

# 正交试验优化潞党参药材中核苷类成分的提取工艺<sup>△</sup>

王高峰\*(贵州工程职业学院生命科学系, 贵州 铜仁 565200)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2254-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.28

**摘要** 目的:优化潞党参核苷类成分的提取工艺。方法:采用超声提取法提取潞党参中核苷类成分,以胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷总量为评价指标,以乙醇体积分数(包括水)、提取时间、料液比、提取次数为考察因素,结合单因素和正交试验,对提取工艺条件进行筛选和优化,并进行验证试验。结果:最优提取工艺为以水为提取溶剂,提取时间45 min,料液比1:20(g/ml),提取2次;验证试验中潞党参100 g中4种核苷类成分总量为(17.01±0.005) mg(RSD=0.68%,n=3)。结论:优化的潞党参总核苷提取工艺稳定可行,且操作快速、节约成本。

**关键词** 潞党参;超声提取;核苷类成分;正交试验

## Optimization of the Extraction Technology of Nucleosides from *Codonopsis pilosula* by Orthogonal Test

WANG Gaofeng (Dept. of Life Science, Guizhou Engineering Vocational College, Guizhou Tongren 565200, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of nucleoside from *Codonopsis pilosula*. METHODS: The ultrasonic extraction was used to extract nucleoside from *C. pilosula*. The extraction technology was screened and optimized by single factor and orthogonal test with ethanol concentration (including water), extraction time, solid-liquid ratio and extraction times as factors using the total contents of cytidine, uridine, guanosine and adenosine as index. Validation test was conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was that pure water was extraction solvent, extracting for 45 min, with material-liquid ratio of 1:20 (g/ml), extracting for 2 times. Total amount of 4 kinds of nucleosides from in 100 g *C. pilosula* was (17.01±0.005) mg (RSD=0.68%, n=3). CONCLUSIONS: Optimized extraction technology of nucleoside from *C. pilosula* is stable, feasible, rapid in operation and cost-saving.

**KEYWORDS** *Codonopsis pilosula*; Ultrasonic extraction; Nucleoside; Orthogonal test

潞党参为桔梗科植物党参[*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.]的干燥根,被2015年版《中国药典》(一部)收载为中药材党参的原植物之一,具有补脾益肺、养血生津等功效,为我国常用药食两用的补中益气良药<sup>[1-2]</sup>。潞党参主产于山西省长治市、晋城市及其周边生态环境相似区域,人工栽培历史悠久,品质上乘,为山西省著名的道地药材之一<sup>[3-4]</sup>。现代药理学研究证实,其水溶性成分具有显著的抗胃溃疡、抗氧化、抗血小板聚集、抗血栓等多种生物活性<sup>[5]</sup>,常用于冠心病、高脂血症、调节胃肠功能、肿瘤等<sup>[6]</sup>患者的保健和治疗作用。而党参药材及其制剂在2015年版《中国药典》(一部)中,要求以党参中醇溶性浸出物(45%乙醇为溶剂)的含量来控制党参药材的质量,规定其质量分数不得少于55.0%<sup>[1]</sup>,但未明确具体的指标成分,笔者认为以此作为药材质量控制标准过于笼统。据报道,党参中含有腺苷<sup>[7]</sup>、尿嘧啶<sup>[8]</sup>等核苷类物质,而核苷类物质具有调节免疫功能、调节血糖、促进肠道修复、降低血压、抗心律失常、抗缺血性损伤等生物活性<sup>[9-10]</sup>,且核苷类成分易溶于水,推测其含量水平的高低可能会影响党参制剂的疗效和质量。因此,本试验建立了潞党参药材中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷

的定量分析方法,并以胞苷、尿苷、鸟苷及腺苷的总提取量为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化潞党参核苷类成分的提取工艺条件,旨在开发潞党参综合利用的新途径并为其在医药保健、食品工业等相关领域的广泛应用提供依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);DZF-6050MBE型电热恒温真空干燥箱(上海博讯实业有限公司);SB-5200DTN型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);TDZ5-WS型多管架自动平衡离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);CP225D型分析天平(德国Sartorius公司)。

