

# 黄精中小分子糖提取工艺优化

李晓坤,董晶晶,贺海花,杨云\*  
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的:建立黄精中小分子糖的含量测定方法,研究其最佳提取工艺。方法:采用苯酚-硫酸法测定小分子糖含量,以小分子糖含量为考察指标,通过单因素试验和正交试验法确定黄精中小分子糖的最佳提取工艺。结果:最佳提取工艺条件为提取温度 90 ℃,料液比 1:30,提取时间 2 h。结论:该工艺简便、合理、小分子糖提取率较高。

**[关键词]** 黄精;小分子糖;提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0027-03

## Study on Extraction Technology of Low Molecular Weight Saccharide from Rhizoma Polygonati

LI Xiao-kun, DONG Jing-jing, HE Hai-hua, YANG Yun\*

(College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for content determination of low molecular weight saccharide from Rhizoma Polygonati and optimize the extraction technology. **Method:** The content of low molecular weight saccharide was determined by phenol-sulfuric acid method. On the basis of single factor test and orthogonal design test, the extraction process of low molecular weight saccharide from Rhizoma Polygonati was optimized using the content of low molecular weight saccharide as index. **Result:** The optimum extraction technology condition was as follows: 90 ℃, the ratio of solid to solution 1:30, extracted 2 hours every time. **Conclusion:** This process was simple, reasonable and more productive.

**[Key words]** Rhizoma Polygonati; low molecular weight saccharide; extraction technology

黄精为临床常用补益药,其性味甘平,有补气养阴、健脾润肺及益肾等功效,主治肺燥干咳、体虚乏力、心悸气短、久病津亏口干、糖尿病、高血压病等症<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,黄精具有抗衰老、增强学习记忆、增强免疫、抗炎、抗病毒等作用<sup>[2-3]</sup>。前期研究表明<sup>[4]</sup>黄精中小分子糖具有较好的免疫活性,可显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,促进溶血素和溶血空斑的形成,但是对其提取工艺的研究至今尚未见报道。本试验采用正交试验法研究其最佳提取

工艺,为黄精的进一步开发和应用提供依据。

### 1 仪器与试剂

1/10 万 AE240 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司),1/万 BS224S 型电子天平(北京塞多利斯仪器有限公司),UV-2201 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

黄精药材采集于河南省洛阳市栾川龙峪湾,经河南中医学院生药教研室董诚明教授鉴定为百合科植物黄精 *Polygonatum sibiricum* 的干燥根茎。将采挖的新鲜黄精除去芦头、须根及泥沙,清蒸 1 h 后干燥,粉碎,过 20 目筛,备用。葡萄糖对照品(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号 20050805,纯度大于 95%);95% 乙醇、浓硫酸、苯酚等试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 含量测定

**[收稿日期]** 20110304(004)

**[基金项目]** 河南省重大科技攻关项目(200422030700)

**[第一作者]** 李晓坤,讲师,研究方向:中药新药研究与开发

**[通讯作者]** \* 杨云,硕士生导师,教授,Tel:0371-65680605, E-mail: Yyun@china.com.cn

**2.1.1 对照品溶液的配制** 精密称取干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 50.05 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得  $500.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液, 备用。

**2.1.2 5% 苯酚试剂的配制** 精确称取 182 °C 蒸馏后苯酚 5 g, 加水溶解于 100 mL 棕色瓶, 置冰箱中备用。

**2.1.3 标准曲线的制备** 精密移取葡萄糖对照品溶液 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 mL 于 25 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 摇匀, 得 20.02, 30.03, 40.04, 50.05, 60.06, 70.07  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖溶液, 分别吸取上述葡萄糖对照品溶液 2 mL 置于具塞试管中, 加 5% 苯酚溶液 1 mL, 再加浓硫酸 5 mL, 摇匀后室温放置 40 min, 以蒸馏水作空白对照, 在波长 490 nm 处测定吸收度。以吸收度  $A$  为纵坐标, 葡萄糖质量浓度  $C$  为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为  $A = 0.0156C + 0.0176$  ( $r = 0.9995$ ), 在 20.02 ~ 70.07  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与吸收度呈现良好的线性关系。

