

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.08

正交设计法优选七味地藿颗粒多糖的提取工艺研究

杨耀森, 褚秀玲*

(聊城大学农学院, 山东聊城, 252059)

[收稿日期] 2018-01-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0044-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 试验采用水浴提取法提取七味地藿颗粒中的多糖, 通过苯酚-硫酸显色体系运用紫外分光光度法对该方剂中多糖的含量进行测定, 分析提取时间、提取次数、提取温度和料液比等因素的影响, 并在此基础上进行正交试验, 优化提取工艺参数。结果表明: 当料液比为 1:25, 提取时间为 2 h, 提取温度为 90 ℃, 提取次数为 3 次时, 七味地藿颗粒多糖提取效果最好, 提取率为 28.01%。该优化工艺条件稳定、可靠, 可作为工业化生产七味地藿颗粒的试验依据。

[关键词] 七味地藿颗粒; 多糖; 水浴提取; 正交设计

Optimization the Extraction Process of Qi Wei Di Huo Granule by Orthogonal Design

YANG Yao-sen, CHU Xiu-ling*

(Agricultural College of Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China)

Corresponding author: CHU Xiu-ling, E-mail: chuxiul@163.com

Abstract: The study on Extraction of Polysaccharide from Qi Wei Di Huo Granule in the water bath to herb extraction method by phenol sulfuric acid chromogenic system using UV spectrophotometry on the prescription of polysaccharide content determination, analysis of extraction time, extraction times, extraction temperature and ratio of material to liquid, and on this basis by orthogonal experiment, optimization of extraction parameters. The results show that when the solid-liquid ratio was 1:25, extraction time 2 h, extraction temperature of 90 ℃, 2 times of extraction, Qi Wei Di Huo Granule to epimedium polysaccharide extract had the best effect, the extraction rate was 28.01%. The optimum technological conditions of stable and reliable theoretical basis, can produce seven flavor herb granules as industrialization.

Key words: Qi Wei Di Huo Granule; polysaccharide; extraction; orthogonal design

研究表明, 中药有效成分多糖类作为新的具有生理活性的天然产物, 正受到越来越多科研工作者

的高度关注^[1]。到目前为止, 已有 300 多种多糖类化合物从天然药物中分离出来, 其中从植物, 尤其

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2013CL010)

作者简介: 杨耀森, 硕士研究生, 从事动物疫病发生机理与防控方向研究。

通讯作者: 褚秀玲。E-mail: chuxiul@163.com

是从中草药中提取的水溶性多糖所占比例最大^[2]。因此,试验研究针对七味地藿颗粒中的多糖提取工艺进行深入优化研究,其目的在于寻找最佳的提取工艺条件,最大限度地提取组方中的有效成分,充分地发挥其药效^[3-4]。

试验运用的七味地藿颗粒是由熟地黄、淫羊藿、菟丝子等 7 味中药据“君、臣、佐、使”配伍原则配伍而成,七味地藿颗粒具有补肝肾、强筋骨、助阳益精、祛风湿等功效,试验证实^[5],是一个疗效确切的中药组方。该组方中主要的有效成份为多糖、黄酮等。因此,试验以方剂多糖为提取对象,采用水浴提取法^[6],在单因素试验的基础上采用正交试验设计法,研究七味地藿颗粒多糖的最佳提取工艺,为临床生产提供理论基础^[7-9]。

1 材 料

1.1 试剂 熟地黄、淫羊藿、菟丝子、黄芪、知母、肉桂、阳起石均购自聊城利民大药店。葡萄糖、浓硫酸和苯酚均购自莱阳经济开发区精细化工厂。

1.2 仪器设备 数显恒温水浴锅(金坛市双捷试验仪器厂);722 可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);中药万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

2 方法与设计

2.1 多糖含量分析方法的建立 采用苯酚-硫酸显色体系分光光度法测定,并绘制标准曲线。精确称取 2 g 分析纯葡萄糖标准品,置于 100 mL 容量瓶中,加重蒸水溶解,定容至刻度线,摇匀得 20 mg/mL 葡萄糖溶液,备用。

