

· 中药工业 ·

均匀设计法优选淫羊藿多糖提取工艺[△]鲁静^{1,2}, 牛晓静¹, 段晓颖^{1*}

1. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450000;

2. 中药临床评价技术河南省工程实验室, 河南 郑州 450000

[摘要] 目的: 优选淫羊藿多糖的提取工艺。方法: 采用均匀设计法, 以液料比、提取时间、提取温度、提取次数为考察因素, 以多糖收率为评价指标, 对淫羊藿多糖热水浸提工艺进行优化。结果: 淫羊藿多糖最佳提取工艺为液料比 25 mL·g⁻¹、提取温度 90 ℃、提取时间 140 min、提取次数 3 次, 多糖收率为 1.09%。结论: 优选的淫羊藿多糖提取工艺稳定、可行, 为淫羊藿多糖进一步研究开发提供实验依据。

[关键词] 淫羊藿多糖; 提取工艺; 均匀设计法

[中图分类号] **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)01-0095-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180529002

Optimization of Extraction Process for Epimedium Polysaccharide by Uniform Design Method

LU Jing^{1,2}, NIU Xiao-jing¹, DUAN Xiao-ying^{1*}

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University of CM, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Province Engineering Laboratory for Clinical Evaluation Technology of CM, Zhengzhou 450000, China

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction process for *Epimedium* polysaccharide (EPS). **Methods:** The effects of liquid-material ratio, extraction time, extraction temperature and extraction times on polysaccharides extraction yields were investigated by uniform design method. The result was analyzed and the extracting process was optimized. **Results:** The optimized conditions were as follows; extracted 3 times with 25 times the amount of water at 90 ℃ and each for 140 min. The yield was 1.09%. **Conclusion:** The optimum extraction process of EPS is stable and feasible, which could provide experimental basis for further research and development.

[Keywords] EPS; extraction process; uniform design method

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的干燥叶, 味辛、甘, 性温, 归肝、肾经, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用, 用于肾阳虚衰、阳痿遗精、筋骨痿软等^[1]。淫羊藿多糖为淫羊藿中有效活性成分之一, 具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、调节免疫、抗病毒等功能^[2-6]。

目前, 已有多种方法可以分离提纯淫羊藿多糖, 包括煎煮法、浸提法、超声法、微波辅助提取法、酶提取法、超高压提取法等^[7-12]。但煎煮

法能耗较高, 超声处理会影响多糖的结构和活性^[13]; 而酶法提取对酶促反应条件要求严格。此外, 微波法、超声法和酶提取法在工业化生产中尚未广泛应用。本实验采用均匀设计法, 优选淫羊藿多糖的热水浸提工艺, 为其有效开发、利用提供保障。

1 仪器与试剂

Thermo Evolution 201 紫外可见分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司); BSA224S-CW 电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); HH-S4 电子恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); LXJ-IIIB 离

[△] [基金项目] 河南省科技厅基础与前沿研究(152300-410105)

* [通信作者] 段晓颖, 主任中药师, 研究方向: 中药制剂的质量控制、中药新制剂的研究与开发; E-mail: dxy1378@163.com

心机(上海安亭科学仪器厂)。

无水葡萄糖对照品(批号:110833-200503,中国食品药品检定研究院);蒽酮、无水乙醇、浓硫酸为分析纯。

淫羊藿药材购自河南中一医药经营有限公司,经河南中医药大学第一附属医院药学部陈天朝主任药师鉴定,符合《中华人民共和国药典》2015年版一部淫羊藿项下相关要求。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取干燥至恒重的无水葡萄糖对照品适量,精密称定,加水制成每1 mL含0.107 mg的葡萄糖对照品溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备

取淫羊藿药材10 g,精密称定,按照设定的条件提取,过滤,取滤液适量,加入无水乙醇(4倍体积),摇匀,4℃放置12 h,4000 r·min⁻¹离心20 min,弃去上清液,沉淀用水溶解,转移并定容至100 mL,摇匀,即得。