#### 1.2 药材、药品与试剂

潞党参[新鲜根2014年10月18日采集于山西省平顺县杏城镇浦水村规范化栽培基地,采集30株成熟植株根以保证样品代表性,由重庆三峡学院生命科学与工程学院周浓副教授鉴定为桔梗科植物党参[*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.]的干燥根。潞党参根经自来水清洗后,50℃烘干,按分析要求分别粉碎过三号筛,备用];尿苷、腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110887-200202、110879-200202,供含量测定用);胞苷、鸟苷对照品(南京都莱生物技术有限公司,纯度:>98%);甲醇为色谱纯,无水乙醇为分析纯,水为娃哈哈牌纯净水。

<sup>△</sup>基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260622)

\*讲师。研究方向:生物制药的教学与研究。E-mail:80887665

@qq.com

本栏目协办

南京伊登生物医学科技有限公司

地址:江苏省南京市玄武区龙蟠中路29号珠江路都市经济园312室  
邮编:210018

## 2 方法与结果

### 2.1 胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Venusil MP C<sub>18</sub>(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A相为甲醇, B相为水, 进行梯度洗脱(0~10 min, 1% A→5% A; 10~15 min, 5% A→15% A; 15~22 min, 15% A→17% A; 22~26 min, 17% A→20% A; 26~32 min, 20% A→24% A; 32~45 min, 24% A→1% A; 45~50 min, 1% A), 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35 ℃; 检测波长: 260 nm; 进样量: 20 μl。取“2.1.3”项下对照品溶液和正交试验2号样品溶液进样分析, 结果表明, 供试品中4种核苷色谱峰与相邻组分峰能够达到基线分离, 分离度均大于1.68, 且峰形良好。对照品和样品溶液色谱图见图1。

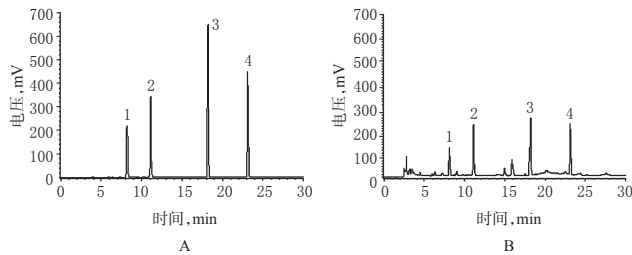


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 样品(正交试验2号); 1. 胞苷; 2. 尿苷; 3. 鸟苷; 4. 腺苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. sample (No. 2 of orthogonal test); 1. cytidine; 2. uridine; 3. guanosine; 4. adenosine

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取减压干燥至恒质量的胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷对照品适量, 加水溶解并制成质量浓度分别为0.58、0.55、0.55、0.59 mg/ml的对照品贮备液, 备用。

2.1.3 线性关系的考察 分别精密吸取各对照品贮备液适量, 加水定容至10 ml, 制成胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷质量浓度分别为58.00、66.00、110.00、59.00 μg/ml的混合对照品溶液, 置于冰箱内(4 ℃), 临用前以0.45 μm微孔滤膜滤过; 逐级稀释, 得到一系列不同质量浓度的4种核苷混合对照品溶液。进样测定, 以对照品的峰面积(y)对相应的质量浓度(x)进行线性回归绘制标准曲线, 得胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的回归方程分别为 $y=38\ 717x-10\ 660$  ( $r=0.999\ 9$ )、 $y=46\ 771x+7\ 432.7$  ( $r=0.999\ 9$ )、 $y=44\ 764x+25\ 825$  ( $r=0.999\ 8$ )、 $y=62\ 835x+15\ 674$  ( $r=0.999\ 8$ )。结果表明, 胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷检测质量浓度的线性范围分别为0.58~58.00、0.66~66.00、1.10~110.00、0.59~59.00 μg/ml。

