

首乌藤多糖提取方法比较

于雷,王保奇,董晶晶,杨云*
(河南中医学院药学院,郑州 450008)

[摘要] **目的:**比较不同提取方法对首乌藤多糖提取效率的影响。**方法:**采用苯酚-硫酸法测定多糖含量,以粗多糖得率和多糖质量分数为评价指标,对首乌藤多糖不同提取方法进行研究。**结果:**6种方法中以氢氧化钠提取方法的效果最优,粗多糖得率和多糖质量分数可达25.13%和21.46%。**结论:**氢氧化钠提取首乌藤多糖是一种效率高且稳定可行的提取方法。

[关键词] 首乌藤多糖;水提;碱提;酶提;酶-水提

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0038-03

Comparison of Extraction Method of Caulis Polygoni Multiflori Polysaccharide

YU Lei, WANG Bao-qi, DONG Jing-jing, YANG Yun*

(College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To compare effect of different extraction methods to extraction efficiency of polysaccharide from Caulis Polygoni Multiflori. **Method:** The content of polysaccharide was determined by phenol-sulfuric acid method, study on different extraction methods for polysaccharide from Caulis Polygoni Multiflori with the content and yield of polysaccharide as indexes. **Result:** Sodiumhydroxide extraction method was the best by comparing with other five methods, yield and the content of polysaccharide were up to 25.13%, 21.46%, respectively. **Conclusion:** Sodiumhydroxide extraction was proved to be a high efficiency and stable method for extraction of polysaccharide from Caulis Polygoni Multiflori.

[Key words] polysaccharide from Caulis Polygoni Multiflori; water extraction; alkali extraction; enzyme extraction; enzyme-water extraction

中药首乌藤具有养血安神、祛风通络的功能^[1],中医用于治疗失眠多梦、血虚身痛、风湿痹痛。现代药理研究表明^[2]首乌藤多糖可显著提高正常小鼠血清和肝组织中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活性,有效降低正常小鼠肝组织中丙二醛的含量,具有很好的抗氧化作用。因此,提取多糖成分对开发新药和功能性食品具有重要的学术意义和利用价值。本实验以粗多糖得率及其含量作

为衡量提取效率的双重指标,对不同提取方法进行比较研究,旨在为提高首乌藤多糖产量及质量提供科学依据。

1 材料

首乌藤药材购于河南省郑州市张仲景大药房,经河南中医学院生药教研室董诚明教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥藤茎。

纤维素酶(夏盛实业集团有限公司),无水葡萄糖(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号20050805),其他化学试剂均为国产分析纯。

DHG-9146A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),METTLER-AE240型1/万电子分析天平(瑞士METTLER TOLEDO公司),Sartorius BS224S型1/万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司),UV-2201型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),LDZ 5-2型台式低速自动平衡离心机

[收稿日期] 20111118(003)

[基金项目] 郑州市金水区科技攻关项目(20093534)

[第一作者] 于雷,硕士研究生,从事天然药物活性成分研究及新药开发 Tel: 13700880747, E-mail: gynanxi@163.com

[通讯作者] *杨云,硕士生导师,教授,从事天然药物活性成分研究及新药开发 Tel: 0371-65680605, E-mail: Yyun@china.com.cn

(北京医用离心机厂)。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 标准溶液的配制 精密称取干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 50.05 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 $500.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

2.1.2 5% 苯酚试剂的配制 精确称取 182 °C 蒸馏后苯酚 5 g,加水溶解于 100 mL 棕色瓶,置冰箱中备用。

2.1.3 标准曲线的制备 精密移取葡萄糖对照品溶液 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,得质量浓度分别为 20.02,30.03,40.04,50.05,60.06,70.07 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液,分别吸取上述葡萄糖对照品溶液 2 mL 置于具塞试管中,加 5% 苯酚溶液 1 mL,再加浓硫酸 5 mL,摇匀后室温放置 40 min,以蒸馏水作空白对照,在波长 490 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y),葡萄糖标准品溶液浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.0156X + 0.0176$ ($r = 0.9995$),葡萄糖在 20.02 ~ 70.07 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈现良好的线性关系。

