第31卷第4期 四川理工学院学报(自然科学版) Vol. 31 No. 4
2018年8月 Journal of Sichuan University of Science & Engineering(Natural Science Edition) Aug. 2018
文章编号:1673-1549(2018)04-0014-06 DOI:10.11863/j.suse.2018.04.03

京大戟多糖的提取及苯酚-硫酸法测定其多糖含量的研究

田凤鸣,陈 强,苏满春,朱秀娟,聂龙英,孙 杰

(陇南师范高等专科学校农林技术学院,甘肃 陇南 742500)

摘 要:对京大戟多糖的提取条件和多糖的测定方法进行探索,以期优化京大戟多糖的提取条件和测定方法。采用热水浸提法提取京大戟多糖,同时采用苯酚-硫酸法测定其多糖含量。结果显示:(1)京大戟多糖最佳提取条件为液料比30:1、提取次数为2、提取温度为80 ℃、提取时间为2 h;(2)苯酚-硫酸法测定京大戟多糖含量的最佳条件为:苯酚浓度为5%、浓硫酸用量为5 mL、反应温度为100 ℃、显色时间为30 min,在此条件下,测得京大戟中含糖量为22.09%。苯酚-硫酸法的精密度和重现性的RSD为1.38%、稳定性RSD为1.78%、加标回收率为98.35%,表明该实验获得的提取条件和测定方法均可有效用于京大戟多糖的提取和测定。

关键词:京大戟多糖;苯酚-硫酸法;提取条件;含量测定

中图分类号:O65 **文献标志码**:A

引 言

京大戟为大戟科(Euphorbiaceace Juss.)大戟属(Euphorbia L.)植物大戟(*E. pekinensis* Rupr.)的干燥根[1],收载于历次版本的《中华人民共和国药典》,具有泻水逐饮、消肿散结的作用[2]。多糖是由单糖缩合而成的多聚物,是一类重要的活性物质[3]。研究报道中,植物多糖具有免疫调节、抗衰老、降血糖、抗肿瘤等多种生物活性,并且具有毒副作用小和不易造成残留等优点[4-5],因此逐渐受到研究人员的青睐。

多糖含量测定方法已有很多,有比色法、滴定法、高效液相、气相色谱法、色谱法、薄层扫描法等[6]。目前比色法已被广泛应用到多糖含量测定中。在多数文献报道中,苯酚-硫酸法和蒽酮比色法是主要测定多糖含量的方法[7-9]。一般在多糖样品较少时,采用蒽酮硫酸法比较合适,但此法的缺点是蒽酮试剂不稳定、需临时配制、稳定性较差。而苯酚硫酸法较为稳定,为较理想的多糖含量测定方法,因此本文采用苯酚-硫酸法来测定多糖。目前对京大戟多糖的提取条件和含量测定的文献报道甚少。本文对京大戟多糖的提取条件进行了探索,且对苯酚硫酸法测定多糖的条件进行了研究,以优化京大戟多糖的提取条件和多糖含量的测定方法,为其后期的研究提供技术上的支持。

收稿日期:2018-05-24
基金项目:全国第四次中药资源普查甘肃试点工作项目(2015CSZYZYPC-10);2016年陇南市科技指导性计划项目(2016-17)
作者简介:田凤鸣(1986-),女,甘肃礼县人,讲师,硕士,主要从事生物技术方面的研究,(E-mail)tianfengming2010@163.com

1　仪器与材料

1.1　仪器设备

HH - 6 数显恒温水浴锅（金坛市医疗仪器厂）；老本行粉碎机（400 型，永康市云臻电子）；可见分光光度计（SP - 723PC，上海光谱仪器公司）；旋转蒸发仪（RE - 52 A，上海亚荣生化仪器厂）；超纯水仪（HS1810 - 2，重庆阿修罗）；分析天平（DV215CD，奥豪斯公司）；离心机（L - 500，长沙湘仪离心机公司）。

1.2　材料与试剂

京大戟由陇南师专黄兆辉博士采集并鉴定，苯酚、乙醇、浓硫酸、葡萄糖标准品均由西安化玻试剂有限公司提供。

2　方法及内容

2.1　京大戟多糖提取工艺[10]

