

紫草多糖提取工艺参数优选及其分子量测定

朱艳红¹, 邓远辉^{2*}, 王海兰¹

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广东省中医药科学院, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的: 优化紫草多糖的提取工艺, 探测其分子量组成。方法: 采用正交实验方法, 以总糖含量为评价指标, 对紫草多糖提取工艺进行筛选; 将提取得到的紫草多糖进行纯化分离, 经体外药效学实验表明其中一组分有抗人乳头瘤病毒 (HPV) 的作用, 用高效凝胶渗透色谱方法 (HP-GPC) 测定该组分分子量的组成。结果: 综合考虑, 最佳提取工艺为煎煮 3 次, 加水 15 倍量, 煎煮时间 1 h; 该多糖的重均分子量分别为 28 746, 4 877, 数均分子量分别为 27 336, 1 152。结论: 优选得到的工艺经济、简单、稳定、可行。

[关键词] 紫草多糖; 正交设计; 高效凝胶渗透色谱方法; 提取

[中图分类号] R286.3 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0006-03

中药紫草是紫草科多年生草本植物干燥的根, 具有凉血、活血、清热、解毒和透疹的功效^[1]。主治

血热毒盛、湿性斑疹、麻疹不透、疮疡、水火烫伤等。经广东省中医院皮肤科临床应用和体外药效学实验研究发现, 紫草多糖具有抗 HPV 的作用^[2-3]。为更好的利用这种成分, 我们用正交设计方法对紫草多糖的提取工艺参数进行了优选, 同时对该方法提取得到的紫草多糖进行纯化分离, 测定其分子量组成。

[收稿日期] 2009-06-26

[基金项目] 广东省科技计划资助项目(2008B030301203)

[通讯作者] * 邓远辉, Tel: (020) 39318778; E-mail: yhdeng62

@126.com

1 实验材料

1.1 仪器 TC-15 套式恒温器(新华医疗器械厂); DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);紫外分光光度计(美国 Pharmacia Biotech); HC-TP11.5 物理天平(北京医用天平厂);电子天平(美国 Denver);低速离心机(JINGLI-LD25-2); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);配示差折光(RDI)检测器及 GPC 数据处理软件;色谱柱(K-GEL G3000SWXL)。

1.2 试剂与药材 本实验研究采用新疆紫草 *Arnebia euchroma*(Royle) Johnst(20050307)(广东康美药业股份有限公司提供,经该公司药品检验室石琳药师鉴定;无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所);无水乙醇、丙酮、石油醚、浓硫酸、苯酚等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫草多糖提取工艺参数优选

2.1.1 因素水平考察 本实验采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法,并以紫草多糖的总糖含量为考察指标,其因素水平见表 1,正交实验方案见表 2。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	A(提取次数)	B(提取时间)	C(固液比)	D(误差)
1	1	0.5 h	1: 8	
2	2	1.0 h	1: 10	
3	3	1.5 h	1: 15	

2.1.2 多糖提取 精确称取新疆紫草 9 份,每份 50 g,剪成碎片,按表 2 安排实验。将各次提取液纱布过滤,合并,浓缩至 100 mL,加入 95% 乙醇,使醇含量达到 80%,室温静置 24 h 抽滤,取沉淀 60 °C 烘干,研成粉末,充分溶解于 100 mL 的蒸馏水中,离心 15 min,抽滤,滤液加入 95% 乙醇,使醇含量达到 80%,室温静置 24 h 抽滤,沉淀于 60 °C 烘干,依次用无水乙醇、丙酮、石油醚分别洗涤 3 次,于 60 °C 烘干,即得紫草粗多糖,称重分别为 0.033 4, 0.334 6, 0.431 8, 0.432 8, 0.694 7, 0.548 1, 0.865 6, 0.729 8, 0.654 0 g。

2.2 总糖含量的测定(硫酸-苯酚法)

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取在 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 50 mg,置 50 mL 的容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1 mg · mL⁻¹ 的葡萄糖溶液。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL 分别置于 10 mL 的容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,得到浓度为 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140 μg · mL⁻¹ 的溶液,分别取以上溶液各 2 mL 于具塞离心管中,分别加入 5% 的苯酚溶液 1 mL,混匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,充分混匀,冷却后,100 °C 水浴 15 min,取出,放置室温,于 490 nm 处测定吸光度,同时,用蒸馏水做一空白。以多糖的量(C, μg · mL⁻¹) 为横坐标,以吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线。结果浓度在 10 ~ 140 μg · mL⁻¹ 范围内成线性关系,实验数据做回归处理的回归方程 $Y = 0.0134X + 0.0380, r = 0.9994$ 。

