

大蓟生品及炭品中多糖不同提取方法的比较

龚千锋, 余香*, 钟凌云, 王晓巍, 易炳学, 陈泣, 李慧莲, 杨巧玲, 朱龙涛, 任建锋
(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:通过对几种不同的提取多糖方法的比较研究,寻找提取大蓟生品及炭品多糖效果较好的方法。方法:分别采用水提醇沉法、醇提除杂法、超声辅助法、碱提取法对中药大蓟生品及炭品进行提取,用苯酚-硫酸比色法测定多糖含量。结果:生品多糖4种方法测定的结果分别为1.587%,1.908%,2.283%,0.112%;炭品多糖测定的结果分别为2.142%,0.425%,2.302%,2.343%。结论:大蓟生品的多糖提取方法是超声辅助法提取的多糖含量较高,差异显著。大蓟炭的多糖提取方法是醇提除杂法提取的多糖含量较高,差异显著。

[关键词] 大蓟生品及炭品;多糖;提取方法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0094-04

Comparison of Extraction Methods of Polysaccharides from Raw and Processing *Cirsium japonicum*

GONG Qian-feng, YU Xiang*, ZHONG Ling-yun, WANG Xiao-wei, YI Bing-xue,
CHEN Qi, LI Hui-lian, YANG Qiao-ling, ZHU Long-tao, REN Jian-feng
(Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** Different extraction methods of polysaccharides were compared in order to optimize a better method to extract polysaccharides from the raw and processing *Cirsium japonicum*. **Method:** Four methods were used to extract the raw and processing *C. japonicum*. The four methods were as follows: ① water extraction followed by alcohol precipitation; ② removing impurity by ethanol extraction; ③ ultrasonic auxiliary extraction; ④ extraction with alkali solution. Polysaccharides were detected by phenol sulfuric acid colorimetry. **Result:** The polysaccharide content extracted by above four different methods in the raw *C. japonicum* was 1.587%, 1.908%, 2.283% and 0.112%, and in the processing *C. japonicum* was 2.142%, 0.425%, 2.302% and 2.343%, respectively. **Conclusion:** The optimum method for the raw *C. japonicum* is ultrasonic auxiliary method which had significant difference while the best method for the processing of *C. japonicum* is removing impurity by ethanol extraction method.

[Key words] raw and processing *Cirsium japonicum*; polysaccharide; extraction method

大蓟是菊科植物蓟 *Cirsium japonicum* DC. 的干燥地上部分,具有凉血止血、散瘀消肿之功效^[1]。大蓟

的化学成分复杂,具有广泛的药理作用和临床应用。现代化学和药理研究已部分阐明了其化学成分和临床应用之间的联系^[2-3],但是还有很多活性成分如抗菌、降压等成分未被找到,很多药理研究也仅停留在提取物阶段^[4-8],因此对其化学成分和药理作用进行深入研究。多糖作为大蓟中的一类有效成分,其作用正在被发觉和应用,迄今所知的是药理作用有抑菌和清除自由基的作用,从而对集体抵抗衰老有重要影响^[9]。而现代对于从大蓟中提取出来的多糖的研究

[收稿日期] 20110512(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060343)

[第一作者] 龚千锋,教授,博士研究生导师,从事中药炮制研究, Tel: 0791-7118852, E-mail: gongqf2002@163.com

[通讯作者] *余香, Tel: 15879059804, E-mail: 353975814@qq.com

文章并不多。本实验尝试应用不同的提取方法,从大蓟生品及炭品中提取出多糖,优选大蓟多糖的最佳提取方案,为大蓟多糖的进一步研究打下基础。

1 材料

1.1 药材 大蓟药材均购自湖南怀化,经本院中药鉴定教研室邓可众副教授鉴定为大蓟 *C. japonicum*。取原药材,除去杂质,抢水洗,润软后,切段,干燥,筛去碎屑。取大蓟段,置炒制容器内,用武火炒至表面焦黑色,内部棕褐色,喷洒少许清水,灭尽火星,取出晾凉^[1]。

1.2 仪器 3100PC 型紫外-可见分光光度计,FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),HY-4 型振荡机(国华电器有限公司),KQ3200 型超声波清洗器(昆山超声仪器厂),Sartorius BS214-D 型天平(1/万),HH-2 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),2NHW 型电热套,药典筛(浙江上虞道墟张兴纱筛厂)。