2.1.4 灵敏度、精密性、加样回收率试验 按相关方法进行试验, 得胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的定量限分别为0.25、0.30、0.41、0.32 μg/ml; 精密性试验中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷峰面积的RSD分别为0.67%、0.42%、1.06%、0.71% ( $n=6$ ); 样品中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷平均回收率分别为100.02% ( $RSD=2.14\%$ ,  $n=6$ )、98.12% ( $RSD=2.28\%$ ,  $n=6$ )、98.23% ( $RSD=2.35\%$ ,  $n=6$ )、97.58% ( $RSD=1.42\%$ ,  $n=6$ )。

### 2.2 回流提取法与超声提取法的提取效果比较

目前文献报道的提取方法多为回流提取法<sup>[11]</sup>和超声提取法<sup>[12]</sup>, 本试验考察了这2种方法对潞党参核苷的提取量的影响, 比较两者的优劣。结果表明, 采用超声提取法提取后潞党参中4种核苷类成分的总量平均值[(1.129±0.014) mg/g]显著高于回流提取法[(0.541±0.081) mg/g], 故本试验选择超声提取法进行后续提取试验。

### 2.3 单因素试验考察

本试验分别选取乙醇体积分数[0(水)、15%、30%、50%、

70%、100%]、提取时间(15、30、45、60 min)、料液比(1:10、1:20、1:30、1:40, g/ml)、提取次数(1、2、3、4次)4个单因素进行试验, 研究某一因素变化对潞党参核苷类成分的影响。各条件下提取样品分别按“2.1.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 标准曲线法计算4种核苷成分的含量。

2.3.1 乙醇体积分数对潞党参核苷成分总量的影响 精密称取18份潞党参粉末(过三号筛)各10 g, 置于锥形瓶中, 在固定超声功率300 W、提取温度30 ℃、提取时间30 min、料液比1:20(g/ml)、提取1次的条件下, 考察不同乙醇体积分数对潞党参中核苷类成分总量的影响, 结果见图2A。

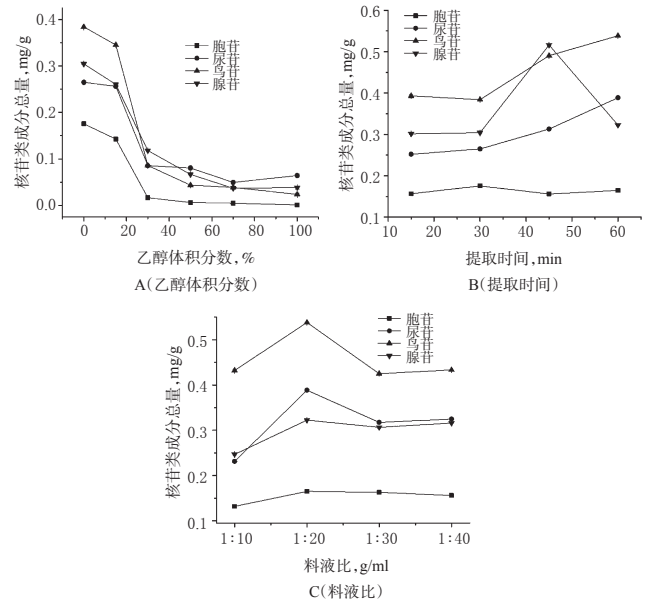


图2 各因素对潞党参核苷类成分总量的影响( $n=3$ )

Fig 2 Effects of each factor on the amount of nucleosides from *C. pilosula* ( $n=3$ )

从图2A可以看出, 潞党参中核苷类成分总量随着乙醇体积分数增加而逐渐下降, 其中在乙醇体积分数为0~50%范围内下降趋势较快, 大于50%以后下降趋势较缓。这可能是因为核苷类化合物极性大, 易溶于水而难溶于有机溶剂<sup>[13]</sup>, 即在纯水(乙醇体积分数为0)条件下提取率效果最好, 同时有助于节能环保。因此, 选择乙醇体积分数为0(水)~50%为宜。

