



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102512458 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201110437505. 0

A61P 39/06(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 23

A61P 37/04(2006. 01)

(73) 专利权人 正源堂(天津)生物科技有限公司

A61P 3/10(2006. 01)

地址 300457 天津市滨海新区经济开发区洞
庭路 220 号天津国际医药联合研究院 5
楼 N511

A61P 3/02(2006. 01)

(72) 发明人 卢丽丽 张丽 陈剑清 舒特俊
张耀洲

(56) 对比文件

CN 101173218 A, 2008. 05. 07,

CN 101173218 A, 2008. 05. 07,

审查员 樊江波

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限
公司 11228

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

代理人 张若华

(51) Int. Cl.

A61K 36/068(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 31/12(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

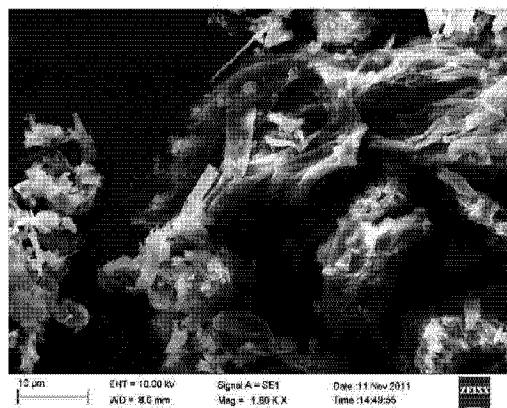
A61P 29/00(2006. 01)

(54) 发明名称

蛹虫草活性组分的半仿生提取方法

(57) 摘要

本发明涉及一种蛹虫草活性组分的半仿生提取方法，属于生物制品加工技术领域。本发明主要以大米和缫丝后的蚕蛹为原料生产蛹虫草，经低温超微粉碎后模拟人体胃肠道酸碱环境，应用半仿生提取工艺提取蛹虫草中的活性组分并进行优化。本发明的超微低温粉碎对蛹虫草孢子的破壁效果极好，在保证营养成分最小损失的同时，使蛹虫草的内容物充分暴露，易于提取工艺的进行。半仿生提取工艺模拟人体胃肠道酸碱环境，对蛹虫草细胞内容物进行连续多次提取，一方面达到充分提取的效果，另一方面确保提取的物质在进入人体胃肠道时直接被吸收，有利于蛹虫草中的营养物质在人体内最大程度的发挥其功能，同时减轻人体肠胃负担。



1. 一种蛹虫草活性组分的半仿生提取方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

(1) 蛹虫草的培养：以蚕蛹为主要原料，大米为辅料，加入磷酸盐及水配制成培养基对蛹虫草进行培养；

(2) 低温超微粉碎：通过低温超微粉碎技术破除蛹虫草子实体坚硬的细胞壁；

(3) 蛹虫草活性组分的半仿生提取：采用 pH 值为 1~6 的酸性水、pH 值为 6~8 的中性水和 pH 值为 8~14 的碱性水，以及总提取时间 50~180min，先于 pH 值为 1~6 的酸性环境下对蛹虫草进行提取，以 8000g~10000g 的离心力离心 5~10 分钟后收集上清液，沉淀自然风干后再于 pH 值为 6~8 中性环境下进行提取，以同样的离心力离心 5~10 分钟后收集上清液，最后于 pH 值为 8~14 碱性环境中进行提取，按上述同样的条件离心收集上清液；每次提取所用溶剂水与原药材的料液比为 5~15 倍，三次提取的料液比可不同；合并三次上清液，即为半仿生法提取获得的蛹虫草活性组分。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (1) 包括：

a. 蛹虫草培养基的配制：培养基配方为干蚕蛹粉 130~140 g/L；大米粉 60~65 g/L；磷酸二氢钾 1.2 ~1.5g/L；磷酸二氢钠 0.8~1.2 g/L；加水先溶解 KH₂PO₄、NaH₂PO₄、充分混匀后再加入上述干蚕蛹粉、大米粉混合均匀，匀浆，分装，每瓶装 50 ml，盖好盖子，于 121℃，1.1Mpa 的条件下湿热灭菌 30~45 min，冷却后备用；

b. 接种：于步骤 a 所得蛹虫草培养基中接种蛹虫草菌种，其密度为 3 ~ 5 个菌球 /mL，所述蛹虫草培养基与所述蛹虫草菌种的体积比为 50:1，接种后于 22℃、湿度 75 ~ 85% 的条件下避光培养 3 ~ 5 天，使虫草菌丝迅速长满培养基表面，然后进行以下光照培养；

