

野菊花中总多糖提取条件的研究

吴明侠¹, 崔永霞¹, 王晶娟², 张贵君^{2*} (1.河南中医学院, 郑州 450008; 2.北京中医药大学, 北京 100102)

摘要: 目的 研究野菊花总多糖的提取条件, 并测定不同产地野菊花水煎剂中总多糖的含量。方法 采用苯酚-硫酸法测定总多糖含量, 并对多糖显色方式进行优选。结果 野菊花中总多糖回收率为 100.3%, RSD 为 1.19%, 不同产地野菊花中总多糖含量存在差异。结论 该方法准确、快速、重复性好, 可用于测定野菊花中总多糖的含量。

关键词: 野菊花; 多糖; 苯酚-硫酸法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)02-0133-04

Study on Extraction of Total Polysaccharides in Chrysanthemi Indici Flos

WU Mingxia¹, CUI Yongxia¹, WANG Jingjuan², ZHANG Guijun^{2*} (1.Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2.Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study on extraction of total polysaccharides in Chrysanthemi Indici Flos. And determine total polysaccharides in water extraction of Chrysanthemi Indici Flos from various habitats. **METHODS** Total polysaccharides were determined with phenol-sulfuric acid method and orthogonal test was used to select the best coloration. **RESULTS** Recovery of total polysaccharides was 100.3%, RSD was 1.19%, there was difference among Chrysanthemi Indici Flos from various habitats. **CONCLUSION** The method is accurate, repeatable and suitable to determine total polysaccharides in water extraction of Chrysanthemi Indici Flos.

KEY WORDS: Chrysanthemi Indici Flos; polysaccharides; phenol-sulfuric acid method

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 具清热解毒之功效, 用于疮痍肿痛、头痛眩晕、目赤肿痛^[1]。目前多是对野菊花中黄酮类成分进行研究。近年来有报道认为野菊花多糖也是其主要活性成分之一, 有增强免疫力、抗衰老等多方面的药理作用^[2]。而关于野菊花中总多糖含量的测定未见报道, 故本研究以野菊花中总多糖为指标, 对野菊花水煎剂的提取条件进行了探讨, 并对不同产地野菊花中的总多糖含量进行了测定。

1 仪器与试剂

TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); METTLER AE240 型电子分析天平。葡萄糖对照品(分析纯, 批号: 20050805, 上海化学试剂厂); 其他试剂均为分析纯。野菊花由北京中医药大学张贵君教授鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 野菊花总多糖测定条件的研究

2.1.1 苯酚液的配制 取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g

基金项目: 河南中医学院博士科研基金(BSJJ2009-11)

作者简介: 吴明侠, 女, 博士, 副教授 Tel: 13613801926
Tel: 13501027481 E-mail: guijunzhang@163.com

E-mail: mxwu711@163.com

*通信作者: 张贵君, 男, 教授, 博导

和碳酸氢钠 0.05 g，常压蒸馏，收集 182 ℃馏分。称取该馏分 5 g，置 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀后，滤过至棕色试剂瓶中，得 5%苯酚液，置冰箱中储存备用。

2.1.2 葡萄糖对照品溶液的配制 精密称取干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 26.21 mg，置 250 mL 量瓶中，加水溶解后稀释至刻度，制成葡萄糖对照品溶液。

2.1.3 多糖显色方式的优选 多糖的含量测定方法中以苯酚-硫酸法最常用，并且常以葡萄糖为对照，其文献所报道的显色方式不尽一致^[3-7]。为此，笔者综合文献报道，采用正交试验法对该显色方式进行了优选。设计 5%苯酚(A)、浓硫酸的用量(B)、水浴时间(C)3 个因素，每个因素取 3 个水平，选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验因素水平见表 1。

取安徽金寨野菊花样品 20 g，精密称定，加适量水浸泡 10 min，煎煮 2 次，每次 20 min，滤过，滤渣用水洗涤 2 次，合并水提液，浓缩至 250 mL，精密量取 1 mL，置 100 mL 量瓶中，加水至刻度，摇匀，作为样品液。精密量取样品液 2 mL，置 25 mL 量瓶中，按正交表中方法显色，测定 490.5 nm 波长处的吸光度，以多糖含量为评价指标。结果见表 2，方差分析见表 3。

