

· 中药工业 ·

葛根多糖提取工艺的优化[△]

裴莉昕, 纪宝玉, 陈随清*, 薛淑娟, 郝琼琼

(河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046)

[摘要] 目的: 以葛根多糖为研究对象, 提取率和含量为指标, 进行综合分析, 得出葛根多糖的最佳提取工艺。方法: 通过正交试验分析影响葛根多糖提取的因素, 采用加权分析法分析各因素的影响度。结果: 应用最佳提取工艺, 葛根多糖提取率可达 15.38%, 含量达 12.88%。结论: 该方法简单、可靠, 应用广泛, 可为葛根多糖的工业化生产提供依据。

[关键词] 葛根多糖; 工艺优化; 水提醇沉法; 正交设计; 加权分析法

Study on Optimization of Puerariae Radix Polysaccharides Extraction

PEI Lixin, JI Baoyu, CHEN Suiqing*, XUE Shujuan, HAO Qionqiong

(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of polysaccharide from Radix Puerariae. **Methods:** The orthogonal experiment was applied to analyze the affecting factors of extraction of polysaccharide in Puerariae Radix, the weighted analysis method was used to analyze the influence degree of each factor. **Results:** The extraction rate of the polysaccharides was 15.38%, and the content was 12.88%. **Conclusion:** This method is simple, reliable, wide application, and provides the basis for the industrial production of polysaccharide from Radix Puerariae.

[Keywords] Puerarin polysaccharide; process optimization; water extraction and alcohol precipitation method; orthogonal design; weighted analysis method

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.4.017

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria Lobate* (Willd.) ohwi 的干燥根^[1]。我国葛根资源极为丰富, 除了西藏、新疆、青海外, 全国各省均有分布^[2]。从 20 世纪开始, 随着细胞生物学研究和分子生物学的不断深入, 人们陆续发现多糖具有多种生物活性^[3], 大量药理及临床研究证实, 多糖具有降血糖、提高机体的免疫功能^[4]、抗病毒、抗辐射^[5]、抗衰老^[6]、抗突变^[7]、保鲜^[8]、抗肿瘤、抗氧化活性等作用, 而且对机体的副作用小。但目前人们主要集中对葛根资源及异黄酮类成分的研究, 对葛根多糖研究甚少。笔者首次采用正交试验和加权分析法相结合, 以多糖的提取率及含量为指标, 对葛根多糖提取中水提和醇沉过程的各影响因素进行综合分析, 得出葛根多糖的最佳提取工艺, 为葛根多糖的工业

化生产提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

电热恒温水浴锅(上海精宏试验设备有限公司); 烘箱(上海南荣试验设备有限公司, 型号: DGX-9053B); 电子天平(常熟市天量仪器有限责任公司); 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); UV-2600 紫外分光光度计(日本岛津); 电热套(金坛市医疗仪器厂 KDM-1000B 型调温电热套); 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 试剂

石油醚(天津市富宇精细化工有限公司, 沸程:

[△] [基金项目] 中医药公共卫生专项资助项目(财[2011]76号); 中医药行业科研专项资助项目(201207002); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A360557)

* [通信作者] 陈随清, 教授, 研究方向: 中药品种整理及质量标准研究; Tel: (0371)65676686, E-mail: suiqingchen@sohu.com

60~90℃,分析纯);无水乙醇(天津市登科化学试剂有限公司,分析纯);丙酮(烟台市双双化工有限公司,分析纯);苯酚(天津市致远化学试剂有限公司,分析纯);浓硫酸(洛阳昊华化学试剂有限公司,分析纯);蒸馏水(实验室自制);无水葡萄糖(天津市凯通化学试剂有限公司,分析纯,批号:1911101)。

1.3 材料

葛根饮片购于亳州市张仲景中药饮片责任公司(批号:140501,产地:河南),经河南中医药大学生药学科陈随清教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria Lobate*(Willd.) ohwi 的干燥根,

