

正交试验法优选墨旱莲多糖的水提工艺研究

许小华, 杨云*, 张寒娟, 郝鹏飞, 许闽(河南中医学院, 郑州 450008)

摘要: 目的 研究墨旱莲多糖的最佳水提工艺。方法 以墨旱莲中多糖的含量和提取率为指标, 采用正交试验筛选墨旱莲多糖的最佳提取工艺。结果 最佳工艺参数为料水比 1:10, 提取 3 次, 每次 3.5 h, 提取温度 100 °C。在此条件下, 测得墨旱莲多糖提取率为 11.39%, 多糖含量为 18.43%。结论 本实验优选出的工艺稳定、经济、可行。

关键词: 墨旱莲; 多糖; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)04-0319-04

Optimal Water-Extraction of Polysaccharide from Herba Ecliptae by Orthogonal Design

XU Xiaohua, YANG Yun*, ZHANG Hanjuan, HAO Pengfei, XU Min (Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the water-extraction of polysaccharide from Herba Ecliptae. **METHODS** With the extraction rate and contents of polysaccharide as the index, orthogonal test was used to evaluate the extraction. **RESULTS** The optimal condition was added 10 times water for 3 times and 3.5 hours for each time at the temperature of 100 °C. In this condition, the extraction percent of polysaccharide from Herba Ecliptae was 11.39% and the content was 18.43%. **CONCLUSION** The optimized extraction is stable, economical and feasible.

KEY WORDS: Herba Ecliptae; polysaccharide; extraction; orthogonal design

墨旱莲系菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的地上部分, 性寒, 味酸, 归肾、肝经, 具有滋肝补血、凉血止血之功效^[1]。目前国内有关文献对墨旱莲的水、醇以及乙酸乙酯提取物的生物活性报道较多^[2-4], 但迄今未见有关墨旱莲多糖活性的报道。本课题组前期实验结果表明墨旱莲多糖具有显著的免疫活性: 墨

旱莲多糖可以显著增加小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率及吞噬指数, 其中空白组吞噬百分率和指数为 (26.0±8.2)%, 0.223±0.005; 多糖组为 (86.1±4.9)%, 0.518±0.014; 可以显著增加血清中溶血素含量和溶血空斑的形成, 其中空白组溶血素含量和溶血空斑形成 OD 值为 0.051±0.012, 0.208±0.009, 多糖组 OD 值为

作者简介: 许小华, 男, 硕士
E-mail: yyun@china.com.cn

Tel: 13783503010

E-mail: xiaohua8586@163.com

*通信作者: 杨云, 女, 教授

Tel: (0371)65680605

0.102±0.008, 0.281±0.004。因此, 本试验采用双指标方法即以墨旱莲多糖的得率和含量为指标, 通过正交试验方法优选出最佳提取工艺, 以期为墨旱莲的进一步研究开发和利用提供参考。

1 仪器与试剂

METTLER AE240 电子分析天平(瑞士); UV-2201 紫外分光光度计(日本岛津); 无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110833-200503, 供含量测定用)乙醇、硫酸、丙酮、无水乙醚、苯酚均为分析纯; 墨旱莲药材购于河南省药材公司, 经河南中医学院药学院生药学科董诚明教授鉴定为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计

影响水提多糖的因素很多, 结合文献^[5-6]报道和生产实际, 以墨旱莲中多糖的得率和含量为考察指标, 选择提取温度、料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 设计正交试验 $L_9(3^4)$, 因素水平的安排见表 1。

表 1 因素水平表

Tab 1 The factors and levels

水平	A	B	C	D
	温度/℃	料液比	提取时间/h	提取次数
1	70	10	2	1
2	85	15	3.5	2
3	100	20	5	3

2.2 墨旱莲多糖的制备

分别称取墨旱莲 30 g, 按正交试验表所列进行提取, 提取液用旋转蒸发仪浓缩至 1:2(原料重: 溶液体积), 浓缩液加入 95%乙醇使溶液中醇浓度为 80%, 4℃静置 8 h, 3 000 r·min⁻¹离心, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤, 每次 80 mL, 洗涤 2 次, 所得沉淀经真空干燥, 得粗多糖, 计算得率并测定多糖含量。

2.3 糖含量测定方法的建立

2.3.1 标准曲线的制备 精密称取 105℃干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 50.05 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 500.5 μg·mL⁻¹ 的储备液。精密量取葡萄糖储备液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL 于 25 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 摇匀, 得葡萄糖浓度分别为 20.02, 30.03, 40.04, 50.05, 60.06, 70.07 μg·mL⁻¹ 对照品

