

正交设计法优选六月青多糖胶囊提取及醇沉工艺

葛文漪, 黄建春, 陈兆霓, 焦杨, 张士军, 黄仁彬*

(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 优选六月青多糖胶囊提取、醇沉工艺条件。方法: 以多糖含量为指标, 采用正交试验考察料液比、煎煮次数及煎煮时间对六月青多糖胶囊提取工艺的影响; 以多糖含量及多糖收率为综合评价指标, 选取醇沉时间、醇沉次数、加醇量及醇沉浓度为考察因素, 通过正交试验优选醇沉工艺; 采用苯酚-浓硫酸法测定总多糖含量。结果: 六月青多糖胶囊最佳提取工艺为加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次煎煮 2 h。最佳醇沉条件为水提液过滤后浓缩至 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加 7 倍量 95% 乙醇沉淀 12 h, 沉淀 1 次。醇沉后多糖纯度达 71.05%, 收率 6.83%。结论: 优选的提取及醇沉工艺条件稳定合理, 可为六月青多糖胶囊的生产提供实验依据。

[关键词] 六月青胶囊; 正交试验; 提取工艺; 煎煮法; 醇沉法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0042-04

Optimization of Extraction and Precipitation Technology for Liuyueqing Polysaccharide Capsule by Orthogonal Design

GE Wen-yi, HUANG Jian-chun, CHEN Zhao-ni, JIAO Yang, ZHANG Shi-jun, HUANG Ren-bin*

(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and precipitation technology conditions of Liuyueqing polysaccharide capsule. **Method:** With the content of polysaccharide as index, orthogonal test was adopted to investigate influence of solid-liquid ratio, decoction times and decoction time on extraction technology of Liuyueqing polysaccharide capsule; With the content and yield of polysaccharide as comprehensive evaluation index, alcohol precipitation time and times, the amount of ethanol and alcohol precipitation concentration were chosen as factors, alcohol precipitation technology was optimized by orthogonal test. The content of total polysaccharides was determined by phenol-concentrated sulfuric acid method. **Result:** Optimal extraction technology of Liuyueqing polysaccharide capsule was as follows: decocted three times with 10-fold water, 2 hours each time. Optimum alcohol precipitation conditions were: filtered extraction liquid, mixed and concentrated to $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and then precipitated one time with 7-fold 95% ethanol for 12 hours. Under these conditions, purity of polysaccharide was up to 71.05%, yield of it was 6.83%. **Conclusion:** This optimized extraction and precipitation procedure was proved to be stable and reliable, it could provide experimental basis for Liuyueqing polysaccharide capsule.

[Key words] Liuyueqing polysaccharide capsule; orthogonal design; extraction technology; decoction method; alcohol precipitation method

六月青为广西特色民间草药, 在《本草拾遗》中 记载, 其能活血、凉血、疏肝泻湿、消肿止痛, 主要用

[收稿日期] 20120618(001)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 10124008-6; 桂科攻 0992003A-2, KFJJ2010-22)

[第一作者] 葛文漪, 硕士, 从事药物质量控制和生化药理学研究, Tel: 15994443433, E-mail: gewenyi1986@163.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 教授, 博士生导师, 从事抗病毒性肝炎药物和生化药理学研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: huangrenbin518@163.com

于急慢性肝炎、黄疸等^[1]。本课题组前期试验结果表明,六月青总多糖作为六月青的活性成分之一,具有明显的体外抗氧化作用,对四氯化碳所致小鼠急性化学性肝损伤及刀豆蛋白A致免疫性肝损伤均具有显著的保护作用,同时可减轻四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化,其作用机制可能与抗氧自由基、抑制脂质过氧化、抑制肝脏胶原纤维的合成和沉积有关^[2]。六月青多糖胶囊系根据中医理论和民间治疗肝炎经验研制的纯中药单方制剂,由六月青总多糖及相应辅料组成。本研究为尽可能提取完全六月青药材中总多糖活性成分,依据正交试验设计原理,分别对水煎煮工艺和醇沉工艺进行考察^[3-5],以优选最佳工艺条件,为六月青多糖胶囊制剂的开发研究提供工艺支持和科学依据。

1 材料

722S型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),EL204 METTLER TOLEDO型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),DHJF-2005型低温恒温搅拌反应浴(郑州长城科工贸有限公司),DZF-300型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司)。

