

正交试验优选人参多糖的提取工艺

宋利华^{1,3}, 萧伟^{2,3*}, 鹿丽丽^{1,3}, 王振中^{2,3}, 姜华^{2,3}, 张怡^{2,3}, 朱克近^{2,3}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 优选人参多糖的最佳提取工艺。方法 以多糖提取率、糖醛酸提取率和相对分子质量为指标, 比较 3 种不同提取方法(水提、酸提和碱提)的提取效果, 并采用正交试验优选最佳提取工艺。结果 人参多糖的最佳提取工艺为 15 倍量水, 100 ℃ 水浴提取 3 次, 每次 3 h。结论 该工艺操作简单、稳定性好, 可用于产业化生产。

关键词: 人参多糖; 糖醛酸; 相对分子质量; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0283-05

Extracting technology optimization of polysaccharides from *Panax ginseng* by orthogonal test

SONG Li-hua^{1,3}, XIAO Wei^{2,3}, LU Li-li^{1,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, JIANG Hua^{2,3}, ZHANG Yi^{2,3}, ZHU Ke-jin^{2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Key words: polysaccharides in *Panax ginseng* C. A. Mey.; uronic acid; relative molecular weight; orthogonal test; extraction technology

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智的功能^[1]。人参中含皂苷类、糖类、蛋白质、挥发性成分、黄酮类、维生素、酶类、木质素以及微量元素等成分^[2-3]。现代药理研究表明, 人参多糖具有显著地增强免疫功能^[4]、抗肿瘤^[5]、抗衰老^[6]、抗辐射^[7]等作用, 其中酸性多糖具有明显的免疫增强和抗肿瘤作用^[4,8-10]。目前, 植物多糖的提取方法有水提法、酸提法、碱提法、酶提法、超声提取法等^[11], 其中以前 3 种方法最为常用。本实验采用酸提、碱提、水提 3 种方法提取人参多糖, 以多糖提取率、糖醛酸提取率和多糖相对分子质量为指标, 比较 3 种提取方法的提取效果, 再以综合提取率为指标, 采用正交试验法优选最佳提取工艺, 旨在筛选出简单高效、稳定可

行的人参多糖提取方法。

1 仪器与材料

UV2550—PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); BP—211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); 电热恒温水浴锅(上海贺德实验设备有限公司); TDL—5—A 型离心机(上海安亭科学仪器厂制造)。

人参, 产地为吉林抚松, 经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主管药师鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根。

D-无水葡萄糖(批号为 1108332200503, 中国药品生物制品检定所); D-半乳糖醛酸(质量分数≥97.0%, Sigma 公司); 间羟基联苯(分析纯, Sigma 公司); 苯酚、浓硫酸、无水四硼酸钠、无水乙醇、丙酮、乙醚(均为分析纯, 南京化学试剂有限公司), 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2011-08-09

作者简介: 宋利华(1986—), 河南省商丘市人, 南京中医药大学 2009 级研究生, 研究方向为中药制剂。

Tel: 15950733792 E-mail: songlihua0305@163.com

*通讯作者 萧伟 E-mail: wzzh-nj@tom.com

2 方法与结果

2.1 提取方法

2.1.1 水提 精密称取人参药材 10 g, 平行 3 份, 置圆底烧瓶中, 加入 20 倍量水, 浸泡 2 h, 于 90 °C 水浴中提取 3 h, 提取 1 次, 滤过, 滤液 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加 95% 乙醇调至乙醇体积分数为 75%, 醇沉过夜, 抽滤, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 干燥, 称定质量。

2.1.2 酸提 精密称取人参药材 10 g, 平行 3 份, 置圆底烧瓶中, 加入 20 倍量 0.3 mol/L 盐酸, 浸泡 2 h, 于 90 °C 水浴中提取 3 h, 提取 1 次, 滤过, 滤液 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值为 6~7, 离心, 上清液加 95% 乙醇至乙醇体积分数为 75%, 醇沉过夜, 抽滤, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 干燥, 称定质量。

2.1.3 碱提 精密称取人参药材 10 g, 平行 3 份, 置圆底烧瓶中, 加入 20 倍量 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液, 浸泡 2 h, 于 90 °C 水浴中提取 3 h, 提取 1 次, 滤过, 滤液 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 1.0 mol/L 盐酸溶液调 pH 值为 6~7, 离心, 上清液加 95% 乙醇至乙醇体积分数为 75%, 醇沉过夜, 抽滤, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 干燥, 称定质量。

