

南方菟丝子不同炮制品多糖含量的比较研究

徐丽媛, 吕永磊, 王丹, 杨蕾, 李向日*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 测定南方菟丝子及其不同炮制品(清炒、酒炙、盐炙)多糖的含量, 从多糖变化角度探究炮制原理。方法: 以南方菟丝子精制多糖测得菟丝子粗多糖对甘露糖的换算因子, 以苯酚-硫酸分光光度法测定南方菟丝子及其炮制品多糖的含量。结果: 菟丝子多糖精制前后单糖组成无明显变化, 多糖供试液在 6 h 内显色稳定, 重复性好, 平均加样回收率为 99.4%, RSD 3.02% ($n=6$)。测得南方菟丝子生品及不同炮制品(清炒、酒炙、盐炙)多糖含量分别为 6.71%, 8.27%, 8.54%, 14.17%, RSD 分别为 0.59%, 2.47%, 1.40%, 0.35% ($n=3$)。结论: 南方菟丝子经过炮制后多糖含量明显增加, 以盐炙菟丝子含量为最高, 酒炙菟丝子和炒菟丝子次之。

[关键词] 南方菟丝子; 炮制; 多糖; 含量测定; 精制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0119-04

Comparison of Content Determination of Polysaccharides in *Cuscuta Australis* and Its Processed Products

XU Li-yuan, LV Yong-lei, WANG Dan, YANG Lei, LI Xiang-ri*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To determine content of polysaccharides of different processing drugs (plain-frying drugs, stir-heating drugs with wine and stir-heating drugs with salt) in *Cuscuta australis*. To explore the processing principle from the angel of changes of polysaccharides. **Method:** The conversion coefficient of *C. australis* polysaccharides to mannitose was obtained by refined polysaccharides, and then the content of crude polysaccharides in *C. australis* and its processed products were determined by phenol-sulferic acid method. **Result:** Afer refining, monosaccharide composition of polysaccharides have no obvious changes. The color of solutions for testing showed good stabilization within 6 h and the average value of the recovery for polysaccharides measurement was 99.4% with 3.02% of RSD ($n=6$). The contents of polysaccharides and different processing drugs (plain-frying drugs, stir-heating drugs with wine and stir-heating drugs with salt) in *C. australis* were 6.71%, 8.27%, 8.54%, 14.17%, with 0.59%, 2.47%, 1.40%, 0.35% of RSD ($n=3$). **Conclusion:** The content of polysaccharides obviously increased after processed. Salt content is the highest; plain-frying and wine content took second place.

[Key words] *Cuscuta australis*; process; polysaccharides; content determination; refining

中药菟丝子为常用补益中药, 具有滋补肝肾、固

精缩尿、安胎、明目等功效。2010年前中国药典规定菟丝子药材来源为旋花科植物菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)的干燥成熟种子^[1], 但多次市场调查表明, 同属植物南方菟丝子已成为商品药材的主流品种, 菟丝子的商品在市场已少见^[2-3]。同时研究表明南方菟丝子与菟丝子在主要化学成分和药理作用方面一致, 因此《中国药典》2010年版将旋花科植物南方菟丝子也列为正品菟丝子^[4]。

菟丝子炮制历史悠久, 古代记载有 6 种方法

[收稿日期] 20110709(003)

[基金项目] 北京中医药大学校级课题

[第一作者] 徐丽媛, 硕士, Tel: 010-84738660, E-mail: ailinger2009@126.com

[通讯作者] *李向日, 教授, 从事中药炮制研究, Tel: 010-84738616, E-mail: lixiangri@sina.com

(酒制、炒法、水煮、盐炙、制饼、净制)。现代菟丝子炮制以清炒、盐炙、酒炙、制饼为主。

南方菟丝子与菟丝子的化学成分和药理作用基本相似,主要包括多糖、黄酮、糖苷、甾醇类、脂肪酸等成分。多糖具有提高免疫力^[5]、抗氧化衰老作用^[6]、增强性腺功能等作用。本研究拟从炮制前后多糖的变化角度阐述南方菟丝子炮制的原理。