六月青采于广西灵山县,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为爵床科肖鸡笼属植物肖鸡笼(顶花马兰)*Taraphochlamys affinis* (Giff) Bremekhu的干燥地上部分。*D*-无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号110833-200904),水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 六月青多糖含量测定

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖对照品20 mg,置于100 mL量瓶中,加水溶解并定容至刻度,混匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的配制 精密称取六月青提取物粉末40 mg,加水溶解并定容于100 mL量瓶中,即得。

2.1.3 标准曲线的绘制 精确吸取对照品储备溶液0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL分置于10 mL具塞玻璃试管中,加水稀释至2.0 mL,摇匀,另取蒸馏水2.0 mL于试管中作为空白对照,分别加入6%重蒸苯酚溶液1 mL,沿壁迅速滴加浓硫酸5 mL,旋涡混匀,沸水浴中加热10 min,冷却至室温,于490 nm处测定吸光度(*A*)。以*A*对葡萄糖质量浓度作回归处理,得回归方程 $A = 0.0074C + 0.0705$ ($R^2 = 0.9996$),表明葡萄糖质量浓度在20~100 mg·L⁻¹

与*A*呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密量取对照品溶液1 mL于10 mL具塞玻璃试管中,按2.1.3项下的方法操作,连续5次测定其*A*,结果RSD 0.82%,说明仪器精密度符合要求。

2.1.5 重复性试验 取六月青提取物细粉6份,依2.1.2项下方法配制供试品溶液,按2.1.3项下的方法操作分别测定*A*,得出六月青总多糖平均质量分数65.36%,RSD 1.34%,说明重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 精确量取同一供试品溶液1 mL,分别于配制后0.5,1,2,4,8,12 h取样,按2.1.3项下方法测定*A*,RSD 1.05%,说明供试品在12 h内稳定。

2.1.7 加样回收率的测定 精密称取已知含量的六月青多糖6份,分别精密加入葡萄糖对照品适量,按2.1.2项下方法配制供试品溶液,按2.1.3项下方法测定*A*,得平均回收率99.04%,RSD 1.65%,表明该方法系统误差小。

2.1.8 换算因子的测定 精密称取六月青提取物适量,采用gevage法除去蛋白后用水透析72 h,浓缩至适量。置于100 mL量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,取1.0 mL,按2.1.3项下方法测定*A*,依下式计算换算因子,测得换算因子为1.1367。

$$f = m / (C \times D)$$

式中*m*为称取多糖的质量;*C*为多糖液中葡萄糖质量浓度;*D*为多糖的稀释倍数^[6]。

2.1.9 样品测定 精密称取由正交设计不同工艺制备的六月青多糖细粉50 mg,置于100 mL量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,精密量取1.0 mL溶液,按2.1.3项下方法测定*A*,计算葡萄糖质量浓度,按以下公式计算六月青总多糖的含量。

$$\text{六月青多糖含量} = C \times D \times f / W \times 100\% \quad [6]$$

式中*C*为样品溶液中葡萄糖质量浓度;*D*为样品溶液的稀释倍数;*f*为换算因子;*W*为称取的样品质量。

2.2 吸水率的测定 称取干燥六月青生药材200 g,平行3份,加6倍量水浸泡,每隔0.5 h观察1次浸透程度,滤出未被吸收的药液,测定药渣湿重,直至质量不增加为止。按公式:吸水率=(药渣湿重-药材干重)/药材干重×100%,计算药材吸水率。3次试验中,药渣湿重分别为406.16,402.57,404.39 g,计算得六月青药材平均吸水率102.26%,即首次应多加入1倍量水。

2.3 水煎煮工艺优选 根据六月青生药材性质及

预试验结果,确定选取料液比、煎煮次数和煎煮时间为 3 个主要考察因素,因素水平见表 1,以多糖纯度为考察指标,对水煎煮提取工艺进行优选。按处方称取六月青生药材 27 份(每组试验平行操作 3 次),每份重 200 g,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验,煎煮液趁热过滤,合并滤液,减压浓缩,真空干燥,粉碎,按 2.1.9 项下的方法测定多糖含量。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 六月青多糖胶囊水煎煮提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 煎煮数/次	C 煎煮时间/h
1	1:6	1	1
2	1:8	2	1.5
3	1:10	3	2

