

正交法优化党参多糖提取工艺的研究

胡玲玲, 吴佳财

(安康学院 化学化工学院, 陕西 安康 725000)

摘要:目的:优化传统方法提取党参多糖的提取工艺。方法:利用水提-醇沉法对党参多糖进行提取,采用苯酚-硫酸法测定党参多糖的含量,计算提取率。通过单因素实验,采取三因素正交分析法优化传统方法提取党参多糖的工艺。结果:水提-醇沉法提取党参多糖的最优条件为:液料比 25:1(ml:g)、80℃下,回流提取时间 2h。在此提取方案下党参多糖提取率均值可达到为 15.678%。结论:此提取工艺操作简单,用水做提取溶剂更为经济,有利于较大规模生产,为党参的开发利用提供了理论依据。

关键词:党参多糖;提取得率;紫外分光光度法;正交分析法

党参(*Codonopsis pilosula*),为《中国药典》收载的一味药食同源(卫健委发布(2018)版药食同源目录)、价值较高的常用中草药,由桔梗科的党参、川党参等植物的根干燥而得。具有补气生津,补脾益肺的功效^[1]。党参具有多种对人体有益的活性成分,能抗溃疡、抗辐射、增强人体免疫力的作用^[2,3]。党参多糖是党参的有效活性成分之一,多糖含量的高低能直接反映药材质量的优劣。党参多糖提取的传统方法主要有为:水提-醇沉法;以及近年来发展的实验室使用较多的超声波辅助提法,微波法,酶法,亚临界法等^[4,5],对设备要求较高。本文拟采用传统的水提-醇沉法,对党参多糖进行提取,并以提取得率为评价提取方案的指标,结合三因素正交分析法优化党参多糖的提取工艺。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

实验所需主要仪器及试剂见表 1、表 2。

1.2 实验方法

1.2.1 党参中党参多糖的提取 将干燥的党参洗涤去杂、干燥处理后,切碎,用中草药粉碎机粉碎,过 24 目筛,将党参粉末加入 95%乙醇加热回流 2 小时进行脱脂,趁热抽滤,滤饼冷冻干燥,制成党参粉末供试品。取 1 g 的党参供试品粉末于 100 mL 圆底烧瓶,按不同的料液比加入蒸馏水,在设定的温度下,水浴回流一段时间,趁热抽滤,浓缩液体,加入 20 mL 无水乙醇,4℃下静置 24 h,党参多糖沉淀完全,抽滤,并用乙醇、丙酮洗涤,冷冻干燥得到党参多糖冻干品^[6,7]。

表 1 实验仪器及设备

实验仪器	型号	厂家
紫外可见分光光度计	L5S	上海仪电分析仪器有限公司
中草药粉碎机	FW177	天津市泰斯特仪器有限公司
电热恒温水浴锅	HH-2 型	上海科伟永兴仪器有限公司
台式冷冻干燥机	FD-1A-80	上海予腾生物科技有限公司
电子分析天平	AE224	上海舜宇恒平仪器有限公司

表 2 实验试剂

实验仪器	型号	厂家
党参	500g	购于安康市药材公司
无水乙醇	AR	天津市天力化学试剂有限公司
苯酚	AR	天津市东丽区新中村西王药业有限公司
无水葡萄糖	AR	天津市东丽区新中村西王药业有限公司

1.2.2 党参中党参多糖含量的测定

1.2.2.1 标准曲线的绘制 用电子分析天平称取在 105℃干燥至恒重的葡萄糖粉末 25 mg,溶解后,转移至 250 mL 的容量瓶定容,配制成的葡萄糖溶液的浓度为 100 mg·L⁻¹。用吸量管分别移取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20 mL 的 0.1 mg·mL⁻¹ 溶液于 10 mL 具塞比色管中,加去离子水至 2 mL。再分别加入 6% 的苯酚 1.0

收稿日期:2020-06-05 修回日期:2020-07-25

第一作者简介:胡玲玲(1977-)女,陕西汉中,实验师 主要从事化学分析工作。

mL,浓硫酸 6 mL,静置 5 min,90℃水浴加热 10 min,立即冷冻至室温。紫外分光光度计在波长 300~800 nm 范围内扫描,波长在 490 nm 处有最大吸光度。因此,在波长 490 nm 处测定多糖的吸光度^[8~10]。分别以吸光度和浓度为纵、横坐标,得到回归方程 $y=4.0114x+0.0989$; $R^2=0.9997$ 。标准曲线在浓度为 10~60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内线性关系良好。

