

紫萁贯众中多糖的含量测定

厉博文, 张东, 杨岚*, 傅梅红, 方婧
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立紫萁贯众中总多糖的含量测定方法, 比较不同产地和采收期紫萁贯众多糖含量。方法: 采用硫酸-苯酚法显色, 分光光度法在 490 nm 处测定。结果: 12 个不同产地紫萁贯众多糖含量为 1.22% ~1.85%, 同产地不同采收期紫萁贯众多糖含量为 0.91% ~1.37%。结论: 紫萁贯众多糖含量因产地和采收期变化而不同。

[关键词] 紫萁贯众; 总多糖; 硫酸-苯酚法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0041-03

Determination of Polysaccharides from Rhizoma of *Osmunda japonica*

LI Bo-wen, ZHANG Dong, YANG Lan*, FU Mei-hong, FANG Jing

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for determination of polysaccharide from Rhizoma of *Osmunda japonica* and the content of polysaccharide from Rhizoma of *O. japonica* in different locations and different harvest times was compared. **Method:** Sulfuric acid-phenol method was used and the sugar content was determined by the spectrophotometer at 490 nm. **Result:** The content of polysaccharide from Rhizoma of *O. japonica* in different locations was 1.22% -1.85% and in different harvest times was 0.91% -1.37%. **Conclusion:** The different locations and different harvest times would affect the content of polysaccharide from Rhizoma of *O. japonica*.

[Key words] *Osmunda japonica*; polysaccharide; sulfuric acid-phenol method

紫萁贯众为为紫萁科植物紫萁 *Osmunda japonica* Thunb. 的根茎及叶柄残基。具有清热解毒, 止血的功效。用于防治感冒、鼻衄头晕、痢疾、崩漏。为传统中药贯众的主要商品流通品种之一, 收载于 1977 年版和 2010 年版《中国药典》一部^[1]。据文献报道紫萁多糖具有抗菌消炎、促进损伤细胞修复等生物活性^[2-3]。本文建立了紫萁贯众中多糖的含量测定方法, 并测定了不同产地和采收期紫萁贯众多糖含量。为全面评价紫萁贯众药材质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器 UV-T6 型新世纪紫外-可见分光光度计(中国北京普析通用); 电子天平(Sartorius Bs-210 s 1/100 00); 离心机(北京雷勃尔离心机有限公司); 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药 葡萄糖对照品(批号 0833-9504, 购于中国药品生物制品检定所); 浓硫酸、苯酚、95% 乙醇、无水乙醇等试剂均为分析纯, 水为蒸馏水; 紫萁贯众药材均经中国中医科学院中药研究所冯雪峰副研究员鉴定为紫萁科植物紫萁 *O. japonica* T. 的干燥带叶柄残基的根茎。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 5% 苯酚液的制备 称取苯酚 100 g, 加铝条 0.1 g, 碳酸氢钠 0.2 g, 用套式电热器加热蒸馏, 收集 182 馏份, 称定 5 g, 置于棕色量瓶中, 加少量水溶解后, 加水定容至 100 mL, 充分混匀, 冷藏, 备用。

[收稿日期] 2009-12-27

[基金项目] 《中国药典》2010 版标准研究(YZ-241)

[第一作者] 厉博文, 硕士研究生, Tel: 010-64014347

[通讯作者] * 杨岚, 研究员, Tel: 010-64014347, Email: ylan_66@ yahoo. com. cn, 研究方向中药有效成分和质量标准研究

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取葡萄糖对照品 5 mg, 加水溶解并定容至 50 mL 容量瓶中, 得浓度为 0.101 1 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取 3 g 过二号筛的紫萁贯众干燥药材, 加入 95% 乙醇 50 mL, 浸泡 1 h, 回流提取 2 h, 抽滤, 滤渣用 95% 乙醇洗涤 3 次, 弃去滤液, 滤渣挥发至无醇味。加水 150 mL, 回流提取 2 h, 于 3 500 r·min⁻¹ 转速, 离心 10 min, 弃去沉淀, 将上清液适当浓缩, 加无水乙醇至醇浓度为 80%, 静置过夜, 离心。沉淀干燥后, 加水溶解定容于 100 mL 量瓶中, 精密移取 4 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 即得供试品溶液。

2.2 最大吸收波长的测定 精密吸取对照品和供试品溶液各 1 mL 于 10 mL 的具塞试管中, 分别精密加入 5% 苯酚溶液 2 mL, 浓硫酸 7 mL, 混匀, 于 100 °C 水浴加热 20 min, 于 800 ~400 nm 范围内扫描。测得显色后的对照品和供试品溶液最大吸收波长均为 490 nm。

2.3 标准曲线绘制 精密吸取浓度为 0.101 1 g·L⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mL, 分别置 10 mL 干燥具塞试管中, 加水至 1 mL, 另取水 1 mL 作为空白对照。分别加入 5% 苯酚溶液 2.0 mL, 混匀, 然后加浓硫酸 7.0 mL, 充分混匀, 置沸水浴中加热 20 min, 在 490 nm 处, 测定吸光度。绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=6.2890X+0.0065$ ($r=0.9993$), 结果表明葡萄糖在 20.22 ~ 80.88 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取江西九江供试品溶液 1 mL, 按照 2.3 项下方法显色, 于 490 nm 波长处连续测定吸光度 5 次。RSD 0.05%。结果表明, 此方法精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密吸取江西九江供试品溶液 1 mL, 按照 2.3 项下方法显色, 分别于显色后 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 min, 在 490 nm 波长处测定吸光度, 2 h 内吸光度值无明显变化, RSD 0.05%。结果表明, 供试品溶液显色后在 2 h 内稳定。

