

灰兜巴粗多糖的提取及含量测定

陈燕忠,符美燕,谢清春*,吕竹芬,申楼,陈卉,秦贞苗
(1. 广东省药物新剂型重点实验室 广东药学院药物研究所, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究灰兜巴粗多糖的提取及含量测定,为临床糖尿病的药物治疗提供新的线索,对开发和研究治疗糖尿病的新物质,特别是从天然资源中找到既能治疗糖尿病又无明显不良反应的药物,具有特别重要的意义。方法:采用水提醇沉法从灰兜巴药材中提取灰兜巴粗多糖;采用苯酚-硫酸法显色后用分光光度法测定多糖的总糖含量。结果:灰兜巴粗多糖总糖的浓度与吸光度在 15~50 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系,回归方程: $A = 0.0152C + 0.0192$, $r = 0.9993$ 。采用换算因子 $f = 3.3473$ 计算,灰兜巴粗多糖总糖的平均质量分数为 99.92%。结论:该试验采用的苯酚-硫酸法易操作、灵敏度高、稳定性和重现性好,可行。该方法可作为灰兜巴粗多糖的含量测定方法。

[关键词] 灰兜巴;粗多糖;提取;苯酚-硫酸法;含量测定
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0079-04

Extraction and Assaying of Huidouba Polysaccharides

CHEN Yan-zhong, FU Mei-yan, XIE Qing-chun*, LU Zhu-fen, SHEN Lou, CHEN Hui, QIN Zhen-miao
(1. Key Laboratory of Advanced Drug Delivery of Guangdong Province, Institute of Material Medica,
Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20101104(002)
[基金项目] 广东省社会发展领域科技计划项目(粤科函社字[2010]1096-30)
[第一作者] 陈燕忠,博士,教授,Tel:020-39352501,E-mail:Doctor. c@163.com
[通讯作者] * 谢清春,硕士,助理研究员,从事药物新剂型与质量研究,Tel:020-39352508,E-mail:xieqchun@163.com

表 5 延 0~延 90 及延红 0~延红 90 含量测定结果

样品	延胡索乙素 /mg	样品	延胡索乙素 /mg
延 0	0.071	延红 0	0.078
延 5	0.135	延红 5	0.084
延 10	0.162	延红 10	0.094
延 20	0.190	延红 20	0.099
延 30	0.195	延红 30	0.107
延 45	0.206	延红 45	0.108
延 60	0.346	延红 60	0.174
延 75	0.354	延红 75	0.274
延 90	0.338	延红 90	0.121

3 讨论

本文从动态变化为切入点,研究延胡索红花配伍对其有效成分影响,在煎煮的相同时间段,延胡索中延胡索乙素含量比延胡索红花配伍中要大,说明延胡索红花配伍后使延胡索乙素的含量降低。
延胡索煎煮液和延胡索红花配伍煎煮液在煎煮

75 min 时,延胡索乙素的含量最大,煎煮至 90 min 时,延胡索乙素的含量则变小。说明煎煮时间对延胡索乙素有一定的时间,不宜超过 75 min。

[参考文献]

[1] 张晓丽,曲扬,侯家鸣,等. 延胡索的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(7):537.
[2] 贺凯,高建莉,赵光树. 延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中草药,2007,38(12):1909.
[3] 姜建双,夏鹏飞,冯子明,等. 红花化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(24):2911.
[4] 杨丽华,张敏,马春,等. 红花的现代研究进展[J]. 中国老年学杂志,2007,27(14):1429.
[5] 魏良兵,孟楣,程璠,等. 不同醋炙延胡索中延胡索乙素的含量变化[J]. 中药材,2008,31(4):494.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] Objective: To study on the extraction and assaying of Huidouba polysaccharides, to provide new clues for drug treatment in clinical diabetes, and to develop and research new materials for treating diabetes mellitus, especially those from natural resources that is able to treat diabetes mellitus and no obvious side effects, which is of great significance. **Method:** The method of decocting with water and depositing with alcohol was adopted to extract polysaccharides from Huidouba. And after phenol-sulfuric acid reaction, the method of absorption spectrometry was used to determine the polysaccharides content of Huidouba. **Result:** The standard curve was linear in the range of $15\text{--}50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ with correlation coefficient of $r = 0.999\ 3$. The linear regression equation was $A = 0.015\ 2C + 0.019\ 2$. The average content of total sugars of Huidouba polysaccharides was 99.92% calculated using the conversion factor $f = 3.347\ 3$. **Conclusion:** The method of phenol-sulfuric acid reaction used in determining the content of polysaccharides is simple in operation with high sensitivity, good stability and reproducibility, which can be used for quantity control of the polysaccharides content of Huidouba.