第一阶段生长培养：在生长期第 5 ~ 20 天内光照培养，白天 12 小时自然光光照，温度 20~22℃、湿度 80 ~ 85%，光照强度控制在 100 ~ 150Lx；晚上 12 小时闭光，温度 18~20℃、湿度 75 ~ 85%，每天通风 2 次，早晚各一次，每次通风 20 ~ 30 分钟；

第二阶段生长培养：在生长期第 20 ~ 35 天内，白天 12 小时自然光加日光灯光照，温度 20~22℃、湿度 75% ~ 85%，光照强度控制在 1000~1200 Lx；晚上 12 小时闭光，温度 18~20℃、湿度 75 ~ 85%，每天通风 2 次，早晚各一次，每次通风时间为 20 ~ 30 分钟；

c. 收获及再培养：旋开培养瓶盖，镊子用 75% 酒精消毒后，将步骤 b 所得培养基上面的子实体取出，将取出的子实体置于干净的不锈钢盘中，挑选色泽均匀、粗壮、完整的子实体，去除残存的培养基后置于新的不锈钢盘中称重备用；培养瓶中剩余部分按第 20~35 天的培养条件及方法继续培养后用于再次收获；

d. 烘干：将步骤 c 所得蛹虫草子实体置于垫有纱布的不锈钢盘中，均匀铺开，30~37℃ 热风循环烘干待用，水分含量最终控制在 10% 以下。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述步骤 b 中的蛹虫草为 *Cordyceps militaris* (L.) Link.，蛹虫草菌种为蛹虫草液体菌种。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (2) 包括：

每次称取 200~250 g 烘干的蛹虫草子实体，放入超微粉碎机中粉碎 5~7 min，粉碎时用 4~10℃ 的水作为冷却液，以降低粉碎温度，保护蛹虫草中的活性成分。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (3) 中还添加有胃蛋白酶、胰蛋白酶、α - 糖昔酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、肠肽酶或脂肪酶。

蛹虫草活性组分的半仿生提取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛹虫草活性组分的半仿生提取方法，属于生物制品加工技术领域。

背景技术

[0002] 蜀虫草是以蚕蛹为宿主的真菌，与冬虫夏草同科同属，化学成分基本一致，具有很大的药用价值，且是卫生部批准的新资源食品，具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎症、延缓衰老、提高免疫力，降血糖等多种功效，适用人群广泛。它与冬虫夏草的药理功能和临床效果相似，但价格却远远低于冬虫夏草，其含有的活性成分虫草素的含量更是冬虫夏草中的 10 倍，因此蛹虫草逐渐成为冬虫夏草的替代品，具有极大的潜在市场。

[0003] 蜀虫草的常规提取工艺，如水提法，水提醇沉法，醇提法等，在保留有效成分，弃除无效成分方面，仍存在提取不够充分，有效成分损失大，工序多，周期长，成本高等缺点。蛹虫草细胞壁坚硬，常规方法难以破除，给提取过程带来很大的困难，且造成很大的浪费与损失。

[0004] 目前，天然虫草产量有限，质量参差不齐且价格昂贵，无法满足人们的需要，本方法培养的蛹虫草营养丰富，质量可控，料损少成本低，产品易于保存，市场潜力巨大。

发明内容

[0005] 有鉴于此，本发明的目的在于提供一种蛹虫草活性组分的半仿生提取方法，以通过模拟人体胃肠道酸碱环境，对蛹虫草细胞内容物进行连续多次提取；相比于其他的提取方法，所得到的活性组分的提取率高，且质量可控，料损少，成本低，适合大规模生产，市场潜力巨大。

