

均匀设计法优化附子中多糖的超声提取工艺[△]

鲁 静*,牛晓静(河南中医药大学第一附属医院药学部,郑州 450000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1834-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.30

摘要 目的:优化超声法提取附子中多糖的工艺。方法:采用均匀设计法,考察液料比、超声时间、超声温度对附子多糖提取率的影响,进行验证试验并与常规煎煮法结果比较。结果:优化的超声提取工艺为液料比10 mL/g、超声时间34 min、超声温度73 ℃;验证试验中多糖提取率为19.05% (RSD=0.60%, n=3),与预测值(19.44%)的相对误差为2.0%,提取率高于煎煮法的16.42%。结论:优化的超声提取工艺简单、快速、稳定,且提取率较高,适用于附子中多糖的提取。

关键词 附子;多糖;超声提取;工艺优化;均匀设计法

Optimization of Ultrasonic Extraction Technology for Polysaccharide from Aconiti Lateralis Radix Praeparata by Uniform Design Method

LU Jing, NIU Xiaojing (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize ultrasonic extraction technology for polysaccharide from Aconiti lateralis radix praeparata (ALRP). METHODS: Uniform design method was applied to investigate the effects of liquid material ratio, ultrasonic time and ultrasonic temperature on extraction rate of polysaccharide from ALRP. Verification test was conducted and compared with the results of conventional decoction and boiling method. RESULTS: Optimized ultrasonic extraction technology was as follow as liquid material ratio of 10 mL/g, ultrasonic time of 34 min and ultrasonic temperature of 73 ℃. The polysaccharide extraction rate in verification test was 19.05% (RSD=0.60%, n=3), relative error of the predicted value (19.44%) was 2.0%, while the extraction rate was higher than decoction and boiling method (16.42%). CONCLUSIONS: Optimized ultrasonic extraction technology is simple, rapid and stable with high extraction rate, which is suitable for extracting polysaccharide from ALRP.

KEYWORDS Aconiti lateralis radix praeparata; Polysaccharide; Ultrasonic extraction; Technology optimization; Uniform design method

附子是毛茛科植物乌头(*Aconitum carmichaelii* Debx.)的子根,味辛甘,性热,有毒,归心、肾、脾经,具有回阳救逆、散寒除湿的功效,主治阴盛格阳、大汗亡阳、吐泻厥逆、心腹冷痛等^[1]。由于附子毒性较大,临床上常以其炮制品入药,根据加工方式的不同,可分为盐附子、黑顺片、白附片、淡附片等,其中黑顺片的临床使用频率较高^[2]。目前,对附子成分的研究多集中在生物碱^[3],而关于附子多糖的报道相对较少。附子多糖作为附子有效成分之一,已证实的生物活性涉及免疫调节、抗肿瘤、保护心肌、降血糖等多个方面^[4-7],具有一定的研究价值。

附子多糖的提取方法主要有煎煮法、热水浸提法、微波提取法等^[8-10]。煎煮法和热水浸提法所需时间较长,而微波提取设备不易普及。超声提取法具有操作简单、提取时间短、提取率高、对成分影响小等优点,被广泛用于中药有效成分的提取^[11-12]。为了更加有效地提取附子多糖,本试验采用均匀设计法对附子超声提取工艺进行优化,为附子多糖的有效利用提供参考。

[△] 基金项目:河南中医学院第一附属医院科研基金项目(No.2012KJ31)

* 主管药师,博士。研究方向:药物分析。电话:0371-66251204。
E-mail: lujing1@msn.com

1 材料

1.1 仪器

TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KQ-100DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BSA224S-CW型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);LXJ-IIB型离心机(上海安亭科学仪器厂);FW-500型高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

D-无水葡萄糖(以下简称葡萄糖)对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110833-200503,含量:以99.5%计);萘酮、无水乙醇、浓硫酸等均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 药材

黑顺片(产地:四川,批号:151203)由河南中医药大学第一附属医院中药房提供,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为毛茛科植物乌头的子根。

2 方法与结果

2.1 多糖的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒质量的

葡萄糖对照品 10.80 mg,用水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,制成质量浓度为 108.0 μg/mL 的葡萄糖对照品溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取黑顺片粉末 10 g,精密称定,加入 80% 乙醇适量过夜,回流提取 3 h 脱脂,药渣挥干后,加入一定体积的水,按照设定的超声条件提取;过滤,滤液浓缩至适量,加入 4 倍量无水乙醇,摇匀,4 ℃ 放置 24 h,离心(4 000 r/min, 20 min, 离心半径为 20 cm);弃去上清液,沉淀用水溶解,转移并定容至 1 000 mL 量瓶中,摇匀,再精密移取 8 mL,用水稀释并定容至 250 mL 量瓶中,摇匀,即得。