2.3 最大吸收波长的确定

精密吸取葡萄糖对照品溶液0.2 mL,置于10 mL具塞刻度试管,加水至2 mL,摇匀,迅速精密加入0.1%蒽酮硫酸溶液6 mL,混匀,于沸水浴中加热15 min,取出,立即置冰水浴中冷却15 min,取出,以蒸馏水为空白,进行同样的显色操作,采用紫外-可见分光光度计进行扫描,扫描波长范围为400~800 nm。另取供试品溶液2 mL,同法操作。结果显示,葡萄糖对照品及淫羊藿多糖显色后均在625 nm处有最大吸收峰,见图1~2。

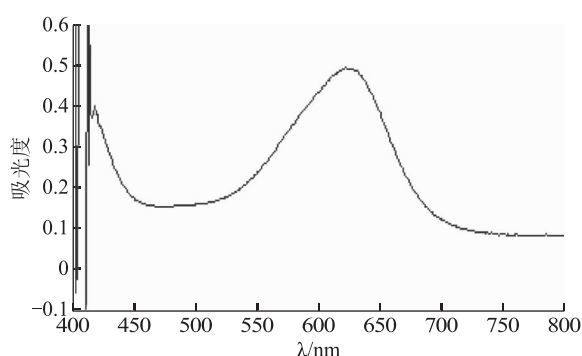


图1 葡萄糖对照品显色后400~800nm全波长扫描图

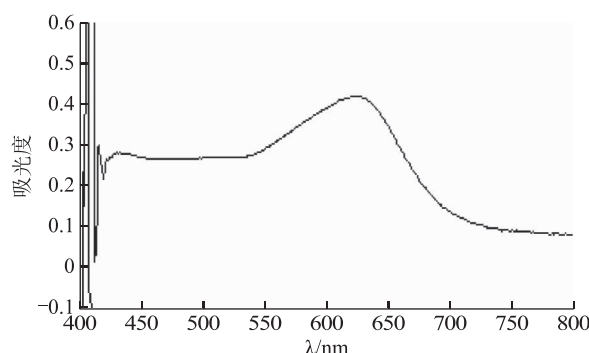


图2 淫羊藿多糖显色后400~800nm全波长扫描图

2.4 标准曲线的绘制

精密吸取葡萄糖对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,按2.3项下方法显色,在625 nm处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,绘制标准曲线: $Y = 11.279X + 0.0206$ ($r = 0.9995$),结果表明,葡萄糖在0.0107~0.0642 mg·mL⁻¹与吸光度线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取供试品溶液2 mL,按2.3项下方法显色并测定吸光度,重复测定6次,记录吸光度,RSD为0.37%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取供试品溶液2 mL,按2.3项下方法显色,每5 min测定1次吸光度,30 min内RSD为0.72%,表明供试品溶液在30 min内稳定。

2.7 加样回收率试验

称取淫羊藿药材5 g,精密称定,共6份,分别加入葡萄糖对照品适量,按2.2项下制成供试品溶液,再按2.3项下方法显色并测定吸光度,平均回收率为99.7%,RSD为2.31%,表明方法回收率良好。

2.8 样品含量测定

精密吸取供试品溶液2 mL,按2.3项下方法显色并测定吸光度,根据标准曲线计算供试品溶液中多糖含量。

2.9 均匀试验设计

根据预试验的结果,选择液料比(X_1)、提取温度(X_2)、提取时间(X_3)、提取次数(X_4)为考察因素,以淫羊藿多糖收率为评价指标,每个因素设置9个水平,选用均匀设计表 $U_9(9^4)$ 设计试验方案。

均匀试验的因素水平表及结果见表 1~3。

$$\text{多糖收率}(\%) = \frac{\text{供试品溶液中多糖浓度} \times \text{供试品溶液总体积} \times \text{滤液总体积} / \text{滤液量取量} / \text{药材质量} \times 100\%}{(1)}$$

表 1 $U_9^*(9^4)$ 因素水平表

水平	因素			
	$X_1/\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	$X_4/\text{次}$
1	10	60	60	1
2	15	65	75	2
3	20	70	90	3
4	25	75	105	
5	30	80	120	
6	35	85	135	
7	40	90	150	
8	45	95	165	
9	50	100	180	