1.2.2.2 党参提取液中党参多糖的测定
将 1.2.1 提取的党参多糖冻干品,用去离子水摇匀定容至 250 mL,吸量管移取 2 mL 于 25 mL 的容量瓶中,加水至刻度线处。再从中取出 1 mL 溶液于比色管中加水定容至 2 mL,加入 6% 的苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 6 mL,静置 5 min,90℃水浴加热 10 min,用紫外分光光度计测其吸光度并计算出党参多糖的提取得率。

$$\text{多糖提取率}(\%) = \frac{c \times 250 \times n}{m \times 1000} \times 100\%$$

式中:C 为由标准曲线方程所得党参多糖浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$);n 为稀释倍数;m 为粉葛粉末的质量(g)。

2 实验结果与分析

2.1 单因素实验

称取供试党参粉末每份 1 g,按 1.2.1 的提取方法进行提取试验,在其他条件固定不变的情况下,分别考察料液比($\text{mL}:\text{g}$)、回流提取时间(h)、回流温度(℃),以及提取次数等因素对提取得率的影响。

2.2 党参多糖提取条件的正交设计

由文献和前期的单因素实验的情况^[11],选择液料比($\text{mL}:\text{g}$)、多糖提取时间(h)和提取温度(℃)三个因素,各个因素设置三个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验分析^[12,13],因素和水平值见表 3。

表 3 党参多糖提取实验因素水平

水平	因素		
	A 液料比 /($\text{mL}:\text{g}$)	B 提取时间 /h	C 提取温度 /℃
1	15	1	60
2	20	1.5	70
3	25	2	80

按照 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验,结合 1.2. 的方法对党参多糖进行提取并计算提取率,实验结果及分析见表 4 和表 5。

表 4 党参多糖提取正交实验及结构

因素列号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	11.04
2	1	2	2	2	11.32
3	1	3	3	3	11.48
4	2	1	2	3	11.97
5	2	2	3	1	12.71
6	2	3	1	2	12.68
7	3	1	3	2	12.04
8	3	2	1	3	12.41
9	3	3	2	1	12.59
K1	11.280	11.683	12.043	12.113	
K2	12.453	12.147	11.960	12.013	
K3	12.374	12.250	12.077	11.953	
R	1.173	0.567	0.117	0.160	
S	2.526	0.546	0.022	0.0039	

注:D 为空白项

表 5 党参多糖正交实验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	2.526	2	1.263	211.00	**
B	0.546	2	0.273	45.833	
* C	0.022	2	0.011	2.667	
误差	0.04	2	0.02		

注; $F(2,2)_{0.05}=19, F(2,2)_{0.01}=99$

由极差(R 值)可知,对党参多糖提取得率的影响因素中,A(液料比)影响最大、B(提取时间)

次之、C(提取温度)影响较小;且 $A_2 > A_3 > A_1$ 、 $B_3 > B_2 > B_1$ 、 $C_3 > C_1 > C_2$,所以党参多糖提取最佳

操作方案为 $A_2B_3C_3$, 由表 5 的正交实验方差分析表中的 F 值也可得出, A 因素(液料比): $FA > F_{0.01}$, B 因素(提取时间): $F_{0.05} < FB < F_{0.01}$ 即液料比和提取时间对提取得率影响显著, 而 C 因素(提取温度)对提取得率无显著影响。传统的水提一醇沉法提取党参多糖的最优方案为: $A_2B_3C_3$, 即加入党参粉末质量 20 倍的蒸馏水, 在 80°C 的条件下回流 2 h。

2.3 重复性实验

由于正交设计中的实验没有 $A_2B_3C_3$ 此方案, 因此需要进行重复性实验来验证优选出的最佳方案的是否可信。称取党参粉末 3 份, 按照优选出的方案进行提取并计算提取率。结果见表 6。