溶液。分别量取葡萄糖对照品溶液 2.0 mL 于 20 mL 试管中, 加 5%苯酚溶液 1 mL, 浓硫酸 5 mL, 摇匀, 室温放置 40 min, 以相应试剂为空白, 在 490 nm 波长处测定吸收度, 以吸收度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。标准曲线方程: $Y=0.0156X+0.0176$, $r=0.9995$, 结果表明葡萄糖浓度在 20.02~70.07 μg·mL⁻¹ 内, 呈良好的线性关系。

2.3.2 仪器精密度试验 取浓度为 40.04 μg·mL⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液, 按“2.3.1”项下“量取葡萄糖对照品溶液 2.0 mL”起操作, 连续测定吸收度 5 次, 结果 RSD 为 0.74%, 表明该仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 分别取 6 份浓度为 40.04 μg·mL⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液, 按“2.3.1”项下“量取葡萄糖对照品溶液 2.0 mL”起操作, 测定吸收度, 结果 RSD 为 1.41%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取浓度为 40.04 μg·mL⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液, 按“2.3.1”项下“量取葡萄糖对照品溶液 2.0 mL”起操作, 每隔 20 min 测定一次吸收度, 连续 2 h 考察其稳定性, 结果 RSD 为 0.54%, 表明供试品在 2 h 内基本稳定。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取样品多糖(多糖含量 17.53%)6 份, 分别加入葡萄糖对照品溶液(浓度 141.2 μg·mL⁻¹)5.0 mL, 定容至 25 mL 量瓶中, 精密吸取 2 mL 溶液于 20 mL 试管中, 按“2.3.1”项下“加 5%苯酚溶液 1 mL”起操作, 测定糖含量, 计算回收率, 测得多糖平均回收率为 99.48%, RSD=1.30%(n=6)。结果见表 2。

表 2 加样回收率试验(n=6)

Tab 2 Results of recovery test(n=6)

取样量/mg	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
4.01	0.703	0.706	1.398	98.44		
3.99	0.699	0.706	1.411	100.85		
4.04	0.708	0.706	1.399	97.88	99.48	1.30
4.08	0.715	0.706	1.420	99.86		
3.97	0.696	0.706	1.409	100.99		
4.06	0.712	0.706	1.410	98.87		

2.3.6 样品多糖含量的测定 精密称取多糖 10 mg, 用水溶解并定容至 25 mL 的量瓶中。精密吸取 2 mL 溶液于 20 mL 试管中, 加 5%苯酚溶液 1 mL、浓硫酸 5 mL, 摇匀, 室温放置 40 min, 以相应试剂为空白, 在 490 nm 波长处测定吸收度, 根据回归方程计算多糖含量。

2.4 数据处理

最佳提取条件要满足多糖得率高并且含量也高,因此采用加权评分法综合评估墨旱莲多糖提取条件。评分标准:将各项指标除以该列最大值再乘以100,为该项得分。通过这样处理,使多糖得率和多糖含量转化为0~100之间的数。根据多糖得率(a)和多糖含量(b)作用,确定两者的权重系数均为

表3 正交试验表及结果分析

试验号	A 温度/℃	B 料液比	C 提取时间/h	D 提取次数	y1		y2		y1 评分	y2 评分	评分 合计
					多糖 得率/%	多糖 含量/%	多糖 得率/%	多糖 含量/%			
1	1	1	1	1	5.5	10.8	5.4	11.5	56.3	56.4	112.7
2	1	2	2	2	8.9	10.7	8.0	11.4	70.4	67.4	137.8
3	1	3	3	3	8.6	9.2	8.2	10.5	77.2	66.1	143.3
4	2	1	2	3	10.1	14.3	10.0	15.3	86.6	87.4	174.0
5	2	2	3	1	7.6	14.1	7.3	14.9	75.6	74.3	149.9
6	2	3	1	2	10.5	10.9	9.2	12.5	77.8	75.9	153.7
7	3	1	3	2	10.3	15.8	9.2	17.0	92.0	88.6	180.6
8	3	2	1	3	11.8	13.3	11.4	13.9	90.7	89.7	180.4
9	3	3	2	1	10.5	16.3	9.3	17.5	94.5	91.0	185.5
I _j	393.8	467.4	446.9	448.2	评分总和 G=1 417.9 总离均差平方和 SS _总 =2 472.2 总自由度 F _总 =17 去除实验误差后的总离均差平方和 SS _总 =2 390.6 第二类离差 SS _总 =81.6 自由度 f _总 =9						
II _j	477.7	468.1	497.3	472.1							
III _j	546.5	482.5	473.8	497.7							
I _j ²	155 099.1	218 464.2	199 718.8	200 888.9							
II _j ²	228 160.9	219 091.4	247 331.9	222 867.5							
III _j ²	298 698.3	232 852.1	224 483.9	247 731.6							
R _j	681 958.3	67 0407.7	671 534.5	671 487.9							
S _j	1 949.5	24.4	212.2	204.4							