**2.1.4 精密度试验** 精密吸取 40.04  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖对照品溶液 2 mL, 共 5 份, 置于具塞试管中, 其余操作同 2.1.3, RSD 0.47%, 表明仪器精密良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取黄精药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 按料液比 1:30 比例加入 80% 乙醇 30 mL, 在水浴温度 80 °C 条件下回流提取 2 h, 制备样品溶液, 其余操作同 2.1.3, 分别于 10, 30 min, 1, 1.5, 2 h 测定吸收度, 测得结果 RSD 0.57%, 表明样品溶液在 2 h 内基本稳定。

**2.1.6 重复性试验** 平行称取黄精药材粉末 5 份, 按稳定性试验方法制备供试品溶液, 测定其吸收度, 测得结果 RSD 1.27%, 表明该方法重复性较好。

**2.1.7 加样回收率试验** 平行称取黄精药材粉末 6 份, 精密加入葡萄糖对照品适量, 按稳定性试验方法制备供试品溶液, 测定其吸收度, 测得结果平均回收率为 98.43%, RSD 1.34%, 结果表明本法具有良好的回收率。

**2.1.8 黄精小分子糖溶液的制备与含量测定** 取黄精药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 80% 乙醇水浴回流提取, 趁热过滤, 80% 乙醇洗涤烧瓶及残渣 2 次, 每次 10 mL, 合并滤液和洗涤液, 冷却至室温, 转移至 250 mL 量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度线, 摇匀, 吸取 2 mL 至 100 mL 量瓶

中, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀后备用<sup>[5]</sup>。

精密移取样品溶液 2 mL 置于具塞试管中, 加 5% 苯酚溶液 1 mL, 再加浓硫酸 5 mL, 摇匀后室温放置 40 min, 以蒸馏水作空白对照, 在波长 490 nm 处测定吸收度, 将其代入回归方程计算黄精中小分子糖含量。

## 2.2 黄精小分子糖提取条件单因素研究

**2.2.1 提取温度的选择** 称取黄精药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 按料液比 1:30 比例加入 80% 乙醇 30 mL, 分别在水浴温度 50, 60, 70, 80, 90 °C 下回流提取 3 h, 黄精中小分子糖质量分数分别为 24.76%, 34.88%, 38.94%, 53.99%, 55.25%。黄精中小分子糖质量分数随着温度的升高而增大, 在 80 °C 以前增长迅速, 80 °C 以后增长趋于平缓, 考虑到温度过高, 热能消耗大, 提取液的活性成分易被破坏, 且杂质溶出量增加, 给后续工作带来很大不便, 故选择最佳提取温度为 80 °C。

**2.2.2 提取时间的选择** 称取黄精药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 按料液比 1:30 比例加入 80% 乙醇 30 mL, 在水浴温度 80 °C 条件下分别回流提取 1, 2, 3, 4, 5 h, 黄精中小分子糖质量分数分别为 46.45%, 54.85%, 54.60%, 53.54%, 52.75%。在提取时间 2 h 以前, 随着提取时间的延长黄精中小分子糖质量分数升高显著, 2 h 后随着提取时间的延长, 小分子糖质量分数呈缓慢下降的趋势, 可能是由于提取时间过长引起部分小分子糖被分解、结构发生变化, 导致糖含量降低, 为节省能耗和提取时间, 避免糖类成分损失, 故选择 2 h 进行提取。

**2.2.3 料液比的选择** 称取黄精药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 分别按料液比 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 比例加入 80% 乙醇, 在水浴温度 80 °C 条件下回流提取 2 h, 黄精中小分子糖质量分数分别为 40.76%, 49.57%, 55.70%, 56.06%, 55.61%。在料液比 1:30 之前随着料液比的增大, 黄精中小分子糖质量分数增长迅速, 但在 1:30 之后小分子糖随料液比增大呈平缓趋势, 考虑到溶剂量增多给后续的浓缩带来能量的消耗、时间以及溶剂成本的增加, 故选择料液比 1:30 进行提取。

**2.2.4 提取次数的选择** 称取黄精药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 按料液比 1:30 比例加入 80% 乙醇 30 mL, 在水浴温度 80 °C 条件

下回流提取 2 h,趁热过滤,80% 乙醇洗涤烧瓶及残渣 2 次,每次 10 mL。滤渣按上述条件提取第 2 次,同法共提取 4 次,分别将每次提取的滤液和洗涤液合并后按上述方法制备样品溶液,考察提取次数对黄精中小分子糖质量分数的影响,结果黄精中小分子糖质量分数分别为 54.15%, 5.98%, 1.97%, 1.91%。随着提取次数的增加,黄精中小分子糖质量分数越来越低,提取 1 次时糖含量最高,之后急剧降低,呈平缓趋势,表明提取 1 次就能将黄精中小分子糖充分提取出来,考虑到减少操作环节和节约成本,故选择提取 1 次。

