

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.010

地稔多糖微波提取与回流提取工艺比较*

曾荣香, 陈丽, 蓝义琨, 雷凯君

(广东省佛山市中医院药剂科, 广东 佛山 528000)

摘要:目的 优选地稔多糖的最佳提取工艺。方法 采用水提醇沉法提取地稔多糖,以苯酚硫酸法测定多糖含量。采用单因素考察试验比较微波提取与回流提取的多糖提取率。采用正交试验确定地稔多糖的最佳提取工艺。结果 微波提取地稔多糖的时间短于回流提取,但回流提取的多糖提取率高于微波提取;回流提取的最佳提取工艺为20倍水量,提取3次,每次2 h。结论 回流提取更适合地稔多糖的提取。

关键词:地稔多糖;苯酚硫酸法;微波提取;回流提取

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)13-0039-03

Comparison of Microwave Extraction Versus Reflux Extraction for *Melastoma Dodecandrum*

ZENG Rongxiang, CHEN Li, LAN Yikun, LEI Kaijun

(Department of Pharmacy, Foshan Hospital of Chinese Traditional Medicine, Foshan, Guangdong, China 528000)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction technology of polysaccharides from *Melastoma dodecandrum*. **Methods** Water extraction and alcohol precipitation was used for the extraction of *Melastoma dodecandrum*, and the polysaccharide content was determined by phenol sulfuric acid method; a single factor test was used to compare the extraction rate of polysaccharides extracted by microwave extraction and reflux extraction. Orthogonal experiment was used to determine the best extraction process of *Melastoma dodecandrum*. **Results** Microwave extraction time was shorter than that of the reflux extraction, but reflux extraction rate was higher than that of the microwave extraction. The optimal reflux extraction parameters were 20 times water, 3 extraction times, and each for 2 h. **Conclusion** The reflux extraction could be a better method for polysaccharides extraction in the *Melastoma dodecandrum*.

Key words: polysaccharides in *Melastoma dodecandrum*; phenol sulfuric acid method; microwave extraction; reflux extraction

地稔 *Melastoma dodecandrum* Lour. 为野牡丹科植物地稔的全草^[1],喜酸性土壤,广泛分布于江浙、两广、福建、贵州、湖南等地区,其味甘、微涩,性凉,具有清热解毒消肿、活血祛瘀止血的功效,常用于治疗高热、疮痍肿痛、咽喉肿痛、痔疮、毒蛇咬伤等症^[2]。地稔的多糖类成分药理作用广泛,如抗氧化、清除自由基、抗溃疡、抗炎症、抗肿瘤、抗衰老、降糖调脂等^[3-4]。目前,对地稔活性成分的研究多集中于没食子酸^[5-6],但对地稔多糖的研究报道不多。多糖的提取一般采用回流提取法,目前也有关于微波提取多糖的报道^[7-9]。本研究中采用单因素考察比较微波提取和回流提取的多糖提取率,通过正交试验优选地稔多糖的最佳提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:UV2550型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);BT25S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,精度为十万分之一);HWC-3LA型微波提取设备(广州兴兴微波能设备有限公司);KDM型控温电热套(山东华鲁电热仪器有限公司);R-200型旋转蒸发器(厦门精艺兴业科技有限公司);Sorvall Legend X1型高速大容量离心机(德国 Thermo 公司);SZ-93型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

试剂:地稔饮片(广州致信中药饮片有限公司,批号

为130801);D-无水葡萄糖(中国药品生物制品检定所,批号为110833-201204);苯酚、浓硫酸、95%乙醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖含量测定

2.1.1 溶液制备

无水葡萄糖 105℃干燥至恒重,取60.00 mg,精密称定,置100 mL容量瓶,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,备用,即得对照品溶液。取样品20 g,浸泡30 min,微波或回流提取,过滤,浓缩至20 mL,加4倍量的95%乙醇,放置冰箱中醇沉过夜,离心,取沉淀稀释至1 000 mL,再取10 mL稀释至100 mL,即得供试品溶液。

2.1.2 标准曲线绘制

分别精密量取葡萄糖对照品溶液1,2,3,4,5 mL,置50 mL容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,再分别精密量取2 mL置25 mL具塞试管中,加5%苯酚溶液1 mL,摇匀,迅速加浓硫酸7.5 mL,摇匀,室温放置15 min,置冷水中冷却30 min取出,以相应试剂为空白,按分光光度法于490 nm波长处测定吸光度^[10]。以葡萄糖质量浓度(C)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A = 0.0473C + 0.0574$, $R^2 = 0.9982$ ($n = 5$)。结果表明,葡萄糖溶液质量浓度在12~60 μg/mL范围内与吸光度线性关系良好。

