

不同提取工艺对黄芪总皂苷提取效果的研究

侯美如,刘 宇,王 岩,尹琚伊,周庆民,秦平伟,史同瑞*,杨淑萍

(黑龙江省兽医科学研究所 黑龙江齐齐哈尔 161006)

[收稿日期] 2016-07-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 12-0000-00 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 为了研究黄芪经发酵后对黄芪总皂苷释放量的影响。采用水浸法、水煎法提取黄芪与发酵黄芪中总皂苷,利用紫外分光光度法测定黄芪总皂苷的提取量。结果显示,发酵黄芪经水浸法、水煎法提取的总皂苷量分别为 6.568、4.843 mg/g,显著高于对照黄芪的提取量 5.356、4.007 mg/g。黄芪经产纤维素酶解淀粉芽孢杆菌发酵后,可有效提高黄芪总皂苷的释放量,长时间水煎会致皂苷受损,致使含量降低。

[关键词] 发酵中药;黄芪甲苷;释放量

Effect of Different Extraction Processes on the Content of the Total Saponins of Astragalus

HOU Mei-ru, LIU Yu, WANG Yan, YIN Jun-yi, ZHOU Qin-min,

QIN Ping-wei, SHI Tong-rui*, YANG Shu-ping

(Heilongjiang Institute of Veterinary Medicine Science, Qiqihaer, Heilongjiang 161006, china)

Abstract: In the present, the influence of fermented extraction of the total saponins in astragalus was investigated. Water immersion method and water decoction method were used to extract the total saponins in astragalus and fermented astragalus. The extracted content of total saponins in astragalus were detection using UV spectrophotometry. The content of total saponins in fermented astragalus extracted utilizing water immersion method and water decoction method were 6.568 and 4.843 mg/g, respectively, the result was significantly higher than the control group, which the content of total saponins were 5.356 and 4.007 mg/g, respectively. This results indicated that the release content of the total saponins in astragalus could be efficiently improved after the astragalus was fermented by cellulase-producing *Bacillus amyloliquefaciens*, and long-time decoction will caused damage to saponins and resulted in reducing of the content of total saponins.

Key words: fermentation of traditional Chinese medicine; total saponins; release amount

黄芪总皂苷是中药黄芪中的重要生理活性成分,因此黄芪总皂苷常作为黄芪药材的定性定量指

基金项目:黑龙江科技计划项目:生物发酵中药制剂的研究与开发(GC13B404)

作者简介:侯美如,中级研究员,从事疾病预防方向研究。

通讯作者:史同瑞。E-mail: systr@sina.com

标^[1]。中草药有效成分的释放量直接影响着其药效的发挥。根据中草药种类及其有效活性成分性质的不同,应选择较为适宜的提取工艺,以提升有效成分的提取率,提高中药疗效。中药提取有着悠久的历史,冷浸渍法、回流法、煎煮法、索氏提取法等都是传统的提取分离手段^[2]。然而这些提取工艺往往存在提取时间长、溶剂消耗大、提取效率低下、杂质含量大、操作流程复杂等缺点。随着中药发酵技术的不断开展,大量学者运用发酵技术以实现中药有效成分的释放,这不仅能提高中药有效成分的释放量,而且还可通过微生物对中药的纤维、糖类、蛋白质等成分的利用和转化,产生包含多种活性成分的制剂或新药^[3]。

研究证实,黄芪中黄芪总皂苷是心脏正性肌力作用的主要有效成分,也是降压的有效成分之一^[4]。目前,黄芪皂苷提取方法常采用超声波提取法、索氏提取器提取法、发酵法、酶解法、浸泡提取法和大孔树脂吸附法^[1,5]。研究利用分离筛选的产纤维素酶解淀粉芽孢杆菌对中药黄芪进行了发酵,为检验生物发酵对中药活性成分释放量的影响,以黄芪总皂苷为考察指标,比较了生物发酵发与普通传统提取方法对黄芪皂苷的提取效果,旨在为黄芪活性成分提取提供更为简单、高效的方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂黄芪,河北凯达药业有限公司产品;黄芪甲苷对照品(批号:20151213),上海金穗生物科技有限公司;其它试剂均为分析纯。黄芪固态发酵培养基:黄芪粉(过40目筛)30 g、黄豆粉10 g、 CaCO_3 0.2 g、水 59.8 mL。解淀粉芽孢杆菌 SSYB 菌株,由本研究室分离鉴定并保存。

1.2 仪器设备

UV-1900PC 双束紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;分析天平,常州万泰天平仪器有限公司;电热恒温干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司;低速离心机:上海安亭科学仪器厂;振荡器:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

