

刺五加镇静抗疲劳有效成分的提取、纯化工艺优选

田志浩¹, 马长华¹, 黄颖², 周艳华², 崔海峰², 孙明杰^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优选刺五加镇静抗疲劳成分的提取及纯化工艺。方法: 采用 HPLC 测定刺五加镇静抗疲劳成分含量, 色谱条件为 TechMate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 紫丁香苷、刺五加 E、异嗪皮啶检测波长分别为 265, 209, 344 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液梯度洗脱。以刺五加苷 E、紫丁香苷、异嗪皮啶为综合考察指标, 通过正交试验考察乙醇用量、提取次数、乙醇体积分数对提取工艺的影响, 静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 单因素试验优选刺五加镇静抗疲劳成分的纯化工艺。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h。选择 D101 型大孔树脂, 其最佳纯化工艺为上样量 1:1.3 ~ 1:1.4, 上样液质量浓度 0.33 g·mL⁻¹, 加 30% 乙醇 3.5 BV 洗脱, 刺五加抗疲劳成分纯度达 18.35%。结论: 优选的提取工艺可靠、重复性好, 刺五加有效成分收率达满意效果。

[关键词] 刺五加苷 E; 紫丁香苷; 异嗪皮啶; 分离及纯化工艺; 含量测定

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0038-05

[doi] 10.11653/syjf2013190038

Optimization of Extraction and Purification Processes for Anti-fatigue and Sedative Ingredients from *Acanthopanax Senticosi Radix Et Rhizoma Seu Caulis*

TIAN Zhi-hao¹, MA Chang-hua¹, HUANG Ying², ZHOU Yan-hua², CUI Hai-feng², SUN Ming-jie^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification processes of sedative and anti-fatigue ingredients from *Acanthopanax Senticosi Radix Et Rhizoma Seu Caulis*. **Method:** The contents of sedative and anti-fatigue ingredients were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: TechMate C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), detection wavelengths of syringin, acanthopanax E, isofraxidin at 265, 209, 344 nm, flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature 30 °C, injection volume 10 μL, mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid gradient elution. With the contents of syringin, eleutheroside E, isofraxidin as comprehensive evaluation index, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology with ethanol concentration, extraction times and ethanol amount as factors, types of macroporous resin was screened by static adsorption-elution test, purification technology of sedative and anti-fatigue ingredients from *Acanthopanax Senticosi Radix Et Rhizoma Seu Caulis* was optimized by single factor tests. **Result:** Optimum extraction process was as following: extracted 3 times with 10-fold the amount of 70% ethanol, 1 h each time. D101 macroporous resin was selected, optimum purification technology was: sample volume 1:1.3-1:1.4, the concentration of sample solution was 0.33 g·mL⁻¹, eluted with 3.5 BV 30% ethanol, purify of sedative and anti-fatigue ingredients

[收稿日期] 20130524(005)

[基金项目] 中国中医科学院自主选题项目(ZZ2011008)

[第一作者] 田志浩, 在读硕士, 从事现代仪器分析方法在中药质量控制方面的应用研究, Tel: 010-84738603, E-mail: tianzhihao. hi@163.com

[通讯作者] * 孙明杰, 研究员, 从事中药药理和方剂基础研究, Tel: 010-64014411-3330, E-mail: sunmj62@tom.cn

18.35%。 **Conclusion:** Optimized extraction technology was reliable and repeatable, yield of active ingredients of *Acanthopanax Senticosi Radix Et Rhizoma Seu Caulis* had satisfactory results.

[**Key words**] eleutheroside E; syringin; isofraxidin; separation and purification technology; determination

《本草纲目》将刺五加列为“本经上品”，能“补中益气、坚筋骨、强意志、久服轻身耐老”，具有益气健脾、补肾安神之功效。现代药理研究表明，刺五加具有神经元保护、免疫调节、延缓衰老、抗氧化、抗肿瘤、改善心脑血管活性、调节血糖等作用。此外，刺五加还能增强人体的适应性、抗疲劳和防辐射功能^[1-3]。其中刺五加总苷及根提取物均具有抗疲劳作用，且前者较后者强40~120倍，较人参提取物及人参苷都强^[4-5]，抗疲劳的主要成分为刺五加总皂苷^[6-9]。本实验以紫丁香苷、刺五加苷E、异嗪皮啶为综合评价指标，通过正交试验优选刺五加抗疲劳成分的提取工艺，单因素试验考察大孔树脂纯化工艺，为刺五加的开发提供实验依据。