2.2 多糖测定

2.2.1 对照品溶液制备 取干燥至恒定质量的 *D*-无水葡萄糖对照品 10 mg 精密称定, 置 100 mL 量瓶中定容, 配成 100 μg/mL 的储备液, 备用。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取干燥粗多糖 10 mg, 置 100 mL 量瓶中定容, 配成 100 μg/mL 的供试品溶液, 备用。

2.2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于具塞试管中, 加蒸馏水补足 1.0 mL, 加 6% 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 沸水浴 15 min, 置冰水浴中 10 min, 室温放置 15 min, 于 490 nm 处测定吸光度 (*A*) 值, 以 *A* 值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=9.606\ 14\ X-0.013\ 15$, $r=0.999\ 89$, 结果表明 *D*-无水葡萄糖在 10.022~100.22 μg/mL 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密量取对照品溶液 0.8 mL 于具塞试管中, 按“2.2.3”项下方法测定 *A* 值, 重复测定 6 次, 结果 *A* 值的 RSD 为 0.093%。

2.2.5 稳定性试验 精密量取供试品溶液 1.0 mL 于具塞试管中, 按“2.2.3”项下方法测定 *A* 值, 每隔 30 min 测定 1 次, 结果 *A* 值的 RSD 为 0.807%, 表明供试品溶液在 3 h 内稳定。

2.2.6 重现性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 各精密量取 1.0 mL 于具塞试管中, 按“2.2.3”项下方法测定 *A* 值, 计算其质量分数的 RSD 为 1.636%。

2.2.7 加样回收率试验 精密量取样品溶液 0.5 mL, 平行 6 份, 均加入 0.5 mL 的对照品溶液, 按“2.2.3”项下方法测定 *A* 值, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.68%, RSD 为 1.893%。

2.2.8 样品中多糖的测定 精密称取“2.1”项下制备的 3 种干燥粗多糖适量, 分别配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的多糖溶液, 量取待测溶液 1.0 mL, 加 6% 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 沸水浴 15 min, 置冰水浴中 10 min, 室温放置 15 min, 于 490 nm 处测定 *A* 值, 计算多糖量。

2.3 糖醛酸测定

2.3.1 对照品溶液制备 取干燥至恒定质量的 *D*-半乳糖醛酸对照品 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中定容, 配成 100 μg/mL 的储备液, 备用。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取干燥粗多糖 10 mg, 置 100 mL 量瓶中定容, 配成 100 μg/mL 的储备液, 备用。

2.3.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于具塞试管中, 加蒸馏水补足 1.0 mL, 于冰水浴中加四硼酸钠-浓硫酸溶液 6.0 mL, 摇匀, 沸水浴 6 min, 放至室温, 加间羟基联苯 80 μL, 摇匀, 放置 30 min, 于 525 nm 处测定 *A* 值, 以 *A* 值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=11.703\ 650\ X-0.025\ 78$, $r=0.999\ 27$, 结果表明 *D*-半乳糖醛酸在 9.844~98.44 μg/mL 线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 精密量取对照品溶液 0.5 mL 于具塞试管中, 加水补足 1.0 mL, 按“2.3.3”项下方法测定 *A* 值, 重复测定 6 次, 结果 *A* 值的 RSD 为 0.121%。

2.3.5 稳定性试验 精密量取供试品溶液 1.0 mL 于具塞试管中, 按“2.3.3”项下方法测定 *A* 值, 每隔 20 min 测定 1 次, 结果 *A* 值的 RSD 为 0.885%。表明供试品溶液在 2 h 内稳定。

2.3.6 重现性试验 按“2.3.2”项下方法制备供试

品溶液, 平行 6 份, 各精密量取 1.0 mL 于具塞试管中, 平行 6 份, 按“2.3.3”项下方法测定 A 值, 计算其质量分数的 RSD 为 1.755%。

2.3.7 加样回收率试验 精密量取样品溶液 0.8 mL, 平行 6 份, 均加入 0.2 mL 的对照品溶液, 按“2.3.3”项下方法测定 A 值, 计算回收率, 结果平均回收率为 100.07%, RSD 为 1.489%。