[0006] 为达到上述目的，本发明提供一种蛹虫草活性组分的半仿生提取方法，所述方法包括以下步骤：

[0007] (1) 蜀虫草的培养，包括如下步骤：

[0008] a. 蜀虫草培养基的配制：培养基配方为干蚕蛹粉 130~140g/L；大米粉 60~65g/L；磷酸二氢钾 1.2~1.5g/L；磷酸二氢钠 0.8~1.2 g/L；加水先溶解 KH₂PO₄、NaH₂PO₄、充分混匀后再加入上述干蚕蛹粉、大米粉混合均匀，匀浆，分装，每瓶装 50 ml，盖好盖子，于 121℃，1.1Mpa 的条件下湿热灭菌 30~45 min，冷却后备用；

[0009] b. 接种：于步骤 a 所得蛹虫草培养基中接种蛹虫草菌种（蛹虫草为 Cordyceps militaris(L.) Link），其密度为 3~5 个菌球/mL，所述蛹虫草培养基与所述蛹虫草菌种的体积比为 50:1，接种后于 22℃、湿度 75~85% 的条件下避光培养 3~5 天，使虫草菌丝迅速长满培养基表面，然后进行以下光照培养；

[0010] 第一阶段生长培养：在生长期第 5~20 天内光照培养，白天 12 小时自然光光照，温度 20~22℃（优选为 22℃）、湿度 80~85%，光照强度控制在 100~150Lx；晚上 12 小时闭光，温度 18~20℃（优选为 18℃）、湿度 75~85%，每天通风 2 次，早晚各一次，每次通风

20 ~ 30 分钟；

[0011] 第二阶段生长培养：在生长期第 20 ~ 35 天内，白天 12 小时自然光加日光灯光照，温度 20~22℃（优选为 22℃）、湿度 75% ~ 85%，光照强度控制在 1000~1200 Lx；晚上 12 小时闭光，温度 18~20℃（优选为 18℃）、湿度 75 ~ 85%，每天通风 2 次，早晚各一次，每次通风时间为 20 ~ 30 分钟；

[0012] c. 旋开培养瓶盖，镊子用 75% 酒精消毒后，将步骤 b 所得培养基上面的子实体取出，将取出的子实体置于干净的不锈钢盘中，挑选色泽均匀、粗壮、完整的子实体，去除残存的培养基后置于新的不锈钢盘中称重备用；培养瓶中剩余部分按第 20~35 天的培养条件及方法继续培养后用于再次收获；

[0013] d. 烘干：将步骤 c 所得蛹虫草子实体置于垫有纱布的不锈钢盘中，均匀铺开，30~37℃热风循环烘干待用，水分含量最终控制在 10% 以下；

[0014] (2) 低温超微粉碎：每次称取 200~250 g 烘干的蛹虫草子实体，放入超微粉碎机中粉碎 5~7 min，粉碎时用 4~10℃ 的水作为冷却液，降低粉碎温度，保护蛹虫草中的活性成分；

[0015] (3) 蜓虫草活性组分的半仿生提取：采用选定 pH 值的酸性水（pH 值为 1~6），中性水（pH 值为 6~8）和碱性水（pH 值为 8~14），以及选定的时间（总提取时间 50~180min），先于 pH 值为 1~6 酸性环境下对蛹虫草进行提取，以 8000~10000g 的离心力离心 5~10 分钟后收集上清液，沉淀自然风干后再于 pH 值为 6~8 中性环境下进行提取，以同样的离心力离心 5~10 分钟后收集上清液，最后于 pH 值为 8~14 碱性环境中进行提取，按上述同样的条件离心收集上清液；每次提取所用溶剂水与原药材的料液比为 5~15 倍，三次提取的料液比可不同；合并三次上清液，即为半仿生法提取获得的蛹虫草活性组分。

[0016] 优选地，其中所述步骤 (3) 中还添加有胃蛋白酶、胰蛋白酶、α - 糖昔酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、肠肽酶或脂肪酶。