苯酚溶液制备:精确称取 5 g 苯酚,置于 100 mL 容量瓶中,加重蒸水使其溶解,定容至刻度线,得到 50 mg/mL 的苯酚溶液,避光保存,备用。

准确移取 400、500、600、700、800、900、1000 μ L 的葡萄糖标准品溶液,分别置于 100 mL 容量瓶中,并加入重蒸水定容至刻度线,制成 80、100、120、140、160、180、200 μ g/mL 的葡萄糖溶液。再分别取 1 mL 该溶液置于干燥试管中,依次加 1 mL 苯酚溶液,并迅速加入 5 mL 浓硫酸,混匀,冷水浴 20 min,于紫外分光光度计波长为 490 nm 处测定

吸光值,重蒸水作空白对照。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

2.2 试验设计 根据单因素试验设计方法,研究各因素对七味地藿颗粒中有效成分多糖提取率的影响。然后在此基础上进行正交试验,优化提取工艺。

2.2.1 料液比对方剂多糖提取率的影响 精确称量方剂中这 7 味中药,共 5 份,每份 6 g,分别放置锥形瓶中,编号方便记录数据。然后按照料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 的比例分别将蒸馏水加入至每个锥形瓶中,80 $^{\circ}$ C 水浴提取 2 h。将剪裁好的 500 目过滤纱布放入布氏漏斗内并将提取物倒入布氏漏斗通过抽气泵进行负压抽滤,从而分离到纯净的滤液和药渣。保存滤液并将药渣进行第二次提取,2 h 后过滤。合并滤液,并将滤液用蒸馏水定容至 500 mL 容量瓶,充分定容混匀后分别量取 1 mL,待测,考察料液比对方剂多糖提取率的影响。

2.2.2 提取时间对方剂多糖提取率的影响 精确称量准备试验方剂 5 份,每份 6 g,分别放置于 5 个锥形瓶中并加入 150 mL 蒸馏水,提取时间分别为 1、1.5、2、2.5、3 h,80 $^{\circ}$ C 水浴提取,提取一次后过滤按照不同提取时间提取第二次,其余同 2.2.1。考察提取时间对方剂多糖提取率的影响。

2.2.3 提取温度对方剂多糖提取率的影响 精确称量准备试验方剂 5 份,每份 6 g,分别放置于 5 个锥形瓶中并加入 150 mL 蒸馏水,提取温度分别为 60、70、80、90、100 $^{\circ}$ C,按照不同提取温度分别水浴提取 2 h,提取一次后过滤相同条件下进行二次提取,其余同 2.2.1。考察提取温度对方剂多糖提取率的影响。

2.2.4 提取次数对方剂多糖提取率的影响 精确称量准备试验方剂 3 份,每份 6 g,分别放置于 3 个锥形瓶中并加入 150 mL 蒸馏水,提取次数按照 1、2、3 次,80 $^{\circ}$ C 水浴提取 2 h,其余同 2.2.1。考察不同提取次数对方剂多糖提取率的影响。

2.2.5 正交试验设计 根据文献报道并结合实际,在上述单因素试验的基础上,制定因素水平表,七

味地藿颗粒多糖提取工艺的影响因素有提取温度、提取时间、料液比和提取次数,为此选择此 4 因素作为考察因素,并结合生产实际需要,每因素又选取 3 个水平,按照表 1 正交试验设计表安排实验,以多糖得率作为衡量多糖提取效率的双重客观指

标,优选最佳工艺,为了提高统计分析的可靠性,每一条件下均进行重复试验($n=3$),测定结果取其平均值供统计分析用。正交试验因素与水平安排见表 1。

表 1 正交试验设计表
Tab 1 Orthogonal test design table

水平	因素			
	料液比	提取时间/h	提取次数/次	提取温度/℃
1	1 : 20	1.5	1	80
2	1 : 25	2	2	90
3	1 : 30	2.5	3	100

3 结果与分析

3.1 分析标准曲线的建立 葡萄糖的标准曲线见图 1。以葡萄糖的质量浓度 x 为横坐标,吸光度 y (OD 值)为纵坐标制作标准曲线,葡萄糖的线性回归方程为 $y=0.0064x+0.4037$, $R^2=0.9992$,葡萄糖标准溶液浓度为 80~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围时,线性关系良好。