目前关于菟丝子多糖的含量测定研究比较多,对南方菟丝子的研究较少,通常多糖的测定采用苯酚-硫酸法^[7],以葡萄糖为对照品,本研究制备南方菟丝子精制多糖,并测定了精制多糖的¹³C-NMR 谱和单糖组成。在此基础上,以精制多糖测得粗多糖对甘露糖的换算因子,以此校正菟丝子多糖含量测定方法,并且对不同炮制品多糖含量进行了比较,为南方菟丝子的综合应用和质量评价提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters 液相色谱仪包括 1525 色谱泵, 2489 双波长紫外检测器, Breeze 工作站; AV III 600 型超导屏蔽核磁共振仪(德国 Bruker 公司); TU-1810 型紫外-可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限公司); TDL-5-A 型低速台式大容量离心机(杭州汇尔仪器设备有限公司)。

1.2 试剂与试药 南方菟丝子(*Cuscuta australis* R. Br. 批号 090215), 产地黑龙江, 河北光明饮片有限公司汉草饮片厂供应, 经北京中医药大学中药生药系杨瑶珺副教授鉴定为旋花科植物南方菟丝子。

盐炙菟丝子:取净菟丝子加 2% 盐水适量拌匀, 闷透, 置锅内, 文火加热, 炒至微鼓起, 取出放凉。每 100 kg 药材用食盐 2 kg。

酒炙菟丝子:取菟丝子, 黄酒拌匀, 稍润, 待黄酒吸尽, 用文火炒至表面微变黄色, 微开裂, 取出, 摊凉。每 100 kg 药材用黄酒 12 kg。

炒菟丝子:取菟丝子, 炒至表面黄色, 微鼓起时,

捞出, 摊凉。

D-葡萄糖(Glc, 110833-200503)、*D*-半乳糖(Gal, 100226-200404)、*D*-甘露糖(Man, 140651-200602)、阿拉伯糖(Ara, 1506-200001)、*D*-木糖(Xyl, 111508-200404)均购自中国药品生物制品检定所;重蒸苯酚、过氧化氢、乙醇、1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)、三氟乙酸(TFA)均为分析纯;乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 南方菟丝子精制多糖的制备^[8] 精密称取南方菟丝子 50 g, 加入 80% 乙醇 500 mL, 回流提取 2 次, 每次 1 h, 脱脂, 过滤, 药渣挥尽乙醇后, 沸水提取 2 次, 每次提取 2 h, 离心(5 000 r·min⁻¹, 10 min), 合并上清液, 浓缩至 100 mL, 加乙醇使醇含量达到 80%, 于 4 °C 冰箱中过夜, 过滤, 干燥, 即得粗多糖。

将粗多糖以水复溶, 与等体积 Sevage 试剂(三氯甲烷-正丁醇 = 4:1)混合, 振摇, 离心, 除去蛋白, 先在 200 ~ 400 nm 紫外光谱段进行扫描, 260 ~ 280 nm 处无吸收峰, 再用考马斯亮蓝法^[9]测蛋白, 反复进行 5 次至无蛋白。浓缩溶液至 50 mL, 加入体积分数 30% 的过氧化氢原液, 用 0.5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠调节其 pH 至 8 ~ 9, 45 °C 水浴 4 h, 将多糖脱色液置于透析袋中, 先流水透析 1 d, 再用蒸馏水透析 3 d。透析后过滤, 浓缩, 加乙醇使醇含量至 80%, 于 4 °C 冰箱中过夜, 过滤, 滤渣依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次, 50 °C 真空干燥, 即得精制多糖。

南方菟丝子精制多糖的¹³C-NMR 图谱(溶剂为 D₂O)见图 1, 化学位移 101 的信号为糖的端基碳信号, 69 ~ 78 的为糖氧环的 C₂ ~ C₃ 信号, 58 ~ 63 的为 C₆ 信号, 18 的为甲基五碳糖的 C₆ 信号, 除上述糖信号外, 基本未见其他信号, 由此可判断精制的菟丝子多糖中基本不含其他杂质^[10]。