[0017] 本发明具有以下有益效果：

[0018] 1. 采用半仿生提取方法，模拟人体胃肠道酸碱环境，进行蛹虫草有效组分的提取并对其进行优化，酸碱变化的环境有利于增加药物中有效组分的溶出，使得提取更充分。并且避免了用有害溶剂进行提取，所得物安全有效；

[0019] 2. 使用超微粉碎机，进行低温超微粉碎，以破除蛹虫草子实体坚硬的细胞壁，有利于内容物的溶出，提高蛹虫草中有效组分的提取率；

[0020] 3. 采用冷冻干燥法浓缩干燥蛹虫草中的活性成分，该方法不仅可以保证最终所获得的活性成分的良好的水溶效果，而且在低温真空的条件下进行干燥，可有效保证蛹虫草中提取物的活性，保证其药用价值；

[0021] 4. 该方法提取蛹虫草营养物质含量高，以所提取的虫草素和最终所得活性物质的质量为标准，得到半仿生提取工艺的最优条件，该条件下，虫草素的含量可达到每 g 原药材提取得到 7.417mg 的量，最终活性成分的提取率可高达 79.54%；相比于其他的提取方法，所得到的活性组分的提取率都高，且质量可控，料损少，成本低，适合大规模生产，市场潜力巨大；

[0022] 5. 模拟人体胃肠道酸碱环境进行蛹虫草活性组分的提取，在生产加工成口服液或其他类型的剂型之后，可确保蛹虫草有效成分的直接吸收，减轻肠胃负担，并充分发挥蛹虫

草这一珍贵中药的重要作用。

附图说明

- [0023] 图 1 为采用普通破碎方法破碎蛹虫草后的扫描电镜图；
- [0024] 图 2 为超微低温粉碎后的扫描电镜图；
- [0025] 图 3 为虫草素的标准曲线图。

具体实施方式

[0026] 应该指出，以下具体说明都是例示性的，旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有说明，本文使用的所有科学和技术术语具有与本发明所属技术领域人员通常理解的相同含义。

[0027] 本发明所述的方法以缫丝后的蚕蛹为主要原料，大米为辅料进行蛹虫草的培养。其营养成分含量远高于采用其他方法培养的虫草中的成分含量，且颜色金黄有光泽，香气四溢，腺苷及虫草素含量高于天然的冬虫夏草；收获烘干后进行多重冷灭菌处理，采用低温超微粉碎在保证蛹虫草孢子的破壁效果的同时降低营养成分的损失，用酸碱环境不断变化的水溶液于低温下进行蛹虫草活性物质的提取，以保证活性成分不被破坏。通过模拟人体胃肠道酸碱环境进行蛹虫草活性组分的提取，在生产加工成用药剂型后，可确保蛹虫草有效成分的直接吸收，减轻肠胃负担，并充分发挥蛹虫草这一珍贵中药的重要作用。

[0028] 下面结合实施例详细阐述本发明的具体内容。

[0029] 实施例 1：蛹虫草的培养

[0030] a. 培养基的配置：本发明的蛹虫草培养基为水溶液，由如下浓度的成分构成：

[0031] 干蚕蛹粉 140 g/L；

[0032] 大米粉 60 g/L；

[0033] 磷酸二氢钾 1.2 g/L；

[0034] 磷酸二氢钠 1.2 g/L；

[0035] 优选的具体制备方法如下：

[0036] 准确称取干蚕蛹粉 2.1kg，大米粉 900g，磷酸二氢钾 18g，磷酸二氢钠 18g 后，加纯净水 12 L，先溶解 KH₂PO₄、NaH₂PO₄、充分混匀后得到体积为 15L 的培养基溶液，再加入上述干蚕蛹粉、大米粉混合均匀，匀浆，分装，每瓶装 50 ml，盖好盖子，于 121℃, 1.1Mpa 的条件下湿热灭菌 30 min，冷却后备用。

