

## 正交试验优化超声法提取北苍术多糖的工艺研究

孟利娜, 许 静, 南 楠, 段 殷, 宋晓娇, 周 晶\*

天津医科大学 药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

**摘要:** 目的 优化北苍术多糖的超声提取工艺。方法 利用超声波提取北苍术根茎中的多糖, 以提取物得率和多糖提取率为指标, 在单因素试验的基础上, 采用 4 个因素(超声时间、料液比、超声温度、乙醇用量) 3 个水平的  $L_9(3^4)$  正交试验优选超声提取工艺条件, 并采用苯酚-浓硫酸法测定多糖。结果 北苍术多糖的最佳提取工艺条件为: 料液比 1:20、提取温度 60 °C、超声提取 40 min、浓缩后加入 4 倍量乙醇进行醇沉。在该实验条件下, 苍术水提物得率为 23.16%, 多糖提取率为 11.23%。结论 超声法提取苍术中多糖简便快捷, 多糖提取率高, 为北苍术多糖的开发利用提供了参考。

**关键词:** 北苍术; 多糖; 超声提取; 正交试验

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2012)05-0457-04

## Optimization of ultrasonic extraction process for polysaccharide from *Atractylodes chinensis* by orthogonal test

MENG Li-na, XU Jing, NAN-nan, DUAN Yin, SONG Xiao-jiao, ZHOU Jing

Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

**Abstract: Objective** To optimize the extraction technology of polysaccharide from *Atractylodes chinensis* using ultrasonic extraction method by orthogonal test. **Methods** Polysaccharide was extracted from *A. chinensis* by ultrasonic-assisted extraction method. The yield of crude polysaccharide of *A. chinensis* and extraction rate of polysaccharide were taken as indices. Based on single-factor experiment, the ultrasonic-assisted extraction technology of polysaccharide from *A. chinensis* was optimized by  $L_9(3^4)$  orthogonal test. The phenol-sulphuric acid method was applied for the determination of polysaccharide. **Results** The optimal extraction conditions of polysaccharide from *A. chinensis* were as follows: the solid-liquid ratio was 1:20; the extraction temperature was 60 °C; the extraction time was 40 min and alcohol volume was 4 times of the medicinal materials. Under the conditions, the yield crude polysaccharide and the purity of polysaccharide were 23.16% and 11.23%, respectively. **Conclusion** Ultrasonic extraction has the advantages of short time, simple operation, and higher extract rate, which could provide the reference for development and utilization of *A. chinensis*.

**Key words:** *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz.; polysaccharide; ultrasonic extraction; orthogonal test

北苍术为菊科植物北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎, 为《中国药典》2010 年版收载的苍术药材之一, 主产于东北、华北等地, 性味辛、苦、温, 归脾、胃经, 具有健脾、燥湿、解郁、辟秽之功效<sup>[1]</sup>。对苍术的研究多集中在挥发性成分的化学和药理研究<sup>[2-5]</sup>, 但药理实验研究表明茅苍术中的水溶性多糖具有降血糖作用<sup>[4]</sup>, 其水提液

具有促进肝脏蛋白质合成和胆汁分泌的作用<sup>[6]</sup>。因此本研究采用超声提取方法, 选取料液比、超声时间、超声温度及醇沉用量 4 个因素, 在单因素试验的基础上, 采用  $L_9(3^4)$  正交实验对北苍术中水溶性多糖进行最佳提取工艺优化, 以期为进一步开展北苍术的活性研究与临床应用提供实验依据。

### 1 仪器与材料

收稿日期: 2012-07-10

基金项目: 天津市科技攻关项目 (06YFGPSH02900)

作者简介: 孟利娜 (1985—), 女, 河北省邯郸市鸡泽县人, 天津医科大学 2010 级硕士研究生, 2010 年毕业于哈尔滨医科大学, 研究方向为天然药物化学。Tel: 13821063537 E-mail: mln19850709@163.com

\*通讯作者 周 晶, 教授, 天津医科大学药学院药化教研室主任。Tel: 13920680193 E-mail: zhoujing@tjmu.edu.cn

日本日立 U—3310 紫外可见分光光度计；超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；FA2004N 电子分析天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）。

葡萄糖对照品（中国药品生物制品检定所，批号 20101125）；北苍术由河北省安国市同利中药材有限公司提供，天津医科大学生药教研室周晔教授鉴定符合《中国药典》2010 年版一部要求；丙酮、石油醚、乙醇、乙醚、苯酚、浓硫酸等试剂（分析纯，天津基准化学试剂有限公司）。

