

蒙药山野豌豆多糖的提取与含量测定

李 振*,云学英#,于海青,李成林,郭晓宇,况媛媛(内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010110)

中图分类号 R914.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0518-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.24

摘要 目的:优化蒙药山野豌豆多糖提取液经活性炭脱色的条件,并建立其提取及含量测定方法。方法:以水提醇沉法提取蒙药山野豌豆粗多糖。以脱色率为考察指标,设计正交试验,考察活性炭用量、脱色时间及脱色温度对粗多糖脱色的影响,优化活性炭脱色条件。以葡萄糖为对照品,采用苯酚-硫酸法,490 nm波长下经紫外分光光度法测定粗多糖中多糖含量。结果:优化的活性炭脱色条件为活性炭用量3%、脱色时间40 min、脱色温度60 ℃。以此条件对粗多糖进行脱色验证试验,平均脱色率可达19.77% (RSD=1.85%,n=3)。蒙药山野豌豆粗多糖平均提取得率为4.56% (RSD=2.38%,n=3),提取液中多糖含量为1.98% (RSD=2.18%,n=4)。结论:本试验提取多糖得率重复性较好;建立的多糖含量测定方法稳定、可行。

关键词 蒙药;山野豌豆;多糖;分光光度法;含量测定;活性炭;脱色率;正交试验

Extraction and Content Determination of Polysaccharide in Mongolian Medicine *Vicia amoena*

LI Zhen, YUN Xueying, YU Haiqing, LI Chenglin, GUO Xiaoyu, KUANG Yuanyuan (College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the decolorization condition for polysaccharide extract of Mongolian medicine *Vicia amoena*, and to establish the method for its extraction and content determination. METHODS: The water extract-alcohol precipitation was used to extract polysaccharide from Mongolian medicine *V. amoena*. Using decolorization rate as index, orthogonal test was designed to investigate the effects of the dosage of activated carbon, decolorization temperature, decolorization time on the decolorization of polysaccharide, so as to optimize the conditions for the decoloration of polysaccharide. Using glucose as control, phenol sulfuric acid method was adopted, and the content of polysaccharide in crude polysaccharide was determined by UV spectro-

[1] Rath W, Heilmann L. Thromboembolism complications most frequent cause of death after cesarean section[J]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 2001, 205(4):125-127.

[2] 滕光寿,秦明,毛峰峰,等.小茴香提取物对胃肠动力障碍小鼠胃肠运动的影响[J]. *国际中医中药杂志*, 2011, 33(8):695-697.

[3] 方龙迪.大黄不同途径给药对小鼠胃肠动力影响及作用机制的实验研究[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2012, 22(12):929-934.

[4] 丘玉昌,曹莹,孔焕育,等.少腹逐瘀汤活血化瘀及镇痛、抗炎作用的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2012, 19(6):498-499.

[5] 赵启鹏.大鼠急性血瘀模型建立及复方丹参滴丸化瘀作用研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 33(9):849-852.

[6] 刘婉书,黄晓君.妇科再造胶囊联合米非司酮对子宫肌瘤治疗作用的临床研究[J]. *中国医药*, 2014, 9(5):713-715.

[7] 汪永坚,陈晓洁,胡婵娟,等.穴位灸罐干预妇科腹部术后胃肠功能恢复的临床研究[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(11):132-133.

[8] 李卫国,陈开红,熊凯宁.服用拜阿司匹林后出现急性再生障碍性贫血[J]. *临床荟萃*, 2006, 21(9):632.

[9] 田徽,阮期平,李崇进,等.马兰水煎液对小鼠胃排空及小肠推进的影响[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(23):464-465.

[10] 孙定人,张石革.中成药内科学疾病用药:行气剂[J]. *中国药房*, 2001, 12(9):573-574.

[11] 高敏,汝明.木香顺气丸对妇产科手术后腹胀及肠功能恢复的临床观察[J]. *中医临床研究*, 2013, 5(1):91-92.

[12] 毛萌,乔玉环,郭瑞霞.妇科术后下肢深静脉血栓形成的病因及预防[J]. *山东医药*, 2010, 50(12):115-116.

[13] 刘培,宿树兰,周卫,等.香附四物汤与四物汤对急性血瘀模型血液流变性及其卵巢功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(8):124-127.

