

香荷胶囊中香菇总多糖提取工艺

范彦博^{1,2},周才新¹,张义生¹,石新华¹,李赫宇³

(1.武汉市中医医院,湖北 武汉 430014;2.武汉市中医药研究所国家中管局中药制剂三级实验室,湖北 武汉 430014;3.天津市益倍建生物技术有限公司,天津 300457)

摘要:研究香荷胶囊中香菇总多糖的最佳提取工艺。采用正交试验法,考察加水量、提取时间和提取次数3个因素对提取工艺的影响;采用紫外分光光度法进行测定。香荷胶囊中香菇总多糖的最佳提取工艺为:加入12倍量水,沸水提取3次,每次1h。优选的工艺简便可行、稳定性好。

关键词:香荷胶囊;香菇;正交试验;提取工艺

Extraction Process of Polysaccharide in Xianghe Capsule

FAN Yan-bo^{1,2}, ZHOU Cai-xin¹, ZHANG Yi-sheng¹, SHI Xin-hua¹, LI He-yu³

(1. Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, Hubei, China; 2. 3-level Traditional Chinese Medicine Preparation Laboratory of State Administration of TCM of the PRC, Wuhan 430014, Hubei, China; 3. Tianjin UBasic Health Biological Technology Limited Company, Tianjin 300457, China)

Abstract: To optimize the extraction process of polysaccharide in Xianghe Capsule. The optimum extraction was investigated by the orthogonal design and UV-spectrophotometry. The optimum extraction conditions: ratio of solid to liquid 12:1, boiling water extraction for 1h and repeated the extraction for 3 times. This optimized process is simple, stable and efficient.

Key words: xianghe capsule; lentinus edodes; orthogonal design; extraction process

香荷胶囊由香菇、苦丁茶、山楂等药食同源的中药饮片组成,具有调血脂的功效。本文是关于香荷胶囊中香菇总多糖提取工艺的正交设计实验。处方中香菇总多糖单独提取,现代研究表明^[1],香菇总多糖提取物具有良好的治疗高脂血症的作用,故确定香菇采用水作为溶剂水浴提取。本文以香菇总多糖的含量为考察指标,采用正交试验法,优选香荷胶囊中香菇的提取工艺,为香荷胶囊的研制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

香菇购自咸宁康进饮片公司。

1.2 仪器

AB-135-S型万分之一电子天平:瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;SP-756P型紫外分光光度计:上海光谱仪器有限公司;TGL-16B型离心机:上海菲恰尔

作者简介:范彦博(1982—),男(汉),中药师,博士,主要从事中药学研究工作。

分析仪器有限公司。

1.3 试剂

葡聚糖对照品(分子量 5×10^5)(sigma),无水乙醇、氢氧化钠、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸钠、无水硫酸钠、浓硫酸、苯酚等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 试液的制备

1.乙醇溶液(80%):20mL水中加入无水乙醇80mL,混匀。

2.氢氧化钠溶液(100g/L):称取100g氢氧化钠,加水溶解并稀释至1L,加入固体无水硫酸钠至饱和,备用。

3.铜试剂储备液:称取3.0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、30.0g柠檬酸钠,加水溶解并稀释至1L,混匀,备用。

4.铜试剂溶液:取铜试剂储备液50mL,加水50mL,混匀后加入固体无水硫酸钠12.5g并使其溶解。

临用新配。

5.洗涤剂:取水 50 mL,加入 10 mL 铜试剂溶液、10 mL 氢氧化钠溶液,混匀。

6.硫酸溶液(10%):取 100 mL 浓硫酸加入到 800 mL 左右水中,混匀,冷却后稀释至 1 L。

7.苯酚溶液(50 g/L):称取精制苯酚 5.0 g,加水溶解并稀释至 100 mL,混匀。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的葡聚糖对照品 0.500 8 g,加水溶解,定容至 50 mL,混匀,再精密移取 1 mL,置 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,混匀。(每 1 mL 含葡聚糖 0.100 2 mg)。