**2.3 黄精小分子糖提取工艺正交试验研究** 根据单因素试验结果,选取提取温度、提取时间、料液比作为考察因素,每个因素选用 3 个水平,确定因素水平见表 1。以黄精中小分子糖质量分数为考察指标,采用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,正交试验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 黄精小分子糖提取工艺因素水平

水平	A 提取温度/℃	B 料液比	C 提取时间/h
1	70	1:20	2
2	80	1:30	3
3	90	1:40	4

表 2 黄精小分子糖提取工艺  $L_9(3^4)$  正交试验

No.	A	B	C	D	小分子糖质量分数/%
1	1	1	1	1	45.38
2	1	2	2	2	46.60
3	1	3	3	3	49.61
4	2	1	2	3	52.97
5	2	2	3	1	64.18
6	2	3	1	2	60.30
7	3	1	3	2	51.45
8	3	2	1	3	68.29
9	3	3	2	1	59.45
$K_1$	141.59	149.79	173.97	169.00	
$K_2$	177.44	179.07	159.01	158.35	
$K_3$	179.19	169.35	165.23	170.86	
R	37.6	29.28	14.96	12.51	

表 3 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	300.211	2	150.106	9.871	<0.1
B	148.224	2	74.112	4.874	
C	37.637	2	18.819	1.238	
D(误差)	30.412	2	15.206		

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.10}(2,2) = 9.00$ 。

表 2,3 结果表明,提取温度(A)对黄精中小分子糖质量分数有显著影响,而料液比(B)、提取时间

(C)对黄精中小分子糖质量分数无显著影响。由 R<sub>1</sub> 可以得出 3 个因素对糖质量分数影响的主次顺序为  $A > B > C$ ,考虑到实际生产情况及因素影响的显著性,确定黄精中小分子糖的最佳提取工艺为  $A_3B_2C_1$ ,即提取温度 90 ℃,料液比 1:30,提取时间 2 h。

**2.4 验证试验** 按照上述优化工艺进行验证试验,重复 3 次,黄精中小分子糖质量分数平均值为 68.98%,RSD 0.74%,表明该工艺重现性良好。

### 3 讨论

苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法为糖含量测定的 2 种经典方法。由于苯酚相对价廉,且重馏苯酚溶液配制以后只要放在冰箱冷藏保存,一般不会影响测定结果。故选用苯酚-硫酸法作为黄精小分子糖含量测定方法。其原理是糖在浓硫酸的作用下,先水解为单糖,单糖迅速脱水形成糠醛衍生物,然后与苯酚缩合为有色化合物,在 490 nm 处有特征吸收。本法简单,显色稳定,灵敏度高,重现性好。

在小分子糖含量测定中,得到相应的小分子糖对照品较困难,因其组成比较复杂,往往采用葡萄糖代替对照品,测定样品中小分子糖的相对含量。

通过单因素和  $L_9(3^4)$  正交试验法,确定黄精中小分子糖的最佳提取工艺为提取温度 90 ℃,料液比 1:30,提取时间 2 h,在此条件下提取 1 次。通过验证试验结果证明,该工艺条件可靠,操作简单,成本低,提取率高,可用于指导工业化生产,也可将此法提取得到的小分子糖进一步分离纯化得到低聚糖。关于黄精低聚糖的分离纯化、结构组成及药理活性,本课题组正在进一步研究之中。

### [参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2005:215.  
 [2] 郑虎占,董泽宏,余靖,等.中药现代研究与应用.第 5 卷[M].北京:学苑出版社,1998:4071.  
 [3] 王冬梅,朱玮,张存莉,等.黄精化学成分及其生物活性[J].西北林学院报,2006,21(2):142.  
 [4] 杨云,王爽,冯云霞,等.黄精中小分子糖对小鼠免疫功能的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(18):3447.  
 [5] 汤韦奇,张国升.正交试验法优选芦根中低聚糖及单糖的提取工艺[J].安徽中医学院报,2008,27(3):43.

[责任编辑 仝燕]