

优选黄柏多糖超声波辅助提取工艺的研究

甄铎¹, 罗傲雪¹, 罗傲霜², 马明东¹, 蒲尚饶¹, 苏芳¹, 严毅¹, 王泽英¹, 范益军^{1*}

(1. 四川农业大学都江堰分校, 四川都江堰 611830; 2. 中国科学院成都生物研究所, 四川成都 610041)

摘要 [目的]采用超声波技术辅助提取黄柏多糖。[方法]通过正交设计对提取工艺进行优化,考察因素为提取温度、提取时间、pH 值和次数。[结果]影响黄柏多糖提取的主要因素是提取次数,优选方案为温度 95 ℃、时间 25 min、pH 9、提取 3 次。[结论]该方法简单、高效,具有良好的精密度和稳定性,重现性好,是提取黄柏多糖的一个可行的方法。

关键词 黄柏;多糖;超声波辅助提取

中图分类号 S567.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12747-02

Optimal Ultrasonic-assisted Extraction Process of Cortex *Phellodendri chinensis* by Orthogonal Method

ZHEN Hua et al (Sichuan Agricultural University Dujiangyan Campus, Dujiangyan, Sichuan 611830)

Abstract [Objective] The aim of this paper was to optimize the ultrasonic-assisted extraction process of polysaccharide from cortex *Phellodendri Chinensis*. [Method] The extraction technology was optimized by orthogonal experimental design on effects of extraction temperature, ultrasonic-irradiation time, pH value and extraction times. [Result] The results indicated that the primary factor influencing the extraction rate of polysaccharide was extraction times. The optimum conditions were three times extraction for 25 min at 95 ℃ with pH = 9. [Conclusion] The results showed that the method adopted was simple with high accuracy, good stability and reproducibility, and could be used to extract the polysaccharide from cortex *Phellodendri chinensis*.

Key words Cortex *Phellodendri chinensis*; Polysaccharide; Ultrasonic-assisted extraction

黄柏为芸香科植物黄檗或黄皮树的干燥树皮,是我国传统医学中一种重要的常用中药材,主要分布于东北三省及河北、内蒙古、四川、云南、贵州、湖北、广西、山东、甘肃、浙江等地,四川都江堰地区也是黄柏的主产地之一。现代药理学研究发现黄柏在降血糖^[1]、抗癌^[2]、增强免疫^[3]、降血压、抗菌^[4]、抗炎^[5]、解热、抗溃疡、抗氧化、抗痛风、抗病毒等方面具有良好的功效。近年来植物多糖的药理研究结果显示,多糖具有抗肿瘤^[6]、提高免疫力^[7]以及抗氧化^[8]等多种生理活性,而多糖的这些生理活性也正是黄柏具有的部分药理作用,因此对黄柏中的多糖类成分进行研究必将为黄柏药理作用的探索带来重要的启迪。但目前对黄柏化学成分的研究却主要集中于黄柏中的小檗碱^[9],而黄柏多糖尚无人重视,研究甚少。为此,笔者利用超声波辅助技术研究黄柏中多糖成分的提取工艺,为黄柏多糖的进一步研究提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试材。黄柏(四川都江堰),60 ℃烘干并过 40 目筛。

1.1.2 仪器与试剂。①仪器。TU-1800S 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器);KQ-5200 超声波发生装置(昆山超声仪器);T214 分析天平(北京赛多利斯仪器);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器);HH-S 数显恒温水浴锅(江苏金坛医疗仪器);6202 植物粉碎机(北京环亚天元机械)。②试剂。葡萄糖、苯酚、硫酸、乙醇等均为分析纯试剂(成都科龙化工)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制备。精密称取 105 ℃干燥至恒重的葡萄糖标准品 0.025 0 g,加水溶解,250 ml 容量瓶定容,即得 0.1 mg/ml 的葡萄糖对照品液。精密量取上述对照品液 0.2、

0.4、0.6、0.8 和 1.0 ml 于具塞试管中,分别加水至 2.0 ml,各加入 5% 苯酚溶液 1.0 ml,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0 ml,摇匀,放置 10 min,置 40 ℃水浴保温 15 min,取出迅速冷却至室温,紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度;空白对照以 2.0 ml 蒸馏水代替葡萄糖液。

1.2.2 超声波辅助提取工艺正交试验设计。对提取温度、提取时间、pH 值和提取次数进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1),筛选最优提取工艺。对筛选出来的最优提取工艺进行精密度、重现性、稳定性等方法学考察,同时将其与传统加热回流工艺的提取效率进行比较。

