

雷公藤多糖的提取和含量测定方法研究

梁惠花, 刘晓河, 王志宝, 郭春燕(张家口医学院, 河北 张家口 075000)

摘要:目的 建立雷公藤中多糖的测定方法, 进行不同提取条件时, 药物中多糖的含量比较。方法 采用苯酚-硫酸比色法, 于 490nm 处测定含量。结果 该方法线性关系良好, 平均加样回收率为 100.5%, $RSD=1.23\%$ 。结论 本法准确, 可作为雷公藤中多糖的质量控制。

关键词:雷公藤; 多糖; 含量测定

中图分类号: R284.2; R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2004)01-0008-03

Extraction and determination of polysaccharide from *Tripterygium wilfordii*

LIANG Hui-hua, LIU Xiao-he, WANG Zhi-bao, GUO Chun-yan (Zhangjiakou Medical College, Zhangjiakou 075000, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish the method for determination of polysaccharide from *Tripterygium wilfordii* Hook.f., and compare the content of *Tripterygium wilfordii* Hook.f. polysaccharide extracted with different methods. **METHOD** The content of polysaccharide was determined by phenol-sulfuric acid method, the detection wavelength was 490nm. **RESULTS** The linear relationship of this method was well and the average recovery was 100.5%, $RSD=1.23\%$. **CONCLUSION** This method is accurate and can be used for quality control of polysaccharide in *Tripterygium wilfordii* Hook.f..

KEY WORDS: *Tripterygium wilfordii* Hook.f.; polysaccharide; determinate

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.f. 系卫矛科雷公藤属木质藤本植物。其化学成分复杂, 主要为生物碱类、萜类及糖类^[1]。雷公藤具有活血化瘀、抗炎、抗生育等作用, 但其不良反应较大, 而雷公藤多糖是一类高效低毒的高分子化合物, 药理研究发现, 雷公藤多糖具有降低血液黏度、提高人体免疫力、抗肿瘤等作用^[1]。为此, 我们提取了雷公藤多糖, 建立了雷公藤多糖含量的测定方法, 并进行了不同

提取条件时多糖含量的比较。

1 仪器与药品

UV-752 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

(+) 葡萄糖: AR, 105℃干燥恒重, 所用其它试剂均为分析纯; 中药雷公藤购于张家口市药材公司, 并按照 2000 年药典进行鉴定, 符合标准, 实验前于硅胶干燥器中干燥 2d。

2 方法与结果

2.1 葡萄糖标准贮备液的制备

精密称取干燥至恒重的葡萄糖 100 mg, 溶解并定容 100 mL, 则其浓度为 1.0 mg/mL, 将其浓度稀释 100 倍即为对照品溶液。

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, 0.05 g 碳酸钠, 加热蒸馏, 收集 182 °C 馏分 10 g, 加蒸馏水 190 g 溶解, 置于棕色瓶中备用。

2.3 正交试验设计

2.3.1 试验因素水平表设计: 实验选择苯酚用量、硫酸用量、反应温度和反应时间 4 个因素为考察对象, 根据初步试验, 每个因素确定 3 个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 见表 1。

表 1 因素水平表

Tab 1 The factors and levels of orthogonal design

水平	A 苯酚用量 (mL)	B 硫酸用量 (mL)	C 反应温度 (K)	D 反应时间 (min)
1	0.4	4.0	313	20
2	0.8	5.0	373	30
3	1.0	6.0	298	40

精密吸取标准贮备液 1.0 mL 于 100 mL 量瓶中, 加水稀释到刻度, 即为对照品溶液, 取该对照品溶液 1.0 mL 于具塞试管中, 按正交表进行试验, 于 490 nm 处测其吸光度, 结果见表 2。从表中可以看出, 最佳显色条件为 $A_3B_2C_1D_3$ 即苯酚和硫酸用量分别为 1.0 mL 和 5.0 mL, 反应温度为 313 K, 反应时间为 40 min。

2.4 标准曲线制备

精密吸取标准贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 均定容 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。于 40 °C 水浴中恒温 40 min, 取出, 冷却 15 min 后, 于其最大吸收波长 $\lambda_{max} = 490$ nm 处测其吸光度值, 分别为 0.05, 0.12, 0.24, 0.38, 0.51, 得回归方程 $A = 0.01321 C - 0.01835$, $r = 0.9997$ 。

表 2 正交试验结果

Tab 2 The results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	样品量 (μ g)	测得量 (μ g)	回收率 (%)
1	1	1	1	1	10	0.08	74.5
2	1	2	2	2	10	0.10	89.6
3	1	3	3	3	10	0.09	82.0
4	2	1	2	3	10	0.09	82.0
5	2	2	3	1	10	0.10	89.6
6	2	3	1	2	10	0.11	93.4
7	3	1	3	2	10	0.09	82.0
8	3	2	1	3	10	0.11	100.2
9	3	3	2	1	10	0.11	97.2

实验表明, 在糖含量 5 ~ 40 μ g 范围内, 吸光度与糖浓度呈现良好的线性关系。测定反应完成后的样品在不同时间内的

吸光度值, 结果 3 h 内稳定。并且将正交实验测得的吸光度值, 根据标准曲线计算含量和回收率, 结果见表 2。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 1.0 mL, 10 份, 同“2.4”操作, 结果 $RSD = 0.98\%$ 。

