

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.02.027

蒙药耧斗菜多糖提取方法及 质量分数测定的研究^①

云学英, 王建华, 李成林,
况媛媛, 李振, 韩士强

内蒙古医科大学 药学院, 呼和浩特 010110

摘要: 目的: 优选蒙药耧斗菜多糖的提取方法, 并测定其质量分数. 方法: 用回流法与超声法提取蒙药耧斗菜多糖, 用硫酸-苯酚法测定其多糖质量分数, 设计正交试验优化超声提取法. 结果: 2 种提取方法得到的蒙药耧斗菜粗多糖均为棕色粉末, 回流法粗多糖产率为 3.47%, 多糖质量分数为 6.86 mg/g, 超声法得到的粗多糖产率为 2.61%, 多糖质量分数为 18.90 mg/g; 正交试验优选出的超声提取条件为: 料液比 1:20, 超声时间 60 min, 超声温度 50 °C, 超声功率 80 W. 结论: 回流法提取得到的粗多糖产量高, 多糖质量分数低, 提取时间较长, 操作步骤多; 超声法得到的粗多糖产量低, 多糖质量分数高, 提取时间较短, 操作步骤较为简便. 后者更适合于植物多糖的质量分数测定.

关键词: 蒙药耧斗菜; 多糖; 提取; 正交试验; 质量分数

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)02-0171-06

蒙药耧斗菜(*Aquilegia viridiflora* Pall.) 是毛茛科耧斗菜属植物, 生长于海拔 200~2 300 m 的山地路旁、河边或潮湿草地, 主要分布于东北、华北及陕西、宁夏、甘肃、青海和内蒙古等地. 目前蒙医临床和蒙药生产企业使用的“乌日勒其-额布斯”均为耧斗菜^[1]. 蒙药耧斗菜具有通经活血、催产、下胎衣、愈伤、止痛等功效, 主治月经不调、经血淋漓不止、胎盘滞留、腹痛、刃伤等^[2]. 多糖是一种普遍存在于植物细胞壁及细胞中的成分, 是由许多单糖通过 α -苷键、 β -苷键或 α , β -苷键等组成的高分子有机化合物. 各种多糖组成不同, 单糖间的连接方式也不同, 其独特的组成结构与性质是构成多糖重要药理活性的基础. 相关研究证明^[3-5] 植物多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、抗病毒及降血糖等多种功能. 目前植物、药物中多糖的质量分数均以样品所含葡萄糖的质量分数来表示, 质量分数测定方法多用分光光度法, 粗多糖的制备主要用水提醇沉法. 本文对蒙药耧斗菜多糖的提取方法及质量分数测定进行了研究, 通过对比回流水提醇沉法与超声水提醇沉法的提取结果, 设计正交试验, 对超声提取法进行了提取工艺的优化, 拟为提升蒙药耧斗菜的质量标准、进一步研究其药效物质基础提供理论依据.

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 药材

蒙药耧斗菜采集于呼和浩特市大青山小井沟, 经内蒙古医科大学药学院李骁博士鉴定为毛茛科植物耧斗菜(*Aquilegia viridiflora* PaLL.) 全草, 且留有凭证标本.

① 收稿日期: 2016-05-03

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2013MS1222).

作者简介: 云学英(1958-), 女, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中蒙药有效成分研究.

试剂: 葡萄糖对照品(上海市国药集团化学试剂有限公司), 无水乙醇, 碳酸氢钠, 丙酮, 乙醚, 氯仿, 正丁醇, 浓硫酸, 苯酚, 铝片, 均为分析纯试剂.

1.1.2 仪器

TU-1901 型紫外分光光度计(北京普析仪器有限公司); KH5200DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); TG328B 型电子分析天平(上海天平厂); 循环水式多用真空泵 JHZ-DIII; 旋转蒸发器; 等.