2.1.4 样品多糖含量的测定 精密称取样品多糖 25 mg,加蒸馏水适量溶解,置于 100 mL 量瓶中加蒸馏水定容至刻度,摇匀后精密吸取 2 mL 溶液于具塞试管中,加 5% 苯酚溶液 1 mL,再加浓硫酸 5 mL,摇匀后室温放置 40 min,以蒸馏水作空白对照,在波长 490 nm 处测定吸光度,将其代入回归方程计算各样品中的多糖含量。

2.1.5 精密密度试验 取 $60.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖对照品溶液 2 mL,按照 2.1.3 项下操作,连续测定吸光度 5 次,考察其精密密度,结果表明实验仪器精密密度良好,RSD 0.07%。

2.1.6 稳定性试验 取 $30.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖对照品溶液 2 mL,按照 2.1.3 项下操作,每隔 20 min 测定一次吸光度,连续测定 2 h 考察其稳定性,结果表明样品溶液在 2 h 内具有良好的稳定性,RSD 0.54%。

2.1.7 重复性试验 取同一样品糖溶液 6 份,各取 2 mL 置于具塞试管中,按照 2.1.3 项下操作,测定多糖含量考察其重复性,结果表明该方法重复性良好,RSD 1.24%。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取多糖样品(多糖质量分数 22.76%)6 份,分别加入葡萄糖对照品

溶液 5 mL ($124.83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),定容至 25 mL,各溶液取 2 mL,按照 2.1.4 项下操作,测定其吸光度,结果得平均回收率 96.14%,RSD 2.17%,表明本法具有较好的回收率。

2.2 首乌藤多糖的提取

2.2.1 水提法 称取首乌藤药材粗粉 20 g,加药材 10 倍量水,100 °C 水浴回流 2 h,提取 3 次,过滤,合并药液,保存备用。

2.2.2 碱提法 称取首乌藤药材粗粉 3 份,每份 20 g,分别加入 15 倍量 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、饱和石灰水溶液,90 °C 水浴回流提取 2 次,每次 3 h,合并滤液,保存备用。

2.2.3 酶提法 称取首乌藤药材粗粉 20 g,置于烧瓶中,按料液比 1:10 加入水,50 °C 浸泡 30 min,冷却后加入 3% 已活化的纤维素酶(纤维素酶加 10 mL 水溶解,于 40 °C 水浴活化 10 min),并调溶液 pH 5,于 55 °C 下水浴酶解 4 h,过滤,滤液保存备用。

2.2.4 酶-水提法 称取首乌藤药材粗粉 20 g,按料液比为 1:10 加入水,50 °C 浸泡 30 min,冷却后加入药材量 3% 的纤维素酶并调 pH 5,于 55 °C 水浴酶解 4 h,调 pH 中性,然后 100 °C 恒温提取 2 h,过滤,滤液保存备用。

2.2.5 样品溶液的制备 各组提取液调 pH 中性,浓缩至料液比 1:1.5 ~ 1:2(原料重:溶液体积),离心去残渣,上清液加 95% 乙醇至终醇体积分数为 80%,4 °C 静置过夜,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 得多糖沉淀,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,挥干乙醚,真空干燥,即得首乌藤粗多糖,计算粗多糖得率,另取少量粗多糖样品,按照 2.1.4 项下方法操作测定多糖含量。结果碳酸钠、氢氧化钠、饱和石灰水、水、酶和酶-水提取的粗多糖得率分别为 12.37%,25.13%,3.66%,4.37%,5.32%,6.55%;各样品多糖质量分数分别为 24.89%,21.46%,15.05%,24.36%,25.82%,31.24%。以粗多糖得率及其多糖质量分数作为衡量提取效率的综合评价指标,结果见表 1。