表4 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F值	显著性
A	1 949.50	2	974.75	71.67	极显著
B	24.40	2	12.20	0.90	
C	212.20	2	106.10	7.80	显著
D	204.40	2	102.20	7.51	显著
误差 SS _{e2}	122.40	9	13.60		

注: F_{0.01(2,9)}=8.02; F_{0.05(2,9)}=4.26
Note: F_{0.01(2,9)}=8.02; F_{0.05(2,9)}=4.26

2.5 结果

表3和表4结果表明,因素显著性为:A>C>D>B,A有极显著性影响,C和D有显著性影响,AIII>AII>AI,CII>CIII>CI,DIII>DII>DI,选择A₃C₂D₃,而B无显著性差异,选择最低水平B₁,优选出最佳工艺为A₃B₁C₂D₃,即取墨旱莲药材,加10倍量水,100℃水浴3.5h,提取3次。

2.6 验证实验

0.5,对这两项指标进行加权求和,即得综合评分c=0.5a+0.5b。

规定y1中多糖得率的最大值11.8%和含量的最大值16.3%为100,y2中多糖得率的最大值11.4%和含量的最大值17.5%为100,其余值对应比较,两项加和后平均得各项综合评分值。结果见表3、表4。

称取墨旱莲粗粉30g,以最优工艺进行提取,重复3次,分别进行提取率和含量的考察,结果测得多糖平均得率为11.39%,含量为18.43%。由结果可知,采用优化最佳工艺提取墨旱莲多糖的得率和含量均较高,且工艺条件稳定。

3 讨论

苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法为多糖含量测定的2种经典方法,由于蒽酮容易氧化,需用现配,否则会影响测定结果;而蒸馏苯酚溶液冷藏保存,一般不会影响测定结果,并且苯酚相对廉价。故选用苯酚-硫酸法作为墨旱莲多糖的含量测定方法。苯酚-硫酸比色法的原理是多糖在浓硫酸的作用下,先水解为单糖,单糖迅速脱水形成糠醛衍生物,然后与苯酚缩合为有色化合物,在490nm处有特征吸收。本法简单,显色稳定,灵敏度高,重复性好。

植物药所含成分复杂,其提取工艺对中药制剂的质量、加快新药开发起着重要的作用。其中多糖

具有多种生物活性属非细胞毒物质,同维持生物机能密切相关。本试验通过对墨旱莲水提多糖工艺的研究,为以后墨旱莲多糖的开发提供参考,并使其能更广泛地用于临床,在防病治病方面发挥其最大的功效。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2005) Vol I (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 259.
- [2] WANG Y W, ZHOU Q F, BAI X Z. Effect of *eclipta prostrata* on DTH and hemolysin antibody concentration in mice [J]. Acta Acad Med Coll(锦州医学院学报), 2003, 24(6): 28-29.
- [3] LI G, ZHOU L, YANG F Y. Anti-aging effects of Herbal

- Ecliptae* in subacute aging mice caused by D-galactose [J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报), 2005, 36(5): 574-576.
- [4] ZHANG Y F, CHEN L. Effect of *Eclipta prostrata* L. on free radical metabolism of senescent mice [J]. J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 2006, 27(10): 957-958.
- [5] YANG Y, FENG W S, MENG J, et al. Optimizing water-extraction process for polysaccharides in the residue of *Fructus Jujubae* by orthogonal design [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2003, 14(3): 200-202.
- [6] SHENG X L, WANG K P. Optimal extraction technology of polysaccharide from *Angelica sinensis* by orthogonal design [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2008, 30(12): 1862-1864.

收稿日期: 2009-09-24