

# 碱水超声波法提取对叶百部粗多糖的工艺研究<sup>△</sup>

王 昶\*, 陈丽艳, 孙晓雪, 张树明, 魏文峰, 王伟明<sup>△</sup>(黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2695-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.32

**摘要** 目的:优化对叶百部粗多糖提取工艺,提高其提取率及效率。方法:采用蒽酮-硫酸法检测,分别以水及碱水(NaOH溶液)为溶剂,考察煎煮法、超声波法和微波法对对叶百部粗多糖提取率的影响;采用单因素及正交试验,以粗多糖提取率为指标,考察加水量、NaOH溶液浓度、提取温度、提取时间对碱水超声法提取粗多糖的影响,优化其工艺参数并进行验证试验。结果:碱水超声波法优于其他提取方法;其最优工艺参数为加入药材量30倍的0.3 mol/L NaOH水溶液,50℃超声处理70 min;验证试验结果表明粗多糖平均提取率为25.76%(RSD=3.51%,n=6)。结论:优选的碱水超声波法可较好地提取出对叶百部中粗多糖成分。

**关键词** 对叶百部;多糖;碱水超声波法;提取工艺

## Study on Extraction Technology of Polysaccharides from *Stemona tuberosa* by Alkaline Water Ultrasound Method

WANG Chang, CHEN Li-yan, SUN Xiao-xue, ZHANG Shu-ming, WEI Wen-feng, WANG Wei-ming (Heilongjiang Academy of TCM Sciences, Harbin 150036, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize extraction technology of polysaccharides from *Stemona tuberosa* so as to increase the extraction rate and efficiency. METHODS: Anthrone-sulfuric acid method was used for detection. With water and alkaline water (NaOH solution) as the solvent respectively, the effects of decocting method, ultrasound method and microwave method on the extraction rate of crude polysaccharide were observed respectively. By carrying out single factor and orthogonal tests, with the extraction rate of crude polysaccharide as the index, the effects of the amount of water, NaOH solution concentration, extraction temperature and extraction time on the extraction of crude polysaccharide by alkaline water ultrasound method were observed to optimize the technology parameters, and verification test was conducted. RESULTS: The alkaline water ultrasound method is superior to other extraction methods, where the optimal technology parameters were as follows as 0.3 mol/L NaOH aqueous solution 30 times as much as the amount of crud drug, ultrasonic processing for 70 min at 50℃. The verification tests showed that the average extraction rate of crude polysaccharide was 25.76% (RSD=3.51%, n=6). CONCLUSIONS: The optimal alkaline water ultrasound method can better extract crude polysaccharide from *S. tuberosa*.

**KEYWORDS** *Stemona tuberosa*; Polysaccharide; Alkaline water ultrasound method; Extraction technology

对叶百部为百部科植物对叶百部 *Stemona tuberosa* 的干燥块根,具有润肺、下气、止咳、杀虫的功效<sup>[1]</sup>,主要分布在我国南部各省。根据文献检索<sup>[2-3]</sup>,其研究多集中于生物碱类成分,对其中的多糖类成分研究较少。现代研究表明,多糖具有免疫调节、抗病原微生物、抗病毒等诸多药理活性<sup>[4-5]</sup>,故对百部中多糖的研究也逐渐引起重视。笔者在本文中以对叶百部为研究对象,比较不同提取方法下粗多糖的提取率,并对提取效果较优的碱水超声波法进行了单因素工艺参数优化及正交试验研究,以期可为百部多糖的研究提供基础数据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BP211D型分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); CTXNW-10B型超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司); XH-100A型微波提取器(北京祥鹤科技发展有限公司)

△基金项目:国家重大新药创制项目(No.2010ZX09101-104);哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(No.2011RFQYS090)

\*助理研究员,硕士。研究方向:中药化学。E-mail: wangchang89993762@126.com

#通信作者:研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药基础及新药研发。E-mail: zyyjy@163.com

司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

对叶百部(产地广西,采集时间为2012年8月,经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为真品);葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110833-201205,纯度:99.5%);试验中所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取对叶百部药材30 g,加水900 ml,煎煮90 min,滤过,滤液经Sevage法除蛋白3次后作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液 精密称定葡萄糖对照品30 mg,置于50 ml量瓶中,加适量蒸馏水定容至刻度,摇匀,即得。