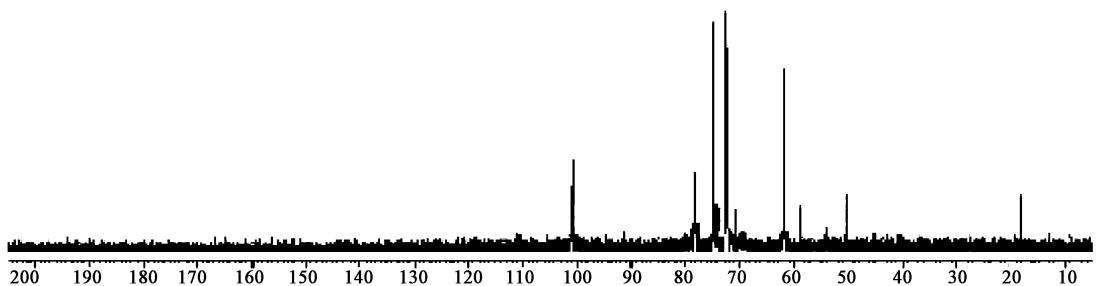
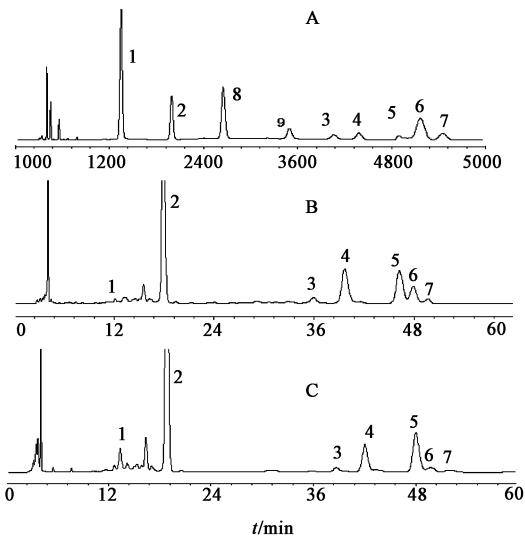


图 1 菟丝子精制多糖¹³C-NMR

2.2 PMP 衍生化法测定粗多糖和精制多糖的单体组成^[11]

2.2.1 衍生化供试品的制备 精密称取南方菟丝子粗多糖 10 mg 和精制多糖 5 mg, 加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 1 mL, 氮气封管, 于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 6 h, 从中取出 $400 \text{ } \mu\text{L}$ 置具塞试管中, 氮气吹干, 吹的同时反复加入甲醇以除净三氟乙酸。在水解供试品中加 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液和 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP 甲醇溶液各 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 混匀后于 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 100 min, 冷却至室温后加 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 中和, 加水至 1 mL, 最后加入等体积三氯甲烷除去未反应的 PMP, 重复 3 次。水相分别以 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜过滤后备用。

2.2.2 HPLC 条件 Agilent TC C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$); 流动相 18% 乙腈-82% $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7); 紫外检测器, 检测波长 250 nm , 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。菟丝子粗多糖和精制多糖的 PMP 衍生物 HPLC 见图 2, 由图可知南方菟丝子多糖精制前后多糖组成基本没有明显变化, 以甘露糖为主, 约占多糖总量的 50% 以上。



A. 单糖混合标准品; B. 南方菟丝子粗多糖;
C. 南方菟丝子精制多糖

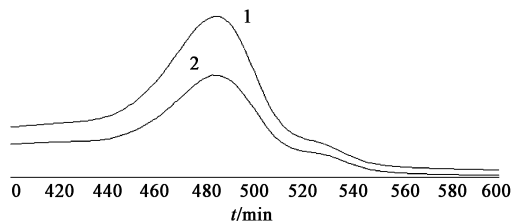
1. PMP; 2. 甘露糖; 3. 半乳糖醛酸; 4. 葡萄糖; 5. 半乳糖;
6. 木糖; 7. 阿拉伯糖; 8. 鼠李糖; 9. 葡萄糖醛酸