[Key words] Huidouba; polysaccharides; extraction; phenol-sulfuric acid method; assaying

灰兜巴(又名闭口袋、灰兜巴)是在海拔 1 200 m 以上的老茶树林里的一种洞穴红蜘蛛所分泌的丝为原料而筑成的巢穴。其外观形成一个布袋,上端开口处附于老茶树干上、下端藏于洞穴里。其表面黏附了较多红色或黄色的泥土和枯枝败叶,其上端开口偶见蜘蛛尸体。以黏附灰黄色泥土品质最佳。灰兜巴具有益气健脾,滋补肾阴,缓解糖尿病症状;改善胰岛 B 细胞性不足,促进体内血糖的自然平衡;平衡阴阳,调和气血,纠正代谢紊乱,防止糖尿病并发症。其主治糖尿病,强效降糖,因此被誉为四川省峨眉山治疗糖尿病的优良偏方,并拥有“仙山灵药”、“糖尿病克星”和“天然纯绿色的大自然珍宝”的美誉。经本地居民通过长期试用证明对各类糖尿病有很强的抑制作用,这种药材为峨眉山所特有,是峨眉山千年来民间世代相传的药物^[1-4]。

为进一步开发利用灰兜巴这一药用天然产物,本文用水提醇沉法制得灰兜巴粗多糖,通过经典的苯酚-硫酸法显色,采用分光光度法进行多糖总糖的含量测定,为进一步研究灰兜巴多糖的提取和分离纯化条件、质量分析和结构鉴定等提供理论依据。

1 仪器与试剂

DFY-200 摇摆式高速中药粉碎机(中国浙江温岭市大德中药机械有限公司制造),Sartorius 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),JJ2000 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),LXJ-IIIB 低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂),UV1101 紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),GLZ-0.2B 冷冻干燥机(上海浦东冷冻干燥设备有限公司)。

灰兜巴(购于四川省峨眉山明秀中草药店),95% 乙醇(药用酒精),苯酚(A. R.,广州化学试剂厂),铝片(A. R.,天津市科密欧化学试剂有限公司),碳酸氢钠(A. R.,天津市大茂化学试剂厂),葡萄糖(A. R.,天津市大茂化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 灰兜巴粗多糖的提取 称取灰兜巴粗粉 150 g,置圆底烧瓶中,第 1 次加水 10 倍量,浸泡 1 h 后回流煎煮 2 h,第 2 次加水 8 倍量,回流煎煮 2 h。每次提取后趁热纱布过滤,室温放冷,以 $5\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液抽滤,合并 2 次滤液并混匀,于温度为 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下减压浓缩至原液的 $1/10\sim 1/15$,转移至锥形瓶中放冷,边搅拌边加入 95% 的乙醇,调整浓缩液的乙醇体积分数至 80%,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中均静置 12 h,然后离心,弃去上清液,热水复溶沉淀物到一定体积,转移至 200 mL 量瓶中定容,混匀,备用。

将定容混匀后的灰兜巴热水复溶溶液转移至钢盘,用表面穿小孔锡纸铺盖,于冷冻干燥机 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻 12 h,在真空度 $10\sim 20\text{ Pa}$ 的环境下真空冷冻干燥 24 h,得灰黄色絮状冻干物,密封并于干燥器贮存备用。

2.2 含量测定方法学考察

2.2.1 5% 苯酚溶液的制备 50 g 苯酚,加入 0.05 g 铝片和 0.025 g 碳酸氢钠,在 $178\sim 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 常压蒸馏,空气冷凝,得到白色针状苯酚结晶,用棕色瓶密封贮存备用。在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下缓慢加热结晶的重蒸苯酚,取 5 g 融化了的重蒸苯酚,用蒸馏水稀释并定容至 100 mL,混匀,即可。

2.2.2 葡萄糖标准溶液的制备 精密称取干燥至恒重的分析纯葡萄糖 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,以蒸馏水溶解并定容至刻度,混匀,即得 0.1 g/L 葡萄糖溶液,4 ℃ 冰箱储存备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取灰兜巴热水复溶溶液 1 mL 置于 100 mL 容量瓶中,用热水稀释并定容至刻度,过滤,滤液即为待测的样品溶液。

