

# 正交实验法优化提取二型鳞毛蕨多糖工艺的研究

罗 琴<sup>1</sup>, 林惠昆<sup>2</sup>, 管春平<sup>1</sup>, 谢启明<sup>1</sup>

(1. 楚雄师范学院 化学与生命科学系, 云南 楚雄 675000; 2. 德宏师范高等专科学校 理工系, 云南 德宏 678400)

**摘 要:**以二型鳞毛蕨为试材,通过单因素试验研究了浸提温度、料液比、提取时间和乙醇浓度对多糖提取率的影响,并采用正交实验优化了二型鳞毛蕨多糖提取工艺。结果表明:多糖最佳提取工艺为浸提时间 2.5 h,料液比 1:40 g/mL,乙醇浓度 80%,浸提温度 80℃,在此条件下,多糖的提取率为 2.60%;经该试验优化后的工艺合理,多糖提取率高,品质较好。

**关键词:**二型鳞毛蕨;多糖;提取;正交实验

**中图分类号:**R 284.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0146-03

二型鳞毛蕨(*Dryopteris cochleata* (Buch. -Ham. ex D. Don) C. Chr.) 属鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物<sup>[1]</sup>,鳞毛蕨属是云南哀牢山蕨类植物区系最大的属之一<sup>[2]</sup>,其中药用植物有 21 种<sup>[3]</sup>。多糖类化合物是一种免疫调节剂,参与细胞生命现象的调节,而且多糖没有细胞毒性,药物质量易通过化学手段控制,已经成为新药的发展方向之一<sup>[4]</sup>。近年对蕨类植物的分析研究表明,药用蕨类植物多糖复合物具抗肿瘤、免疫促进、抗凝血、抗补体、抗溃疡、抗病毒和降血糖等多种生理和药理活性。其功能作用限于细胞表面,具有高效低毒的特性,但有效成分的分离提取工艺尚需完善<sup>[5-6]</sup>。目前,二型鳞毛蕨化学成分研究报道较少,为了研究二型鳞毛蕨多糖的生物活性,该试验采用苯酚-硫酸法测定了二型鳞毛蕨中水溶性多糖含量,并以二型鳞毛蕨水溶性多糖提取率为指标,对多糖的提取工艺进行了单因素试验和正交实验优化<sup>[7]</sup>,以为云南哀牢山二型鳞毛蕨的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试二型鳞毛蕨全株采自云南楚雄市紫溪山自然保护区,经楚雄师范学院徐成东教授鉴定。采集后迅速干燥(70℃)后粉碎成干粉,保存备用。

