

新疆产甘草品质评价及甘草多糖提取工艺研究

张泽生, 史坤, 白鑫, 杨海延

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文通过测定样品中甘草酸和甘草多糖的含量, 比较不同新疆产甘草切片品质; 并通过单因素和正交实验研究甘草多糖的提取条件。结果表明, 人工种植甘草毛草的甘草酸及甘草多糖含量分别为 2.9% 和 5.0%, 高于统草(甘草酸 2.2% 和甘草多糖 3.5%), 而野生甘草样品中, 含量最高的仅有 2.4% 和 3.3%; 十年生野生甘草中甘草酸和甘草多糖含量均为 2.4%, 与五年生及 3-5 年生甘草根切片无显著性差异; 甘草多糖的提取条件为: 30 倍料/液比, 90 °C 提取 0.5 h, 提取 2 次。

关键词: 甘草; 品质; 甘草多糖; 提取工艺

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0143-04

Quality Evaluation of Sinkiang Glycyrrhiza and Extraction of Glycyrrhiza Polysaccharide

ZHANG Ze-sheng, SHI Shen, BAI Xin, YANG Hai-yan

(Department of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this study, the characteristics of different Sinkiang Glycyrrhizas were compared by determining the contents of glycyrrhiza acid and glycyrrhiza polysaccharide. And the extraction conditions of glycyrrhiza polysaccharide were investigated via single factor and orthogonal experiments. The results showed that the side branches of planted Glycyrrhiza contained 2.9% glycyrrhiza acid and 5.0% glycyrrhiza polysaccharide, which were higher than those in the trunks (glycyrrhiza acid 2.2% and glycyrrhiza polysaccharide 3.5%). In the wild glycyrrhiza, the highest contents of glycyrrhiza acid and glycyrrhiza polysaccharide were 2.4% and 3.3%, respectively. Ten years old wild glycyrrhiza contained 2.4% glycyrrhiza acid and glycyrrhiza polysaccharide. For the extraction of glycyrrhiza polysaccharide, the most suitable ratio of solid to liquid, extracting temperature, time and times were found to be 1:30, 90 °C, 0.5 h and twice, respectively.

Key words: Glycyrrhiza; quality; glycyrrhiza polysaccharide; extract technology

甘草 (Glycyrrhiza) 属多年生草本植物, 主要产于新疆、内蒙、山西、甘肃、陕西等地, 是我国传统中草药, 有中草药之王的美誉。由于甘草中的甘草酸和甘草多糖具有多种生物活性^[1-4], 甘草被广泛应用于医药、食品、日化等行业。但不同品种的甘草在品质上有较大差异, 不利于甘草的合理利用, 因而有必要研究不同品种甘草的品质差异。本文以甘草酸与甘草多糖含量为评价标准, 比较了几种新疆产甘草的品质, 并研究了甘草多糖的提取工艺。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

兰博高效液相色谱系统; Phenomenex 十八烷基键

收稿日期: 2007-10-27

作者简介: 张泽生 (1956-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为天然产物研究

合硅胶柱 250×4.60 mm; KQ5200DB 超声处理器; SHIMADZU UVmini1240 紫外可见分光光度计; SHB-III 循环水式多用真空泵。

1.2 主要试剂与材料

流动相所需甲醇、冰乙酸为色谱纯; 醋酸铵、重蒸酚、浓硫酸、无水乙醇、丙酮、无水乙醚、葡萄糖为分析纯; 甘草酸单铵盐对照品 (纯度≥90%): SIGMA; 甘草多糖纯品由本实验室制备。

待测样品购自河北祁新中药颗粒饮片有限公司, 均系乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fish, 种属信息由河北祁新中药颗粒饮片有限公司提供, 由赵永华博士鉴定。人工种植甘草生产自新疆阜康市; 野生甘草系生长于新疆伊犁、阿勒泰地区。

