

复合酶法提取远志总皂苷的工艺研究*

□王颖莉** 张丹丹 (山西中医学院 太原 030024)

摘要:目的:研究酶法结合传统回流法提取远志总皂苷工艺条件。方法:利用可见分光光度法测定远志总皂苷含量;考察植物复合酶的酶解时间、酶解温度对传统提取工艺的强化效果;通过显微结构图和红外光谱图说明了复合酶法强化传统提取法的作用方式及提取物的结构。结果:酶用量为 0.4% 时,适宜酶解温度为 55℃,最优酶解时间为 0.5h。结论:复合酶法结合传统回流提取后,可提高远志总皂苷提取率、缩短提取时间、减少乙醇使用量,对于远志流浸膏的高效提取具有一定指导意义。

关键词:远志总皂苷 复合酶法 显微结构 红外光谱 远志流浸膏

远志来源于远志科植物远志 (*Polygala tenuifolia* Willd.) 或卵叶远志 (*Polygala sibirica* L.) 的干燥根^[1], 始载于《神农本草经》,列为上品,具有安神益智、祛痰、消肿之功效,常用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘、惊悸、咳痰不爽、疮疡肿毒、乳房肿痛等症。远志主要含有皂苷、口山酮、生物碱、糖及低聚糖酯、脂肪油等成分,其中远志皂苷为镇静、祛痰的有效成分^[2-4]。因此,研究提高远志总皂苷的提取效率有着重要的意义。

皂苷的提取方法主要有传统回流、超声波、生物酶等方法^[5-8]。未见关于传统回流与酶法相结合提取远志总皂苷的研究。本研究拟以远志总皂苷含量为指标,初步考察了复合酶法结合传统回流法的最优提取工艺条件。

一、实验材料

1. 主要仪器与试剂

收稿日期: 2009-07-30

修回日期: 2009-08-18

* 山西省卫生厅科技攻关计划项目(2008034):远志皂苷提取分离方法研究,负责人:王颖莉。

** 联系人:王颖莉,副高,主要研究方向:中药提取分离研究及工艺设计,E-mail:wyltyut@163.com。

VIS-723G 可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);FA/JA 1004 型万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司);HH-2 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);PHG-9075A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海-恒科学仪器有限公司);HX-200A 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金具厂);索氏提取器等。

SPE-001 植物复合酶(夏盛实业集团有限公司)主酶系为纤维素酶与果胶酶等,是植物类药材皂苷提取专用酶。所用试剂石油醚(30~60℃)、95%乙醇、甲醇、香草醛、冰乙酸和高氯酸等均为分析纯。

2. 药材和对照品

本实验所需远志药材(产地:山西;产品批号:081015)经本院中药鉴定教研室裴香萍老师鉴定。远志皂苷元化学对照品(批号:111572-200702)购于中国药品生物制品检定所。

二、含量测定

1. 脱脂

远志药材置于 61~63℃ 电热恒温鼓风干燥箱中,干燥 12h 后取出,粉碎(过 20 目筛)。称取远志粉末适量,置于 500mL 圆底烧瓶中,在常压 45℃ 水浴中加热回流,用石油醚脱脂 2 次(固液比为 1:6 和 1:4),每次 1h,过滤,药渣挥尽石油醚。

2. 对照品溶液的制备

精密称取远志皂苷元对照品 0.007g,加适量甲醇溶解并定容至 10mL 的容量瓶中,作为对照品溶液(浓度为 $0.7\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[6]。

3. 供试品溶液的制备

(1) 传统回流法。

取脱脂后远志粉末 2.0g(过 20 目筛),置于索氏提取器中,加入 150mL 不同浓度的乙醇溶液,加热连续回流一定时间,挥干提取液中的乙醇,残渣用适量甲醇溶解,过滤并定容至 25mL 容量瓶中,即得。

(2) 复合酶法结合传统回流法。

将脱脂后远志粉末 2.0g(过 20 目筛),加入 47mL 水恒温浸泡 30min;复合酶加水活化 10min 后,缓缓加入渍泡过的远志粉末中,并轻轻搅拌,恒温酶解一定时间。酶解结束后,将远志粉末置于索氏提取器中,加入 95%乙醇溶液 103mL,使乙醇提取液的浓度为 65%,加热连续回流 1h,挥干定容,即得。

4. 标准曲线的制备

精密吸取标准品溶液与供试品溶液 $40\mu\text{L}$ 于具塞试管中,以 5%香草醛-冰醋酸-高氯酸为显色剂^[6],在 400~600nm 范围内扫描测定最大吸收度。结果显示对照品与供试品在 568nm 处均有最大吸收波长,标准曲线方程 $C=0.059A+0.005$, $r=0.9932$,其中 A 为吸收度值,C(mg)为远志皂苷的含量。