1.3 试剂 98% 浓硫酸(分析纯)、4% 苯酚(重蒸,分析纯)、纯化水、葡萄糖对照品(江西省药品检验所,批号 0833-9501)、氯仿(分析纯,南昌鑫光精细化工厂)、无水乙醇(分析纯,天津恒兴化学试剂制造有限公司)、正丁醇(分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司)、娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 苯酚溶液的制备 精密称取苯酚 4.000 2 g,加纯化水溶解,移至 100 mL 量瓶中,用纯化水定容至刻度,摇匀,超声即得 4% 苯酚溶液。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖 10.00 mg,置于 10 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1.00 g·L⁻¹ 的葡萄糖溶液。再从其中精密量取 2 mL 溶液加双蒸馏水定容于 10 mL 的量瓶中,即得 0.20 g·L⁻¹ 对照品储备溶液。

2.3 标准曲线的绘制 精密吸取上述对照品储备溶液 0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL,分别置于 25 mL 的具塞试管中,体积不足 2.0 mL 者用纯化水补足至 2.0 mL,分别精密加入 4% 的苯酚溶液 1 mL,浓硫酸 7 mL,摇匀,放置于沸水中加热保温 30 min,取出后放冷,以纯化水为空白,于 490 nm 波长处测定吸光度(A)^[10]。以吸光度为纵坐标,葡萄糖对照品的质量为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程 $A = 0.487C + 0.0426$ ($r = 0.9945$),结果表明葡萄糖在

0.04 ~ 0.12 mg 线性关系良好。

2.4 供试品溶液的制备

2.4.1 水提醇沉法 大蓟生品及炭品用中药粉碎机粉碎成粉末,过三号筛,备用。精密称取生品及炭品各 10 g 各 3 份放入烧杯中,加纯化水 200 mL 煮沸,煎煮 2 h,煎煮 2 次,合并滤液,滤液浓缩至 60 mL,用 20 mL 乙醚脱脂 3 次,再用 sevag 法(氯仿-正丁醇 5:1,样品-试剂 2:1)脱蛋白,即振荡约 8 min,3 500 r·min⁻¹ 离心 20 min。脱蛋白 4 次。取上清液,加入 300 mL 无水乙醇,静置 1 夜,使其沉淀,收集沉淀,加纯化水溶解沉淀,移入 100 mL 量瓶中,用纯化水定容至刻度,摇匀,即得^[11]。

2.4.2 醇提除杂法 精密称取大蓟生品及炭品各 10 g 各 3 份于 500 mL 圆底烧杯中,加入 200 mL 95% 乙醇回流 1 h,趁热过滤,残渣用 95% 乙醇 20 mL 洗涤 3 次,将残渣同滤纸一同置于圆底烧杯中,加纯化水 150 mL,水浴加热提取 30 min,趁热过滤,残渣用 20 mL 纯化水洗涤 3 次,洗液合并后,浓缩至 60 mL,用 20 mL 乙醚脱脂 3 次,再用 sevag 法(氯仿-正丁醇 5:1,样品-试剂 2:1)脱蛋白,即振荡约 8 min,3 500 r·min⁻¹ 离心 20 min。脱蛋白 4 次。取上清液,移入 100 mL 量瓶中,用蒸纯化水定容至刻度,摇匀,即得。

2.4.3 超声辅助法 精密称取大蓟生品及炭品各 10 g 各 3 份,加入 200 mL 纯化水超声 30 min 后,回流 4 h,趁热过滤,浓缩至 60 mL,用 20 mL 乙醚脱脂 3 次后,用 sevag 法(氯仿-正丁醇 5:1,样品-试剂 2:1)脱蛋白,即振荡约 8 min,3 500 r·min⁻¹ 离心 20 min,脱蛋白 4 次。取上清液,加入 300 mL 无水乙醇,静置 1 夜,使其沉淀,收集沉淀,用纯化水溶解沉淀,移入 100 mL 量瓶中,用纯化水定容至刻度,摇匀,即得^[10]。

2.4.4 碱提取法 精密称取大蓟生品及炭品各 10 g 各 3 份,加入 200 mL,0.5 mol·L⁻¹ NaOH,静置 1 夜,过滤,滤液中加入 36% 乙酸中和得胶状沉淀,挥干溶剂,得浸膏沉淀,沉淀用纯化水溶解,转移至 100 mL 量瓶中,用纯化水定容至刻度,摇匀,即得。

