

神香草总多糖的提取工艺研究

马雪萍^{1,2b}, 马秀敏^{1,2a}, 丁剑冰^{1,2a}, 薛志琴^{2a}, 阿依达尔^{2c}, 谷茜^{2c}, 田树革¹, 武新华^{1,2b*} (1.新疆医科大学附属中医医院新疆国家中医临床研究基地, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆医科大学, a.基础医学院, b.药学院, c.法医学, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 对维药神香草总多糖的最佳提取工艺进行研究。方法 用正交试验法筛选最佳提取工艺,并用蒽酮-硫酸法测定多糖含量。结果 最大吸收波长为 620 nm, RSD=2.84%(n=3), 神香草总多糖的最佳提取工艺为:料液比 1:25, 提取次数 2 次, 提取时间 1 h, 醇沉浓度为 80%。结论 该方法简单、快速、重复性好,为从神香草中提取多糖提供了参考依据。

关键词: 正交试验; 神香草; 总多糖

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)05-0437-03

Extraction Process of Polysaccharide from *Hyssopus Offcinalis*

MA Xueping^{1,2b}, MA Xiumin^{1,2a}, DING Jianbing^{1,2a}, XUE Zhiqin^{2a}, Ayider^{2c}, GU Qian^{2c}, TIAN Shuge¹, WU Xinhua^{1,2b*} (1.Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Xinjiang State Research Center of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, China; 2.Xinjiang Medical University, a.Department of Basic Medicine, b.College of Pharmacology, c. Forensic Medicine, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the optimum extraction process of polysaccharide from *Hyssopus officinalis*. **METHODS** The optional ultrasonic extraction process was selected with the orthogonal design and the content of polysaccharides was determined by spectrophotometer. **RESULTS** $\lambda_{\max}$ =620 nm, RSD=2.84%(n=3), the optimum extraction process was as follows: the polysaccharide was extracted with ultrasonic technology for 1 hour with 25 times water for 2 times and alcohol concentration was 80%. **CONCLUSION** The experimental results provide the basis for the ultrasonic extraction process of polysaccharide from *Hyssopus officinalis*. This optimum process is simple, stable and efficient.

KEY WORDS: orthogonal test; *Hyssopus officinalis*; polysaccharide

神香草(*Hyssopus officinalis*)又名牛膝草或海索草, 维语叫祖发奇尼, 为唇形科(*Labiatae*)神香草属多年生半灌木(草本)。维吾尔医认为, 神香草的性质为二级干热, 功能与主治为化痰、止咳、祛风寒、杀菌, 用于咳嗽、头疼、哮喘及寒性引起的感冒等, 每次用量 3~6 g^[1-2]。全草主要含有挥发油、萜类、黄酮、多糖等成分^[3-5]。近年在新疆维吾尔自治区人工种植神香草获得成功, 为开发和利用神香草的食用和药用价值提供了充足的物质资源。药理研究表明神香草具有祛痰止咳、抗衰老、抑菌等作用^[6-9]。

本课题组通过给哮喘大鼠神香草水提液, 发现神香草可通过抑制 IL-17 的分泌, 纠正 Th1/Th2 型

细胞因子失衡, 发挥抗炎作用; 还通过抑制 Eotaxin-2 的分泌减轻哮喘的炎症反应, 推测神香草多糖可能具有一定的免疫调节功能^[10-11]。文献报道神香草含有酚性葡萄糖苷类成分, 具有降血糖的作用^[12]。为有效开发利用神香草, 充分提取其中所含的多糖类物质, 本试验以神香草为原料, 在单因素考察的基础上, 用正交试验对提取过程中料液比、提取时间和醇沉浓度进行优化选择, 并采用蒽酮-硫酸法测定其多糖含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂

离心机(上海安湾科学厂 TDL-40B); HY-B II 回旋振荡器(金坛市医疗仪器厂); AL-204 电子天平

基金项目: 新疆维吾尔自治区教育厅项目(XJEDU2008I17, XJEDU2009S50); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(200821129); 新疆医科大学大学生创新实验项目(CX2010004, CX2010006)

作者简介: 马雪萍, 硕士生 Tel:13579811457
Tel: 13095017469 E-mail: djbing002@163.com

E-mail: maxueping95678@sina.com

***通信作者:** 武新华, 男, 硕士, 副教授

(梅特勒-托利多仪器有限公司, 0.1 mg); RE-52Cs-2型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SK3300LH超声波清洗机(上海科导超声有限公司); 紫外可见分光光度计(上海凌光有限公司); BXHW型电热套(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 试药