用粉碎机将干燥的京大戟粉碎成粉末状，采用热水浸提法按照"粗多糖的制备 - 除蛋白 - 纯净多糖"的提取工艺来制备京大戟多糖。

2.2　葡萄糖标液的配制及标准曲线的制备

精确称取烘干至恒重的葡萄糖 1.0 mg，蒸馏水溶解、定容至 10 mL。分别取 0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL的葡萄糖标准液于各试管中，加水补足至 1 mL，摇匀。在各管中加入 1 mL 浓度为 5% 的苯酚，再立即加入 5.0 mL的浓硫酸混匀（在冰水浴中进行）；沸水浴 30 min，取出迅速冷却至室温，在波长 490 nm 处测定吸光值。以吸光值和对应的葡萄糖含量来绘制标准曲线，得到线性回归方程。

2.3　京大戟多糖的提取率

称取 2.1 中制备的京大戟多糖 2.5 mg，蒸馏水溶解并定容至 100 mL，从中吸取 1 mL，按照 2.2 的方法，在波长 490 nm 处测定吸光值，按照标准曲线方程计算出京大戟总糖的含量。京大戟多糖提取率的计算式为[11]：

$$提取率 = V \times C \times W_2/(W_3 \times W_1) \times f \times 100\%$$

式中：C 由葡萄糖标准曲线方程计算所得京大戟多糖的浓度，g/L；W_1 为京大戟粉末的质量，g；W_2 为提取的京大戟多糖的质量，g；W_3 为用于测定的京大戟多糖质量，g；V 为溶解定容后的体积，L；f 为校正因子。

2.4　京大戟多糖热水提取条件的优化

（1）液料比：京大戟粉末各称取 5.0 g 共 7 份，在 80 ℃温度下提取 2 h，液料比分别选用 10∶1、15∶1、20∶1、25∶1、30∶1、35∶1、40∶1，各提取 1 次，由京大戟多糖提取率的差异来判断液料比不同对京大戟多糖提取率的影响；

（2）提取次数：分别取 5.0 g 京大戟粉末共 5 份，在温度 80 ℃、液料比为 30∶1，提取时间为 2 h 的条件下，分别提取 1、2、3、4、5 次，由京大戟多糖提取率的差异来分析不同提取次数对京大戟多糖提取率的影响；

（3）提取时间：分别称取 5.0 g 京大戟粉末共 6 份，在液料比为 30∶1，提取温度为 80 ℃，提取次数为 2 的条件下，分别提取 1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h、3.5 h，由京大戟多糖提取率的差异比较不同时间对京大戟多糖提取率的影响；

（4）提取温度：分别称取 5.0 g 京大戟粉末共 5 份，在液料比为30∶1，提取时间为 2 h，提取次数为 2 的条件下，分别于 70 ℃、75 ℃、80 ℃、90 ℃、95 ℃下提取，由京大戟多糖提取率的差异分析不同温度对京大戟多糖提取率的影响。

2.5　样品中京大戟多糖含量的计算方法[12]

取 1.0 mL 浓度为 0.3 mg/mL 样液于试管中，加入 1.0 mL 浓度为 5% 的苯酚，摇匀，冰浴中加入浓硫酸 5.0 mL，混匀，沸水浴 30 min，冷却后在波长 490 nm 处测定吸光值，由以下公式计算京大戟多糖含量：

$$多糖含量(\%) = (C \times D \times f)/m \times 100\%$$

式中：C 为样品中葡萄糖质量浓度，mg/mL；D 为京大戟中多糖溶液的稀释因子；f 为校正因子；m 为样品中京大戟的质量，mg。

2.6　稀释因子的计算方法

因：$C_1 . V_1 = C_2 . V_2$

故：稀释因子 $= C_1/C_2 = V_2/V_1$

式中:V_1 是从原溶液中移取京大戟多糖的体积; V_2 是稀释定容后多糖的体积; C_1 是原溶液中京大戟多糖的浓度; C_2 是稀释定容后多糖的浓度。

2.7 计算校正因子[13]

称取京大戟多糖 10.0 mg,蒸馏水溶解定容于 50 mL 的容量瓶中,取 2 mL 多糖溶液按照苯酚-硫酸法测定其吸光度,利用回归方程求出京大戟多糖储备液中葡萄质量的浓度,校正因子 f 的计算式为:

$$f = m/C \times D$$

式中:m 为称取多糖的质量,mg; C 为曲线中求得储备的葡萄质量浓度,mg/mL; D 为稀释因子。

2.8 苯酚-硫酸法测定京大戟多糖含量条件的优化

(1) 苯酚浓度:按照 2.5,其他条件相同,改变苯酚的浓度(1%、3%、5%、7%、9%),在波长 490 nm 处测定吸光值,计算多糖含量;

(2) 浓硫酸用量:按照 2.5,苯酚的浓度按照确定的浓度,改变浓硫酸体积(3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL),在波长 490 nm 处测定吸光值,计算多糖含量;