2 实验方法

2.1 蒙药耧斗菜粗多糖的提取

2.1.1 回流水提醇沉法^[6]

称取蒙药耧斗菜粉末, 置于圆底烧瓶中, 加入 95%乙醇浸泡 6 h, 回流 2 h 以除去单糖和低聚糖等干扰成分, 抽滤, 药渣晾干. 精密称定 10 g 药渣加入 150 mL 蒸馏水浸泡 6 h 后加热微沸回流提取 2 h, 趁热抽滤, 得棕色滤液, 将滤渣再次回流提取、抽滤, 合并 2 次滤液, 将滤液用旋转蒸发器浓缩至约 80 mL, 加入 Sevage 试剂除去蛋白, 在提取液中加入无水乙醇至乙醇体积分数约 85%, 放置过夜、抽滤, 滤渣依次用无水乙醇、丙酮和无水乙醚分别洗涤 3 次, 得棕色蒙药耧斗菜粗多糖粉末, 干燥后置真空干燥器中备用. 实验分别进行 5 次, 计算平均产率.

2.1.2 超声水提醇沉法

称取蒙药耧斗菜粉末, 加入适量 95%乙醇溶液, 超声提取 1 h, 离心, 弃去上清液, 同样的操作再进行一次. 药渣加 150 mL 蒸馏水超声提取 1 h, 离心, 再提取一次, 合并两次提取液, 浓缩滤液至 80 mL 左右, 加入 Sevage 试剂除去蛋白, 加入无水乙醇至提取液的乙醇体积分数约 85%, 放置过夜, 离心, 沉淀用无水乙醇, 丙酮和无水乙醚依次洗涤 3 次, 得棕色耧斗菜粗多糖粉末, 干燥后置于干燥器中备用. 实验分别进行 5 次, 计算平均产率.

2.2 对照品标准曲线的制作

2.2.1 5%苯酚试剂的制备

称取苯酚 100 g, 加入铝片 0.1 g 与碳酸氢钠 0.05 g, 蒸馏. 收集 179~181 °C 馏分, 称取 12.5 g, 置于 250 mL 棕色瓶中加水溶解、定容, 放于 4 °C 冰箱内备用.

2.2.2 对照品溶液的配制^[7]

精密称取干燥衡重的葡萄糖标准品 50 mg, 用水定容于 100 mL 容量瓶中. 精密量取该溶液 20 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 即得对照品溶液.

2.2.3 测定波长的选择

取对照品和供试品溶液, 经苯酚-硫酸试剂显色后, 分别在 400~600 nm 波长范围内进行扫描, 测定结果显示两者在 486 nm 波长处均有最大吸收峰, 故选择 486 nm 作为质量分数测定波长.

2.2.4 标准曲线的制备

精密量取 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL 对照品溶液, 分别置于 10 mL 量管中, 各加蒸馏水至 2.0 mL, 再分别加入 5%苯酚溶液 1.0 mL 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL 摇匀, 暗处放置 5 min, 待冷却至室温后, 置于 60 °C 水浴中加热 20 min, 取出, 冰水冷却至室温, 以蒸馏水作为空白对照, 在 486 nm 波长处测定吸收值, 以吸光度为纵坐标, 葡萄糖质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 确定回归方程.

2.3 蒙药耧斗菜多糖质量分数的测定^[8-9]

精密称取回流法制得的蒙药耧斗菜粗多糖 0.20 g, 加水定容于 10 mL 容量瓶中备用. 精密称取超声法制得的蒙药耧斗菜粗多糖 0.05 g, 加水定容于 10 mL 容量瓶中备用. 精密量取 2 种粗多糖溶液各 1 mL, 分别加水定容于 50 mL 容量瓶中, 精密量取该溶液各 2 mL, 分别置于 10 mL 量管中, 以蒸馏水作为空白对照, 按标准曲线项下方法测定吸光度, 通过回归方程计算葡萄糖的质量. 每个样平行做 3 次, 按下式计算它们的多糖质量分数:

$$\text{回流法多糖质量分数} = \frac{\text{样品中含葡萄糖质量}}{\text{样品中含粗多糖质量} \div 3.47\%}$$

$$\text{超声法多糖质量分数} = \frac{\text{样品中含葡萄糖质量}}{\text{样品中含粗多糖质量} \div 2.61\%}$$

由测得的吸光度带入回归方程计算葡萄糖的质量分数, 再由体积换算出葡萄糖的质量; 样品所含粗多糖的质量除以产率即为样品的质量。

2.4 方法学考查

精密性实验: 精密量取对照品溶液 5 份, 每份 2 mL, 按照标准曲线项下操作, 测定吸光度, 计算多糖的质量分数。

稳定性实验: 分别取对照品溶液及 2 种粗多糖溶液各 2 mL, 按照标准曲线项下方法操作, 每隔 20 min 测定一次吸光度, 观察实验在显色后的 140 min 内的稳定性。

