

表3 方差分析

Table 3 Variance analysis

来源	离均差平方和	自由度	F值	显著性
A	0.011 0	2	13.75	$P < 0.01$
B	0.000 8	2	1	
C	0.009 3	2	11.75	$P < 0.01$
D	0.008 7	2	14	$P < 0.01$

$$F_{0.05}(2,9) = 4.26 \quad F_{0.01}(2,9) = 8.02$$

可知各因素指标对实验结果的重要性次序为 $D > A > C > B$ 。方差分析表明,乙醇体积分数对结果有显著性的影响,除提取回流次数外,其余因素均有显著性,从操作简便和降低物耗的角度考虑,取提取回流1次。故复方益精胶囊的最佳工艺条件为 $A_3B_1C_2D_2$,即加6倍量80%乙醇溶液,提取回流1次,回流时间为2 h。

2.4 验证试验:采用优化筛选后的工艺路线重复试验3次,测定浸膏中熊果酸的得率,结果所得浸膏中

熊果酸平均得率为0.0217%。

3 讨论

本方由具有补肾益精、补肾壮阳、清热祛湿作用的3组药材组成,用于治疗不育症,以补肾益精之山茱萸为君药,山茱萸也是贵重药材,熊果酸是山茱萸的主要有效成分,故选取山茱萸中熊果酸的量为优选指标。山茱萸及处方中其余中药材均含有丰富的营养成分和珍贵的保健成分,大部分是水溶性的有机酸、糖、氨基酸、矿物质、维生素、苷类、可溶性蛋白等,也有一部分脂溶性维生素、苷元及熊果酸等脂溶性成分,选择合适的提取溶剂乙醇及其体积分数是该工艺的关键。由实验结果可知,提取采用80%乙醇既能获得较高的水溶性成分,又能获得较高的脂溶性成分。并不破坏熊果酸的量。

该工艺具有稳定性好,操作简单,生产成本较低的优点,适用于产业化,为进一步开发打下了良好的基础。

百合不同炮制品中多糖的测定

张慧芳,蔡宝昌*,张志杰,李伟东,李林,杨晨

(南京中医药大学,江苏南京 210029)

百合始载于《神农本草经》,尔后历代本草均有记载。《中国药典》2005年版一部规定,百合为百合科百合属植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb.、百合 *L. brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker 或细叶百合 *L. pumilum* DC. 的干燥肉质鳞叶。百合性味甘、寒,具有养阴润肺、清心安神之功,用于治疗阴虚久咳、痰中带血、虚烦惊悸、失眠多梦、精神恍惚。百合含有多种活性多糖,具有明显的补益作用与增强免疫作用^[1],并具降血糖功能^[2]。百合以蜜制为主要的炮制方法,包括蜜炙法与蜜炒法,传统认为蜜制可增强百合润肺及补益的功效。本实验分别测定了生百合、蜜炙百合与蜜炒百合中的多糖,以考察百合的炮制与多糖的关系。

1 实验材料

百合药材购于江苏宜兴,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定,为卷丹 *L. lancifolium* Thunb. 的干

燥肉质鳞叶。试剂均为分析纯。

AG285 电子天平; Buchi V800 旋转蒸发器; YXJ-2 离心机; DZF-6050 真空干燥箱; TU-1800S 紫外可见分光光度计。

2 方法与结果

2.1 试剂的配制

2.1.1 对照品溶液的配制:精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖50.0 mg,加适量蒸馏水溶解,转移至100 mL量瓶中,加蒸馏水至刻度,混匀。精密移取该葡萄糖溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL置50 mL量瓶中,加水至刻度,配成质量浓度为0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL葡萄糖对照品溶液备用。

2.1.2 供试品溶液的配制:精密称取百合多糖10.0、20.0 mg置100 mL量瓶中,加水溶解,稀释至刻度,摇匀即得质量浓度为0.1、0.2 mg/mL多糖供试品溶液。

收稿日期:2006-02-23

基金项目:国家科技部“十五”攻关科技专项(2001BA701A55-36)

作者简介:张慧芳(1979-),女,浙江金华人,南京中医药大学2004级硕士,从事中药质量控制。

Tel: (025) 86798281 E-mail: meixiao115@hotmail.com

* 通讯作者 蔡宝昌 Tel: (025) 85811112 E-mail: bccai@hotmail.com

2.1.3 苯酚试剂的配制:取苯酚 100 g,加铝片 0.1 g 和 NaHCO₃ 0.05 g,蒸馏。收集 180~182 ℃ 馏份,称取 5.0 g 置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度,溶解,置棕色瓶中放冰箱内备用。

2.2 百合不同炮制品的制备:蜜炒百合:取净百合,置炒制容器内,用文火加热,炒至颜色加深时,加入适量开水稀释过的炼蜜,迅速翻炒均匀,并继续用文火炒至微黄色、不粘手时,取出晾凉。

