

从 340~ 520 nm扫描,其最大吸收峰位于 415 nm,与文献报道相同^[2]。

4.5 标准曲线的制备:精密吸取对照液 0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL分别置分液漏斗中,各加氯仿至 20 mL,再加入 10 mL pH(6.0±0.1)溴甲酚绿溶液充分振摇,静置 1 h,氯仿层滤于 25 mL量瓶中,并加氯仿至刻度,于 415 nm处以不加对照品管为空白,测定吸光度,求得回归方程 $Y=1.1783X-0.0442$, $r=0.9987$,乌头碱含量在 0.1648~0.4944 mg 其吸光度与乌头碱的量呈良好的线性关系。

4.6 回收率试验:精密量取双乌止痛酊约 2.5 mL,加入乌头碱对照品约 1.2 mg,精密称定,按供试品溶液的制备及含量测定方法测定,结果平均回收率为 97.19%, $RSD=1.3\%$ ($n=3$)。

4.7 样品总生物碱含量测定:精密量取对照液、供试品溶液与阴性对照品液各 20 mL,分别置分液漏斗,4.5项下“各加……”依法操作,以阴性对照为空白,测定吸光度,结果见表 1。

表 1 双乌止痛酊中乌头碱的含量测定 ($n=5$)

批 号	乌头碱 (mg/mL)	RSD (%)
1	0.295	3.12
2	0.267	2.45
3	0.272	1.67

5 讨论

5.1 本品中含有制川乌、制草乌,其生药含量为 20%,按每次用量 2~3 mL计,一日用量约 10 mL,相当生药 2 g,与该药的内服剂量相当(1.5~3 g)。

生川乌、生草乌中的毒性成分是乌头碱,人口服的中毒剂量 3~5 mg,生药中含量分别为 0.423%、0.599%,但经炮炙后,水解成苯甲酰乌头原碱和乌头原碱,其毒性大大下降,前者仅为乌头碱的 1/50~1/200,后者仅为 1/2000,因此,炮炙后的制川乌、制草乌已不属毒性中药,但由于其药材来源不同,炮炙的程度不同,而使乌头碱含量不同,为保证用药安全,本品对乌头碱作限量检查,其最高限量若以对照品 10μL 作标准,仅为人口服中毒剂量的 1/20,并且本品仅作为外用制剂,应比较安全。

5.2 本品以乌头碱作出了对照品进行总生物碱的含量测定,因处方中除含有制川乌、制草乌外,还含有延胡索和川芎,经分析,川草乌中的生物碱占 63%,延胡索中的生物碱占 36%,川芎仅含 0.33%,故总碱以乌头碱作对照,用酸性染料比色法测定是可供质量控制参考。

参考文献:

[1] WS₃-B-0046-89,中成药方制剂[S].第1册.
[2] 陈其华.中成药中乌头总碱的酸性染料比色测定法[J].中国中药杂志,1991,16(8):476-477.

冬虫夏草多糖提取工艺的优化

余晓斌¹,罗长才¹,缪静^{2*}

(1.江南大学生物工程学院 教育部工业微生物重点实验室,江苏 无锡 214036; 2.烟台师范学院 生物技术科学与技术系,山东 烟台 264025)

自从日本学者千原进行多糖研究以来,从一些真菌中提取生物活性物质,尤其是真菌多糖成了人们的研究热点^[1]。据药理学及临床研究表明,冬虫夏草多糖可以增强免疫力、抗肿瘤及降血糖等^[2~4]。随着人们保健意识的增强,对于虫草多糖的研究及开发也日益升温,但由于天然冬虫夏草资源的稀少,为解决严重的供需矛盾,人们采用液体深层培养法来生产虫草菌丝体,以替代天然冬虫夏草^[5]。在虫草多糖的生产过程中,涉及到虫草多糖的提取问题,为使

虫草多糖提取的质和量达到最佳化,本实验采用常用的乙醇沉析法从乙醇添加量、pH值及时间3个因素对虫草多糖的提取进行了优化,利用SAS分析软件得出了回归方程,并进行了响应面分析,从而得出了虫草多糖的最佳提取工艺。

1 材料与方法

1.1 实验材料:冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* 供试菌种 CS2(自编号),通过大量筛选获得。取自CS2在25 L罐培养后的发酵液,然后将此发酵液进行减

* 收稿日期: 2001-12-20
作者简介:余晓斌(1965-),男,安徽芜湖人,副教授,硕士生导师,1985年毕业于南京大学化学系,1994年在无锡轻工大学获博士学位,1998年在韩国仁荷大学完成博士后研究,目前主持省级课题1项、国家“十五”攻关课题1项,发表论文30多篇,2篇被SCI收录 Tel (0510) 5876272 E-mail xbyu@mail.sytu.edu.cn

压浓缩至原体积的 1/5,用 Severg 法脱蛋白^[6],离心,取上清液备用。

1.2 实验设计:通过调节乙醇添加量、pH值及时间 3个因素,根据 Box-Benhknen 的中心组合设计原理,设计了 3因素 3水平的响应面分析实验^[7],共有 15个实验点,其中 12个为析因点,3个为零点,以估计误差。实验因素与水平的选取见表 1。