2.3.2 提取时间对潞党参核苷类成分总量的影响 精密称取12份潞党参粉末(过三号筛)各10 g, 置于锥形瓶中, 分别精密加入水200 ml, 在固定超声功率300 W、提取温度30 ℃、提取1次的条件下, 考察不同提取时间对潞党参中核苷类成分总量的影响, 结果见图2B。

从图2B可以看出, 提取时间为15~45 min时, 核苷类成分总量随时间的延长呈增加趋势; 当提取时间在45 min后, 腺苷总量降低。因此, 选择提取时间为15~45 min为宜。

2.3.3 料液比对潞党参核苷类成分总量的影响 精密称取12份潞党参粉末(过三号筛)各10 g, 置于锥形瓶中, 分别精密加入水适量, 在固定超声功率300 W、提取温度30 ℃、提取时间45 min、提取1次的条件下, 考察不同料液比对潞党参中核苷类成分总量的影响, 结果见图2C。

从图2C可以看出, 在料液比为1:10~1:20时, 核苷类成分总量随着料液比增大而快速增大; 但料液比大于1:20时, 核苷总量明显下降。因此, 选取料液比1:10、1:20、1:30为宜。

2.3.4 提取次数对潞党参核苷类成分总量的影响 精密称取12份潞党参粉末(过三号筛)各10 g, 置于锥形瓶中, 分别精密

加入水 200 ml,在固定超声功率 300 W、提取温度 30 ℃、提取时间 45 min 的条件下,考察不同提取次数对潞党参中核苷类成分总量的影响。结果,超声提取 2 次已经基本提取完全,从经济合理性方面考虑,选取提取次数为 1~3 次进行优化。

#### 2.4 正交试验优化

以单因素试验的结果为基础,以胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷 4 种核苷类成分总量(10 g 药材中的总量)为评价指标,选取乙醇体积分数(A)、提取时间(B)、料液比(C)、提取次数(D)为考察因素,采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计。因素与水平见表 1,正交试验设计与结果见表 2(每组试验平行 3 份),方差分析结果见表 3。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, %	B, min	C, g/ml	D, 次
1	水	15	1:10	1
2	30%乙醇	30	1:20	2
3	50%乙醇	45	1:30	3

表 2 正交试验设计与结果

Tab 2 Result of orthogonal test

试验编号	因素				核苷总量, mg
	A	B	C	D	
1	水	15	1:10	1	1.377
2	水	30	1:20	2	1.556
3	水	45	1:30	3	1.608
4	30%乙醇	15	1:30	3	0.951
5	30%乙醇	30	1:20	1	1.110
6	30%乙醇	45	1:10	2	1.163
7	50%乙醇	15	1:30	2	0.404
8	50%乙醇	30	1:10	3	0.534
9	50%乙醇	45	1:20	1	0.614
$K_1$	4.541	2.732	3.074	3.101	
$K_2$	3.224	3.200	3.280	3.123	
$K_3$	1.552	3.385	2.963	3.093	
R	2.989	0.653	0.317	0.030	

表 3 方差分析结果

Tab 3 Result of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	3.587	2	1.793	1 121.372	<0.01
B	0.114	2	0.057	35.665	<0.05
C	0.001	2	0.001	0.320	
D	0.000	2	0.000	0.087	
误差	0.021	18	0.002		

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ ,  $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$

Note:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ ,  $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$

从表 2 中 R 值可以看出,影响潞党参中核苷类成分总量的因素大小排序为乙醇体积分数(A) > 提取时间(B) > 料液比(C) > 提取次数(D)。由表 3 方差分析结果可知,料液比(C)、提取次数(D)各水平之间无显著差异,而超声提取时间(B)水平之间差异有显著性( $P < 0.05$ ),乙醇体积分数(A)水平之间差异有极显著性( $P < 0.01$ )。由极差和方差分析综合分析可得,超声提取潞党参中核苷的最优工艺条件为  $A_1B_3C_2D_2$ ,即常温条件下用 20 倍药材量的水超声提取 45 min,重复提取 2 次,合并提取液。

