

## 白芨多糖提取方法的优选及其理化性质研究

韩丹<sup>1</sup>, 王艳萍<sup>2</sup>, 毕亚静<sup>1</sup>, 刘福强<sup>2</sup> (1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000; 2. 解放军 208 医院, 吉林 长春 130062)

**[摘要]** 目的 从白芨中等粉中用不同方法提取白芨多糖, 优选最佳的提取工艺, 对其理化性质进行研究。方法 采用水提法、碱水提法、纤维素酶解法、超声波法进行提取; 采用分光光度法测定多糖含量。得出多糖得率最高的一种方法为基础, 以多糖含量为指标进行工艺优化; 按照《中国药典》2010年版一部规定的方法研究其理化性质。结果 超声提取法最好, 最佳提取工艺为: 料液比 1:20 温度 80℃, 时间 10 min, 提取率为 49.90%; 求出 5 个理化性质数据。结论 超声波提取法提取白芨多糖的得率高于其他方法, 适宜大规模生产; 为白芨多糖现代化应用提供了依据。

**[关键词]** 白芨多糖; 提取; 苯酚-硫酸法; 工艺优化; 理化性质

**[中图分类号]** R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)01-0035-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.01.010

## Extracting method optimization and physical and chemical properties of polysaccharide in *Bletilla striata*

HAN Dan<sup>1</sup>, WANG Yang-ping<sup>2</sup>, BI Ya-jing<sup>1</sup>, LIU Fu-qiang<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Yan Bian University, Yanji 133000, China; 2. The 208th Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

**[Abstract]** **Objective** To establishing the best extraction technology of polysaccharide in *Bletilla striata* and researching its physical and chemical properties. **Methods** Water extraction and buck formulation, cellulose enzyme hydrolysis and ultrasonic extraction were used, and the spectrophotometry was used to determine the content of polysaccharide, the receiving rate of polysaccharide in the highest method as the foundation, the contents of polysaccharide as the target to process optimization. The physical and chemical characteristics of polysaccharide were studied according to the Ch. P(2010). **Results** The ultrasonic extraction method was the best extraction technology with the condition that: the ratio of material and liquid was 1:20, temperature was 80℃, in 10 min. The extraction rate was 49.90%. Five physical and chemical properties were calculated. **Conclusion** The extraction rate of ultrasonic method for polysaccharide in *Bletilla striata* was high than other methods, and suitable for mass production which could provide the references for modern application of polysaccharide in *Bletilla striata*.

**[Key words]** polysaccharide in *Bletilla striata*; extraction; phenol-sulfuric acid; process optimization; physical and chemical properties

白芨 *Bletilla striata* 是兰科白芨属, 多年生草本植物, 有收敛止血、清热利湿、消肿生肌之功效<sup>[1]</sup>。其块茎提取物主要成分为白芨多糖, 化学组成为葡甘聚糖<sup>[2]</sup>。本研究用 5 种不同方法进行提取, 最终选择一种提取多糖含量最高的方法, 通过正交设计进行工艺优化, 确定最佳提取工艺, 测定其理化性质, 为白芨多糖的应用奠定基础。

### 1 仪器、材料与试剂

**1.1 仪器** ZK-82B 型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂); RE-5205 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); KH5200DE 型数控超声波清洗器(昆山

禾创超声仪器有限公司); UV-3 系列紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); PHS-3C 精密酸度计(上海虹美仪器仪表有限公司); WZZ-2A 数显自动旋光仪(上海索光光电技术有限公司); NDJ-1 旋转式粘度计(上海精密科学仪器有限公司)。

**1.2 材料** 白芨购于吉林省北药药材加工有限公司, 经嘉兴医学院王峻副教授鉴定为兰科植物白芨 *Bletilla striata* 的干燥块茎, 符合《中国药典》2010年版(一部)该药材项下的有关规定。

**1.3 试剂** 重蒸水, 实验室自制; 葡萄糖、甘露糖对照品, 均购于中国药品生物制品检定所(批号分别为: 110833-200503; 140651-200301); 纤维素酶; 三氯甲烷、正丁醇、乙醇、硫酸、苯酚、氢氧化钠、碳酸钡、羧甲基纤维素钠、乙酸乙酯、乙酸、甲醇、苯胺、二

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81173559)。

**[作者简介]** 韩丹(1985-)女, 硕士研究生, Tel: (0431) 86988187, E-mail: th\_handan@163.com。

苯胺 均为 AR 级。

## 2 方法

### 2.1 提取方法

**2.1.1 回流法** 称取白苕中等粉 20 g,加 20 倍量体积水,用沸水浴回流提取 4 h,重复提取 3 次,合并提取液,滤过,滤液于旋转蒸发仪中减压浓缩至稠膏状,加 3 倍量体积 95% 乙醇沉淀,抽滤,55 ℃ 真空干燥,即得多糖粗品。