[0037] b. 接种：于超净台中接种蛹虫草 (*Cordyceps militaris* (L) Link) 菌种（菌种来自于苏州蚕桑专科学校，贡成良教授赠送），液体菌种密度控制在 3-5 个菌球 /mL，每瓶接种 1 mL，接种后于 22℃、湿度 75 ~ 85% 的条件下避光培养 3 ~ 5 天，使虫草菌丝迅速长满培养基表面，然后进行以下光照培养；

[0038] 第一阶段生长培养：在第 5 ~ 20 天光照培养，白天 12 小时光照（用自然光即可），温度 22℃、湿度 80 ~ 85%，光照强度控制在 100 ~ 150Lx；晚上 12 小时闭光，温度 18℃、湿度 75 ~ 85%。每天通风 2 次，早晚各一次，每次通风 20 ~ 30 分钟；

[0039] 第二阶段生长培养：在第 20 ~ 35 天白天 12 小时光照（自然光加日光灯），温度 22℃、湿度 75% ~ 85%，光照强度控制在 1000 Lx；晚上 12 小时闭光，温度 18℃、湿度 75 ~

85%，每天通风 2 次，早晚各一次，每次通风时间为 20 ~ 30 分钟。

[0040] 注意事项：

[0041] ①光照时要用散射光，而不能用直射光，虫草的生长有向光性，处于光照均匀的地方的瓶子要注意转瓶，以促进子实体向上生长；

[0042] ②在培养过程中要严格控制温度和湿度。若车间没有温控装置，可通过地面洒水的方式来控制培养室的温度。培养室的温度不能超过 25℃；

[0043] ③注意通风换气的次数和时间；

[0044] ④污染的瓶子要及时拿出处理，以避免污染的扩大。

[0045] c. 收获及再培养：旋开培养瓶盖，镊子用 75% 酒精消毒后，将子实体取出（只取出培养基上面的部分），将取出的子实体置于干净的不锈钢盘中，挑选色泽均匀、粗壮、完整的子实体，去除残存的培养基后置于新的不锈钢盘中称重备用；培养瓶中剩余部分按第 20~35 天的培养条件及方法继续培养后可再次收获。

[0046] d. 烘干：将蛹虫草子实体置于垫有纱布的不锈钢盘中，均匀铺开，37℃热风循环烘干待用，水分含量最终控制在 10% 以下。

[0047] 实施例 2：低温超微粉碎

[0048] 每次称取 200 g 烘干的蛹虫草子实体，放入超微粉碎机中粉碎 6 min，粉碎时用 4~10℃ 的水作为冷却液，降低粉碎温度，保护蛹虫草中的活性成分。粉碎后取样用扫描电镜检测破壁效果。普通破碎和超微破碎后的效果分别见图 1 和图 2。通过比较图 1 和图 2 可见，普通破碎后蛹虫草子实体的细胞壁完整，细胞仍旧成团块聚集。超微粉碎破碎后的细胞壁不完整，内容物隐约可见，故超微粉碎后的蛹虫草孢子破碎彻底，营养成分得到了有效的释放。

[0049] 实施例 3：蛹虫草活性组分的半仿生提取

[0050] 通过模仿口服药物在胃肠道中的转运过程，采用选定 pH 值的酸性水（pH 值为 1~6），中性水（pH 值为 6~8）和碱性水（pH 值为 8~14），以及选定的时间（总提取时间 50~180min），先于 pH 值为 1~6 的酸性环境下对蛹虫草进行提取，以 10000g 的离心力离心 10 分钟后收集上清液，沉淀自然风干后再于 pH 值为 6~8 的中性环境下进行提取，以同样的离心力离心 10 分钟后收集上清液，最后于 pH 值为 8~14 的碱性环境中进行提取，按上述同样的条件离心收集上清液。每次提取所用溶剂水与原药材的料液比为 5~15 倍，三次提取的料液比可不同。合并三次上清液，此即为半仿生法提取获得的蛹虫草活性组分。

