

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.04.013

正交试验优选地稔多糖提取工艺*

张帆¹, 毛卓炯², 刘亚平², 金镭^{1△}, 叶喜德²

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇一医院药剂科, 安徽 合肥 230031; 2. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)
摘要:目的 优选地稔多糖的提取工艺。方法 采用苯酚硫酸法测定多糖含量, 通过单因素考察, 比较微波提取与回流提取的多糖提取率; 在此基础上以多糖提取得率为评价指标, 从提取时间、料液比、提取次数为3因素, 采用正交试验优化提取工艺。结果 回流提取的多糖提取率高于微波提取; 回流提取优化工艺条件为加20倍水, 提取3次, 每次2 h。结论 回流提取方法更适用于提取地稔多糖, 优化后的工艺稳定可行。

关键词:地稔多糖; 微波提取; 回流提取; 工艺优化; 正交试验

中图分类号: R932; R284.2; TQ460.6

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)04-0049-05

Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Melastoma Dodecandrum* by Orthogonal Test

ZHANG Fan¹, MAO Zhuojiong², LIU Yaping², JIN Lei¹, YE Xide²

(1. Department of Pharmacy, The 901th Hospital of PLA Joint Service Support Force, Hefei, Anhui, China 230031; 2. College of Pharmacy, Jiangxi University of Tradition Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi, China 330004)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of polysaccharide from *Melastoma dodecandrum*. **Methods** The content of polysaccharide was determined by phenol sulfuric acid method, and the effect of microwave extraction and reflux extraction on the yield of polysaccharide was compared by single factor investigation. On this basis, the extraction process was optimized by orthogonal test with the yield of polysaccharide as evaluation index, extraction time, solid-liquid ratio and extraction times as three factors. **Results** The yield of polysaccharide extracted by reflux extraction was higher than that extracted by microwave extraction, and the optimum conditions of reflux extraction were as follows: adding 20 times water, extracting three times, 2 h each time. **Conclusion** Reflux extraction method is more suitable for the extraction of polysaccharide from *Melastoma dodecandrum*, and the optimized process is stable and feasible.

Key words: polysaccharide from *Melastoma dodecandrum*; microwave extraction; reflux extraction; process optimization; orthogonal test

地稔 *Melastoma dodecandrum* Lour. 为野牡丹科植物地稔干燥全草, 又名山地苘、铺地稔、落地稔、地茄等^[1], 主要分布于广西、湖南、广东、江苏、浙江、福建等地, 适宜于山坡路旁矮草丛的酸性土壤中生长。地稔性凉, 味甘、涩, 有活血止血、消肿祛瘀、清热解毒功效^[2], 临床常用于治疗热入营血所致高热、疮疡肿毒、咽喉肿痛、风火牙痛、痛经等证, 也可治疗痔疮、毒蛇咬伤等^[3]。多糖为地稔主要成分之一, 有抗氧化、抗衰老、抗炎、抗肿瘤、降血糖、调血脂等作用^[4]。目前对地稔成分的研究多集中于黄酮类^[5]和凝集素类成分^[6], 对没食子酸^[7]、多糖^[8]和挥发油^[9]等主要分析其含量和性质, 而地稔多糖提取相关内容尚未见报道。多糖为水溶性成分, 通常以水为溶剂^[10-11], 采用回流提取法提取, 但也有微波提取的报道^[12]。本研究中以多糖含量为评价指标, 通过单因素考察, 比较微波提取与回流提取的多糖提取率。在此基础上, 采用正交试验优化提取工艺, 为深入开发地稔药用资源提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-8000S 型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); BT25S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司, 精度为 0.01 mg); TDL-80-2C 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); KDM 型控温电热套(鄞城华鲁电热仪器有限公司); HWC-3LA 型微波提取仪(广州兴兴微波能设备有限公司); 离心机(德国 Thermo 公司); OSB-2200 型旋转蒸发仪(厦门精艺兴业科技有限公司); HH-66 型多功能数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂

