

金英黄归汤的工艺改进对总多糖含量的影响

周送桂, 李欣, 李中改, 张小艺, 王鲁, 何珺*

(贵州大学 贵州省生化工程中心, 药学院, 动物科学学院, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:改进金英黄归汤的制备工艺,为提高金英黄归汤中总多糖的含量和提升该制剂品质提供参考。方法:金英黄归汤原制备工艺中删除石油醚的萃取步骤,将 70%、75% 及 80% 逐步醇沉改为 80% 一步醇沉,通过 GC-MS 联用仪分析金英黄归汤总多糖中单糖组分,程序升温(初始温度 60 °C,保持 2 min,以 20 °C·min⁻¹升温至 180 °C,保持 30 min,以 10 °C·min⁻¹升温至 260 °C,运行 46 min),汽化室温度 250 °C,载气为高纯氦气(99.999%),柱前压 5.27 × 10⁴ Pa,载气流量 1.0 mL·min⁻¹,溶剂延迟时间 7.0 min。离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,电子能量 70 eV,发射电流 34.6 μA,接口温度 280 °C。采用苯酚-硫酸比色法比较了改进前后金英黄归汤中总多糖的含量差异。结果:工艺改进前后金英黄归汤中总多糖的单糖组分均为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖,摩尔分数比分别为 0.08:0.08:0.02:0.03:1:0.04,0.05:0.07:0.02:0.05:1:0.08。工艺改进前后总多糖平均质量浓度分别为 11.52,22.69 g·L⁻¹。结论:建立的总多糖检测方法简单、准确、重复性好,可用于金英黄归汤中总多糖的含量测定,工艺改进有利于提高该制剂中多糖类成分的含量。

[关键词] 金英黄归汤; 气相色谱-质谱联用; 苯酚-硫酸法; 总多糖; 葡萄糖

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0065-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080065

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160311.1049.026.html>

[网络出版时间] 2016-03-11 10:49

Effect of Process Improvement of Jinying Huanggui Decoction on Content of Total Polysaccharides

ZHOU Song-gui, LI Xin, LI Zhong-gai, ZHANG Xiao-yi, WANG Lu, HE Jun*

(College of Animal Science, School of Pharmaceutical Sciences,

Biochemistry Engineering Center of Guizhou Province, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To improve preparation process of Jinying Huanggui decoction for increasing the content of total polysaccharides in this preparation. **Method:** Step of petroleum ether extraction in preparation process of Jinying Huanggui decoction had been deleted, changed 70%, 75% and 80% alcohol precipitation step to 80% alcohol precipitation by one step. Monosaccharide composition in total polysaccharides from Jinying Huanggui decoction was analyzed by GC-MS. Comparison of the content of total polysaccharides before and after process improvement was determined by phenol-sulfuric acid colorimetry. **Result:** Monosaccharide composition in total polysaccharides was composed of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose with molar ratio of 0.08:0.08:0.02:0.03:1.00:0.04; after process improvement, this molar ratio was 0.05:0.07:0.02:0.05:1.00:0.08. Before and after process improvement, average concentrations of total polysaccharides in Jinying Huanggui decoction were 11.52, 22.69 g·L⁻¹, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and reproducible, it can be used for determination of total polysaccharides of Jinying Huanggui decoction. Process improvement of this preparation is in favor of increasing of total polysaccharides content.

[收稿日期] 20150626(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31260618)

[第一作者] 周送桂,在读硕士,从事药物化学研究,E-mail:565345638@qq.com

[通讯作者] *何珺,副教授,硕士生导师,从事天然产物活性成分分离提取及分析测试研究,E-mail:hejun1016@163.com

[Key words] Jinying Huanggui decoction; GC-MS; phenol-sulfuric acid method; total polysaccharides; glucose

中药多糖类物质及其衍生物因具有增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗衰老等药理作用^[1],越来越引起科研人员的关注与研究。金英黄归汤是本课题组前期研制而成复方制剂,由金银花、连翘、蒲公英、大黄、当归等 8 味中药组成,具有良好的清热解毒、消肿散结、抗炎作用^[2],对金黄色葡萄球菌有抑杀作用^[3],对金黄色葡萄球菌引起乳房炎的家兔血清及乳汁中白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的分泌也有显著抑制作用^[4],并在奶牛隐性乳房炎的治疗方面取得了良好效果^[5]。前期研究发现金英黄归汤含有一定量多糖类成分,但含量不高,制备工艺繁琐,有机试剂使用多、损耗大。本实验采用 GC-MS 联用仪分析金英黄归汤中多糖类的单糖组分,通过苯酚-硫酸法建立总多糖的含量测定方法^[6-10],分析金英黄归汤工艺改进对其多糖类成分含量的影响,为该制剂的质量控制及制备工艺改进提供参考。