2.5 超声提取正交实验

2.5.1 供试品溶液的制备及多糖质量分数的测定

精密称取蒙药耧斗菜粉末 1 g, 放置于带盖锥形瓶中, 加入 20 mL 95% 乙醇溶液超声提取 1 h, 抽滤, 弃去上清液, 同一方法再进行一次。药渣按正交实验设计定量超声提取 2 次, 合并 2 次提取液, 定容于 100 mL 容量瓶中。精密量取该溶液 10 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 加水定容作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 2 mL, 按标准曲线项下方法测定吸光度, 计算多糖质量分数。

2.5.2 超声提取正交试验设计^[10-11]

在超声提取条件下, 以多糖的质量分数作为考察指标, 以样品与溶剂的料液比(因素 A)、超声时间(因素 B)、超声温度(因素 C)、超声功率(因素 D)为考察因素, 在预实验的基础上设计如下四因素三水平的正交试验 $L_9(3^4)$, 优选蒙药耧斗菜多糖的超声提取条件, 每个水平平行进行 3 次, 取其平均值。试验设计见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交设计水平因素表

水 平	因 素			
	A 料液比	B 超声时间/min	C 超声温度/℃	D 超声功率/W
1	1 : 15	40	40	80
2	1 : 20	50	50	90
3	1 : 25	60	60	100

3 结果与分析

3.1 2 种方法制得的粗多糖产率

由表 2 可知, 回流法制得的粗多糖平均产率为 3.47%, RSD 为 1.52%。超声法制得的粗多糖平均产率为 2.61%, RSD 为 2.02%。结果显示, 回流法比超声法提取得到的蒙药耧斗菜粗多糖产率高。

表 2 2 种提取方法制得的蒙药耧斗菜粗多糖产率

方法	序号	药材质量/g	粗多糖质量/g	产率/%	平均产率/%	RSD/%
回流	1	10.0	0.348	3.48	3.47	1.52
	2	10.0	0.349	3.49		
	3	10.0	0.340	3.40		
	4	10.0	0.344	3.44		
	5	10.0	0.354	3.54		
超声	1	10.0	0.276	2.76	2.61	2.02
	2	10.0	0.267	2.67		
	3	10.0	0.262	2.62		
	4	10.0	0.271	2.71		
	5	10.0	0.263	2.63		

3.2 对照品标准曲线及回归方程

以吸光度为纵坐标、葡萄糖质量浓度为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为

$$A = 2.8156C + 0.0937 \quad R^2 = 0.9992$$

结果表明,葡萄糖对照品在 0.01~0.10 mg/mL 范围内线性关系良好.标准曲线见图 1 所示.

3.3 蒙药耧斗菜多糖的质量分数

2 种提取方法得到的蒙药耧斗菜多糖质量分数结果见表 3.

由表 3 可见,2 种方法制得的粗多糖,超声法比回流法多糖质量分数高,即超声法制得的粗多糖纯度较高.