2.2.3 样品溶液的制备 取“2.1.2”项下所得的粗多糖,精密称取各 10 mg,置 10 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 1 mg · mL⁻¹ 紫草粗多糖溶液。

2.2.4 样品的多糖含量测定 精确吸取“2.2.3”项下配置的各样品溶液 2 mL,按照“2.2.2”项下操作,测其吸光度,每个样本连续测 5 次,取平均值,计算总糖含量。结果见表 2。

表 2 正交实验方案

试验号	提取次数 (A)	提取时间 (B)	固液比 (C)	误差 (D)	多糖含量 (%)
1	1	1	1	1	12.59
2	1	2	2	2	27.28
3	1	3	3	3	36.41
4	2	1	2	3	44.38
5	2	2	3	1	55.44
6	2	3	1	2	49.78
7	3	1	3	2	70.79
8	3	2	1	3	68.61
9	3	3	2	1	60.02
K1	22.10	39.26	40.33		
K2	49.87	50.44	43.89		
K3	66.47	48.74	54.22		
R	44.37	11.18	13.89		

将正交实验结果进行方差分析。结果见表 3。

2.3 紫草多糖分子量测定 将该方法提取得到的紫草多糖进行纯化分离,经体外药效学实验表明其中一部分有抗 HPV-DNA 的作用^[3]。将该组分及已知分子量为 0.738, 0.58, 1.22, 2.37, 4.8, 10, 18.6,

$38, 83.5 \times 10^4$ 的多糖标样, 用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH = 6.7, 加 0.05% NaN_3) 溶解, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 滤液进样量为 $20 \mu\text{L}$, 流动相为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH = 6.7, 加 0.05% NaN_3), 体积流量 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 色谱柱 (TSK-GEL G3000SWXL $7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$), 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 进行高效凝胶渗透色谱方法 (HP-GPC) 分析。以多糖标样的保留时间为横坐标, 多糖分子量的对数为纵坐标作 GPC 校正曲线。根据标准校正曲线求得各组分多糖的重均分子量 (Mw) 和数均分子量 (Mn)。

表 3 方差分析表

误差来源	方差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	2 557.924	2	1 278.962	27.075	<0.05
B	102.462	2	51.231	1.085	
C	217.930	2	108.965	2.307	
误差	94.474	2	47.237		

2.4 实验结果

2.4.1 由表 2 直观分析可知, 以总糖含量为评价指标, 各因素对提取效果的影响程度依次为 $A > C > B$, 最佳的提取条件是 $A_3B_2C_3$, 即提取次数是 3 次, 提取时间是 1 h, 提取的固液比是 1: 15。由表 3 方差分析可以看出提取次数有显著性差异 ($P < 0.05$), 而提取时间和提取的固液比无显著性差异, 其影响较小。

2.4.2 紫草多糖的凝胶渗透色谱图中测试样品在 14.6 及 20 min 处有两个吸收峰, 根据 GPC 校正曲线及样品的保留时间, 采用 GPC 软件计算样品组分

表 4 紫草多糖分子量的测试结果 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

分析项目	保留时间 1	保留时间 2
	14.6 min	20.0 min
重均分子量 (Mw)	28 746	4 877
数均分子量 (Mn)	27 336	1 152
相对含量 (%)	63	37

3 讨论

紫草是一种常用中药, 紫草多糖作为其有效成分之一, 具有多种药理作用。本实验采用了水提醇沉这种多糖提取最常用的精制工艺, 并优化了其水提工艺, 经过优化的工艺经济、简单、稳定、可行, 使多糖的含量升高, 该研究结果为紫草多糖进一步的精制提供了依据。

该方法提取的紫草多糖经纯化分离后其中一个组分具有抗 HPV 的生物活性, 采用高效凝胶渗透色谱方法对该部分做分子量测定, 得出该部分紫草多糖含有两个不同分子量的多糖。但是, 具体哪个分子量的紫草多糖对 HPV-DNA 有杀灭作用, 或是两者的联合作用, 还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 238-239.
- [2] 符惠燕, 邓远辉, 冯 怡, 等. 紫草抗人乳头瘤病毒作用的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(4): 259-260.
- [3] 邓远辉, 王海兰, 韩 凌. 紫草多糖的分离纯化及生物活性研究[J]. 中药材, 2008, 31(3): 753-756.