表 1 因素水平表

Tab 1 The factors and levels

水平	因素		
	A(苯酚用量/mL)	B(浓硫酸量/mL)	C(水浴时间/min)
1	1.0	5.0	10
2	1.4	7.5	15
3	1.8	10.0	20

表 2 正交试验结果

Tab 2 The results of orthogonal test

试验号	A (苯酚用量)	B (浓硫酸量)	C (水浴时间)	D (误差)	多糖含量/%
1	1	1	1	1	11.17
2	1	2	2	2	11.25
3	1	3	3	3	12.11
4	2	1	2	3	10.77
5	2	2	3	1	11.06
6	2	3	1	2	11.95
7	3	1	3	2	10.72
8	3	2	1	3	11.24
9	3	3	2	1	11.98
K ₁	34.53	32.66	34.36	34.21	
K ₂	33.78	33.55	34.00	33.92	
K ₃	33.94	36.04	33.89	34.12	
R	0.25	1.13	0.16	0.10	

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值
A(苯酚量)	0.104 0	2	0.052 0	7.081 7
B(浓硫酸量)	2.046 3	2	1.023 1	139.3 1
C(水浴时间)	0.040 3	2	0.020 1	2.742 8
D(误差)	0.014 7	2	0.007 3	1.000 0

注: $F_{0.01}(2, 2)=99$, $F_{0.05}(2, 2)=19$

Note: $F_{0.01}(2, 2)=99$, $F_{0.05}(2, 2)=19$

可见，因素作用主次为 $B>A>C$ ，直观分析其最佳显色条件组合为 $A_1B_3C_1$ 。由方差分析结果可见，B 因素对多糖含量大小的影响具有极显著意义，因其为最高水平，故对其进行单因素考察。精密量取样品液 2 mL，各加 5%苯酚液 1.0 mL，混匀，精密加入适量浓硫酸，振摇后放置 10 min，置 40 ℃水浴中保温 10 min，立即转入冷水浴中冷却至室温，照分光光度法在 490.5 nm 波长处测定吸光度。结果见表 4。

表 4 浓硫酸用量单因素考察结果

Tab 4 The results of sulfuric acid amount

试验号	浓硫酸用量/mL	多糖含量/%
1	10.0	10.27
2	12.5	11.77
3	15.0	11.16

综上所述，优选显色方式为：取待测溶液，加入 5%苯酚液 1.0 mL，混匀，精密加入浓硫酸 12.5 mL，振摇后放置 10 min，置 40 ℃水浴中保温 10 min，立即转入冷水浴中冷却至室温，照分光光度法在 490.5 nm 波长处测定吸光度。

2.1.4 测定波长的选择 准确移取一定量的葡萄糖对照品溶液置于 25 mL 量瓶中，加入新配制的 5%苯酚液 1.0 mL，混匀，精密加入 12.5 mL 浓硫酸，振摇后放置 10 min，置 40 ℃水浴中保温 10 min，立即转入冷水浴中冷却至室温，在不同波长下考察最大吸光度。结果在 490.5 nm 处有最大吸收。故选定测定波长为 490.5 nm。

2.1.5 标准曲线的绘制 分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 和 3.0 mL 置 25 mL 量瓶中，然后依次精密加入 2.4, 1.8, 1.2, 0.6 和 0.0 mL 蒸馏水，再各加 5%苯酚液 1.0 mL，混匀，精密加入 12.5 mL 浓硫酸，振摇后放置 10 min，置 40 ℃水浴中保温 10 min，立即转入冷水浴中冷却至室温，照分光光度法在 490.5 nm 处测定吸光度，以对照品溶液浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。线性回归方程为 $Y=52.424X-$

