

## 多指标优选蛹虫草提取工艺

江宝红<sup>1,2</sup>, 鞠建明<sup>1\*</sup>, 蔡雪萍<sup>1,2</sup>, 刘汉清<sup>2</sup>, 黄一平<sup>1</sup>, 方志军<sup>1</sup>

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028; 2. 南京中医药大学, 南京 210046)

**[摘要]** 目的: 优选蛹虫草的提取工艺。方法: 用多指标综合评分法, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计, 以虫草素、腺苷、尿苷、多糖及出膏率为检测指标, 考察了 4 种因素(溶剂用量、乙醇体积分数、提取时间、提取次数)对其提取工艺的影响。结果: 蛹虫草最佳提取工艺条件为加 8 倍量水, 煎煮 3 次, 每次 1 h。结论: 本研究优化了蛹虫草的提取工艺, 并为蛹虫草的进一步利用和产品开发提供了实验依据。

**[关键词]** 蛹虫草; 多指标; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0029-04

## Multi-index Optimization Technology of *Cordyceps militaris* Extraction

JIANG Bao-hong<sup>1,2</sup>, JU Jian-ming<sup>1\*</sup>, CAI Xue-ping<sup>1,2</sup>, LIU Han-qing<sup>2</sup>, HUANG Yi-ping<sup>1</sup>, FANG Zhi-jun<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To choose the optimal extracting process of *Cordyceps militaris* by multi-index synthetic evaluation method. **Method:** Using cordycepin, adenosine, uridine, content of polysaccharides and paste rates as detecting index, orthogonal test method was used for studying with four extracting factors (the solid liquid ratio, alcohol concentration, the extracting time, the times of extracting) on the extracting process. **Result:** The optimum condition of *C. militaris* was: eight times of water, extracting one hour, three times. **Conclusion:** The study optimized extraction technology of *C. militaris* and provides the experimental basis for its further use and product development.

**[Key words]** *Cordyceps militaris*; multi-index; extraction technics

**[收稿日期]** 20101126(003)

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金(SBK2008489)

**[第一作者]** 江宝红, 在读硕士生, 中药新制剂和新剂型研究, Tel: 025-85639640

**[通讯作者]** \* 鞠建明, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药质量标准研究及制剂工艺研究, Tel: 025-85639640, E-mail: jjm405@sina.com

45 min 仅溶出 85% 左右, 且随时间增加溶出度不再提高。据文献报道, PVPP 能与含羟基的物质形成氢键<sup>[3]</sup>, 因此 PVPP 可能会影响分散片中山楂叶总黄酮的溶出。综上所述, 本研究选择 cCMC-Na 作为崩解剂, 所制备的分散片不仅崩解迅速, 而且溶出速度快, 明显优于市售普通片, 具有重要的临床应用价值。

### [参考文献]

[1] 张妍, 李厚伟, 张永春, 等. 山楂中总黄酮几种提取分离

方法的考察及含量测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(3): 1832.

[2] 闵清, 白育庭, 吴基良, 等. 山楂叶总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能的影响[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(7): 514.

[3] 黎新明, 崔英德, 廖列文. PVPP 对啤酒中多酚类物质和蛋白质的吸附作用比较[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 74.

[责任编辑 全燕]

蛹虫草 *Cordyceps militaris* L. Link 又名北冬虫夏草、北虫草,与传统名贵中药冬虫夏草同属异种,是我国东北地区首先发现的一种虫生真菌。据研究<sup>[1-2]</sup>,蛹虫草与冬虫夏草有效成分相近,药理作用相似。目前市场上有较多蛹虫草的药品和保健品,以替代资源短缺的冬虫夏草,核苷类化合物和多糖是蛹虫草中含量较高的生物活性物质,均易溶于水和低浓度乙醇,其中虫草素是一种核苷类抗生素,对多种肿瘤具有抑制作用,腺苷具有改善心脑血管循环的作用,虫草多糖可激活巨噬细胞,刺激抗体产生,具有抗肿瘤活性和提高人体免疫力的功效。为了确保蛹虫草被合理有效地应用,本试验采用多指标正交设计法<sup>[3]</sup>优化蛹虫草的提取工艺,建立了测定其中多种核苷类成分含量的高效液相色谱法,优选出了蛹虫草的最佳提取工艺,为蛹虫草进一步的开发利用提供了实验依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** Waters 高效液相色谱仪 (Alliance 2695 四元泵及自动进样系统, 996 二极管阵列检测, Empower 色谱工作站), BECKMAN DU-640 紫外分光光度计 (美国), Millipore Milli-Q 纯水器; METTLER 电子天平 (瑞士)。