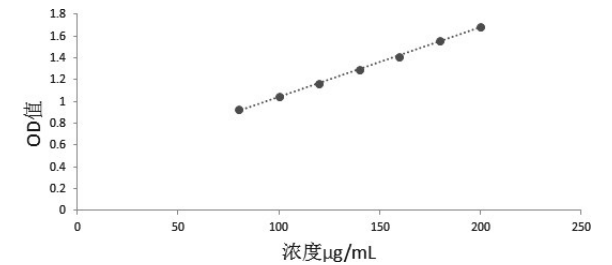


图 1 葡萄糖标准曲线
Fig 1 Glucose standard curve

3.2 单因素对七味地藿颗粒多糖提取率的影响
3.2.1 料液比对方剂多糖提取率的影响 由图 2 可知,方剂中多糖提取率随料液比的增大而增大,即加水量越多,多糖的得率越大,多糖的提取率先呈快速上升,后上升平缓,料液比 1 : 25 时方剂多糖提取率达到最大,往后随着料液比的增加而缓慢减少。因此最佳料液比选择 1 : 25。

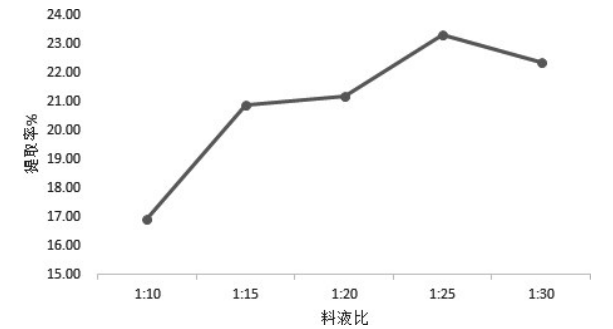


图 2 料液比对方剂多糖提取率的影响
Fig 2 The effect of material liquid on the extraction rate of polysaccharide from the other agent

3.2.2 提取时间对方剂多糖提取率的影响 由图 3 可知,方剂中多糖提取率随提取时间的延长而增大,即提取时间越长,多糖的得率越大,多糖的提取率先呈快速上升,提取时间为 2 h 时方剂多糖提取率达到最大,往后随着提取时间的延长而缓慢减少。因此,最佳提取时间选择 2 h。
3.2.3 提取温度对方剂多糖提取率的影响 由图 4 可知,方剂中多糖提取率随提取温度的提高而增大,即提取温度越高,多糖的得率越大,多糖的提取率先呈快速上升,提取温度为 90 $^{\circ}\text{C}$ 时方剂多糖提取率达到最大,往后随着提取温度的提高而缓慢减少。因此,最佳提取时间为 90 $^{\circ}\text{C}$ 。

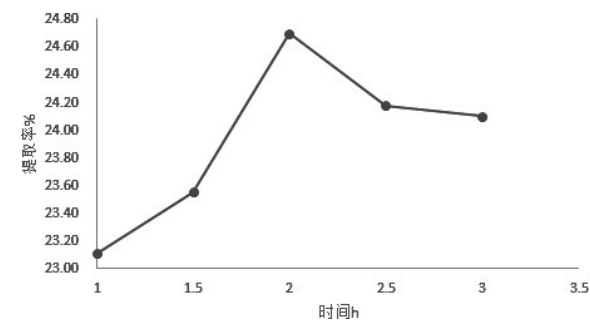


图 3 提取时间对方剂多糖提取率的影响

Fig 3 The effect of extraction time on extraction rate of polysaccharide

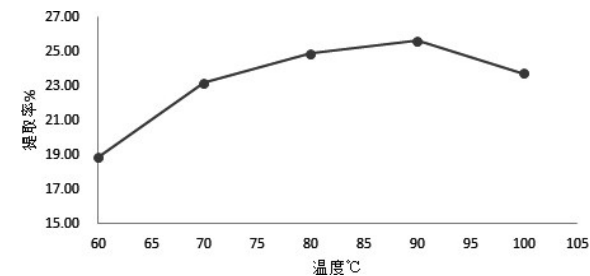


图 4 提取温度对方剂多糖提取率的影响

Fig 4 The effect of extraction temperature on extraction rate of polysaccharide

3.2.4 提取次数对方剂多糖提取率的影响 由图 5 可知,方剂中多糖提取率随提取次数的增多而增大,即提取次数越多,多糖的得率越大。提取 1~2 次时,有效成分浓度差大,提取率上升快;提取次数为 3 次时,与第 2 次提取相比浓度差小,提取率几乎并没提高趋于稳定。因此,最佳提取次数为 3 次。