[14] 鲁雅莉,宁喜斌.血栓形成机理及溶血栓药物的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(1):169-172.

[15] 史载祥,谷万里,杜金行,等.血瘀证诊断标准修订研究构想[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007, 5(11):1037-1039.

* 硕士研究生。研究方向:中蒙药有效成分研究、药物合成。E-mail: m15147165026@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中蒙药有效成分研究、药物合成。电话:0471-6653176。E-mail: yunxueying888@sohu.com

(收稿日期:2016-10-08 修回日期:2016-12-12)

(编辑:林 静)

photometry at 490 nm. RESULTS: The optimal decoloration condition was as follows as actived carbon of 3% , decoloration time of 40 min, decoloration temperature of 60 °C. On this basis, the average decolorization rate reached 19.77% (RSD=1.85% ,n=3) by the verification test of the decoloration. The average extraction yield for the crude polysaccharide was 4.56% (RSD=2.38% ,n=3), of which the polysaccharide content was 1.98% (RSD=2.18% ,n=4). CONCLUSIONS: This experiment has relatively good reproducibility in polysaccharide yield; established method for content determination of polysaccharide is stable and feasible.

KEYWORDS Mongolian medicine; *Vicia amoena*; Polysaccharide; Spectrophotometry; Content determination; Activated carbon; Decolorization rate; Orthogonal test

蒙药山野豌豆(*Vicia amoena* Fisch.)为豆科野豌豆属植物,别名落豆秧、山黑豆、透骨草,蒙药名乌拉音-给希^[1],主要分布于我国东北及华北地区^[2]。蒙药山野豌豆全草可供药用,具有祛风湿、活血、舒筋、止痛之功效,常用于治疗风湿性关节炎、筋骨挛缩、扭闪挫伤、无名肿毒、阴囊湿疹等症^[3]。由杨巧荷等^[4]进行的化学成分分析结果得知,蒙药山野豌豆中含有蛋白质、多糖、氨基酸、非还原糖、皂苷、强心苷、内酯、香豆素类、黄酮类、甾体类、三萜类等多种化学成分,但有关蒙药山野豌豆多糖的提取与含量测定研究未见相关文献报道。多糖是由许多单糖通过苷键连接而成的高分子化合物,是一类重要的信息分子,具有多种生物活性,研究药物中的多糖含量可为其临床用药提供一定的参考。由于植物粗多糖均有颜色,颜色的深浅直接影响到多糖含量的测定结果,因此在多糖的含量测定过程中脱色是很重要的。目前用于多糖的脱色剂主要有大孔树脂、双氧水及活性炭等,大孔树脂脱色效果好,但价格较贵、操作复杂;双氧水脱色率较高,但易破坏多糖结构,氧化脱色后的色素仍留在体系中^[5];活性炭的脱色率虽然不如前两者高,但廉价易得、脱色操作简单,该法最大的优点是对多糖的结构不会造成破坏,且脱色后色素吸附在活性炭上。基于此,本试验以水提醇沉法提取蒙药山野豌豆粗多糖;选用活性炭为脱色剂,通过设计活性炭脱色的正交试验,优化其脱色条件;以苯酚-硫酸法显色后采用分光光度法测定粗多糖中多糖含量。

1 材料

1.1 仪器

TU-1901型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);TG328B型光学分析天平(上海精密科学仪器有限公司);SHZ-D III型循环水多用真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);R-1001-VN-小型旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司);HC-2518高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);DHG-9030A电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

蒙药山野豌豆于2014年7月中旬采集于内蒙古大青山,经内蒙古医科大学药学院李骁教授鉴定为豆科野豌豆属植物山野豌豆(*Vicia amoena* Fisch.)全草;D-无水葡萄糖对照品(上海市国药集团化学试剂有限公司,批号:20120415,纯度:≥99.5%);无水乙醇、丙酮、乙醚、活性炭、浓硫酸、苯酚、氯仿、正丁醇、碳酸氢钠、铝片等试