2 方法与结果

2.1 多糖的测定

2.1.1 标准曲线的绘制<sup>[7]</sup> 精密称定 105 °C 干燥至恒定质量的葡萄糖对照品 10 mg，蒸馏水定容至 100 mL，摇匀，即得 0.1 mg/mL 葡萄糖对照品溶液。精密吸取该溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL，置于 10 mL 干燥具塞试管中，以蒸馏水补足至 0.5 mL，分别精密加入 5% 苯酚溶液 0.5 mL，混匀，加入浓硫酸 3 mL，剧烈振摇使其混匀，30 °C 水浴加热反应 30 min。以未加供试品的溶液为参比，在 485 nm 处测定吸光度值。通过对数据进行线性回归，得到回归方程  $Y=7.420 0 X-0.009 4$ ， $R^2=0.998 6$ ，表明葡萄糖在 0.02~0.10 mg/mL 与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.2 样品溶液制备 精密称取 40 目北苍术 100 g，加入 400 mL 石油醚(60~90 °C)，加热回流 4 h，趁热抽滤，药渣挥干石油醚，用 400 mL 无水乙醇回流 2 h，挥干乙醇，干燥得脱脂北苍术药材，脱脂后药材得率为 80.12%。称取脱脂北苍术药材 5 g，加入 10 倍量蒸馏水，40 °C 条件下超声 40 min，提取 2 次，合并滤液，8 层纱布滤过，滤液经布氏漏斗抽滤、减压浓缩至 10 mL，缓慢加入 4 倍量 95% 乙醇，析出絮状沉淀，4 °C 条件下放置过夜，抽滤，沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次，于 40 °C 真空干燥至恒定质量，得苍术粗多糖。精密称取苍术粗多糖约 5.0 mg，蒸馏水定容至 50 mL，摇匀，即得苍术多糖样品溶液。

2.1.3 样品测定 取苍术脱脂药材 5 g，按照“2.1.2”项下方法制备样品溶液。精密取粗多糖溶液 0.5 mL，精密加入 5% 苯酚溶液 0.5 mL，操作同“2.1.1”项，测定吸光度值，由回归方程计算多糖的质量分数。换算因子  $f=W/(C \times D)$ ，式中  $C$  为多糖溶液中葡萄糖的质量浓度， $D$  为多糖稀释倍数， $W$  为苍术粗多糖质量。

$$\text{水提物得率} = (\text{水提浓缩物的质量} / \text{药材的质量}) / 80.12\%$$

$$\text{多糖提取率} = CDf / (W_1 \times 1000) \times 100\%$$

其中  $W_1$  为苍术药材的质量， $f$  为换算因子，80.12% 为药材脱脂后的产率

2.2 单因素条件的筛选

2.2.1 超声时间对多糖提取的影响 精密称取脱脂北苍术药材粉末 5 g，平行 2 份，分别加入 10 倍体积的蒸馏水，40 °C 条件下分别超声 20、40、60、80 min，制备样品溶液。精密取粗多糖溶液 0.5 mL，加入 5% 苯酚溶液 0.5 mL，操作同“2.1.1”项，测定吸光度值，由回归方程计算多糖的质量分数。结果见图 1。结果表明，超声提取 40 min，其水提物得率和多糖提取率均较高，所以选择超声 40 min 进行其他单因素的筛选。

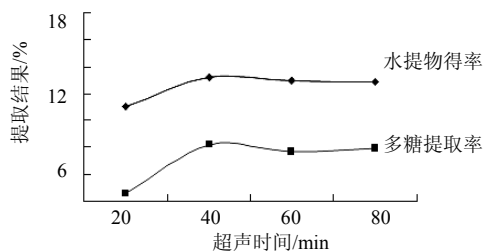


图 1 超声时间对多糖提取的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic extraction time on polysaccharides extraction

2.2.2 料液比对多糖提取的影响 精密称取脱脂北苍术 5 g，40 °C 条件下超声 40 min，分别加入药材质量 10、15、20、25 倍的蒸馏水，操作同 2.2.1 项下，结果见图 2。结果表明料液比为 1:15 之前，苍术多糖提取率随料液比的增大而明显提高，之后便无明显变化。因此，料液比以 1:15 为宜。

