍量无水乙醇在微沸状态下回流提取 2 h,弃去乙醇浸提液,滤渣加 30 倍量水分别在 60,70,80,90,100 ℃ 的温度下回流提取 2 h,计算总多糖提取率分别为 3.70%,6.67%,12.09%,14.98%,17.89%。说明随温度的升高,总多糖提取率不断升高,且增加显著。

2.4.2 料液比 称定柴胡粉末 2.0 g,加 20 倍量无水乙醇在微沸状态下回流提取 2 h,弃去乙醇浸提液,滤渣分别按料液比 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50 加水于 90 ℃ 下回流提取 2 h,结果总多糖提取率分别为 10.30%,10.57%,10.82%,11.16%,12.84%。

2.4.3 提取时间 精密称定柴胡粉末 2.0 g,加 20 倍量无水乙醇在微沸状态下回流提取 2 h,弃去乙醇浸提液,滤渣加 30 倍量水于 90 ℃ 分别回流提取 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h,结果总多糖提取率分别为 7.47%,9.93%,11.26%,14.26%,11.64%。说明随着提取时间的增加,总多糖提取率逐渐上升,但超过 2.0 h 后,提取率略微下降,说明提取时间的延长可能导致总多糖的降解。

2.4.4 提取次数 精密称定柴胡粉末 2.0 g,加 20 倍量无水乙醇在微沸状态下回流提取 2 h,弃去乙醇浸提液,滤渣加 30 倍量水于 90 ℃ 回流提取 2 h,分别重复抽提 1,2,3,4 次,结果总多糖提取率分别为 12.50%,15.95%,18.97%,19.07%。

2.5 正交试验优选 在单因素试验基础上,选取提取温度、料液比、提取水量和提取次数为考察因素,以总多糖提取率为评价指标,分别精密称定柴胡药材粉末 2.0 g,共 9 份,试验安排及结果见表 1。方差分析利用 SPSS 16.0 软件处理,见表 2。由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $A > D > B > C$ 。以极差最小的因素 C 为误差项,结果表明因素 A, D 具有极显著性影响,因素 B 则无显著性影响。综合分析,确定最优工艺条件为 $A_3B_3C_2D_2$,即加 50 倍量水在 100 ℃ 下提取 2 次,每次 2 h。

2.6 样品测定 分别精密称取柴胡不同炮制品(柴胡生品、清炒柴胡、酒炙柴胡、酒拌柴胡、醋炙柴胡、醋拌柴胡、鳖血炒柴胡)粉末 2.0 g,按优选的工艺条件提取,按 2.3 项下方法测定,结果总多糖质量分数分别为 20.47%,20.82%,19.42%,14.70%,19.40%,14.93%,9.82%。说明不同柴胡炮制品中总多糖含量有较大差异,相同辅料而炮制工艺不同的炮制品中总多糖含量也存在着差异。提示不同柴

表 1 柴胡总多糖提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of total polysaccharides in Bupleuri Radix

No.	A 提取温度 /℃	B 料液比	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	总多糖 提取率 /%
1	80	1:30	1.5	1	5.250
2	80	1:40	2.0	2	9.736
3	80	1:50	2.5	3	12.070
4	90	1:30	2.0	3	14.809
5	90	1:40	2.5	1	6.929
6	90	1:50	1.5	2	14.875
7	100	1:30	2.5	2	19.390
8	100	1:40	1.5	3	18.493
9	100	1:50	2.0	1	15.530

表 2 柴胡总多糖提取率方差分析

Table 2 Variance analysis of yield of total polysaccharides in Bupleuri Radix

方差来源	SS	MS	F	P
A	118.694	59.347	213.005	<0.01
B	9.012	4.506	16.173	>0.05
D	0.557	0.279	115.515	<0.01
C(误差)	64.369	32.184		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

胡炮制品中总多糖的含量与炮制辅料、炮制工艺等因素密切相关。液体辅料酒、醋、鳖血可使柴胡中总多糖含量降低,鳖血尤其明显;炒法可使柴胡中总多糖含量升高,其具体机制有待进一步探究。

3 讨论

本文采用水提醇沉法提取柴胡总多糖中的可溶性多糖,建立了苯酚-硫酸比色法测定总多糖的含量,该法操作简单、显色稳定、灵敏度高、重复性好。采用单因素试验与正交试验优化了柴胡总多糖的提取工艺,该工艺具有稳定、操作简单、生产成本较低的优点,为柴胡总多糖的进一步研究打下了良好基础。

植物多糖结构复杂,不同提取工艺对多糖的提取率和含量也会有不同,多糖的溶解度主要受到分子间氢键的相互作用及相对分子质量大小的影响,同时不同类别的多糖溶解性也是不同的。由于工艺不同,辅料不同,这几种炮制品中多糖含量各异,结构和药理学效应也有差异,要找到一种适合不同炮制品的最优工艺,还需要进一步探究。

从本文研究结果可知,相对于其他几种炮制品,

鳖血柴胡中总多糖含量降低明显,这是由于鳖血中含有丰富的蛋白,而鳖血柴胡在炮制过程中一部分多糖与蛋白结合,在 Sevage 法除蛋白时被除去,造成鳖血柴胡总多糖含量降低,其具体机制本课题组将进行进一步探究。通过建立柴胡总多糖的最优提取工艺,测定柴胡中总多糖的含量,为进一步研究柴胡多糖含量与胃黏膜保护作用、增强免疫作用、辐射防护作用的相关性分析提供了实验依据。

[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,2010:230-231.

[2] 史青,聂淑琴,黄璐琦. 柴胡属植物化学成分及药理研究新进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(5):53-56.

[3] 叶方,杨光义,王刚,等. 柴胡多糖的研究进展[J]. 医药导报,2012,31(8):1042-1045.

[4] Wang Z, Li H, Xu H, et al. Beneficial effect of *Bupleurum* polysaccharides on autoimmune disease induced by *Campylobacter jejuni* in BALB/c mice[J]. J Ethnopharm,2009,124(3):481-487.

[5] 林波,章蕴毅,徐晗,等. 柴胡总多糖对急性肺损伤大鼠的抗氧化作用[J]. 中国临床药理学杂志,2010,19

(1):6-10.

[6] 杨立明,章伟,苏逊生,等. 柴胡多糖对⁶⁰Co-γ射线辐照小鼠的辐射防护作用[J]. 江苏农业科学,2009,37(6):292-293.

[7] 陈涛. 植物多糖的提取方法概述[J]. 科技风,2010,23(8):246.

[8] 杨立明,王永中. 柴胡多糖的制备及部分理化性质测定[J]. 安徽农业技术师范学院学报,2000,14(3):27-32.

[9] 李岱,张静,孙润广. 超声波处理对柴胡多糖提取率、微观形貌特征及生物活性的影响[J]. 生物加工过程,2009,7(2):29-34.

[10] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:237.

[11] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社,2009:123.

[12] 龚千锋. 樟树中药炮制全书[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1990:111.

[13] 罗忠圣,黄秀平,周镁,等. 海拔高度对黔产太子参总多糖含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):39-42.

[14] 王丹,吕永磊,徐丽媛,等. 人参多糖含量测定方法研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(4):774-776.

[责任编辑 刘德文]