2 方法与结果

2.1 葛根多糖的提取

称取50.00g葛根粉末,置圆底烧瓶中,加石油醚250mL,回流提取1h,过滤,挥干滤渣溶媒,置烧瓶中。重复操作一次,加蒸馏水,回流提取,趁热过滤,滤液浓缩至50mL,加入无水乙醇,在一定温度下,静置,过滤,沉淀物以无水乙醇、丙酮依次洗涤8次,每次5mL,得到总多糖组分,60℃烘干,称重,计算粗多糖的提取率。

2.1.1 葛根多糖的含量测定 采用苯酚-硫酸法,含量以无水葡萄糖为对照品。

2.1.2 标准溶液的配制 精密称取无水葡萄糖0.0025g,置50mL容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,冷藏备用。

2.1.3 5%的苯酚溶液的配制 精密称取苯酚5.0003g,置100mL容量瓶中,加蒸馏水,摇匀备用。

2.1.4 检测波长的选择 精密吸取无水葡萄糖标准溶液2.0mL,置10mL具塞试管中,另取2.0mL蒸馏水作为空白对照。两试管中分别加入1.0mL苯酚溶液,混匀,再加入浓硫酸5.0mL,摇匀后放置25min,置沸水浴中加热15min,取出置冷水浴中冷却后,在200~800nm波长范围进行全波长扫描。扫描结果显示,无水葡萄糖在490nm处有最大吸收,故可确定最大吸收波长为490nm。

2.1.5 换算因素测定 精密称取葛根总多糖0.1000g,置100mL容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。精密量取储备液10.0mL,置100mL容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,此为供试品溶液。精密量取供试品溶液2.0mL,按标准曲线制备项下试剂的加入方法操作,测定吸光度,从标准曲线中

求出供试品的浓度,并计算出2mL供试液中所含的粗多糖的质量,按如下公式计算换算因数:

$$J = W/CD \quad (1)$$

W为实际总多糖量(mg),C为测得多糖液中总多糖(mg),D为稀释因素,经计算得出换算因素为 $J=2.19(n=3)$ 。

2.1.6 供试品的制备及含量测定 取粉末50.00g,按照2.1项下方法制备,精密称取制得的葛根粗多糖0.1000g,置100mL容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,作为储备液。精密量取储备液10.0mL,置100mL容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。精密量取2.0mL供试品溶液,置10mL试管中,加入1.0mL5%苯酚溶液,垂直快速加入浓硫酸5.0mL,摇匀,放置25min,置沸水浴加热15min,取出放入冷水浴中冷却后,在最大吸收波长(490nm)处测定吸光度,按下式计算样品中粗多糖的含量:

$$\text{多糖含量} = \frac{c \times F \times f}{M} \times 100\% \quad (2)$$

c为供试液葡萄糖浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),F为供试品溶液的稀释因素,f为换算因素,M为供试品质量(mg)。

2.2 葛根多糖提取影响因素的正交试验

2.2.1 葛根多糖水提过程影响因素的正交试验 根据多糖水提过程中的影响因素,选取提取次数分别为1、2、3次,提取时间分别为1、2、3h,料液比分别为1:10、1:15、1:20 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;药材粉碎程度直径分别为1.0、0.5、0.25cm,醇沉过程的条件均设定乙醇浓度为80%,醇沉时间为24h,醇沉温度为25℃,用以上四因素三水平进行正交试验 $L_9(3^4)$,结果见表1。

由表1可知,水提过程中影响综合指标最大的因素为提取次数,最小的影响因素为料液比,四因素影响程度为提取次数>提取时间>粒度大小>料液比,所以最佳水提工艺为 $A_2B_3C_1D_3$,即:水提时间为2h,水提的次数为3次,水提料液比为1:10 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,药材的粉碎程度为0.25cm。

2.2.2 葛根多糖醇沉过程影响因素的正交试验 选定最佳水提条件,根据葛根多糖醇沉过程影响因素,选取乙醇浓度为70%、80%、90%,沉淀时间为12、24、36h,醇沉温度55、25、4~10℃;用以上三因素三水平进行正交试验 $L_9(3^3)$,结果见表2。

