

正交试验优选库拉索芦荟多糖的醇沉工艺

郭菲¹, 蒋金珩², 石森林^{1*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 义乌市中心医院, 浙江 义乌 322000)

[摘要] 目的: 优选库拉索芦荟多糖的醇沉工艺。方法: 以多糖得率为指标, 选取浓缩程度、醇沉浓度、醇沉时间为考察因素, 通过正交试验优选库拉索芦荟多糖的醇沉工艺。采用硫酸-苯酚法测定芦荟多糖含量。结果: 最佳醇沉工艺条件为新鲜库拉索芦荟多糖提取液浓缩比例 1:2, 醇沉体积分数 70%, 醇沉时间 6 h; 芦荟多糖平均得率达 0.076%, 平均纯度 57.37%。结论: 该优选的工艺条件科学合理, 可用于库拉索芦荟多糖的工业化生产。

[关键词] 芦荟; 多糖; 正交试验; 醇沉工艺; *D*-甘露糖

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0053-03

[doi] 10.11653/syjf2013240053

Optimization of Alcohol Precipitation Technology for Polysaccharides from Aloe by Orthogonal Test

GUO Fei¹, JIANG Jin-heng², SHI Sen-lin^{1*}

(1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. The Central Hospital of Yiwu City, Yiwu 322000, China)

[Abstract] **Objective:** Optimize alcohol precipitation process of polysaccharides from Aloe. **Method:** With yield of polysaccharides as index, orthogonal test was adopted to optimize alcohol precipitation process of polysaccharides from Aloe by taking alcohol precipitation time, alcohol precipitation concentration and concentration degree as factors. Sulfuric acid-phenol method was used to determine the content of polysaccharides from Aloe. **Result:** Optimum alcohol precipitation process was as following: alcohol precipitation time 6 h, alcohol precipitation concentration 70%, concentration degree 1:2; The average yield of polysaccharides was up to 0.076% with the average purity of 57.37%. **Conclusion:** This optimized technology was stable and credible, it could be used for industrial production of polysaccharides from Aloe.

[Key words] Aloe; polysaccharides; orthoqonal design; alcohol precipitation process; *D*-mannose

百合科芦荟属植物的药用品种主要有库拉索芦荟、木立芦荟、中华芦荟等^[1]。传统中医学认为芦荟性寒味苦, 归肝、胃、大肠经, 具有泻下通便、清肝泄热、消痞杀虫之功效, 常用于治疗热结便秘、肝火头痛、目赤惊风、疳热虫积等症, 化学成分包括多糖、芦荟苷、氨基酸、有机酸、维生素和微量元素等, 其中

芦荟多糖为主要有效成分。现代药理学研究已证明芦荟多糖具有治疗烫烧伤、免疫调节、抗肿瘤、抗辐射、抗溃疡、降低血糖、促进组织损伤修复、维持血管内皮及周围组织自身平衡等生物活性^[2-8], 说明芦荟多糖具有较高的实际生产意义。近年来关于芦荟多糖的研究多集中于药理药效方面, 提取、纯化工艺的研究较少, 本实验采用硫酸-苯酚法测定芦荟多糖含量, 通过正交试验优选芦荟多糖的醇沉工艺条件, 为其工业化生产提供实验依据。

1 材料

UV-2450 型紫外-可见分光光度仪(日本岛津), XS105 Dualrange 型分析天平[梅特勒-托利多仪器

[收稿日期] 20130608(006)

[第一作者] 郭菲, 在读硕士, 从事中药制剂新技术与新剂型研究, Tel: 13567146495, E-mail: 87011665@qq.com

[通讯作者] * 石森林, 博士, 教授, 从事中药制剂新技术与新剂型研究, Tel: 13157106148, E-mail: pjstone@163.com

(上海)有限公司], Avanti J-26XP 型高效离心机[贝
克曼库尔特商贸(中国)有限公司], DZF6050 型真
空干燥箱(上海顿可仪器科技有限公司), BM255 型
榨汁机(美的集团)。库拉索芦荟(6 年生植物, 采
摘于江苏省宿迁市沐阳县, 经浙江中医药大学陈孔
荣副教授鉴定为百合科植物库拉索芦荟 *Aloe*
barbadensis Miller 叶的汁液浓缩干燥物), *D*-甘露糖
对照品(上海安研商贸有限公司, 批号 140651-
200301), 所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 芦荟多糖的含量测定 以 *D*-甘露糖为对照
品, 采用硫酸-苯酚显色法测定^[9]。