图 2 南方菟丝子粗多糖和精制多糖 PMP 衍生物 HPLC

2.3 供试品溶液的制备 精密称取生品南方菟丝子(过 40 目) 1 g, 加入 80% 乙醇 50 mL 回流提取 3 h, 滤渣挥尽乙醇后, 用 60 mL 水回流提取 3 次, 抽滤, 合并滤液并浓缩, 加 95% 乙醇使含醇量达 80%, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中醇沉过夜。过滤得到粗多糖, 将粗多糖溶于热水, 定容至 500 mL, 继续吸取 10 mL 定容

至 50 mL, 作为供试品溶液。

2.4 最大吸收波长的选择 按照 2.3 项下方法制备 1 份供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL, 置于 20 mL 试管中, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 浓硫酸 6.0 mL, 混匀后室温下放置 5 min, 沸水加热 15 min, 冷至室温, 以蒸馏水替代供试品溶液配制空白, 以甘露糖溶液替代供试品溶液如上法配制对照品溶液, 在 $400 \sim 600 \text{ nm}$ 扫描, 确定最大吸收波长。对照品和供试品最大吸收波长都在 483 nm , $400 \sim 600 \text{ nm}$ 全波长扫描见图 3。



1. 甘露糖对照品; 2. 南方菟丝子多糖样品

图 3 菟丝子多糖样品和甘露糖标准品全波长扫描

2.5 标准曲线的绘制 精密称取 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重的甘露糖对照品 9.84 mg , 蒸馏水溶解后, 定容至 50 mL。精确量取此溶液 1.0, 2.0, 4.0, 7.0, 12.0, 20.0 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 配成系列标准溶液。以蒸馏水作空白, 分别加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 浓硫酸 6 mL, 摇匀, 放置 5 min, 沸水加热 15 min, 冷至室温, 于 483 nm 处测定吸光度。经计算得回归方程 $Y = 11.328X - 0.0312$ ($r = 0.9996$), 甘露糖在 $0.003936 \sim 0.07872 \text{ mg}$ 线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密量取 $0.0034 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露糖对照溶液 1 mL, 按 2.4 项下方法显色并测定其吸光度, 平行测定 6 份, 结果 RSD 0.82%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 按 2.3 项下方法制备 1 份供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL, 置具塞试管中, 照 2.4 项下方法显色并测定吸光度, 每隔 1 h 测定 1 次, 连续 6 h, 测得吸光度的 RSD 为 0.95%, 表明供试品溶液在 6 h 内显色稳定。

2.8 重复性试验 按照 2.3 项下方法同时制备 6 份供试品溶液。精密量取各供试品溶液 1 mL, 分别置于具塞试管中, 照 2.4 项下方法显色并测定吸光度, 结果 RSD 为 3.37%, 表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取 6 份生品菟丝子各 0.5 g, 分别加入精制多糖约 44 mg, 照 2.3 项下方法制备供试品溶液和 2.4 项下方法显色并测定吸光

度,计算回收率,结果平均加样回收率为 99.4%, RSD 为 3.02% ($n=6$)。

表 1 菟丝子多糖加样回收率

取样量 /mg	样品中 含量/mg	精制多糖 加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
500.6	44.10	44.05	86.00	97.56	99.4	3.02
500.2	44.07	44.03	85.08	96.57		
500.3	44.08	44.02	90.61	102.85		
500.2	44.07	44.02	88.76	100.76		
500.3	44.08	44.03	90.30	102.49		
500.5	44.09	44.05	84.77	96.17		

2.10 换算因子的测定 精密称取南方菟丝子精制多糖 5 mg,定容到 100 mL,摇匀。精密量取 1 mL 于具塞试管中,按照 2.4 项下方法显色并测定吸光度,根据回归方程计算多糖溶液中甘露糖的浓度,按 $f=W/(C \times D)$ 计算换算因子,其中 W 为多糖质量 (mg), C 为多糖中甘露糖浓度 ($g \cdot L^{-1}$), D 为稀释倍数。测得换算因子 $f=1.07$ ($n=6$)。

