

蝉花总多糖的提取纯化及含量测定

★ 周俐斐 芦柏震 蔡菊芬 (浙江省肿瘤医院 杭州 310022)

摘要:目的:探索蝉花总多糖的提取纯化及含量测定方法,为深入研究蝉花总多糖提供技术方法。方法:采用水提醇沉法提取水溶性粗多糖,经 Sevag 法除蛋白、透析和活性炭脱色制备得蝉花总多糖,采用苯酚硫酸法测定多糖含量,干燥失重法测定水分含量。结果:经纯化后的蝉花总多糖含量为 51.6%,水分含量为 8.7%,在 250 ~ 280 nm 间无明显吸收峰。结论:该系列纯化方法能有效地去除核酸、蛋白质、小分子物质等杂质成分,使蝉花总多糖含量达到 50% 以上;苯酚硫酸法测定蝉花总多糖含量简便、准确、重现性好。

关键词:蝉花;多糖;纯化;含量测定;Sevag 法;透析;苯酚硫酸法

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**B

蝉花为麦角菌科真菌大蝉草(*Cordyceps cicadae* Shing)及其寄主山蝉(*Cicada flammata* Dist)幼虫的干燥体,其性味甘寒,具散风热、定惊镇痉的功效。研究表明主要含多糖、氨基酸、核苷类等多种物质,具有调节免疫、调节脂质代谢、解热镇痛、镇静催眠等多种作用^[1]。其中多糖含量约占 2% ~ 3%^[2],由于蝉花中蛋白质、色素等杂质含量高,目前对于蝉花多糖的研究主要集中于粗多糖或半乳甘露聚糖等单类糖的研究,对蝉花总多糖的研究甚少。本文对粗多糖经 Sevag 法除蛋白、透析、活性炭脱色后,经苯酚硫酸法测定其总多糖含量可达 50% 以上。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器 TU-1800PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Labconco Free-Zone 2.5L 台式冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);Sartorius Bp211D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 材料 蝉花(浙江中医药大学中药饮片厂);葡萄糖标准品(中国药品生物制品鉴定所);透析袋和活性炭(华东医药股份有限公司);苯酚、硫酸、三氯甲烷、正丁醇等试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 蝉花粗多糖的制备 称取蝉花 500 g,加 8 倍量水 50 ℃ 温浸 3 次,每次 5 小时,过滤,滤液 40 ℃ 以下减压回收溶剂至 400 mL,加 95% 乙醇使其浓度为 75%,静置 24 小时,析出之沉淀即为蝉花粗多糖。

2.2 蝉花多糖的纯化 蝉花粗多糖以水溶解后,加等体积 Sevag 试剂(三氯甲烷:正丁醇=4:1)搅匀后分层,分取水层透析(截留分子量 8 000 ~ 12 000)后,浓缩成约 1 mg/ml 的浓度,加入活性炭使其浓度达到 0.5% 左右,煮沸 30 分钟脱色,最后经 0.45 μm 滤膜抽滤后,回收溶剂,冷冻干燥,即得蝉花总多糖 4.85 g。

2.3 蝉花多糖的含量测定

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取葡萄糖适量,用蒸馏水配制成 0.1 mg/ml 的葡萄糖标准品溶液,吸取葡萄糖标准液 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 ml,分别置于具塞试管中,各加蒸馏水,使体积为 2.0 ml,再加 6% 苯酚液 1.0 ml,摇匀,迅速滴加浓硫酸 5.0 ml,摇匀后放置 5 分钟,置沸水浴加热 15 分钟,取出冷水冷却至室温;另以蒸馏水 2.0 ml,同上操作做空白对照,于 490 nm 处测定吸收度(Abs)。以标准品葡萄糖量(μg)为横坐标,Abs 为纵坐标,得回归方程: $Y=0.0077X+0.0053$, $R=0.9997$,说明标准品葡萄糖量在 0 ~ 110 μg 范围内,与 Abs 呈良好的线性关系。

2.3.2 仪器精密度 取标准品溶液 0.9 ml,加蒸馏水至 2.0 ml,按标准曲线制备项下测定 Abs 值 6 次,值分别为 0.699 8、0.699 7、0.699 9、0.700 0、0.699 8、0.699 7, $RSD=0.02\%$ 。

2.3.3 样品中多糖含量测定 精密称取蝉花总多糖适量,用蒸馏水配制成 0.2 mg/ml 的供试品溶液,

吸取供试品溶液 0.5 ml, 加蒸馏水至 2.0 ml, 按标准曲线制备项下测定吸收度。

2.3.4 重现性 吸取 0.2 mg/ml 的供试品溶液 0.5 ml 3 份, 加蒸馏水至 2.0 ml, 分别按标准曲线制备项下测定 Abs, 值分别为 0.402 9、0.410 8、0.394 8, $RSD = 1.99\%$, 按回归方程求得蝉花总多糖含量为 51.6% (未减去水分含量)。