表 6 党参多糖提取的重复性实验

党参粉末/g	提取得率/%	平均值	RSD/%
1.0	12.69		
1.5	12.57	12.66	0.60
2.0	12.71		

表 6 结果显示, 在此最佳方案下提取党参多糖, 提取率分别为 12.69%, 12.57% 和 12.71%, 平均提取率为 12.66%, 与正交设计中的方案 6 的提取得率接近, 且 RSD/% 仅为 0.60%, 说明优选出的提取方案($A_2B_3C_3$, 即加入党参粉末质量 20 倍的蒸馏水, 在 80°C 的条件下回流 2 h。)合理, 可行。

3 讨论

实验采用了传统方法提取党参多糖, 即水提一醇沉法, 通过查阅资料及前期预实验, 选用液料比、提取时间和提取温度三个因素, 结合 $L_9(3^4)$ 正交表分析法对党参多糖提取方案进行优化, 优选出的最佳的提取方案为液料比 20:1 (mL:g), 提取回流温度 80°C , 回流提取时间为 2 h。在此

提取线路下, 党参多糖的提取率较高, 最大值均值为 12.66%。该提取线路简单易操作, 可以为党参多糖开发提供理论依据。

参 考 文 献:

- [1] 李启艳, 祝清芬, 刘春霖党参多糖分离纯化及氧化活性研究[J]. 中草药, 2017, 48(05): 907-912.
- [2] 杨瑾, 刘杰书, 袁德培. 版桥党参多糖体内抗肿瘤活性实验研究[J]. 中国处方药, 2014, 12(03): 25-26.
- [3] 晏永新, 张丽, 贾海芳, 等. 党参多糖口服液对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(03): 18-20.
- [4] 朱斌, 曾森, 刘林, 等. 党参中水溶性多糖研究进展. 安徽农业科学, 2016, 44(19): 109-110, 118.
- [5] 樊志强. 党参多糖提取工艺研究进展[J]. 农业科技与装备, 2018(06): 33-34.
- [6] 梁乙川, 潘欢欢, 吴清芳, 等. 中药材多糖的提取、分离纯化研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(08): 1774-1777.
- [7] 宋艺君, 郭涛. 党参多糖提取纯化工工艺的研[J]. 现代中医药, 2010, 30(03): 77-78.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化技术 2 版[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 11-12.
- [9] 邱晓, 宫晓庆, 李学涛, 等. 党参总多糖提取工艺优化及其对胃癌 BGC-823 细胞的抑制作用考察[J]. 中医药导报, 2019, 25(03): 74-79.
- [10] 武新亮, 王宏军, 白子霞, 等. 响应面法优化川党参多糖的提取工艺研究[J]. 天津中医药, 2015, 32(07): 432-436.
- [11] 李启艳, 胡德福, 张雪梅. 党参多糖提取纯化工工艺优化及其组成研究[J]. 中草药, 2016, 47(15): 2663-2667.
- [12] 邓镇涛, 向灿辉, 孙志勇, 等. 正交法优选党参粗多糖水提工艺[J]. 食品工程, 2009(04): 22-24.
- [13] 胡玲玲正交法优选木贼山奈素水接条件的研究[J]. 陕西农业科学, 2017, 65(11): 24-26.
- [14] Sugai E, Morimitsu Y, Iwasaki Y, et al. Pungent qualities of sanshool-related compounds evaluated by a sensory test and activation of rat TRPV1[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005, 69(10): 1951-1957.
- [15] Sugai E, Morimitsu Y, Kubota K. Quantitative analysis of sanshool compounds in Japanese pepper (*Xanthoxylum piperitum* DC.) and their pungent characteristics[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005, 69(10): 1958-1962.
- [16] 杨瑞丽. 不同处理和贮藏条件对花椒及其制品麻味物质稳定性影响的研究[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2018.
- [10] 刘福权, 巫碧清, 赵志峰, 等. 花椒中典型酰胺类物质的提取工艺优化研究[J]. 中国调味品报, 2017, 42(08): 25-29.
- [11] 崔美玉, 赵云丽, 王婷, 等. RP-HPLC 法同时测定花椒提取物中 3 种山椒素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(04): 272-275.
- [12] 杨清山, 翟彦伟, 栗星, 等. 花椒及其提取物中花椒麻素的 HPLC 测定方法杨[J]. 食品工业, 2019, 40(08): 328-332.
- [13] 徐建平, 蔡锦源, 李林轩, 等. 总评归一值法优选山豆根茎多糖的微波预处理-超声波提取工艺及生物活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(07): 187-192.