葡萄糖标准品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110833, 纯度: 99%); 蒽酮, 硫酸均为分析纯。神香草购于维吾尔医院, 由新疆自治区中医医院李永和主任药师鉴定为 *Hyssopus officinalis*。

2 方法与结果

2.1 标准品溶液的配制

室温下精密称取减压干燥至恒重的葡萄糖标准品0.1 g, 置100 mL量瓶中, 加水适量使其溶解并稀释至刻度, 摇匀即得标准品溶液。

2.2 最大吸收波长的确定

精密量取标准品溶液0.2 mL, 置5 mL具塞刻度试管中, 加水至1 mL摇匀, 在冰水浴中缓缓滴加0.2%硫酸-蒽酮溶液4 mL混匀, 放冷后置沸水浴中保温20 min, 取出后置水浴冷却10 min, 以相应的试剂为空白, 按照紫外可见分光光度法, 在200~800 nm扫描测试, 结果在620 nm处有最大吸收, 故选择620 nm为检测波长。

2.3 标准曲线的绘制

精密量取标准品溶液0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mL, 分别置5 mL具塞刻度试管中, 各加蒸馏水至1 mL, 按“2.2”项下方法在620 nm处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标、浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=35.196\ 0X+0.148\ 6$, $r=0.999\ 0$ 。

2.4 样品溶液的制备

精密称取神香草5.0 g置于圆底烧瓶中, 按表1设定的因素进行回流提取, 滤液过滤、浓缩至一定体积后, 依次加入乙醇沉淀、Savage试剂除蛋白后, 将样品溶液定容至100 mL。再取1 mL定容至10 mL备用。在单因素考察的基础上, 本试验取3个主要影响因素: 料液比、提取时间、乙醇浓度, 提取次数设定为2次。每个因素拟3个水平, 选用 $L_9(3^4)$ 正交实验表。

表1 因素水平表

Tab 1 Factors and levels

水平	A	B	C
	料液比	提取时间/h	乙醇浓度/%
1	1:25	1.0	75
2	1:30	1.5	80
3	1:35	2.0	85

2.5 样品的测定

精密吸样品溶液1 mL置于试管中, 按“2.2”项下方法在620 nm处测定吸光度, 代入回归方程, 测得神香草总多糖的含量, 结果见表2。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

Tab 2 $L_9(3^4)$ arrangement and the results of orthogonal test

序号	A (料液比)	B (提取时间)	C (乙醇浓度)	D (误差项)	多糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	1	1	1	1	9.48
2	1	2	2	2	10.03
3	1	3	3	3	11.04
4	2	1	2	3	10.22
5	2	2	3	1	9.82
6	2	3	1	2	5.70
7	3	1	3	2	6.86
8	3	2	1	3	3.74
9	3	3	2	1	4.85
K1	33.55	26.56	18.91		
K2	25.74	23.59	25.10		
K3	15.45	21.58	27.73		
R	15.10	4.98	8.82		

2.6 含量测定

精密称取神香草5.0 g按照优选出最佳条件(料液比1:25, 提取时间1 h, 乙醇浓度80%, 提取次数为2次)回流提取, 620 nm处测得3份样品的吸光度, 根据回归方程求出含量分别为10.354, 9.984, 10.751 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 平均含量为10.363 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{RSD}=2.84\%$ 。

2.7 方差分析

对表2进行统计学处理, 方差分析见表3。

3 讨论

多糖是由单糖之间脱水形成糖苷键, 并以糖苷键线性或分枝连接而成的链状聚合物, 一般由10个以上的单糖分子聚合而成, 分子量较大, 是

表3 方差分析表

Tab 3 Analysis of variance

变异来源	SS	V	MS	F	P
A	39.73	2	19.86	41.80	0.05
B	4.20	2	2.10	4.42	
C	13.64	2	6.82	14.35	
误差	0.95	2	0.48	1.00	

注: $F_{0.05}(2, 2)=19$

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

一类大分子化合物,广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果及种子中,是中药活性成分之一。多糖在生物体内作为能量物质,存在于一切细胞膜结构中,参与细胞的各种生理活动。