#### 2.5 验证试验

精密称取潞党参粉末(过三号筛)100 g,以最优工艺条件提取,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,平行测定 3 次,结果胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷和 4 种核苷总量分别为(4.10 ± 0.004)、(4.74 ± 0.007)、(4.86 ± 0.025)、(3.30 ± 0.006)、(17.01 ± 0.005)

mg(总量的 RSD = 0.68%,  $n = 3$ )。结果表明,采用优化工艺提取潞党参中 4 种核苷,总量较高,且符合正交试验优化结果,说明该工艺稳定、重复性较好、操作简单、节约成本、利于推广。

### 3 讨论

核苷类化合物极性大,较难分离。笔者在前期试验中曾比较了 2 种色谱柱[Innoval AQ  $C_{18}$ 和 Venusil MP  $C_{18}(2)$ ]的分离效果,结果表明,后者对 4 种核苷类成分分离良好,而采用前一种色谱柱分离后峰形较差。同时还比较了不同的流动相组成如乙腈-水、甲醇-水、乙腈-甲酸水溶液和甲醇-甲酸水溶液对样品的分离效果,结果发现流动相为甲醇-水时对分析物的分离效果较好。因此,本试验最终选择了 Venusil MP  $C_{18}(2)$ 柱和甲醇-水系统梯度洗脱组成的分离系统。在 190~400 nm 波长下用二极管阵列检测器对混合对照品进行光谱扫描并保存全光谱,发现胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷在 260 nm 波长处都有较大的吸收峰,故选择 260 nm 作为检测波长。

本研究首次对潞党参中核苷进行了提取,并通过正交试验对提取工艺参数进行了优化,为潞党参核苷的开发利用提供了技术支持。

(致谢:感谢重庆三峡学院本科毕业生张莲莉同学在本试验过程中提供帮助)

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015 年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:281-282.
- [2] 赵莎,辛天怡,侯典云,等. 党参药材及其混伪品的 ITS/ITS2 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2013, 15(3):421.
- [3] 关琳静,连云岚,李建宽,等. 潞党参 HPLC 特征图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14):2 854.
- [4] 樊点莲,杨阿罗. 潞党参中重金属和农药残留分析[J]. 中国药房, 2015, 26(30):4 282.
- [5] 朱焰,魏均娟. 党参属药用植物研究状况[J]. 天然产物研究与开发, 1994, 6(1):70.
- [6] 冯佩佩,李忠祥,原忠. 党参属药用植物化学成分和药理研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(4):307.
- [7] Li CY, Xu HX, Han QB, et al. Quality assessment of Radix Codonopsis by quantitative nuclear magnetic resonance[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1 216(11):2 124.
- [8] 贺庆,朱恩圆,王峥涛,等. 党参化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(1):10.
- [9] 张雪梅,杨丰庆,夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9):277.
- [10] 赵洁,左华丽. RP-HPLC 法测定不同厂家阿胶中核苷类化合物的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(32):3 050.
- [11] 周菊峰,黄兰芳,郭方道. LC-ESI-MS 快速同时测定冬虫夏草中主要核苷类成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18):2 349.
- [12] Duan BZ, Wang LZ, Dai XH, et al. Identification and quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in aqueous extracts of *Fritillaria Cirrhosa* D. DON. Using HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS[J]. *Analytical Letters*, 2011, 44(15):2 491.
- [13] 黄林芳,段宝忠,王丽芝,等. 川贝母新资源太白贝母中水溶性成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 585.

(收稿日期:2015-09-23 修回日期:2015-12-03)

(编辑:刘 萍)