

# 黄芪多糖含量测定的方法学研究

□李孝栋\* 陈景山 陈峰 张小如

(福建中医学院药学系药剂教研室 福州 350003)

**摘要:** 本文采用紫外分光光度法测定黄芪中多糖的含量,通过对多糖部位的水溶部分、水不溶部分及两部分混合物的多糖含量测定,表明水溶部分与水不溶部分总多糖的含量和两部分混合物的多糖含量接近,结合多糖特性和 Molish 反应的阳性现象,提出用沸水代替冷水对黄芪多糖有效部位萃取的方法更具准确性。本研究结果证明苯酚-硫酸法也可用于测定水不溶多糖。

**关键词:** 黄芪多糖 紫外分光光度法 含量测定

黄芪是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,主要含水溶性黄芪多糖和由葡萄糖与阿拉伯糖形成的水不溶多聚糖,药理研究表明黄芪多糖作为一种免疫抑制剂,具有保护急性心肌缺血,对抗心率失常,改善微循环的作用<sup>[1-2]</sup>。

根据多糖多不溶于冷水而溶于热水的性质<sup>[3]</sup>,本文对黄芪多糖含量测定常用的苯酚-硫酸法方法学进行研究。

## 一、材料

黄芪饮片购自福建中医学院国医堂,经中药鉴定室车苏容老师鉴定,符合国家药典的规定。752N型紫外分光光度计(上海精密科技有限公司),RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣仪器有限公司),DZF-150型小型减压干燥器(郑州长城科工贸有限公司),TDL-4型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), $\alpha$ -萘酚、苯酚和浓硫酸均为分析纯,试剂配制按照药典规定操作进行。

收稿日期: 2005-10-27

修回日期: 2005-12-14

\* 联系人:李孝栋,药学博士,从事中药新剂型和质量标准的研究, Tel: 0591-22861135, Email: lxdtem@263.net。

## 二、方法与结果

### 1. 黄芪多糖的提取与分离

称取黄芪切片 100g,用水浸泡 0.5hr,10,8,8 倍量的水煎煮 3 次,每次 1.5hr,合并提取液,浓缩至 300ml,冷至室温,静置 12hr,过滤,固体物干燥得 H<sub>1</sub>,滤液配成 60%的乙醇溶液,冷藏 12hr,过滤,固体物干燥得 H<sub>2</sub>,将 H<sub>1</sub> 和 H<sub>2</sub> 均匀混合,即得黄芪多糖总样。

### 2. 黄芪多糖的测定

(1)标准曲线的绘制。

精密称取葡萄糖对照品 100mg,置于 100ml 容量瓶内,加入蒸馏水溶解并定容至刻度。用移液管精密吸取 0.25,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5ml 溶液分别置于具塞刻度试管中,蒸馏水补充至 5ml,加入 5%的苯酚溶液 1.0ml,再用酸式滴定管滴加浓硫酸 5.0ml,振摇 5min,沸水水浴加热 15min,取出,冷水冷却 30min。以空白为参比,用紫外可见分光光度计在波长 490nm 处测吸光度。以糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线如下:

$$A=1.236C-0.0106 \quad r=0.9908$$

由上可知,葡萄糖在 0.05~0.5mg/ml 浓度范围内呈良好线性关系。

#### (2) 黄芪多糖的含量测定。

##### ① 黄芪多糖总样水溶部分多糖的含量测定。

精密称取黄芪多糖总样 0.05g,加 90ml 蒸馏水使充分溶解,离心,将上清液移入 100ml 容量瓶内,蒸馏水定容至刻度。再精密吸取溶液 2.0ml 置于具塞刻度试管中,定容到 5ml,加入 5% 苯酚溶液 1.0ml,浓硫酸 5.0ml,振摇 5min,沸水水浴加热 15min,取出,冷水冷却 30min,以空白为参比,在紫外可见波长 490nm 处测吸光度,由标准曲线方程计算出多糖的含量。每份样品平行测定 3 次。