**1.2 试药** 虫草素、腺苷、尿苷、D-无水葡萄糖对照品 (中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号依次为 858-200202, 879-200002, 887-200202, 110833-200503), 重蒸水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。蛹虫草 (购自江苏省农科院食用菌中心, 批号 201001)。

## 2 方法与结果

**2.1 出膏率测定**<sup>[5]</sup> 精密量取样品液 10.0 mL, 水浴蒸至近干, 105 °C 干燥 3 h, 取出置干燥器内冷却 30 min, 迅速称重。

**2.2 虫草素、腺苷、尿苷的含量测定**<sup>[6-7]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 0 ~ 20 min (99% ~ 95% A), 20 ~ 30 min (95% ~ 94% A), 30 ~ 45 min (94% ~ 90% A), 45 ~ 50 min (90% ~ 99% A), 50 ~ 60 min (99% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 260 nm, 进样量 25 μL。在此条件下虫草素、腺苷及尿苷与相邻峰达到基线分离, 见图 1。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取虫草素、

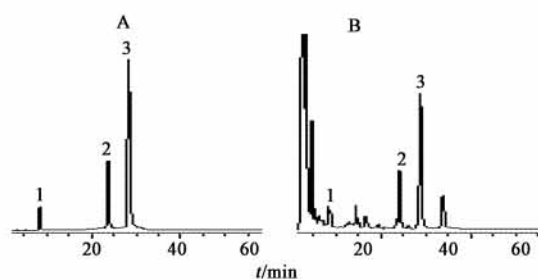


图 1 蛹虫草 HPLC

A. 对照品; B. 样品; 1. 尿苷; 2. 腺苷; 3. 虫草素

腺苷和尿苷的对照品适量, 用 50% 甲醇溶解, 超声混匀, 制成每 1 mL 含虫草素 0.140 mg, 腺苷 0.205 mg, 尿苷 0.601 mg 的混合对照品溶液, 取该对照品溶液 1 mL, 加入 50% 甲醇稀释 10 倍, 定容到 10 mL 量瓶, 即得。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取正交试验样品液适量, 离心, 上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得。

**2.2.4 标准曲线的制备** 精密吸虫草素、腺苷、尿苷的混合对照品溶液 5, 10, 20, 25, 50 μL, 注入液相色谱仪, 测定其峰面积, 以进样量 (μg) 为横坐标 (X), 峰面积 (Y) 为纵坐标, 得虫草素标准曲线回归方程为  $Y = 8.36 \times 10^5 X + 4.06 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ), 腺苷标准曲线回归方程为  $Y = 2.98 \times 10^6 X - 3.41 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ), 尿苷标准曲线回归方程为  $Y = 2.98 \times 10^6 X + 1.53 \times 10^3$  ( $r = 0.9993$ ), 3 种对照品进样量的线性范围分别在 0.070 ~ 0.700, 0.103 ~ 1.025, 0.300 ~ 3.005 μg。

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 虫草素、腺苷、尿苷峰面积的 RSD 分别为 0.20%, 0.08%, 0.40%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.6 回收率试验** 分别精密移取正交试验 7 号提取液 2.0 mL 于 18 个 25 mL 量瓶中, 编号为 1 ~ 18 号, 分别精密移取 0.014 0 g·L<sup>-1</sup> 的虫草素对照液 6.0 mL 于其中 1 ~ 6 号量瓶中, 同法, 分别精密移取 0.020 1 g·L<sup>-1</sup> 的腺苷对照液 2.0 mL 于 7 ~ 12 号量瓶中, 再分别精密移取 0.060 1 g·L<sup>-1</sup> 的尿苷对照液 1.0 mL 于 13 ~ 18 号量瓶中, 加 50% 甲醇于各量瓶中稀释并定容, 按 2.2.1 项的色谱条件测定, 计算回收率, 结果虫草素、腺苷、尿苷平均回收率分别为 100.05%, 99.74%, 99.98%, RSD 分别为 1.05%, 1.12%, 1.02%。