2.1.3 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、1.4 mL,置于 10 mL 具塞刻度试管中,加水至 2 mL,摇匀;迅速精密加入 0.1% 萘酚-硫酸溶液 6 mL,混匀后于沸水浴中加热 15 min,取出,立即置于冰水浴中冷却 15 min,取出。以相应的试剂为空白,在 625 nm 波长处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标、葡萄糖质量浓度(c)为横坐标,绘制标准曲线,得到方程为: $A=43.363c+0.03644$ ($R^2=0.9994$)。结果表明葡萄糖检测质量浓度线性范围为 2.7~18.9 μg/mL。

2.1.4 精密度、稳定性和准确度试验 按相关方法进行。结果精密度试验中吸光度的 RSD 为 0.41% ($n=6$);稳定性试验中供试品溶液在放置 90 min 内吸光度的 RSD 为 0.78% ($n=6$);准确度试验中平均加样回收率为 99.4% ($RSD=2.06\%$, $n=9$)。

2.1.5 样品含量测定 精密量取供试品溶液 2 mL,置于 10 mL 具塞刻度试管,摇匀,迅速精密加入新制备的 0.1% 萘酚-硫酸溶液 6 mL,其余操作同“2.1.3”项。根据标准曲线方程计算供试品溶液中多糖含量。

2.2 均匀试验设计

在预试验基础上,选择液料比(X_1)、超声时间(X_2)、超声温度(X_3)为考察因素,以附子多糖提取率(Y , 多糖提取率=供试品溶液中多糖质量浓度×供试品溶液总体积/药材质量×100%)为评价指标,每个因素设置 8 个水平,选用均匀设计表 $U_8^8(8^3)$ 设计试验方案。称取黑顺片粉末 8 份,每份约 10 g,按“2.1.2”项下方法处理,测定样品中多糖含量,每组试验重复 3 次。均匀试验的因素与水平见表 1,试验设计与结果见表 2。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平							
	1	2	3	4	5	6	7	8
X_1 , mL/g	10	20	30	40	50	60	70	80
X_2 , min	25	45	20	40	15	35	10	30
X_3 , ℃	70	50	30	10	80	60	40	20

表 2 均匀试验设计与结果

Tab 2 Design and results of uniform test

编号	X_1 , mL/g	X_2 , min	X_3 , ℃	Y , %
1	10	25	70	18.64
2	20	45	50	9.85
3	30	20	30	4.86
4	40	40	10	4.14
5	50	15	80	17.14
6	60	35	60	15.93
7	70	10	40	6.18
8	80	30	20	7.60

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 Y 与 X_1 、 X_2 、 X_3 的回归方程为: $Y=5.0309-0.2359X_2+0.0045X_1X_2-0.0021X_1X_3+0.0033X_2X_3+0.0027X_3^2$ ($R=0.992$)。调整后 $R^2=0.946$, $P=0.038<0.05$,表明回归方程拟合度高,且具有统计学意义。各因素对 Y 的影响大小为: X_3^2 ($P=0.030$) $>$ X_1X_2 ($P=0.079$) $>$ X_1X_3 ($P=0.114$) $>$ X_2X_3 ($P=0.159$) $>$ X_2 ($P=0.165$)。 X_1 与 X_2 、 X_1 与 X_3 、 X_2 与 X_3 存在交互作用; X_2 、 X_1X_3 的系数为负值,提示其与 Y 呈负相关; X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_3^2 的系数为正值,提示其与 Y 呈正相关。

将回归方程进行规划求解, Y 值大者为佳,得到附子多糖最优提取条件为液料比 10 mL/g、超声时间 34 min,超声温度 73 ℃,此时 Y 预测值为 19.44%。

2.3 工艺验证

取黑顺片粉末 50 g,精密称定,共 3 份,按上述最优提取工艺条件进行验证试验。得多糖提取率分别为 18.92%、19.08%、19.14%,平均值为 19.05% ($RSD=0.60\%$, $n=3$),与预测值接近,相对误差为 2.0%,提示回归方程预测基本准确,优化后的试验条件可靠,结果重现性好。

2.4 与煎煮法比较

煎煮法方法参考文献[8]。取黑顺片粉末 50 g,精密称定,脱脂后加入 10 倍量的水,煎煮 2 次,每次 2 h;过滤,合并滤液,浓缩至适量,其余按“2.1.2”项下自“加入 4 倍量体积无水乙醇”起操作,按“2.1.5”项下方法测定,测得多糖提取率为 16.42% ($n=3$)。结果表明,超声法提取附子多糖的提取率要高于煎煮法。

