

不同产地生制狗脊中多糖的比较分析

鞠成国^{1,2}, 章琦¹, 于海涛¹, 高倩¹, 史俊¹, 贾天柱^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;

2. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:建立狗脊中多糖的含量测定方法,比较不同产地生制狗脊多糖的含量。方法:采用苯酚-硫酸法测定狗脊中多糖的含量,利用单糖和多糖的换算因子计算多糖含量,测定波长为 489 nm。结果:在 2.46 ~ 14.79 mg·L⁻¹葡萄糖浓度 C 与吸光度 A 线性关系良好($r=0.9995$),平均回收率为 98.7%,RSD 1.48%。不同产地的生狗脊多糖含量在 2.48% ~ 10.06%,制狗脊多糖含量在 5.56% ~ 15.17%。结论:该法简单、方便、准确、可靠,可以用来测定狗脊中多糖含量。不同产地狗脊中多糖的含量差异较大,其中福建产狗脊中多糖含量最高,狗脊经炮制后多糖的含量升高。

[关键词] 狗脊;炮制;多糖;含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0046-03

Determination of Polysaccharides in Cibotium Barometz and Its Processed Product from Various Cultivation Locations

JU Cheng-guo^{1,2}, ZHANG Qi¹, YU Hai-tao¹, GAO Qian¹, SHI Jun¹, JIA Tian-zhu^{1,2*}

(1. School of Pharmacy Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China;

2. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining polysaccharides in Cibotium barometz, then compare different place of production the content of polysaccharides in Cibotium barometz and its processed product. **Method:** The content of the polysaccharides in Cibotium barometz was determined by phenol-sulfuric acid method, and calculated using a conversion factor, and the determination of the wavelength was 489 nm. **Result:** The glucose concentration value C and absorbance A were linear in the range of 2.46-14.79 mg·L⁻¹ ($r=0.9995$), The average recovery was 98.7%, RSD 1.48%. The content of polysaccharides in Cibotium barometz from various cultivation locations varied from 2.48%-10.06%, and 5.56%-15.17% in its processed product. **Conclusion:** The method is simple, effective and feasible. It can be used for the determination of the content of polysaccharides in Cibotium barometz. The content of polysaccharides in Cibotium barometz which were collected at Fujian City was the highest. There is great difference in polysaccharides content in Cibotium barometz from various cultivation locations, and the content of polysaccharides was increased after processed.

[Key words] Cibotium barometz; processing; polysaccharides; content determination

狗脊为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz*(L.)J. Sm. 的干燥根茎。具有补肝肾、强腰

膝、祛风湿、止痛的功能^[1]。主治风湿痹痛,腰膝酸软,下肢无力,尿频,遗尿,白带过多,外敷金疮止血。

[收稿日期] 20110727(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973938)

[第一作者] 鞠成国,博士在读,讲师,从事中药炮制工艺与原理研究

[通讯作者] * 贾天柱,教授,博士生导师,从事中药炮制原理研究,E-mail:jiatz@lnutcm.edu.cn

主产于福建、四川、云南、广西等地。多糖为狗脊中重要的活性成分,关于狗脊中多糖的研究较少,只有许重远等^[2]对狗脊中的多糖进行了研究,认为不同产地狗脊中多糖的含量相差较大,但是未比较同一批狗脊药材炮制前后多糖的含量。本实验采用苯酚-浓硫酸法对不同产地狗脊生品及炮制品中的多糖进行含量测定,并比较炮制前后多糖含量变化,为进一步研究狗脊的作用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 METTLER AE240 型 1/10 万分析天平(瑞士 METTLER),FA1004B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),101 型电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器厂),HH-4 型恒温水浴锅(国华电器有限公司),RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),日本日立 U-3010 紫外分光光度计,SHZ-DⅢ 循环水式真空泵(上海予华仪器有限公司)。

1.2 药材 所有狗脊药材经鉴定为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *C. barometz* 的干燥根茎。狗脊制品为取净狗脊片置河砂中 180~190 °C 烫制 6 min,取出,筛去河砂。将生制狗脊饮片粉碎,过 60 目筛,备用。

