

白花蛇舌草中多糖提取精制工艺的考察

★ 陈浩¹ 何小女² 许军² 彭红² (1.江西中医学院 2005 级研究生 南昌 330004;2.江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:改进白花蛇舌草中多糖的提取工艺,并对所得多糖进行分离纯化。方法:将旋转蒸发仪(RE-52-05)进行改进,用于提取白花蛇舌草中的多糖成分。采用紫外分光光度法测定提取物中多糖的含量,以优化多糖的提取工艺;采用化学方法和薄层色谱法对所得多糖进行鉴别,并用柱层析对样品进行分离纯化。结果:通过以上方法得到白花蛇舌草中多糖的白色纯品。结论:采用真空提取,可减少白花蛇舌草多糖的提取过程中因高温带来的多糖的损耗,经柱层析分离纯化可得多糖纯品。

关键词:白花蛇舌草;提取工艺;多糖

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A

白花蛇舌草为茜草科耳草属一年生草本植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxb. (*Hedyotis diffusa* Willd.) 的干燥全草,又名二叶葎。药用干燥或新鲜全草,《中华人民共和国药典》(2005 版)一部附录中描述其为茜草科植物白花蛇舌草^[1]。临床应用广泛,主治恶性肿瘤、肠炎、胃肠炎、阑尾炎、扁桃体炎、肺炎、泌尿系统感染等病症,具有很高的研究价值。

自 20 世纪 70 年代以来陆续发现多糖及多糖复合物参与了细胞生命的代谢和调节,中草药多糖在增强机体免疫功能及抗肿瘤、抗肝炎、抗溃疡、调血脂、降血糖、抗衰老方面有作用^[2~4]。对其多糖的研究具有极大的临床价值,可带来极大的市场效应。近年来江西省开展了白花蛇舌草的野生转家种工作,为白花蛇舌草的研究与分析以及有效成分的分离纯化提供了可靠的依据。本实验对江西产的白花蛇舌草全草中的多糖的提取工艺、含量以及化学鉴别进行了研究。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 紫外分光光度计贝克曼(DV-650);电子天平(型号:BS 124S 北京赛多利斯仪器);超声波清洗器(型号:KQ3200 昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发仪器(RE-52-05)上海亚荣生化仪器。

1.2 试剂 1-萘酚(分析纯)(天津市科密欧化学试剂开发中心 批号:20060725),蒽酮(上海化学试剂采购供应五联化工厂 批号:20061227),其他所用试剂全为分析纯试剂,白花蛇舌草购自江西樟树。

2 粗多糖提取的方法学考察

2.1 粗多糖提取的正交设计 采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 实验方案以不同水平时的收率作直观分析和方差分析(见表 1)。对各因素在不同水平时的收率之和作直观分析。

表 1 因素与水平

水平	因素		
	提取温度/℃	醇沉浓度(%)	提取时间/h
1	55	75	1.5
2	60	80	2
3	65	85	2.5

表 2 $L_9(3^4)$ 正交设计表及实验数据

实验次数	提取温度/℃	醇沉浓度(%)	提取时间/h	多糖含量 [*] (%)
1	55	75	1.5	3.78
2	55	80	2	4.22
3	55	85	2.5	4.12
4	60	80	1.5	4.04
5	60	85	2	4.58
6	60	75	2.5	3.95
7	65	85	1.5	4.15
8	65	75	2	4.08
9	65	80	2.5	3.88

* 取 3 次试验平均值。

表 3 方差分析结果

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	P 值
A	0.001	2	0.001	9.317	0.001
B	0.007	2	0.003	59.885	0.000
C	0.005	2	0.002	44.636	0.000
Error	0.001	20	5.514E-05		

从表 3 分析可知 A、B、C 三因素 P 均 < 0.05 , 有统计学意义,可认为重复实验无差异,从表 2 极差分析可知,醇沉浓度对含量影响最大,提取温度的影响次之,提取时间影响最小。因素水平分析可得提取温度以 2 水平为最佳醇沉浓度以 3 水平为最佳,提取时间以 2 水平为最佳。因此最优水平搭配为 $A_2B_3C_2$,旋转蒸发仪 60℃,醇沉浓度 85%,提取时间 2 h 为最佳。

2.2 TCA 法除蛋白质的考察

以 1:1 等体积加入 5% 三氯乙酸溶液,静置 4

h,离心取上清液 3000 r/min,通过高速离心蛋白质等沉积于试管底部,取上清液达到多糖与蛋白质的初步分离。除蛋白 3 次后,离心所得沉淀量大大减少,且离心 4 次以上多糖损耗率大大增加,因此离心 3 次为佳(未除尽之蛋白通过凝胶分离与多糖分子分离)。