样品编号: (1) 人工种植甘草根主干部分 (3~5 年生); (2) 人工种植甘草根侧枝部分 (3~5 年生); (3) 野生甘草根主干部分 (3~5 年生); (4) 野生甘

草根侧枝部分(3~5年生);(5)野生甘草根主干部分(5年以上);(6)野生甘草根主干部分(10年以上)。

1.3 实验方法

1.3.1 甘草酸含量的测定

测定方法参照参考文献^[5]。

色谱条件:色谱柱十八烷基键合硅胶为填充剂,流动相为甲醇-0.2 M 醋酸铵溶液-冰乙酸(66:33:1);流速 1.0 mL/min;检测波长为 250 nm;柱温 25 ℃。

甘草酸测定标准曲线的制备:对照品溶液的制备:精密称取甘草酸铵标准品(90%) 0.0121 g,精确加入流动相 10.0 mL,制成每毫升含 0.00121 g 的溶液。精密吸取上述溶液 0.25 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加流动相至刻度,按上述色谱条件各进样 10 μL,测定峰面积,以峰面积积分值为横坐标,甘草酸的浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

待测样品的制备:取甘草干燥粉末 0.3 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加流动相约 45 mL,超声处理(功率 250 w,频率 20 kHz) 30 min,取出,放冷,加流动相至刻度,摇匀,滤过,即得待测样溶液。10 μL 进样,测得峰面积带入标准曲线。

1.3.2 甘草多糖含量的测定

测定方法采用苯酚硫酸法参照参考文献^[6-8]。

甘草多糖测定标准曲线的制备:精密称取干燥至恒重的分析纯葡萄糖 20 mg 于 500 mL 容量瓶中,加水至刻度,分别吸取 0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL、1.6 mL、1.8 mL、2.0 mL,各以水补至 2.0 mL,然后加入 6%苯酚 1.0 mL 及 5.0 mL 浓硫酸,静置 10 min,混匀,室温放置 20 min 以后于 490 nm 测定吸光度 A 值。以 2.0 mL 水按同样显色操作为空白,横坐标(X)为 A 值,纵坐标(Y)为葡萄糖浓度,得标准曲线。

待测样品的制备:精密称取甘草粉末 250 mg,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加 80%乙醇 100 mL 回流提取 2 h,过滤,残渣用 80%乙醇洗涤数次后,加水 100 mL 于 90 ℃水浴提取 2 次,每次 2 h,合并两次提取液,浓缩至 50 mL,加 HCl 调 pH 至 2,放置沉淀完全,抽滤,滤液加碱液调至中性,转至 250 mL 容量瓶中,定容作为待测液。吸取待测液 2.0 mL,按上述步骤操作,测定 A 值,以标准曲线计算多糖含量。

多糖含量%=(C·D·f/W)×100。

其中:f为换算因素,f=1.47;W为甘草粉末质量;C为根据标准曲线所折算的数值;D为稀释倍数。)

2 结果与讨论

2.1 甘草酸含量测定结果

甘草酸标准曲线为 $y=2\times 10^{-7}x+0.0113$,检测范围为 0.027 mg/mL-0.427 mg/mL, $R=0.9999$ 。

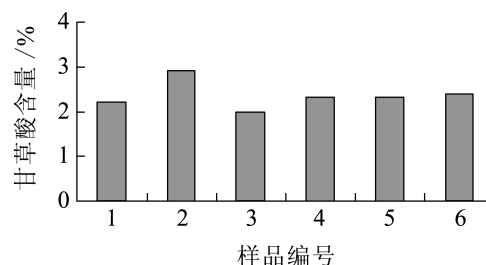


图1 甘草酸含量测定结果

Fig.1 Glycyrrhiza acid content mensurating result

注:1为人工种植甘草根主干部分(3~5年生);2为人工种植甘草根侧枝部分(3~5年生);3为野生甘草根主干部分(3~5年生);4为野生甘草根侧枝部分(3~5年生);5为野生甘草根主干部分(5年以上);6为野生甘草根主干部分(10年以上)。