表 2 均匀设计试验及结果

	$X_1/\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	$X_4/\text{次}$	多糖收率/%
1	10	70	150	3	0.25
2	15	85	105	2	0.51
3	20	100	60	1	0.37
4	25	65	165	3	0.88
5	30	80	120	2	1.04
6	35	95	75	1	0.29
7	40	60	180	3	0.99
8	45	75	135	2	0.94
9	50	90	90	1	0.13

表 3 均匀设计试验对各回归系数的检验结果

因素	非标准化系数		标准化系数	t 值	P 值
	B	标准误差			
常数	-1.183 215	0.612 701		-1.931	0.149
X_1X_2	0.000 241	0.000 218	0.790	1.104	0.350
X_1X_3	0.000 351	0.000 052	2.051	6.695	0.007
X_2X_3	0.000 190	0.000 063	0.900	2.991	0.058
X_1^2	-0.001 115	0.000 301	-2.589	-3.708	0.034
X_4^2	-0.128 049	0.040 253	-1.244	-3.181	0.050

利用 SPSS 22.0 对试验数据进行二次多项式回归分析处理, 得到淫羊藿多糖提取率与各因素的回归方程: $Y = -1.183\ 215 + 0.000\ 241X_1X_2 + 0.000\ 351X_1X_3 + 0.000\ 190X_2X_3 - 0.001\ 115X_1^2 - 0.128\ 049X_4^2$, $r = 0.990$, 调整后 $r = 0.949$, 表明回归方程拟合度高, 且差异具有统计学意义, $P = 0.024 < 0.05$ 。各因素对淫羊藿多糖收率的影响大小为: $X_1X_3 > X_1^2 > X_4^2 > X_2X_3 > X_1X_2$ 。 X_1 与 X_2 、 X_1 与 X_3 、 X_2 与 X_3 存在交互作用。 X_1^2 、 X_4^2 与多糖收率呈负相关; X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 与多糖收率呈正相关。

对回归方程进行规划求解, 得到淫羊藿多糖最佳热水浸提条件为液料比 $25\ \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、提取温度 $90\ ^\circ\text{C}$ 、提取时间 $140\ \text{min}$ 、提取次数 3 次, 此时多糖收率为 1.13% 。

2.10 工艺验证

取淫羊藿药材 $100\ \text{g}$, 共 3 份, 按所得到的最佳提取工艺条件进行验证试验, 按 2.2 项下制成供试品溶液, 按 2.8 项下含量测定法进行测定, 得到淫羊藿多糖收率分别为 1.08% 、 1.09% 和 1.11% , 与预测值接近, 说明回归方程预测基本准确, 优化后的实验条件可靠, 结果重复性好。

3 讨论

目前对多糖的定量主要采用经典的紫外扫描方法, 最常用的为硫酸-蒽酮法和苯酚-硫酸法。苯酚-硫酸法需要使用重蒸酚^[14], 硫酸-蒽酮法试剂需要现配, 且反应及冷却时间应严格控制^[15], 本实验选用硫酸-蒽酮法测定多糖含量。

实验中考察了醇沉浓度(含醇量 $50\% \sim 90\%$)对淫羊藿多糖提取率的影响, 结果发现, 含醇量为 80% 时, 多糖提取率最高, 故选择醇沉浓度为含醇量 80% 。考察了醇沉时间($6 \sim 24\ \text{h}$)对多糖提取率的影响, 结果发现, 醇沉时间大于 $12\ \text{h}$ 时, 多糖提取率趋于稳定, 故选择醇沉时间为 $12\ \text{h}$ 。

均匀设计法只考虑试验点在试验范围内均匀分布, 每个因素仅需用一次, 与正交试验相比, 大幅减少了次数, 不仅节省时间, 而且节约资源, 适合用来优化工艺条件。本实验采用均匀设计法对热水浸提淫羊藿多糖的工艺条件进行优化, 结果表明, 液料比、提取温度、提取时间之间存在交互作用, 验证试验得到的淫羊藿多糖的