2.2.6 数据处理方法 最佳提取条件要满足粗多糖得率高且多糖质量分数也高的要求,因此采用加权评分法综合评估首乌藤多糖的提取工艺条件。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。通过此处理,使粗多糖得率和多糖质量分数转化为 0 ~ 100 的数。根据粗多糖得率(a)与多糖质量分数(b)的作用,确定两者的权重系数均为 0.5,对这两项指标进行加权求和,通过公式 $c =$

表 1 首乌藤多糖不同提取方法的结果比较

提取方法	粗多糖得率/%	多糖质量分数/%	综合评分
碳酸钠	12.37	24.89	64.45
氢氧化钠	25.13	21.46	84.34
饱和石灰水	3.66	15.05	31.37
水提	4.37	24.36	47.68
酶提	5.32	25.82	51.91
酶-水提	6.55	31.24	63.03

0.5a + 0.5b, 即得综合评分 (c)。粗多糖得率和多糖质量分数计算公式如下:

$$\text{粗多糖得率} = \frac{\text{所得粗多糖质量}}{\text{药材质量}} \times 100\%$$

$$\text{多糖质量分数} = C \times D / M \times 100\%$$

C 为根据标准曲线回归方程求得质量浓度; D 为稀释倍数; M 为干燥后所得粗多糖的质量。

3 讨论

多糖大多能溶于水, 极性比较强^[3], 但是植物不同, 多糖性质也有所不同, 导致其提取方法也有区别。比如: 一般中性糖使用传统水提法就可以有效的提取多糖, 但对于酸性多糖, 用水提法的效果并不好, 而应该选用碱法提取, 同时也可达到破坏植物细胞壁的效果, 加速多糖的溶出, 另外采用碱法可促使多糖与蛋白质间的键裂解而有利于多糖在提取时的溶出。

不同提取方法对首乌藤粗多糖得率的影响为氢氧化钠 > 碳酸钠 > 酶-水 > 酶 > 水 > 饱和石灰水; 对多糖质量分数的影响为酶-水 > 酶 > 碳酸钠 > 水 > 氢氧化钠 > 饱和石灰水; 综合评分显示氢氧化钠提取为最佳工艺, 该法多糖得率高于其他 5 种方法, 虽多糖质量分数略低, 但从综合效果来看, 氢氧化钠提

取方法为最优。

苯酚-硫酸法^[4]和蒽酮-硫酸法^[5]为多糖质量分数测定的 2 种经典方法。由于苯酚相对价廉, 且重馏苯酚溶液配制以后只要放在冰箱冷藏保存, 一般不会影响测定结果。并且多糖在浓硫酸作用下, 先水解成单糖, 并迅速脱水生成糖醛衍生物, 与苯酚反应生成橙黄色液体, 在一定范围内, 其颜色深浅和吸光度符合朗伯-比尔定律^[6]。进一步通过稳定性、精密度、重复性和加样回收率等方法学实验说明该方法不仅准确可靠, 简便快速, 正确率和精密度高, 而且重复性好, 故选用苯酚-硫酸法作为首乌藤多糖的质量分数测定方法。在多糖质量分数测定中, 得到相应的多糖对照品较困难, 因其组成比较复杂, 往往采用葡萄糖代替对照品, 测定样品中多糖的相对质量分数。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:248.
- [2] 张寒娟, 李晓坤, 杨云, 等. 首乌藤多糖体内抗氧化活性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8): 668.
- [3] 吴玉强, 侯小涛, 郭振旺, 等. 多指标正交优选甘蔗叶多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 11.
- [4] 郭辉, 张红旭, 曲枫, 等. 红毛五加多糖胶囊中多糖含量测定[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(11): 735.
- [5] 黄东萍, 文东旭, 林文翰. 天芎注射液中多糖的含量测定[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(2): 167.
- [6] 张璐, 翁立冬, 刘莉, 等. 苯酚-硫酸法测定乌梅多糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 107.

[责任编辑 仝燕]