不同样品的甘草酸含量如图1所示。在人工种植的甘草切片中,毛草(甘草根侧枝部位2号)中的甘草酸含量(2.9%)高于统草(甘草根主干部位1号)的含量(2.2%);在野生甘草样品切片(3、5、6号)中,甘草酸含量随甘草生长年限增加而增加,但十年生甘草根中含量与五年生甘草根相比较,增加不多;比较人工种植甘草和野生甘草的甘草酸含量,人工种植甘草根主干部位的样品切片(1号)略高于野生甘草根主干部位的样品切片(3号),人工种植甘草根侧枝部位的样品切片(2号)高于野生甘草根侧枝部位的样品切片(4号)。

2.2 甘草多糖含量测定结果

甘草多糖的葡萄糖标准曲线为 $y=0.0809x-0.0018$,检测范围为 0.009 mg/mL~0.043 mg/mL 时, $R=0.9992$ 。

不同样品的甘草多糖含量如图2所示。在人工种植的甘草切片中,毛草(甘草根侧枝部位2号)中的甘草多糖含量(5.0%)高于统草(甘草根主干部位1号)的含量(3.5%);在野生甘草样品切片(3、5、6号)中,甘草多糖含量不随甘草生长年限而增加,十年生甘草根中含量与五年生甘草根相比较,有所降低;比较人工种植甘草和野生甘草的甘草多糖含量,人工种植甘草根主干部位的样品切片(1号3.5%)高于野生甘草根主干部位的样品切片(3号2.5%),人工种植甘草根侧枝部位的样品切片(2号5.0%)高于野生甘草根主干部位的样品切片(4号3.3%)。

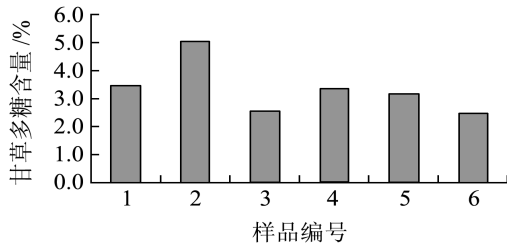


图2 甘草多糖含量测定结果

Fig.2 Glycyrrhiza polysaccharide content mensurating result

注: 1 为人工种植甘草根主干部分(3~5年生); 2 为人工种植甘草根侧枝部分(3~5年生); 3 为野生甘草根主干部分(3~5年生); 4 为野生甘草根侧枝部分(3~5年生); 5 为野生甘草根主干部分(5年以上); 6 为野生甘草根主干部分(10年以上)。

2.3 甘草多糖的提取条件

按表 1 的单因素实验条件进行提取, 结果见图 3~图 6。

表 1 单因素实验条件

Table 1 Single Factor Experiment

因素	料液比	提取温度/°C	提取时间/h	提取级数
料液比因素实验	X	90	2	1
提取温度因素实验	20	X	2	1
提取时间因素实验	20	90	X	1
提取级数因素实验	20	90	0.5	X

注: X 表示单因素实验中的变化条件。

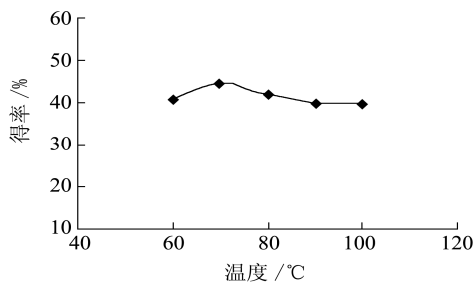


图3 提取温度对甘草多糖提取得率的影响

Fig.3 The effects of temperature on extracted rate of glycyrrhiza polysaccharide

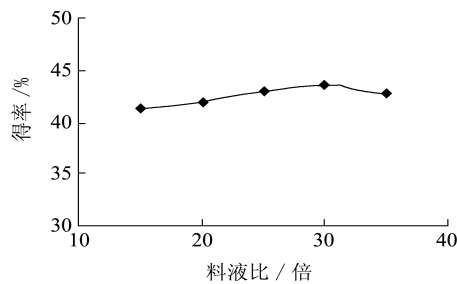


图4 料液比对甘草多糖提取得率的影响

Fig.4 The effects of ratio of solid to liquid on extracted rate of glycyrrhiza polysaccharide