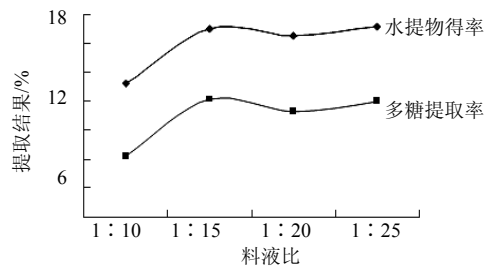


图 2 料液比对多糖提取的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio on polysaccharides extraction

2.2.3 乙醇用量对多糖提取的影响 精密称取脱脂北苍术 5 g，依据“2.2.2”结果，加入药材质量 15

倍的蒸馏水, 40 °C 超声 40 min, 操作同“2.2.1”项, 分别加入 2、3、4、5 倍量的乙醇进行沉淀, 结果见图 3。结果表明, 当加入 4 倍量乙醇时, 水提物得率 and 多糖提取率均较高, 大于 4 倍量时, 多糖提取率反而有所下降, 因此加入 4 倍量乙醇最佳。

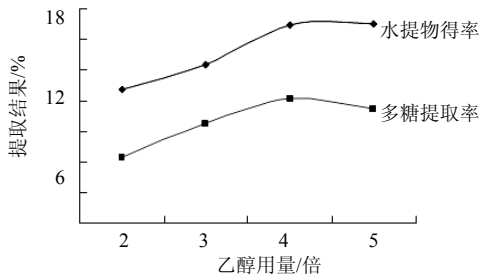


图 3 乙醇用量对多糖提取的影响

Fig. 3 Effects of alcohol volume on polysaccharides extraction

**2.2.4 超声温度对多糖提取的影响** 精密称取脱脂北苍术 5 g, 加入 15 倍药材重量的蒸馏水, 分别在 20、40、60、70、80 °C 条件下超声 40 min, 操作同“2.2.1”项, 结果见图 4。结果表明在 40~60 °C 时, 水提物得率和多糖提取率都相对较高。温度高于 60 °C 时, 水提物得率有所增加, 多糖提取率反而下降, 综合考虑认为 60 °C 时对多糖的提取较好。

**2.3 正交设计优选条件**

**2.3.1 因素和水平的确定** 根据单因素试验结果, 选取超声时间 (A)、料液比 (B)、乙醇用量 (C) 和超

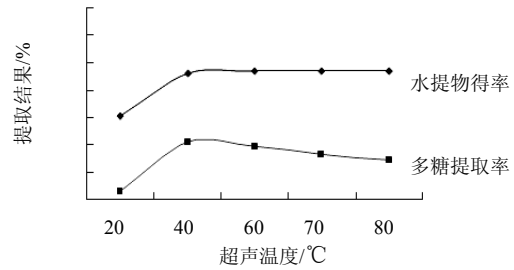


图 4 超声温度对多糖提取的影响

Fig. 4 Effects of ultrasonic temperature on polysaccharides extraction

声温度 (D) 4 个因素, 每个因素 3 个水平, 见表 1。

表 1 因素和水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A/min	B	C/倍	D/°C
1	20	1 : 10	3	40
2	40	1 : 15	4	60
3	60	1 : 20	5	70

**2.3.2 正交试验结果及方差分析** 精密称取脱脂北苍术 5 g, 分别按  $L_9(3^4)$  正交设计表设定的条件进行超声提取, 操作同 2.2.1 项下, 以水提物得率和多糖提取率为指标, 结果见表 2。方差分析结果见表 3。评分时将水提物得率和多糖提取率的权重系数分别设为 0.4、0.6, 以综合评分 (综合评分 = 水提浓缩物得率  $\times$  0.4 + 多糖提取率  $\times$  0.6) 进行统计分析。

表 2 正交试验方案与结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	水提物得率/%	多糖提取率/%	综合评分
1	20	1:10	3	40	9.95	5.267	7.140
2	20	1:15	4	60	14.36	7.002	9.944
3	20	1:20	5	70	16.38	9.319	12.140
4	40	1:10	4	70	14.43	6.828	9.868
5	40	1:15	5	40	16.09	7.650	11.030
6	40	1:20	3	60	15.87	9.969	12.330
7	60	1:10	5	60	14.78	6.801	9.992
8	60	1:15	3	70	13.45	6.598	9.339
9	60	1:20	4	40	16.53	9.510	12.320
$k_1$	9.74	9.00	9.60	10.16			
$k_2$	11.07	10.10	10.71	10.76			
$k_3$	10.55	12.26	11.05	10.45			
R	1.33	3.26	1.45	0.60			