2.3.8 样品中糖醛酸的测定 精密称取“2.1”项下制备的 3 种干燥粗多糖适量, 配成质量浓度均为 0.5 mg/mL 的多糖溶液, 量取待测溶液 1.0 mL, 于冰水浴中加四硼酸钠-浓硫酸溶液 6.0 mL, 摇匀, 沸水浴 6 min, 放至室温, 加间羟基联苯 80 μ L, 摇匀, 放置 30 min, 于 525 nm 处测定 A 值, 计算糖醛酸量。

2.4 相对分子质量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Polysep-GFC-P4000 (300 mm $\times$ 7.80 mm); 流动相为 0.71% Na₂SO₄-0.02% NaN₃ 水溶液; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测器为 RID-10A 示差折光检测器; 检测器温度 35 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L。

2.4.2 线性关系考察 以不同相对分子质量的右旋糖酐 (M_w 180、21 400、133 800、670 000、2 000 000) 为对照品, 分别用流动相配制成 10 mg/mL 溶液, 进样 20 μ L, 记录其保留时间, 以保留时间 (t) 为横坐标, 相对分子质量的对数值 ($\lg M_w$) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $\lg M_w = -4.29 \times 10^{-3} t^3 - 8.65 t^2 + 0.24 t + 5.47$, $r = 0.999 7$ 。

2.4.3 样品中多糖相对分子质量的测定 精密称取“2.1”项下制备的 3 种干燥粗多糖适量, 配成质量浓度均为 10 mg/mL 的多糖溶液, 按“2.4.1”项下条件进样测定, 计算多糖相对分子质量。

2.5 结果

水提、酸提和碱提的多糖及糖醛酸提取率结果见表 1, 相对分子质量分布色谱图见图 1。水提的多糖提取率远远高于酸提与碱提, 酸提的糖醛酸提取率高于水提与碱提。水提粗多糖的保留时间为 11~25 min, 相对分子质量为 $180 \sim 1.8 \times 10^6$, 相对分子质量范围较广; 酸提粗多糖的保留时间为 17~25 min, 相对分子质量为 $180 \sim 1.0 \times 10^5$, 大分子多糖可能被破坏; 碱提粗多糖的保留时间为 11~25 min, 与水提相似, 水提多糖的相对分子质量范围较酸提、碱提的广, 信息较全面。基础研究应以提取率高、信息全面为最佳, 综合考虑多糖提取率、糖醛酸提取率和多糖相对分子质量 3 个方面, 选择水为提取

溶剂。

$$\text{多糖提取率} = C_1 V_1 m_1 / (m_2 M)$$

$$\text{糖醛酸提取率} = C_2 V_2 m_1 / (m_3 M)$$

C_1 为多糖质量浓度 (mg/mL), V_1 为溶液体积 (mL), m_1 为粗多糖质量 (mg); m_2 为粗多糖取样量 (mg), M 为药材质量 (mg), C_2 为糖醛酸质量浓度 (mg/mL), V_2 为溶液体积 (mL), m_3 为粗多糖取样量 (mg)

表 1 3 种提取方法比较

Table 1 Comparison on three extraction methods

提取方法	多糖提取率 / %	糖醛酸提取率 / %
水提	6.207	0.809
酸提	1.222	1.139
碱提	3.893	0.731

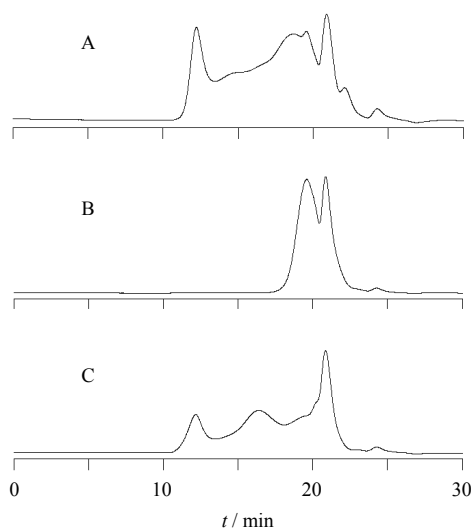


图 1 水提 (A)、酸提 (B) 和碱提 (C) 多糖的相对分子质量色谱图

Fig. 1 Relative molecular weight chromatograms of water extraction (A), acid extraction (B), and alkaline extraction (C)

