

大蒜总多糖、总皂苷的提取纯化工艺

王瑞海, 柏冬, 刘丽梅*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的: 优选大蒜总多糖、总皂苷的提取纯化工艺。方法: 采用双提法提取大蒜油和大蒜总多糖, 乙醇提取总皂苷, 以大蒜总多糖、总皂苷收得率为考察指标, 对料液比、提取时间、提取次数以及药液浓缩浓度等进行 $L_9(3^4)$ 正交试验和单因素考察。结果: 优选大蒜总多糖提取工艺条件为加 5 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h; 纯化条件为药液浓缩至含生药 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。85% 乙醇沉淀; 总皂苷提取工艺为加 5 倍量乙醇提取 2 次, 每次 1 h; 纯化条件为药液减压回收乙醇至无醇味 ($53 \text{ }^\circ\text{C}$ 相对密度 1.065), 加水至药材质量的 0.8 倍 ($1.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。结论: 该工艺稳定, 利用一批大蒜原料, 可同时得到大蒜油、大蒜总多糖和总皂苷, 大蒜总多糖提取物出膏率为 21.36%, 含多糖 51.36%, 大蒜总皂苷提取物出膏率为 6.04%, 含总皂苷 3.79%。

【关键词】 大蒜多糖; 大蒜皂苷; 正交设计; 提取工艺

【中图分类号】 R283.6 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1005-9903(2012)07-0060-04

大蒜主要含有挥发油、氨基酸、糖、苷类化合物等, 其中大蒜多糖和皂苷是大蒜的有效成分。大蒜多糖能够增强免疫力, 对肝损伤有保护作用, 具有抗氧化抗病毒等多种生物活性^[1]。大蒜皂苷类成分具有抗真菌、抗肿瘤、抗血栓、降低胆固醇的作用^[2-3]。目前大蒜多糖的提取多采用大蒜脱脂、草酸铵提取, 用酸调节 pH 后, 在大蒜提取液中加入乙醇使多糖析出^[4]。大蒜皂苷的提取采用脱水蒜粉, 用 40% ~ 80% 乙醇提取^[5]。本课题以同一批大蒜为原料, 采用双提法, 水蒸气蒸馏提取大蒜油后, 水提取大蒜总多糖、醇提大蒜总皂苷。之前报道了大蒜油的优选工艺^[6], 本文报道大蒜总多糖、总皂苷提取、纯化工艺。

1 材料

1.1 仪器 SPS202F 型天平 (奥豪斯公司), DS200 型高速组织捣碎机 (江苏江阴周庄科研器械厂), 挥发油提取器 (北京玻璃仪器厂), 98-1-B 型电热套 (天

津泰斯特仪器有限公司), 8453 型紫外-可见分光光度计 (美国安捷伦), HW·SY11-K 型数显恒温水浴锅 (北京市长风仪器仪表公司), CX-250 型超声波清洗机 (天海双龙医疗设备有限公司), P225D 型天平 (德国赛多利斯)。

1.2 试药 大蒜生药材购自北京市东直门内南小街奥士凯菜市场, 产地为山东金乡, 经课题组鉴定为百合科植物大蒜 *Allium sativum* L. 的鳞茎。浓硫酸、苯酚、无水乙醇、甲醇 (均为分析纯, 北京化工厂); 大蒜皂苷对照品 Proto-iso-eruboside-B (PIEB, 实验室自制, 经核磁共振光谱及质谱测试鉴定结构, HPLC 归一化法测试纯度 > 98%)。D-无水葡萄糖 (中国药品生物检定所, 批号 110833-200503)。

2 方法和结果

2.1 大蒜总多糖、总皂苷提取工艺流程 大蒜药材 → 粉碎 (3 ~ 5 mm 颗粒) → 提取挥发油 (加 5 倍水, 保温 1 h, 提取油 1 h) → 过滤 → 蒜渣 → 提取多糖 →

【收稿日期】 2011-12-08

【基金项目】 国家重大科技专项 (2009ZX09301-005-11)

【第一作者】 王瑞海, 副主任技师, 从事中药学相关研究, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: betterhairui@126.com

【通讯作者】 * 刘丽梅, 研究员, 从事中药化学、质量、工艺研究, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: liulimeihrb@sina.com

[4] 张瑞亭, 张兆旺, 孙秀梅. 思维方式的转换与中药“半仿生提取法”[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 542.