地稔饮片(江西天施康中药股份有限公司, 批号为 20191127); D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 190852-201904); 苯酚、浓硫酸、95%乙醇均为分析纯, 水为纯化水。

*基金项目: 江西省学位与研究生教育教学改革研究项目[JXYJG-2019-122]。

第一作者: 张帆, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药物制剂学, (电话)0791-87118995。

△通信作者: 金镭, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药制剂学, (电话)0551-65967757(电子信箱)369548689@qq.com。

2 方法与结果

2.1 多糖含量测定

对照品溶液制备:取干燥后的D-无水葡萄糖60 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,保存,备用。

供试品溶液制备:取地稔饮片20 g,浸泡30 min,回流提取后,滤过,浓缩至20 mL,加4倍量95%乙醇,醇沉过夜,离心,取沉淀稀释至1 000 mL,再取10 mL稀释至100 mL,备用。

测定波长选择:取对照品溶液,进行全波长扫描,结果在490 nm波长处吸光度最高,干扰最小,故以此为检测波长。

线性关系考察:精密量取对照品溶液1, 2, 3, 4, 5 mL,分别置50 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;分别取2 mL,置具塞试管中,加5%苯酚溶液1 mL,摇匀,加浓硫酸7.5 mL,轻摇,室温放置15 min,冷却30 min,取出,以相应试剂为空白对照,进样,测定吸光度^[18]。以吸光度(Y)为纵坐标、待测溶液质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.0472X + 0.0573$, $R^2 = 0.9986$ ($n = 5$),待测溶液质量浓度线性范围为0.0582 ~ 0.2912 mg/mL。

样品含量测定:精密量取供试品溶液2 mL,置25 mL具塞试管中,按线性关系考察项下方法操作,代入回归方程,计算含量。

2.2 单因素考察

2.2.1 微波提取法

提取时间:称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,按料液比1:30(g/mL,下同)加水600 mL,置微波提取设备中,于700 W功率下分别提取5, 10, 15, 20, 25 min,同法测定多糖含量,平行试验3次(见图1)。多糖提取率在5 ~ 20 min内处于平稳状态,此后呈下降趋势。可能是由于长时间微波辐射的作用,杂质溶出较多或地稔多糖稳定性下降,从而影响其含量。综合考虑时间和能源消耗,微波提取时间不宜过长。

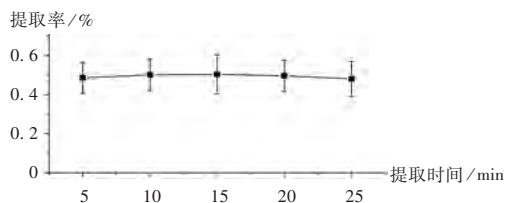


图1 微波提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of microwave extraction time on the extraction yield of polysaccharide

料液比:称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,固定提取时间15 min、微波功率700 W,分别以料液比1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50的比例加水提取,平行试验3次,同法测定多糖含量(见图2)。多糖含量在料液比达

1:40时呈下降趋势,为1:20时的地稔多糖提取率相对较高。

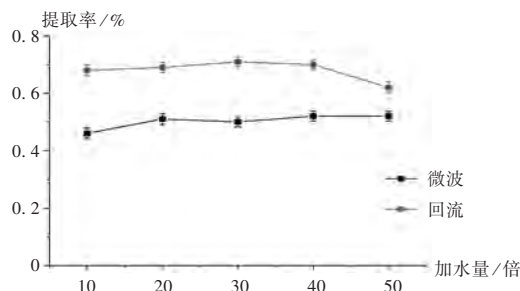


图2 加水量(液料比)对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of water addition(liquid-material ratio) on the extraction yield of polysaccharide

微波功率:称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,按上述提取条件,固定料液比和提取时间,其中料液比按1:20加水400 mL、提取时间为15 min,分别于400, 500, 600, 700, 800 W提取功率下提取,按前述方法测定多糖含量,平行试验3次(见图3)。地稔多糖提取率随着微波功率的增大而升高。