2.6 正交试验优化水提工艺

以综合提取率 (综合提取率 = 多糖提取率 + 糖醛酸提取率) 为指标, 对提取温度 (A)、提取时间 (B)、提取次数 (C)、溶媒用量 (D) 4 个因素进行考察。精密称取人参药材 10 g, 平行 9 份, 置圆底烧瓶中, 按 $L_9(3^4)$ 正交表分别进行提取, 试验设计及结果见表 2。不考虑交互作用, 进行方差分析, 结果见表 3。

由 R 值可知, 以综合提取率为指标, 各因素影响的大小依次为 $A > C > B > D$ 。通过方差分析可知, 4 个因素中, A 具有显著影响 ($P < 0.05$), 其他因

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / °C	B / h	C / 次	D / 倍	多糖提取率 / %	糖醛酸提取率 / %	综合提取率 / %
1	80 (1)	2.0 (1)	1 (1)	10 (1)	3.95	0.61	4.56
2	80 (1)	2.5 (2)	2 (2)	15 (2)	4.92	0.71	5.63
3	80 (1)	3.0 (3)	3 (3)	20 (3)	5.37	0.77	6.14
4	90 (2)	2.0 (1)	2 (2)	20 (3)	6.88	0.91	7.79
5	90 (2)	2.5 (2)	3 (3)	10 (1)	6.93	0.98	7.91
6	90 (2)	3.0 (3)	1 (1)	15 (2)	7.38	0.99	8.37
7	100 (3)	2.0 (1)	3 (3)	15 (2)	8.08	1.19	9.27
8	100 (3)	2.5 (2)	1 (1)	20 (3)	6.39	0.95	7.34
9	100 (3)	3.0 (3)	2 (2)	10 (1)	7.81	1.09	8.90
K_1	5.443	7.207	6.757	7.123			
K_2	8.023	6.960	7.440	7.757			
K_3	8.503	7.803	7.773	7.090			
R	3.060	0.843	1.016	0.667			

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	16.250	2	19.185	$P < 0.05$
B	1.128	2	1.332	
C	1.612	2	1.903	
D (误差)	0.847	2	1.000	

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

素均不具有显著影响。通过正交试验优选的人参多糖最佳提取工艺为 15 倍量水, 100 °C 水浴回流提取 3 次, 每次 3 h。

2.7 最佳工艺验证试验

称取人参药材 10 g, 平行 3 份, 按最佳工艺提取, 多糖提取率分别为 8.43%、8.01%、8.12%, 糖醛酸提取率分别为 1.22%、1.17%、1.18%, 表明该工艺稳定可行。

根据正交试验结果可知, 提取溶剂用量对提取率的影响最小, 且不同水平间差异不大, 故可考虑改用 10 倍量水; 另外, 提取 3 次与提取 2 次相比, 提取率并没有明显提高, 并且提取次数越多, 用时越长、溶剂用量越大, 对下步的浓缩、醇沉带来不便, 故考虑将提取工艺改为 10 倍量水, 100 °C 水浴回流提取 2 次, 每次 3 h, 并按此工艺进行了 3 份药材用量为 10 g 的验证试验, 多糖提取率分别为 7.53%、7.97%、7.87%, 糖醛酸提取率分别为 1.07%、

1.13%、1.11%。此工艺与正交试验优选出的最佳工艺相比, 多糖提取率与糖醛酸提取率并无明显降低, 且提取时间缩短, 溶剂用量大大减少, 方便进一步的处理。故生产上可采用 10 倍量水, 100 °C 水浴回流提取 2 次, 每次 3 h 的工艺。

3 讨论

本实验在选择提取溶剂时, 考察了 0.1~0.5 mol/L 盐酸溶液与 0.1~0.5 mol/L 氢氧化钠溶液的提取效果, 发现酸或碱的浓度较高 (0.4~0.5 mol/L) 时提取液颜色较深, 多糖提取率较低, 原因可能是较高浓度的酸或碱对多糖的破坏能力强, 使得大分子多糖分解成小分子多糖、寡糖或单糖, 不能被 75% 乙醇沉淀下来; 浓度为 0.1~0.3 mol/L 时, 提取液颜色依次加深, 多糖提取率也依次提高, 因此, 本实验选择 0.3 mol/L 盐酸溶液和 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液作为酸提与碱提溶剂。本实验还发现酸提的糖醛酸量要高于碱提和水提, 这与一些文献报道的含糖醛酸的多糖可用碱提的说法相悖^[9], 且酸提的人参多糖中淀粉量、蛋白质质量均明显低于水提与碱提, 相对分子质量分布也较窄, 因而, 可考虑对酸提的人参多糖进行深入研究。