*基金项目:广东省佛山市医学类科技攻关项目[201208074]。

第一作者:曾荣香,女,大学本科,主任中药师,研究方向为中药制剂,(电子信箱)okzrx@163.com。

2.1.3 样品含量测定

精密吸取供试品溶液 2 mL, 置 25 mL 具塞试管中, 按标准曲线项下操作, 代入回归方程, 计算含量。

2.2 单因素考察

2.2.1 微波提取

提取时间: 取样品 20 g, 按料液比 1:30 加水 600 mL, 每个条件取 3 个平行, 置微波提取设备中, 在 700 W 功率下分别提取 5, 10, 15, 20, 25 min, *RSD* 分别为 1.46%, 1.14%, 0.67%, 0.99%, 2.52% ($n=3$)。由图 1 可见, 5~20 min 多糖提取率处于平稳状态, 20 min 后呈下降趋势, 可能是较长时间的微波辐射使多糖的稳定性下降, 从而影响其含量, 故微波提取时间不宜过长。

料液比: 取样品 20 g, 置微波提取设备中, 在 700 W 功率下提取 15 min, 每个条件取 3 个平行, 分别按 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 的比例加水提取, 结果的 *RSD* 分别为 1.03%, 0.69%, 0.88%, 1.21% ($n=3$)。由图 2 可见, 料液比对地稔多糖提取率的影响并不大。由于地稔饮片吸水性较强, 为使药材完全浸泡, 故料液比 1:20 相对较佳。

微波功率: 取样品 20 g, 按料液比 1:20 加水 400 mL, 每个条件取 3 个平行, 置微波提取设备中提取 15 min, 分别于 400, 500, 600, 700, 800 W 提取功率下提取, 结果的 *RSD* 分别为 1.80%, 1.20%, 0.81%, 1.20%, 0.92% ($n=3$)。由图 3 可见, 多糖的提取率随着微波功率的增大而升高, 但 700 W 后无显著变化。

提取次数: 取样品 20 g, 按料液比 1:20 加水 400 mL, 每个条件取 3 个平行, 置微波提取设备中, 在 700 W 功率下提取 15 min, 分别提取 1, 2, 3 次, 结果的 *RSD* 分别为 0.91%, 0.52%, 0.42% ($n=3$)。由图 4 可见, 地稔多

糖提取率随提取次数的增多而升高。

2.2.2 回流提取

提取时间: 取样品 20 g, 按料液比 1:20 加水 400 mL, 每个条件取 3 个平行, 分别提取 1, 2, 3, 4, 5 h, 结果的 *RSD* 分别为 0.86%, 1.88%, 1.60%, 2.87%, 1.12% ($n=3$)。由图 5 可见, 1~2 h 多糖提取率显著增加, 而 2 h 后随着时间的延长并无显著变化, 故提取 2 h 最佳。

料液比: 取样品 20 g, 提取 1 h, 每个条件取 3 个平行, 分别按 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 的比例加水提取, 结果的 *RSD* 分别为 0.93%, 0.59%, 0.64%, 0.37% ($n=3$)。由图 2 可见, 料液比对地稔多糖提取率的影响不大, 故 1:20 相对较佳。

提取次数: 取样品 20 g, 按料液比 1:20 加水 400 mL, 提取 2 h, 每个条件取 3 个平行, 分别提取 1, 2, 3 次 (结果的 *RSD* 分别为 0.30%, 2.99%, 2.26% ($n=3$))。由图 4 可见, 地稔多糖提取率随提取次数的增多而升高。

2.2.3 微波辅助回流提取

取样品 20 g, 按料液比 1:20 加水 400 mL, 先在 700 W 功率下微波提取 10 min, 再回流提取 2 h, 平行 3 次, 结果的 *RSD* 为 1.03% ($n=3$)。

2.2.4 多糖提取率比较

由图 1 至图 5 可见, 回流提取的多糖提取率增长趋势比微波提取更显著。由图 6 可见, 微波辅助回流提取的多糖提取率并未高于回流提取。

2.3 正交试验设计

由单因素考察试验结果可见, 回流提取比微波提取更适合地稔多糖的提取, 故对回流提取进行正交设计优化。选择提取时间 (因素 A)、料液比 (因素 B)、提取次数 (因素 C) 3 个因素为考察对象, 每个因素拟 3 个水平,