(3) 反应温度:按照 2.5,苯酚的浓度和浓硫酸用量按照确定的条件,改变反应温度(20 ℃、40 ℃、60 ℃、80 ℃、100 ℃),在波长 490 nm 处测定吸光值,计算多糖含量;

(4) 反应时间:按照 2.5,苯酚的浓度、浓硫酸用量和反应温度按照确定后的条件,改变反应时间(10 min、20 min、30 min、40 min、50 min),在波长 490 nm 处测定吸光值,计算多糖含量。

2.9 苯酚-硫酸法的方法学评价[14]

按照确定的条件,分别依次进行精密度实验、稳定性实验、重现性实验以及加标回收率实验。

2.9.1 精密度实验和重现性

在苯酚-硫酸法的最佳条件下重复检测 5 次京大戟多糖含量,并计算其 RSD 值。

2.9.2 稳定性实验方法

采用最佳的苯酚-硫酸法,每隔 2 h 对京大戟多糖检测一次,重复 5 次,并计算其 RSD。

2.9.3 加样回收率实验方法

取已知含量的京大戟多糖样品溶液 6 份,分别按照 100% 加入已知含量的葡萄糖标准品溶液,采用苯酚-硫酸法最佳的条件测定其吸光值,并计算加样回收率。

加样回收率(%)=(检测总量-样品所含量)/加标量×100%

3 结果与分析

3.1 葡萄糖标准曲线的制备

如图 1 所示,葡萄糖标准曲线方程为:$A = 0.0023x - 0.0018$,其中,A 为吸光值,x 为葡萄糖浓度(ug/mL),$R^2 = 0.9998$。由标准曲线得到京大戟多糖含量为 58.6%。

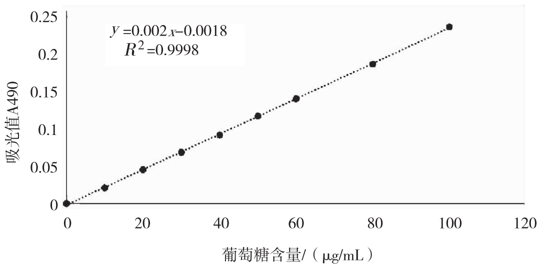

图 1 葡萄糖标准曲线

3.2 京大戟多糖提取条件的确定

各因素对京大戟多糖提取率的影响如图 2 所示。由图 2(a)可知京大戟多糖的提取率随液料比的增加而逐渐提高,这是因为液料比的增大能增加物料与溶剂分子的接触机会,从而加速了多糖的扩散,在 30:1 时提取率达到最大,而再增加液料比例时,其多糖提取率反而降低,因此液料比最佳为 30:1。由图 2(b)可知,随提取次数的增加京大戟多糖的提取率也在不断上升,但当次数达到 2 次后,提取率增加缓慢,继续增加提取次数,反而会增加后续的工作成本,因此确定提取次数为 2 次较为合理。由图 2(c)可知,京大戟多糖提取率在 2 h 内随着时间的增加而迅速提高,超过 2 h 后增加缓慢,甚至降低,因此最佳提取时间为 2 h。由

图 2(d)可知提取温度在 70 ℃ ~85 ℃之间时,京大戟多糖提取率随温度的上升而迅速提高,在 85℃ ~95℃之间时又迅速下降,因此京大戟多糖提取的最佳温度为 85℃。