**2.1.2 浸提法<sup>[3]</sup>** 称取白苕中等粉 20 g,加 20 倍量体积水,在 80 ℃ 下浸提 4 h,重复提取 3 次,以下步骤同 2.1.1 项(自合并提取液)。

**2.1.3 超声波法<sup>[3]</sup>** 称取白苕中等粉 20 g,加 20 倍量体积水,在 80 ℃ 下超声提取 30 min,重复提取 3 次,以下步骤同 2.1.1 项(自合并提取液)。

**2.1.4 碱水提法<sup>[4]</sup>** 用氢氧化钠试液将水调至 pH10,称取白苕中等粉 20 g,加 20 倍量体积碱水,在 80 ℃ 下浸提 4 h,重复提取 3 次,以下步骤同 2.1.1 项(自合并提取液)。

**2.1.5 纤维素酶解法<sup>[5]</sup>** 精密称取纤维素酶 300 mg,溶于少量水中,40 ℃ 活化 40 min,取白苕粉末 20 g,加 1 倍水浸泡 30 min,将浸泡好的白苕及活化好的酶同时倒入 150 ml 磷酸盐缓冲液(pH5)中,50 ℃ 酶解 1.5 h。加 20 倍量体积水,在 80 ℃ 下浸提 4 h,重复提取 3 次,以下步骤同 2.1.1 项(自合并提取液)。

### 2.2 多糖的鉴别

**2.2.1 显色反应<sup>[6]</sup>** 精密称取 5 种提取方法下的提取物 10 mg,加水定容至 10 ml 容量瓶中,摇匀。分别取 4 ml,加稀盐酸 0.5 ml,水浴加热 30 min,取出,放冷,加氢氧化钠适量调至中性,再加斐林试剂 3 ml,水浴加热,结果斐林反应呈阳性。

**2.2.2 单糖的鉴别<sup>[7]</sup>** 精密称取多糖样品 10 mg,加 2 mol/L 硫酸 10 ml,100 ℃ 水解 8 h,加适量碳酸钡中和,抽滤,滤液蒸干,残渣加乙醇 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另分别取葡萄糖、甘露糖,加乙醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照《中国药典》2010 年版一部附录 VIB 试验,吸取对照品溶液各 2 μl、供试品溶液 2~4 μl,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-乙酸-甲醇-水(2:12:4:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以苯胺-二苯胺溶液,在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰。日光下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。置紫外光灯(365 nm)下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的

斑点。

### 2.3 含量测定<sup>[8]</sup>(苯酚-硫酸法)

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取经真空干燥 12 h 的葡萄糖对照品 1.5 mg,加水定容至 25 ml 容量瓶中,摇匀,即得每 1 ml 含 60 μg 的对照品溶液。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密称取 5 种提取方法下的多糖粗品 0.6 mg,加水定容至 10 ml 容量瓶中,摇匀,即得。

**2.3.3 测定波长的选择** 精密量取供试品溶液和葡萄糖对照品溶液各 1.0 ml,置试管中,分别加入水 1.0 ml,6% 苯酚溶液 1.0 ml,硫酸 5.0 ml,混匀,室温下放置 10 min,摇匀,静置 20 min。以水为空白,在 400~800 nm 波长范围内扫描。结果对照品和供试品在 490 nm 波长处均有最大吸收,确定 490 nm 作为测定波长。

**2.3.4 标准曲线的绘制** 精密吸取对照品溶液 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 ml,分别加水至 2.0 ml,再加入 6% 苯酚 1.0 ml 及硫酸 5.0 ml,静置 10 min,摇匀,室温放置 20 min,以水为空白,于 490 nm 波长处测定吸光度(A)。以葡萄糖质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 0.0522X - 0.0062$  ( $r = 0.9999$ ),葡萄糖在 24~120 μg 呈良好的线性关系。

**2.3.5 样品的测定** 精密吸取上述样品溶液 1.0 ml,按 2.3.4 项下步骤操作,测定吸光度,代入标准曲线计算含量,结果见表 1。结果表明超声提取法提取率最好。

表 1 白苕多糖不同提取方法的提取效果比较

提取方法	吸光度 (A)	粗多糖质量 (g/20 g)	多糖含量 (%)
回流法	0.180	3.17	47.6
浸提法	0.250	3.45	65.4
碱水提法	0.269	3.47	70.2
超声波法	0.292	4.06	76.1
纤维素酶解法	0.162	2.96	42.9