[0051] 取 100 μl 提取液稀释至 1000 μl 后过 0.22 μm 的滤膜，于高效液相色谱仪中测定虫草素含量，剩下的提取液于冷冻干燥机中冻干。该步骤可通过均匀设计实验或正交实验对提取方案进行优化，考虑的因素除溶剂 pH 外，还可考虑提取时间，温度，提取用水量等因素尽量优化提取条件。提取过程中为加强传质过程，除使用超声波提取法外，还可使用微波提取，震荡提取等方式加强传质过程，模拟胃肠蠕动，以更有效的促进细胞内容物的溶出，强化提取过程。半仿生提取过程还可加入胃蛋白酶，胰蛋白酶，α - 糖苷酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、肠肽酶、脂肪酶等生物酶，尽量达到仿生提取，最终达到更充分更高效的提取蛹虫草中的活性组分。

[0052] 以下通过设计不同的时间和 pH 值，对蛹虫草进行 3 次水提与优化，以所提取的虫草素含量以及冷冻干燥后所得的干物质的质量为标准来评价提取效果的优劣。虫草素含量

用高效液相色谱仪进行测定。

[0053] 本实验采用均匀设计法优化提取工艺,均匀设计因素为四因素,水平为六水平。第一次超声波提取所用的酸性水 pH 值分别为 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 和 6.00, 第二次超声波水提所用的中性水的 pH 值分别为 6.50, 7.00 和 7.50, 第三次超声波水提的碱性水的 pH 值为 8.00, 9.00 和 10.00。提取总时间分别为 55 分钟, 77 分钟和 99 分钟, 三次提取所用时间比例为 5 :3 :3。运用均匀设计法合理安排实验布点。三次提取的料液比分别为 10, 8, 8。每次提取结束后于 10000g 的离心力, 4℃的条件下离心 10 分钟。

[0054] 为保证结果的可比性和可重复性,在饮片规格、提取温度、提取用水量、滤过、浓缩等条件相同的前提下,确定考察的主要因素及水平,内容见下表 1:

[0055] 表 1 :

[0056]

因 素	水平					
	1	2	3	4	5	6
第一次 超声波 提取 pH 值(I)	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
第一次 超声波 提取 pH 值(II)	6.50	6.50	7.00	7.00	7.50	7.50
第一次 超声波 提取 pH 值(II)	8.00	8.00	9.00	9.00	10.00	10.00
超声波 提取时 间 /min(IV)	55	55	77	77	99	99

[0057] 其中,3 次提取时间比例为 5:3:3。

[0058] 采用均匀设计实验优化实验方案, 均匀设计表 U6*(64) 安排布点见下表 2 :

[0059] 表 2 :

[0060]

因素 序号	第一次超声 波提取 pH 值(I)	第二次超声 波提取 pH 值(II)	第一次超声 波提取pH值 (II)	超声波提取 时间 /min(IV)
1	1.00	6.50	9.00	99
2	2.00	7.00	10.00	99
3	3.00	7.50	8.00	77
4	4.00	6.50	10.00	77
5	5.00	7.00	8.00	55
6	6.00	7.50	9.00	55

[0061] (1) 色谱条件 :

[0062] Apollo C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) ,柱温 30°C, 检测波长 260nm, 流动相甲醇 (色谱级 100%)—0.01mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.6) 15:85, 流速 0.700ml/min, 进样量 10 μl 。

[0063] (2) 样品溶液的制备 :

[0064] 称取蛹虫草超微粉碎粉末 0.5000 克 (每组正负误差不超过 0.0005 克), 按照上表条件水浴超声提取, 超声波提取温度为 20°C, 每次提取结束后于离心机中以 10000g 的离心力离心 10 分钟, 收集合并上清液后过 0.45 μm 的水系滤膜, 定容至 25ml 后取 100 μl 用超纯水稀释至 1000 μl 过 0.22 μm 的水系滤膜后于高效液相色谱仪中测定虫草素含量。

[0065] (3) 标准品溶液的制备 :

[0066] 购于 sigma 公司的虫草素标准品的纯度为 99.9%, 将 10mg 的虫草素标准品溶于 5ml, 100% 的色谱级甲醇中, 制备成 2mg/ml 的储备液。

[0067] 取 8 μl 的标准贮备液, 用超纯水稀释成 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准品溶液, 然后再依次稀释成 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准品溶液。每个浓度的标准品溶液测试 3 次。按照 (1) 色谱条件进样, 以峰面积 Y 对浓度 X ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 做标准曲线, 得线性回归方程。

