

民族药金耳环总多糖的提取工艺优选

魏学军¹, 林先燕¹, 李雪莹¹, 冯光维¹, 李江², 王怀富³

(1. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558003; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550001;
3. 贵州神奇药业有限责任公司, 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 优选金耳环中总多糖的提取工艺。方法: 选取固液比、提取温度、提取时间、醇沉浓度为考察因素, 以金耳环总多糖得率为评价指标, 采用正交试验对其提取工艺进行优选。结果: 金耳环总多糖最优提取工艺参数为液固比 6:1, 80 °C 提取 2 次, 每次 90 min, 90% 乙醇沉淀。此条件下, 总多糖平均得率 1.82%, RSD 1.93%。结论: 该优选方法简单快速, 稳定可行。

[关键词] 金耳环; 总多糖; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)10-0041-04

Optimization of Extraction Technology for Total Polysaccharides form *Asarum insigne*

WEI Xue-jun¹, LIN Xian-yan¹, LI Xue-ying¹, FENG Guang-wei¹, LI Jiang², WANG Huai-fu³

(1. Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558003, China;
2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;
3. Guizhou Maqika Pharmaceutical Co. Ltd, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total polysaccharides form *Asarum insigne*. **Method:** With ratio of solid-liquid, extraction temperature, extraction time and the concentration of ethanol precipitation as factors, orthogonal test was used for optimization of extraction process with yield of total polysaccharides from *A. insigne* as index. **Result:** Optimum extraction technology parameters of total polysaccharides form *A. insigne* were: solid-liquid ratio 6:1, extracted 2 times at 80 °C, per time 90 min, the concentration of ethanol precipitation 90%. Under these conditions, the average yield of total polysaccharides was 1.82%, RSD 1.93%. **Conclusion:** This optimized technology was simple, rapid, had good repeatability and stability.

[Key words] *Asarum insigne*; total polysaccharides; orthogonal test; extraction technology

金耳环为马兜铃科植物金耳环的干燥全草, 别名土细辛、大叶山茨菇、一块瓦, 主要分布在江西、广东、广西等地。金耳环具有温经散寒、祛痰止咳、散瘀消肿、行气止痛之功效, 所含成分包括黄酮类、氨基酸、糖类和挥发油等^[1]。在贵州三都水族集聚地

被广泛用于风寒感冒、慢性支气管炎、哮喘等症的治疗^[2]。多糖是中草药中重要活性成分之一, 对抗衰老、抗病毒、抗肿瘤、降血糖等有显著疗效^[3-4]。目前有关金耳环总多糖的提取工艺研究未见报道。本试验以金耳环总多糖得率为评价指标, 对金耳环水提工艺进行探讨, 以期为进一步开发利用提供理论依据。

1 材料

Cary 100 型双光束紫外-可见分光光度计(安捷伦科技有限公司), AE 240 型电子天平(瑞士 Mettler), DHG-9240A 型真空干燥箱(上海金山公

[收稿日期] 20111206(009)

[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(黔省专合字 2010156 号); 贵州省黔南州科技局专项资金项目(黔南科合社字 201018 号)

[第一作者] 魏学军, 副教授, 从事中药质量控制研究, Tel: 0854-8308038, E-mail: qndywxj@163.com

司), 2.0R 型大容量低速离心机(德国 Heraeus)。

葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110833-200904),其他试剂均为分析纯,金耳环药材采于贵州三都水族自治县境内,经贵阳中医学院李江教授鉴定为马兜铃科植物金耳环 *Asarum insigne* Diels 的干燥全草。

2 方法与结果^[5-6]

2.1 金耳环多糖的提取与精制^[7-8] 取 60 ℃ 恒温干燥的金耳环 10 g,石油醚回流脱脂。挥去石油醚,加水回流提取 2 次,合并提取液,过滤,放冷,离心 5 min(4 000 r·min⁻¹),取上清液,反复冻融除杂,Sevage 法除蛋白质,活性炭脱色。过滤,滤液用乙醇沉淀,静置 24 h,倾去上清液,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,于 60 ℃ 减压干燥,即得精制金耳环多糖,称重,计算多糖得率。