### 2.2 硫酸-蒽酮法测定多糖含量<sup>[6-7]</sup>

2.2.1 线性关系考察 精密量取对照品溶液1、2、3、4、5 ml,分别置于25 ml量瓶中,加水定容。精密量取此溶液0.5 ml,加4 ml浓硫酸,摇匀,5 min后加2 mg/ml蒽酮溶液1 ml,摇匀,置于100℃水浴加热10 min,取出,速冷至室温后,以水为空白试剂,在波长600 nm处测定各质量浓度溶液的吸光度。以吸光度(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y=11.923x-0.0798$ ( $r=0.9993$ )。结果表明,葡萄糖

检测质量浓度线性范围为0.024 0~0.120 0 mg/ml。

2.2.2 精密度、稳定性、重复性和回收率试验 根据相关方法进行试验。结果,精密度试验吸光度的RSD为1.12%( $n=6$ );稳定性试验中24 h内吸光度的RSD为2.65%( $n=7$ );重复性试验中葡萄糖含量的RSD为3.12%( $n=6$ );加样回收率试验中平均回收率为97.3%(RSD=3.62%, $n=6$ )。上述结果表明,葡萄糖含量测定方法学考察结果符合要求。

### 2.3 不同提取方法下溶剂提取百部粗多糖的比较研究

分别取对叶百部粗粉200 g,精密称定,按表2中的方法进行平行操作3次,取提取液测定多糖含量,计算粗多糖提取率(粗多糖含量×溶液体积/药材量×100%),结果见表1。

表1 不同提取方法下溶剂粗多糖提取率比较( $n=3$ )

Tab 1 Comparison of the extraction rates of crude polysaccharide by different extraction methods and solvents ( $n=3$ )

溶剂	操作方法	粗多糖平均提取率, %	RSD, %
纯水	煎煮(加水6 000 ml,煎煮1 h)	30.68	2.14
	超声波(加水6 000 ml, 50 °C, 超声提取1 h, 功率1 500 W)	20.19	2.36
	微波(加水6 000 ml, 微波提取30 min, 功率1 500 W)	22.52	2.26
碱水(0.3 mol/L NaOH)	煎煮(加水6 000 ml,煎煮1 h)	9.90	2.89
	超声波(加水6 000 ml, 50 °C, 超声提取1 h, 功率1 500 W)	25.88	2.63
	微波(加水6 000 ml, 微波提取30 min, 功率1 500 W)	16.37	2.31

从表1可知,不同提取方法下百部粗多糖的提取率差异较大,其中以纯水作溶剂时煎煮法提取率最高,超声波法提取率较低;以碱水作溶剂时超声波法提取率最高,而煎煮法提取率大幅降低。这表明碱性环境下,加热会破坏多糖的结构,而在相对低温下,加入碱液可有效提高百部粗多糖提取率。根据试验数据并结合实际生产情况分析,碱水超声波提取法具有低温提取、操作方便、能源消耗少等优势,在提取率相近的情况下,生产效率更高,有较好的应用推广价值,故本试验重点对碱水超声波法提取工艺进行系统考察。

### 2.4 碱水超声波法提取百部粗多糖工艺单因素试验

2.4.1 加水量对粗多糖提取率的影响 取对叶百部粗粉200 g,分别加0.3 mol/L的NaOH水溶液2 000、4 000、6 000、8 000、10 000 ml,超声处理60 min,温度50 °C,功率1 500 W,滤过,测定含量。结果,随着加水量的增加,粗多糖提取率随之增加,当加水量为生药质量的30倍(6 000 ml)时,粗多糖提取率为24.91%,至40倍量时提取率为25.22%,50倍量时提取率为25.42%。结果表明加水量为30倍时,再增加水量提取率增加不明显,故确定最优加水量为生药质量的30倍。

2.4.2 溶剂浓度对粗多糖提取率的影响 取对叶百部粗粉200 g,分别加0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L的NaOH水溶液6 000 ml,超声处理60 min,温度50 °C,功率1 500 W,滤过,测定。结果,随着NaOH水溶液浓度的升高,粗多糖提取率呈上升趋势,当NaOH溶液浓度为0.3 mol/L时,粗多糖提取率达到最大值25.26%;其后,再升高NaOH溶液浓度,粗多糖提取率开始下降,当NaOH溶液浓度为0.4 mol/L时,粗多糖提取率为22.92%,0.5 mol/L时粗多糖提取率为21.70%。结果表明多糖成分在较高浓度条件下,出现了结构破坏,导致粗多糖提取率下降,故确定最优NaOH溶液浓度为0.3 mol/L。