1 材料

HP6890/5975C 型 GC/MS 联用仪(美国安捷伦公司),MultiskanGo 型全波段酶标仪(美国 Thermo 公司),TE64 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。葡萄糖对照品(成都金山化学试剂有限公司,批号 20140620),核糖、甘露糖、阿拉伯糖对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 830A026,526A022,215A044),鼠李糖、半乳糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111683-200401,100226-200404),木糖、果糖对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 55086-6,57-48-7),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。金银花、蒲公英、瓜蒌、连翘、大黄、黄芪、当归于 2013 年购自贵阳市同济堂药店(药品 GMP 证号黔 J0190),均经贵州省生化工程中心王鲁教授和贵州大学农学院王华磊教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版相关项下要求;芙蓉花于 2013 年 10 月采自贵阳花溪湿地公园。

2 方法与结果

2.1 金英黄归汤的制备^[4] 将 8 味中药按处方比例混合,称取 150 g,加 50% 乙醇 1.5 L 浸泡 30 min,回流提取 2 h,多层纱布过滤。药渣加 50% 乙醇 1.2 L 回流提取 1.5 h,多层纱布过滤,合并滤液,旋转蒸发至无醇味,加水定容至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。加入石油醚萃

取,水相浓缩至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。加乙醇连续醇沉 3 次,溶液中乙醇体积分数依次为 70%,75% 及 80%,每次于 4 °C 进行醇沉 24 h,取 80% 乙醇醇沉后的上清液于 52 °C 旋转蒸发,向浓缩液加入注射用水,制备成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,得澄明透亮的淡黄色液体状。加入 0.5% 活性炭,煮沸,搅拌 15 min,过滤到热源处理后的量筒中,制备成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液,用氢氧化钠调 pH 7.2,过 0.22 μm 微孔滤膜除菌,得金英黄归汤。

2.2 金英黄归汤制备工艺改进 将 2.1 项下石油醚萃取步骤除掉,同时将醇沉数改为 1 次,使溶液中乙醇体积分数 80%,后续操作同 2.1 项。

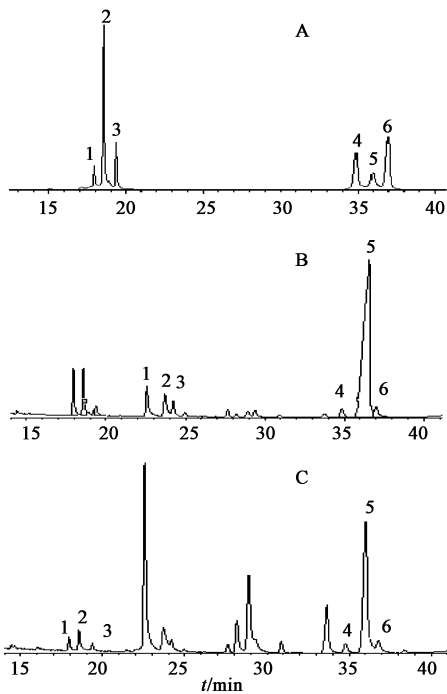
2.3 总多糖的单糖组分分析^[11-12]

2.3.1 总多糖的水解 分别取工艺改进前后的金英黄归汤 0.2 mL 置于安剖瓶中,分别加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 2 mL,封口,100 °C 水解 8 h,冷却至室温,转入梨形瓶中,多次加无水乙醇减压蒸除三氟乙酸直至无酸味,加水蒸干除去无水乙醇,备用。

2.3.2 检测条件 ZB-5MSI 5% Phenyl-95% DiMethylpolysiloxane 弹性石英毛细管柱(0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μm);初始温度 60 °C,保持 2 min,以 $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 180 °C,保持 30 min,以 $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 260 °C,运行 46 min;汽化室温度 250 °C,载气高纯氦气(99.999%),柱前压 $5.27 \times 10^4 \text{ Pa}$,载气流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,不分流,溶剂延迟时间 7.0 min。离子源为 EI 源,离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,电子能量 70 eV,发射电流 34.6 μA ,倍增器电压 1.294 kv,接口温度 280 °C, m/z 29 ~ 500。