3 讨论

超声法是近年来应用于中药有效成分提取分离的较为成熟的技术,主要通过超声波的空化效应、机械效应、热效应等^[13]促进中药有效成分进入溶剂。该方法具有简便、快速、高效、节能等特点。目前,国内外利用超声法提取中药有效成分的报道屡见不鲜,涉及绝大部分中药的多个种类的活性成分,提取方法已收录至多版《中国药典》中,用于制备样品以进行目标成分的鉴定或含量测定。随着科学技术的不断进步和对超声提取工

业化设备的探索研究,循环超声提取机、超声逆流循环提取机已研发成功并适用于挥发性或非挥发性溶剂提取有效成分。中试型超声提取机提取葛根素的研究已见报道,单次可提取葛根0.5 kg^[14]。超声波强化逆流提取机的开发,满足了药材提取物生产的工艺要求,产品品质和生产效益得到大幅度提高,有望应用于工业化生产^[15]。因此,超声法在中药领域具有广阔的应用前景和开发价值。附子多糖的提取目前多采用煎煮或热水浸提,提取时间长(约4 h)。而本试验建立的附子多糖的超声提取法,方法操作简单,不仅提取时间较传统方法缩短80%(34 min vs. 4 h)以上,且提取率较高。

当试验所研究的因素和水平数较多时,均匀试验设计比其他设计法需要更少的试验次数,且能够反映因素之间的交互作用,具有明显的优越性。设计时要求试验点在整个区域内分布均匀,水平范围应尽可能选择更大,得到的结果才具有较好的代表性;若试验范围太小,不容易获得比已有条件有显著改善的结果。本试验采用均匀设计对超声提取附子多糖的工艺条件进行优化,文献中提取植物多糖的液料比多在5~100 mL/g^[16-17],笔者考虑到液料比较小时多糖提取可能不完全,过大时超声波辐射又会被溶剂大量吸收,不但可影响多糖提取率,且易造成浪费,故结合预试验结果,确定液料比为10~80 mL/g。对提取温度的选择,依据均匀设计法的要求,设定相对较大的水平范围为10~80 ℃。结果表明,液料比、超声时间、超声时间3个因素存在交互作用;最优提取条件下,附子多糖的提取率与预测值相符。故本文建立的提取方法准确、可靠,为附子多糖的深入研究和开发利用提供了科学的研究基础。

参考文献

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2005:1670-1674.
[2] 罗学风. 浅谈黑顺片的合理应用[J]. 内蒙古中医药,2014,33(11):48.
[3] 陈思,李武宏,陈啸飞,等. 附子生物碱化学成分和质量控制的研究进展[J]. 药物分析杂志,2014,34(10):1709-1717.

[4] 李发胜,徐恒瑰,李明阳,等. 附子多糖的提取及免疫活性研究[J]. 现代预防医学,2008,35(12):2290-2291.
[5] 高林林,曾升平,潘力拽. 附子多糖诱导肝癌患者外周血树突状细胞分化成熟的实验研究[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(13):882-885,894.
[6] 刘颖,纪超. 附子多糖对SD乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的保护作用及其机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(5):504-507.
[7] 于乐,吴伟康. 附子多糖对胰岛素抵抗脂肪细胞模型GLUT4蛋白表达和转位的影响[J]. 热带医学杂志,2014,14(7):856-858.
[8] 叶强,张丹,郭力. 附子多糖提取纯化工艺研究[J]. 中药与临床,2013,4(2):29-31.
[9] 朱盛林,郑玲利,袁明勇,等. 响应曲面法优化附子多糖的微波提取工艺[J]. 中国医药导报,2015,12(16):48-51.
[10] 舒晓燕,刘慧,梁静,等. 川附子粗多糖提取工艺的研究[J]. 中药材,2006,29(12):1349-1352.
[11] 曹建华,李光辉,张敏. 超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺优化[J]. 中国药房,2015,26(31):4426-4428.
[12] Lin L, Ni B, Lin H, et al. Simultaneous determination of 14 constituents of Radix polygoni multiflori from different geographical areas by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(7): 1048-1055.
[13] 万水昌,王志祥,乐龙,等. 超声提取技术在中药及天然产物提取中的应用[J]. 西北药学杂志,2008,23(1):60-62.
[14] 曾荣华,李金华,刘翠红. 多功能超声波提取机强化提取葛根素的研究[J]. 中国实用医药,2007,2(16):1-2.
[15] 易克传,岳鹏翔,王继先,等. 超声波强化逆流提取机及提取试验[J]. 农业机械学报,2007,38(12):109-112.
[16] 朱智勇. 超声提取白花蛇舌草多糖的工艺研究[J]. 内蒙古中医药,2010,29(14):43.
[17] 胡位荣,孙茹,李昭露,等. 霸王花水溶性多糖提取工艺及其对羟自由基的清除作用[J]. 食品科学,2013,34(14):104-107.

(收稿日期:2016-08-22 修回日期:2016-09-24)

(编辑:刘萍)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