1 材料

1525型高效液相色谱仪(美国Waters), AE 240型1/10万电子分析天平(梅特勒-托利多公司), BS 110S型1/万电子分析天平(德国赛多利斯)。刺五加购于河北安国, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax sessiliflorus* (Rupr. et Maxim.) Seem 的干燥根与茎。紫丁香苷、刺五加苷E对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为111574-200603, 111713-200502), 异嗪皮啶对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号20111024, 纯度 $\geq 98\%$), 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 醇提工艺优选^[10] 取刺五加饮片打成粗粉^[11], 过40目筛, 精密称取25g, 共9份, 加乙醇回流提取^[12-14], 合并提取液, 减压回收乙醇并浓缩至干, 取干膏适量, 测定刺五加苷E、紫丁香苷、异嗪皮啶含量, 因素水平见表1。

表1 刺五加镇静抗疲劳成分提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取数/次	C 乙醇用量/倍
1	60	1	6
2	70	2	8
3	80	3	10

2.2 镇静抗疲劳成分的含量测定

2.2.1 色谱条件 TechMate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 紫丁香苷、刺五加E、异嗪皮啶检测

波长分别为265, 209, 344 nm, 流速1.0 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 进样量10 μL, 流动相乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~40 min, 85% A; 40~60 min, 85%~100% A; 60~80 min, 100%~85% A; 80~100 min, 85% A)。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取紫丁香苷、刺五加苷E、异嗪皮啶对照品5.12, 5.88, 3.75 mg, 分别置于10, 10, 100 mL量瓶中, 用适量甲醇超声溶解, 待冷却后定容, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取刺五加粉末25g(过40目筛), 提取, 减压回收乙醇, 水浴蒸干, 得刺五加干膏。取干膏适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 定容于10 mL量瓶中, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别取紫丁香苷、刺五加苷E、异嗪皮啶对照品溶液适量, 分别配制成系列质量浓度溶液, 按2.2.1项下色谱条件进样, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y_{\text{紫丁香苷}} = 3 \times 10^9 X - 8\ 631.8$ ($r = 0.999\ 9$), $Y_{\text{刺五加苷E}} = 2 \times 10^9 X + 20\ 783$ ($r = 0.999\ 9$), $Y_{\text{异嗪皮啶}} = 1 \times 10^9 X + 6\ 701.3$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围分别为6.44~206, 8.56~274, 1.17~37.5 mg·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 分别取0.023 g·L⁻¹紫丁香苷, 0.021 3 g·L⁻¹刺五加苷E, 0.015 8 g·L⁻¹异嗪皮啶对照品溶液, 各进样6次, 结果峰面积的RSD分别为0.34%, 1.2%, 0.19%。

2.2.6 重复性试验 取6份供试品溶液进样, 结果峰面积的RSD分别为1.08%, 0.56%, 2.75%。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于制备后0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h进样, 结果峰面积的RSD分别为0.72%, 0.35%, 2.15%, 表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的刺五加粉末6份(每份约1g), 分别加入紫丁香苷0.51 mg, 刺五加苷E 1.56 mg, 异嗪皮啶0.013 2 mg, 按2.2.3项下方法制备供试品溶液, 测定, 计算平均回收率分别为98.89%, 98.01%, 97.24%, RSD分别为0.23%, 0.03%, 0.3%。