2.5 精密密度试验 精密吸取上述对照品储备溶液 0.4 mL,共 6 份,分别置于 25 mL 的具塞试管中,体积不足 2.0 mL 者用蒸馏水补足 2.0 mL,分别精密加入 4% 的苯酚溶液 1 mL,浓硫酸 7 mL,摇匀,放置于沸水中加热 30 min,取出后放冷,取出,以纯化水

为空白,于 490 nm 波长处测定 A。计算 RSD 0.40%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取大蓟生品的供试品 5 份,每份约 10 g,按照供试品醇提除杂法制备方法制备供试液,按照标准曲线制作项下的相同条进行测定,计算 RSD 0.34%,表明该实验重复性良好。

2.7 稳定性试验 取 2.4.2 项下制备得到的大蓟生品 2 mL,按 2.3 项下的方法每隔 1 h 测定其 A,总共测 6 次。结果测得 RSD 0.40%,5 h 内 A 基本没有变化。

2.8 回收率试验 精密称取大蓟生品的供试品(葡萄糖质量分数 1.97%)5 份,每份 10.00 g,分别加入 10 mg 的葡萄糖对照溶液,按照供试品醇提去杂法的制备方法制备供试液,按照标准曲线制作项下的相同条件进行测定,平均回收率 99.5%,RSD 2.86%。

2.9 样品多糖含量测定 分别从上述 100 mL 的待测原溶液中取出 0.2 mL,置于 10 mL 量瓶中,加纯化水定容至刻度,摇匀,再从中取出 2.0 mL,置于 25 mL 具塞试管中,以下同 2.3 项“分别加入 4% 的苯酚 1 mL”起,同法操作即得。在 490 nm 下测定其 A,按回归方程计算出样品溶液中的多糖含量,根据稀释倍数及样品质量换算出样品中多糖的含量。结果见表 1。

3 讨论与小结

水提醇沉法为常用的大蓟多糖提取方法,所用设备简单,试剂便宜无害,操作方法简单易行,且得到的多糖含量也较高,但往往提取物中所含杂质成分多,给多糖测定带来影响;醇提除杂法选用乙醇提取以除去单糖、低聚糖、苷类以及生物碱等干扰成分,然后用蒸馏水提取其中所含的多糖成分,提取成分相对较纯,且提取量大,有利于多糖的含量测定。超声辅助法对大蓟多糖的提取方法与醇提去杂法相比无任何的污染,工艺过程简单,且提取量与醇提除杂法相差很小,与传统的水提醇沉法相比,提取量显著高于水提醇沉法,故是一种较理想的提取大蓟中多糖的途径。碱提取法提取得到的多糖的量是最低的,原因是用此法提取得到的多糖一般只是碱性、或者部分中性的多糖,而酸溶性的、以及部分中性多糖则无法通过此法被提取出来,同时,在过程中,用酸中和时,由于溶液颜色的干扰,很难准确判断胶状沉淀,这个也是造成提取量少的重要原因。

表 1 大蓟生品及炭品含量测定(n=3)

炮制方法	提取方法	A	含糖量 /%	平均值 /%	RSD /%
生品	水提醇沉	0.336	1.506	1.587	4.47
		0.357	1.614		
		0.362	1.640		
		0.415	1.912		
		0.412	1.896		
		0.416	1.917		
	醇提除杂	0.492	2.307	1.908	0.57
		0.487	2.281		
		0.483	2.261		
		0.064	0.109 9		
		0.066	0.120 1		
		0.063	0.104 7		
炭品	水提醇沉	0.452	2.102	2.142	2.89
		0.472	2.112		
		0.474	2.214		
		0.502	2.358		
		0.498	2.337		
		0.497	2.333		
	醇提除杂	0.494	2.317	2.343	0.57
		0.490	2.297		
		0.489	2.292		
		0.126	0.428 1		
		0.122	0.407 6		
		0.128	0.438 4		
碱提取	0.425	2.302	2.302	1.57	
	0.489	2.292			
	0.126	0.428 1			
	0.122	0.407 6			
	0.128	0.438 4			
	0.425	2.302			