2.2 含量测定

2.2.1 葡萄糖对照品溶液的制备 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖 10 mg,置 100 mL 量瓶中,蒸馏水溶解并定容至刻度,配制成 100 mg·L⁻¹ 的储备液。精密吸取 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 储备液分别加于 20 mL 具塞试管中,分别加蒸馏水补至 2.0 mL,配制成 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg·L⁻¹ 的葡萄糖对照品系列溶液。取 2.0 mL 蒸馏水作为空白调零。

2.2.2 最大吸收波长的确定 精密吸取 20 mg·L⁻¹ 葡萄糖对照品溶液和 40 mg·L⁻¹ 精制红金耳环多糖溶液各 1.0 mL,分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,迅速沿管壁各加入浓硫酸 5.0 mL,混匀,封口,室温放置 30 min。取蒸馏水 1.0 mL 加于具塞试管中作为空白对照,其余操作相同。在 450 ~ 530 nm 扫描,确定最大吸收波长。结果表明,采用苯酚-硫酸法显色,葡萄糖和金耳环多糖均在 496 nm 波长处均有最大吸收。

2.2.3 标准曲线的绘制 向 2.2.1 项下葡萄糖系列对照品溶液及蒸馏水中各加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,混匀,迅速沿管壁加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀,封口,室温放置 30 min。在 496 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(A)为纵坐标,葡萄糖对照品溶液质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,进行线性回归,得标准曲线的回归方程 $A = 135.120 0C - 0.515 0$ ($r = 0.999 3$)。线性范围 5 ~ 50 mg·L⁻¹。

2.2.4 样品中多糖含量的测定 精密称取精制多糖 20 mg,定容于 100 mL 量瓶中,摇匀,吸取上述溶液 2.0 mL 定容至 20 mL,吸取 1.0 mL,按标准曲线

制备的方法测其 A,计算多糖含量,并按下式计算总多糖得率。

$$\text{总多糖得率} = \text{多糖含量} \times \text{精制总多糖得率} \times 100\%$$

2.2.5 稳定性试验 按 2.2.4 项下方法操作,对同一多糖样品分别在 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 处测定 A,结果表明,在 24 h 时吸光度开始下降,说明多糖溶液在 16 h 内较稳定, RSD 2.13%。

2.2.6 精密度试验 精密称取精制多糖样品 10 mg,按 2.2.4 项下方法操作,测定 A,连续测定 6 次,其平均吸光度 0.143 2, RSD 1.67%,表明此方法精密度良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取多糖样品 6 份,分别制备成质量浓度 0.1 g·L⁻¹ 的溶液,按 2.2.3 项下方法测定其吸光度, RSD 2.23%,说明重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取 60 ℃ 干燥恒重的精制多糖 20 mg,置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并定容,吸取上述溶液 1.0 mL 定容至 10 mL,精密吸取 1.0 mL,共 6 份,置于 20 mL 试管中,分别精密加入 10 mg·L⁻¹ 葡萄糖对照品溶液 1.0 mL,按 2.2.3 项下方法操作,计算加样回收率(表 1)。

表 1 金耳环总多糖提取工艺加样回收率试验

No.	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	10	29.653 8	98.85		
2	10	29.812 4	99.37		
3	10	29.771 1	99.02	99.00	0.55
4	10	29.832 0	99.44		
5	10	29.765 4	99.22		
6	10	29.401 3	98.00		

2.3 提取工艺条件的优选

2.3.1 单因素试验

2.3.1.1 液固比的考察 准确称取金耳环 5 份,每份 10 g,按液固比 4:1, 6:1, 8:1, 10:1, 12:1 分别加水溶解, 80 ℃ 浸提 2 次,每次 60 min,按 2.1 项下方法提取与精制,测得金耳环总多糖得率分别为 1.365%, 1.612%, 1.773%, 1.784%, 1.786%。即随液固比增加,多糖得率增长显著,当超过 8:1 后,增长不明显,故选择液固比 8:1 左右为宜。

