

桂枝汤水提液中总多糖含量的测定

牛晓红¹, 柏冬², 宋剑南^{2*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;

2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立分光光度法测定桂枝汤水提液中总多糖含量的方法。方法: 以葡萄糖为对照品, 苯酚-硫酸比色法测定桂枝汤水提液中总多糖的含量。结果: 葡萄糖在 19.62 ~ 117.70 mg·L⁻¹ 与吸光度成良好线性关系, 平均回收率为 99.3%, RSD 2.5% (n=6)。结论: 该方法简便易行, 重复性良好, 可作为桂枝汤水提液中总多糖含量测定的方法。

[关键词] 桂枝汤水提液; 总多糖; 分光光度法; 苯酚-硫酸法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0066-03

[doi] 10.11653/syfy2013130066

Content Determination of Total Polysaccharide in the Guizhitang Decoction by Colorimetry

NIU Xiao-hong¹, BAI Dong², SONG Jian-nan^{2*}

(1. Experiment Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for content determination of total polysaccharide in Guizhitang decoction. **Method:** Glucose was used as the reference substance, and phenol-sulfuric acid was applied as coloring reagent to determine the content of total polysaccharide. **Result:** The calibration curve of glucose showed good linearity in the range of 19.62-117.70 mg·L⁻¹. The average recovery rate was 99.28%, and RSD was 2.5% (n=6). **Conclusion:** The determination method is simple, sensitive and accurate, which can be used for evaluating the content of total polysaccharide in Guizhitang decoction.

[Key words] Guizhitang decoction; total polysaccharide; colorimetry; phenol-sulfuric acid; content determination

桂枝汤出自张仲景的《伤寒论》,由桂枝、炙甘草、炒白芍、大枣、生姜组成,主要作用为解肌发表、调和营卫,历代医家称誉此方为仲景“群方之冠”。以往对桂枝汤的研究主要侧重于桂枝汤中的脂溶性成分^[1-2],而忽视了桂枝汤中的多糖类成分。有研究表明桂枝汤中多糖类成分具有药理活性,能促进经细菌脂多糖诱导的巨噬细胞释放 IL-6, IL-8, 其效

应具有浓度差异性^[3]。为了对桂枝汤中多糖类成分进行系统研究,本文采用硫酸-苯酚法测定桂枝汤水提液中总多糖的含量。

1 材料

1.1 仪器 8453 型紫外-可见分光光度计(美国,安捷伦), HW·SY11-K 型数显恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司), CX-250 超声波清洗机(天海双龙医疗设备有限公司)。

1.2 试剂 无水葡萄糖对照品(供含量测定用,中国药品生物制品检定所,批号 110833-200302)。硫酸,苯酚,无水乙醇(均为分析纯,北京化工厂)。桂枝汤中桂枝、炒白芍、炙甘草、大枣、生姜等药材均购自北京同仁堂药店,实验室自制 3 批桂枝汤水提液

[收稿日期] 20120502(324)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572334)

[第一作者] 牛晓红,副主任技师,从事中药学相关研究, Tel: 13691194232, E-mail: bjxhniu@126.com

[通讯作者] * 宋剑南,研究员,从事中药学相关研究, Tel: 010-64076065, E-mail: sjn2003@sina.com

(批号分别为 20080610,20080611,20080612)。

2 方法与结果

2.1 桂枝汤水提液的制备 根据处方分别称取桂枝 9 g,炒白芍 9 g,炙甘草 6 g,生姜 9 g,大枣 3 枚加入 8 倍量的水,浸渍 30 min,煎煮 30 min,过滤,滤液浓缩定容至相当生药量的 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取无水葡萄糖对照品 12.26 mg,置 25 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取桂枝汤水提液 10 mL,置离心管中, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,精密吸取上清液 1.0 mL 至离心管中,加入 9 mL 无水乙醇, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倾去上清液,残渣用无水乙醇洗涤 2~3 次后转移至 50 mL 平底烧瓶中,精密加入 25 mL 蒸馏水,称定质量,加热回流 30 min,取出,放冷,再称定质量,用蒸馏水补足减失的质量,滤过,即得。

2.4 检测波长的确定 精密吸取 2.1 项下的对照品溶液 3.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取稀释后的葡萄糖对照品溶液及 2.3 项下供试品溶液 1 mL 置 10 mL 具塞试管中,精密加入 4% 苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 7.0 mL,摇匀后于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中保温 30 min,取出,置冰水浴中冷却至室温。精密吸取 1.0 mL 蒸馏水按照以上方法显色作为空白试剂,照紫外-可见分光光度法在 $400 \sim 600 \text{ nm}$ 进行扫描,结果葡萄糖对照品和供试品溶液的最大吸收波长均为 485 nm,故选择 485 nm 为检测波长。

2.5 标准曲线的制备 精密吸取 2.1 项下的对照品溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加水稀释并定容至刻度,摇匀。精密吸取上述各溶液 1 mL,分别置于 10 mL 具塞试管中,分别精密加入 4% 苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 7.0 mL,摇匀后于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中保温 30 min,取出,置冰水浴中冷却至室温。以相应试剂为空白,测定 485 nm 波长处吸光度为 0.152 4,0.278 5,0.435 6,0.582 1,0.730 1,0.875 1。以对照品溶液质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标,吸光度 (A) 为纵坐标绘制标准曲线,回归方程 $Y = 0.007X - 0.002$ ($r = 0.999\ 6$),结果表明葡萄糖溶液浓度在 $19.62 \sim 117.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度成良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取 2.5 项下质量浓度为 $58.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液 1 mL,按 2.4 项下方法显色后,连续测定 6 次,计算吸光度 RSD,结