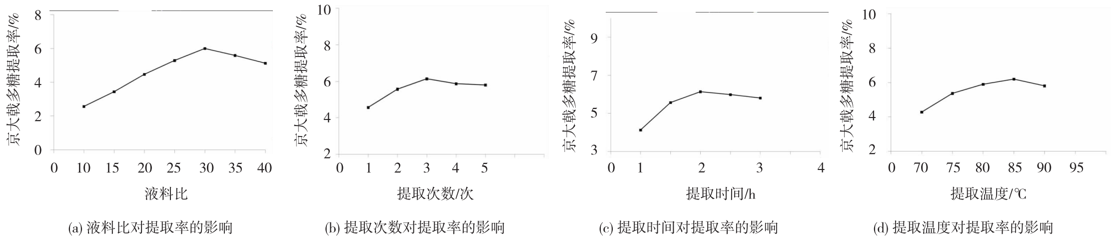

图 2　各因素对京大戟多糖提取率的影响

3.3　苯酚 - 硫酸法测定京大戟多糖含量

本文从苯酚浓度、硫酸用量、反应温度、反应时间 4 个方面来优化苯酚 - 硫酸法测定京大戟多糖的条件。各因素对苯酚 - 硫酸法测定京大戟多糖含量的影响如图 3 所示。由图 3(a)可知苯酚浓度在 1% ~5% 范围内时多糖的吸光值随苯酚浓度的增加而上升,到 5% 时吸光值达到最大,再增加苯酚浓度吸光值反而降低,因此确定苯酚的最佳浓度为 5% 。由图 3(b)可知硫酸用量对多糖测定的影响很明显,硫酸用量在 1 mL ~5 mL 之内时,吸光值随硫酸用量的增加而增加,当硫酸达到 5 mL 时吸光值最大,超过 5 mL 后吸光值反而逐渐减小,因此确定硫酸的用量为 5 mL。由图 3(c)可知,随着反应温度的上升,吸光值不断增加,当反应温度达到 100 ℃时,吸光值最大,因此确定其反应的最佳温度为 100 ℃。由图 3(d)可知,反应时间在 0 min ~30 min之内时,随时间的延长其吸光值也在不断增加,当反应时间达到 30 min 时吸光值达到最大值,超过 30 min后吸光值反而不断降低,因此确定最佳反应时间为 30 min。以上优化的条件将为京大戟多糖后续的研究奠定一定的基础。

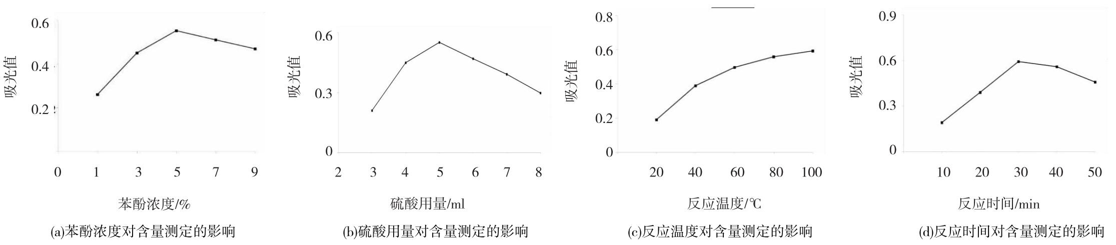

图 3　各因素对苯酚 - 硫酸法测定京大戟多糖含量的影响

3.4　方法学评价

从表 1、表 2 和表 3 可知苯酚硫酸法测定京大戟多糖含量的精密度和重现性的相对标准偏差为 1. 38% ,稳定性标准偏差为 1. 78% ,加标回收率的标准偏差为 1. 89% 。结果表明,此方法操作简单、快速、准确、条件易于掌握,在实验室可操作。

表 1　苯酚硫酸法测定京大戟多糖含量的精密度和重现性

方　法	京大戟多糖含量/%	平均值/%	RSD/%
苯酚 - 硫酸法	22. 13　22. 70　22. 42 21. 40　21. 84	22. 09	1. 38

表 2　苯酚硫酸法测定京大戟多糖含量的稳定性

方　法	京大戟多糖含量/%	平均值/%	RSD/%
苯酚 - 硫酸法	22. 49　22. 49　22. 32 22. 10　22. 34	22. 24	1. 78

表 3 苯酚硫酸法测定京大戟多糖含量加标回收率

重复	样品含量/mg	加标量/mg	检测总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	95.2	90	182.7	97.22	98.35	1.89
2	95.2	90	182.7	97.22		
3	95.2	90	187.1	102.11		
4	95.2	90	183.5	98.11		
5	95.2	90	183.5	98.11		
6	95.2	90	182.8	97.33		

4 讨 论

水提醇沉法是药材中的有效成分以水作为溶剂进行提取,然后提取液中的杂质用不同浓度的乙醇去除[15]。多糖的醇沉效果直接受乙醇浓度的影响[16]。研究报道中,莪术[17]、白及[18]、山茱萸[19]多糖含量受乙醇浓度的影响较大。同时水的用量、料液比、提取次数、提取时间及提取温度,都会影响提取率[20]。因此需对提取条件进行优化。

本文对京大戟多糖提取的条件确定为:液料比30∶1,提取次数2次,提取时间2 h,提取温度85 ℃;苯酚-硫酸法测定京大戟多糖含量的条件确定为:苯酚浓度为5%,浓硫酸为5 mL,反应温度为100 ℃,反应时间为30 min。同时对苯酚硫酸法测定多糖的方法分别进行了精密度、重现性、稳定性和加样回收率实验,实验结果显示精密度和重现性的相对标准偏差为1.38%,稳定性标准偏差为1.78%,加标回收率的标准偏差为1.89%,表明实验确定的京大戟多糖的提取条件和测定方法的数据可靠准确,在实验室可行,为今后京大戟多糖进一步的研究奠定基础。

参 考 文 献:

[1] 中华本草编委会.中华本草精选本第4卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:806.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典1部[M].北京:化学工业出版社,2005:156.