表 1 超声波辅助提取正交试验设计 $L_9(3^4)$

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal test design of ultrasonic-assisted extraction

水平 Level	试验因素 Test factor			
	提取温度/℃ Extraction temperature	提取时间//min Extraction time	pH 值 pH value	提取次数//次 Extraction times
1	75	15	5	1
2	85	20	7	2
3	95	25	9	3

1.2.3 数据分析。试验过程中所有处理均设 3 个平行样,试验数据利用 SPSS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制备 紫外分光光度计 490 nm 处测定不同浓度标准液的吸光度,以吸光度为横坐标、浓度为纵坐标绘制标准曲线,标准曲线回归方程为 $y = 0.0686x - 0.0003$ ($r = 0.999$)。

2.2 黄柏多糖超声波辅助提取工艺的优化 对超声波辅助提取黄柏多糖中提取温度、提取时间、pH 值和提取次数进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果表明(表 2):极差值中 R_A 为 3.517, R_B 为 0.601, R_C 为 2.022, R_D 为 3.661。说明 D 因素(提取次数)影响最大,其次是 A 和 C,影响因素主次顺序为 $D > A > C >$

基金项目 都江堰市科技计划项目(2007-61)。

作者简介 甄铎(1963-),男,四川都江堰人,副教授,从事天然产物分析研究。*通讯作者,E-mail:yijfan@yahoo.com.cn。

收稿日期 2008-07-17

B;最优水平为 $A_3B_3C_3D_3$, 即温度为 95 ℃、提取时间为 25 min、pH 值 9、提取 3 次。

表 2 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test

试验号 Test No.	A (提取温度 Extraction temperature)	B (提取时间 Extraction time)	C (pH 值 pH value)	D (提取次数 Extraction times)	提取率/% Extraction rate
1	1	1	1	1	1.582
2	1	2	2	2	2.890
3	1	3	3	3	3.657
4	2	1	2	3	3.704
5	2	2	3	1	2.636
6	2	3	1	2	2.988
7	3	1	3	2	4.254
8	3	2	1	3	3.955
9	3	3	2	1	3.437
K_1	8.129	9.540	8.525	7.655	
K_2	9.328	9.481	10.031	10.132	
K_3	11.646	10.082	10.547	11.316	
R	3.517	0.601	2.022	3.661	

试验因素显著性分析表明,提取次数、温度、pH 值、提取时间均对黄柏多糖提取具有极显著的影响。

2.3 优选工艺的精密性 按照最优工艺制备黄柏多糖样品液 1 份,同时取样 5 次,紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度,检测方法的精密性,结果表明:5 个样品液的吸光度(A)分别为 0.761、0.756、0.755、0.746 和 0.792,平均值 0.762,样品吸光度的 $RSD=2.312\%$ ($n=5$),表明该方法精密性良好。

2.4 优选工艺的稳定性 分别在 0、30、60、90、120 min 检测同一个黄柏多糖样品液的吸光度,考查该方法在 120 min 内的稳定性。结果表明,样品液吸光度(A)分别为 0.737、0.744、0.743、0.743 和 0.752,样品吸光度的 $RSD=0.706\%$ ($n=5$),不同时间点检测的样品液的吸光度值无显著差异,表明样品液在 120 min 内基本稳定。

2.5 优选工艺的重现性 按照筛选出的最优提取工艺分别制备 5 份样品液,测定其吸光度值,检测该工艺的重现性。结果表明,5 份样品的提取率分别为 5.507%、5.419%、5.482%、5.143% 和 5.550%,无显著差异, $RSD=2.990\%$,符合方法学的规定,表明该方法具有良好的重现性。

2.6 最优工艺与传统加热回流工艺的比较 结果表明,超声波辅助提取工艺的提取率为 $(5.109 \pm 0.021)\%$,而加热回

流 2 h 的提取率为 $(4.195 \pm 0.153)\%$,超声波辅助提取法较传统加热回流法提取率增加了 21.788%。说明采用超声波辅助提取黄柏多糖既缩短了提取时间,又显著增加了提取率。

3 结论

试验建立了利用超声波技术辅助提取黄柏多糖的方法。通过正交设计对提取温度、时间、pH 值以及提取次数进行优化,结果表明,提取次数对黄柏多糖提取具有显著的影响,其次为提取温度、pH 值和提取时间。最优水平为 $A_3B_3C_3D_3$,即温度 95 ℃、时间 25 min、pH 值 9、提取 3 次。经方法学考察,该方法具有良好的精密性和稳定性,且重现性好。