提取率与预测值相符。所建立的热水浸提工艺稳定、可行,为淫羊藿多糖进一步的研究和开发奠定了基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:327-328.
- [2] 王程成,苏嘉炎,蔡继炎,等. 响应面优化朝鲜淫羊藿多糖提取条件及其肿瘤免疫活性研究[J]. 药学学报,2016,51(9):1464-1471.
- [3] 孟宪丽,李建亚,张艺,等. 淫羊藿多糖对老年大鼠神经内分泌免疫调节作用的研究[J]. 中药药理与临床,1998,4(3):19-20.
- [4] 李秋莹,陈守哲,李波,等. 淫羊藿多糖抗氧化性研究[J]. 亚太传统医药,2016,12(18):24-26.
- [5] 董娜,李倩,张贵强,等. 淫羊藿多糖对甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的免疫佐剂作用[J]. 国际药学研究杂志,2013,40(1):63-68.
- [6] 吕岫华,刘伟,郝冬梅,等. 中药多糖对 EB 病毒早期抗原激活的抑制作用[J]. 北京工业大学学报,2010,36(1):92-97.
- [7] 陈建,郭辉,马瑞彬. 淫羊藿多糖的精制实验研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(7):1241-1242.
- [8] 于红梅. 淫羊藿多糖提取工艺的优化及其对肉鸡免疫功能的调节作用[D]. 聊城:聊城大学,2015.
- [9] 姜虹,李新龙,李海平,等. 响应面法优化淫羊藿多糖超声提取工艺的研究[J]. 长春师范学院学报,2013,32(2):59-64.
- [10] 刘晓鹏,姜宁,刘志彪,等. 微波辅助提取淫羊藿多糖研究[J]. 亚太传统医药,2014,10(16):16-18.
- [11] 张曜武,王薇薇,王超,等. 淫羊藿多糖的酶法除蛋白工艺研究[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版),2014,35(2):167-169,173.
- [12] 侯丽丽,陈洪海,张守勤. 朝鲜淫羊藿多糖的提取工艺研究[J]. 湖北农业科学,2015,54(1):145-147,151.
- [13] 王小梅,孙润广,张静,等. 超声提取功率对麦冬多糖结构及抗氧化活性的影响[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2013,41(3):68-75.
- [14] 张贵明,王继文,王文泽,等. 朝鲜产东北红豆杉树皮中多糖提取工艺的比较研究[J]. 中国现代中药,2008,10(6):32-34.
- [15] 张庆红,马梅芳. 硫酸-蒽酮法测定天冬中多糖含量[J]. 中国现代中药,2008,10(8):18-19,22.

(收稿日期:2018-05-29 编辑:王笑辉)

(上接第84页)

- [5] 杨婉珍,吕朝耕,康传志,等. 人参中农药残留在水煎及研粉吞服两种用药方式下溶出转移情况研究. 中国现代中药,2018,20(6):729-733.
- [6] 马伟,王振月,张连学,等. 影响人参药材品质的因素分析. 中国现代中药,2012,14(9):44-47.
- [7] 王雪,王春伟,高洁,等. 不同杀菌剂对人参黑斑病菌的毒力测定及田间药效[J]. 农药,2011,50(11):841-844.
- [8] TANG M H,ZHANG X,XING S H,et al. Antibiotic activity of seven fungicides against *Alternaria panax* Whetz[J]. Agri Sci Technol,2016,17(12):2862-2865.
- [9] 张国珍,张雪松,梁月,等. 10% 世高水分散粒剂防治西洋参黑斑病试验[J]. 植物保护,2005,31(3):86-88.
- [10] 关一鸣,吴连举,王英平,等. 3 种新型杀菌剂对人参黑斑病菌的抑菌作用及田间防治效果[J]. 特产研究,2008(3):47-49.
- [11] 张雷鸣,徐娇,刘振鹏,等. 人参黑斑病拮抗菌的筛选[J]. 东北林业大学学报,2016,44(11):89-91.
- [12] 陈长卿,李桐,李欣莲,等. 人参内生细菌 NJ13 在宿主体内定殖特性及对人参黑斑病的防治效果[J]. 中国中药杂志,2014,39(10):1782-1787.
- [13] 李勇,赵东岳,丁万隆,等. 人参内生细菌的分离及拮抗菌株的筛选[J]. 中国中药杂志,2012,37(11):1532-1535.

(收稿日期:2018-07-06 编辑:姚霞)