2.3.3 单糖衍生化的制备与分析^[13-17] 取适量样品,加入硼氢化钠 30 mg,加水 1 mL 使溶解,室温下放置 1.5 h,使得糖样还原为相应的糖醇,滴入乙醇分解过量的硼氢化钠。溶液于 60 °C 减压浓缩至干,加入 0.1% 盐酸甲醇溶液 2 mL 使溶解,减压干燥,重复多次后,在 100 °C 烘箱中加热除去水分,加入吡啶 1 mL 溶解糖醇,转入安剖瓶中,加入乙酸酐 1 mL,封口,在 100 °C 烘箱中反应 1 h,冷却至室温,吸取 0.5 μL 直接进样。见图 1。

对总离子流图中的各色谱峰经质谱计算机数据系统检索及核对 Nist2005 和 Wiley275 标准质谱图,分别确定了工艺改进前后的金英黄归汤水解液中单



A. 混合对照品; B. 改进前样品; C. 改进后样品; 1. 鼠李糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 木糖; 4. 甘露糖; 5. 葡萄糖; 6. 半乳糖

图 1 金英黄归汤总多糖中单糖组分 GC-MS 分析
Fig. 1 Analysis of monosaccharide composition in total polysaccharides from Jinying Huanggui decoction by GC-MS

糖组分,用峰面积归一化法测定各单糖的摩尔分数比。结果发现工艺改进前后金英黄归汤中总多糖的单糖组分均为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖,摩尔分数比分别为 0.08:0.08:0.02:0.03:1:0.04,0.05:0.07:0.02:0.05:1:0.08。表明金英黄归汤中总多糖的主要单糖成分为葡萄糖,其他几种单糖比例均不足葡萄糖的 10%,故选择葡萄糖对照品为参照进行金英黄归汤中总多糖的含量测定。

2.4 总多糖检测方法的建立

2.4.1 标准曲线的绘制

精密量取苯酚溶液 2.5 mL 置于 50 mL 具塞量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,得 5% 苯酚溶液。精密称取于 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖 50 mg,置 50 mL 具塞量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,得 1 g·L⁻¹ 葡萄糖对照品溶液。精密量取葡萄糖对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置具塞试管中,加水至 2 mL,摇匀,分别加 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,迅速摇匀,室温静置 10 min,40 °C 放置 18 min,用水做空白,于 490 nm 处测定吸光度 A。以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 23.902X - 0.151 (R^2 = 0.9995)$,线性范围 0.025 ~

0.125 g·L⁻¹。

2.4.2 精密度试验

精密量取金英黄归汤 0.01 mL,按 2.4.1 项下方法显色和测定,平行测定 6 次 A,结果 RSD 1.6%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验

精密量取金英黄归汤 0.01 mL,按 2.4.1 项下方法显色和测定,每隔 20 min 记录 1 次 A,记 5 次,结果 RSD 0.3%,表明供试品溶液在 80 min 内稳定性好。

2.4.4 重复性试验

精密量取同一金英黄归汤 6 份,按 2.4.1 项下方法显色和测定,平行测定 5 次,计算总多糖含量的 RSD 1.3%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验

精密吸取金英黄归汤 0.01 mL,共 5 份,各加入葡萄糖对照品溶液 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mL,按 2.4.1 项下方法显色和测定,根据标准曲线方程计算平均加样回收率 101.23%,RSD 0.7%。

2.5 样品测定

精密量取工艺改进前的 3 批金英黄归汤各 0.01 mL 置具塞试管中,按 2.4.1 项下方法显色和测定,计算总多糖质量浓度分别为 12.37, 10.93, 11.25 g·L⁻¹。精密量取 3 批工艺改进后的金英黄归汤各 0.01 mL 置具塞试管中,分别加水至 2 mL,各精密量取 0.5 mL 置具塞试管中,按 2.4.1 项下方法显色和测定,计算总多糖质量浓度分别为 21.14, 21.99, 24.95 g·L⁻¹。