[3] 申利红,王建森,李雅,等.植物多糖的研究及应用进展[J].中国农学通报,2011,27(2):349-352.

[4] TAO Y W,TIAN G Y.Studies on the physicochemical properties,structure and antitumor activity of polysaccharide YhPS-1 from the root of Cordalis yanhusuo Wang[J].Chinese Journal of Chemistry,2006,24(2):235-239.

[5] GE Y,DUAN Y F,FANG G Z,et al.Study on biological activities of Physalis alkekengi var francheti polysaccharide[J].Journal of the Science of Food & Agriculture,2009,89(9):1593-1598.

[6] 梁存权.比色法测定植物多糖含量方法概述[J].北方药学,2011,8(12):4+86.

[7] 李计萍.中药新药研究中多糖含量测定方法探讨[J].中国中药杂志,2014,39(17):3392-3394.

[8] 郭志烨,韩丽,杨明,等.中药多糖定量测定方法的探讨[J].中成药,2014,36(10):2172-2176.

[9] 陈龙浩,黄雪峰,陈颖珊,等.西番莲果皮多糖2种测定方法的比较研究[J].今日药学,2013,23(9):573-575.

[10] 王晶,王春国,李冰,等.苯酚-硫酸法测定慈姑中多糖的含量[J].吉林中医药,2017,37(12):1258-1260.

[11] 彭晶.毛樱桃多糖的分离纯化、结构分析及其抗氧化活性研究[D].西安:陕西师范大学,2014.

[12] 王文洁,唐炜,俞玲娜,等.蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定凉粉草多糖的比较[J].食品科技,2017,42(9):274-279.

[13] 池源,王丽波.苯酚-硫酸法测定南瓜籽多糖含量的条件优化[J].食品与机械,2014,30(1):89-92.

[14] 张媛媛,张彬.苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究[J].食品科学,2016,37(4):158-163.

[15] 翟莲,宋凯凯,刘瑞锦.中药水提液纯化研究进展[J].齐鲁药事,2011,30(5):296-297.
[16] 孙玉琦,刘晓娟,代春美,等.中药醇沉技术应用与评价[J].中成药,2010,32(11):1961-1963.
[17] 戴平,黄凤香,曾建红,等.不同醇沉浓度对广西莪术多糖含量的影响[J].时珍国医国药,2012,23(10):2436-2437.
[18] 洪彤彤,冯军,贺少龙,等.白及多糖的醇沉分级[J].宁夏医科大学学报,2015,37(3):282-284.
[19] 高嘉屿,杨㰚,余娅楠,等.山茱萸多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J].辽宁中医杂志,2015,42(11):2166-2169.
[20] 佟茵,吴红娟.植物多糖的提取方法研究进展[J].中医药信息,2012,29(5):108-110.

Study on Extraction of Polysaccharide From Euphorbia Pekinensis and Determination of Its Content by Phenol-Sulfuric Acid Method

TIAN Fengming, CHEN Qiang, SU Manchun, ZHU Xiujuan, NIE Longying, SUN Jie
(College of Agriculture and Forestry, Longnan Teacher's College, Longnan 742500, China)

Abstract: To explore the extraction conditions of polysaccharides from Euphorbia pekinensis and the conditions for the determination of polysaccharides, in order to select the better extraction conditions and the better conditions for the determination of the polysaccharide method of the Euphorbia pekinensis. The polysaccharides extracted from Euphorbia pekinensis are extracted by hot water and the content of polysaccharides is determined by phenol sulfuric acid method. The polysaccharides of Euphorbia pekinensis in this condition under the liquid material ratio 30∶1, the number of extractions is 2 times, the extraction temperature is 80 ℃, and the extraction time is 2 h. The conditions for the extraction are as follows: the concentration of phenol is 5%, the concentration of concentrated sulfuric acid is 5 mL, the reaction temperature is 100℃, and the color time is 30 min, and the polysaccharide content in the Euphorbia pekinonis is determined as the content 22.09%, the precision and repeatability of phenol sulfuric acid method are RSD, 1.38%, stability RSD 1.78%, and standard addition recovery 98.35%. The extraction conditions and determination methods can be used as a feasible method for the extraction and determination of polysaccharides in Euphorbia pekinensis.

Key words: polysaccharide of the Euphorbia pekinensis; phenol-sulfuric acid method; extraction conditions; determination of content