蜜炙百合:先将炼蜜加适量开始稀释后,加入净百合中拌匀,闷透,置锅内,用火炒至微黄色,不粘手时,取出晾凉。

2.3 百合不同炮制品中多糖的提取和精制:精密称取百合生品、蜜炒品、蜜炙品粉末(60 目)各 5.0 g,加入 80%乙醇 50 mL 超声 30 min,抽滤,弃去滤液,残渣挥干乙醇,以水超声提取 2 次,每次加水 50 mL,超声 30 min,3 000 r/min 离心 15 min,分离上清液,合并两次上清液,减压浓缩至含生药 0.5 g/mL,加无水乙醇至含醇量为 80%,静置 24 h,抽滤,残渣用乙醚、无水乙醇反复洗涤,真空干燥,即得百合多糖。

2.4 测定条件的考察

2.4.1 检测波长的选择:分别精确量取 0.06 mg/mL 葡萄糖对照品溶液 2.0 mL,样品溶液 2.0 mL 置干燥试管中,再分别加入 4%苯酚溶液 1.0 mL 摇匀,然后加入浓 H₂SO₄ 5.0 mL 摇匀,另以 2.0 mL 水同上操作,作为空白液,于沸水浴中恒温 30 min,取出,冷却 15 min 后,在 200~800 nm 波长扫描,结果供试品与对照品溶液在 488 nm 波长处均有最大吸收,而空白溶液在此波长无干扰,故选用 488 nm 为检测波长。

2.4.2 苯酚质量浓度的选择:精确吸取 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 葡萄糖对照品溶液各 2.0 mL 置干燥刻度试管中,分别加 4%、5%苯酚溶液各 1.0 mL,再分别加水 2.0 mL、浓硫酸 5.0 mL,混匀,沸水浴 30 min,然后冰水浴 15 min,测其 488 nm 处吸光度值,结果见表 1。因此本实验选择 5%苯酚。

表 1 苯酚质量浓度对选择结果的影响

Table 1 Effects of phenol concentration on selecting

葡萄糖/(mg · mL ⁻¹)	A	
	4%苯酚	5%苯酚
0.02	0.184	0.316
0.04	0.343	0.645
0.06	0.509	0.950
0.08	0.708	1.282
0.10	0.890	1.664

2.4.3 显色加热时间的选择:精确量取 0.02、

0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 葡萄糖对照品溶液各 2.0 mL 置干燥刻度试管中,分别加 5%苯酚溶液 1.0 mL,再分别加水 2.0 mL、浓硫酸 5.0 mL,混匀,分别在 15、30 min 沸水浴,然后冰水浴 15 min,测其 488 nm 处吸光度,结果见表 2。因此本实验选择 30 min 的加热显色时间。

表 2 显色加热时间对选择结果的影响

Table 2 Effects of calefaction time on selecting

葡萄糖/(mg · mL ⁻¹)	A	
	加热 15 min	加热 30 min
0.02	0.231	0.316
0.04	0.417	0.645
0.06	0.639	0.950
0.08	0.833	1.282
0.10	1.071	1.664

2.4.4 硫酸用量的选择:精密量取 0.1、0.2 mg/mL 多糖样品溶液、水各 2.0 mL(各平行 3 份)置刻度试管中,分别加入 5%苯酚溶液 1.0 mL,再分别加入浓硫酸 5.0、7.0、9.0 mL,混匀,沸水浴 30 min,冰水浴 15 min,测其 488 nm 处吸光度。结果 0.1 mg/mL 多糖样品的吸光度分别为 0.553、0.591、0.433。0.2 mg/mL 多糖样品吸光度分别为 1.314、1.203、0.084。按多糖换算因素换算其相当于葡萄糖质量浓度,分别为 0.032 78、0.057 46、0.066 53 mg/mL,0.074 24、0.116 42、0.140 10 mg/mL。多糖质量浓度随硫酸量的增加而增加,说明硫酸用量越多,多糖水解越完全。因此选择最佳显色条件为:5%苯酚 1 mL,浓硫酸 9 mL,沸水浴 30 min,冰水浴 15 min。

2.5 标准曲线的绘制:精确量取 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 葡萄糖对照品溶液各 2.0 mL 置干燥刻度试管中,分别加入 5%苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,然后加入浓 H₂SO₄ 9.0 mL 摇匀,另以 1.0 mL 水同上操作,作为空白液,于沸水浴中恒温 30 min,取出,冰水冷却 15 min 后,在 488 nm 波长处测其吸光度值,绘制标准曲线,计算得回归方程 $A = 6.13 C + 0.025 2$ ($r = 0.999 8$)。