2.2.4 总糖含量测定波长的选定 取 0.1 g·L⁻¹ 葡萄糖溶液 1.0 mL, 样品溶液 1.6 mL 和蒸馏水 2.0 mL,采用苯酚-硫酸比色法显色,以显色剂-水、葡萄糖显色液-水、样品显色液-水、葡萄糖显色液-显色剂和样品显色液-显色剂(后者均为参比)在 200 ~ 800 nm 扫描,绘制紫外-可见吸收光谱。结果见图 1。

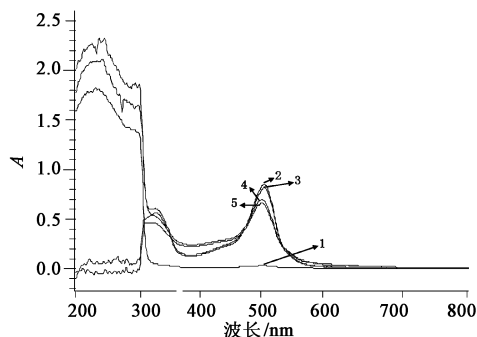


图 1 灰兜巴总糖紫外-可见吸收光谱

1. 显色剂-水;2. 葡萄糖显色液-水;3. 葡萄糖显色液-显色剂;
4. 样品显色液-水;5. 样品显色液-显色剂

由图 1 可以看出,在波长 400 nm 前,显色剂的干扰严重,但在 400 nm 后,显色剂对葡萄糖标准溶液和样品溶液基本无干扰,且结果均在 (487 ± 3) nm 波长处有最大吸收,故以 487 nm 作为测定波长。

2.2.5 标准曲线的绘制 精密量取已配制好的 0.1 g·L⁻¹ 葡萄糖溶液 0.0, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 分别置于 10 mL 的具塞离心管中,用蒸馏水稀释至 2 mL,充分混匀,分别加入 5% 苯酚溶液 1 mL,充分混匀,各管沿壁缓慢加入 5 mL 浓硫酸,在加入过程采用旋涡混合仪混匀,室温放置 10 min,充分混匀,置于 80 ℃ 水浴槽恒温 15 min,置冰水浴中冷却 10 min,充分混匀,自来水中放置 10 min,室温放置 10 min。以 2.0 mL 蒸馏水的作为空白调零,于 487 nm 处测定吸光度,每个样品平行操作 3 次取吸光度平均值。以吸光度 A 为纵坐标,以葡萄糖标准溶液质量浓度 C (mg·L⁻¹) 为横坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。得分析纯葡萄糖的吸光度和其质量浓度

的回归方程 $A = 0.0152C + 0.0192$ ($r = 0.9993$),结果表明葡萄糖对照品的质量浓度在 15 ~ 50 mg·L⁻¹ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 精确量取样品溶液 1 mL,按 2.2.5 项下的方法操作显色,测定吸光度,重复测定 6 次,其相对标准偏差 RSD 0.12% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精确量取同一样品溶液各 1 mL,按 2.2.5 项下的方法操作显色,分别于 (0 ~ 60) min (每隔 10 min), (75 ~ 120) min (每隔 15 min), (140 ~ 180) min (每隔 20 min), 210, 240, 300, 420, 540 min 测定 1 次吸光度,共测 19 次,计算 RSD 0.97% ($n = 19$),该方法的稳定性较好。前 180 min 吸光度下降了 2.63%, 540 min 后吸光度下降了 3.82%,表明苯酚-硫酸比色法在灰兜巴粗提取液中显色的稳定性可达 180 min 以上,在 180 min 内测定结果可靠。

2.2.8 重复性试验 精密量取同一提取批号的灰兜巴热水复溶溶液 6 份,按照样品溶液的制备方法制备并按绘制标准曲线的方法测定其吸光度, RSD 2.71% ($n = 6$),结果表明该方法的重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密量取已知含量的灰兜巴热水复溶溶液 1 mL,按照样品溶液的制备方法制备,精密吸取灰兜巴粗多糖样品溶液 700 μL 共 6 份(每份相当于含葡萄糖 37.4 μg),置于 10 mL 具塞离心管中,分别精密加入配制好的标准葡萄糖溶液 400 μL (相当于加入葡萄糖量 40.0 μg),按绘制标准曲线的方法显色并测定其吸光度,求算平均回收率和 RSD,结果回收率平均值 99.09%, RSD 1.58% ($n = 6$),因而可以判断该测定方法准确度较高。