表1 水提过程正交试验设计

编号	A 回流时间/h	B 回流次数	C 料液比/mg·mL ⁻¹	D 药材粉碎度	多糖的提取率(%)	多糖的含量(%)	综合评价
1	1	1	1	1	9.38	6.116	7.421 6
2	1	2	2	2	11.01	8.839	9.707 4
3	1	3	3	3	12.03	9.508	10.516 8
4	2	1	2	3	9.79	8.755	9.169 0
5	2	2	3	1	11.19	9.597	10.234 2
6	2	3	1	2	13.61	12.070	12.686 0
7	3	1	3	2	10.23	7.566	8.631 6
8	3	2	1	3	11.40	11.270	11.322 0
9	3	3	2	1	12.79	9.926	11.071 6
K ₁	27.645 8	25.222 2	31.429 6	28.727 4			
K ₂	32.089 2	31.263 6	29.948 0	31.025 0			
K ₃	31.025 2	34.274 4	29.382 6	31.007 8			
R	4.443 4	9.052 2	2.047 0	2.297 6			

表2 醇沉过程正交试验设计

编号	A 乙醇浓度	B 醇沉时间/h	C 醇沉温度/℃	多糖提取率(%)	多糖的含量(%)	综合评价(%)
1	1	1	1	9.40	7.184	8.070 4
2	1	2	2	10.01	7.257	8.358 2
3	1	3	3	11.34	9.016	9.945 6
4	2	1	2	13.32	9.769	11.001 4
5	2	2	3	14.01	10.940	12.160 0
6	2	3	1	11.97	8.577	9.934 2
7	3	1	3	14.98	11.450	12.682 0
8	3	2	1	13.57	8.466	10.507 6
9	3	3	2	15.20	12.730	13.718 0
K ₁	26.374 2	31.933 8	28.512 2			
K ₂	33.095 6	31.025 8	33.076 6			
K ₃	37.087 6	33.597 8	34.967 6			
R	10.713 4	2.572 0	6.455 4			

由表2可知,在最佳的水提条件下,葛根多糖的醇沉过程中最大影响因素为乙醇浓度,最小影响因素为醇沉时间,各因素影响程度为乙醇浓度>醇沉温度>醇沉时间。确定最佳的醇沉方案:乙醇浓度为90%,醇沉温度为4~10℃,醇沉时间为36h。

2.2.3 方法学考察 标准曲线的建立:精密吸取标准溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0 mL分别置于50 mL容量瓶中,加溶剂稀释至刻度,分别吸取上述各浓度的标准溶液2.0 mL,置10 mL具塞试管中,另取2.0 mL蒸馏水作为空白对照。各管中分别加入1.0 mL苯酚溶液,混匀,再垂直快速加入浓硫酸5.0 mL,摇匀后放置25 min,置沸水浴中加热15 min,取出置冷水浴中冷却后,在最大吸收波长490 nm处测定吸光度。以葡

萄糖对照品浓度为横坐标(X),以其吸光度为纵坐标(Y),得到标准曲线。得回归方程: $Y = 15.611X + 0.1302$, $r = 0.9996$ ($n = 7$)。结果表明,无水葡萄糖在0.005~0.07 mg·mL⁻¹线性关系良好。

稳定性考察:取同一供试品溶液2.0 mL,置具塞试管中,按2.1.6项下供试品的制备方法制备,每隔20 min测定一次吸光度,连续测定2 h。RSD为2.34%,表明2 h内多糖含量的测定结果稳定。

精密度考察:取同一供试品溶液,分别吸取2.0 mL置5个具塞试管中,按照2.1.6项下的方法测定吸光度。RSD为2.59%,实验仪器精密度良好。

重复性考察 取同一葛根粉末6份,在相同条件下制备供试品,按照2.1.6项下供试品的制备及

含量测定操作。RSD为1.02%，实验具有良好的重复性。

加样回收试验：精密称取葛根样品6份，加入

葛根多糖，按照2.1.6项下测定，计算加样回收率，结果显示，加样回收率为98.20%，RSD为1.43%，结果见表3。

表3 葛根多糖加样回收率试验结果($n=6$)