2.1.3 供试品溶液的制备

称取已干燥的香菇粗粉(40目)20 g,加入 10 倍量水水浴提取 1 h,过滤后将提取液定容至 1 000 mL,混匀。准确移取上述提取液 5 mL,置于 50 mL 离心管中,加入无水乙醇 20 mL,混匀,沉淀 5 min 后,以 3 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。残渣用 80%乙醇溶液数毫升洗涤,离心后弃去上清液,反复操作 3 次~4 次。残渣用水溶解并定容至 5 mL,混匀。准确移取上述水溶液 2 mL,置于 20 mL 离心管中,各加入 100 g/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL、铜试剂溶液 2.0 mL,沸水浴煮沸 2 min,冷却,以 3 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。残渣用洗涤液数毫升洗涤,离心后弃去上清液,反复操作 3 次,残渣用 10%硫酸溶液 2 mL 溶解并转移至 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀,即得。

2.2 检测波长的选择

在 300 nm~600 nm 波长范围内对对照品溶液进行扫描,结果对照品溶液在 485 nm 波长处有最大吸收峰,故选择测定波长为 485 nm。

2.3 线性范围

精密移取 2.1.2 项下对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置 25 mL 比色管中,准确补充水至 2.0 mL,加入 50 g/L 苯酚溶液 1.0 mL,使混匀,小心加入浓硫酸 10.0 mL,混匀,置沸水浴中煮沸 2 min,冷却至室温后用分光光度计,在 485 nm 波长处,以试剂空白为参比,1 cm 比色皿测定吸光度值。以吸光度值(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,进行线性回归,回归方程为 $Y=22.282X-0.0008$,相关系数 $r=0.9996$,结果表明在 0.02 mg/mL~0.10 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取 2.1.2 项下对照品溶液 1.0 mL,置 25 mL 比色管中,按 2.2 项下自“准确补充水至 2.0 mL”起操

作,在同一条件下分别测定吸光度,重复测定 6 次,RSD 为 0.213%,表明精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 2.0 mL,置 25 mL 比色管中,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按 2.2 项下自“准确补充水至 2.0 mL”起操作,测定吸光度,RSD 为 1.13%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重现性试验

取已干燥的香菇粗粉(40目)6份,每份 20 g,精密称定,照 2.1.3 项下的方法依法制备,精密吸取各供试品溶液 2.0 mL,置 5 支 25 mL 比色管中,按 2.2 项下自“准确补充水至 2.0 mL”起操作,在同一条件下分别测定吸光度,RSD 为 2.82%,表明重现性良好。

2.7 加样回收试验

取已知含量的香菇粗粉 6 份,每份 5.0 g,精密称定,分别加入一定量的葡聚糖对照品,照 2.1.3 项下的方法依法制备,精密吸取各供试品溶液 2.0 mL,置 6 支 25 mL 比色管中,按 2.2 项下自“准确补充水至 2.0 mL”起操作,依法测定,加样回收率为 99.4%,RSD 为 0.99%,结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果
Table 1 Results of recovery test

样品含量/ mg	加入量/ mg	实测量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
190.5	160.0	351.14	100.4	99.4	0.99
195.7	160.0	355.86	100.1		
204.1	200.0	403.70	99.8		
198.8	200.0	395.20	98.2		
196.7	240.0	432.14	98.1		
202.5	240.0	441.78	99.7		

3 香菇总多糖提取工艺的正交设计实验

为系统考察香菇水提的工艺参数,选取加水量、提取时间、提取次数作为考察因素,以总多糖的含量为考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表设计。

3.1 因素水平表的设定

以加水量(A)、提取时间(B)、空白(C)、提取次数(D)作为考察因素,每个因素设置 3 个水平,因素、水平见表 2。

表 2 香菇提取工艺正交试验因素水平表

Table 2 Mushroom extracting technology orthogonal experiment factor level table

水平	因素		
	A 加水量(生药倍数)	B 提取时间/h	C 提取次数
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