2.2.10 换算因子(f)的测定 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的冻干品灰兜巴样品 10 mg,置于 50 mL 量瓶中,以蒸馏水溶解并定容至刻度,混匀,自然过滤,即得样品溶液。精密量取 1.0 mL 上述溶液按 2.2.5 项下的方法操作显色并测定吸光度,按下式计算换算因子^[5]:

$$f = W / (C \times D)$$

式中 W 为灰兜巴粗多糖冻干品的质量 (mg), C 为灰兜巴粗多糖稀释液中葡萄糖的质量浓度 (mg·L⁻¹), D 为灰兜巴粗多糖的稀释倍数。测得换算因子 $f = 3.3473$, RSD 2.14% ($n = 6$)。

2.2.11 样品中粗多糖总糖含量的测定 精密称取 105 ℃干燥至恒重的 5 批不同的冻干品灰兜巴样品 10 mg,置于 50 mL 量瓶中,以蒸馏水溶解并定容至刻度,混匀,过滤,即得样品溶液。精密量取 1.0 mL 样品溶液,按照绘制标准曲线的方法进行显色并测定其吸光度,代入回归方程,得葡萄糖的质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),按下式计算灰兜巴粗多糖总糖的质量分数(%):

灰兜巴粗多糖总糖的质量分数 = $C \times D \times f / W \times 100\%$
其中 C 为灰兜巴粗多糖稀释液中葡萄糖的浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), D 为灰兜巴粗多糖的稀释倍数, f 为换算因子, W 为灰兜巴粗多糖冻干品的质量(mg)。结果见表 1。

表 1 不同批号的灰兜巴粗多糖总糖含量测定结果				
批号	冻干品 取样量/mg	多糖总糖 /%	平均值 /%	RSD /%
20100909-1	10.33	99.16		
20100909-2	10.37	102.05		
20100926-2	10.13	100.03	99.92	2.12
20101125	10.30	96.33		
20101130	10.20	102.01		

3 讨论

本试验采用冷冻干燥法干燥灰兜巴粗提取物,结果其在水中的溶解效果比真空干燥法好,真空干燥后的样品经浸泡过夜依然难以溶解。可能由于多糖是天然高分子聚合物,也可能真空干燥法会破坏多糖结构。

有文献报道^[6]采用蒽酮-硫酸法测定灰兜巴粗多糖,本试验前也做了蒽酮-硫酸法的预试验,发现灰兜巴粗多糖和标准葡萄糖溶液分别显色后在 200 ~ 800 nm 扫描出现的最大吸收波长差别很大,灰兜巴粗多糖溶液显色后在 580 nm 左右处有最大吸收波长,标准葡萄糖溶液显色后在 610 nm 左右处有最大吸收波长,若采用蒽酮-硫酸法作为灰兜巴粗多糖总糖含量的测定方法,则得到的多糖总糖含量的误

差大,于是本试验采用经典的测定多糖含量方法苯酚-硫酸法对灰兜巴粗多糖和标准葡萄糖进行 200 ~ 800 nm 扫描,结果在(487 ± 3) nm 波长处有最大吸收,故以 487 nm 作为测定波长,灵敏度高、稳定性和重现性好。

由于灰兜巴原药材批号不同,再者粉碎混匀程度不同,提取多糖的含量将存在差异,为了下一步精制工艺、质量标准研究的取样量以及成型工艺中的处方量更加精确,因此每次提取完一批样品冻干后要进行换算因子的测定,否则会影响下一步试验的结果。

多糖容易降解和吸潮,因此宜在提取完后就进行冻干,冻干品密封保存。

由于多糖的生物活性与其纯度和化学结构即糖苷键的不同连接方式有着重要的关系,所以对灰兜巴粗多糖中单糖组分的分析、结构的鉴定以及与该多糖结合的蛋白和络合的微量元素等的测定需进一步研究,在此之前还需对灰兜巴粗多糖进行脱蛋白、脱色、过柱、透析等一系列精制工艺研究。

[参考文献]

[1] 伍艳,田淑琴,朱俊安.藏药灰兜巴化学成分的系统预实验[J].西南民族大学学报:自然科学版,2009(5):1017.
[2] 赵劲航,田淑琴.中药复方灰兜巴对糖尿病治疗作用研究[J].西南民族大学学报:自然科学版,2008,34(6):1186.
[3] 宋根萍.灰兜巴有效成分的提取方法.中国:CN101380339A[P].2009-03-11.
[4] 刘艳,逯家辉,郑丹,等.灰茛苈多糖的超声波提取条件优化及其降血糖作用[J].吉林大学学报:工学版,2009(S1):360.
[5] 张晓莉,李玉婷,王亚贤,等.红花多糖的提取与含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):19.
[6] 刘艳.灰茛苈多糖的提取及其降血糖活性的研究[D].长春:吉林大学,2009.

[责任编辑 全燕]