表 1 因素与水平的取值表

水平	因 素		
	X ₁ 乙醇 浓缩液 (V/V)	X ₂ 沉淀时间 (h)	X ₃ pH值
+ 1	5	15	8
0	3	10	6
- 1	1	5	4

1.3 实验方法:多糖测定:采用干重法,将乙醇沉淀下来的虫草多糖过滤并烘干至恒重称量。响应面分析:实验重复 3次,所得的多糖量采用平均值,用 SAS-RSREG(Response surface regression)程序进行分析。

2 结果与讨论

2.1 回归方程的建立及分析:响应面分析 (Response surface analysis)能以最经济的方式(如用很少的实验次数和时间)对实验进行全面、科学的研究,并取得明确的、有目的的结论。根据表 1对实验因素与水平的设计,采用不同的乙醇添加量、pH值及沉析时间,进行了 15次实验,各因素安排及结果见表 2。

表 2 响应面分析实验结果

编 号	X ₁	X ₂	X ₃	沉析多糖量 (g/L)
1	- 1	- 1	0	2.4
2	- 1	0	- 1	1.2
3	- 1	0	+ 1	2.8
4	- 1	+ 1	0	2.6
5	0	- 1	- 1	8.6
6	0	- 1	+ 1	10.1
7	0	+ 1	- 1	8.2
8	0	+ 1	+ 1	10.9
9	+ 1	- 1	0	9.7
10	+ 1	0	- 1	8.3
11	+ 1	0	+ 1	9.8
12	+ 1	+ 1	0	9.0
13	0	0	0	10.0
14	0	0	0	10.5
15	0	0	0	10.3

由表 2中的数据,采用 SAS-RSREG 程序回归拟合得出回归方程:

$$Y = 10.267 + 3.478X_1 - 0.0125X_2 + 0.913X_3 - 4.133X_1^2 - 0.208X_2^2 - 0.608X_3^2 - 0.225X_1X_2 - 0.025X_1X_3 + 0.30X_2X_3$$

对回归方程作显著性检验和方差分析,见表 3。

对回归模型进一步分析和计算可以发现:回归

模型的 F值 (= 195)大于 $F_{0.01}(9, 5)$,线性相关系数达到了 0.998,说明方程的因变量与全部自变量之间的线性关系很显著,方程的失拟性很小,所以用 SAS程序拟合得到的回归模型有较好的代表性,从而可用回归方程对实验进行分析和预测。另外,从表中可以看出,方程的一次项及二次项对响应值的影响显著,而交互项的影响不显著。

表 3 回归方程的显著性检验及方差分析

方差来源	自由度	平方和	平均平方和	F	显著性
一次项	3	103.27	34.42	431.2	<0.01
二次项	3	63.46	21.15	265.0	<0.01
交互项	3	0.57	0.19	2.359	
失拟项	3	0.27	0.09	1.434	
误差	2	0.13	0.07		
总和	14	167.70			
线性相关系数				0.998	

$$F_{0.05}(3, 2) = 19.16, F_{0.01}(3, 2) = 99.17, F_{0.01}(9, 5) = 10.2$$

2.2 虫草多糖提取工艺的优化:在用 SAS-RSREG 程序计算出回归方程中各系数的基础上,以虫草多糖沉析量回归模型进行数学分析,即对模型方程求偏导,并令其等于零,可得到曲面的最大点,结果:乙醇发酵液 (V/V)为 3.8:1,醇析时间为 11.7h, pH值为 7.65,虫草多糖醇析量为 11.35 g/L 发酵液。

为了进一步验证虫草多糖最优的提取工艺,采用上述条件即乙醇添加量为 3.8倍体积、沉析时间为 12h、pH值为 7.65进行了实验,结果虫草多糖的沉析量达到了 11.36 g/L,优化效果显著。

通过实验,发现在虫草多糖的沉析过程中,乙醇添加量对多糖沉析的影响最大,其次是 pH值,且当 pH值为 7.65时沉淀量最大,这可能是虫草多糖分子带电荷有关,所以可以通过调整乙醇添加量、沉析时间及 pH使虫草多糖的沉析达到最佳化。

在响应面分析的基础上,采用回归模型进行计算,可以预测虫草多糖的提取量,并得到虫草多糖提取的优化工艺,这为以后虫草多糖的提取打下了基础。

参考文献:

- [1] 唐茂芝. 食用菌类食品作为功能性食品的优势和特点 [J]. 食品科技, 1999, 3: 5-6.
- [2] 李绍平,李 晖,李 萍,等. 冬虫夏草抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(4): 373-375.
- [3] 李 晖,涂红湖,李耐三. 人工虫草菌丝多糖的分离提取及其降血糖作用研究 [J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(1): 39-42.
- [4] 龚 敏,朱 勤,王 彤,等. 冬虫夏草多糖分子结构与免疫活性 [J]. 生物化学杂志, 1990, 6(6): 486-488.
- [5] 肖宏亮,高孔荣,谭盈科. 冬虫夏草及其菌丝体研究进展 [J]. 中国食用菌, 1997, 16(2): 3-5.
- [6] Staub A N. Removal of proteins from polysaccharides [J]. Method Carbohydr Chem, 1975, 5: 5-6.
- [7] 费荣昌. 试验设计与数据处理 [M]. 第 4版. 无锡: 无锡轻工大学出版社, 1997.