表 2 六月青多糖胶囊水煎煮提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	多糖/%
1	1	1	1	1	19.45
2	1	2	2	2	23.18
3	1	3	3	3	27.09
4	2	1	2	3	21.95
5	2	2	3	1	25.71
6	2	3	1	2	24.43
7	3	1	3	2	27.48
8	3	2	1	3	25.38
9	3	3	2	1	30.12
K_1	23.240	22.960	23.087	25.093	
K_2	24.030	24.757	25.083	25.030	
K_3	27.660	27.213	26.760	24.807	
R	4.420	4.253	3.673	0.286	

表 3 水煎煮工艺方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	11.112	2	5.556	245.125	<0.01
B	9.118	2	4.559	201.132	<0.01
C	6.764	2	3.382	149.199	<0.01
D(误差)	0.045	2	0.022		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$; $F_{0.01}(2,2) = 99$ (表 6 同)。

由表 2,3 可知,A,B,C 三因素对多糖含量的影响均具有统计学意义上的显著性差异,影响因素大小顺序为 $A > B > C$,确定水煎煮最佳工艺条件为 $A_3B_3C_3$,即加 11,10,10 倍量水煎煮 3 次,每次煎煮 2 h。

2.4 醇沉工艺优选

在预试验基础上,采用正交试

验考察加醇量、醇沉浓度、醇沉时间和醇沉次数 4 个因素对试验结果的影响,以收率和多糖含量为综合评分指标^[7],对醇沉工艺进行优选,每个因素选取 3 个水平,因素水平见表 4。称取六月青生药材,按优选的水煎煮工艺提取,过滤,合并滤液,减压浓缩至 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,均分成 27 份(每组试验平行操作 3 次),按表 5 中条件置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱进行醇沉, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,抽滤,沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤,即得六月青总多糖,干燥,称量,计算多糖收率。

表 4 六月青多糖胶囊醇沉工艺正交试验因素水平

水平	A 加醇量/倍	B 醇沉浓度/%	C 醇沉时间/h	D 醇沉数/次
1	5	95	24	1
2	6	85	12	2
3	7	75	8	3

表 5 六月青多糖胶囊醇沉工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	收率/%	多糖纯度/%	综合评分
1	1	1	1	1	4.14	64.38	84.26
2	1	2	2	2	4.60	57.21	76.95
3	1	3	3	3	3.80	53.05	70.30
4	2	1	2	3	3.33	59.19	76.38
5	2	2	3	1	3.82	41.72	57.19
6	2	3	1	2	5.58	49.08	69.73
7	3	1	3	2	8.82	52.56	81.13
8	3	2	1	3	5.26	58.85	80.37
9	3	3	2	1	4.06	68.79	89.21
K_1	77.170	80.590	78.120	76.887			
K_2	67.767	71.503	80.847	75.937			
K_3	83.570	76.413	69.540	75.683			
R	15.803	9.087	11.307	1.204			

注:综合评分 = (收率/最大收率) × 20 + (多糖含量/最大多糖含量) × 80^[8]。

表 6 醇沉工艺综合评分方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	126.376	2	63.188	156.989	<0.01
B	41.373	2	20.687	51.395	<0.05
C	69.631	2	34.815	86.498	<0.05
D(误差)	0.805	2	0.403	1.000	

由表 5 直观分析可知,以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,因素 B,C 对试验结果影响均

具有统计学意义上的显著性差异, A 因素则有极显著性差异,各影响因素大小顺序为 $A > C > B > D$, 确定乙醇沉淀工艺最佳条件为 $A_3B_1C_2D_1$, 即加 7 倍量 95% 乙醇沉淀 1 次, 醇沉时间 12 h。

2.5 验证试验 取干燥六月青生药材, 分别加入 11, 10, 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 2 h, 水提液过滤, 合并, 浓缩至 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 所得浓缩液加入 7 倍量 95% 乙醇沉淀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 12 h, 将提取液及沉淀以 $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 抽滤取沉淀, 无水乙醇、丙酮洗涤, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重, 粉碎, 即得。重复提取 3 次, 六月青多糖质量分数分别为 70.13%, 71.09%, 71.94%, 按公式: 六月青总多糖提取率 = (提取物质量 \times 多糖质量分数) / 六月青药材投入量 $\times 100\%$ [9], 计算多糖提取率平均值达 6.83%, RSD 1.25%, 说明该提取工艺稳定可行。

