茵陈中多糖的含量测定

刘晓河,梁惠花,谭晓红*

(张家口医学院,河北 张家口 075000)

茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 为传统中药,具有清热燥湿、利胆退黄等作用,用于黄疸疾病的治疗,具有改善肝功能,提高 GOT、GPT 等水平的作用。茵陈中的有效成分一般认为是香豆素和茵陈色原酮,而这两类物质难溶于水。天津等地以茵陈代茶饮,可降低血清胆固醇和甘油三酯。我们在进行茵陈调血脂作用的研究时,首次从中提取出了水溶性多糖,并采用改良的苯酚-硫酸比色法测定多糖含量,获得满意结果。

1 仪器与药品

UV-752 分光光度计(上海第三分析仪器厂),GOA 型电热真空干燥箱(天津市东郊机械加工厂),RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

(+)葡萄糖(AR, 105℃干燥至恒重),茵陈购于张家口市药材公司,符合《中华人民共和国药典》2000 年版标准,于硅胶干燥器中干燥 2 d;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葡萄糖储备液的制备:精密称取葡萄糖对照品 100 mg,用蒸馏水溶解并定容至 100 mL。

2.2 苯酚液的配制:称取苯酚 100 g 于烧瓶中,加入 0.1 g 铝片和 0.05 g 碳酸氢钠,加热蒸馏,收集 182℃馏分 10 g,加蒸馏水 190 g,溶解,置棕色瓶中备用。

2.3 提取条件选择

2.3.1 反应温度选择:精密吸取葡萄糖储备液 1.0 mL 于 100 mL 容器瓶中,用水稀释至刻度,作为对照品溶液。分别吸取葡萄糖对照品液 1.0 mL 于两个具塞试管中,各加苯酚液 1.0 mL,并分别迅速滴加浓硫酸 5.0 mL。另取两份 1.0 mL 水同上操作,为空白液。一份于水浴中煮沸 15 min,另一份于 40℃水浴中恒温 30 min。取出,冷却至室温,15 min 后于 490 nm 处测其吸光度值,分别为 0.112 和 0.126。因此,本实验采用 40℃恒温 30 min 的方法。

2.3.2 苯酚及硫酸用量选择:吸取葡萄糖对照品液

1.0 mL 5 份,分别加入苯酚液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别加水至 2.0 mL,再各滴加浓硫酸 5.0 mL,40℃恒温 30 min 后,测其吸光度值,分别为 0.095, 0.112, 0.125, 0.127, 0.126,可见加入苯酚液 0.6 mL 以上时,反应都能完成;另取葡萄糖对照品液 0.6 mL 5 份,分别加苯酚液 1.0 mL,再分别滴加浓硫酸 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL,并均用水稀释至 8.0 mL,加入硫酸体积占总体积的 62.5% 以上时的结果较满意。

2.3.3 反应时间选择及稳定性:取对葡萄糖对照品溶液 1.0 mL 3 份,各加苯酚液 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,于 40℃分别恒温 20, 30, 40 min。测得吸光度值分别为 0.16, 0.125, 0.126,可见加热 30 min 即可使反应完全。另测反应完成后样品在不同时间内的吸光度值,结果 3 h 内稳定。

2.4 标准曲线制备:精密吸取葡萄糖贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 定容至 100 mL。分别取 1.0 mL,各加入苯酚液 1.0 mL,迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,另以 1.0 mL 水同上操作,作为空白液。于 40℃水浴中恒温 30 min,取出,冷却 15 min 后,于 490 nm 处测其吸光度值,计算得回归方程 $A = 0.01312C - 0.01534$, $r = 0.9995$ 。实验表明,葡萄糖为 5~40 μg 时与吸光度呈现良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取对照品溶液 1.0 mL, 10 份,同 2.4 项下操作,结果吸光度的 $RSD = 1.45\%$ 。

2.6 多糖的提取与精制

2.6.1 茵陈多糖的提取:称取干燥至恒重的茵陈 800 g,用 95% 乙醇温浸 30 min,两次,以除去色素和脂溶性杂质。药渣中加水 2 000 mL,微沸煎煮 1 h,过滤,滤渣再用 1 500 mL 水煎煮 1 h,过滤,合并提取液,浓缩至 200 mL,分成 4 份,每份 50 mL,加入乙醇,使醇含量分别达到 70%, 75%, 80%, 85%,静置过夜,抽滤,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,得灰白色粗多糖,于真空干燥器中干燥后称重。各定容至 1 000 mL,再稀释 100 倍,依法操作,并测