取样量/g	样品中含量/g	加入量/g	测得量/g	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
25.000 1	3.825 0	3.824 7	7.649 9	100.01	98.20	1.43
24.999 8	3.825 0	3.824 9	7.628 5	99.44		
25.000 0	3.825 0	3.825 0	7.613 5	99.04		
24.999 7	3.825 0	3.825 3	7.580 5	98.18		
25.000 2	3.825 0	3.825 1	7.498 8	96.04		
24.999 9	3.825 0	3.824 9	7.516 2	96.50		

2.3 最佳工艺的确定

结合水提和醇沉的影响因素，最终确定最佳提取工艺：水提时间为2 h，水提次数为3次，料液比为1:10 g·mL⁻¹，葛根粒度为0.25 cm，醇沉时乙醇浓度为90%，醇沉时间为36 h，醇沉温度为4~10℃。

3 讨论

3.1 测定方法

多糖的含量测定方法有很多，例如：色谱法、化学滴定法、光谱法等。色谱法具有定性能力比较差、分析能力受到检测器的限制、购买与使用费用偏高、需消耗有机溶剂等缺点；化学滴定法则步骤繁琐，重复性、准确度差，且实验操作的细微偏差对结果影响很大。因此，本实验采用光谱法-紫外-可见分光光度法。此法是近些年来应用于多糖的含量测定最为广泛的方法^[9]。根据显色剂的不同，分为苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法和地衣酚-盐(硫)酸法。本文采用苯酚-硫酸法，此法的优势在于能够进行大量样品的测定，并在实验时基本不受蛋白质存在的影响，而且产生的有色化合物在120 min内颜色稳定^[10]。实验用苯酚溶液(未加硫酸)为现配溶液，每次用苯酚浓度一致，否则将会影响实验结果^[11]。其含量测定依据的原理：多糖在浓硫酸的作用下，首先水解成单糖，此单糖迅速脱水生成糖醛的衍生物，然后再和苯酚迅速反应，缩合成有色的化合物，再用紫外分光光度计于最大吸收波长处测定其吸光度，通过标准曲线以及换算因子计算得出多糖含量^[12-13]。

3.2 分析方法

在正交试验的基础上，利用加权分析法分别赋

予多糖提取率和多糖含量0.4和0.6的权重，计算多糖的综合指标，从而分析比较各个影响因素的影响程度，得出利用水提醇沉法提取葛根多糖的最佳工艺，以便于葛根多糖制品的规模化生产。

3.3 结果分析

本实验系统分析了影响葛根多糖提取过程的因素，利用加权分析法将各个影响因素的影响程度进行分析，得到葛根多糖的最佳提取工艺。在最佳提取工艺下，葛根多糖提取率最大可达15.38%，含量达12.88%。实验结果可以为葛根多糖在其他领域的应用，如药品、保健品等方面提供参考，对于推动相关行业的发展，具有一定的理论价值和实际应用前景。

3.4 提取因素分析

水提过程中，水提次数对实验结果的影响非常明显，水提时间次之，料液比和粒度的影响相对而言则不太明显。出现这个结果的原因，可能是料液比设定的最小比例已经足以完全提取出多糖，所以再加大料液比的比例对于结果的影响就不太明显。醇沉过程中，乙醇浓度对结果的影响非常明显，醇沉温度次之，影响最小的是醇沉时间，在实验中发现，葛根多糖醇沉时现象极为明显，表明对于醇沉时间的单因素分析也是非常必要的。因此本实验后期可增加单因素分析。

参考文献

- [1] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [2] 张勇, 王艾平, 周丽明, 等. 葛根多糖提取条件的研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(7): 65-67.