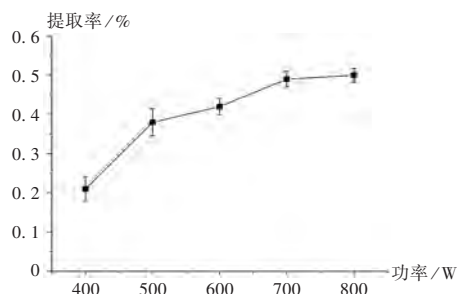


图3 微波功率对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of microwave power on the extraction yield of polysaccharide

提取次数:称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,固定料液比为1:20,提取功率为700 W,提取时间为15 min,分别提取1, 2, 3次,按前述方法测定多糖含量,平行试验3次(见图4)。可见,微波提取次数对多糖提取率的影响相差较小。

2.2.2 回流提取法

提取时间:称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,按料液比1:20加水400 mL,分别提取1, 2, 3, 4, 5 h,

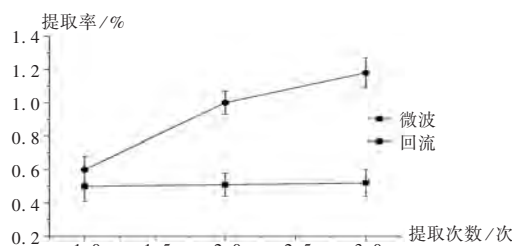


图4 提取次数对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of extraction times on the extraction yield of polysaccharide

依照前述方法测定多糖含量,平行试验3次(见图5)。1~2 h 多糖提取率显著增加,此后随着时间的延长未见显著变化,综合能耗和时间考虑,故以2 h 为最佳提取时间。

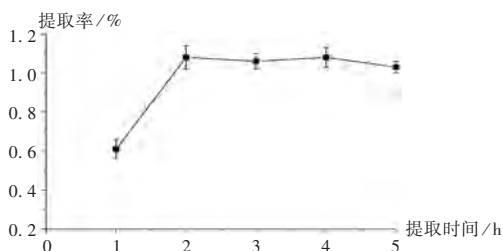


图5 回流提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of reflux extraction time on the extraction yield of polysaccharide

料液比:称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,固定提取时间为2 h,分别按料液比1:10,1:20,1:30,1:40,1:50的比例加水提取,依照前述方法测定多糖含量,平行试验3次(见图2)。可见,料液比对地稔多糖提取率的影响并不大,考虑地稔饮片具有吸水性,为了使药材完全浸泡,综合考虑,故以料液比1:20为佳。

提取次数:称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,固定料液比1:20加水400 mL、提取时间为2 h,分别提取1,2,3次,依照前述方法测定多糖含量,平行试验3次(见图4)。可见,提取次数越多,地稔多糖的提取率也相应升高,其中回流提取率增高趋势比微波提取率显著。

2.2.3 微波辅助回流提取

称取地稔饮片干燥后的粉末20 g,按料液比1:20加水400 mL,先于700 W 功率下微波提取15 min,再回流提取2 h,依照前述方法测定多糖含量,平行试验3次(见图6)。可见,微波辅助回流提取率并不明显高于直接回流提取。

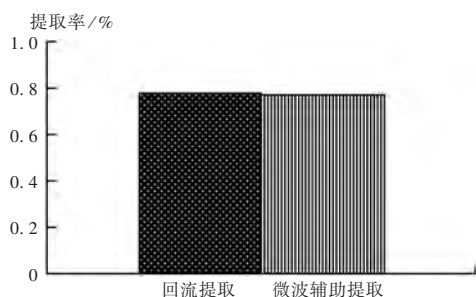


图6 微波辅助回流提取与回流提取的效果比较

Fig. 6 Comparison of microwave assisted reflux extraction and reflux extraction

2.4 正交试验

根据单因素试验结果,地稔多糖回流提取效果优于微波提取,故选择回流提取工艺进行优化。以提取时间(A)、料液比(B)、提取次数(C)为影响因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行设计和试验,平行操作3