试剂:丙酮、丁醇、无水乙醇、苯酚、乙醚、浓硫酸、氯仿、葡萄糖标准品,以上试剂均为分析纯,试验用水为蒸

馏水。

仪器:722 型光栅分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司);索氏提取器;HH-S2S 恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂);EX124 电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司);9FZ-15 型机械粉碎机。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 水溶性多糖含量测定** 标准曲线绘制:按苯酚-硫酸法测定水溶性多糖含量的方法配制葡萄糖标准液及苯酚溶液<sup>[8]</sup>,以试剂空白溶液为参比液,于 490 nm 波长处测定吸光度,绘制标准曲线,得线性回归方程为: $A = 0.0056C - 0.0055$  ( $R^2 = 0.9991$ ),该曲线在 20 ~ 10  $\mu\text{g/mL}$  范围内,吸光度与多糖浓度呈良好线性关系。换算因子确定:准确称取干燥至恒重的二型鳞毛蕨多糖 0.2023 g,置 100 mL 容量瓶中,蒸馏水稀释至刻度,吸取 1.00 mL 于 50 mL 容量瓶中稀释定容,然后吸取 2.00 mL 稀释液于比色管中,按苯酚-硫酸法测定水溶性多糖含量的方法显色。求换算因子  $f$ ,  $f = W \times 10^6 / (C \times D)$ ,式中  $W$  为多糖质量(g), $C$  为多糖的浓度( $\mu\text{g/mL}$ ), $D$  为多糖的稀释倍数。算出多糖的换算因子  $f = 3.115$ 。二型鳞毛蕨中水溶性多糖提取及含量测定<sup>[9]</sup>:准确称取二型鳞毛蕨样品 10.0235 g,置于索氏提取器中,加入 4:1 氯仿和甲醇,回流脱去植物脂质后,按料液比 1:30 g/mL 加入蒸馏水,80℃ 水浴中提取 2 h,浓缩至 60 mL。离心后取上清液加入 8.0 mL 氯仿和 2.0 mL 正丁醇,萃取除去蛋白质和顽固脂质后转入 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容。吸取 1.00 mL 于 50 mL 容量瓶中进行稀释,然后吸取 2.00 mL 稀释溶液于比色管中,显色。计算二型鳞毛蕨中多糖的含量,平行试验 5 次。多糖含量 =  $(C \times D \times f) / (W \times 10^6)$ ,式中  $W$  为二型鳞毛蕨的质量(g), $C$  为多糖溶液中葡萄糖的浓度( $\mu\text{g/mL}$ ), $D$  为多糖的稀释倍数, $f$  为换算因子。计算出二型鳞毛蕨中多糖的含量为二型鳞毛蕨全株干重的 2.64%。

**第一作者简介:**罗琴(1963-),女,云南姚安人,本科,副教授,研究方向为分子光谱及天然有机物。E-mail:hxqlq@163.com.

**责任作者:**谢启明(1961-),男,云南玉溪人,本科,教授,研究方向为分子光谱及天然有机物。E-mail:hxxxqm@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31260095);云南省应用基础研究计划资助项目(200667)。

**收稿日期:**2013-06-19

**1.2.2 多糖提取的单因素试验** 提取温度对多糖提取率的影响:称取二型鳞毛蕨样品 10 g,按料液比 1:20 g/mL 加入蒸馏水,分别在不同温度(50、60、70、80、90℃)提取 2 h,水提液浓缩,加无水乙醇至浓度 80%沉淀 24 h,过滤、洗涤,干燥至恒重后测多糖含量,计算提取率。料液比对多糖提取率的影响:称取二型鳞毛蕨样品 10 g,按料液比 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL 加入蒸馏水,在 80℃提取 2 h,水提液浓缩,加无水乙醇至浓度 80%沉淀 24 h,过滤、洗涤,干燥至恒重后测多糖含量,计算提取率。提取时间对多糖提取率的影响:称取二型鳞毛蕨样品 10 g,按料液比 1:30 g/mL 加入蒸馏水,在 80℃提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,水提液浓缩,加无水乙醇至浓度 80%沉淀 24 h,过滤、洗涤,干燥至恒重后测多糖含量,计算提取率。醇沉浓度对多糖提取率的影响:称取二型鳞毛蕨样品 10 g,按料液比 1:30 g/mL 加入蒸馏水,在 80℃提取 2 h,水提液浓缩,分别加无水乙醇至浓度 50%、60%、70%、80%、90%沉淀 24 h,过滤、洗涤,干燥至恒重后测多糖含量,计算提取率。

**1.2.3 多糖提取的正交实验** 在单因素试验基础上,选取提取温度、料液比、提取时间和乙醇浓度为考察因素,以二型鳞毛蕨多糖提取率为考察指标,采用  $L_9(3^4)$  正交实验,确定最佳提取条件。正交实验因素及水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	提取温度/℃	料液比/g·mL <sup>-1</sup>	提取时间/h	乙醇浓度/%
1	70	1:20	1.5	70
2	80	1:30	2.0	80
3	90	1:40	2.5	90

## 2 结果与分析

### 2.1 提取温度对多糖提取率的影响

由图 1 可知,温度升高对多糖的提取有利,但当温度提高到 80℃以后,提取率却稍有下降。原因可能是温度过高,导致多糖的降解,因此温度宜控制在 80℃。

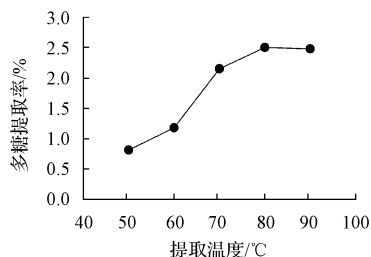


图 1 提取温度对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperatures on polysaccharide yield