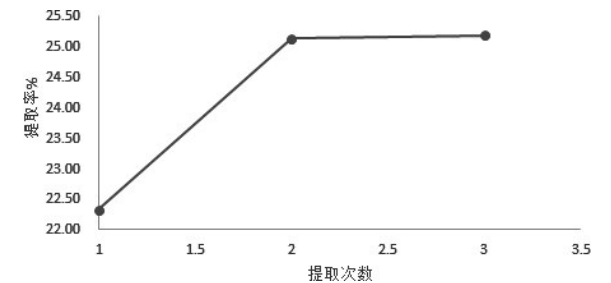


图 5 提取次数对方剂多糖提取率的影响

Fig 5 The effect of extraction times on extraction rate of polysaccharide

3.3 七味地菔颗粒多糖提取工艺优化正交试验结果 七味地菔颗粒多糖提取工艺优化 4 因素 3 水平正交试验结果与分析见表 2。

表 2 正交试验结果与分析

Tab 2 Results and analysis of orthogonal test					
试验号	A	B	C	D	
因素	料液比	提取时间/h	提取温度/℃	提取次数/次	多糖得率/%
1	1	1	1	1	14.90
2	1	2	2	2	25.45
3	1	3	3	3	26.34
4	2	1	2	3	27.25
5	2	2	3	1	16.67
6	2	3	1	2	23.24
7	3	1	3	2	22.30
8	3	2	1	3	24.80
9	3	3	2	1	15.55
均值 1	22.230	21.483	20.980	15.707	
均值 2	22.387	22.307	22.750	23.663	
均值 3	20.883	21.710	21.770	26.130	
极差	1.504	0.824	1.770	10.423	

由表 2 可知,在 4 个主要因素中,由极差可以看出 $D>C>A>B$,即提取次数的影响最大,提取温度次之,料液比第三,而提取时间的影响最小。

七味地藿颗粒多糖提取工艺优化 4 因素 3 水平正交试验结果方差与显著性分析见表 3。

表 3 方差与显著性分析
Tab 3 Analysis of variance and significance

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	186.854 ^a	6	31.14	57.391	.017
截距	4290.250	1	4290.250	7906.352	.000
A	4.098	2	2.049	3.766	.209
C	4.717	2	2.359	4.374	.187
D	178.039	2	89.019	164.051	.006
误差	1.085	2	.543		
总计	4478.190	9			
校正的总计	187.940	8			

a. $R^2=0.994$ (调整 $R^2=0.997$);A 料液比 B(误差)提取时间 C 提取温度 D 提取次数

由表 2 可知,提取时间对于多糖提取率的影响最小,故将 B 提取时间做为误差项,并对其他因素进行显著性分析,可得出 P 值 $D<0.05<C<A$,可知提取次数相对于其他因素对七味地藿颗粒中多糖的提取率具有显著影响。根据结果分析,该方剂中多糖的最佳提取工艺为 $A_2B_2C_2D_3$,即料液比为 1:25,提取时间为 2 h,提取温度为 90 ℃,提取次数为 3 次。

4 讨论与结论

多糖是存在于生物体内的一类生物大分子物质,具有重要的生物活性^[10-11]。多糖的传统提取方法为水浴煎煮、水提醇沉等方法。因此,试验采取水浴提取多糖,溶剂来源为蒸馏水,经济实惠且提取率高^[12-13]。

研究表明,方剂多糖提取工艺的最优条件为:1:25为最佳料液比,2 h 为最佳提取时间,90 ℃为最佳提取温度,最佳提取次数为 3 次。另外,经正交试验结果方差与显著性分析发现,在影响方剂多糖提取率的主要因素中,以提取次数的影响最大,且相对于其他因素显著($P<0.05$),提取温度次之,料液比第三,而提取时间的影响最小,并通过正交试验得出最佳提取工艺为料液比为 1:25,提取时

间为 2 h,提取温度为 90 ℃,提取次数为3 次。

对于七味地藿颗粒中有效成分多糖的提取工艺进行优选,是从单味药有效成分的提取到组方有效成分的提取的进步,从而为临床应用中药方剂提供试验依据^[14-15]。

参考文献:

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2010 版)[S]. National Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Pharmacopoeia (2010 Edition) [S].

[2] 邹胜,徐溢,张庆.天然植物多糖分离纯化技术研究现状和进展[J].天然产物研究与开发.2015,31(8):1501-1509. Zou S, Xu Y, Zhang Q. Research status and progress on separation and purification of natural plant polysaccharides[J]. Natural Product Research and Development.2015,31(8):1501-1509.