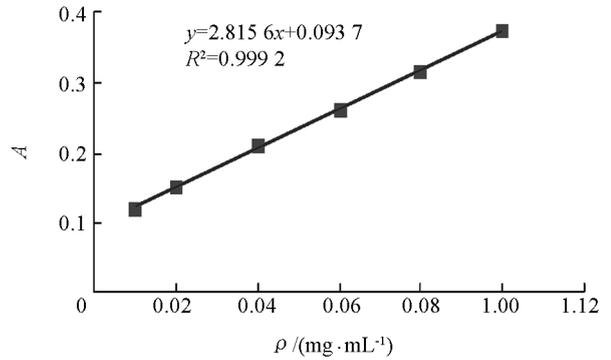


图 1 葡萄糖标准曲线图

表 3 2 种提取方法得到的蒙药耧斗菜多糖质量分数

方法	序号	吸光度	葡萄糖质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	多糖质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/ %
回流法	1	0.315	78.61	6.82	6.86	0.67
	2	0.316	78.95	6.85		
	3	0.318	79.66	6.91		
超声法	1	0.297	72.60	18.80	18.90	0.46
	2	0.298	72.94	18.95		
	3	0.298	72.94	18.95		

3.4 方法学考察结果

精密度的实验结果:5 份对照品溶液测得的吸收值 RSD 为 0.71%,表明仪器精密性良好.

稳定性的实验结果:在实验时间内分别测得的吸收值对照品 RSD 为 0.30%,回流法粗多糖 RSD 为 1.25%,超声法粗多糖 RSD 为 0.94%,表明对照品及 2 种方法制得的粗多糖溶液在显色后的 140 min 内均稳定.

3.5 正交实验结果

按“2.5.2”项下设计的水平因素正交表进行正交实验,结果见表 4,正交试验的方差分析结果见表 5.

表 4 超声提取正交试验结果

试验号	因素				质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
	料液比	超声时间	超声温度	超声功率	
1	1	1	1	1	11.86
2	1	2	2	2	14.20
3	1	3	3	3	12.56
4	2	1	2	3	17.94
5	2	2	3	1	16.88
6	2	3	1	2	15.19
7	3	1	3	2	14.48
8	3	2	1	3	12.78
9	3	3	2	1	18.16
K_1	38.62	44.28	39.83	46.90	
K_2	50.01	43.86	50.30	43.87	
K_3	45.42	45.91	43.92	43.28	
k_1	12.87	14.76	13.28	15.63	
k_2	16.67	14.62	16.77	14.62	
k_3	15.14	15.30	14.64	14.43	
R	3.80	0.68	3.49	1.20	

表 5 正交试验的方差分析结果

变异来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方和	F	p
(A)	21.90	2	10.95	28.08	<0.05
(B)	0.78	2	0.39	1.00	
(C)	18.57	2	9.29	23.81	<0.05
(D)	2.52	2	1.26	3.24	
误差	0.78	2			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$.

由表 4 正交实验结果及极差分析结果可知, 4 种因素对超声提取蒙药耧斗菜多糖影响从大到小依次为 R_A, R_C, R_D, R_B , 即料液比、超声温度、超声功率、超声时间; 优选水平为 $A_2B_3C_2D_1$, 即料液比 1:20, 超声时间 60 min, 超声温度 50 °C, 超声功率 80 W. 由表 5 方差分析结果检验在 95% 可信程度下断定 A, C 对实验结果有显著影响, B, D 没有, 这与极差分析结果一致.

3.6 验证试验

精密称取 3 份蒙药耧斗菜粉末, 每份 1 g, 按照超声水提醇沉的提取方法, 在超声优选条件即料液比 1:20、超声时间 60 min、超声功率 80 W、超声温度 50 °C 下进行提取, 3 次测得多糖的质量分数分别为 19.40 mg/g, 19.38 mg/g, 19.33 mg/g, 平均质量分数为 19.37 mg/g, RSD 为 0.19%. 而超声提取正交试验结果显示(表 4), 按第 9 组条件提取蒙药耧斗菜多糖的质量分数最高, 为 18.16 mg/g, 可见超声优化后的提取条件提取率更高.

4 结 论

本文对提取蒙药耧斗菜多糖的 2 种方法进行了研究对比, 回流水提醇沉法制得的粗多糖平均产率为 3.47%, 多糖质量分数是 6.86 mg/g; 超声水提醇沉法制得的粗多糖平均产率为 2.61%, 多糖质量分数是 18.90 mg/g. 可见回流法制得的粗多糖产率较高, 多糖质量分数较低; 超声法制得的粗多糖产率较低, 但多糖质量分数则是回流法的 2.7 倍之多. 比较发现, 超声法不但可以降低提取温度, 节省提取时间, 简化提取步骤, 而且得到的粗多糖杂质较少, 纯度较高, 具有推广应用价值.