### 2.2 料液比对多糖提取率的影响

由图 2 可知,料液比对多糖提取率有影响,但不显著,当料液比增加到 1:30 g/mL 时多糖已经基本溶出完全。再增加溶剂的用量对提取率没有提高,反而不利

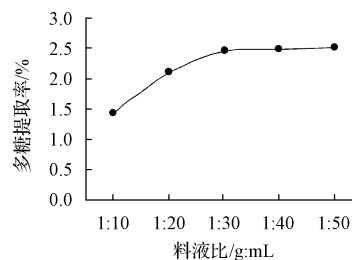


图 2 料液比对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of the extraction ratio of material to liquid on polysaccharide yield

于提取操作。因此,料液比控制在 1:30 g/mL 为宜。

### 2.3 提取时间对多糖提取率的影响

由图 3 可知,提取时间对多糖提取率有较大影响,这可能与多糖透过植物细胞溶出的难易程度有关。当提取时间在 0.5~2.0 h 间,多糖溶出增加,超过 2.0 h 后,显示多糖已经溶出完全。所以,提取时间应不低于 2.0 h。

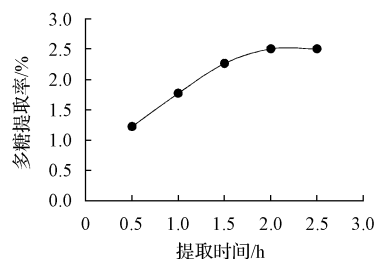


图 3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of the extraction time on polysaccharide yield

### 2.4 醇沉浓度对多糖提取率的影响

由图 4 可知,乙醇浓度升高,多糖提取率增加。但乙醇浓度超过 80%后,多糖提取率有下降趋势。说明乙醇浓度过高,不利于二型鳞毛蕨多糖提取,因此最适宜的乙醇浓度是 80%。

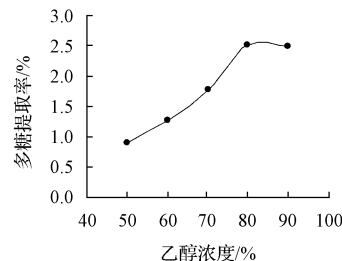


图 4 醇沉浓度对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of the alcohol precipitation concentration on polysaccharide yield

### 2.5 多糖提取的正交实验结果

由表 2 可知,正交实验极差  $R$  值大小顺序为  $R_A > R_D > R_C > R_B$ ,影响多糖提取因素的大小依次是浸提温度、乙醇浓度、浸提时间、料液比,浸提温度对提取率的

影响最大,乙醇浓度次之,料液比和浸提时间的影响较小。各项指标最高水平组成较优工艺条件为 $A_2B_3C_3D_2$ ,即浸提时间 2.5 h,料液比 1:40 g/mL,乙醇浓度 80%,浸提温度 80℃。表 3 的方差分析也表明,浸提温度对结果的影响最大,乙醇浓度次之,其它影响因素与之相比影响较小。

表 2  $L_9(3^4)$  正交实验结果Table 2 Results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

试验号	影响因素				多糖提取率 /%
	A 提取温度	B 料液比	C 提取时间	D 乙醇浓度	
1	1	1	1	1	1.29
2	1	2	2	2	1.82
3	1	3	3	3	2.10
4	2	1	2	3	2.35
5	2	2	3	1	2.15
6	2	3	1	2	2.57
7	3	1	3	2	2.51
8	3	2	1	3	2.45
9	3	3	2	1	2.01
$k_1$	1.737	2.050	2.103	1.817	
$k_2$	2.357	2.140	2.060	2.300	
$k_3$	2.323	2.227	2.253	2.300	
R	0.620	0.177	0.193	0.483	

