

- physical stability [J]. *Int J Pharm*, 2015, 486 (1-2): 175-184.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [13] 陈伶俐, 王振华. 穿心莲内酯基本理化性质考察[J]. 今日药学, 2010, 20(1): 41-43.
- [14] 张志云, 张 维, 王立红, 等. 采用超临界 CO₂ 制备姜黄素羟丙基-β-环糊精包合物[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(12): 1147-1150.
- [15] 朱 甜, 缪虹刚, 林 文, 等. 超临界 CO₂ 抗溶剂法制备谷维素/PVP-K30 固体分散体[J]. 今日药学, 2015, 25(2): 86-89.
- [16] 程泓波, 刘为为, 张少华, 等. 超临界 CO₂ 微乳法制备盐酸小檗碱脂质体工艺的考察与优化[J]. 安徽医药, 2015, 19(1): 18-22.

减压内部沸腾提取川佛手多糖工艺的优化

王 玉¹, 王 佳¹, 李远辉¹, 张帅杰², 李 希^{1,3*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075; 2. 成都百草和济科技有限公司, 四川 成都 610000; 3. 四川省中医药科学院中医研究所, 四川 成都 610031)

摘要: 目的 优化减压内部沸腾提取川佛手多糖工艺。方法 在单因素试验基础上, 以多糖提取量为评价指标, 乙醇体积分数、提取压力、提取温度、提取时间为影响因素, Box-Behnken 响应面法优化工艺。结果 最佳条件为乙醇体积分数 50%, 提取压力 0.07 MPa, 提取温度 75 ℃, 提取时间 5 min, 多糖提取量 70.105 mg/g。结论 该方法稳定可行, 可用于减压内部沸腾提取川佛手多糖。

关键词: 川佛手; 多糖; 减压内部沸腾提取; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)04-0723-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.012

Optimization of decompressing inner ebullition extraction for polysaccharides from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* from Sichuan Province

WANG Yu¹, WANG Jia¹, LI Yuan-hui¹, ZHANG Shuai-jie², LI Xi^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Chengdu Baicao Heji Technology Co., Ltd., Chengdu 610000, China; 3. Institute of TCM, Sichuan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610031, China)

KEY WORDS: *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle from Sichuan Province; polysaccharides; decompressing inner ebullition extraction; Box-Behnken response surface method

佛手为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实, 味辛、苦、酸, 性温, 具有疏肝理气, 燥湿化痰的功效^[1], 主产于四川、云南、浙江、广东、广西、福建等地, 因产地不同有川佛手、金佛手、广佛手、建佛手之分, 主产于四川、云南等地的称为“川佛手”^[2]。其化学成分主要有多糖、挥发油、黄酮、微量元

素、氨基酸等^[3], 其中佛手多糖作为免疫调节剂, 在抗肿瘤、抗病毒及抗衰老等方面应用广泛^[4], 经现代药理研究表明, 佛手多糖对多环节免疫功能有明显促进作用^[5], 具有一定开发前景。

目前, 佛手多糖的提取方法主要有煎煮提取法和回流提取法, 但两者普遍存在提取时间长、速度慢、能耗高、效率低等缺点^[6]。减压内部沸腾提

收稿日期: 2016-09-08

基金项目: 国家中医药管理局公益性科研专项 (201507002-2)

作者简介: 王 玉, 女, 硕士生, 从事中药新药、新技术、新工艺、新剂型研究。Tel: 18382284431, E-mail: 272429134@qq.com

* 通信作者: 李 希, 女, 硕士, 教授, 从事中药新药、新技术、新工艺、新剂型研究。Tel: 18030897734, E-mail: 1836820767@qq.com

取是一种低温快速的有效成分提取方法,即采用少量低沸点有机溶剂润湿待提取物料,然后加入温度高于解吸剂沸点的热溶剂,同时降低操作压强来使解吸剂沸腾,产生对流,强化有效成分的扩散,以乙醇与水为介质,利用两者沸点不同对提取过程进行优化,该方法的优点是提取速度快、能耗低、杂质少、适用范围广等,已广泛应用于黄精多糖、青蒿素、黄芩苷、穿心莲内酯等成分的提取,其提取效率与传统方法相比明显提高^[7-13],故本实验将首次采用该方法提取川佛手多糖。

1 材料

TU-1810PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);旋转蒸发仪、恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂);电热恒温真空干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);JA2003 电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。D-无水葡萄糖对照品(批号 110833-201205,中国食品药品检定研究院)。所用试剂均为分析纯(成都市科龙化工试剂厂);水为纯净水。川佛手(批号 150201,四川利民中药饮片有限责任公司)经成都中医药大学卢先明教授鉴定为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实。