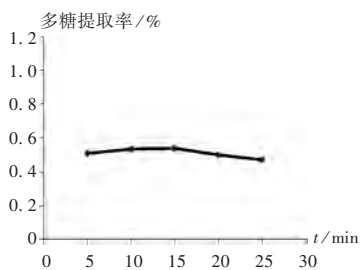


图1 微波提取时间对地稔多糖提取率的影响

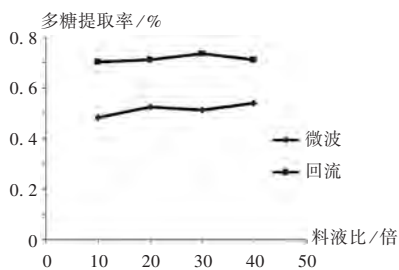


图2 料液比对地稔多糖提取率的影响

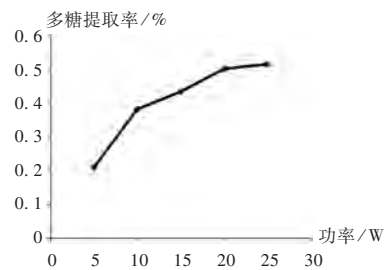


图3 微波功率对地稔多糖提取率的影响

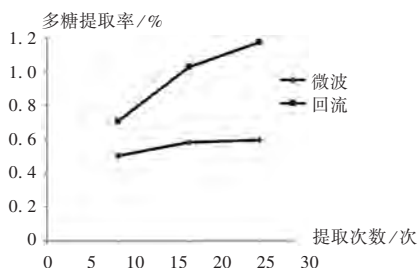


图4 提取次数对地稔多糖提取率的影响

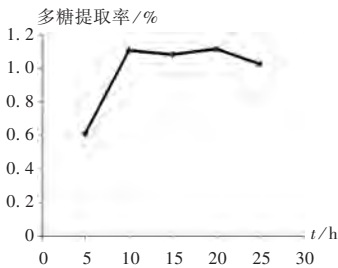


图5 回流提取时间对地稔多糖提取率的影响

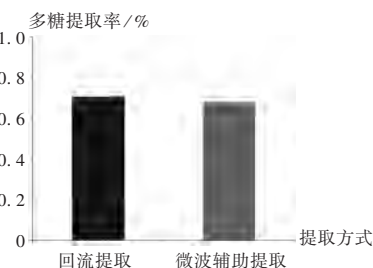


图6 微波辅助回流提取与回流提取的比较

选用 $L_9(3^4)$ 正交设计优化回流提取工艺。因素水平见表 1。正交试验结果见表 2, 方差分析结果见表 3。可见, A 列 K 值 $A_3 > A_2 > A_1$, B_1 、 B_2 、 B_3 相差不大, 说明因素 B 的三水平差不多; C 列 K 值 $C_3 > C_2 > C_1$, 说明 C_3 比 C_1 和 C_2 好。由直观分析表明, 因素 C 的极值 R 最大, 为主要影响因素, 其次为因素 A, 最后是因素 B。故各因素对提取效果的影响程度依次为 $C > A > B$ 。由方差分析结果可见, 因素 A、因素 C 是极显著因素。综合考虑, 优选出的最佳提取工艺为 $A_2B_1C_3$, 即 20 倍水量, 提取 3 次, 每次 2 h。

表 1 $L_9(3^4)$ 因素水平

水平	因素 A(h)	因素 B(倍)	因素 C(次)
1	1	20	1
2	2	30	2
3	3	40	3

表 2 正交试验方案与结果

序号	A(h)	B(倍)	C(次)	D(误差)	地稔多糖含量(%)
1	1	1	1	1	0.53
2	1	2	2	2	0.78
3	1	3	3	3	0.95
4	2	1	2	3	0.98
5	2	2	3	1	1.07
6	2	3	1	2	0.71
7	3	1	3	2	1.16
8	3	2	1	3	0.78
9	3	3	2	1	1.06
K_1	2.26	2.67	2.02	2.66	
K_2	2.76	2.63	2.82	2.65	
K_3	3.00	2.72	3.18	2.71	
R	0.74	0.09	1.16	0.06	