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素	离差平方和	自由度	均方差	F	P
A	2.699	2	1.349	5.095	0.164
B	16.530	2	8.265	31.210	0.031
C	3.452	2	1.726	6.518	0.133
D	0.530	2	0.265		—

$F_{0.05}(2,2)=19.00$

从直观分析可知,各因素对综合评分的影响程度大小为 B(料液比) > C(乙醇用量) > A(超声时间) > D(超声温度),初步认为工艺条件最佳组合为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>。方差分析结果表明料液比对综合评分的影响具有显著性 ( $P < 0.05$ ), A、C、D 因素的影响均无显著性 ( $P > 0.05$ )。综合分析上述结果,确定最佳提取工艺条件是:料液比为 1:20, 60 °C 条件下超声 40 min, 4 倍量乙醇进行醇沉。

**2.3.3 验证试验** 精密称取 40 目北苍术 50 g,按优选工艺条件进行试验,同时做回流法提取苍术多糖对比试验,加入 20 倍药材质量的水,回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,其余操作同“2.1.1”项,结果见表 4。可知超声提取 40 min 比水回流提取 2 h 多糖提取率提高 22.24%,且重现性好。

表 4 验证试验结果

Table 4 Results of verification test

方法	水提取物		多糖	
	得率/%	RSD/%	提取率/%	RSD/%
水超声提取	18.56	0.53	8.997	1.54
水回流提取	14.48	1.00	7.327	0.47

### 3 讨论

超声波提取技术是利用超声波产生的强烈振动、高加速度、强烈空化效应、热效应、搅拌作用等加速药物有效成分进入溶剂,从而提高提取效率<sup>[8]</sup>。与常规渗漉法和回流提取法相比,超声波技术因具有成本低、安全、操作简单、低温和无污染等一系列优点,近年来越来越多地被用于天然产物的提取<sup>[9-10]</sup>。本实验通过对北苍术多糖的超声提取工艺进行优化,该优化后的超声提取方法比水回流法多糖收率提高了 22.24%,其时间为回流法的

1/3,温度比回流法低了近 50 °C,该方法更突出地显示提取时间短、温度低的特点,可以大幅度地降低能耗与成本,不失为工业生产提取苍术多糖的一种可选方法。

苯酚-浓硫酸法广泛用于多糖的测定<sup>[11-12]</sup>,由于苯酚具有还原性,很容易被氧化成醌而变成粉色,因此实验中使用的苯酚必须经过重蒸处理。同时需注意苯酚的浓度不宜太高,否则反应的稳定性不好且易产生操作误差。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 150-151.
- [2] Guo F Q, Huang L F. Comparison of the volatile compounds of *Atractylodes* medicinal plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 570: 73-78.
- [3] 赵爱梅. 苍术的药理作用研究 [J]. 光明中医, 2009, 24(1): 181-182.
- [4] 段国峰, 欧阳臻, 樊一桥, 等. 茅苍术多糖防治小鼠高血糖的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(6): 1211-1212.
- [5] 李霞, 杨静玉, 孟大利, 等. 麸炒北苍术挥发油成分的分析及镇痛活性的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 886-887.
- [6] 董海燕, 邵敬伟, 王涛, 等. 四种抗癌中药提取物对大鼠肝 CYP3A 酶活性及 mRNA 表达的影响 [J]. 中药材, 2008, 31(1): 68-71.
- [7] 杨勇杰, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 苯酚-硫酸法测定杂多糖含量的研究 [J]. 中成药, 2005, 27(6): 706-708.
- [8] 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.
- [9] Wu J Y, Lin L D, Chau F T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells [J]. *Ultrason Sonochem*, 2001, 8: 347-352.
- [10] 王佩琪, 郭伟英, 王轶晶, 等. 超声提取大黄游离蒽醌的研究 [J]. 中成药, 2004, 26(7): 592-593.
- [11] 王海侠, 吴云, 时维静, 等. 白茅根多糖的提取与含量测定 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(2): 55-57.
- [12] 刘涛, 尼玛卓玛, 尼珍, 等. 苯酚-浓硫酸法测定西藏天麻中多糖含量的条件优化 [J]. 广东农业科学, 2011, 8: 132-134.