**2.2.7 供试品溶液的含量测定** 精密吸取供试品溶液 25 μL, 注入液相色谱仪, 依法测定, 计算含量,

以虫草素、腺苷、尿苷含量的总和作为总核苷含量。

### 2.3 多糖含量测定<sup>[8]</sup>

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取葡萄糖对照品 6.200 mg 置于 50 mL 的量瓶中,用蒸馏水溶解,定容至刻度,摇匀,即得  $0.124 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖对照品溶液。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 取正交试验样品液 1.0 mL 置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即得供试品溶液。

**2.3.3 标准曲线的制备** 精密吸取葡萄糖的对照品溶液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 置于具塞试管中,加水至 2.0 mL,加入 0.2% 的硫酸蒽酮溶液(现配) 5.0 mL,沸水浴 15 min,然后冰浴 10 min,冷却至室温,在 625 nm 的最大吸收波长下测定其吸光度。得到多糖的标准曲线回归方程为  $Y = 8.427 2X - 0.000 3 (r = 0.999 1)$ ,多糖质量浓度在  $0.024 8 \sim 0.124 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好。

**2.3.4 精密度试验** 精密吸取葡萄糖的对照品溶液 1.2 mL 置于具塞试管中,加水至 2.0 mL,依法连续测定 6 次,吸光度的 RSD 0.35%,表明仪器精密度良好。

**2.3.5 回收率试验** 分别精密移取正交试验 2 号提取的蛹虫草多糖样品溶液 0.3 mL 于 6 个 25 mL 量瓶中,再精密移取  $0.124 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖对照液 20.0 mL 于其中,加蒸馏水稀释并定容,按 2.3.3 项下操作,在 625 nm 的波长下测定其吸光度,并计算回收率,结果多糖的平均回收率为 99.05%,RSD 1.04%。

**2.3.6 供试品溶液的含量测定** 取供试品溶液 2.0 mL,按照 2.3.2 项下的处理方法,测定各样品的吸光度值,计算多糖含量。

**2.4 提取工艺<sup>[4]</sup>正交试验优选** 根据预试验,对影响提取工艺的主要因素(溶剂用量、乙醇体积分数、提取时间、提取次数)按 4 因素 3 水平进行  $L_9(3^4)$  正交试验。各因素水平安排见表 1。取蛹虫草药材 9 份,每份 10.0 g 左右,分别按正交试验表中所列条件煎煮,滤过,合并滤液,分别加相应的提取溶剂定容到 295 mL(最大提取液的体积),使每份提取液含生药量相同。试验结果见表 2,方差分析见表 3。

$$\text{分值} = \frac{\text{测定值}}{9 \text{ 个试验中最大值}} \times 100$$

$$\text{综合评分} = \text{出膏率分值} \times 0.1 + \text{核苷类物质分值} \times 0.45 + \text{多糖分值} \times 0.45$$

表 1 蛹虫草提取正交试验因素水平

水平	A 溶剂 用量/倍	B 乙醇体积 分数/%	C 提取 时间/h	D 提取 次数/次
1	8	0	0.5	1
2	10	25	1	2
3	12	50	1.5	3

表 2 蛹虫草正交试验安排

No.	A	B	C	D	出膏率	总核苷	多糖	综合 评分
1	1	1	1	1	34.22	0.1735	15.60	54.53
2	1	2	2	2	37.85	0.2231	25.17	75.95
3	1	3	3	3	47.42	0.1588	32.25	78.38
4	2	1	2	3	45.31	0.2501	29.52	87.57
5	2	2	3	1	35.37	0.1605	27.65	69.67
6	2	3	1	2	41.33	0.1624	20.39	61.08
7	3	1	3	2	45.11	0.3056	23.46	87.25
8	3	2	1	3	45.05	0.2037	23.89	72.83
9	3	3	2	1	44.69	0.1518	25.05	66.73
$K_1$	71.86	75.15	63.27	66.29				
$K_2$	75.43	75.10	78.89	74.15				
$K_3$	76.01	73.04	81.14	82.85				
R	5.98	7.72	15.62	15.95				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
B	89.49	2	44.74	1.67	>0.05
C	441.13	2	220.56	8.22	>0.05
D	401.33	2	200.67	7.47	>0.05
A(误差)	53.68	2	26.88	1.00	