[5] 方开泰. 均匀设计——数论方法在试验设计中的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363.

[6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 901.

[7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 355.

[8] 吕青涛, 张兆旺, 孙秀敏, 等. 乙肝颗粒剂 4 种提取方法提取液的成分比较[J]. 中成药, 2000, 22(11): 752.

[责任编辑 全燕]

药液→浓缩→加乙醇沉淀→离心→沉淀和醇上清液①→沉淀→减压干燥→大蒜总多糖提取物;提多糖后药渣→醇提→醇提液②→与醇上清液①合并→减压回收→浓缩液→加水→沉淀→离心→上清液→浓缩→减压干燥→大蒜总皂苷提取物。

2.2 大蒜总多糖含量测定 精密吸取葡萄糖对照品溶液($0.0578 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 2, 4, 6, 8, 10 mL, 用蒸馏水分别定容于 10 mL 量瓶中, 精密量取各对照品溶液 1 mL, 于 10 mL 具塞试管中, 分别加 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 再加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀后置沸水浴 10 min, 取出置于冰水浴中冷却 15 min, 室温放置 15 min 后, 以试剂空白为参比在 485 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, 得回归方程 $A = 15.43C - 0.020$ ($r = 0.9995$)。结果表明葡萄糖在 $0.0116 \sim 0.0578 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.3 大蒜总皂苷含量测定 精密吸取 PIEB 对照品溶液($0.324 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.8 mL 溶液, 80 °C 水浴挥干后, 加入 70% 硫酸甲醇 5 mL, 置于 60 °C 水浴中加热 60 min, 取出后冰水浴 15 min, 室温放置 15 min 后, 以相应溶液为空白, 照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版一部附录 V A), 测定 325 nm 下吸光度。以对照品的含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得线性回归方程 $Y = 0.012X + 0.002$ ($r = 0.9995$), 表明 PIEB 在 19.44 ~ 58.32 μg 与吸光度呈良好线性关系。

2.4 大蒜总多糖提取正交试验 对提取次数(包括挥发油提取在内)、提取时间、料液比作为考察因素, 以多糖收得率为考核指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 进行多糖提取工艺的优选。总多糖收得率 = 总多糖质量分数 \times 干膏量 / 生药量 $\times 100\%$ 。因素水平表、试验安排表、方差分析表见表 1 ~ 3。

表 1 大蒜总多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取次数/次	B 加水量/倍	C 提取时间/h
1	1	3	0.5
2	2	5	1
3	3	7	1.5

将因素 B 与空白项合并计为误差项进行方差分析, A 因素有显著性影响, 根据方差分析结果和生产实际情况, 优选多糖提取的工艺为 $A_3B_2C_2$, 即大蒜提取蒜油后, 加药材 5 倍量水, 提取 2 次, 每次提

表 2 大蒜总多糖提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	多糖收得率/%
1	1	1	1	1	4.65
2	1	2	2	2	6.27
3	1	3	3	3	6.57
4	2	1	2	3	10.07
5	2	2	3	1	8.29
6	2	3	1	2	8.51
7	3	1	3	2	8.6
8	3	2	1	3	9.81
9	3	3	2	1	11.11
K_1	17.490 0	23.320 0	22.970 0	24.050 0	
K_2	26.870 0	24.370 0	27.450 0	23.380 0	
K_3	29.520 0	26.190 0	23.460 0	26.450 0	
R	12.030 0	2.870 0	4.480 0	3.070 0	

表 3 大蒜多糖提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	26.636 4	2	13.318 2	16.950 2	<0.05
C	4.025 6	2	2.012 8	2.561 7	
误差(B + e)	3.142 9	4	0.785 7		

注: $F_{0.05}(2, 4) = 6.94$, $F_{0.01}(2, 4) = 18$ 。

取 1 h。

2.5 大蒜总多糖提取液纯化时浓缩浓度的考察 取大蒜生药材按上述优选的工艺提取多糖, 得到药液均分 3 份, 分别减压浓缩至含生药 1.25, 1, 0.83 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加乙醇至 75% 醇沉, 置冰箱过夜, 离心, 沉淀减压干燥, 得干膏粉, 称重, 测多糖含量, 计算多糖收得率, 结果见表 4。