3 讨论

金英黄归汤中大黄、当归、黄芪及蒲公英药材均含有丰富的多糖类成分,通过对金英黄归汤中总多糖进行含量测定,同时分析制备工艺的改进对总多糖含量的影响,可为该制剂的质量控制及制备工艺的改进提供参考。复方制剂中多糖类成分的分布情况复杂多样,研究复方中总多糖含量,需要对不同相对分子质量的多糖类成分尽量提纯分析。蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法是测定总多糖含量的 2 种经典方法。苯酚-硫酸法用于甲基化的糖类成分的测定,而蒽酮-硫酸法可测定所有的碳水化合物^[18]。但苯酚-硫酸法方法简便、灵敏度高,试验时基本不受蛋白质存在的影响,适用于对单糖、寡糖及均多糖的含量测定。对于均多糖,可直接以其组成糖作标准曲线,但对于由不同糖残基构成的杂多糖,情况则较为复杂,不同单糖的标准曲线的斜率不同,需要用其单糖混合组分作为对照品进行检测。对于单糖组分的分析,常采用 GC 或 HPLC 示差检测器。本文采用灵敏度极高的 GC-MS 联用仪,与 GC 相比,其定性

参数增加、定性可靠、定量精度较高,且同时对多种化合物进行测量不会受基质干扰,使结果准确度高、说服力更强。金英黄归汤中总多糖的主要单糖成分为葡萄糖,其他几种单糖比例较低,故选葡萄糖对照品为参照进行含量测定。

本文使用与紫外分光光度计原理相同的酶标仪来进行总多糖的检测。酶标仪可以1次测定多个样和多个值,且样品用量极少,简便快捷且结果准确度高,避免了采用紫外风光光度计只能1次测定1个样,从而导致测量时间慢、影响样品的显色时间等问题,进而可能影响实验结果的准确性。在金英黄归汤的制备过程中,醇沉的主要目的是除去制剂中蛋白质、糊化淀粉、黏液质、油脂、树脂等杂质。但制备过程中三步醇沉具有试剂用量多、成本高、时间消耗多等缺点,同时也增加了多糖类成分的损失。在改进工艺中,除去石油醚萃取步骤,且采用一步醇沉,即达到了去除蛋白质、树脂、油脂、脂溶性色素等杂质的效果,还可减少试剂用量、降低成本、节约时间,同时也显著减少了金英黄归汤中总多糖的损失,说明制备工艺的改进对该制剂的工业生产具有一定的参考意义。

[参考文献]

[1] 张永文. 中药多糖成分的质控及评价要点[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(3): 260-262.

[2] 覃英克, 郭庆, 王鲁, 等. 8个中药组方抗炎活性的筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011, 11(6): 126-127.

[3] 杨航, 张小艺, 王鲁. 金英黄归液的抑菌作用分析[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(9): 169-173.

[4] Wang L U, He C L, He B K, et al. Effects of Jin-Ying-Tang on Staphylococcus aureus-induced mastitis in rabbit[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2012, 34(5): 786-793.

[5] 郭庆, 王鲁, 朱伟, 等. 中药透皮剂的制备及其对奶牛

隐性乳房炎临床疗效[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(5): 45-46.

[6] 黄越燕, 谭荣德, 吴世平. 龙葵总多糖的闪式提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 24-26.

[7] 张康逸, 路凤银, 宋范范, 等. 鲜食甜玉米粒多糖含量检测方法研究[J]. 河南农业科学, 2015, 44(1): 146-148.

[8] 刘晓涵, 陈永刚, 林励, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 270-272.

[9] 牟珍珍, 王明芳, 高雯雯, 等. 桑黄总多糖的提取及其单糖组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 13-16.

[10] 杨宝慧. 不同产地绞股蓝中多糖的含量测定[J]. 药学研究, 2013, 32(7): 387-389.

[11] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 10-27.

[12] 王长振, 丛建波, 先宏, 等. 海藻提取物中岩藻糖与半乳糖的摩尔比分析[J]. 解放军药学报, 2006, 22(5): 377-378.

[13] 许晓霞. 大黄多糖的组分及结构分析[J]. 中国现代医学, 2012, 50(32): 93-94.

[14] 李卫燕, 李萍, 闫涵威, 等. 当归多糖的结构研究进展[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(3): 322-324.

[15] 屠婕红, 余菁, 盛静. 瓜蒌多糖的提取及组分分析[J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(3): 240-242.

[16] 李玉平, 张利, 黎晓敏. 金银花多糖的研究概况[J]. 饲料博览, 2011(2): 21-23.

[17] 高金波, 孙丽娜. 柱前衍生化 HPLC 分析蒲公英多糖的单糖组成[J]. 中国现代应用药学杂志, 2010, 27(1): 55-57.

[18] 张杰, 李春燕, 李劲平, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定竹节参多糖含量的比较研究[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 424-426.

[责任编辑 刘德文]