2.4.3 温度对粗多糖提取率的影响 取对叶百部粗粉200 g,加0.3 mol/L的NaOH水溶液6 000 ml,超声处理60 min,功率1 500 W,温度分别为30、40、50、60、70 °C,滤过,测定。结果,随着温度的升高,粗多糖提取率随之增加,当温度为50 °C时,粗多糖提取率达到最大值25.46%;而后,随着温度升高,粗多糖提取率开始下降,60 °C时为23.56%,70 °C时为21.78%。结果表明温度升高后多糖结构开始被破坏,提取率下降,故确定最优提取温度为50 °C。

2.4.4 提取时间对粗多糖提取率的影响 取对叶百部粗粉200 g,加0.3 mol/L的NaOH水溶液6 000 ml,分别超声提取30、60、90、120、150 min,温度50 °C,功率1 500 W,滤过,测定。结果,随着提取时间的延长,对叶百部粗多糖提取率呈现先高后低的趋势,提取时间在30~90 min时,粗多糖提取率呈上升趋势,60 min时提取率为25.12%,90 min时提取率为25.23%;而后随着提取时间的延长,粗多糖提取率开始下降,在120 min时提取率为23.02%,150 min时提取率为21.03%。结果表明在碱性环境下,由于长时间的提取,多糖结构受到破坏而导致提取率下降。从数据趋势分析,粗多糖提取率达到最大值的提取时间应在60~90 min,故综合提取率及效率考虑,确定最优提取时间为70 min。

### 2.5 碱水超声波法提取百部粗多糖工艺正交试验

在上述单因素试验所确定的工艺参数下,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进一步对工艺参数进行优化,水平设计以单因素试验所确定的最优工艺参数为基准。因素与水平见表2;正交试验安排与结果见表3;方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A(加水量,倍)	B(溶剂浓度,mol/L)	C(提取温度,°C)	D(提取时间,h)
1	25	0.25	45	65
2	30	0.3	50	70
3	35	0.35	55	75

表3 正交试验安排与结果

Tab 3 Arrangement and results of orthogonal test

试验号	因素				粗多糖提取率, %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	23.22
2	1	2	2	2	24.84
3	1	3	3	3	24.03
4	2	1	2	3	24.67
5	2	2	3	1	25.58
6	2	3	1	2	24.72
7	3	1	3	2	24.61
8	3	2	1	3	24.88
9	3	3	2	1	24.94
$K_1$	24.030	24.167	24.273	24.580	
$K_2$	24.990	25.100	24.817	24.723	
$K_3$	24.810	24.563	24.740	24.527	
R	0.960	0.933	0.544	0.196	

结果表明,各因素对粗多糖提取率影响程度大小依次为加水量(A)、溶剂浓度(B)、提取温度(C)、提取时间(D),确定最优工艺参数为 $A_3B_2C_2D_2$ ,即加水量为30倍,NaOH水溶液浓度为0.3 mol/L,提取温度为50 °C,提取时间为70 min。此结果

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	F	P
A	1.562	2	25.194	<0.05
B	1.316	2	21.226	<0.05
C	0.519	2	8.371	
D	0.062	2	1.000	

注:  $F_{0.05}(2,2)=19.00$ ;  $F_{0.01}(2,2)=99.00$

Note:  $F_{0.05}(2,2)=19.00$ ;  $F_{0.01}(2,2)=99.00$

与单因素试验结果基本一致。

### 2.6 碱水超声波法提取百部粗多糖工艺验证

取对叶百部粗粉共6份,每份200g,按上述最优工艺进行粗多糖提取,即加0.3 mol/L的NaOH水溶液6 000 ml,超声提取70 min,温度50℃,功率1 500 W。提取滤过后测定并计算粗多糖提取率,结果分别为26.41%、25.28%、24.31%、26.82%、25.55%、26.18%,平均值为25.76%(RSD=3.51%, $n=6$ )。这表明优选的方法可较好地提取对叶百部中的粗多糖成分。