5. 样品含量测定

精密吸取各供试液,依法显色,在 568nm 处测定吸光值,按标准曲线方程计算远志总皂苷含量。

三、实验结果与讨论

1. 传统回流法

影响传统回流法提取总皂苷的主要因素有乙醇浓度、回流时间。

同一浓度的乙醇,随着回流时间的增加,远志总皂苷的提取率增加。75%乙醇回流提取 3h,远志总皂苷提取率最高为 1.75%。实验结果如图 1。

2. 复合酶法结合传统回流法

酶法提取的效果主要取决于酶的种类、用量、酶

解时间、酶解温度。复合酶 SPE-001 主要适用于植物类药材的根、茎、叶、花、果中皂苷的提取,推荐用量为 0.3~0.5%(药材干重),实验选择酶加入量为药材质量的 0.4%,选取酶解时间、酶解温度进行实验。

(1) 酶解时间对远志总皂苷提取率的影响。

不同的植物药材部位,其细胞壁的性能不同,因而复合酶对其作用所需的时间不同,实验研究了酶解温度为 45℃ 时,酶解时间为 0.5、1、1.5、2、2.5 和 3h,乙醇浓度为 65% 时,其对提取率的影响结果,见图 2。

随着酶解时间增加,远志总皂苷提取率增加,酶解时间从 2.5h 延长至 3h,远志总皂苷提取率增加很小。利用复合酶强化乙醇回流提取时,在酶解温度为 45℃ 时,酶解时间以 2.5h 为宜。

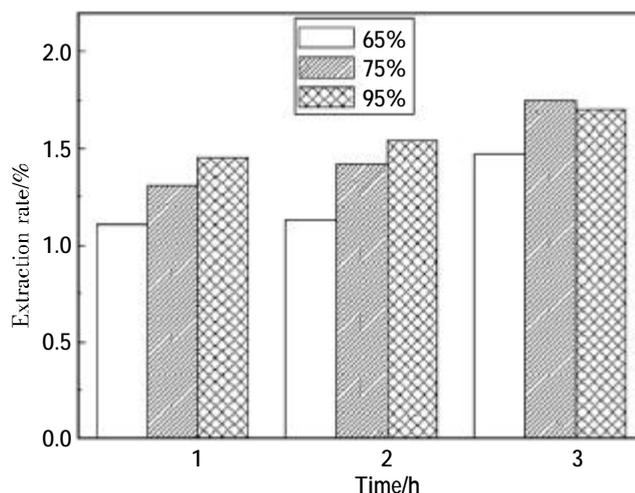


图 1 传统回流法提取时间、乙醇浓度对提取率的影响

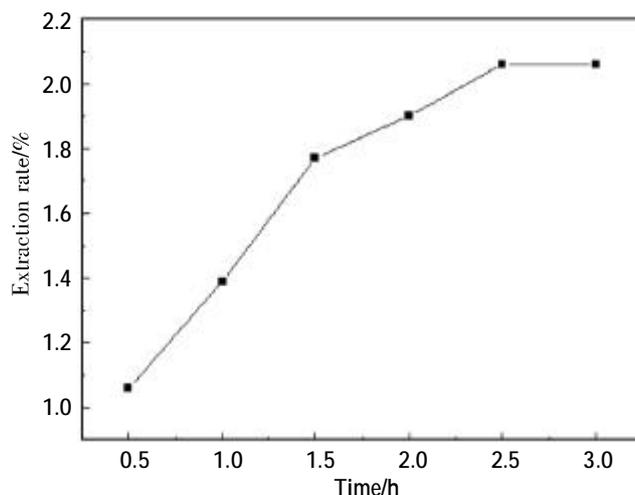


图 2 酶解时间与远志总皂苷提取率间的关系图

(2) 酶解温度对远志总皂苷提取率的影响。

复合酶的作用温度大多在 40~65℃之间,酶作用的发挥与酶解温度有很大的关系。在其它实验条件相同情况下,考查了酶加入量为 0.4%,酶解 1h,65%乙醇回流提取 1h,酶解温度对远志总皂苷提取率的影响结果,见图 3。

在 55℃时,植物精提复合酶发挥了很好的作用,即 SPE-001 植物精提复合酶应用于远志总皂苷提取时,其适宜的酶温度是 55℃。

3. 传统回流法与复合酶解法结合传统回流法提取效果对比

传统回流法,取脱脂后远志粉末 2.0g(过 20 目筛),65%乙醇 150mL,索氏连续回流提取 1h,提取率为 1.11%;75%乙醇 150mL 回流提取 3h,远志总皂苷提取率最高为 1.75%。