2.3 实验操作

取白花蛇舌草粗粉,干燥粉碎过 20 目筛,用石油醚回流提取 2 次,每次 1 h,(将接液瓶取下用木塞塞紧接液口外部工业胶布扎紧,将旋转蒸发器改装成回流装置)。滤过,将滤渣置于广口瓶中,用 95% 乙醇 1 回流提取 2 次。(同上改装成回流装置),每次 1h,滤过,滤渣加蒸馏水回流提取 2 h,(同上改装成回流装置),滤过,再加蒸馏水回流提取 2h,滤过,滤液合并,浓缩至 400 ml。用水饱和乙酸乙酯萃取 2 次,再用 TCA 法除蛋白:以 1:1 等体积加入 5% 三氯乙酸溶液,静置 4 h,离心取上清液,取出部分上清液,再用 TCA 法除蛋白两次,滤液浓缩至 200 ml,加入 95% 的乙醇至含醇量达 85%,静置过夜,过滤,本次得到的滤渣以乙醚、无水乙醇、丙酮依次洗涤多次,得棕色精制多糖,40℃ 真空烘干备用。

2.4 样品保存的考察

粗多糖样品在空气中一周后开始氧化变质,颜色逐渐变黑,将样品放在冰箱中,用丙酮保存,3 个月内无明显变质现象。

2.5 样品的鉴别

2.5.1 粗多糖的化学鉴别 与蒽酮硫酸反应为阳性,与 10% 1-萘酚硫酸反应阳性。

2.5.2 粗多糖的薄层鉴别 样品处理,取粗多糖样品用 6 mol/L 盐酸溶解,在 100℃ 水浴加热 10 h,用 1mol/L 氢氧化钠中和得点样溶液。用 10% α -萘酚、苯胺邻苯二甲酸作显色剂,分离斑点与标准单糖 R_f 比较后通过对照得知白花蛇舌草中白色多糖水解后,含有鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、D-甘露糖,阿拉伯糖等单糖。

3 样品的粗步纯化

3.1 预处理

用 95% 乙醇浸泡大孔树脂 24 h,再用 95% 乙醇上柱洗脱至滴液无浑浊——将水与流出液按 2:1 混合置光处澄清透明。

3.2 吸附率与解析率考察

通过对大孔树脂吸附与解吸的考察,合理的选择出一种最理想的用于初步纯化的大孔树脂,从表 4 中数据最终选用 D-101 大孔树脂进行初步纯化分离。

3.3 实验步骤

取粗多糖样品上 D-101 大孔树脂柱,用水洗至

20 个 BV,洗脱液体无 α -萘酚反应,再用 5% 酒精冲洗 10 个 BV 至洗脱液体无 α -萘酚反应(用 10% 酒精冲洗已无 α -萘酚反应),合并收集,浓缩醇沉,得白色粗多糖纯品(40℃ 真空烘干备用)。

表 4 不同大孔树脂吸附率与解析率考察

大孔树脂	极性强弱	吸附率 (%)	吸附量 /mg·g ⁻¹	解吸率 (%)
D101	非极性	78	62	92
AB-8	弱极性	62	48	85
D4020	非极性	65	52	88
D101-1	非极性	70	56	89

4 样品的精制

4.1 DEAE 纤维素吸附柱纯化

4.1.1 预处理 取 100 克 DEAE 纤维素先用 1 mol/L 氢氧化钠上柱冲洗,再用盐酸 1 mol/L 冲洗,最后用水平衡得处理好的纤维素离子吸附柱。

4.1.2 DEAE 纤维素吸附柱纯化 用 0.1 mol/L 氢氧化钠为洗脱剂将粗多糖样品洗脱,将洗脱液浓缩(50 度浓缩),醇沉,抽滤得去离子纯多糖(真空干燥)。

4.2 凝胶柱纯化

4.2.1 预处理 将 100 克 G-100 凝胶置于 1% 氯化钠溶液中,充分浸泡两天后取出,再用 1% 氯化钠溶液冲洗 4 个柱体积至流出液无浑浊。

4.2.2 G-100 凝胶柱纯化 用 1% 氯化钠溶液将去离子纯多糖溶液洗脱,收集洗脱液浓缩(50℃ 浓缩),醇沉,抽滤,得白色纯多糖样品(低温冷冻干燥)。

5 讨论

所得精制多糖经双缩脲反应鉴别所知样品中已不含蛋白质,为白色纯品无晶型微溶于冷水,溶于热水以及重水,水解后,含有鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、D-甘露糖,阿拉伯糖等单糖。

采用真空提取,可减少提取过程中因传统方法高温提取所带来的多糖损耗,通过粗提,纯化及精制等步骤得到白花蛇舌草中白色纯多糖,所得的纯品红外图谱表示为多糖。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 26.
- [2] Kumazawa Y, Mizunoe K, Otsuka Y. Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of angelica acutifolia Kitagawa(Yamato Tohki) [J]. Immunology, 1982, 47(1): 75-83.
- [3] Cho CH, Mei QB, Shang P, et al. Study of the gastrointestinal protective effects of polysaccharides from Angelica sinensis in rats[J]. Planta Med & a, 2000, 66(4): 348-351.
- [4] 陈群, 刘家昌. 人参多糖、黄芪多糖、枸杞多糖的研究进展[J]. 淮南师范学院学报, 2001, 3(1): 39-41.

(收稿日期: 2007-10-10)