[0068] (4) 仪器精密度的测定 :

[0069] 取 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准品溶液按 (1) 条件连续进样 5 针, 精密度结果以相对标准偏差 RSD 值表示。

[0070] (5) 回收率实验

[0071] 取 1 号样品分别加入 4 μg 的标准品 (低), 8 μg 的标准品 (中), 12 μg 的标准品

(高),每个样品连续进样3针,计算回收率和相对标准方差RSD值。

[0072] 3、优化提取结果

[0073] (1) 仪器精密度测定结果见下表3(以5 $\mu\text{g/ml}$ 的标准品连续进样5针)。

[0074] 表3:

[0075]

针数	峰面积	平均值	RSD%
1	254530	258017	3.532
2	266122		
3	248875		
4	269240		
5	251319		

[0076] 由表3可知:相对标准方差RSD值<15%,说明仪器精密度良好。

[0077] (2) 虫草素标准品测定结果见下表4。

[0078] 表4:

标准品浓度 / $\mu\text{g/ml}$	峰面积
1	47850
5	258817
20	1112332
40	2211727

[0079] 如表4所示:以峰面积Y对浓度X($\mu\text{g/ml}$)做标准曲线(标准曲线见图3),得线性回归方程: $y=55657x-10660$ ($R^2=0.9999$),相对标准方差 R^2 为0.9999,说明标准曲线线性关系很好,所测值真实可靠,标准曲线可用。

[0080] (3) 样品测定结果见下表5。

[0081] 表5:

序号	峰面积	虫草素浓度 / $\mu\text{g/ml}$	每g生药中虫草素含量 / $\mu\text{g/g}$
1	706931	12.893	6446.552
2	815002	14.835	7417.415
3	507134	9.303	4651.649
4	574334	10.511	5255.354
5	656451	11.986	5993.053
6	639898	11.689	5844.347

[0082] 由表5可知:提取最佳条件为第2组条件:即第一次超声波提取pH值为2.00,第二次超声波提取pH值为7.00,第三次超声波提取pH值为10.00。超声波提取时间为第一次超声提取时间为45分钟,第二次超声波提取条件为27分钟,第三次超声提取条件为27分钟,总时间为99分钟。在此条件下,所得虫草素提取率为每g生药材中可提取到7.417mg

的虫草素。

[0083] (4) 回收率实验见下表 6。

[0084] 表 6 :

本底含量 / μg	添加量 / μg	测定值	回收率 / %	平均值	RSD / %
	4(低)	915329	93. 611		
12. 893	4(低)	914975	93. 452	93. 353	0. 342
	4(低)	913960	92. 996		
	8(中)	905392	89. 147		
12. 893	8(中)	905690	89. 281	89. 206	0. 077
	8(中)	905489	89. 191		
	12(高)	863036	70. 122		
12. 893	12(高)	863235	70. 211	70. 144	0. 084
	12(高)	862988	70. 100		

[0085] 由表 6 可知, 回收率达到 70% 以上, 说明测定方法的准确性较高。

[0086] 4. 干物质含量

[0087] 将提取物于冷冻干燥机中冻干, 最后所得干物质的质量见下表 7。

[0088] 表 7 :

序号	每 g 生药中虫草素含量 / $\mu\text{g/g}$	干物质的质量 / g	活性组分提取率 / %
1	6446. 552	0. 3092	61. 84
2	7417. 415	0. 3977	79. 54
3	4651. 649	0. 2741	54. 82
4	5255. 354	0. 3361	67. 22
5	5993. 053	0. 3679	73. 58
6	5844. 347	0. 3528	70. 56

[0089] 由表 7 可知, 提取最佳条件仍为第二组, 用此条件进行半仿生提取可获得其活性成分提取率可达 79. 54%, 比一般的提取方法所要获得的活性组分都要高, 且采用冷冻干燥法对活性组分进行浓缩干燥, 可最大程度的保持物质的活性, 保证其药效。