2.3.5 稳定性 取 2.3.4 重现性项下 3 份供试品分别于显色后 0、15、30、60、120 分钟测定 Abs, 结果显示 120 分钟内 $RSD = 0.37\%$, 样品溶液稳定。

2.3.6 加样回收率 取已知多糖含量的供试样品 (0.2 mg/ml) 0.5 ml, 分别添加葡萄糖标准品, 按上述测定条件测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 样品回收率试验结果 / μg

样品中总多糖的量 A	加入葡萄糖的量 B	实测总糖量 C	回收率(C-A)/B (%)	平均回收率	RSD
51.6	40	90.23	96.58	97.41	1.95
51.6	40	89.45	94.63		
51.6	50	100.62	98.04		
51.6	50	101.42	99.64		
51.6	60	111.12	99.20		
51.6	60	109.44	96.40		

2.4 蝉花总多糖中水分含量测定

采用中华人民共和国药典 2005 年版一部附录 IX G 干燥失重法测得蝉花总多糖中的水分含量为 8.7%。

3 讨论

蝉花和冬虫夏草均为麦角菌科真菌感染动物幼虫后的复合体, 其性状和成分有较多的相似性。冬虫夏草多糖经研究证实具有调节免疫、抗肿瘤、延缓衰老等多个方面药理作用确切^[3], 但其稀缺的资源

和异常昂贵的价格严重阻碍了进一步的研究和开发。蝉花资源量相对充足, 价格低廉, 其多糖含量也较高, 所以对蝉花多糖的研究和开发具有广泛的前景。

Sevag 法利用有机溶剂使蛋白质变性成不溶状态的原理除去蛋白, 透析法能去除盐和各种小分子物质, 都是经典的多糖纯化方法。本文经 Sevag 法除蛋白、透析、活性炭脱色后, 可在最大限度地保留多糖成分的前提下, 使水提醇沉的粗多糖中多糖的含量从 10% 提升至 50% 以上。经纯化后的蝉花总多糖紫外可见分光光度法 190 ~ 400 nm 扫描光谱显示, 在 194 nm 处有多糖特征性吸收峰, 在 250 ~ 280 nm 间无明显吸收峰, 表明不含有核酸、蛋白质、多肽等杂质成分; 以苯酚硫酸法测定其多糖含量, 操作简便、准确性和重现性好。

多糖的提取纯化、质量控制和结构测定都具有自身的难度和特殊性, 本文对蝉花多糖进行了初步的纯化研究和含量测定, 可基本满足药理实验的初筛, 其纯化工艺及理化性质等方面的研究都将在今后的工作中逐步开展。

参考文献

- [1] 王春雷, 芦柏震, 侯桂兰. 中国蝉花的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(4): 244-247.
- [2] 葛飞, 夏成润, 李春如, 等. 蝉拟青霉菌丝体与天然蝉花中化学成分的比较分析[J]. 菌物学报, 2007, 26(1): 68-75.
- [3] 王菊凤, 杨道德, 李鹤鸣, 等. 虫草多糖的研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(5): 附 6-8.

(收稿日期: 2008-07-16 责任编辑: 曹征)

《中医的现在与未来》征订启示

由我国著名中医基础理论学者、天津市精粹国医经验研究所所长张维耀编著的《中医的现在与未来》(第二版)已由天津科学技术出版社出版。全书 100 万字, 分为九章: 1. 命运攸关的抉择; 2. 试评中医经典著作; 3. 中医理论体系的形成; 4. 理论核心的演变; 5. 脏象学说的实质; 6. 中医系统论假说; 7. 中西医结合是里程碑; 8. 中医现代化方向; 9. 人才决定现代化的成败。

2006 年 6 月 10 日,《人民日报》海外版撰文评论此书, 认为该书“具有里程碑的意义, 是因为它具备了三个条件: 其一, 该书对经典中医学理论体系的形成作出了整体性的规范; 其二, 确定了现代中医学门类应该具备的要素和经典中医学的根本区别; 其三, 阐明了由中医学基本概念构成的现代中医基本原理和假说。该书系统介绍了经典中医学规范体系 and 未来发展方向, 论述严谨, 证明有据, 剖析深入。”所以说此书是中医学发展史上里程碑式的著作, 是经典中医学和现代中医学的分水岭, 对当前中医学、中西医结合研究中的不规范和误区, 提出了极具参考价值的论点, 在当前发扬中医学还是废弃中医学的大讨论中有较大的指导意义。

该书是中医学、中西医结合研究者, 中、高级中医师, 各级管理人员的必读之书。定价: 185 元, 求购册数较多可优惠, 书到后付款。联系地址: 天津市南开区黄河道 467 号博爱门诊; 邮编: 300110; 电话: 02227641818; 联系人: 张子超, 胡雯, 张晓芳。