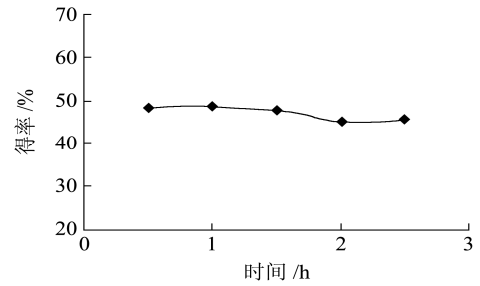


图5 提取时间对甘草多糖提取得率的影响

Fig.5 The effects of time on extracted rate of glycyrrhiza polysaccharide

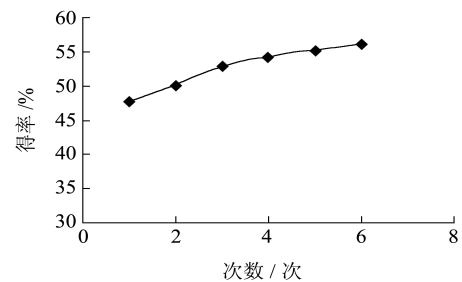


图6 提取次数对甘草多糖提取得率的影响

Fig.6 The effects of times on extracted rate of glycyrrhiza polysaccharide

提取温度对甘草多糖提取效果的影响如图 3 所示, 提取温度由 60 °C 增加到 70 °C 时, 甘草多糖提取随温度的上升而上升, 当温度超过 70 °C 以后继续提高温度提取率略有下降; 料液比对甘草多糖提取效果的影响如图 4 所示, 甘草多糖提取量随料液比的增大而增加, 当料液比大于 1:30 时, 提取量不再呈递增趋势; 提取时间对甘草多糖提取效果的影响如图 5 所示, 在提取时间为 1 h 时提取率较高, 随着时间的延长, 提取率有所下降; 提取次数对甘草多糖提取效果的影响如图 6 所示, 随着提取次数的增加, 提取率也在提高, 第三次提取后得率增加趋势变缓, 由于提取次数的增加伴随生产成本的增加和工艺的复杂化, 因而, 这一因素水平的确定应综合考虑技术和经济两方面的影响。

根据单因素实验结果选取表 2 做 L₁₆(4⁵) 实验, 结果见表 3。

表 2 正交实验因素水平表

Table 2 orthogonal experiment factor-level

水平	A 温度/°C	B 液/料	C 提间/h	D 提取次数
1	60	30	1.5	5
2	70	25	0.5	3
3	80	20	2	4
4	90	15	1	2

表3 甘草多糖正交直观分析表

Table 3 Extracting Glycyrrhiza polysaccharide orthogonal experiment intuitionistic analyze

实验号	A 温度 /℃	B 料液比	C 提取时间/h	D 提取次数	E 误差	甘草多糖提取率/%
1	1	1	1	1	1	46.8
2	1	2	2	2	2	43.3
3	1	3	3	3	3	48.8
4	1	4	4	4	4	44.8
5	2	1	2	3	4	54.9
6	2	2	1	4	3	48.5
7	2	3	4	1	2	52.2
8	2	4	3	2	1	48.9
9	3	1	3	4	2	55.5
10	3	2	4	3	1	49.4
11	3	3	1	2	4	49.2
12	3	4	2	1	3	54.8
13	4	1	4	2	3	57.5
14	4	2	3	1	4	55.4
15	4	3	2	4	1	59.2
16	4	4	1	3	2	53.0
k1	45.9	53.7	49.4	52.3	51.1	
k2	51.1	49.1	53.0	49.7	51.0	
k3	52.2	52.3	52.2	51.5	52.4	
k4	56.3	50.4	50.9	51.9	51.1	
R	10.34	4.54	3.66	2.58	1.40	