2 方法与结果

2.1 含有量测定 按照 2015 年版《中国药典》,采用紫外-可见分光光度法测定。

2.1.1 供试品溶液制备 将川佛手饮片粉碎,称取 10 g 左右,加入 50% 乙醇 10 mL,20 ℃ 下浸润 30 min,将提取器放入 45 ℃ 水浴中,再倒入 45 ℃ 热水 100 mL,置于减压装置中 5 min,过滤,滤渣同法再次提取,合并滤液,浓缩,加入 95% 乙醇,4 ℃ 下放置 12 h,过滤,洗涤沉淀,定容,即得。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取无水葡萄糖对照品 10.19 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 含无水葡萄糖 0.1019 mg)。

2.1.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,置于具塞试管中,加水至 2.0 mL,摇匀,精密加入 1 mL 5% 苯酚溶液,摇匀,迅速加入 5 mL 浓硫酸,室温下静置 10 min,80 ℃ 水浴中加热 15 min,取出,放至室温,以相应试剂为空白,在葡萄糖最大吸收波长 490 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(A),

溶液质量浓度为横坐标(X)进行回归,得标准曲线 $A = 0.05937X - 0.10007$ ($r = 0.9929$),在 0.0025 ~ 0.0150 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 取供试品溶液 1 mL,加水稀释到 250 mL,取 1 mL,按“2.1.3”项下方法测定,连续 6 次,测得吸光度 RSD 为 1.23%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 精密移取“2.1.1”项下供试品溶液 1 mL,加水稀释到 250 mL,取 1 mL,平行 6 份,按“2.1.3”项下方法测定,测得多糖含量 RSD 为 1.14%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 精密移取“2.1.1”项下供试品溶液 1 mL,加水稀释到 250 mL,取 1 mL,按“2.1.3”项下方法于 0、15、30、45、60 min 测定,测得吸光度 RSD 为 1.06%,表明供试品溶液在 60 min 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密移取“2.1.1”项下供试品溶液 1 mL,加水稀释到 250 mL,取 1 mL,共 9 份,精密加入葡萄糖对照品溶液 0.176、0.223、0.270 mL,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,测得平均加样回收率为 100.03%,RSD 为 2.0%。

2.2 工艺优化

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 乙醇体积分数 将川佛手饮片粉碎,称取 10 g 左右,共 6 份,乙醇用量 10 mL,按“2.1.1”项下方法操作,提取压力 0.075 MPa,提取温度 75 ℃,加入 30%、40%、50%、60%、70%、80% 乙醇解吸 30 min 后提取,结果见图 1。

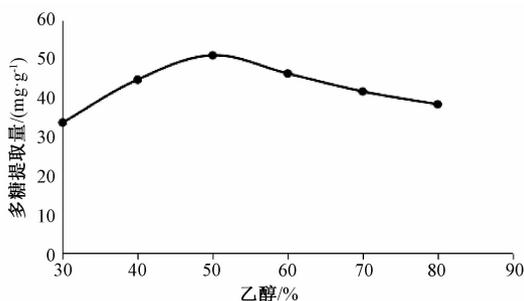


图 1 乙醇体积分数对多糖提取量的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on polysaccharides yield

2.2.1.2 提取压力 将川佛手饮片粉碎,称取 10 g 左右,共 6 份,乙醇体积分数 50%,用量 10 mL,按“2.1.1”项下方法操作,提取压力 0、0.03、

0.05、0.07、0.09 MPa，提取温度 75 °C，解吸 30 min后提取，结果见图 2。

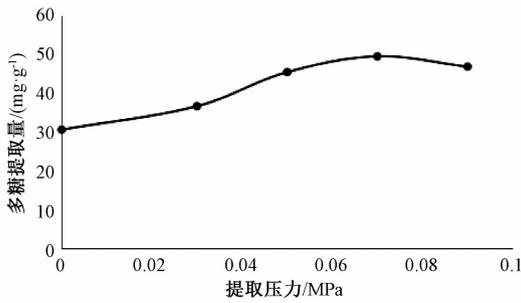


图 2 提取压力对多糖提取量的影响

Fig. 2 Effect of extraction pressure on polysaccharides yield

2.2.1.3 提取温度 将川佛手饮片粉碎，称取 10 g 左右，共 6 份，乙醇体积分数 50%，用量 10 mL，按“2.1.1”项下方法操作，提取压力 0.07 MPa，提取温度 40、50、60、70、80、90 °C，解吸 30 min 后提取，结果见图 3。