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

由直观分析可知,极差(R)最大的为D因素,  $D > C > B > A$ 。说明对虫草素、腺苷、尿苷、多糖含量及出膏率的影响最大的为提取次数,其次分别为提取时间、乙醇体积分数、溶剂用量。最佳组合为  $A_3B_1C_3D_3$ ;以A为误差项对综合评分进行方差分析估算,B,C,D,各因素各水平间无显著性差异,结合实际生产中的原料和时间成本,选择8倍量水,提取3次,即最佳提取工艺为  $A_1B_1C_2D_3$ ,即8倍量水,煎煮3次,每次煎煮1h。

**2.5 验证试验** 按优选的最佳提取工艺进行试验,测定样品中总核苷、多糖的含量及出膏率,结果见

表 4。

表 4 工艺验证试验 ( $n=3$ ) %

No.	出膏率	总核苷	多糖	综合评分	平均分
1	43.56	0.2608	28.31	87.45	
2	39.50	0.2413	27.12	82.47	87.46
3	40.25	0.2724	28.87	88.94	

由表 4 可见,确定的提取工艺与正交试验中的分值最高组接近,且重复性较好,说明确定的工艺合理。

### 3 讨论

良好的提取工艺是蛹虫草有效成分被充分利用的前提,选取多指标(出膏率、总核苷含量、多糖含量)优选蛹虫草提取工艺,主要是由蛹虫草中的有效成分的相关性质决定,蛹虫草中的核苷类物质易溶于水,也溶于乙醇和甲醇,多糖则易溶于水<sup>[9-10]</sup>,虽然其单因素水平提取工艺多有报道,但是多指标的考察更能够全面、合理地反应其工艺水平和质量。

核苷类化合物和多糖是蛹虫草中含量较高的活性物质,故设定综合评分中的权重分别为 0.45。

本实验采用多指标综合评分法优选出蛹虫草最佳提取工艺条件为加 8 倍量水,煎煮 3 次,每次 1 h;同时采用 HPLC 法测定蛹虫草中核苷类物质,经方法学考察,具有准确、可靠、简便的特点,可作为蛹虫草的质量控制方法,为蛹虫草进一步开发利用提供

了实验依据。

### [参考文献]

- [1] 廖春丽,方改霞,王莲哲. 蛹虫草主要有效成分分析[J]. 安徽农业科学,2008,36(12):5050.
- [2] 钟运俊,韦会平. 蛹虫草中虫草素的研究进展[J]. 中国实用医药,2008,36(3):231.
- [3] 王英娟,李多伟,王义潮. 蛹虫草中虫草素、虫草多糖综合提取工艺研究[J]. 西北植物学报,2005,25(9):1863.
- [4] 宋丽艳,叶斌,于荣敏. 人工蛹虫草核苷类成分的超声提取工艺优化研究[J]. 中药材,2007,30(9):1156.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010:附录 62.
- [6] 陈尚卫,虞锐鹏,朱松,等. 高效液相色谱法同时测定蛹虫草中四种核苷类活性成分[J]. 食品与机械,2006,22(6):107.
- [7] 杨昕,王瑞华,涂秩平. 高效液相色谱法同时测定人工蛹虫草子实体中核苷类成分的含量[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(8):1097.
- [8] 来永斌,王琦,孙月. 蛹虫草多糖含量的测定与分析[J]. 中成药,2001,23(7):517.
- [9] 牛双,高翔,安金双. 蛹虫草菌丝体中腺苷提取工艺的优化[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):322.
- [10] 石岩,王钢力,秦文杰,等. 冬虫夏草的化学成分综述[J]. 中医研究,2006,19(7):54.

[责任编辑 全燕]