前人已做了部分大蓟多糖的研究^[12-13],但未对提取方法进行优选并对大蓟炭品和生品的比较进行研究。本实验表明大蓟生品多糖最佳提取方法是超声辅助法,原因可能是超声破坏了植物细胞壁,是多糖易于被提取出来。炭品多糖最佳提取方法是醇提除杂法,原因可能是醇提除去了较多的杂质,有利于多糖的测定,使得吸光度较高。且超声提取出的生品多糖和炭品多糖的量与醇提除杂法提取出的炭品多糖的量相近,而炭品中碱性多糖比生品多出 4 倍,说明炒炭破坏了大蓟的组织结构让细胞中的多糖特别是碱性多糖容易被提取出来,这可能为大蓟炒炭增效的一个重要原因。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:23.
 [2] 陈海芳,陈凯云,杨武亮,等.大蓟的止血活性药效初步研究[J].中华中医药学刊,2010,28(7):1458.
 [3] 钟凌云,郑晗,龚千锋,等.大蓟炭止血药效物质初步研究[J].中华中医药杂志,2011,26(1):147.
 [4] 黄晓敏,柯野,郑秋桦,等.铜绿假单胞菌生物膜对大蓟乙醇提取物的抗力研究[J].中国消毒学杂志,2010,27(2):142.
 [5] 李相伍,许东元,金政,等.大蓟水提取物对正常大鼠

江西青霉甲醇提取物中的化学成分

陈超¹, 潘卫东^{1*}, 肖建辉^{2*}, 梁光义¹

(1. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002;

2. 遵义医学院附属医院 贵州省细胞工程重点实验室, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 目的:研究江西青霉 *Penicillium jiangxiense* 发酵菌丝体甲醇提取物的化学成分。方法:应用正相硅胶, Sephadex-20, ODS 等色谱技术及重结晶等方法分离纯化, 通过理化性质和波谱学方法鉴别了化合物的结构。结果:从江西青霉甲醇提取物中分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为:尿嘧啶核苷(1), 麦角甾醇(2), 十八烷酸 α -单甘油酯(3), 2'-脱氧腺苷(4), 胸腺嘧啶脱氧核苷(5), *D*-甘露醇(6), 棕榈酸(7), 20-hydroxydammar-24-en-3-one(8), 7,22-二烯-3,5,6-三羟基-麦角甾醇(9), 烟曲霉酸(10), β -单硬脂酸甘油酯(11), 木犀草素(12), 烟酸(13)。结论:化合物 4~13 为首次从该真菌中分离得到。

[关键词] 江西青霉; 化学成分; 分离纯化; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0097-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110920.1429.001 **[网络出版时间]** 2011-09-20 14:29

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1429.001.html>

Investigations on Chemical Constituents of Methanolic Extract from *Penicillium jiangxiense*

CHEN Chao¹, PAN Wei-dong^{1*}, XIAO Jian-hui^{2*}, LIANG Guang-yi¹

(1. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Affiliated Hospital of Zunyi Medicinal College, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of *Penicillium jiangxiense*. **Method:** Isolation

[收稿日期] 20110621(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(20762017);贵州省优秀青年科技人才培养支持计划(黔科人字[2007]10号);贵州省科学技术基金(黔科合J字[2007]2149号)

[第一作者] 陈超, 硕士, 从事天然产物化学研究, Tel:15185142669, E-mail: chencao1217@163.com

[通讯作者] *潘卫东, 副研究员, 从事天然产物化学研究, Tel:0851-3805348, E-mail: wdpan@163.com; *肖建辉, 副教授, 从事微生物制药研究, Tel: 0851-3805348, E-mail: jhxiao@yahoo.cn

离体胸主动脉环的舒张作用及其机制[J]. 四川中医, 2009, 27(9):21.

[6] 刘素君, 郭红, 潘明, 等. 大蓟总黄酮诱导肿瘤细胞凋亡作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2):294.

[7] 史礼貌, 解成喜. 新疆大蓟总黄酮的超声提取及抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(6):120.

[8] 李煜, 王振飞, 李瑶, 等. 大蓟提取液对4种癌细胞生长抑制作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2):265.

[9] 植飞, 孔令义, 彭司勤. 中药大蓟的化学及药理研究进

展[J]. 中草药, 2001, 32(7):664.

[10] 余世春, 徐金龙, 汪海孙, 等. 苯酚-硫酸法测定小柴胡汤口服液多糖的含量[J]. 中成药, 1993, 15(3):12.

[11] 阿力塔. 李英健, 翁惠, 等. 蒙药阿木日-6多糖的提取与含量测定[J]. 光谱实验室, 2007, 24(5):803.

[12] 吴彦, 魏和平. 大蓟多糖提取分离及含量测定[J]. 光谱实验室, 2010, 27(1):98.

[13] 黄新炜. 中药大蓟中生物碱及多糖成分研究[D]. 咸阳:陕西师范大学, 2003.

[责任编辑 邹晓翠]