1.3 总皂苷提取方法

1.3.1 发酵水浸法 取解淀粉芽孢杆菌 SSYB 菌

株普通肉汤培养种子液,按 2% 接种量接种黄芪固态发酵培养基,置 37 ℃ 环境培养 72 h。取发酵黄芪样品 100 g,加入超纯水 500 mL,混匀,置振荡器中振荡浸泡 60 min,以 4000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于 500 mL 容量瓶中定容。

1.3.2 水浸法 取含 2% 普通肉汤的黄芪固态发酵培养基,置 37 ℃ 环境放置 70 h-72 h,然后取未经发酵的黄芪固态发酵培养基 100 g,加入超纯水 500 mL,混匀,置振荡器中振荡浸泡 60 min,以 4000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于 500 mL 容量瓶中定容。

1.3.3 发酵水煎法 取按 1.3.1 发酵法发酵的黄芪样品 100 g,加入超纯水 500 mL,混匀,浸泡 30 min,以武火煮沸后,再以文火煮 1 h,边水煎边补水。水煎黄芪固态发酵培养物经 4000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于 500 mL 容量瓶中定容。

1.3.4 水煎法 取含 2% 普通肉汤的黄芪固态发酵培养基,置 37 ℃ 环境放置 70 h-72 h,然后取未经发酵的黄芪固态发酵培养基 100 g,加入超纯水 500 mL,混匀,浸泡 30 min,以武火煮沸后,再以文火煮 1 h,边水煎边补水。水煎黄芪固态发酵培养基经 4000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于 500 mL 容量瓶中定容。

1.4 样品中黄芪总皂苷的提取

参照文献方法^[6],取 1.3 所述四种方法的提取液各 50 mL,分别置于分液漏斗中,加入正丁醇 50 mL,进行萃取。弃液再次用正丁醇萃取,合并正丁醇萃取液,加入 1% NaOH 溶液 100 mL,洗涤 3 次,除色素后用超纯水洗至中性,收集正丁醇溶液,置 70 ℃ 水浴挥干溶剂,加甲醇溶解,定容于 25 mL 容量瓶中,备用。

1.5 黄芪总皂苷的测定

1.5.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 15.0 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解定容,混匀,即得黄芪甲苷对照品溶液。

1.5.2 黄芪甲苷标准曲线的建立 准确吸取黄芪甲苷对照品溶液 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mL 于试管中,置 70 ℃ 水浴中挥干溶剂,加入

新配制的 5% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,70 ℃ 水浴作用 15 min,取出放冰水浴中,冷却,加入冰醋酸 5 mL,摇匀,以试剂作空白对照,在筛选确定的测定波长 543 nm 处测定黄芪甲苷吸光度值。用甲苷质量浓度(C)作横坐标,以吸光度值(A)作纵坐标,绘制标准曲线。

1.5.3 样品溶液及其显色后的稳定性试验 取发酵法黄芪皂苷提取液,置室温分别放置 0、1、2、3、4 h,取提取液 25 μL,按 1.4.2 方法进行显色后测定吸光度值。另取黄芪皂苷提取液 25 μL,依法进行显色,在室温分别放置 0、1、2、3、4 h,测定吸光度值,计算样品中每克黄芪的总皂苷含量。

1.5.4 重复性试验 取同批发酵法黄芪皂苷提取液样品 6 份,按 1.5.2 方法测定吸光度值,计算样品中每克黄芪的总皂苷含量。

1.5.5 回收率试验 精密称取已知甲苷含量的发酵法黄芪皂苷提取液样品 6 份,加入一定量的甲苷对照品溶液,按 1.5.2 方法显色后测定吸光度值,计算样品中的皂苷含量,并计算回收率。

1.5.6 总皂苷提取量的测定 取样品提取液 25 μL,分别放入干燥试管中,水浴挥干溶剂,按 1.5.2 方法显色,在 543 nm 波长处测定吸光度值,代入标准曲线及计算公式,得黄芪总皂苷提取量。

计算公式: $X = (C \times V_0 \times V_1 \times N) / (M \times V_2 \times$

1000)

式中:X 一样品中每克黄芪总皂苷含量(mg/g)

V_0 一经萃取后的样品总皂苷提取液(mL)

V_1 一显色反应体系体积(mL)

V_2 一测定吸取体积(mL)

C 一从标准曲线计算出的待测液中总皂苷浓度(μg/mL)

M 一样品中黄芪质量(g)