## 3 最佳提取方法的工艺优选

**3.1 正交试验优选** 在预试验的基础上,认为超声波提取法最好,拟定影响多糖得率的 3 个因素即料液比(药材质量 g/所用溶剂的体积 ml)、提取时间(min)和温度(℃)为优选因素,每个因素设定 3 个水平进行正交试验。选  $L_9(3^3)$  正交表进行设计,并以多糖含量作为考察指标,确定最佳提取工

艺,结果见表2、表3。

表2 影响白芨多糖提取的因素水平表

水平	料液比	温度(℃)	时间(min)
	A因素	B因素	C因素
1	1:15	60	10
2	1:20	70	30
3	1:25	80	50

表3 正交试验安排及结果

编号	A	B	C	多糖粗品(g)	多糖含量(%)
1	1	1	1	1.17	38.50
2	1	2	2	1.28	36.45
3	1	3	3	1.21	40.73
4	2	1	2	0.72	30.45
5	2	2	3	1.81	38.85
6	3	3	1	1.13	63.20
7	3	1	3	1.22	39.38
8	3	2	1	1.65	40.22
9	3	3	2	1.32	48.45
K <sub>1</sub>	115.68	108.33	141.92	Σy = 376.23	
K <sub>2</sub>	132.50	115.52	115.35		
K <sub>3</sub>	128.05	152.38	118.96	ȳ = 41.80	
R	5.52	14.68	8.86		

直观分析表明,在所选因素水平范围内,影响因素 B > C > A,即温度 > 时间 > 料液比,最佳的提取条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>,即料液比为 1:20,温度为 80℃,时间为 10 min。

3.2 最佳提取条件的验证试验 按照上述优选工艺 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 进行 3 次重复试验,白芨多糖的含量分别为 61.18%、61.88%、62.35%,说明该工艺稳定可行。

#### 4 理化性质测定<sup>[10]</sup>

按照药典规定的方法,对白芨多糖的特性黏度、比旋度、pH 值、熔点进行了测定,结果见表 4。

表4 白芨多糖理化参数测定结果

次数	特性黏度(η)	比旋度([α] <sub>D</sub> <sup>25</sup> )	pH 值	熔点(℃)
1	376.8	-40	6.67	254.8 (萎缩)
2	375.9	-38.7	6.53	258 (碳化)
3	377.4	-38.5	6.71	
平均值	376.7	-39.1	6.64	

同时对其溶解性进行考察,结果显示白芨多糖易溶于热水,微溶于冷水,不溶于乙醇。

#### 5 讨论

白芨多糖在医学研究和临床等诸多方面的广泛应用,显示出良好的发展前景。但在大多数基础和临床研究中,所用的白芨仅是经过粗略水提或直接采用白芨药材原粉,制备工艺简单,质量差异较大,对各项研究结果的重现性有较大影响。本实验以多糖含量为指标,采用回流法、水提法、碱水提法、纤维素酶解法、超声波 5 种方法进行提取,选择一种获得多糖含量最高的方法,并通过正交设计对该种方法进行工艺优选,结果最佳工艺条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>,即料液比为 1:20,提取温度 80℃,提取时间 10 min。通过验证试验表明,正交实验优选确定的最佳工艺水平是可行的,有利于实际生产,节约时间,具有良好的应用前景。

#### 【参考文献】

- [1] 孙达锋,史劲松,张卫明,等.白芨多糖胶研究进展[J].食品科学,2009,30(3):296.
- [2] 刘光斌,黄忠,黄长干,等.白芨多糖提取工艺的研究[J].中国现代应用化学杂志,2007,24(4):289.
- [3] 舒任庚,蒋跃平,蔡永恒.植物多糖的提取分离方法探讨[J].中国药房,2011,22(11):1052.
- [4] 张楷正,杨跃寰,李光辉,等.香菇多糖提取方法研究进展[J].四川理工学院学报,2009,22(6):63.
- [5] 闫巧娟,韩鲁佳,江正强.纤维素酶解法提取黄芪多糖[J].中草药,2005,36(12):1804.
- [6] 田河林,韦立顺,悦随士.白芨胶的提取及理化特性测定[J].中国临床医药研究杂志,2004,(115):12903.
- [7] 朱小平,吴东儒.白芨多糖分离、纯化、组成及其性质[J].安徽大学学报,1991,(4):86.
- [8] 魏绍云,齐慧玲,王继伦,等.苯酚-硫酸法测定白芨多糖[J].天津化工,2000,(3):35.
- [9] 陈景耀,吴国荣,王建安,等.正交试验优选白芨多糖硫酸酯化工艺的研究[J].中草药,2005,36(1):43.
- [10] 中国药典一部[S].2010年版.

[收稿日期]2012-09-04

[修回日期]2012-11-12

欢迎订阅 2013 年《药学实践杂志》

本刊网址: www.jxsjzz.cn; yxsj.smmu.edu.cn