2.6 重复性试验 按照供试品溶液的制备方法制备 6 份江西九江供试品溶液, 分别按照 2.3 项下方法显色测定, 计算多糖含量。RSD 1.54%。结果表明, 此方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密吸取已知多糖含量的供试品溶液 6 份各 0.4 mL, 分别精密加入浓度为 0.101 1 g·L⁻¹ 对照品溶液 0.2 mL, 加蒸馏水至 1.0

mL, 按 2.3 项下方法显色并测定吸光度, 计算回收率。平均回收率为 95.69%, RSD 2.44%。

2.8 样品测定 取不同产地不同采收期的紫萁贯众药材, 按照 2.1.3 项下的方法制备供试品溶液, 精密吸取 1.0 mL 供试品溶液, 按 2.3 项下方法显色测定吸光度, 并计算总多糖质量分数。结果见表 1, 2。

表 1 不同产地紫萁贯众的多糖质量分数 (n=2) %

No.	产地	多糖质量分数
1	湖南	1.80
2	江西九江	1.31
3	湖北惠始	1.22
4	恩施鹤峰	1.51
5	湖北宜恩	1.85
6	浙江磐安	1.69
7	浙江江山	1.33
8	江西井冈山	1.66
9	恩施凤凰山	1.58
10	江西宜春	1.29
11	江西南昌	1.63
12	恩施巴东	1.40

表 2 不同采收期的湖北恩施产紫萁贯众的多糖质量分数 (n=2) %

No.	采收时间	多糖质量分数
1	2009-5	0.91
2	2009-6	1.30
3	2009-7	1.31
4	2009-8	0.97
5	2009-9	1.37
6	2009-10	1.24

3 讨论

苯酚-硫酸比色法是测定中药材中多糖含量的经典方法, 2010 年版《中国药典》中枸杞子的多糖测定即采用此方法^[4]。供试品溶液的制备方法是影响测定结果主要因素, 本文参考文献方法^[1,4], 比较了紫萁贯众药材经 95% 乙醇回流提取除杂后, 用水提取直接测定和水提取醇沉后再测定, 结果显示前法的含量约为后法的 5 ~6 倍, 说明经醇沉处理可除去大部分干扰测定的杂质, 且方法学考察显示此方法重复性较好, 另外还考察了不同提取次数、提取时间对多糖含量的影响, 据此确定了 2.1.3 项中供试品溶液的制备方法。

测定结果显示, 不同产地和不同采收期的药材

多糖含量存在差异,在 12 个不同产地药材中,湖北宜恩最高为 1.85%,湖北惠始最低为 1.22%;同产地不同采收期药材中,5 月份最低 0.91%,9 月份最高 1.37%。文献报道新鲜紫萁根茎粗多糖(总糖含量为 95.8%)得率为 2.8%^[5]。经比较,发现文献报道的鲜品紫萁贯众药材中多糖的含量明显高于本实验方法测定的干品,因此采收加工方法对药材多糖含量及药材质量的影响有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北

(上接第 40 页)

2.9 样品含量测定 在前述色谱条件下,对新疆紫草原植物根和不同培养条件的 3 批新疆紫草毛状根中乙酰紫草素进行定量测定,计算新疆紫草原植物根和毛状根中乙酰紫草素的含量,结果见表 2。

表 2 乙酰紫草素含量测定 %

No.	样品名	乙酰紫草素
1	毛状根 1	0.070
2	毛状根 2	0.139
3	毛状根 3	0.197
4	原植物根	1.084

3 讨论

曾分别用无水乙醇和石油醚提取新疆紫草毛状根中的紫草素,提取 2 次,合并提取液,滤液浓缩至干,残渣用甲醇溶解,并定量转移至 25 mL 量瓶中,以甲醇稀释至刻度。结果表明石油醚提取物中乙酰紫草素的提取率最高。

曾采用 M9 液体培养基悬浮培养的培养条件,根据含量测定的结果又进行了 2 次优化,结果发现,在第 2 次优化的培养条件下得到的毛状根中乙酰紫

草素的含量明显提高。

京:中国医药科技出版社,2010:321,232.

[2] 陶海南,刘辉,薛喜文,等.紫萁的多糖抗菌活性的初步研究[J].南昌大学学报(理科版),1996,20(4):306.

[3] 戴金凤,李磊,刘辉,等.紫萁的研究进展[J].中草药,1999,30(9):717.

[4] 丁玲,王东,张中林,等.不同商品地山药多糖含量的分析[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(4):187.

[5] 李磊,陶海南.紫萁多糖 POI 的分离纯化和基本性质研究[J].食品科学,1999,6(11):11.

[责任编辑 顾雪竹]

草素的含量明显提高。

本实验采用 RP-HPLC 法测定了新疆紫草毛状根中有效成分乙酰紫草素的含量,方法简单快速,重复性好,以期为新疆紫草毛状根建立科学合理的质量控制方法提供一定依据。

[参考文献]

[1] 张明远,刘蕾,卢春风,等.紫草大黄合剂对四氯化碳致小鼠急性肝损伤保护作用的观察[J].黑龙江医药科学,2003,26(1):4.

[2] 王文杰,白金叶,刘大培,等.紫草素抗炎及对白三烯 B4 生物合成的抑制作用[J].药学学报,1994,29(3):161.

[3] 吴寿金,赵泰,秦永祺.现代中草药成分化学[M].北京:中国医药科技出版社,2002:146.

[4] 高菊红.紫草的资源、化学、药理和临床研究情况[J].中草药,1986,17(7):30.

[5] 国家药典委员会.中国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:238.

[责任编辑 顾雪竹]