2.1.1 苯酚溶液的配制 称取苯酚 100 g 于圆底
烧瓶中, 加入铝片 0.1 g 和碳酸钠 0.05 g, 加热蒸
馏, 收集 182 ℃ 馏分, 冷却, 称定 5 g 于 100 mL 量瓶
中, 加适量水溶解并稀释至刻度, 即得, 其余苯酚置
于棕色瓶中备用。

2.1.2 芦荟多糖的制备 称取新鲜 6 年生库拉索
芦荟, 清洗干净后去刺, 置于去离子水中浸泡以除去
表皮渗出的黄色汁液, 去皮, 刮取内层凝胶层, 称取
凝胶层 1 kg, 榨汁 2 min, 凝胶液于 8 000 r·min⁻¹ 离
心 15 min, 收集上清液, 按一定比例减压浓缩, 加
95% 乙醇醇沉至一定体积分数, 于 4 ℃ 静置一定时
间, 收集沉淀, 沉淀用无水乙醇洗涤, 60 ℃ 真空干
燥, 即得。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密称取干燥至恒重
的芦荟多糖 5.0 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加水溶解
并稀释至刻度, 即得。

2.1.4 对照品溶液的制备 精密称取 *D*-甘露糖对
照品 8.0 mg 于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至
刻度, 即得。

2.1.5 检测波长的选择 精密量取对照品溶液
2 mL 于 25 mL 试管中, 以 2 mL 水为空白, 分别加入
5% 苯酚 1 mL, 于混合仪上混合 2 s, 加入浓硫酸
5 mL, 混合 30 s, 冷却后于 190 ~ 800 nm 进行全波长
扫描, 供试品溶液按相同方法处理, 结果对照品与供
试品溶液均在 489 nm 处有最大吸收。

2.1.6 标准曲线的绘制 分别精密量取对照品溶
液 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.4, 1.8 mL, 加水至 2.0 mL
(平行 3 份), 按 2.1.5 项下自“以 2 mL 水为空白”
至“混合 30 s”操作, 分别于 489 nm 处测定吸光度
(*A*), 以 *A* 为纵坐标, 质量浓度(*C*)为横坐标, 得回
归方程 $Y = 0.0135X + 0.0066 (R^2 = 0.9994)$, 表明
D-甘露糖质量浓度在 16.26 ~ 73.17 mg·L⁻¹ 呈良好

线性关系。

2.1.7 精密度试验 精密量取供试品溶液 2 mL,
按 2.1.5 项下方法操作, 于 489 nm 处测定 *A*, 重复
测定 6 次, 结果 *A* 的 RSD 0.14%, 表明仪器精密度
良好。

2.1.8 稳定性试验 取供试液按 2.1.5 项下方法
操作, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 于 489 nm 处测定,
结果 *A* 的 RSD 2.4%, 表明供试液在 24 h 内稳定性
良好。

2.1.9 重复性试验 称取干燥至恒重的芦荟多糖
约 1.0 mg, 共 6 份, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水溶
解并定容至刻度, 精密移取 2 mL, 按 2.1.5 项下方
法操作, 于 489 nm 处测定 *A*, 计算芦荟多糖平均质
量分数 72.67%, RSD 2.4%, 表明该方法重复性
较好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的样
品(纯度 72.67%)6 份, 分别置于 50 mL 量瓶中, 各
加入 *D*-甘露糖对照品 1.5 mg, 加水溶解并定容至刻
度, 按 2.1.5 项下方法操作, 于 489 nm 处测定 *A*, 计
算回收率, 结果见表 1。

表 1 库拉索芦荟多糖含量测定方法的加样回收率试验

No.	称样量 /mg	样品中 质量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	2.58	1.87	1.53	3.48	102.4	101.8	1.02
2	2.58	1.87	1.53	3.49	102.6		
3	2.44	1.77	1.57	3.34	100.0		
4	2.50	1.82	1.59	3.47	101.8		
5	2.50	1.82	1.54	3.40	101.2		
6	2.47	1.79	1.52	3.34	102.7		

2.2 醇沉工艺优选 在预试验基础上, 选取浓缩比
例(浓缩后凝胶液体积与原凝胶液体积比)、醇沉浓
度、醇沉时间为考察因素, 以芦荟多糖得率为评价指
标, 称取库拉索芦荟内层凝胶 100 g, 共 9 份, 按
 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 因素水平见表 2, 试验安排
及结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 2 芦荟多糖醇沉工艺正交试验因素水平