验所用试剂均为分析纯;水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 蒙药山野豌豆粗多糖的提取

按文献[6-9]方法进行提取。

称取粉碎的蒙药山野豌豆适量,加95%乙醇浸泡药材过夜,过滤,滤渣晾干后用4倍体积的蒸馏水微沸提取2次,每次2.5 h,过滤,合并滤液,得棕黄色滤液。用旋转蒸发仪浓缩滤液至适量,加入一定量的Sevage试剂除去蛋白质,用一定量活性炭在一定温度下脱色一定时间,滤去活性炭。滤液加入95%乙醇使含醇量达85%,放置过夜后以离心半径3 cm、3 500 r/min离心10 min,分离出沉淀。沉淀依次用适量无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,干燥,得蒙药山野豌豆粗多糖粉末。粗多糖粉末干燥后,置于真空干燥器中保存,备用。

2.2 活性炭脱色正交试验

2.2.1 活性炭脱色工艺优化 在单因素试验的基础上,对影响活性炭脱色的主要因素活性炭用量(A,%)、脱色时间(B,min)、脱色温度(C,°C)进行3因素3水平正交试验。分别对脱色前后的溶液进行吸光度测定,通过脱色率来优选活性炭的脱色条件^[10]。脱色率(%)=(脱色前吸光度-脱色后吸光度)/脱色前吸光度×100%。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(活性炭用量),%	B(脱色时间),min	C(脱色温度),°C
1	1	30	40
2	2	40	50
3	3	50	60

由表2可知,各因素对活性炭脱色影响的主次顺序为A>B>C,即活性炭用量>脱色时间>脱色温度。由表3可知,因素A对活性炭脱色结果有较为显著影响,B、C没有影响。由于因素C的离均差平方和较小,为提高分析的精密密度,将因素C、D的和作为误差项,脱色时间与脱色温度选择表2中平均数大的水平B₂C₃作为脱色条件,确定试验最优水平为A₃B₂C₃,即活性炭用量3%、脱色时间40 min、脱色温度60 °C。

2.2.2 工艺验证试验 以优选出的活性炭脱色条件对蒙药山野豌豆粗多糖进行脱色验证试验,平行进行3次。计算得脱色率分别为19.56%、20.08%、19.68%,平

均脱色率为19.77%,RSD=1.85%(n=3)。验证试验表明,优化后的活性炭脱色条件效果较好,工艺可行。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	因素				脱色率, %
	A	B	C	D(空白)	
1	1	1	1	1	10.98
2	1	2	2	2	7.02
3	1	3	3	3	5.20
4	2	1	2	3	12.96
5	2	2	3	1	18.61
6	2	3	1	2	11.59
7	3	1	3	2	16.31
8	3	2	1	3	16.31
9	3	3	2	1	15.39
K_1	7.73	13.42	12.96	14.99	
K_2	14.51	13.98	11.79	11.64	
K_3	16.00	10.73	13.37	11.49	
R	8.27	3.25	1.58	3.50	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	116.51	2	58.26	12.14	<0.1
B	8.97	2	4.49	0.93	>0.1
C	5.12	2	2.56	0.53	>0.1
D	14.08	2	7.04		
误差	19.20	2	4.80		

注: $F_{0.1}(2,2)=9.0, F_{0.05}(2,2)=19.0$

Note: $F_{0.1}(2,2)=9.0, F_{0.05}(2,2)=19.0$

2.3 苯酚-硫酸法测定蒙药山野豌豆多糖的含量

按文献[11-12]方法测定含量。

2.3.1 蒙药山野豌豆粗多糖的提取得率 按“2.1”“2.2.2”项下方法在相同条件下进行3次提取试验,按文献[13]计算蒙药山野豌豆粗多糖得率,即粗多糖得率(%)=(粗多糖质量/样品质量)×100%。结果,3次提取试验粗多糖得率分别为4.58%、4.40%、4.66%,平均得率为4.56%,RSD=2.38%(n=3)。将蒙药山野豌豆粗多糖100 mg,用蒸馏水溶解定容至100 mL量瓶中,即得供试品溶液。

2.3.2 苯酚溶液的制备 取苯酚100 g,加铝片约0.1 g、碳酸氢钠0.05 g,蒸馏收集180℃的馏分,称取此馏分10.0 g,加蒸馏水150 g,放置于棕色瓶中,备用。