2.6 多糖的提取与精制

称取雷公藤 100 g, 用 95% 乙醇回流提取 40 min, 除去脂溶性成分和色素等, 残渣用 1 500 mL 水煮沸 1 h, 过滤, 残渣再用 1 200 mL 水煮沸 40 min, 过滤, 合并提取液, 用旋转蒸发器减压浓缩至 200 mL, 用 Sevag 法除去蛋白, 然后分成 4 份, 加入乙醇, 使醇含量分别为 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, 得精制多糖, 真空干燥后称重。各定容 1 000 mL, 再稀释 100 倍, 各取 1.0 mL, 按 2.4 操作, 测其吸光度, 根据标准曲线计算含量。结果见表 3。

表 3 不同醇浓度时多糖的得率和含量

Tab 3 The extraction rate and content of polysaccharide extracted with different concentration of ethanol

乙醇浓度 (%)	多糖重 (g)	得率 (%)	A (μ g/mL)	C (μ g/mL)	含量 (%) 以多糖计以生药计
70	1.1665	4.67	0.13	11.08	65.15 4.43
75	1.2456	4.98	0.135	11.46	67.38 4.58
80	1.3784	5.51	0.152	12.75	74.97 5.10
85	1.3621	5.45	0.15	12.60	74.09 5.04

2.7 换算因子测定

准确称取精制多糖 10 mg, 用水定容 500 mL, 吸取 1.0 mL 按 2.4 操作, 根据标准曲线计算多糖含量, 然后按下式计算换算因子 f

$$f = \frac{W}{C \cdot D}$$

式中 W: 多糖重 (mg), C: 多糖浓度 (mg/mL), D: 稀释因素, 得 $f = 2.10$, 见表 4。

表 4 换算因子测定

Tab 4 Determination of conversion factor

序号	多糖液 (mL)	A	C (mg/mL)	f
1	1.0	0.14	13.59	
2	1.0	0.17	13.82	2.07
3	1.0	0.16	13.67	2.14
4	1.0	0.16	13.36	2.14
5	1.0	0.16	13.44	2.13
6	1.0	0.16	13.67	2.09
平均				2.10
RSD (%)				1.27

2.8 样品液制备

准确称取中药粉末 50 mg, 3 份, 分别置于索氏提取器中, 用 95% 乙醇回流提取 1 h 后, 过滤, 取残渣第一份加 150 mL 水煮沸 1 h, 第二份加 100 mL 水煮沸 1 h, 过滤, 残渣再用 50 mL 水煮沸 40 min, 第三份分别加 80, 40, 40 mL 水煮 3 次, 时间分别为 1.0, 0.5, 0.5 h, 3 份均定容 100 mL, 备用。

2.9 样品含量测定

分别精密吸取上述样品液 10 mL, 稀释至 100 mL, 各取

1.0 mL 按 2.4 操作,并按下式计算多糖含量

$$\text{含量}(\%) = \frac{C \cdot D \cdot f}{W} \times 100$$

式中 W:样品重(mg),C:多糖浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$),D:稀释因素,f:换算因子,并按生药计算多糖含量,结果表明提取两次即可。见表 5。

表 5 不同提取次数样品中多糖含量

Tab 5 The content of polysaccharide extracted in different process

序号	提取次数 (次)	A (n=6)	C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD (%)	含量(%) 以多糖计以生药计	
1	1	0.23	18.85	1.22	55.42	3.77
2	2	0.32	25.56	1.28	75.15	5.11
3	3	0.32	25.63	1.18	75.35	5.12

2.10 回收率试验

精密称取样品粉末 25 mg,6 份,分别加入对照品液 0.5,1.0,2.0,2.5,3.0 mL,以下同“2.6”项多糖的提取操作,测得平均回收率为 100.5%,结果见表 6。

表 6 回收率试验

Tab 6 The results of recovery test

序号	加入量(μg)	回收量(μg)	回收率(%)
1	5.00	4.92	98.4
2	10.00	10.18	101.8
3	15.00	15.20	101.3
4	20.00	21.12	100.6
5	25.00	25.31	101.2
6	30.00	29.97	99.9
平均			100.5
RSD(%)			1.23

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,但在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。本实验表明以 40℃ 恒温 40 min 较好。加入苯酚量在 0.5 mL 以上时,均能使反应完全,因此,在配置苯酚液时,不妨免去蒸馏一步。对硫酸用量结果是 5 mL 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^[2]。

关于多糖的干燥,许多文献都是采用真空干燥和冷冻干燥,我们发现在真空干燥器中加入 P_2O_5 或固体 NaOH 等干燥剂,同时保持高真空度,可提高干燥效率。然而也有文献报道用 60℃ 烘干^[3,4]。我们经过多次实验证实,多糖的干燥不能加热,也不能室温下缓慢干燥,否则会使多糖变成难溶的角质块状物。

参考文献

- [1] 李秀才,雷公藤的研究与临床应用[J].中国中药杂志,1997,22(1):53.
- [2] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定总糖和寡糖的研究[J].中国药理学杂志,1996,31(9):550.
- [3] 刘媛,薛慧中,杨文革,等.玉米须多糖的提取及含量测定[J].南京中医药大学学报,1999,15(2):90.
- [4] 何云庆,李荣芷.不同产地灵芝中多糖含量测定[J].中国中药杂志,1997,22(2):83.

收稿日期:2002-06-25