N 一样品提取液与待萃取样品提取液的体积比

1.6 统计学分析软件 数据统计使用 SAS (SAS forw indows, Version 8.2)软件包中的 stat 模块中的平衡试验设计中的 Anova 过程,多重比较用 Duncan 法进行。

2 结 果

2.1 黄芪甲苷标准曲线 以 543 nm 为检测波长,测定浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μg/mL 溶液的吸光度值,结果分别为 0.043、0.069、0.091、0.116、0.139、0.165。回归方程为: $A = 0.0241C + 0.0193$ $R^2 = 0.9996$ 。试验表明,在 1.0 - 6.0 μg/mL 浓度范围内,吸光度值与浓度呈良好的线性关系。

2.2 样品溶液及其显色后溶液的稳定性 样品溶液及其显色后稳定性试验结果显示,其 RSD 分别为 0.0693% 和 0.1473%,结果表明,样品溶液及其显色后溶液在 4 h 内稳定,见表 1。

表 1 稳定性试验结果

样品溶液			显色后溶液		
时间(h)	含量(mg/g)	RSD (%)	时间(h)	含量(mg/g)	RSD (%)
0	6.564		0	6.564	
1	6.558		1	6.559	
2	6.563	0.0693	2	6.552	0.1473
3	6.555		3	6.546	
4	6.566		4	6.540	

2.3 重复性试验结果 由表 2 可知,黄芪总皂苷平均含量为 6.561 ± 0.0045 mg/g, RSD 为

0.0678%,方法重复性良好。

表 2 重复性试验测定结果

样品总皂苷测定量 (mg/g)						平均含量 (mg/g)	RSD (%)
1	2	3	4	5	6		
6.562	6.558	6.567	6.554	6.561	6.563	6.561 ± 0.0045	0.0678

2.4 回收率试验结果 由表 3 可知,其平均回收率为 100.12 ± 0.26%, RSD 为 0.2543%,结果表明,本法具有良好的回收率。

表 3 回收试验测定结果

编号	已知量 (mg)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD
1	6.560	0.50	7.064	100.06	100.12 ± 0.26	0.2543
2	6.551	0.60	7.146	99.93		
3	6.562	0.70	7.257	99.93		
4	6.564	0.80	7.371	100.10		
5	6.556	0.90	7.502	100.62		
6	6.563	1.00	7.570	100.09		

2.5 不同工艺对黄芪总皂苷的提取效果 由表 4 可知,发酵水浸法黄芪总皂苷提取量最高,达到 6.568 ± 0.0068 mg/g,其次为水浸法,为 5.356 ± 0.0061 mg/g,水煎法最低,为 4.007 ± 0.0123 mg/g。发酵水浸法较水浸法的总皂苷的提取量提高了 22.63%,水煎法组较水浸法组质量分数降低了 33.67%,发酵水煎组较水煎法组总皂苷质量分数有所增加,但仍低于水浸法组。

表 4 不同工艺对黄芪甲苷的提取效果 (n=3)

组别	发酵水浸法	水浸法	发酵水煎法	水煎法
总皂苷含量 (mg/g)	6.568 ± 0.0068 ^d	5.356 ± 0.0061 ^c	4.843 ± 0.0091 ^b	4.007 ± 0.0123 ^a

同一列中上标字母完全相同者差异不显著 (P > 0.05),完全不同者差异极显著 (P < 0.05),有相同字母者差异显著。

3 讨论

目前,常用的定量测定黄芪中黄芪总皂苷的方法有薄层扫描法、高效液相色谱法、薄层色谱-分光光度法、比色法、紫外分光光度法等测定方法^[7]。紫外分光光度法不仅能测定有色物质,还能精确测定有共轭结构的无色物质,属于经典、成熟的方法。因其简便、灵敏、适应面广、常用于皂苷的分析^[8]。因此本试验采用紫外分光光度法测定总皂苷含量。本试验结果表明,水煎法黄芪总皂苷的提取量均低于相应的水浸法,说明皂苷的热稳定性可能较差,长时间的高温处理会使皂苷受损而致含量下降,这与一些学者研究结果一致。黄芪甲苷在药材中主要是以其结构中 C-3 位木糖基上不同位置羟基的乙酰化物的形式存在,研究中发现,因黄芪甲苷乙酰化物的化学不稳定性,在制剂生产工艺过程中黄芪甲苷含量受不同处理条件影响较大^[9]。郁