甘草多糖提取条件正交优化实验结果见表 3。根据极差分析结果可知, 各种因素对提取效果的影响顺序为: A>B>C>D; 根据正交实验方差分析结果可知, A 因子具有显著性 ($p<0.05$) 影响, B、C 具有较显著性 ($p<0.1$) 影响, 由于 D 没有显著性影响, 本着简化工艺、节约能源、降低成本的原则, 选取较为节约的条件, 提取次数 2 次。结合极差分析结果, 选择最佳甘草多糖提取条件为 A₄B₁C₂D₄, 即温度 90 ℃, 料液比 30 倍, 时间 0.5 h, 提取次数 2 次。

表4 正交实验方差分析结果

Table 4 Orthogonal experiment VARA analyze

来源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性
A	217.771	3	72.590	40.02	*
B	48.830	3	16.277	8.97	(*)
C	30.250	3	10.083	5.56	(*)
D	15.938	3	5.313	2.93	
误差	5.441	3	1.814		

: $p<0.05$; (): $p<0.1$

3 结论

通过对人工种植的甘草根不同部位(主干与侧枝), 野生甘草根不同部位(主干与侧枝)以及不同年龄野生甘草根中甘草酸、甘草多糖含量的测定, 可以推测: 首先, 比较 1、2 号样品, 可知 2 号样品人工种植甘草根侧枝部分(俗称毛草)的甘草酸与甘草多糖含量并不低于, 甚至显著高于 1 号样品人工种植甘草根主干部分(统草), 说明前者的品质并不低于甚至优于后者, 因此, 是相对性价比更具优势的医药保健品生产原料。其次, 对比 1、2 与 3、4 号样品, 可见该品种人工种植的甘草, 其根部切片不论是主干还是侧枝部分的甘草酸与甘草多糖含量均不低于甚至高于相应野生样品, 品质达到升值超过野生甘草。第三, 由样品 3、5、6 号的测定结果可见, 甘草酸与甘草多糖的含量在野生甘草根中虽然有随生长年限的增长而累积, 但达到五年后, 含量增长不显著, 十年生甘草根切片在两项指标上均无明显优势。另外, 参考 2 号样的两项指标可知, 野生甘草在五年内其侧支部位的主要活性物质的积累已达到五至十年生甘草的水平。因此, 多年生甘草并不具有合理的性价比优势, 其采集作为医药生产的意义不及防止土地流失的意义更大。

单因素实验与正交实验研究甘草多糖提取工艺研究结果表明: 最佳甘草多糖提取条件为 30 倍料液比, 90 ℃, 提取 0.5 h, 提取 2 次。

参考文献

- [1] 田莉,高晓黎.甘草的抗肿瘤作用[J].西北药学杂志, 2004, (3):133-134
- [2] 贾国惠,贾世山.甘草中黄酮的药理作用研究进展[J].中国药学杂志,1998,9(9):513-516
- [3] 王枕,谢广茹,史玉荣,等.甘草多糖的体内抑瘤作用及其机制的研究[J].临床肿瘤学杂志,2003,8(2):85-87
- [4] 张静,孙润广,齐浩.甘草酸苯胺铂配合物的结构和理化性质及其抗肿瘤细胞活性的研究[J].中草药,2002,33 (11): 1002-1005
- [5] 卫生部药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:化学工业出版社,2000
- [6] 张惟杰.糖复合物生化研究技术.浙江大学
- [7] 刘金荣,赵文彬,江发寿,等.不同生长期栽培甘草中多糖的含量测定.中成药,2005,27(6):708-710
- [8] 新疆中草药编委会.新疆中草药[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1976. 246