3.2 方法

3.2.1 供试品提取

称取已干燥的香菇粗粉(40目)20g,按正交表中条件水浴提取,滤过后将各提取液定容至1000mL,混匀。

3.2.2 沉淀粗多糖

准确移取3.2.1项下9份溶液各5mL,分别置于50mL离心管中,各加入无水乙醇20mL,混匀,沉淀5min后,以3000r/min离心5min,弃去上清液。残渣用80%乙醇溶液数毫升洗涤,离心后弃去上清液,反复操作3次~4次。残渣用水溶解并定容至5mL,混匀。

3.2.3 供试品测定液的制备

准确移取3.2.2项下9份溶液各2mL,分别置于20mL离心管中,各加入100g/L氢氧化钠溶液2.0mL、铜试剂溶液2.0mL,沸水浴煮沸2min,冷却,以3000r/min离心5min,弃去上清液。残渣用洗涤液数毫升洗涤,离心后弃去上清液,反复操作3次,残渣用10%硫酸溶液2mL溶解并转移至50mL容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀,即得。

3.2.4 供试品测定

准确移取3.2.3项下9份供试品测定液各2.0mL置于25mL比色管中,加入50g/L苯酚溶液1.0mL,混匀,小心加入浓硫酸10.0mL,混匀,置沸水浴中煮沸2min,冷却至室温,用紫外分光光度计,在485nm波长处,以试剂空白为参比,1cm比色皿测定吸光度值。由标准曲线算出总多糖含量。

3.3 实验结果与方差分析结果

正交试验设计及结果见表3,方差分析结果见表4。

表3 正交试验设计及结果

Table 3 Orthogonal experimental design and results

试验号	A	B	C	D	总多糖含量/%
1	1	1	1	1	2.610
2	1	2	2	2	3.203
3	1	3	3	3	3.912
4	2	1	3	2	5.507
5	2	2	1	3	3.113
6	2	3	2	1	4.005
7	3	1	2	3	4.420
8	3	2	3	1	5.600
9	3	3	1	2	4.219
K ₁	9.725 0	12.537 0	12.215 0	9.942 0	
K ₂	12.625 0	11.916 0	12.929 0	11.628 0	
K ₃	14.239 0	12.136 0	11.445 0	15.019 0	
R	4.514 0	0.621 0	1.484 0	5.077 0	

表4 方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis

方差来源	SS	f	S	F	P
A	3.487 9	2.000 0	1.744 0	52.772 3	*
B	0.066 1	2.000 0	0.033 0	1.000 0	
C	0.367 2	2.000 0	0.183 6	5.556 0	
D	4.457 5	2.000 0	2.228 7	67.442 1	*

注:*表示显著因子 $P<0.05$ 。

比较表3中各因素的极差大小,可知各因素对总多糖含量的影响顺序为 $D>A>B$ 。由表4方差分析可知:提取次数与加水量有显著性差异,说明此因素对总多糖含量影响较大,提取时间无显著性差异,其对总多糖含量影响较小。综合以上分析,最佳提取工艺条件为 $A_3B_1D_3$,即:加入12倍量水,提取3次,每次1h。

3.4 验证试验

取已干燥的香菇粗粉3份(20g/份),按上述最佳提取工艺条件进行验证试验,紫外分光光度法测定香菇总多糖的含量,结果见表5。

表5 验证试验结果

Table 5 Results of verification test

试验号	总多糖含量/%	RSD/%
1	5.370	0.84
2	5.410	
3	5.320	

结果表明:经正交试验优选的最佳提取工艺基本稳定、可行。

4 讨论

1)现代研究表明,香菇水提浸膏和香菇总多糖提取物具有良好的治疗高脂血症的作用,另由于多糖溶解于热水而不溶于乙醇,故本实验以水作为提取溶剂水浴提取。

2)本文采用正交设计研究香荷胶囊中香菇的提取工艺,试验结果表明香菇粗粉加入12倍量水,提取3次,每次1h,所得香菇总多糖含量较高,且该提取工艺稳定,方法简便、可行,适用于规模化的生产。

参考文献:

- [1] 王慧铭,夏道宗,夏明,等.香菇多糖降血脂作用及其机制的研究[J].浙江中西医结合杂志,2005,15(10):599-602