2.3 正交试验设计 由于紫丁香苷和刺五加苷E均为刺五加苷类, 选择异嗪皮啶和刺五加总苷(紫丁香苷和刺五加苷E含量之和)的综合评分为指

标, 权重系数分别为 0.3, 0.7, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 刺五加镇静抗疲劳成分提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	总苷质量分数/%	异嗪皮啶质量分数/%	综合评分
1	1	1	3	1	0.197 10	0.005 07	83.73
2	1	2	1	2	0.142 43	0.004 26	63.42
3	1	3	2	3	0.189 19	0.003 94	75.85
4	2	1	2	3	0.181 35	0.002 80	67.93
5	2	2	3	1	0.241 52	0.006 14	102.25
6	2	3	1	2	0.199 31	0.004 95	83.81
7	3	1	1	2	0.134 99	0.002 67	53.43
8	3	2	2	3	0.171 73	0.005 44	77.95
9	3	3	3	1	0.239 99	0.005 62	99.25
K_1	223.00	205.09	200.66	285.23			
K_2	253.99	243.62	221.73	200.66			
K_3	230.63	258.91	285.23	221.73			
R	30.99	53.82	84.57	84.57			

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	512.688	2	256.344	11.045	>0.05
B	1 292.249	2	646.124	27.840	<0.05
C	173.782	2	86.891	3.744	>0.05
D(误差)	46.417	2	23.209		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

直观分析表明各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > B > A$ 。方差分析表明 B 因素具有显著影响, 其他因素则无显著影响, 确定最佳提取工艺为 $A_2B_3C_3$, 即加 10 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h。

2.4 提取工艺验证试验 称取刺五加粉末(过 40 目筛)3 份, 每份 250 g, 按最佳提取工艺进行 3 次验证试验, 结果刺五加总苷、异嗪皮啶质量分数分别为 0.18%, 0.002 7%, RSD 分别为 1.25%, 0.56%, 2.8%。

2.5 纯化工艺考察^[15-17]

2.5.1 大孔树脂筛选 精密称取 3 种已处理好的干树脂(AB-8, D-101, D-201)各 1 g, 分别置 250 mL 具塞锥形瓶中, 各加样品溶液 100 mL, 将具塞锥形瓶放入电动摇床持续振摇 20 h, 使饱和和吸附, 分别吸取上层液测定各成分含量, 计算各树脂的饱和吸附量(吸附前含量 - 吸附饱和后含量), 结果见表 4, 故选用 D-101 型大孔树脂。

2.5.2 上样液质量浓度考察 精密称取刺五加提取物 5 份, 每份 20 g, 分别加入 10, 20, 40, 60, 80 mL

表 4 大孔树脂饱和吸附量

树脂型号	紫丁香苷	刺五加苷	异嗪皮啶
AB-8	5.424	73.522	1.244
D-101	7.16	113.958	1.462
D-201	0.716	0	0.028

水震荡溶解, 过 D-101 型大孔树脂柱, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速吸附, 用水洗至流出液糖反应为阴性为止, 弃去洗脱液, 用 30% 乙醇洗脱, 流速 $1.25 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集 8 h 的洗脱液定容于 250 mL 量瓶中, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 进样量 50 μL , 结果见表 5, 故选择上样液质量浓度 $0.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 5 上样液质量浓度考察

上样液质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	紫丁香苷 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	刺五加苷 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	异嗪皮啶 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
2	30.376	146.260	3.715
1	32.765	164.262	2.337
0.5	66.410	250.493	22.744
0.33	131.894	774.34	20.8614
0.25	52.119	232.934	6.80

2.5.3 洗脱剂浓度考察 取 $0.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以生药量计, 下同) 溶液 5 份, 每份 60 mL, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样, 用水洗至流出液糖反应为阴性, 弃去洗脱液, 分别用不同体积分数的乙醇洗脱, 洗脱流速 $1.25 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集 8 h 的洗脱液, 共 240 mL, 定容于 250 mL 量瓶中, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 进样量 50 μL , 结果

见表6,应选洗脱溶剂30%乙醇。

表6 洗脱剂考察

乙醇体积分数 /%	紫丁香苷 /μg	刺五加苷 /μg	异嗪皮啶 /μg
10	108.258	33.572	0
30	113.895	480.991	23.361
50	88.742	215.226	37.725
70	38.016	134.492	12.827
90	31.433	116.72	9.167

2.5.4 泄漏曲线及最佳上样量考察 取0.33 g·mL⁻¹供试品溶液适量以2 BV·h⁻¹流速上样,收集流出液,每0.5 BV为一流份,进行HPLC检测,以流出液体积为横坐标,以每份流出液中紫丁香苷,刺五加苷E面积为纵坐标,绘制泄漏曲线(因异嗪皮啶含量很低,对其作泄漏曲线无实际意义),见图1,结果确定最大上样量1:4.455(大孔树脂质量-生药量)。