表 3 方差分析结果

因素	离差平方和(SS)	自由度(F)	F 值	F 临界值	P
A(h)	0.095 0	2	137.9	99.000	<0.05
B(倍)	0.001 4	2	2.0	99.000	
C(次)	0.235 0	2	341.2	99.000	<0.05
D(误差)	0.000 7	2	1.0	99.000	

注: $\alpha = 0.01$ 。

2.4 验证试验

分别称取同一批样品 20 g, 平行 3 份, 用 20 倍水量浸泡 30 min, 提取 3 次, 每次 2 h。在此工艺下, 地稔多糖的提取率为 1.12%。

3 讨论

目前, 多糖提取方法有超声提取法、回流提取法、微波提取法、酶提取法等, 其中超声提取技术可通过超声的空化作用及其次级效应, 如机械振动、扩散、乳化、击碎、化学效应等, 促进植物有效成分溶出、扩散、释放并与溶剂充分混合^[11]。预试验结果显示, 超声提取地稔

多糖效率很低, 不利于提高药材的使用率。微波提取是将微波射线辐射于溶剂, 微波射线透过细胞壁到达细胞内部, 极性溶剂及细胞液可吸收微波能, 导致细胞内部及附近的温度升高, 细胞内气化压力增大至超过细胞壁承受能力时, 细胞壁破裂, 细胞内成分释放转移到溶剂中^[12]。回流提取法是常规提取方法, 操作简单, 成本较低。酶提取法提取条件温和, 提取率高, 但工艺条件要求及成本也较高^[13], 不利于大规模工业化生产。

本试验结果显示, 微波提取达到平衡态的时间虽比回流提取时间短, 但提取率明显低于回流提取, 表明微波提取不适合地稔多糖。超声提取法和微波提取法操作简单, 提取率高, 但提取较剧烈, 易造成多糖降解^[14-15]。综合回流提取的单因素试验、正交试验和实际应用考虑, 地稔多糖更适合的提取工艺为回流提取, 最佳提取条件为料液比 1:20, 提取 3 次, 每次提取 2 h, 此条件下的地稔多糖提取率约为 1.1%。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第二册)[M]. 北京: 科学出版社, 1972: 1002.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(5)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 628.
- [3] 张超, 姚惠珍, 徐兰琴. 地稔多糖 MDI 清除活性氧自由基及对人红细胞膜脂质过氧化作用影响的研究[J]. 广州医学院学报, 2002, 30(4): 18.
- [4] 李丽, 罗泽萍, 周煥第, 等. 地稔乙酸乙酯提取部位对糖尿病小鼠血糖、血脂及抗氧化作用的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015(35): 3250-3252.
- [5] 刘敏, 李水福, 程科军. HPLC 法测定畲药地稔药材中没食子酸和槲皮素[J]. 中草药, 2012, 43(4): 721.
- [6] 彭玲, 谢晟, 陈小清, 等. 高效液相色谱法测定地稔中没食子酸含量[J]. 食品工业, 2012, 33(12): 177.
- [7] 王秀文, 王颖莉, 裴晓丽, 等. 均匀设计法优选党参茯苓水溶性多糖的微波提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 24.
- [8] 陈艾萌, 潘洁, 胡博, 等. 川牛膝多糖抗氧化活性测定和微波提取工艺优化[J]. 中成药, 2017, 39(1): 80-84.
- [9] 李萍, 秦国正, 付双, 等. 打破碗花花多糖微波提取工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(4): 954-957.
- [10] 罗毅, 潘细贵, 刘刚, 等. 苯酚硫酸法测定多糖含量显示方式的优选[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(1): 45.
- [11] 边洪荣, 孙广利, 张海岚. 用正交试验法研究超声提取香菇多糖的最佳工艺[J]. 中药材, 2006, 19(3): 289.
- [12] 黎海彬, 王邕, 李俊芳. 微波辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J]. 现代食品科技, 2005, 21(3): 148-149.
- [13] 李玲, 王维香, 王晓君. 果胶酶法提取川芎多糖工艺的研究[J]. 中药材, 2008, 31(4): 600-602.
- [14] 徐凌川, 张华, 许昌盛, 等. 超声波提取灵芝多糖的最佳工艺探讨[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 471-472.
- [15] 尹艳, 高文宏, 于淑娟, 等. 微波提取水溶性大豆多糖工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 26(2): 21-23.

(收稿日期: 2019-11-28)