##### ② 黄芪多糖总样水不溶部分多糖的含量测定。

将①项下离心得到的下层固体物用蒸馏水全部洗入一干净烧杯,加热使溶解,移入 100 ml 容量瓶内,“蒸馏水定容至刻度”起操作步骤同①项下内容。

##### ③ 黄芪多糖总样的多糖含量测定。

精密称取黄芪多糖总样 0.05g,加入 90ml 蒸馏水,加热使溶解,移入 100ml 容量瓶内,“蒸馏水定容至刻度”起操作步骤同①项下内容。测定数据见表 1。

从表 1 可见,黄芪多糖总样水溶部分与水不溶部分相加得的多糖含量与黄芪多糖总样测得的多糖含量数值一致。

### 3. 黄芪多糖的 molish 鉴别反应

#### (1) molish 鉴别反应的一般操作<sup>[4]</sup>。

取样品提取液 1ml,加入 5% $\alpha$ -萘酚,摇匀后沿试管壁缓缓加入浓硫酸。若在两液面间有紫色光环产生,表明样品含有单糖、多糖或者苷类。因本实验所得为按照多糖的制备工艺得到的多糖总样,故不存在单糖和苷类。

#### (2) 黄芪多糖总样水溶部分的 molish 反应。

精密称取多糖总样 0.05g,加 50ml 蒸馏水使充分溶解,离心,吸取上清液 1ml,移入具塞刻度试管中,加入数滴 5% $\alpha$ -萘酚,出现白色絮状物形成。摇匀后沿试管壁缓缓加入 1~2ml 的浓硫酸,出现分层,在两液面间有紫红色光环产生,表明多糖总样水溶部分含有多糖成分。

#### (3) 黄芪多糖总样水不溶部分的 molish 反应。

将 2.3.2 项下离心得到的下层固体物用 2ml 蒸馏水直接加入玻璃离心管中,加热使充分溶解,吸取 1ml 溶液于具塞刻度试管内,加入数滴 5% $\alpha$ -萘酚,出现白色絮状物形成。摇匀后沿试管壁缓缓加入 1~2ml 的浓硫酸,出现分层,在分层处有以黄绿色和紫红色相叠且黄绿色占多数的光环产生,表明多糖总样水不溶部分也含有多糖。

#### (4) 黄芪多糖总样的薄层层析。

取黄芪多糖总样配成 10% 的水溶液,以 D-葡萄糖为对照品,以正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5)的上层液为展开剂展开,直接以 10% 硫酸乙醇溶液为显色剂显色,结果黄芪多糖总样的 Rf 值比对照品的大,而在对照品相对应的地方不存在斑点。

## 三、讨论

据文献<sup>[5-7]</sup>,目前黄芪多糖的测定都是在常温下蒸馏水溶解样品,即测定植物体内的可溶性糖(主要是指能溶于水及乙醇的单糖和寡聚糖),因而不溶于水的多糖可能被忽略或产生误差。从上述实验结果可知,改为沸水提取可将只溶于热水的多糖也包括进去,使测定值更准确。

苯酚-硫酸法测定可溶性糖的原理是:糖在浓硫酸作用下,脱水生成的糠醛或羟甲基糠醛能与苯酚缩合成一种橙红色化合物,在 10~100mg 范围内其颜色深浅与糖的含量成正比,且在 485nm 波长下有最大吸收峰,故可用比色法在此波长下测定。苯酚-硫酸法主要用于甲基化的糖、戊糖和多聚糖的测定,方法简单,试剂便宜,灵敏度高,实验时基本不受蛋白质存在的影响,且产生的颜色可稳定 160min 以上。

薄层层析实验证实黄芪多糖总样中不存在葡萄糖,因此表明该研究方法是可行的。

本研究结果证明苯酚-硫酸法也可用于测定水不

表 1 多糖总样不同部分多糖的含量测定结果

多糖部分	吸光度			含量(%)
	1	2	3	
水溶部分	0.096	0.096	0.097	43.76
水不溶部分	0.773	0.773	0.732	6.02
黄芪多糖总样	0.113	0.113	0.112	49.80