1.3 试剂 D-无水葡萄糖对照品,由中国药品生物制品检定所提供(批号 110833-200503)。苯酚,浓硫酸、乙醇、丙酮、乙醚均为分析纯,水为纯净水。

2 方法

2.1 多糖的提取与精制^[2] 称取狗脊粉末 40 g,加 10 倍量 80% 乙醇水浴中回流 3 次,每次 2 h,抽滤。药渣置通风处晾干,加入 10 倍量水,加热回流 3 次,每次 2 h,抽滤,合并滤液,减压浓缩至 60 mL,取出,Servage 法除蛋白(氯仿-正丁醇,4:1),用 95% 乙醇调至醇浓度达到 80%,4 °C 静置过夜,抽滤,沉淀分别以无水乙醇,丙酮,乙醚洗涤,抽滤,60 °C 烘干至恒重,得精制狗脊多糖。

2.2 对照品溶液的配制 取 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖约 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加适量水溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得 0.101 0 g·L⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取狗脊生品及炮制品粉末各 0.1 g,精密称定,置于烧瓶中,加入 80 mL 80% 乙醇,加热回流 1 h,抽滤,用少量热 80% 乙醇洗涤 2 次。滤渣在常温下挥干,将滤渣连同滤纸置烧瓶中,加蒸馏水 80 mL,加热回流 1 h,趁热滤过,用少量热

水洗涤滤器,合并滤液与洗液,放冷,移入 100 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 精制狗脊多糖溶液的配制 精密称取 105 °C 干燥至恒重的狗脊粗多糖 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 0.103 1 g·L⁻¹ 的狗脊粗多糖溶液。

2.5 苯酚试液的配制^[3-4] 取苯酚 100 g,加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g,蒸馏,收集 182 °C 馏分。称取该馏分 5 g,置 100 mL 量瓶中加蒸馏水稀释至刻度,摇匀后,滤过至棕色试剂瓶中,得 5% 苯酚液,置冰箱中储存备用。

2.6 最大吸收波长的选择 分别取上述对照品溶液、供试品溶液和精制狗脊多糖溶液各 2 mL,置具塞刻度试管中,各加入 5% 苯酚溶液 1.2 mL,混匀,再加入浓硫酸 5 mL,充分摇匀,另取 2.0 mL 的蒸馏水同上操作制得空白溶液。置 100 °C 水浴中反应 5 min,迅速冷却至室温,于 200~800 nm 全波长扫描,均在 489 nm 处有最大吸收,故选择 489 nm 为测定波长。

2.7 标准曲线的制备 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL 分别置于具塞刻度试管中,加水至 2 mL,各加入 5% 苯酚溶液 1.2 mL,混匀,再加入浓硫酸 5 mL,充分摇匀,另取 2.0 mL 的蒸馏水同上操作制得空白溶液。放置 5 min,置沸水浴中反应 5 min,迅速冷却至室温,在 489 nm 波长处测定吸收度值,以葡萄糖浓度 C 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $A = 9.6605C + 0.0283$ ($r = 0.9995$),表明样品在 2.46~14.79 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.8 换算因子的测定 取 2.4 项下所制得的狗脊多糖溶液 2.0 mL,按 2.6 项下依法测定吸光度,由回归方程求出此狗脊多糖溶液中葡萄糖的浓度,并计算其中葡萄糖的含量。按下式计算换算因子^[5] f ,换算因子平均值为 1.356, RSD 为 0.39%。 $f = W / (C \times D)$,式中 W 为狗脊粗多糖的质量(mg), C 为狗脊粗多糖溶液中葡萄糖浓度(g·L⁻¹), D 为狗脊多糖的稀释因数。

2.9 精密度试验 取同一供试品溶液 2.0 mL,照 2.6 项下方法,连续测定 5 次, RSD 为 0.15% ($n = 5$),结果表明精密度良好。

2.10 重复性试验 取同一批次粉碎后的狗脊 5 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,分别按 2.6 项下依