复合酶解法结合传统回流法,取脱脂后远志粉末 2.0g(过 20 目筛),加入 47mL 水恒温浸泡 30min;酶加入量为 0.4%,55℃酶解时间 0.5h 后;将远志粉末置于索氏提取器中,加入 95%乙醇溶液 103mL,控制乙醇量为 150mL 浓度为 65%,加热连续回流 1h,远志总皂苷的提取率达 2.06%。

在回流条件相同条件下,加入复合酶可提高远志总皂苷的收率。传统回流提取法,75%乙醇 150mL,提取 3h,提取率为 1.75%;加入复合酶后,65%乙醇 150mL,提取率达 2.06%。因此,复合酶解法结合传统回流法,在提高远志总皂苷收率的基础上,还节约了提取时间,减少醇溶剂的用量。

4. 显微结构分析

远志总皂苷主要分布于远志韧皮薄壁细胞中^[9],在显微镜下对远志粉末及酶法提取后的残渣进行观察,其显微结构变化如图 4。

在远志薄壁细胞中含有大量的油脂粒,经脱脂,复合酶提取后,观察到薄壁细胞中几乎不存在油脂,但有大量破裂的薄壁细胞壁存在,说明复合酶通过破坏细胞壁而提高了远志总皂的提取率,复合酶对提高远志总皂苷的提取率有明显的作。

5. 远志皂苷元的定性分析

取制备好的供试品溶液 20mL,置于蒸发皿中蒸干,残渣加 10%盐酸溶液 20mL,微热使溶解,置沸水浴中水解 2h,取出,滤过,沉淀用蒸馏水洗至中性,连同滤纸置于锥形瓶中,加甲醇 40mL,超声处理 30min,滤过,滤液置 25mL 容量瓶中,加甲醇置刻度

线,摇匀,即得远志总皂苷元供试品^[10]。

用红外光谱仪测定从远志总皂苷中提取的远志皂苷元(用 KBr 压片),其结果见图 5a 所示,从图中看出,在 3414 cm^{-1} ,2936 cm^{-1} ,2865 cm^{-1} ,1698 cm^{-1} 处有典型的吸收峰。图 5a 的红外吸收波长,在图 5b 的远志皂苷元对照品中基本可找到,说明它们有相同的远志皂苷元骨架。但由于没有经过纯化处理,提取得到的远志皂苷元中含有杂质,造成与对照品的红外光谱图略有区别。