次,按前述方法测定多糖含量,计算综合评分,以多糖含量为评价指标,优化提取工艺参数。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab. 1 Factors and their levels

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

结果见表2和表3。各因素对提取效果影响程度为 $C > A > B$,因素A、因素C是显著因素。结合试验结果和实际应用,优选最佳提取工艺为 $A_2B_1C_3$,即加20倍水,提取3次,每次2 h。

表2 正交试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of the orthogonal test

序号	A	B	C	D	地稔多糖含量(%)
1	1	1	1	1	0.54
2	1	2	2	2	0.77
3	1	3	3	3	0.96
4	2	1	2	3	0.97
5	2	2	3	1	1.08
6	2	3	1	2	0.70
7	3	1	3	2	1.15
8	3	2	1	3	0.77
9	3	3	2	1	1.05
K_1	0.756	0.890	0.672	0.891	
K_2	0.921	0.882	0.946	0.886	
K_3	1.002	0.911	1.061	0.904	
R	0.245	0.031	0.385	0.015	

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	$F_{\text{临界值}}$	P
A	0.093	2	94.000	19.000	<0.05
B	0.001	2	1.000	19.000	
C	0.236	2	237.000	19.000	<0.05
D	0.000	2	0.000	19.000	
误差	0.001	2			

2.5 验证试验

分别称取同一批地稔饮片20 g,平行制备3份,用20倍水浸泡30 min,提取3次,每次2 h。在该工艺下,地稔多糖的提取率为1.1%。

3 讨论

多糖是由多个单糖缩合而成的一种生物大分子物质,常以糖苷键线性或分枝链接而成。许多中药如枸杞、黄芪和灵芝等均以其为有效活性成分^[13]。目前,多糖含量测定方法一般有比色法、高效液相色谱法和滴定法

等。其中使用较广的是比色法,主要包括苯酚硫酸法、3,5-二硝基水杨酸法和硫酸蒽酮法等^[14-15]。多糖含量测定易受药材质地、反应时间和温度、对照品等多种因素的影响。鉴于地稔多糖提取未见文献报道,本试验中按预试验结果,以 D-无水葡萄糖为对照品,选择苯酚硫酸法测定多糖含量,选择影响多糖提取率的因素进行了方法学考察。单因素考察选择的主要依据是由地稔多糖的理化性质及预试验结果决定的。由于同一因素在不同条件下会影响到地稔多糖的提取率;同时,几个不同因素在各自不同条件下会对多糖提取率产生交互作用。因此,在单因素试验中,只能逐步对每个因素进行考察,而将其他因素设为固定。设计这种方法的先决条件,是假设各因素间不会产生交互作用。故在本试验中选择了提取时间、料液比、提取次数 3 个影响多糖提取率的因素进行考察,目的是探讨这些因素在不同条件下对多糖提取率的影响。根据多糖测定原理,在硫酸作用下多糖易分解成单糖后,迅速脱水生成糖醛衍生物,与苯酚缩合生成稳定的橙黄色化合物,于 490 nm 波长处和一定质量浓度范围内,其吸光度与多糖含量呈线性关系。结果表明,葡萄糖溶液在其线性范围内与吸光度线性关系良好,可利用标准曲线定量测定样品中多糖的含量。

多糖提取方法较多,主要有水提醇沉法^[16]、超声提取法^[17]、微波提取法^[18]、酶解辅助提取法^[19]和回流提取法^[20]等。其中,超声提取是利用超声空化效应、热反应和机械作用,借助超声波对介质的作用,使被提取成分加速溶出的有一种方法。但多糖经超声处理后,糖苷键易发生断裂,降低得率。酶解辅助提取法虽可提高多糖得率,但由于提取条件严格,增加了成本,不利于工业化生产。微波提取是通过极性溶剂和细胞液对微波能的吸收,使细胞内部及其周边环境温度迅速升高,超过细胞壁承受范围时,使化合物易于溶出的一种提取方法。而回流提取是常用方法,通过循环回流溶剂对药材的浸出,使多糖充分溶出。相比其他提取工艺,该方法操作简单,成本低,提取效率高,利于工业化生产。基于此,本试验中比较了微波和回流 2 种提取方法,以多糖提取率为评价指标进行了工艺考察。对于微波提取,首先通过单因素试验,确定提取时间、料液比、微波功率、提取次数等因素对多糖含量的影响。结果表明,微波提取时间过长会影响提取率,料液比为 1:20,并随微波功率和次数增加而使多糖含量增高。对于回流提取,确定最佳回流提取时间为 2 h,而料液比及采用微波辅助回流提取,对多糖提取率影响较小,但提取次数增多可提高多糖提取率。