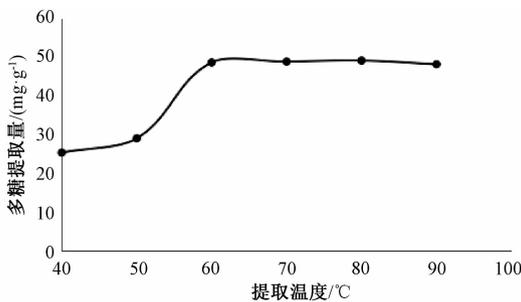


图 3 提取温度对多糖提取量的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on polysaccharides yield

2.2.1.4 提取时间 将川佛手饮片粉碎，称取 10 g 左右，共 6 份，乙醇体积分数 50%，用量 10 mL，按“2.1.1”项下方法操作，提取压力 0.07 MPa，提取温度 75 °C，提取时间 2、5、8、11、14、17 min，解吸 30 min 后提取，结果见图 4。

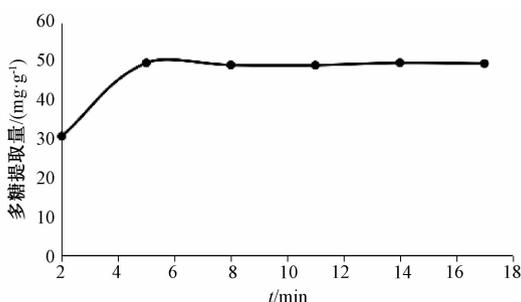


图 4 提取时间对多糖提取量的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on polysaccharides yield

2.2.2 Box-Behnken 响应面法 以乙醇体积分数 (A)、提取压力 (B)、提取温度 (C)、提取时间 (D) 为影响因素，采用 Box-Behnken 响应面法优化。因素水平见表 1，试验设计和结果见表 2。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 乙醇/%	B 提取压力/MPa	C 提取温度/°C	D 提取时间/min
1	40	0.05	60	2
0	50	0.07	75	5
-1	60	0.09	90	8

表 2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A 乙醇/%	B 提取压力/MPa	C 提取温度/°C	D 提取时间/min	多糖提取量/(mg·g ⁻¹)
1	40	0.05	75	5	45.588
2	60	0.05	75	5	49.831
3	40	0.09	75	5	40.424
4	60	0.09	75	5	47.018
5	50	0.07	60	2	40.696
6	50	0.07	90	2	49.125
7	50	0.07	60	8	40.611
8	50	0.07	90	8	49.005
9	40	0.07	75	2	38.576
10	60	0.07	75	2	48.888
11	40	0.07	75	8	42.533
12	60	0.07	75	8	50.002
13	50	0.05	60	5	41.001
14	50	0.09	60	5	40.391
15	50	0.05	90	5	49.999
16	50	0.09	90	5	59.442
17	40	0.07	75	5	35.737
18	60	0.07	75	5	41.538
19	40	0.07	90	5	47.539
20	60	0.07	90	5	47.252
21	50	0.05	75	2	47.192
22	50	0.09	75	2	49.832
23	50	0.05	75	8	51.334
24	50	0.09	75	8	51.796
25	50	0.07	75	5	70.232

将表 2 数据通过 Design-Expert 软件进行效应面分析，以多糖提取量 (Y) 为响应值进行拟合，得方程为 $Y = 70.23 + 2.84A + 0.33B + 5.2C + 0.91D + 0.59AB - 1.52AC - 0.71AD + 2.51BC - 0.54BD - 26.99CD - 14.31A^2 - 9.44B^2 - 13.38C^2 - 11.22D^2$ ($R^2 = 0.9299$)。再进行方差分析，见表 3。

由表 3 可知，该模型有显著性差异 ($P < 0.05$)，而失拟度差异不显著 ($F = 0.12, P > 0.05$)，拟合度和可信度良好，试验误差小，故可用于分析和预测。同时，各因素对多糖提取率的影响程度依次为 $C > A > B > D$ ，即提取温度影响最大，其次是乙醇体积分数和提取压力，提取时间最

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 147.71	14	81.98	9.30	0.000 6
A	97.07	1	97.07	11.01	0.007 8
B	1.31	1	1.31	0.15	0.708 4
C	324.35	1	324.35	36.79	0.000 1
D	10.03	1	10.03	1.14	0.311 2
AB	1.38	1	1.38	0.16	0.700 5
AC	9.27	1	9.27	1.05	0.329 5
AD	2.02	1	2.02	0.23	0.642 5
BC	25.26	1	25.26	2.86	0.121 4
BD	1.19	1	1.19	0.13	0.721 5
CD	4.47	1	4.47	4.60	0.995 4
A ²	577.91	1	577.91	65.54	<0.000 1
B ²	251.67	1	251.67	28.54	0.000 3
C ²	505.49	1	505.49	57.33	<0.000 1
D ²	355.67	1	355.67	40.34	<0.000 1
残差	88.17	10	8.82	—	—
总离差	1 235.88	24	—	—	—