水平	浓缩比例	醇沉浓度/%	醇沉时间/h
1	1:1	60	6
2	1:2	70	12
3	1:4	80	24

由直观分析可知,各因素对库拉索芦荟多糖得率的影响大小为 $B > C > A$ 。方差分析表明 B 因素具有显著影响, A, C 因素则具有极显著影响,结合生产成本考虑,确定最佳醇沉工艺组合 $A_2B_2C_1$,即浓缩比例 1:2,醇沉浓度 70%,醇沉时间 6 h。

表 3 芦荟多糖醇沉工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	多糖得率/%
1	1	1	1	1	0.041
2	1	2	2	2	0.061
3	1	3	3	3	0.071
4	2	1	2	3	0.036
5	2	2	3	1	0.082
6	2	2	1	2	0.088
7	3	1	3	2	0.034
8	3	2	1	3	0.071
9	3	3	2	1	0.053
K_1	0.058	0.037	0.067	0.059	
K_2	0.069	0.071	0.050	0.061	
K_3	0.053	0.071	0.062	0.059	
R	0.016	0.034	0.017	0.002	

表 4 芦荟多糖得率方差分析

方差来源	f	SS	MS	F	P
A	2	0.000	0.000	46.97	<0.05
B	2	0.002	0.001	271.25	<0.01
C	2	0.000	0.000	52.65	<0.05
D(误差)	2	5.369×10^{-6}	2.684×10^{-6}		

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

2.3 验证试验 称取库拉索芦荟内层凝胶 3 份,每份 100 g,按 2.1.2 项下方法提取,按优选的工艺条件进行醇沉,收集沉淀,60 °C 真空干燥,计算库拉索芦荟多糖纯度分别为 58.6%,60.1%,53.4%,得率分别为 0.079%,0.076%,0.074%,说明优选的醇沉工艺稳定可行。

3 讨论

曾采用人工手动研磨法处理凝胶层,发现凝胶黏度较大,难以研磨,故尝试加入等体积蒸馏水,由

于手动研磨提取不彻底且平行试验间存在较大误差,因此最终选择了使用榨汁机来榨取芦荟凝胶层。由于新鲜库拉索芦荟含水量 >99%,故榨取时不需要加入蒸馏水,从而缩短了后续的减压浓缩步骤。

预试验发现库拉索芦荟粗多糖在水中完全溶解需要一定时间,因此在进行多糖含量测定前,应将样品溶解后静置一段时间,使多糖充分溶胀后再进行定容,以保证测定结果的准确性。5% 苯酚溶液易被氧化,应现配现用。测定多糖含量时加入苯酚试液和硫酸后一定要充分混匀,振摇时间要严格控制,否则会影响测定结果。

[参考文献]

- [1] 刘成梅,游海.天然产物有效成分的分离与应用[M].北京:化学工业出版社,2003:242.
- [2] 黄道海,汪涛,黄俊,等.鲜芦荟治疗大白鼠Ⅱ度烧伤疗效的研究[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(5):191.
- [3] 陈伟,林新华,陈俊,等.库拉索芦荟多糖对小鼠腹腔巨噬细胞的体外激活作用[J].中国药学杂志,2005,40(1):34.
- [4] 邹翔,王洪亮,孙宇.3种芦荟多糖体外抗肿瘤作用的比较研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2004,20(5):512.
- [5] 刘庆叶,李红光,张宝林.芦荟多糖对UVB辐射人角质形成细胞氧化损伤的保护作用[J].中国医疗前沿,2011,6(17):1.
- [6] 黄国栋,陈文华,黄敏,等.芦荟多糖抗胃溃疡的机制探讨[J].中药材,2009,32(11):1729.
- [7] 邓阳勇,伍参荣,杨旭丽,等.芦荟多糖对衰老小鼠胸腺组织结构的影响[J].中南医学科学杂志,2011,39(6):626.
- [8] 刘川玉,唐建红,何洁.芦荟多糖对糖尿病模型小鼠血糖水平和体重的影响[J].广西医学,2011,33(11):1405.
- [9] 陈伟,陈俊,林新华,等.库拉索芦荟多糖纯化方法研究[J].药物生物技术,2004,11(3):184.

[责任编辑 全燕]