为进一步考察微波提取工艺,在正交试验中,参数选择的主要依据是对地稔多糖的提取率影响较大,并进一步确认这些因素的影响强弱顺序,从而确定最佳提取

工艺条件,提高多糖提取率。综合分析研究结果,微波提取比回流提取时间短,但地稔多糖提取率较回流提取低。说明微波在提取过程中,可能由于微波辐射产生的高热,破坏了地稔多糖的分子结构,影响了提取率。回流提取中,多糖类易溶于水,在提取过程中不易破坏糖分子结构,使得提取率较高。但这些原因仍有待深入研究。

综上所述,回流提取相对微波提取,多糖提取率更高,更适合地稔多糖的提取,其工艺优选条件为液料比 20:1(即加 20 倍水),提取 3 次,每次 2 h。验证试验结果显示,该提取工艺稳定、可行,可为地稔多糖工艺研究奠定基础。鉴于目前未见地稔多糖提取的文献报道,尚难把本研究成果与其他研究进行比较。

参考文献

- [1] ZHENG XS, REN CW, HUANG S, et al. Structure and features of the complete chloroplast genome of *Melastoma dodecandrum*[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2019, 25(4): 1043 - 1054.
- [2] HAO Y, WEN ZY, CHEN B, et al. The re-sequencing and re-assembly of complete chloroplast genome of *Melastoma dodecandrum*(*Melastomataceae*) from Fujian, China[J]. *Taylor & Francis*, 2019, 4(2): 2219 - 2220.
- [3] 岑祚洁. 地稔水提物和醇提物抗鸭乙型肝炎病毒及护肝作用的实验研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2019.
- [4] 吴霁荣. “二稔汤”加减方治疗脾虚挟湿型经行泄泻的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2018.
- [5] 杨菁, 朱丹, 杜雨涵, 等. 地稔总黄酮的纯化工艺研究[J]. *山东化工*, 2018, 47(16): 19 - 20.
- [6] 邓政东, 程爱芳, 李秀丽. 地稔凝集素的提取及凝血活性的研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2015, 5(2): 56 - 58.
- [7] 刘敏, 李水福, 程科军. HPLC 法测定畚药地稔药材中没食子酸和槲皮素[J]. *中草药*, 2012, 43(4): 721 - 723.
- [8] 曾荣香, 张清华, 管咏梅, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定地稔多糖中单糖组成[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(10): 73 - 76.
- [9] 黄仕清, 徐文芬, 张明昶, 等. 地稔挥发油的气相特征指纹图谱研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(5): 349 - 353.
- [10] 明惠仪, 麻秀萍, 杨菁, 等. 民族药地稔研究的现状分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(11): 228 - 234.
- [11] MTETWA MD, QIAN LS, ZHU HA, et al. Ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Acanthus ilicifolius*[J]. *Journal of Food measurement and Characterization*, 2020, 14(3): 1223 - 1235.
- [12] AKHTAR I, JAVAD S, ANSARI M, et al. Process optimization for microwave assisted extraction of *Foeniculum vulgare* mill using response surface methodology[J]. *Journal of King Saud University - Science*, 2020, 32(2): 1451 - 1458.
- [13] 李娅, 刘京晶, 张新风, 等. 铁皮石斛非淀粉多糖含量测定方法的研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(15): 3221 - 3225.