0.005 1, $r=0.999\ 4$ 。

2.2 野菊花总多糖提取条件的优选

2.2.1 正交试验方法设计 以安徽金寨野菊花为样品, 采用正交设计试验, 对煎煮次数、煎煮时间、加水量进行条件优选, 用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 因素水平表见表 5。

表 5 多糖提取条件因素水平表

Tab 5 The factors and levels about extraction of total polysaccharides

水平	因素		
	A(煎煮次数)	B(煎煮时间/min)	C(加水量/倍)
1	2	30	10
2	3	40	15
3	3	50	20

2.2.2 多糖提取方法研究 取安徽金寨野菊花样品 9 份, 每份约 20 g, 精密称定, 加适量水浸泡 10 min, 按正交试验表进行煎煮, 滤过, 残渣用水洗涤 2 次, 合并水提液, 浓缩至 250 mL, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为样品液。

精密量取样品液 2.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 按“2.1.4”项下方法自“加入新配制的 5% 苯酚液 1.0 mL……”起操作, 测定吸光度, 按回归方程计算多糖含量。结果见表 6, 方差分析见表 7。

表 6 总多糖提取条件正交试验

Tab 6 The orthogonal test about extraction of total polysaccharides

试验号	A (煎煮次数)	B (煎煮时间)	C (加水量)	D (误差)	多糖含量/%
1	1	1	1	1	10.41
2	1	2	2	2	11.38
3	1	3	3	3	12.76
4	2	1	2	3	12.46
5	2	2	3	1	13.48
6	2	3	1	2	10.69
7	3	1	3	2	13.79
8	3	2	1	3	10.70
9	3	3	2	1	12.90
K_1	34.55	36.66	31.80	36.79	
K_2	36.63	35.56	36.74	35.86	
K_3	37.39	36.35	40.03	35.92	
R	0.95	0.37	2.74	0.31	

表 7 方差分析

Tab 7 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值
A(次数)	1.441 1	2	0.720 5	7.979 3
B(时间)	0.214 5	2	0.107 2	1.187 5
C(加水量)	11.440 1	2	5.720 0	63.345
D(误差)	0.180 6	2	0.090 3	1.000 0

注: $F_{0.01}(2, 2)=99$, $F_{0.05}(2, 2)=19$

Note: $F_{0.01}(2, 2)=99$, $F_{0.05}(2, 2)=19$

从正交试验结果中可见, 各因素影响顺序依次为 $C>A>B$, 最佳因素为 $A_3B_1C_3$, 即加 20 倍水, 煎煮 3 次, 每次 30 min, 各因素均无极显著性影响。从节约时间考虑确定为煎煮 2 次; 对煎煮时间、加水量进行单因素考察。

煎煮时间考察: 取安徽金寨野菊花样品约 20 g, 精密称定, 加 20 倍水浸泡 10 min, 煎煮 2 次, 滤过, 滤渣用水洗涤 2 次, 合并水提液, 按上述含量测定方法测定其中多糖含量, 结果见表 8。根据结果, 选择采用煎煮 30 min。

表 8 煎煮时间考察

Tab 8 Investigation on time of decoction

组别	样品量/g	煎煮时间/min	总多糖含量/%
1	20.002 1	20	12.77
2	20.000 6	30	13.22

加水量考察: 取安徽金寨野菊花样品约 20 g, 精密称定, 加适量水浸泡 10 min, 煎煮 2 次, 每次 30 min, 滤过, 滤渣用水洗涤 2 次, 合并水提液, 按上述含量测定方法测定其中多糖含量, 结果见表 9。可见, 加 25 倍量水与 30 倍量水结果差别不大, 故选择加 25 倍量水。

表 9 加水量考察

Tab 9 Investigation on amount of water

试验号	样品量/g	加水量/倍	总多糖含量/%
1	20.138 2	20	13.17
2	20.013 4	25	13.36
3	20.017 3	30	13.41

综上所述, 最终确定水煎煮工艺最佳条件为: 加 25 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 30 min。