* 收稿日期: 2002-03-15

作者简介: 刘晓河(1964-),男,河北唐山人,副教授,1986年毕业于北京大学化学系,主研方向:中草药有效成分分析。

定含量。结果见表 1

表 1 不同醇沉浓度时茵陈多糖的得率和含量

Table 1 Yield and content of polysaccharide from *A. capillaris* with different concentration of alcohol precipitation

醇沉浓度 %	多糖得率 %	多糖含量 %	
		以粗多糖计	以生药计
70	0.620	4.96	0.478
75	0.725	5.36	0.516
80	0.840	6.55	0.630
85	0.830	6.43	0.619

2.6.2 多糖的精制: 将上述粗多糖溶于水, 用 Sev eg 法除去蛋白, 加 1% 活性炭脱色, 抽滤, 加入乙醇使醇浓度达 80%, 静置过夜, 抽滤, 残渣依次用无水乙醇、丙酮、乙醚多次洗涤, 真空干燥, 即得精制茵陈多糖

2.7 换算因子测定: 精密称取茵陈多糖 10 mg, 溶于 100 mL 容量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 0.1 mL, 加水至 1.0 mL, 按 2.4 项下操作。测其吸光度值, 根据标准曲线计算浓度, 再按下式计算换算因子, 得 $f = 1.485$ ($n = 6$)

$$f = W / CD$$

式中 W 为多糖质量 (mg), C 为多糖液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), D 为稀释因素。

2.8 样品液制备及测定: 准确称取干燥茵陈粉末 100 mg, 3 份, 分别置于索氏提取器中, 用 95% 乙醇回流提取 1 h, 改用水微沸煎煮, 3 份分别煎煮 1, 2, 3 次, 各定容至 100 mL, 为样品液。分别精密吸取上述样品液 10 mL, 分别定容至 100 mL, 各取 1.0 mL, 按 2.4 项下操作, 平行做 6 次, 并按下式计算多糖含量 (以粗多糖计), 并计算以生药计多糖含量。结果见表 2 表明提取两次即可。

$$\text{含量} = CDfW$$

式中 W 为样品质量, C 为糖浓度, f 为换算因子, D 为稀释因素。

2.9 回收率试验: 精密吸取 2 号样品液 0.5 mL 6 份, 分别加入不同量的对照品溶液, 并使其总体积至 1.0 mL, 按 2.4 项下操作, 测得葡萄糖的平均回收

表 2 样品中多糖的含量

Table 2 Content of polysaccharide in samples

编号	提取次数	多糖含量 %	
		以粗多糖计	以生药计
1	1	5.55	0.46
2	2	6.73	0.65
3	3	6.82	0.66

率为 99.8%, $RSD = 1.35\%$ ($n = 6$)

3 讨论

苯酚 硫酸比色法是测定多糖含量较为经典有效的方法之一, 但各自的报道中, 对反应温度的控制, 试剂中苯酚及硫酸用量不尽相同。常见的反应温度有煮沸、40℃ 恒温 and 室温 3 种, 鉴于冬天和夏天室温相差较大, 本实验仅比较了前两种条件, 证实本法以 40℃ 恒温 30 min 较好。加入苯酚量 0.6 mL 以上时, 反应能完成, 因此配制苯酚液时不必蒸馏。对于硫酸的用量, 经实验对比认为硫酸占总体积 62.5% 以上时, 在重现性、稳定性及回收率方面都有明显的优越性, 并且与文献报道一致^[1]。

关于多糖的干燥, 许多文献都是采用真空干燥和冷冻干燥。在真空干燥器中放入五氧化二磷或固体氢氧化钠等干燥剂, 保持高真空度, 可提高干燥速度。也有文献报道用 60℃ 烘干^[2]。我们经过多次实验证实, 干燥多糖不能加热, 否则会使多糖变成粘稠的半固体状态; 同样也不能室温下缓慢干燥, 这样也会使多糖变成难溶的角质块状物^[3]。茵陈水提取液中含有丰富的多糖, 这与我们进行的茵陈多糖的降血脂作用研究结果相一致。

References

- [1] Dong Q, Zheng L Y, Fang J N. Study on the determination of oligosaccharide and polysaccharide by modified phenol-sulfuric acid method [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 31(9): 550.
- [2] Liu H, Xue H Z, Yang W G, et al. Extraction and determination of polysaccharide from *Zea mays* [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1999, 15(2): 90.
- [3] Wang R C, Chen Z C, Sun C J. *Monograph on Biological Organic Chemistry* (生物有机化学专论) [M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1990.

众志成城

同舟共济

抗击“非典”

共渡难关