超声波辅助提取法与传统加热回流法相比,提取率增加 21.788%。超声波辅助提取技术利用超声波的机械效应、空化效应和热效应,增大了介质分子的运动速度和介质的穿透力,从而使提取时间缩短、提取效率提高,大大节省了生产能耗^[10]。同时由于在超声波辅助提取时也进行了热处理,从而更好地提高了有效成分的提取效率。笔者将超声波技术用于黄柏多糖的辅助提取,具有节时、节能、得率高的特点。

参考文献

- [1] 李宗友,黄柏和辽宁椴木的丁醇提取物刺激 PI-3-激酶和 ERK2 引起 HepG2 细胞中糖原含量的增加[J]. 国外医学. 中医中药分册,1999,21(3):44-46.
- [2] 廖静,鄂征. 药黄柏的光敏抗癌作用研究[J]. 首都医科大学学报,1999,20(3):153-155.
- [3] 赵向忠,董群. 不同剂量黄柏组方大补阴丸(汤)对 CJ 小鼠 IL-2/IL-4 免疫调节作用的初步研究[J]. 皖南医学院学报,2005,24(3):164-166.
- [4] YU H H, KIM K J, CHA J D, et al. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Med Food, 2005, 8(4):454-461.
- [5] 王德全,胡俊英. 黄柏胶囊抗炎疗效临床分析[J]. 中华实用中西医结合杂志,2004,17(6):839-840.
- [6] YE Q, QIN G, ZHAO W. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* [J]. Phytochemistry, 2002, 61(8):885-890.
- [7] LEE Y H, PARK J D, BAEK N I, et al. In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile* [J]. Planta Med, 1995, 61(2):178-180.
- [8] YANG L, HAN H, NAKAMURA N, et al. Bio-guided isolation of antioxidants from the stems of *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* [J]. Phytother Res, 2007, 21(7):696-698.
- [9] CHAN C O, CHU C C, MOK D K, et al. Analysis of berberine and total alkaloid content in cortex phellodendri by near infrared spectroscopy (NIRS) compared with high-performance liquid chromatography coupled with ultra-visible spectrometric detection [J]. Anal Chim Acta, 2007, 592(2):121-31.
- [10] 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(1):60-62.

(上接第 12737 页)

δ : 8.47 (1H, d, $J=7.8\text{Hz}$, H-7), 8.32 (1H, d, $J=7.8\text{Hz}$, H-5), 7.62 (1H, d, $J=7.8\text{Hz}$, H-6), 6.44 (1H, s, H-3), 4.11 (2H, q, $J=6.9\text{Hz}$, OCH_2), 2.68 (3H, s, COCH_3), 1.57 (3H, t, $J=6.9\text{Hz}$, CH_2CH_3); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ : 172.6 (C-1), 143.7 (C-2), 100.3 (C-3), 182.4 (C-4), 125.5 (C-5), 127.2 (C-6), 127.8 (C-7), 130.2 (C-8), 121.1 (C-4a), 123.6 (C-8a), 204.6 (COCH_3), 56.4 (OCH_2), 32.4 (COCH_3), 16.3 (OCH_2CH_3)。根据以上波谱数据,可确定化合物 XII 的结构为 2-乙氧基-8-乙酰基-1,4-奈酮。

参考文献

- [1] 北京中医学院. 中药化学[M]. 上海:上海人民出版社,1976:136.
- [2] KIMURA Y, KOZAWA M, BABA K, et al. New components of roots of *Polygonum cuspidatum* [J]. Planta Medica, 1983, 48(3):164-168.
- [3] 唐刚,王义明,罗国安,等. 高效液相色谱法测定洁脉冲剂中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J]. 药物分析杂志,1999,19(5):340.
- [4] KANG H, XIANG L, FAN G Q, et al. Studies on chemical constituents in radix and rhizome of *Rheumnanum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2002, 35(5):394-396.
- [5] TAKESHI K, YUTAKA M. Anthraquinones components in *Rumex acetosa* L. [J]. Shoyakugaku Zasshi, 1987, 41(1):67.
- [6] 夏之宁,周闯,孙冠芸,等. 吸附脱附法提取分离大黄蒽醌甙成分[J]. 中成药,1999,21(9):478.
- [7] GAMINI S, JAYATILAKE, HIRANTHI J, et al. Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum* [J]. Natural Products, 1993, 56(10):1805-1810.
- [8] 冯锋,柳文媛,陈优生,等. 蒺藜中黄酮和芪类化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2003,34(2):119.