2.3.3 葡萄糖对照品溶液的制备 精密称取100℃干燥至恒质量的葡萄糖对照品100 mg,置于100 mL量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,即为对照品溶液。

2.3.4 测定波长的确定 取对照品溶液和供试品溶液适量,分别经苯酚-硫酸试剂显色后,于400~800 nm波长范围内进行扫描,结果均在490 nm波长处有最大吸收峰。因此,选择490 nm作为测定波长。

2.3.5 线性关系考察 精密量取0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL葡萄糖对照品溶液,分别置于50 mL量瓶中,加蒸馏水定容。分别精密量取上述溶液2 mL,置

于10 mL量瓶中,各加入5%苯酚试剂1.0 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸5.0 mL摇匀,放置5 min,置于沸水浴中加热15 min,取出,迅速冷却至室温,于490 nm波长处测定吸光度。以吸光度(y)为纵坐标、葡萄糖质量浓度(x, mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y=14.661x+0.1222 (R^2=0.9969)$ 。结果表明,葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.01~0.07 mg/mL。

2.3.6 精密度考察 精密称取供试品溶液2 mL,共6份,按“2.3.5”项下方法操作,测定吸光度。结果,吸光度的RSD=0.26%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.3.7 稳定性考察 精密称取供试品溶液2 mL,按“2.3.5”项下方法操作,在0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0 h时测定吸光度。结果,在7 h内吸光度的RSD=0.96%(n=8),表明供试品溶液在7 h内稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 精密量取蒙药山野豌豆2.5 g(相当于114 mg粗多糖),共6份,按“2.1”“2.2.2”项下方法制备蒙药山野豌豆粗多糖。将所制粗多糖定容于100 mL量瓶中,取出1 mL定容于50 mL量瓶中。精密量取上述溶液2 mL,按“2.3.5”项下方法操作,以蒸馏水为空白对照,测定吸光度。按回归方程计算葡萄糖质量浓度,按文献[5]计算粗多糖中多糖含量,即多糖含量(%)= $c \times D/m \times 100\%$ 。式中,m为粗多糖样品质量,D为粗多糖的稀释倍数,c为葡萄糖质量浓度。再计算样品多糖含量(%),即多糖含量=粗多糖中多糖含量×粗多糖得率(得率取“2.3.1”项下平均值4.56%)。结果,多糖含量的RSD=1.98%(n=6),表明方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 精密称取已知含量的蒙药山野豌豆粗多糖样品溶液,共6份,分别加入0.01 mg/mL的葡萄糖对照品溶液0.2 mL,按“2.3.5”项下方法操作,测定吸光度。计算得平均加样回收率为97.27%,RSD=2.78%(n=6)。

2.3.10 蒙药山野豌豆多糖含量的测定 精密称取蒙药山野豌豆粗多糖100 mg,溶解并定容至100 mL量瓶中。精密量取该溶液1 mL,加蒸馏水定容于50 mL量瓶中。精密量取上述溶液2 mL,按“2.3.5”项下方法操作,测定吸光度。按回归方程计算葡萄糖含量,按“2.3.8”项下公式计算样品中多糖含量。结果多糖平均含量为1.98%,RSD=2.18%(n=4)。

3 讨论

植物多糖具有抗肿瘤、抗炎、抗衰老、抗辐射、抗病毒、降血脂、降血糖及保肝等多种生物活性,常作为评价药材质量的一个重要指标。本试验以水提醇沉法对蒙药山野豌豆粗多糖进行了提取,得到的棕黄色粗多糖产率为4.56%;以葡萄糖作为对照品,采用苯酚-硫酸法,测得的蒙药山野豌豆多糖含量为1.98%。该含量测定方法精密度好、稳定,平均加样回收率为97.27%。由于粗多糖黏度较大,分离时过滤费时、费力,本试验选用离心

基于追踪方法学的高危药品管理评审评价体系的应用效果分析^Δ

李玉珍^{1*}, 刘庭芳^{2#} (1.深圳市福田区人民医院药学部, 广东深圳 518033; 2.清华大学医院管理研究院, 北京 100084)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0521-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.25