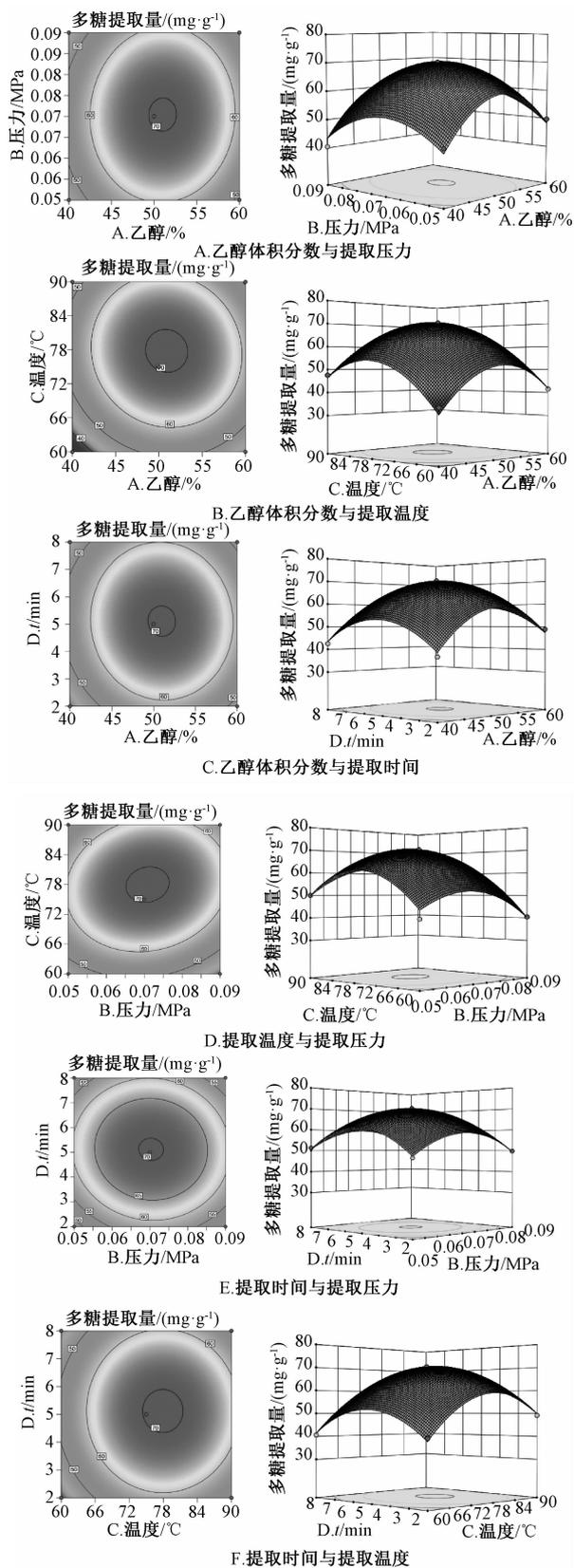
小。再进行响应面分析,结果见图5。

2.2.3 验证试验 通过 Design Expert 软件,得到最优工艺为乙醇体积分数 51.28%, 提取压力 0.07 MPa, 提取温度 75.36 °C, 提取时间 5.11 min。结合实际操作,将其修正为乙醇体积分数 50%, 提取压力 0.07 MPa, 提取温度 75 °C, 提取时间 5 min。再进行 3 批验证试验,测得多糖提取量分别为 70.001、69.983、70.332 mg/g, 平均 70.105 mg/g, 与预测值 70.468 mg/g 相当,表明该方法预测性良好,重复性理想。

3 讨论

减压内部沸腾提取法将传统水提和醇提综合应用,在快速低温下提取,杂质少,成本低。在应用该方法提取川佛手多糖时,先以少量乙醇浸润,再加入温度达到乙醇沸点的水进行提取,可快速得到该成分。本实验确定的最佳条件与文献 [14] 相比,提取时间缩短了 12 倍,乙醇用量减少了 10 倍,多糖提取量增加了 2 倍。《中国药典》中佛手的含有量检测指标为橙皮苷,而本实验发现采用该方法提取时不影响其含有量^[1],故减压内部沸腾法提取川佛手多糖是一条理想的工艺路线。

应用 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺时,在单因素试验的基础上展开,可充分考虑到各因素之间的相互作用,并采用非线性模型拟合,可信度高,预测性强,具有较好的推广应用价值^[15-16]。本实验首次采用该方法对川佛手多糖减压内部沸腾提取工艺进行优化,可为进一步开发该成分提供实验依据。



注:左图均为等高线图,右图均为响应面图

图5 响应面分析图

Fig. 5 Images for response surface analysis

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 178.