多糖作为一类重要的生物活性物质,在免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、降血糖等方面逐渐被人们认识和利用^[13]。近年来,随着分离技术的不断进步,提取多糖有超声萃取法、超临界萃取法和酶法提取等新型高效的提取方法,不仅可以极大地缩短操作周期,而且可提高收率,应用前景广泛。本试验采用传统的水煎煮法,多糖在冷水中溶解度较低,一般需要在70~90℃热水中回流提取,将提取液真空浓缩后加入乙醇将多糖析出。该法具有设备简单、操作方便、适用面广等优点。但是这种方法也存在操作时间长、收率低、需多次反复操作、能耗较高等缺点^[14]。

活性多糖的分离纯化是指获得粗的活性多糖后,除去共存杂质,得到纯度较高的多糖产品。分离纯化的方法很多,有透析、分级沉淀、凝胶柱层析、除蛋白等一系列提纯工序,以保证产品质量的稳定,所选用的方法一般随多糖组成的不同而有所区别。

本试验在单因素考察的基础上,提取次数固定为2次,其余各因素对提取影响程度依次为:A(料液比)>C(乙醇浓度)>B(提取时间),最佳提取工艺为A₁B₁C₃,综合考虑后定料液比1:25、提取时间1 h、醇沉时乙醇浓度为80%;方差分析结果显示料液比对多糖提取的影响最大,各水平间有显著性差异, $P<0.05$ 。

采用正交设计优选了神香草多糖的提取工

艺,方法简单、快速、重复性好、收率稳定,多糖的测定采用经典的硫酸-蒽酮显色分光光度法,为从神香草中提取多糖提供了参考。

REFERENCES

[1] LIU Y M, SHAWUTI Y. Uighur Drug Chi(维吾尔药志) [M]. Urumqi: People's Publishing House of Xinjiang, 1999: 423-429.

[2] States Pharmacopoeia Commission. Department of the People's Republic of China Pharmaceutical Standards Uygur Medicine(中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册) [M]. 1998: 78.

[3] PALIDA A, CONG Y Y, MIRIGULI M S, et al. Chemical composition of the essential oil of *Hyssopus cuspidatus* from Xinjiang, China [J]. Chem Nat Comp, 2009, 45(3): 445.

[4] SKRZYPEK Z, WYSOKINSKA H. Sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L [J]. Z Naturforsch C, 2003, 58(5/6): 308-312.

[5] ZHU Y. Studies of chemical constituents and pharmacodynamics of *Hyssopus officinalis* [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2009.

[6] DING J B, WU X H, WANG Y N, et al. The experimental study of *Hyssopus officinalis* [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med Pharm(新疆中医药), 2002, 20 (3): 10-11.

[7] WANG Y N, MA J, MA X M, et al. Effect of Uigur herb *Hyssopus officinalis* L. on cytokines in allergic asthma mice [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai(上海中医药大学学报), 2008, 22(3): 58-60.

[8] QIU H X, YAO L. Antiaging effect of *Hyssopus officinalis* and its extract [J]. J Shanghai Jiaotong Univ(上海交通大学学报), 2005, 23(1): 1-4.

[9] YIN L P, DENG Y, YAO L, et al. Experimental study on antibacterial and spasmolytic activities of Uigur herb *Zufaqini* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(2): 409-411.

[10] HOU M, ZHU M, MA X M, et al. The effect of Uygur medicine *Hyssopus officinalis* L. on serum IL-17 level and balance of Th1/Th2 of asthma rats [J]. China J Mod Med(中国现代医学杂志), 2010, 20(3): 365-368.

[11] HOU M, MA X M, DING J B, et al. Effects of Uigur herb *Hyssopus officinalis* L on serum eotaxin-2, eotaxin-3 and sP-selection level of asthma rats [J]. Sci Tech Rev(科技导报), 2009, 27(19): 90-93.

[12] HIDEYUKI M, HIROYUKI M, CHIKAKO A. Isolation of α -glucosidase inhibitors from hyssop (*Hyssopus officinalis*) [J]. Phytochemistry, 2004, 65(1): 91-97.

[13] QIAN Q, ZHANG Z Y. Researches progress of plant active polysaccharide on pharmacological functions and application [J]. West China Med J(华西医学), 2009, 24(1): 250-252.

[14] GAO X C. Progress on the method of extraction and purifying polysaccharide [J]. J Yulin Univ (榆林学院学报), 2009, 19(4): 65-67.

收稿日期: 2010-06-17