溶多糖,其原理可能与操作过程中浓硫酸加入时的放热和水浴加热反应有关,因为通过高温的条件,水不溶多糖碳链断裂,从而转化为碳数少的可溶性糖。

### 参考文献

- 1 郑俊华. 生药学, 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 151~155.
- 2 赖斌, 卞红梅. 中药及天然药物中多糖类成分药理研究概况. 首都医药, 2001, 8(5): 52~53.
- 3 吴立军. 天然药物化学, 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 62~63.
- 4 徐任生, 陈仲良. 中草药有效成分提取与分离, 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 1989, 12.
- 5 侯团章. 中草药提取物. 北京: 中国医药科技出版社, 2004, 133.
- 6 张立, 马琼, 何永利, 等. 灵芝香菇黄芪枸杞提取物中多糖的含量测定. 中草药, 2004, 35(2): 167~168.
- 7 闫巧娟, 韩鲁佳, 江正强, 等. 黄芪多糖的分子量分布. 食品科学, 2004, 25(8): 27~30.

## Study on Methodology for Determination of polysaccharides of Astragalus Membranaceus

Li Xiaodong, Chen Jinshan, Chen Feng and Zhang Xiaoru

(laboratory of Pharmaceutics, Department of Materia Medica,

Fujian Institute of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350030)

In this article the content of polysaccharides of Astragalus membranaceus is determined by ultraviolet spectrophotometry. And it is showed through the determination of saccharides of both the water-soluble and water-insoluble parts as well as the mixture of them with saccharides of Astragalus membranaceus that the total content of saccharides of the water-soluble and water-insoluble parts is close to that of their mixture and it is suggested that there must be more accuracy if saccharides of the effective parts of this plant is extracted with boiling water instead of cold water in consideration of the characteristics of saccharides and the positive reaction of Molish. The result of the study presented in this article proves that water-insoluble saccharides can be also determined by the method of phenol-sulfuric acid.

Key Words: poly saccharides of Astragalus membranaceus, ultraviolet spectrophotometry, determination of content

(责任编辑:刘维杰, 责任编审:果德安, 责任译审:秦光道)

### 美国科学家利用纳米微粒摧毁癌细胞

美国麻省理工学院的研究人员发明了一种新的摧毁癌细胞方法。该方法能够通过注射含有细微颗粒的化疗药物,达到只攻击患病癌细胞而对健康细胞没有任何损害的效果。研究成果刊登于《美国国家科学院学报》网络版。

研究人员首先对实验室培养皿中生长的细胞进行试验,然后对携带人类前列腺肿瘤的小鼠进行研究。科学家发现,所有接受治疗小鼠的肿瘤都明显缩小并可以继续存活下来,而未经过治疗的对照组小鼠则死亡。

哈佛大学医学院助理教授奥梅德·福科斯德博士指出,向七只接受治疗的小鼠一次性注射纳米微粒,有五只完全根治了肿瘤,其余小鼠与对照组相比肿瘤也明显减少。

尽管已经知道这项新治疗体系中的所有部分都是安全的,科学家还是要进一步证明它在人体中应用的安全性。今后的试验将扩展到大型动物,最后进行人体试验。一些报告认为,由于纳米微粒体积非常微小,它或许能对细胞造成伤害并威胁人类健康,有些专家也主张在大规模应用纳米微粒之前还需要进行更多的研究。

这项研究显示,科学家将微小海绵状纳米微粒与多烯紫杉醇结合,使微粒在细胞内部流体中溶解,根据需要或快或慢地释放药物。为了确保作用于正确的肿瘤细胞,要应用称为适合体的靶分子或者某些特定的遗传物质对纳米粒子进行包装修饰。这些适合体特异性的识别肿瘤细胞表面特有的一些分子,而对于正常细胞并不识别。因为纳米粒子非常小,当它们到达细胞表面时可以被存活细胞快速的吞噬,因此研究小组便选用了纳米粒子作为运送药物的载体。

(文 摘)