[0090] 以上所述, 仅为本发明的优选实施例, 应当指出, 对于本技术中的普通技术人员来说, 在不脱离本发明的核心技术的前途下, 还可以做出改进与润饰, 如考虑提取时间, 在提取过程中加入胃肠道中的酶如胃蛋白酶, 胰蛋白酶等, 使半仿生提取技术尽量接近真实的人体胃肠道环境, 最终达到真正仿生提取的效果, 使蛹虫草中的珍贵成分充分溶解, 同时减少浪费, 降低成本; 这些润饰和改进也应属于本发明的专利保护范围。

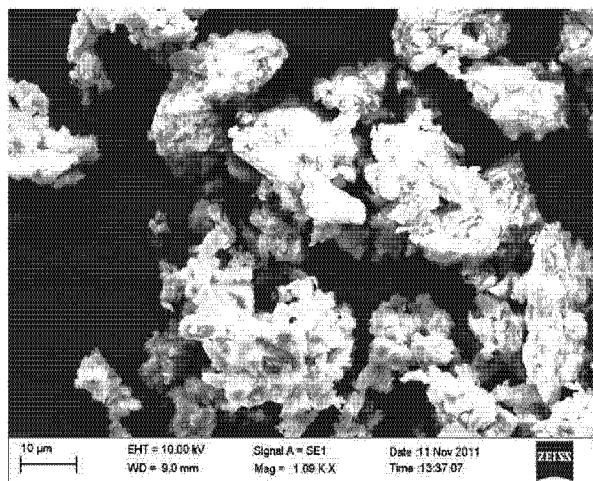


图 1

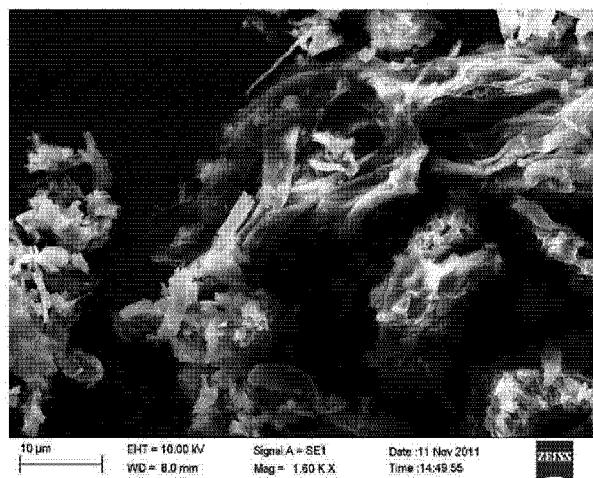


图 2

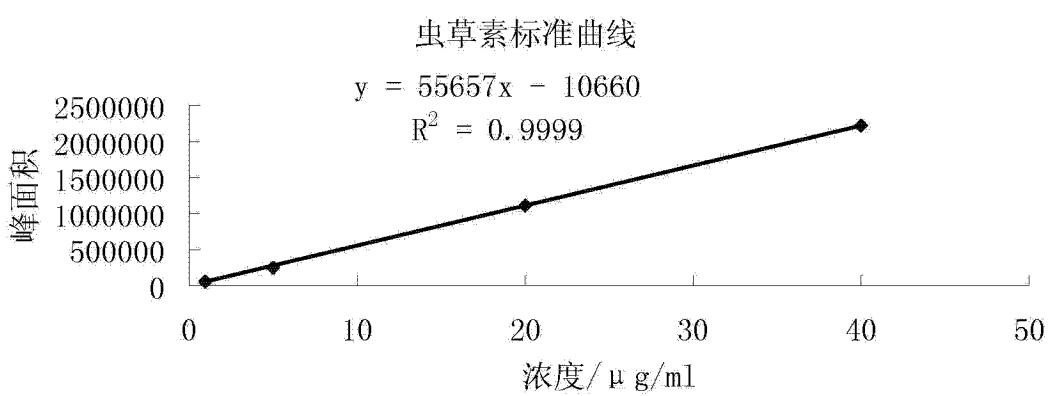


图 3