2.3 不同产地野菊花中总多糖的含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 取安徽金寨野菊花样品约 2 g, 精密称定, 加 25 倍量水浸泡 10 min, 煎煮 2 次, 每次 30 min, 滤过, 残渣用水洗涤 2 次, 合并水提液, 浓缩至 100 mL, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 1.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 显色后每隔 30 min 测定吸光度。结果样品在 0, 30, 60, 90, 120 min 内吸光度 RSD 为 1.75%。表明样品在 120 min 内稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取安徽金寨产野菊花 2 g, 共称 5 份, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 显色后测定吸光度, 按回归方程计算含量,

RSD 为 1.69%。

2.3.4 仪器精密度试验 精密量取葡萄糖对照品溶液 1.8 mL, 置 25 mL 量瓶中, 显色后测定吸光度 5 次, RSD 为 1.47%。

2.3.5 回收率试验 取安徽金寨产野菊花 1 g, 精密称定, 加入葡萄糖对照品适量, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 按“2.1.4”项下方法自“加入新配制的 5%苯酚液 1.0 mL……”起操作, 测定吸光度, 计算回收率。平均回收率为 100.3%, RSD 为 1.19%(n=5)。

2.3.6 不同产地野菊花水煎剂中总多糖的含量测定 取不同产地野菊花样品 2 g, 精密称定, 按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 显色后测定吸光度, 按回归方程计算含量。结果见表 10。

表 10 不同产地野菊花水煎剂中总多糖的含量测定(n=3)
Tab 10 The content of total polysaccharides in Chrysanthemi Indici Flos from various habitats(n=3)

产地	总多糖含量/%			平均值	RSD/%
	1	2	3		
平顶山	10.16	9.86	9.92	9.98	1.59
四川	11.31	11.26	10.92	11.16	1.90
安徽金寨	10.44	10.73	10.81	10.66	1.83
安徽亳州	13.43	13.28	13.02	13.24	1.57
江苏南京	16.89	17.23	16.63	16.92	1.78
江苏连云港	14.25	14.41	14.10	14.25	1.09
湖北汉口	14.13	14.51	14.32	14.32	1.33
广西	13.85	14.31	13.93	14.03	1.75
河北	14.38	14.01	14.16	14.18	1.31
阜阳青山(采集)	6.45	6.30	6.22	6.32	1.85
阜阳梅山(采集)	6.73	6.49	6.63	6.62	1.82
阜阳古碑(采集)	6.94	6.75	6.83	6.84	1.39

3 讨论

笔者对野菊花的水提取工艺进行了正交试验, 最终确定为加 25 倍量水浸泡 10 min, 煎煮 2 次, 每次 30 min。显色方法采用苯酚硫酸法, 该法显色稳定, 重复性及精密度均较好。

结果表明, 不同产地野菊花中总多糖的含量存在着差异。青山、梅山、古碑的野菊花为采集后直接晒干制成, 其他市售野菊花则是炒制后再晒干, 结果未经炒制的野菊花中总多糖含量明显较低, 可见不同炮制方法对多糖含量有较大影响, 有待进一步研究。

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 219.
[2] LI G R. Extraction and effect on reactive oxygen species free radicals of CIP [J]. China Public Health(中国公共卫生), 2002, 18(3): 269-270.
[3] WANG Z J, DAI B, WANG F M. Microwave technique extraction and determination of total flavonoids and polysaccharides in Lysimachia Christinae Hance [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2008, 25(7): 621-622.
[4] ZHOU W L, TONG L B. Determination of polysaccharides in Kangke capsules by phenol-sulfuric acid method [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001, 12(7): 595-596.
[5] XU L C. Determination of total polysaccharides in Radix Cynanchi Auriculati which are cultivated in Tai mountain [J]. Shandong J Tradit Chin Med(山东中医杂志), 2008, 27(3): 193-195.
[6] MAO L Z, XU Y F, TANG H F. Determination of polysaccharide in Tianci capsule [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(3): 215-216.
[7] XIE X L, HE B, YU H Q, et al. Analysis on contents of flavonoids and polysaccharides in *Urtica dioica* L. and its different processed products [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2008, 19(9): 2249-2251.

收稿日期: 2010-05-11