法测定,结果多糖的平均含量为 3.50%,RSD 为 1.19% (n=5),结果表明重复性良好。

2.11 稳定性试验 取供试品溶液,按 2.6 项下操作,每隔 15 min 测定 1 次,连续测定 2 h,RSD 为 0.65%,结果表明供试品溶液 2 h 内显色稳定。

2.12 加样回收率试验 精密称取生狗脊约 0.1 g,

共 6 份,按照 2.3 项下方法除单糖。再称取葡萄糖标准品适量,置于 100 mL 容量瓶中,配成 0.265 g·L⁻¹ 的溶液。分别取该标准溶液 10 mL,置于圆底烧瓶中,加入已除单糖的生狗脊,加蒸馏水 70 mL,回流提取 1 h,其他操作同 2.3。按 2.6 项下依法测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 狗脊中多糖加样回收率试验

No.	取样量/g	样品含量/mg	对照品量/mg	实测总量/mg	回收率/%	/%	RSD/%
1	0.103 4	2.71	2.65	5.33	98.9		
2	0.104 8	2.75	2.65	5.32	97.0		
3	0.100 1	2.62	2.65	5.30	101.1		
4	0.101 1	2.65	2.65	5.26	98.5	98.7	1.48
5	0.105 5	2.76	2.65	5.39	99.2		
6	0.105 2	2.76	2.65	5.34	97.4		

2.13 含量测定 取不同产地狗脊生品及炮制品,按 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.6 项下依法测定吸光度,从回归方程中求出供试品中葡萄糖的浓度,按下式及计算出多糖含量。

多糖含量(%) = (C × D × f / W) × 100%。C 为供试品溶液中葡萄糖的浓度(mg·mL⁻¹),D 为样品溶液的稀释倍数,f 为换算因子,W 为样品质量(mg)。见表 2。

表 2 不同产地生制狗脊中多糖的含量(n=5) %

样品	含量	RSD
云南生品	4.14	1.78
云南制品	6.53	1.53
福建生品	10.06	1.02
福建制品	15.17	0.99
广西生品	2.48	0.81
广西制品	11.16	0.43
四川生品	3.55	1.21
四川制品	8.06	0.33
康美生品	3.08	1.33
康美制品	5.56	0.66

3 讨论与结论

多糖是中药中普遍存在的一类化学成分,具有抗病毒、抗辐射、抗肿瘤、延缓衰老以及提高免疫功能等多方面的药理作用^[6]。对多糖的含量测定多采用苯酚-浓硫酸法。在实验过程中对苯酚-浓硫酸法的最佳显色条件进行了考察,结果表明最佳显色条件为:加入 5% 苯酚液 1.2 mL,浓硫酸 5 mL,置沸水

浴中加热 5 min。比较了回流、超声 2 种提取方法对狗脊中多糖提取效率的影响,结果表明回流提取狗脊多糖效率高。

从实验结果中可以看出,不同产地狗脊中多糖的含量差异较大,其中以福建产狗脊多糖含量最高。狗脊经砂烫炮制后多糖含量均有比较显著的升高,狗脊生品以祛风湿、利关节为主,砂烫炮制后以补肝肾、强筋骨为主,前期研究发现,狗脊炮制后抗骨质疏松作用增强可能与其大极性成分的变化有关系,炮制后多糖含量的增加与其抗骨质疏松作用增强可能存在着一定的相关性,有必要进行进一步研究。

[参考文献]

[1] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008:114.

[2] 许重远,陈振德,晏媛,等. 中药狗脊多糖的含量测定及高效毛细管电泳指纹图谱分析[J]. 中药材,2004,27(1):22.

[3] 赵佳丽,张怀,孙建中,等. 黄瓜子生品及炮制品多糖的含量比较分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):53.

[4] 靳风云,田源红,杨文洵. 炮制对当归中糖含量的影响[J]. 中国中药杂志,2000,25(8):474.

[5] 张慧芳,蔡宝昌,张志杰,等. 百合不同炮制品中多糖的测定[J]. 中草药,2006,37(11):1675.

[6] 王晨明. 植物多糖的药理作用[J]. 中国药业,2002,11(11):73.

[责任编辑 蔡仲德]