2.11 南方菟丝子及炮制品多糖含量的测定 精密称取菟丝子、清炒菟丝子、酒炙菟丝子、盐炙菟丝子粉末均 1 g,按照 2.3 项下条件提取和 2.4 项下条件显色,测定吸光度,由回归方程计算供试品溶液中甘露糖浓度,按含量 $= (C \times D \times f/W) \times 100\%$ 计算供试品中多糖的含量。式中: C 为供试品溶液中甘露糖的浓度, D 为稀释倍数, f 为换算因子, W 为供试品干重质量。结果见表 1。

表 2 不同炮制品多糖含量 ($n=3$) %

样品	多糖含量	RSD/%
生菟丝子	6.71	0.59
清炒菟丝子	8.27	2.47
酒炙菟丝子	8.54	1.40
盐炙菟丝子	14.17	0.35

3 讨论

本研究采用多糖 PMP 柱前衍生化、HPLC 检测的方法检测了南方菟丝子粗多糖和精制多糖中单糖的组成,主要成分为甘露糖,另含有葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸、木糖、阿拉伯糖等。以往多糖含量测定多以葡萄糖为对照品,而在同样的显色条件下,甘露糖与等量葡萄糖的吸光度比约为 1.17:1,南方菟丝子多糖中单糖组成又以甘露糖为主,粗多糖中甘露糖含量为葡萄糖含量的 3.5 倍,因此用甘露糖为对照品来计算菟丝子多糖含量结果更加准确、可靠。

本研究制备南方菟丝子精制多糖,测定了精制多糖的¹³C-NMR 谱,在保证基本不含其他杂质的基础上,比较了精制前后单糖的组成变化。结果表明菟丝子多糖在精制前后单糖组成无明显变化。在测定多糖时,由于不同单糖与苯酚-硫酸试剂显色情况不同,吸光度也不同,单纯用甘露糖作标准曲线计算多糖含量仍存在较大误差。因此以精制多糖测得粗多糖对甘露糖的换算因子,以此校正多糖含量测定方法,对不同炮制品含量进行更为准确的测定。

中医认为菟丝子味甘性温,归肝肾经,生用以养肝明目力胜,多用于肝虚目暗;炒菟丝子功用与生品相似,但可提高煎出效果;酒炙后活血,温肾壮阳固精作用增强;盐炙菟丝子不温不寒,平补阴阳,引药入肾,增强补肾固精安胎作用。实验结果表明,南方菟丝子经炮制后,多糖含量明显增加,以盐炙菟丝子含量最高,酒炙菟丝子和炒菟丝子次之。菟丝子经过炮制后,均利于粉碎,均可提高煎出效果,提高补益作用。但盐炙后多糖含量变化明显,为生品 2.1 倍,菟丝子盐炙后药性的变化和补肾固精安胎作用的增强,是否与多糖的变化具有直接关系,有待结合药效等进行深入研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005;215.
- [2] 郭澄,张芝玉,郑汉臣,等.中药菟丝子的本草考证和原植物调查[J].中国中药杂志,1990,15(3):10.
- [3] 叶敏,阎玉凝,杨雁芳.1997~1999年菟丝子商品药材调查[J].时珍国医国药,2001,12(3):235.
- [4] 中国药典.一部[S].2010;290.
- [5] 李更生,陈雅妍,李顺成.南方菟丝子水溶性成分免疫活性的研究[J].中国中医药科技,1997,4(4):256.
- [6] 田春雨,薄海新.不同产地菟丝子抗衰老作用的比较[J].辽宁中医药大学学报,2009,4(11):206.
- [7] 马鸿雁,刘小彬,李楠,等.附子粗多糖提取工艺的优化[J].时珍国医国药,2005,16(1):22.
- [8] 赵祥升,王惠,许源,等.江油附子多糖含量的测定[J].安徽农业科学,2009,37(2):650.
- [9] 王文平,郭汜远,李琳,等.考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J].食品研究与开发,2008,29(1):115.
- [10] 孙磊,乔善义,赵毅民,等.黑古藤多糖含量测定方法研究[J].中国中药杂志,2009,34(10):1241.
- [11] 戴军,朱松,汤坚. PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J].分析测试学报,2007,26(2):206.

[责任编辑 蔡仲德]