鉴于超声法的诸多优点, 本文在比较了上述 2 种提取多糖方法的同时, 对超声水提醇沉法进行了工艺优化研究, 通过四因素三水平正交实验, 确定影响蒙药耧斗菜多糖超声提取的主要因素依次为料液比、超声温度、超声功率、超声时间, 优选条件是 $A_2B_3C_2D_1$, 即料液比 1:20, 超声时间 60 min, 超声温度 50 °C, 超声功率 80 W. 以优化后的提取条件提取多糖, 其平均质量分数可达 19.37 mg/g. 该提取条件也可推广应用于其他植物多糖的提取.

参考文献:

- [1] 朱亚民. 内蒙古植物药志(第一卷) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2000: 380—383.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编辑委员会. 中华本草(蒙药卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 401—402.
- [3] 孙明晓, 赵 婷, 高 昂, 等. 耧斗菜属药学研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(4): 83—84.
- [4] 沈 飞, 冯 旌, 窦文轩, 等. 天然多糖类药物检验及临床应用现状 [J]. 中国当代医药, 2011, 18(31): 14—15.
- [5] 申利红, 王建森, 李雅, 等. 植物多糖的研究及应用进展 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 349—352.
- [6] 云学英, 罗素琴, 吴宁远, 等. 珍珠梅花及茎中多糖含量测定及成分分析 [J]. 内蒙古医学院学报, 2006; 28(5): 422—424.
- [7] 竺佳佳, 郑军献, 程 林. 正交实验法优选树舌多糖提取工艺 [J]. 中国中医药科技, 2014, 21(5): 527—528.
- [8] 陈鸿英, 朱永智, 吴乃居等. 朝鲜淫羊藿多糖的含量测定 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 810—811.
- [9] 张 文, 周延生. 黄芩中多糖的提取及含量分析 [J]. 微量元素与健康研究, 2004; 21(2): 21—22.

- [10] 颜祖弟, 李芸达, 张照平, 等. 纤维素酶法提取葶苈子多糖的工艺研究 [J]. 化学世界, 2014, 55(2): 80—82, 128.
- [11] 吴 敬, 王英丽, 包海泉, 等. 海红果多糖的超声提取工艺研究 [J]. 内蒙古农业大学学报, 2013, 34(3): 141—145.

Extraction Optimization and Mass Fraction Determination of Polysaccharide in Mongolian Medicine *Aquilegia viridiflora* Pall.

YUN Xue-ying, WANG Jian-hua, LI Cheng-lin,
KUANG Yuan-yuan, LI Zhen, HAN Shi-qiang

College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: Objective: The paper is to optimize the extraction conditions of polysaccharide in *Aquilegia viridiflora* Pall., and to determinate its mass fraction. Methods: The polysaccharide was extracted from *Aquilegia viridiflora* Pall. by reflux extraction and ultrasonic extraction. The mass Fraction was determined by phenol-sulfuric acid method, and ultrasonic extraction was optimized by the orthogonal test. Results: The brown powder of crude polysaccharide can be obtained from *Aquilegia viridiflora* Pall. in both methods. By using reflux method, 3.47% crude polysaccharide with 6.86mg/g mass fraction of polysaccharides can be detected, while 2.61% crude polysaccharide with 18.90 mg/g mass fraction of polysaccharides can be detected in ultrasonic extraction. In addition, the best conditions of ultrasonic extraction are as follows: solid-liquid ratio 1 : 20, extraction time 60 min, extraction temperature 50 °C, and ultrasonic power 80 W. Conclusion: The ultrasonic extraction is much better to detect mass fraction determination of the plant polysaccharide. Contrary to the reflux method, the ultrasonic extraction can obtain less crude polysaccharide and more mass fraction of polysaccharides with less time.

Key words: *Aquilegia viridiflora* Pall.; polysaccharide; extraction; orthogonal test; mass fraction

责任编辑 胡 杨