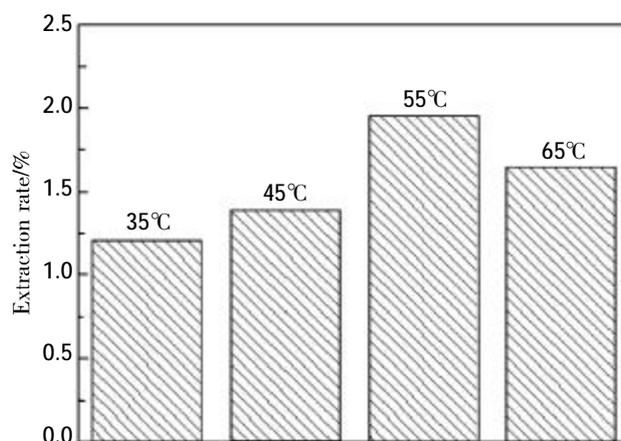


图 3 酶解温度对提取率的影响

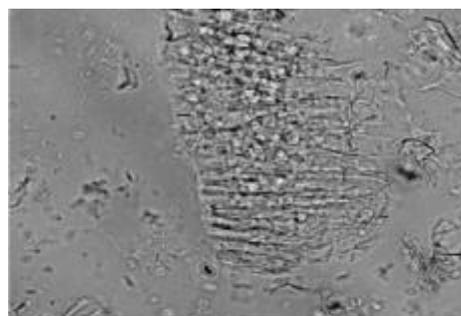


图 4a 远志粉末显微图

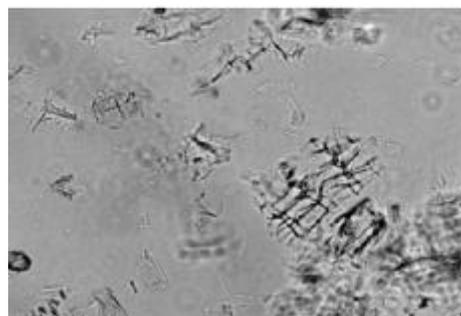


图 4b 远志粉末经复合酶提取后显微图

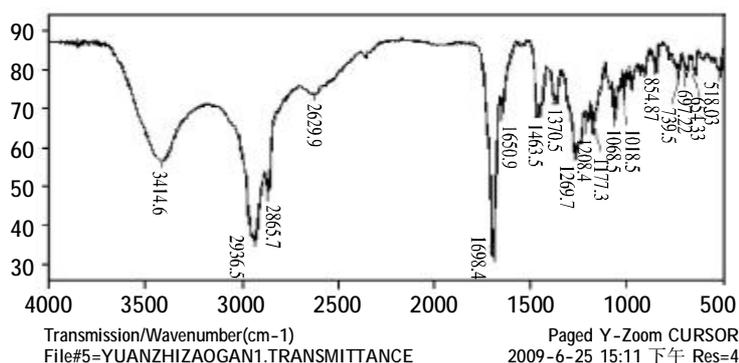


图 5a 远志皂苷的红外光谱图

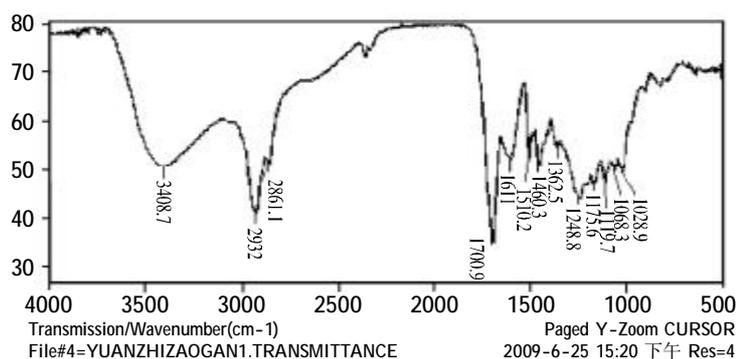


图 5b 远志皂苷元对照品的红外光谱图

四、结论

采用传统乙醇回流法提取远志总皂苷, 延长提取时间可提高远志总皂苷的提取率。用 75% 的乙醇连续索氏提取 3h, 远志总皂苷提取率达 1.75%。

利用复合酶强化传统回流提取工艺, 复合酶用量为 0.4%, 酶解温度为 55℃, 酶解时间为 0.5h, 再进

行传统回流提取工艺 1h 后, 总皂苷提取率可达 2.06%。

采用酶法强化不仅可提高远志总皂苷提取率, 同时可缩短提取时间, 减少有机醇溶剂的使用量, 对于提取远志流浸膏过程具有一定意义。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 107.
- 2 傅晶, 张东明, 陈若芸. 远志属植物的皂苷类成分及其药理作用研究进展. 中草药, 2006, 37(1): 144-146.
- 3 杨学东, 徐丽珍, 杨世林. 远志属植物中口山酮类成分及其药理研究进展. 天然药物研究与开发, 2002, 12(5): 88-93.
- 4 张晓萍. 远志药理活性研究. 黑龙江医药, 2004, 17(2): 139-140.
- 5 梁戈亮, 林书玉, 刘东. 超声提取-分光光度法测定远志总皂苷的含量. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 104-105.
- 6 梁戈亮, 林书玉, 刘东. 超声提取远志总皂苷工艺研究. 工艺技术-食品工业科技, 2008, 29(6): 181-182.
- 7 龚盛昭, 曾海宇, 陈秋基. 微波场协同提取远志皂苷的研究. 广州食品工业科技, 2004, 20(1): 36-38.
- 8 李元波, 殷辉安, 唐明林, 等. 复合酶解法提取三七皂苷的实验研究. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 488-492.
- 9 滕红梅, 李金亭, 胡正海. 远志根的发育解剖学研究. 西北植物, 2008, 28(1): 0090-0096.
- 10 赵云生, 李占林, 张丽萍, 等. 晋产远志种质资源皂苷元含量测定. 世界科学技术-中医药现代化, 2006, 8(4): 68-70.

Extraction of Total Saponin in Radix Polygalae by the Combined Enzymolysis

Wang Yingli, Zhang Dandan

(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

Abstract: This work investigated the extraction of total saponin in Polygala using the enzymolysis combined with the traditional reflux. The content of total saponin in Radix Polygalae was determined by a visible spectrometer, and the strengthened effect of enzymolysis time and enzymolysis temperature was studied on the tradition extraction process. The function of the combined enzymolysis-strengthened traditional extraction and the structure of the extracts were determined by the infrared absorption spectrum and microstructure spectrum. The best quantity of enzyme was found to be 0.4%, the enzymolysis temperature 55℃, and the optimal enzymatic treatment 2.5h. The results showed that this method can increase the extraction rate of total saponin in Polygalae, shorten the extraction time, and reduce the consumption of ethanol, thus helping the extraction of polygala liquidum.

Keywords: Total saponin in Radix Polygalae; Combined enzymolysis; Infrared absorption; Extraction polygalae liquidum

(责任编辑: 李沙沙, 责任译审: 张立崑)