摘要 目的:探讨追踪方法学在医院高危药品管理持续改进中的应用及可行性,提升医院高危药品管理质量,保障临床用药安全。方法:根据追踪方法学的理论与要求,描述我院在管理高危药品方面采取的一系列干预措施,通过比较运用追踪方法学前后医护人员对高危药品知识掌握程度、医院高危药品评审评价结果以及不良事件发生率的变化,评价追踪方法学对高危药品管理的改进效果。结果:通过采取精简高危药品目录、对医务人员进行高危药品培训等干预措施后,与管理前比较,医务人员对高危药品知识的掌握程度提高(平均知晓率从69.6%提高至88.5%)、高危药品的评审评价结果显著改善(评价结果为合格级及以上者占比由66.67%提升至88.89%)、高危药品的不良事件发生率降低(由0.321%降低至0.139%)。结论:追踪方法学对我院高危药品管理的改进效果显著,具有较强的可行性,可在医院高危药品管理工作中推广使用。

关键词 追踪方法学;高危药品;持续改进;评审评价;应用效果

Analysis of the Application Effects of High-alert Medications Management Review and Evaluation System Based on Tracer Methodology

LI Yuzhen¹, LIU Tingfang² (1.Dept. of Pharmacy, Shenzhen Futian District People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518033, China; 2.Institute for Hospital Management, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

机分离,不但缩短了分离时间,也避免了操作过程中的产品损失。通过设计活性炭脱色的3因素3水平正交试验,优化出了脱色条件,即活性炭用量为3%、脱色时间为30 min、脱色温度为60℃。用此条件脱色粗多糖,平均脱色率可达19.77%。与文献[6]报道的活性炭在酸性条件下进行脱色比较,本脱色工艺脱色率偏低,但在酸性条件下加热脱色可促使多糖水解,损失率也较高^[7]。因此选择在不加酸的条件下对粗多糖脱色,虽然脱色率有所降低,但可避免多糖的结构遭到破坏。

综上所述,本试验提取多糖得率重复性较好;建立的多糖含量测定方法稳定、可行。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编:上[M].北京:人民卫生出版社,1992:298.
- [2] 宋敏,于洪柱,姜玉洁,等.山野豌豆生物学特性及其利用[J].草业与畜牧,2011(4):5-6.
- [3] 孙琛,高昂,巩江,等.野豌豆属植物药学研究概况[J].安徽农业科学,2011,39(14):8386-8394.

- [4] 杨巧荷,罗素琴,刘乐乐,等.蒙药材山野豌豆中的化学成分定性分析[J].内蒙古医学院学报,2010,32(5):475-477.
- [5] 周鸿立,吴德恒,董卫权,等.玉米须多糖脱色工艺条件的研究[J].上海中医药杂志,2010,44(4):76-79.
- [6] 李向东,惠和平,封士兰,等.红芪多糖的脱蛋白及脱色素工艺[J].生物医药,2010,17(3):40-41.
- [7] 张霞,聂少平,李景恩,等.夏枯草中多糖的提取与含量的测定[J].食品研究与开发,2012,33(12):81-84.
- [8] 镇卫国,张红梅,杨晓丰,等.武当道茶茶多糖的提取及含量测定[J].湖北医药学院学报,2015,34(2):166-169.
- [9] 赵惠茹,张小娟.山茱萸多糖提取工艺和含量测定方法的研究[J].时珍国医国药,2013,24(10):2396-2398.
- [10] 王维香,王晓君,黄潇,等.川芎多糖脱色方法比较[J].离子交换与吸附,2010,26(1):74-82.
- [11] 潘琼,徐力生,吴承霖,等.二精方多糖提取工艺实验及含量测定[J].时珍国医国药,2014,25(8):1856-1858.
- [12] 李成元,蔡晓.2种灵芝多糖含量测定方法的比较[J].中国药房,2009,20(18):1416-1417.
- [13] 刘小燕,李朝品,朱涛,等.酶法提取中国圆田螺多糖的工艺优选[J].中国药房,2015,26(19):2708-2710.

(收稿日期:2016-03-23 修回日期:2016-10-27)

(编辑:余庆华)

^Δ 基金项目:深圳市福田区卫生公益性科研项目(No.FT-WS2015016)

* 主任药师。研究方向:医院药学、药事管理。电话:0755-8398222-88377。E-mail:yuzhen628@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:医院管理。E-mail:xjcw-gh@sina.com