2.3.1.2 提取温度的考察 准确称取金耳环 5 份,每份 10 g,按液固比 8:1 加水浸提 2 次,每次 60 min,提取温度分别为 60, 70, 80, 90, 100 ℃,按 2.1 项下方法提取与精制,测得金耳环总多糖得率分别为 1.134%, 1.462%, 1.793%, 1.816%, 1.785%。

即随温度的升高,多糖得率逐渐增加,90℃时达最高,随后呈下降趋势,推测可能是高温易使多糖降解所致,故选择提取温度90℃左右为宜。

2.3.1.3 提取时间的考察 准确称取金耳环5份,每份10g,按液固比8:1加水浸提,90℃浸提2次(2次提取时间相同),提取时间分别为30,60,90,120,180min,按2.1项下方法提取与精制,测得金耳环总多糖得率分别为1.467%,1.824%,1.815%,1.807%,1.798%。由试验结果可知,提取时间超过60min,多糖得率呈下降趋势,可能是长时间提取使部分多糖分解所致,故选择提取时间60min左右为宜。

2.3.1.4 醇沉浓度的考察 准确称取金耳环5份,每份10g,按液固比8:1加水浸提,90℃浸提2次,每次60min,合并浸提液,加乙醇沉淀,乙醇体积分数分别为70%,75%,80%,85%,90%,按2.1项下方法提取与精制,测得金耳环总多糖得率分别为0.986%,1.408%,1.833%,1.817%,1.804%。由结果可知,乙醇体积分数>80%沉淀,多糖得率呈下降趋势,故选择80%左右乙醇沉淀。

2.3.1.5 提取次数的考察 准确称取金耳环5份,每份10g,按液固比8:1加水浸提,90℃浸提2次,每次60min,合并浸提液,80%乙醇沉淀。以上条件下连续提取5次,按2.1项下方法提取与精制,测得金耳环总多糖得率分别为1.825%,1.064%,0.328%,0.112%,0.017%。由试验结果可知,提取超过2次,多糖得率呈直线下降。从缩短生产周期、节约能源考虑,提取2次为宜。

2.3.2 正交试验设计 在单因素试验基础上,设定提取次数为2次,选取液固比、提取温度、提取时间、乙醇沉淀体积分数4个因素,各因素取3个水平,以 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排试验,因素水平见表2。

表2 金耳环总多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A 液固比	B 提取温度 /℃	C 提取时间 /min	D 乙醇沉淀 体积分数/%
1	6:1	80	30	70
2	8:1	90	60	80
3	10:1	100	90	90

取9份正交设计试验样品分别测定金耳环总多糖得率,采用SPSS 13.0统计软件对结果进行处理,以直观分析和方差分析判断各因素对提取效果的影响程度,筛选出在该试验条件下的优化提取参数。试验安排及结果见表3,4。

表3 金耳环总多糖提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总多糖得率/%
1	1	1	1	1	0.806
2	1	2	2	2	1.182
3	1	3	3	3	1.867
4	2	1	2	3	1.491
5	2	2	3	1	1.478
6	2	3	1	2	1.132
7	3	1	3	2	1.550
8	3	2	1	3	1.577
9	3	3	2	1	0.978
K_1	3.855	3.847	3.515	3.262	
K_2	4.101	4.237	3.651	3.864	
K_3	4.105	3.977	4.895	4.935	
R	0.250	0.390	1.380	1.673	

表4 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	0.013 7	2	0.006 8	1.000 0	
B	0.026 3	2	0.013 2	1.926 5	
C	0.385 6	2	0.192 8	28.353 0	<0.05
D	0.478 7	2	0.239 4	35.206 0	<0.05

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00$, $F_{0.05}(2,2)=19.00$ 。

由直观分析可知,影响提取效果的因素顺序为醇沉浓度>提取时间>提取温度>液固比,最佳工艺组合为 $A_3B_2C_3D_3$ 。以极差最小的A因素为误差项进行方差分析可知,乙醇沉淀体积分数、提取时间对多糖提取的影响有显著性意义;提取温度对多糖提取的影响无显著性意义,综合生产成本等因素,故分别选择 A_1, B_1 。优化后最优工艺条件为 $A_1B_1C_3D_3$,即加水6倍量,80℃,90min,提取2次,90%乙醇沉淀。