3 讨论

多糖是一类由单糖分子经脱水以苷键缩合而成的天然高分子化合物, 一般为非晶形。提取多糖常用水、稀酸或稀碱等, 由于酸、碱度较难控制, 易影响提取效果 [10], 本研究以水作为溶媒, 利用多糖易溶于水、难溶于一定体积分数乙醇的性质, 将六月青先用热水浸提, 再加乙醇沉淀。通过正交设计, 对水提醇沉工艺进行优化, 以多糖含量和得率作为综合考察指标, 对两项指标进行加权求和得到综合评分, 使结果分析更为客观。由水煎煮试验方差分析得知, 加水量和煎煮次数对多糖含量影响很大, 溶剂体积增加了介质推动力, 新溶剂的多次加入使渗透压变大, 均利于多糖的溶出, 适宜的条件有助于节约能源, 提高生产效率。

醇沉试验方差分析显示, 乙醇加入倍数和浓度、静置时间对总多糖得率影响显著, 浓度过低易致多糖不能充分从提取液中析出, 充足的醇沉时间和适当醇沉次数既能减少原料消耗又能增加多糖有效析出。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境下醇沉时, 能进一步降低多糖在醇溶液中的溶解度, 提高多糖得率。

多糖的含量测定是多糖类物质质量控制的重要内容, 也是筛选提取工艺优劣的基础。苯酚-浓硫酸法原理系多糖在浓硫酸作用下, 水解生成单糖, 并迅速脱水生成糠醛或其衍生物, 可与苯酚试剂缩合产生有色化合物, 反应后溶液呈橙黄色, 在波长 490 nm 及一定波度范围内有特征吸收, 其吸光度与多糖

含量呈线性正比关系, 因此可利用分光光度计测定吸光度, 并利用标准曲线定量测定样品的多糖含量。该法简单快速、灵敏度高, 便于实际应用。本研究采用精制六月青总多糖测得其对葡萄糖的换算因子, 由于组成与待测物接近, 避免了因使用葡萄糖作为标准而引起的误差。苯酚极易氧化, 操作时应避光或操作迅速, 试验中所用苯酚为重蒸苯酚, 将苯酚与铝片、碳酸氢钠混合加热蒸馏后收集 $182 \text{ }^\circ\text{C}$ 的馏分, 配制成相应浓度, 溶液浓度不宜过高, 否则会影响反应稳定性, 硫酸应保持较高纯度, 同时注意操作步骤统一和反应时间一致, 以确保数据重复性和可靠性。

[参考文献]

- [1] 林兴, 黄权芳, 李江, 等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J]. 中药材, 2005, 28(7): 542.
- [2] 刘曦, 黄仁彬, 孙懿, 等. 六月青多糖体外抗氧化作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23): 1984.
- [3] Tian S, Zhou X, Gong H, et al. Orthogonal test design for optimization of the extraction of polysaccharide from *Paeonia sinjiangensis* K. Y. Pan [J]. Pharmacogn Mag, 2011, (25): 6.
- [4] Liang R J. Orthogonal test design for optimization of the extraction of polysaccharides from *Phascolosoma esulentum* and evaluation of its immunity activity [J]. Carbohydr Poly, 2008, 73(4): 560.
- [5] 李鹏程, 张本才, 陈战国, 等. 正交试验法优化太白泡沙参总黄酮的提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1266.
- [6] 陈燕忠, 符美燕, 谢清春, 等. 灰兜巴粗多糖的提取及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 81.
- [7] 陈韩英, 廉宜君, 陈韩飞, 等. 正交设计法优化复方党参中多糖的提取工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(3): 104.
- [8] 韩忠耀, 周福军, 单淇, 等. 正交设计法优选解毒通络颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 16.
- [9] 张黎明, 朱丽, 李雪, 等. 玉屏风总多糖水提醇沉工艺条件优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 26.
- [10] 王敏, 吕凤霞, 陆兆新, 等. 银杏叶多糖提取仪超滤工艺的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1589.

[责任编辑 仝燕]