帅陆等^[10]研究证实,黄芪经高温处理后,其皂苷含量降低了 63.2%,推测是在高温处理的过程中,可能使极性皂苷中连接苷元和多糖的糖苷键部分断裂生成非极性的皂苷元,从而不能经极性较大的甲醇提取出来,同样本试验也采用了醇类作为萃取剂对黄芪皂苷进行萃取,因为导致皂苷提取量较低。有关黄芪总皂苷热稳定性的研究报道较少,但对人参总皂苷热稳定性的研究相对较多。余潇苓等^[11]研究证实,对红参须中的 5 种皂苷高温处理后,其皂苷含量均有所下降,5 种皂苷发生了不同程度的降解反应,并发现皂苷糖基的不同结构决定了降解速率的差异。林龙飞等^[12]对人参茎叶水提液中的 2 种皂苷的热稳定性进行了研究,发现 2 种皂苷均发生了不同程度的降解,并随加热时间延长和温度的升高,其降解速率也随之加快,在 100℃、80℃和 60℃条件下加热 12 h,皂苷分别降至初始

含量的20%、60%及80%,推测是加热条件下发生水解、脱掉糖基,生成皂苷元,使2种皂苷含量下降。由于黄芪总皂苷与人参总皂苷的组成成分及比例存在一定差异,高温引起总皂苷含量下降的原因也可能存在差异。高温处理引起黄芪皂苷含量降低是由于皂苷极性转变影响了测定结果,还是由于皂苷发生了降解或转化成其它物质,尚需进一步研究加以解释。

试验采用水浸法和水煎法两种工艺,比较了发酵黄芪对活性成分总皂苷释放的影响,结果表明,不论是水浸法,还是水煎法,发酵黄芪总皂苷的提取量均显著高于非发酵黄芪。这说明黄芪经过产纤维素酶解淀粉芽孢杆菌发酵后,发酵菌产生的纤维素酶降解了中草药细胞壁的组成成分纤维素、木质素等,使包裹在细胞壁内活性成分得以释放,因此,应用产纤维素酶微生物发酵中药有利于活性成分的释放^[13]。中药发酵无需化学提取剂,工艺简单,成本低,且本试验采用解淀粉芽孢杆菌作为发酵菌种,安全性好,一些学者^[14-16]将其作为益生菌添加剂添加到饲料,以提高动物生产性能,因此,发酵法在提高中药有效成分释放的同时,还可补充益生菌,两者协同作用,增强动物抗病力,提高动物生产性能。

参考文献:

- [1] 段亚丽,谢梅冬. 黄芪化学成分及其有效成分黄芪甲苷含量测定的研究现状[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(3): 35-38.
- [2] 刘 杨. 中药有效成分分析的新方法新技术研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [3] 徐荣芳,薛慧清,闫润红,等. 黄芪药材的发酵研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(3): 136-137.
- [4] 郭晓宇,陈建平,汤化琪,等. 中药材皂苷提取方法与工艺研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 42(4): 12-14.
- [5] 徐先祥,张 睿,夏伦祝. 黄芪皂苷的三种提取方法对黄芪甲苷含量的影响[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(4): 12-14.
- [6] 郑立莹,魏彦明,陈 龙. 纤维素酶在黄芪有效成分提取中的应用[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(1): 94-97.
- [7] 张 娟,路金才. 皂苷的提取方法及含量测定研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(3): 25-29.
- [8] 夏广萍,刘 鹏,韩英梅. 不同处理方法和不同产地黄芪药材中黄芪甲苷的含量测定[J]. 中药材, 2008, 31(3): 385-387.
- [9] 郁帅陆,何 旬,陆利霞,等. 黄芪固态发酵中有效成分的变化[J]. 食品与药品, 2007, 9(3A): 8-10.
- [10] 余潇苓,苗 青,方翠芬. 人参皂苷水溶液热稳定性研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(12): 1109-1112.
- [11] 林飞龙,杨 培,闫 磊,等. 人参茎叶水提液中人参皂苷热稳定性研究及其有效期推算[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 137-141.
- [12] 李红亚,李术娜,王树香,等. 解淀粉芽孢杆菌 MN-8 对玉米秸秆木质纤维素的降解[J]. 应用生态学报, 2015, 26(5): 1404-1410.
- [13] 张 娟,杨彩梅,曹广添,等. 解淀粉芽孢杆菌及其作为益生菌的应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 863-867.
- [14] 沈勇涛. 芽孢杆菌对母猪仔猪微生态的影响及其生长条件优化[D]. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [15] 杨敏馨,寇 涛,李 悦,等. 解淀粉芽孢杆菌 ES-2 对肉鸡屠宰性能和肉品质及肌肉抗氧化能力的影响[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(2): 255-261.
- [16] 王世琼. 解淀粉芽孢杆菌对肉仔鸡饲喂效果的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2015.

(编辑:陈 希)