[2] 肖培根. 新编中药志: 第2卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 304.

[3] 严 玮. 佛手化学成分和药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2015, 31(8): 788-790.

[4] 朱晓艳. 佛手多糖分离纯化结构分析及抗氧化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.

[5] 黄 玲, 张 敏. 佛手多糖对小鼠免疫功能影响[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(5): 324-325.

[6] 蓝峻峰, 刘 琨. 内部沸騰法提取叶下珠没食子酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 63-65.

[7] 冉建明, 田 茜, 何 晨, 等. 解吸-减压内部沸騰法提取黄苏普的工艺研究[J]. 中成药, 2016, 38(4): 944-947.

[8] 石灵高. 银杏总黄酮减压内部沸騰法提取及分离工艺研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.

[9] 李春玲, 翁艳英, 赵钟兴, 等. 三七总皂苷的减压内部沸騰提取及树脂吸附分离[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 372-373.

[10] 石灵高, 韦藤幼. 减压内部沸騰法提取银杏总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2701-2703.

[11] 杨军宣, 张 毅, 吕姗姗, 等. 减压内部沸騰法提取黄精多糖工艺[J]. 中成药, 2016, 38(2): 460-463.

[12] 翁艳英, 韦藤幼, 童张法. 内部沸騰法提取三七多糖的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1435-1436.

[13] 冉建明, 田 茜, 何 晨, 等. 解吸-减压内部沸騰法提取黄芩苷的工艺研究[J]. 中成药, 2016, 38(4): 944-947.

[14] 李 勇, 姚 曦. 不同炮制方法对佛手总多糖含量的影响[J]. 中国药业. 2012, 21(4): 24-26.

[15] 张文秀, 朱卫丰, 聂鹤云, 等. Box-Behnken 响应面法优化马钱子提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1932-1936.

[16] 臧巧真, 唐 涛, 龙凯花, 等. Box-Behnken 效应面法优化 α -细辛脑长循环纳米粒制备工艺[J]. 中成药, 2016, 38(2): 456-460.

山香圆叶提取液纯化工艺的优化

罗开沛, 李小芳*, 林 浩, 罗 佳, 杨 露, 刘海霞, 严敏嘉

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137)

摘要: 目的 优化山香圆 *Turpinia arguta* (Lindl.) Seem. 叶提取液纯化工艺。方法 以总黄酮、女贞苷、野漆树苷的吸附率和解吸率为评价指标, 上样液和洗脱剂(乙醇)的质量浓度(或体积分数)、体积流量、用量为影响因素, 静态吸附试验筛选大孔吸附树脂, 并结合动态吸附优化工艺。结果 最佳条件为 HPD300 大孔吸附树脂, 上样液质量浓度 0.2 g/mL, 体积流量 1 mL/min, 上样量 30 mL, 2 BV 去离子水洗涤, 6 BV 50% 乙醇以 1 mL/min 体积流量洗脱, 总黄酮、女贞苷、野漆树苷含有量分别为 53.95%、13.74%、4.07%。结论 该方法简单准确, 稳定可靠, 可用于纯化山香圆叶提取液。

关键词: 山香圆; 叶; 纯化; 总黄酮; 女贞苷; 野漆树苷; 大孔吸附树脂

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)04-0727-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.013

Optimization of purification of extract from *Turpinia arguta* leaves

LUO Kai-pei, LI Xiao-fang*, LIN Hao, LUO Jia, YANG Lu, LIU Hai-xia, YAN Min-jia

(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—State Key Laboratory

收稿日期: 2016-06-13

基金项目: 四川省科技厅“苗子工程”重点项目(2016RZ0037); 四川省教育厅重点项目(15ZA0094); 成都中医药大学科研实践创新课题(ky2016-188)

作者简介: 罗开沛(1991—), 男, 硕士, 中药师, 研究方向为中药新制剂、新技术。Tel: 15351218131, E-mail: luokaipei@126.com

* 通信作者: 李小芳(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新技术。Tel: 13808195110, E-mail: lixiaofang918@163.com