[3] 丁婵,褚秀玲,苏建青,等.正交设计法优选黄芩苷的提取工艺研究[J].中国畜牧杂志,2016,52(18):72-75. Ding C, Chu X L, Su J Q, et al. Study on optimum extraction process of baicalin from baicalin by orthogonal design[J]. Chinese Journal of Animal Science,2016,52(18):72-75.

[4] 顾欢欢,褚秀玲,苏建青.响应面法优化纤维素酶辅助提取淫羊藿多糖工艺[J].中国兽药杂志,2017,51(8):52-58. Gu H H, Chu X L, Su J Q. Optimization of cellulase assisted extraction of Epimedium Polysaccharide by response surface method [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2017,51(8):52-58.

- [5] 褚秀玲, 苏建青, 韦旭斌. 中药抗病毒最新研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2009(11): 26-28.
- Chu X L, Su J Q, Wei X B. The latest research progress on Antivirus of traditional Chinese Medicine[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2009(11): 26-28.
- [6] 徐静静, 李 琴, 肖 浩, 等. 正交试验优选延龄草多糖提取工艺研究[J]. 中药材, 2013, 36(2): 305-307.
- Xu J J, Li Q, Xiao H, *et al.* Study on the extraction technology of Polysaccharide by orthogonal design cuckoopint [J]. Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(2): 305-307.
- [7] 王德云, 胡元亮. 复方中药成分对新城疫疫苗免疫雏鸡外周血 T 淋巴细胞转化和血清抗体效价的影响[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(3): 194-196.
- Wang D Y, Hu Y L. Effect of compound traditional Chinese medicine on T lymphocyte transformation and serum antibody titer in peripheral blood of vaccinated chickens vaccinated with Newcastle disease vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2006, 26(3): 194-196.
- [8] 王传铭, 尚喜雨. 正交试验优选铁皮石斛多糖提取工艺的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(4): 708-709.
- Wang C M, Shang X Y. Study on optimum extraction process of Polysaccharide from *Dendrobium officinale* by orthogonal test[J]. Liaoning Journal of traditional Chinese Medicine, 2010, 37(4): 708-709.
- [9] 郑必胜, 王能青, 赵 欣. 黄芩苷的水提法工艺研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(1): 48-51.
- Zheng B S, Wang N Q, Zhao X. Study on the water extraction process of Baicalin [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(1): 48-51.
- [10] 张红医, 赵淑军, 成 谦, 等. 中药黄芩提取方法的优化[J]. 河北大学学报, 2006, 26(4): 390-395.
- Zhang H Y, Zhao S J, Cheng Q, *et al.* Optimization of the extraction method of *Scutellaria baicalensis* [J]. Journal of Hebei University, 2006, 26(4): 390-395.
- [11] 李 晋, 徐怀德. 洋葱多糖的分离纯化及单糖组成研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(2): 202-206.
- Li J, Xu H D. Isolation and purification of Polysaccharide from onion and Study on monosaccharide composition [J]. Chinese Journal of food, 2012, 12(2): 202-206.
- [12] 周 凡, 马 芹. 正交试验优选新疆红花总黄酮提取工艺[J]. 中国中医药科技, 2014, 21(2): 167-169.
- Zhou F, Ma Q. Optimization of the extraction technology of total flavonoids from Xinjiang safflower by orthogonal test [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2014, 21(2): 167-169.
- [13] 陈 程. 正交试验法优选黄连中盐酸小檗碱醇提工艺的研究[J]. 应用化工, 2014, 43(3): 485-487.
- Chen C. Study on the extraction process of hydrochloric acid alkali alcohol is preferably small wood of *Coptis chinensis* by orthogonal experiment [J]. Application of chemical industry, 2014, 43(3): 485-487.
- [14] 蒋春茂, 陈晓兰. 不同中药多糖体外对鸡外周血和脾脏淋巴细胞增值能力的比较[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 106-111.
- Jiang M C, Chen X L. Comparison of the ability of different Chinese medicine polysaccharides to peripheral blood and spleen lymphocyte *in vitro* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 31(1): 106-111.
- [15] 朱晓庆, 李效振. 11 味中药多糖提取物对不同 MHCB-L β II 基因型鸡新城疫抗体水平和 IFN- γ , IL-4 含量的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 10(44): 1685-1692.
- Zhu X Q, Li Z X. Effect of 11 kinds of herbal polysaccharide extracts on different MHCB-L beta II genotype Newcastle disease antibody level and IFN- γ , IL-4 content [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2013, 10(44): 1685-1692.

(编辑:陈 希)