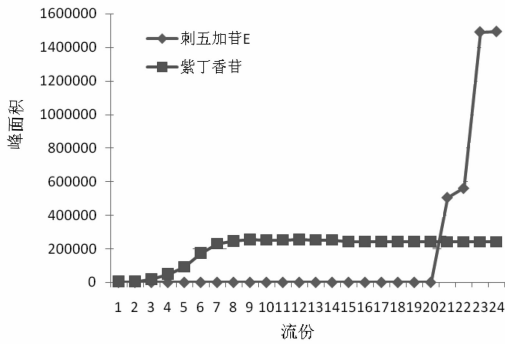


图1 刺五加镇静抗疲劳成分D-101型大孔树脂泄漏曲线

取0.33 g·mL⁻¹供试品溶液,选择不同上样量以2 BV·h⁻¹流速上样,用水洗至糖反应为阴性,弃去水洗部分,加30%乙醇冲洗,收集乙醇洗脱部分,用30%乙醇定容至250 mL,结果见表7,确定最佳上样量1:1.3~1:1.4。

表7 最佳上样量考察

上样量 (结脂质量:生药质量)	紫丁香苷 /μg	刺五加苷 /μg	异嗪皮啶 /μg
1:1	111.58	16.15	1.58
1:1.2	78.91	15.76	1.58
1:1.3	107.98	21.80	4.20
1:1.4	112.28	21.75	4.19
1:1.45	64.99	12.68	0.88

2.5.5 洗脱曲线考察 取刺五加提取液适量,按上述工艺上柱,吸附和洗脱,收集30%乙醇洗脱液,每0.5 BV为1个流份,检测,以流出液体积为横坐标,

以每份流出液中紫丁香苷,刺五加苷E,异嗪皮啶的面积为纵坐标,绘制洗脱曲线,见图2,表明紫丁香苷、刺五加苷E和异嗪皮啶均在第7个流份时基本洗脱干净。

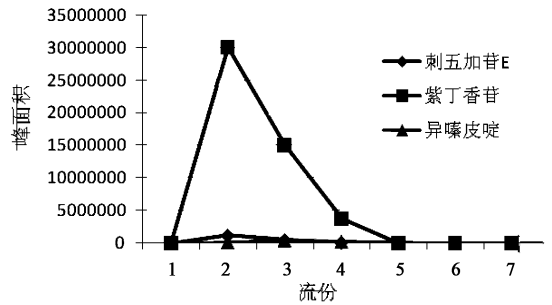


图2 刺五加镇静抗疲劳成分D-101型大孔树脂洗脱曲线

2.6 纯化工艺验证试验 按优选的大孔树脂纯化工艺进行3次试验,测得纯化前、后提取物质量分别为20.361,0.192 g,紫丁香苷质量分别为12.00,9.11 mg,刺五加苷E分别为27.74,24.93 mg,异嗪皮啶分别为1.70,1.20 mg,有效成分质量分数之和分别为0.2%,18.35%。

3 讨论

现代药理试验证实刺五加皂苷及异嗪皮啶均具有抗疲劳作用,故选取刺五加皂苷(紫丁香苷和刺五加苷E)及异嗪皮啶为考察指标,并采用多指标综合评分优选刺五加的提取工艺,避免了以单一指标成分进行工艺优选的片面性,与中药多组分,多靶点的作用特点相一致。因药材中异嗪皮啶含量较少,在绘制泄漏曲线时不能使D-101型树脂吸附饱和,故以刺五加苷E和紫丁香苷为指标考察泄漏曲线。

[参考文献]

- [1] 王志睿,林敬明,张忠义. 刺五加化学成分与药理研究进展[J]. 中药材,2003,26(8):603.
- [2] 潘翔,徐峰. 刺五加抗疲劳功能实验研究的进展[J]. 实验动物科学与管理,2005,20(2):39.
- [3] 钟玲,叶秋荣. 刺五加对大鼠实验性缺血心肌的保护作用[J]. 中国病理生理杂志,1995,11(4):366.
- [4] 李辰. 刺五加抗疲劳活性部位的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2008.
- [5] 李辰,王晓燕,胡绪玮,等. 刺五加抗疲劳活性部位中刺五加苷B的含量测定[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2800.
- [6] 封士兰,胡芳弟,赵健雄,等. RP-HPLC法研究刺五加注射液中刺五加苷E,刺五加苷B在大鼠体内的药代动力学和组织分布特性[J]. 药物分析杂志,2006,26(6):741.