表 3 正交实验方差分析

Table 3 The variance analysis of orthogonal experiment

因素	偏差平方和	自由度	F 比	$F_{0.05}$ 临界值
A 提取温度	0.730	2	2.236	
B 料液比	0.047	2	0.144	
C 提取时间	0.062	2	0.190	4.460
D 乙醇浓度	0.467	2	1.430	
误差	1.31	8		

## 2.6 验证试验

准确称取二型鳞毛蕨,按照最佳工艺条件进行 3 次平行试验。多糖过滤,并依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤、真空干燥得到粉状浅黄色二型鳞毛蕨多糖,品质较

好。多糖提取率分别为全株干重的 2.60%、2.59%、2.62%,其平均值为 2.60%,试验结果比较稳定,优化后的工艺条件重复性好。

## 3 讨论与结论

二型鳞毛蕨多糖的相关研究鲜见报道,其多糖的提取及含量测定有一定的价值。该试验用苯酚-硫酸比色法,测得二型鳞毛蕨中水溶性多糖含量为全株干重的 2.64%。并用水提醇沉法分离得到浅黄色二型鳞毛蕨多糖,品质较好,结构及生物活性有待进一步研究。

在二型鳞毛蕨多糖工艺中,主要影响因素是提取温度、沉淀剂乙醇浓度。在单因素试验基础上,采用正交实验对二型鳞毛蕨多糖的提取工艺进行优化筛选,得出最佳工艺,即浸提时间为 2.5 h,料液比 1:40 g/mL,乙醇浓度 80%,浸提温度 80℃。在此工艺条件下,多糖提取率为 2.60%,提取率较高。

## 参考文献

- [1] 武素功. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [2] 徐成东. 云南哀牢山国家级自然保护区蕨类植物资源[J]. 楚雄师范学院学报,2006,21(9):51-58.
- [3] 谢宗万,余友琴. 全国中草药名鉴[M]. 北京:人民卫生出版社,1996.
- [4] 陈旋,张翼,张剑波. 植物多糖的研究进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(13):1000-1005.
- [5] 王玲,和兆荣. 药用蕨类植物化学成分研究进展[J]. 中国野生植物资源,2006,25(3):1-4.
- [6] 赵莉,杨文钰. 蕨类植物的活性成分研究进展[J]. 中药材,2004,27(6):452-456.
- [7] Jie L R. Orthogonal test design for optimization of the extraction of polysaccharides from *Phascolosoma esulenta* and evaluation of its immunity activity[J]. Carbohydrate Polymers,2008,73:558-560.
- [8] 秦向东,宁玲,闫小颜. 棒节石斛中的多糖分布及提取工艺研究[J]. 云南农业大学学报,2011,26(3):430-433.
- [9] 甘露,张声华. 不同品种枸杞多糖研究[J]. 食品科学,1996,17(9):9-12.

# Study on the Optimization of Extraction Technology of Polysaccharide from *Dryopteris cochleata* Using Orthogonal Experiment

LUO Qin<sup>1</sup>, LIN Hui-kun<sup>2</sup>, GUAN Chun-ping<sup>1</sup>, XIE Qi-ming<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000; 2. Department of Science and Engineering, Dehong Teacher's College, Dehong, Yunnan 678400)

**Abstract:** Taking *Dryopteris cochleata* as material, the effect of extraction temperature, solid-liquid ratio, extraction time and the ethanol concentration on polysaccharide yield were studied by single factor test, and the extraction technology was optimized by orthogonal experiment. The results showed that the best extraction technology of polysaccharide from *Dryopteris cochleata* was the extraction time 2.5 h, the solid-liquid ratio 1:40 g/mL, the ethanol concentration 80% and extraction temperature 80℃. Under these conditions, the extraction rate of polysaccharide was 2.60%. The optimized extraction process was reliable, and the extraction efficiency of polysaccharide was higher than normal with good quality.

**Key words:** *Dryopteris cochleata*; polysaccharide; extraction; orthogonal test