表 4 多糖提取药液浓缩浓度的考察($n = 3$)

浓缩浓度/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	膏重/g	出膏率/%	多糖含量/%	多糖收得率/%
1.25	30.52	20.35	46.21	9.40
1	28.98	19.32	46.27	8.93
0.83	27.75	18.50	43.65	7.93

从多糖收得率来看, 多糖提取药液浓缩至含生药 1.25, 1 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时进行醇沉, 多糖收得率相差不多, 前者略高, 但从生产实际考虑, 浓缩至 1.25 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时很黏, 膏子黏壁, 不便于操作, 而且会造成损失, 所以确定提取药液浓缩至 1.0 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (60 °C 相对密度 1.135) 进行醇沉。

2.6 大蒜总多糖提取液纯化时醇沉浓度的考察

取大蒜生药材按上述优选的工艺提取多糖、浓缩,均分 3 份,分别加乙醇至乙醇体积分数 75%, 80%, 85%, 放置过夜,离心,得沉淀和上清液(沉淀为多糖部分,上清液为总皂苷的一部分),沉淀减压干燥得粗多糖,测含量,计算多糖收得率;上清液减压回收乙醇,浓缩、减压干燥得皂苷,测含量,计算皂苷收得率。总皂苷收得率 = 总皂苷质量分数 × 干膏量 / 生药量 × 100%。结果见表 5, 6。

表 5 多糖提取药液浓缩后醇沉试验 (n=2)

醇沉乙醇体积分数/%	膏重 /g	出膏率 /%	多糖含量 /%	多糖收得率 /%
75	28.17	18.78	45.67	8.58
80	30.24	20.16	46.25	9.33
85	31.49	20.99	46.49	9.75

结果表明,多糖提取药液浓缩醇沉至醇体积分数为 85% 时,多糖收得率最优,同时该浓度下皂苷收得率也优于另外两组,故多糖提取液浓缩后醇沉体积分数为 85%。

表 8 大蒜总皂苷提取正交试验安排 (n=2)

No.	A	B	A * B	C	A * C	B * C	D	皂苷收得率/%
1	1	1	1	1	1	1	1	0.079 9
2	1	1	1	2	2	2	2	0.113 4
3	1	2	2	1	1	2	2	0.193 4
4	1	2	2	2	2	1	1	0.293 7
5	2	1	2	1	2	1	2	0.229 8
6	2	1	2	2	1	2	1	0.200 8
7	2	2	1	1	2	2	1	0.295 1
8	2	2	1	2	1	1	2	0.158 2
K_1	0.680 4	0.623 9	0.646 6	0.798 2	0.632 3	0.761 6	0.869 5	
K_2	0.883 9	0.940 4	0.917 7	0.766 1	0.93 2	0.802 7	0.694 8	
R	0.203 5	0.316 5	0.271 1	0.032 1	0.299 7	0.041 1	0.174 7	

表 9 皂苷收得率方差分析

方差来源	SS	f	F
A	0.005 2	1	40.19
B	0.012 5	1	97.22
A × B	0.009 2	1	71.33
A × C	0.011 2	1	87.17
B × C	0.000	1	1.64
D	0.003 8	1	29.62
误差(C)	0.000 1	1	

注: $F_{1-0.05}(1,1) = 161$ 。

表 6 多糖提取药液不同体积分数醇沉液中皂苷含量及收得率 (n=2)

醇沉乙醇体积分数/%	膏重 /g	出膏率 /%	皂苷含量 /%	皂苷收得率 /%
75	12.96	8.64	1.623	0.14
80	10.77	7.18	2.423	0.17
85	9.24	6.16	3.591	0.22

2.7 大蒜总皂苷提取正交试验 本研究大蒜总皂苷的提取有 2 个部分:①大蒜多糖水提醇沉后的醇液,②提取多糖后的药渣醇提取液。根据可能影响皂苷醇提取的因素:料液比、提取次数、提取时间、乙醇体积分数作为考查因素,并考虑各因素之间可能存在交互作用,以总皂苷收得率为考察指标,采用 $L_8(2^7)$ 正交设计,对大蒜醇提工艺进行优选。因素水平表、试验安排表、方差分析表见表 7~9。