2.4 验证实验 取金耳环10g,按上述优选工艺进行5次验证试验,结果金耳环总多糖平均得率为1.82%,RSD 1.93%。

3 讨论

本实验在单因素考察基础上,对金耳环总多糖提取工艺进行正交优选。实验中以贵州三都水族自治县境内所采金耳环为样品,考虑到不同地区海拔、土壤、气候及植被等状况不同,研究结果可能不尽相同,有待于进一步研究验证。

[参考文献]

[1] 《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 第8卷. 上海:上海科学技术出版社,1999: 504.

补骨脂的超临界 CO₂ 萃取工艺优选

余淑珍^{1*}, 贾媛², 王慧惠³, 刘志辉³

(1. 江苏省中西医结合医院, 南京 210028; 2. 南京中医药大学, 南京 210028;
3. 江苏省中医院, 南京 210028)

[摘要] 目的: 对补骨脂的超临界 CO₂ 流体萃取工艺条件进行优化。方法: 选取萃取温度、萃取压力、萃取时间为考察因素, 以补骨脂素和异补骨脂素萃取率为指标, 采用单因素考察及正交试验对补骨脂萃取工艺进行优选。结果: 优选的工艺条件为 1.5 倍量 95% 乙醇为夹带剂, 萃取温度 65 °C, 萃取压力 20 MPa, 萃取时间 2 h。结论: 优选的超临界 CO₂ 流体萃取工艺合理, 可行。

[关键词] 补骨脂; 补骨脂素; 异补骨脂素; 超临界 CO₂ 流体萃取; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0044-03

Optimization of Technology for *Psoralea corylifolia* by Supercritical CO₂ Fluid Extraction

YU Shu-zhen^{1*}, JIA Yuan², WANG Hui-hui³, LIU Zhi-hui³

(1. Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China;
2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;
3. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology condition of *Psoralea corylifolia* by supercritical CO₂ fluid extraction. **Method:** Single factor test and orthogonal test were used to optimize extraction technology of *P. corylifolia* with extraction ratio of psoralent and isopsoralent as indexes, extraction temperature, extraction pressure and extraction time were taken as factors. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: 1.5 times the amount of 95% ethanol as entrainer, extraction temperature was 65 °C, extraction pressure was 20 MPa, extraction time was 2 h. **Conclusion:** This optimized technology of supercritical CO₂ extraction was reasonable and feasible.

[Key words] *Psoralea corylifolia*; psoralent; isopsoralent; supercritical CO₂ fluid extraction; HPLC

补骨脂为豆科植物补骨脂的成熟果实, 性温、味辛, 具有温肾助阳、纳气、止泻之功效, 主治肾阳不

[收稿日期] 20111125(008)

[基金项目] 江苏省高校优势学科建设工程项目

[通讯作者] * 余淑珍, 主管药师, 从事医院制剂及制剂工艺研究, Tel: 025-85608675, E-mail: yuhuanwang1@163.com

- [2] 司有奇, 陆龙辉. 中国水族医药宝典[M]. 贵阳: 贵州民族出版社, 2007: 318.
- [3] 田庚元, 冯宇澄, 林颖. 植物多糖的研究进展[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(7): 441.
- [4] 申利红, 王建森, 李雅, 等. 植物多糖的研究及应用进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 349.
- [5] 黄佳利, 张红梅, 徐秀泉. 正交设计法优化野菊花多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 30.
- [6] 马雪萍, 马秀敏, 丁剑冰, 等. 神香草总多糖的提取工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(5): 437.
- [7] 张晓莉, 李玉婷, 王亚贤, 等. 红花多糖的提取与含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 19.
- [8] 陈燕忠, 符吴燕, 谢清春. 灰兜巴粗多糖的提取及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 79.

[责任编辑 仝燕]