果显示,对照品溶液显色后吸光度 RSD 1.8%,表明该方法精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取 2.3 项下供试品溶液(批号 20080610)1 mL,按 2.4 项方法显色后,每隔 10 min 测定一次溶液的吸光度,计算吸光度 RSD。

结果显示,供试品溶液显色后 60 min 内吸光度的 RSD 1.2%,表明供试品溶液显色后 60 min 内稳定。

2.8 重复性试验 吸取同一批桂枝汤水提液(20080610)10 mL,共 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液。按 2.5 项下方法显色后,以相应试剂为空白,测定 485 nm 波长处吸光度,计算样品中总多糖的含量。结果显示,样品中总多糖的含量分别为 11.96,11.76,11.51,11.94,11.36,11.89 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,平均含量为 $11.74 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,RSD 2.1%,说明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 取同一批次已知总多糖含量的桂枝汤水提液(批号 20080610) ($11.74 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),离心后取上清液 0.5 mL,平行 6 份,按 2.3 项下方法用乙醇沉淀多糖后,精密加入浓度为 $0.214 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液 25 mL,加热回流 30 min,放冷后,称重,用蒸馏水补足质量,过滤后按 2.5 项下方法显色,测定 485 nm 波长处吸光度,计算回收率,结果见表 1。结果显示本方法平均回收率为 99.28%,RSD 2.5%,说明本方法准确性良好。

表 1 桂枝汤水提液总多糖加样回收率试验

No	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	5.87	5.35	11.18	99.3	99.3	2.5
2	5.87	5.35	11.01	96.1		
3	5.87	5.35	11.03	96.5		
4	5.87	5.35	11.27	100.9		
5	5.87	5.35	11.33	102.1		
6	5.87	5.35	11.27	100.9		

2.10 样品含量测定 3 批桂枝汤水提液样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.5 项下方法测定,计算样品中总多糖含量,结果分别为 11.74% ($n=3$,批号 20080610)、11.21% ($n=3$,批号 20080611)、11.89% ($n=3$,批号 20080612)。

3 讨论

本研究利用多糖不溶于无水乙醇,而溶于热水的性质,对桂枝汤水提液中多糖类成分进行分离纯化。先用无水乙醇将水提液中多糖类成分沉淀后分离,然后利用热水提取并过滤,除去沉淀物中的脂溶

云南松松塔药材质量标准

张志琴^{1,2}, 刘光明¹, 杨永寿¹, 肖培云^{1*}

(1. 大理学院药学院, 云南 大理 671000; 2. 楚雄医药高等专科学校, 云南 楚雄 675000)

[摘要] 目的: 建立松塔药材的质量标准。方法: 生药学研究, 浸出物测定法, 灰分测定法, 水分测定法, TLC 及 HPLC 色谱法。采用 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 110A 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-2% 冰醋酸水溶液(90:10), 流速 0.9 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm。结果: 对 12 个不同来源的松塔药材浸出物、总灰分、酸不溶性灰分和水分进行了测定, 同时对其活性成分异海松酸进行了 TLC 鉴别和 HPLC 定量研究。通过研究, 将松塔药材质量标准定为: 水分不超过 12%, 总灰分不超过 1.3%, 浸出物不低于 3.9%。异海松醇含量不低于 0.19%。结论: 建立了松塔药材的质量控制标准。

[关键词] 松塔; 质量标准; 异海松酸; 高效液相色谱; 薄层色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0068-04

[doi] 10.11653/syfy2013130068

Research on Quality Specification of Pinecone

ZHANG Zhi-qin^{1,2}, LIU Guang-ming¹, YANG Yong-shou¹, XIAO Pei-yun^{1*}

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China;

2. Chuxiong Medical College, Chuxiong 675000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop identification and assay methods of pinecone. **Method:** Pharmacognostic studies, extract mensuration, ash determination, moisture measuring method, and the bioactive constituents were analyzed by TLC and HPLC. In the HPLC method, isopimaric acid was separated on phenomenex

[收稿日期] 20120203(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260632); 云南省教育厅科学研究基金(2012Y328)

[第一作者] 张志琴, 硕士, 讲师, 从事中药材及其制剂质量研究, Tel:18987832393, E-mail: cxyzzq@163.com

[通讯作者] * 肖培云, 硕士, 教授, 从事中药材及其制剂质量研究, Tel:15808729786, E-mail: xpy990120@126.com

性成分, 制得多糖供试品溶液。

苯酚-硫酸法为测定多糖的经典方法之一。多糖在硫酸作用下水解成单糖, 并迅速脱水生成糖醛衍生物, 与苯酚缩合成有色化合物, 然后用分光光度法测定其含量^[4-5]。显色剂中的苯酚、硫酸用量、显色时间、温度等因素均会影响测定效果, 本实验对各影响因素进行了单因素考察, 确定了最佳显色条件。

方法学考察表明, 本方法简便快捷、灵敏度高, 可作为桂枝汤水提液中总多糖含量的检测与控制方法。

[参考文献]

[1] 李沧海, 周军, 霍海如, 等. 桂枝汤及其活性成分对

EP3 受体激动剂诱导发热的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11):1056.

[2] 刘敏, 谭余庆, 黄敬耀. 桂枝汤主要成分对 PGE2 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经 cAMP-PKA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2):35.

[3] 柏冬, 范斌, 牛晓红, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定桂枝汤中 5 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 30(1):1.

[4] 张璐, 翁立冬, 刘莉, 等. 苯酚-硫酸法测定乌梅多糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):107.

[5] 刘瑾, 史万忠, 李世芳, 等. 金力胶囊中多糖含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 16(7):34.

[责任编辑 顾雪竹]