(下转第567页)

麻油、15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯近年来只在少数中药注射液中开展了的探索性的研究^[9-13], 尚未广泛使用。且使用增溶性辅料的制剂安全性研究相对较少^[14-17], 因此需在了解制剂物质基础的同时结合剂型的特点开展相应的安全性研究, 谨慎添加, 为临床用药的安全提供保障。

参考文献

- [1] 冉勇, 冉云, 刘真. 7例清开灵注射液不良反应分析[J]. 药物与临床, 2009, 18(2): 81-82.
- [2] 张婷, 朱婷婷. 不同赋形剂对黄芩苷溶液稳定性的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 192-193.
- [3] 陈翔宇, 孙胜斌, 李响明, 等. 冠心宁注射液蛋白质检查假阳性问题的研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(11): 1212-1215.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 冠心宁注射液质量标准: WS3-B-3267-98-2012[S]. 2012.
- [5] 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.
- [6] 郭青, 吴晓燕. 中药注射剂中蛋白质检查药典方法的假阳性原因探究[J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 219-223.
- [7] 祖金玥, 冯孟鑫, 王小红, 等. 聚山梨酯80对药典方法检查中药注射剂蛋白的影响[J]. 中国药品标准, 2015, 16(1): 36-38.
- [8] 王猛, 张钧寿, 周建平. 注射用辅料泊洛沙姆188[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(1): 10-13.
- [9] 祁星星, 李畅, 孙春萌, 等. 一种以Kolliphor HS15为增溶剂的参麦注射液的稳定性和安全性研究[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(21): 2536-2541.
- [10] 聂飞, 唐芳, 赵彬, 等. 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯在参麦注射液中的应用研究[J]. 中药与临床, 2014, 5(2): 42-44.
- [11] 张少峰, 鄢丹, 唐慧英, 等. 适宜于生脉注射液的增溶性辅料筛选研究[J]. 中药材, 2009, 6(32): 969-972.
- [12] 郭立, 杨秀荣. 清开灵注射液制备工艺对增溶性辅料增溶作用的影响[J]. 中国医药指南, 2011, 9(26): 216-217.
- [13] 王伟. 中药复方开心散和香丹注射液的制剂基础研究[D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2010.
- [14] 罗实. 银杏双酯注射液的制备和质量标准研究[D]. 成都: 四川抗菌素工业研究所, 2014.
- [15] 张嘉, 李贻奎, 李连达, 等. 聚山梨酯80和泊洛沙姆188等4种增溶剂对小鼠的急性毒性[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1491-1493.
- [16] 易红, 高进, 杨华, 等. 几种注射用表面活性剂的质量标准及安全性概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 115-119.
- [17] 张海燕, 韦迎春, 邬伟魁, 等. 3种增溶性辅料致大鼠肝肾损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 237-241.

(收稿日期 2016-04-28)

(上接第556页)

- [3] 曾富华, 赵龙岩, 饶力群. 仙人掌多糖研究进展与开发利用前景[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(5): 411-414.
- [4] 唐小江, 祝寿芬. 国内外高等植物多糖的研究概况[J]. 山西医科大学学报, 1998, 29(1): 94-95.
- [5] 孙元琳, 蔺毅峰, 高文庚, 等. 当归多糖抗辐射功能的构效关系探讨[J]. 中国食品学报, 2009, 9(3): 33-37, 40.
- [6] 李福香, 徐敏, 王键, 等. 肉苁蓉的药理学研究现状与展望[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 92-93.
- [7] 董彩婷, 杨青, 肖元梅, 等. 芦荟多糖抗突变作用的试验研究[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(3): 477-478.
- [8] 王文果, 庞杰. 多糖涂膜保鲜果蔬的研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2006, 25(4): 358-363.
- [9] 苏玉顺, 李艳君, 赵方振, 等. 紫外-可见分光光度法在植物多糖含量测定中的应用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(3): 1101-1107.
- [10] 丁玲, 王东, 张中林, 等. 不同商品地山药多糖含量的分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(4): 187-188.
- [11] 司志鑫, 马玉山, 马俊杰, 等. 希赫日·地格达多糖的提取及含量测定[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2009, 24(3): 280-281.
- [12] 黄秋婷, 陈远锋. 枸杞多糖的研究及其进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 172-175.
- [13] 张若楠, 王三虎, 王剑波, 等. 正交法探讨独活寄生汤的提取工艺条件[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(3): 246-248.

(收稿日期 2016-09-20)