表 7 大蒜皂苷提取正交试验因素水平

水平	A 加乙醇量/倍	B 提取次数/次	C 提取时间/h	D 乙醇体积分数/%
1	3	1	1	95
2	5	2	1.5	85

方差分析表明,各因素对实验结果均没有显著性影响。极差分析表明各因素的影响大小顺序为 $B > A > D > C$, 优选工艺为 $A_2B_2C_1D_1$, 即加 5 倍量 95% 乙醇提取 2 次,每次提取 1 h。

2.8 大蒜总多糖、总皂苷提取纯化工艺验证 大蒜生药材 3 份,每份 150 g,按多糖优选工艺提取多糖,3 次药液合并,浓缩至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,加 95% 乙醇醇沉至含醇量为 85%,放置过夜,离心,得沉淀和上清液,上清液保留,沉淀减压干燥,称重,测多糖含量,

计算总多糖收得率,结果见表 10。

表 10 大蒜总多糖提取纯化工艺验证 ($n=2$) %

样品	出膏率	多糖含量	多糖收得率
1	21.10	51.42	10.84
2	21.51	50.97	10.96
3	21.48	51.71	11.11
平均	21.36	51.36	10.97

药渣按优选的皂苷提取工艺,得醇提液,和上述上清液合并,回收乙醇至无醇味,加水至生药材质量的 0.8 倍,放置冰箱过夜,离心 ($5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 40 min),上清液浓缩,减压干燥 (温度 $< 65\ ^\circ\text{C}$),称重,测皂苷含量,计算总皂苷收得率,结果见表 11。

表 11 大蒜总皂苷提取纯化工艺验证 ($n=2$) %

样品	出膏率	总皂苷含量	总皂苷收得率
1	5.85	3.97	0.232
2	6.06	3.64	0.221
3	6.20	3.76	0.233
平均	6.04	3.79	0.229

结果表明,大蒜总多糖、总皂苷提取纯化工艺稳定,质量可控。

3 讨论

本研究采用的工艺,以同一批大蒜为原料,在提取大蒜油的同时,充分利用取油后的蒜渣,得到大蒜总多糖和总皂苷提取物(已申报专利),本工艺具有操作简单、产品质量可控、适于产业化生产等优点,充分利用大蒜原料,降低了产品成本。

本研究在优选多糖、皂苷工艺中,分别以总多糖、总皂苷收得率为考察指标,既考虑了样品中多糖、皂苷含量,又兼顾了提取物收率,使其成为一个综合的指标,便于分析结果。

该工艺制备的大蒜总多糖提取物多糖的质量分数为 51.36%。本研究大蒜总皂苷的提取来自于 2 个部分,一是大蒜多糖水提醇沉后的醇液,一是提取多糖后的大蒜药渣醇提取液,得到的大蒜总皂苷粗提物含量为 3.79%,再经过大孔树脂纯化,使含量 $> 50\%$,树脂纯化工艺研究在随后的文章中报道。

[参考文献]

- [1] 王文玲,黄雪松,曾莉莎. 大蒜多糖的研究综述[J]. 广州食品工业科,2004,20(4):144.
- [2] 闫淼森,许真,徐蝉,等. 大蒜功能成分研究进展[J]. 食品科学,2010,3(5):312.
- [3] 薛欣,张立石,柏冬,等. 大蒜 3 个有效部位联合应用对人胃癌 MKN45 细胞的杀伤作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):152.
- [4] 余薇,查文良,梁惠敏,等. 大蒜多糖组分 A 总多糖含量的分光光度法测定[J]. 时珍国医国药,2008,19(3):563.
- [5] 罗红,高钜琪. 大蒜总皂苷的制备方法及其产品和应用,中国:200910103133.0[P]. 2009-01-23.
- [6] 刘丽梅,孙作德,王瑞海,等. 水蒸气蒸馏提取大蒜挥发油的工艺研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(8):744.

[责任编辑 仝燕]