赛氏曲霉深层发酵神曲的工艺优选

程亦雄, 张婧, 戚岑聪, 周黎, 史新元*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 优选神曲的深层发酵工艺。方法: 以淀粉酶、蛋白酶活性为指标, 采用单因素试验考察面粉和麦麸比例、不同无机盐对发酵工艺的影响; 以蛋白酶活力为指标, 采用正交试验考察面粉-麦麸用量比、发酵温度、摇床转速、无机盐用量对神曲深层发酵工艺的影响。结果: 选定赛氏曲霉进行纯种发酵工艺, K_2HPO_4 为神曲液态发酵所需的无机盐, 最佳发酵工艺为向 150 mL 水中加入面粉麦麸量 12 g 和 K_2HPO_4 0.15 g, 温度 28 °C, 摇床转速 180 r·min⁻¹。结论: 优选的发酵工艺稳定可行, 为中药发酵炮制技术的开发提供参考。

[关键词] 神曲; 赛氏曲霉; 酶活力; 正交试验; 淀粉酶; 蛋白酶; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0042-04

[doi] 10.11653/syfj2013190042

Optimization of Submerged Fermentation Technology for Massa Medicata Fermentata by Aspergillus Sydowii

CHENG Yi-xiong, ZHANG Jing, QI Cen-cong, ZHOU Li, SHI Xin-yuan*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize submerged fermentation technology of Massa Medicata Fermentata. **Method:** With activity of amylase and protease as indexes, single factor test was adopted to investigate effects of flour-wheat bran ratio and different inorganic salts on fermentation technology; With activity of protease as the index, orthogonal test was used to optimize submerged fermentation technology of Massa Medicata Fermentata with

[收稿日期] 20130314(021)

[基金项目] 北京市科技新星计划交叉学科项目(xxhz201210)

[第一作者] 程亦雄, 在读硕士, 从事发酵工程研究, Tel:15101078376, E-mail:chengyixiong100@163.com

[通讯作者] * 史新元, 副教授, 研究生导师, 从事中药生物技术研究, Tel:010-84738621, E-mail:xyshi@126.com

- [7] 曲中原. 刺五加总苷抗疲劳实验研究[J]. 中成药, 2009, 31(3): 474.
- [8] 许光辉, 吴艳萍, 罗友华, 等. 刺五加增强小鼠睡眠剥夺模型免疫功能和抗疲劳能力的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 153.
- [9] 袁昕蓉, 李康, 李强, 等. HPLC 法测定刺五加中游游离嗉皮啶和总异嗉皮啶的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(2): 118.
- [10] 周金黄, 王筠默主编. 中药药理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 238.
- [11] 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: 192.
- [12] 陆兔林, 马新飞, 毛春芹. 刺五加药材提取工艺的研究[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(4): 59.
- [13] 王玉琴, 郑清. 刺五加中刺五加皂甙提取条件的优化[J]. 盐城工学院学报: 自然科学版, 2005, 18(1): 49.
- [14] 曲中原, 金哲雄, 高文昊. 刺五加总普提取工艺研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2005, 21(1): 14.
- [15] 陈明岩, 邹明强, 李爱军, 等. 紫丁香甙标准品的提纯与表征[J]. 食品科学, 2002, 23(7): 3.
- [16] 彭玉麟, 马桂荣, 藉宝霞, 等. 刺五加糖营 B、B-1 的分离提纯及刺五加不同部位中 B 和 B-1 含量的测定[J]. 河北省科学院学报, 1984(1): 91.
- [17] 邵佳锋, 刘树民, 牟洪, 等. 刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 的大孔树脂分离纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 10.

[责任编辑 仝燕]