2.6 多糖换算因素的测定:精密称取真空干燥的百合多糖 10.0 mg,用蒸馏水溶解后定容到 100 mL 量瓶中,混匀,作为多糖储备液。精确量取多糖储备液 2.0 mL,按测定标准曲线同样的方法测其吸光度值。按下式计算换算因素 f ,测得 $f = 0.665 3$ 。

$$f = W/CD$$

式中:W 为粗多糖质量(mg),C 为多糖液中葡萄糖的质量浓度(mg/mL),D 为多糖的稀释因素

2.7 精密度试验:精密取 0.02 mg/mL 葡萄糖对照品溶液置干燥试管中,在 488 nm 处测定吸光度,结

果吸光度的 RSD 为 0.340 6% (n=5)。

2.8 重现性试验:精密称取同一多糖样品 10 mg 各 5 份,配制供试品溶液在 488 nm 处测定其吸光度,结果多糖的平均质量分数为 1.68%,RSD 为 0.54% (n=5)。

2.9 稳定性试验:精密量取 0.01 mg/mL 多糖样品 2.0 mL,显色后 0、10、20、30、60、90、120、180 min,在 488 nm 波长处测定吸光度,结果吸光度的 RSD 为 0.195%。试验结果表明,测定的样品溶液在 3 h 内稳定。

2.10 回收率试验:精密称取多糖样品 5 份,每份 5.0 mg (含多糖约 3.8 mg),分别精密加入葡萄糖对照品溶液(0.10 mg/mL) 36 mL,加水定容至 100 mL,精密量取 2 mL,置于 10 mL 具塞试管中,另取 2.0 mL 蒸馏水置于 10 mL 具塞试管中作为空白,在 488 nm 处测定其吸光度,结果葡萄糖的平均回收率为 98.47%,RSD 为 2.52% (n=5)。

2.11 样品测定:精密吸取百合生品、炮制品样品溶液(0.1 mg/mL)各 2.0 mL,测定吸光度,计算样品中多糖的质量分数,结果见表 3。

表 3 样品中多糖测定结果 (n=3)

Table 3 Determination of polysaccharide in samples (n=3)

样品	多糖/%	RSD/%
百合生品	1.233 6	1.98
蜜炙百合	2.278 4	1.86
蜜炒百合	1.313 8	2.41

3 讨论

对多糖的测定多采用苯酚-浓硫酸法^[3]。该法的原理是多糖在强酸作用下水解生成单糖,并迅速脱水生成糠醛,与酚性物质缩合成有色化合物,这样用

分光光度法在适当波长处测定,再通过计算,可以得到多糖的量。由于苯酚易氧化,产生醌类杂质,随放置时间增加溶液颜色不断加深,吸光值不稳定,故而限制了其应用。本实验在操作时对比了苯酚纯化前后对吸光度的影响,发现使用未纯化苯酚时,测得的吸光度不稳定,尤其在高浓度时吸光值跳跃较大。而将苯酚纯化后,吸光度稳定,重现性较好。实验结果证明在使用苯酚-浓硫酸比色法时,苯酚纯化与否对吸光值测定起重要作用,且苯酚溶液宜现配现用。试验结果可以看出本法简便、快速、易行,可广泛应用于多糖的测定。

本实验比较了百合生品及蜜制品中多糖,在样品前处理过程中首先用 80%乙醇提取除去所含单糖、低聚糖及苷类等干扰性成分后,再用水提醇沉法制得百合粗制多糖。本实验在百合多糖的测定中,采用了改良后的苯酚-硫酸比色法,且多糖的干燥采用了真空干燥,避免了加热干燥而出现多糖变黏稠且不易溶解的情况。实验表明,本实验方法提取较完全。实验结果显示百合蜜制后多糖的量增加,其中的机制尚需进一步研究。蜜炙法中多糖的量高于蜜炒法,证明《中国药典》规定百合炮制采用蜜炙法的合理性。

References:

- [1] Liu C M, Fu G M, Tu Z C, et al. The lily polysaccharide falls the blood sugar function research [J]. *Food Sci* (食品科学), 2002, 3 (6): 113-114.
- [2] Miao M S, Yang L S. Lily polysaccharide immunity excited function [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2003, 19 (1): 15-16.
- [3] Yang L S, Li Y X, Li M L, et al. Phenol-sulfuric acid color method determination lily polysaccharide content [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2004, 11 (8): 704-705.

欢迎订阅《中草药》杂志 2005 年增刊

2005 年 11 月 25 日~30 日,由天津药物研究院和中国药学会主办的“第五届中药新药研究与开发信息交流会暨《中草药》杂志第九届编委会”在海南省海口市召开,为了配合会议的召开,本刊编辑部编辑、出版了《中草药》杂志 2005 年第 36 卷增刊。本增刊共收载论文 150 余篇,特邀中国科学院院士、中国工程院院士和国内十余位知名专家和中青年学科带头人,就中药现代化和中药走向国际等热点问题撰写综述性文章,另外还有反映国内近年来中药植化、药理、分析、制剂、药材资源和临床等新成就的科研论文和综述性文章。

增刊为大 16 开本,350 页(约 70 万字),天津市报刊增刊特准印证(2005)第 063 号,定价 60 元,另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅,款到寄刊。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编:300193 网址:www.tjpr.com

电话:(022)27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzjb@tjpr.com