## 3 讨论

近年来,国际上对糖及糖复合物的研究较多,大量实验<sup>[4]</sup>揭示,糖类是一种重要的信息分子,参与多种生理和病理过程。到目前为止,已有300余种多糖类化合物从天然产物中被分离出来,其中从中草药、食药菌中提取的水溶性多糖最为重要<sup>[4-5]</sup>。而对百部的研究目前多集中于生物碱类成分上<sup>[2-3]</sup>。近年来,部分研究人员在对百部中的芪类化合物、多氢菲类化合物等非碱性成分的研究上也取得了可喜的进展<sup>[6]</sup>,但对于百部多糖的研究尚属起步阶段。有研究表明,以多糖为主的百部流浸膏对多种免疫功能具有促进作用<sup>[9]</sup>,同时在抗氧化作用方面,百部多糖也发挥出较好的活性<sup>[10]</sup>,表明百部多糖也是百部中重要的活性物质。百部最早收载于《名医别录》<sup>[11]</sup>,其中记载了其重要的润肺功效,但目前并未对此给予系统的药理学上的阐释,而在部分常用润肺中药及食物中,如黑木耳、银耳、虫草、麦冬等,多糖均为其主要活性成分,故多糖作为百部中含量较高的有效成分,是否在润肺中发挥了一定作用值得进一步研究。

多糖的提取方法较多,但如何在提高多糖提取效率的同时,有效保护多糖免遭破坏一直是探究的方向。本试验采用低温碱水超声波法对对叶百部粗多糖进行提取,通过优化工艺参数,有效提高了百部粗多糖的提取率及生产效率。试验中为避免长时间超声后水温升高致使试验数据误差增加的问题,采用事先将一部分溶剂约200~500 ml放置于冰箱中低温冷藏备用,当提取温度超过设定值时将其加入以控制温度的方法。由于这部分溶剂比例较小,最终又加入到提取液中,所

以对提取后数据影响较小。同时,考虑到多糖在碱液中可能会发生水解,故笔者曾采用半透膜法进行了本法与传统水提法的比较,结果表明多糖的含量变化并无统计学意义,表明在较低温度下,百部多糖结构得到了较好的保护,在碱液中并未发生水解现象。

在实际生产中,煎煮法提取一般采用提取罐,用蒸汽加热,故能源消耗较大;同时生产工艺受锅炉蒸汽产出量的影响,从而制约了其生产工序。而超声波提取能源消耗低、工艺独立性好、其他因素干扰小,在提取率接近的情况下,其生产效率优势较明显。当今中药提取技术发展较快,随着大型超声波设备在提取中的应用,此方法在大工业生产中会逐渐发挥出优势,故具有较好的推广价值。

## 参考文献

- [1] 张雷,邱乾栋,张晓林,等.中国百部属植物的研究进展[J].北方园艺,2009(4):105.
- [2] 张亚中,薛玉梅,陶建生.百部生物碱的研究现状和思考[J].中成药,2008,30(2):248.
- [3] Gerger H. Structural relationships, distribution and biological activities of stemona alkaloids[J]. *Planta Med*, 2006, 72(2):99.
- [4] 吴镒,张辉.多糖的研究进展[J].中国老年学杂志,2009, 29(23):3 157.
- [5] 刘贤铭.植物多糖的抗肿瘤作用研究[J].中国药房,2005, 16(19):1 502.
- [6] 王黎明,夏文水.蒽酮-硫酸法测定茶多糖含量的研究[J].食品科学,2005,26(7):185.
- [7] 刘晓涵,陈永刚,林励,等.蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J].食品科技,2009,34(9): 270.
- [8] Lin LG, Yang XZ, Tang CP, et al. Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemona tuberosa*[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(2):457.
- [9] 金岩.百部流浸膏对环磷酰胺模型小鼠的免疫调节作用[D].沈阳:辽宁中医学院,2003:7.
- [10] 姜登钊,吴家忠,李辉敏.对叶百部多糖的提取及其抗氧化活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(6):1 467.
- [11] 梁·陶弘景.《名医别录》辑校本[M].北京:中国中医药出版社,2013:125.

(收稿日期:2014-09-09 修回日期:2014-11-27)

(编辑:刘萍)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