糖醛酸的测定一般用比色法, 常用的方法有咪唑法和间羟基联苯法, 通过比较, 间羟基联苯法受中性糖的影响较小, 几乎不受影响, 且操作简单、方法灵敏、重现性好, 故选用间羟基联苯法测定人参多糖中的糖醛酸。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 黎 阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-附 2.
- [3] 徐 静, 贾 力, 赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [4] 倪维华, 周义发. 人参多糖免疫活性及抗肿瘤作用 [D]. 长春: 东北师范大学, 2010.
- [5] Cheng H R, Li S S, Fan Y Y, *et al.* Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human colon cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(1): 175-181.
- [6] Kim H J, Kim M H, Byon Y Y, *et al.* Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow cells [J]. *J Vet Sci*, 2007, 8(1): 39-44.
- [7] 郑艳蓉, 石 璐, 颜王鑫, 等. 家兔肝缺血再灌注损伤中脂质过氧化反应及人参多糖的干预 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(2): 109-112.
- [8] 张 旭, 周义发. 人参多糖的系统分析及其免疫活性研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2009.
- [9] 张 彬, 林瑞超, 冯 芳. 人参多糖的研究概况 [J]. 中国药事, 2004, 18(9): 566-569.
- [10] 高文芹, 贾 力, 赵余庆. 人参的抗癌作用及其机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 53-58.
- [11] 杨宇博, 夏红梅, 袁恒翼. 植物多糖及其提取方法 [J]. 中国甜菜糖业, 2008(2): 34-37.

《中草药》杂志荣获第二届中国出版政府奖

2011 年 3 月 18 日, “书香中国”第二届中国出版政府奖颁奖典礼在北京隆重举行。《中草药》杂志荣获第二届中国出版政府奖期刊奖, 天津中草药杂志社总经理、《中草药》执行主编陈常青研究员代表《中草药》杂志参加了颁奖典礼。

中国出版政府奖是国家设立的新闻出版行业的最高奖, 2007 年首次开奖, 每 3 年评选 1 次。第二届中国出版政府奖首次设立期刊奖。经期刊奖评委会办公室精心组织, 认真评选, 从全国 1 万多种期刊中评选出 59 种获奖期刊, 其中期刊奖 20 种 (科技类和社科类期刊各 10 种), 提名奖 39 种 (科技类期刊 19 种, 社科类期刊 20 种)。

本届期刊奖评委会评委共 40 位, 主要由期刊出版界专家、研究院所和高等院校各学科领域的著名专家学者及有关部门长期从事期刊管理的领导组成。本次评选组织工作充分体现了公平、公正、公开原则, 获奖期刊代表了我国期刊业的最高水平, 集中体现了我国期刊业近年来改革发展的突出成就, 也体现出了党和政府对出版行业改革发展的高度重视和大力支持, 体现了鼓励原创, 激励创新, 推动期刊实现跨越式发展的政策导向, 必将激励更多的出版单位、出版人肩负责任, 坚守阵地, 与时俱进, 勇于创新, 多出精品力作。

《中草药》杂志于 1970 年创刊, 40 余年来, 几代编辑工作者一直坚持“质量第一”, 坚持普及与提高相结合的办刊方针。杂志以“新”——选题新、发表成果创新性强, “快”——编辑出版速度快, “高”——刊文学术水平和编辑质量高为办刊特色, 载文覆盖面广、信息量大、学术水平高。严格遵守国家标准和国际规范, 在此次评选中以优质的编校质量, 广泛的品牌影响力获得了评委的一致好评, 最终脱颖而出。这是《中草药》杂志继获得第二届国家期刊奖、第三届国家期刊奖提名奖、新中国 60 年有影响力的期刊、中国精品科技期刊、百种中国杰出学术期刊等奖项后取得的又一巨大荣誉!

衷心感谢广大读者、作者、编委和协办单位长期以来对《中草药》杂志的关心和支持! 让我们携起手来, 与时俱进, 开拓创新, 继续攀登, 把中草药杂志社办成“汇集知识的渊薮、传播真理的阵地、探索奥秘的殿堂”, 为中药现代化、国际化做出更大贡献!

天津中草药杂志社