

蒽酮-硫酸比色法测定三黄糖敏汤中多糖的含量^Δ

靳淑敏^{1*}, 齐鹏成², 周娜², 张丽英¹, 董振咏¹, 韩茹¹, 耿文婧¹, 白莉^{1#} (1. 石家庄市第一医院药学部, 石家庄 050011; 2. 河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0811-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.31

摘要 目的: 建立三黄糖敏汤中多糖含量的测定方法。方法: 采用蒽酮-硫酸比色法。以无水葡萄糖为对照品, 在625 nm处测定吸光度。蒽酮-硫酸试剂用量为4.0 ml, 沸水浴加热时间为5 min。结果: 葡萄糖的质量浓度在5.0~13.4 μg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系($r=0.998\ 5$); 精密度的RSD $<2\%$, 重复性、稳定性试验的RSD $<3\%$; 平均加样回收率为93.8%, RSD为2.2% ($n=6$)。三黄糖敏汤中多糖的平均质量浓度为8.6 mg/ml。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 可用于三黄糖敏汤中多糖含量的测定。

关键词 三黄糖敏汤; 多糖; 蒽酮-硫酸比色法; 含量测定

Content Determination of Polysaccharides in Sanhuang Tangmin Decoction by Anthrone-Sulfuric Acid Colorimetry

JIN Shu-min¹, QI Peng-cheng², ZHOU Na², ZHANG Li-ying¹, DONG Zhen-yong¹, HAN Ru¹, GENG Wen-jing¹, BAI Li¹ (1. Dept. of Pharmacy, Shijiazhuang Municipal First Hospital, Shijiazhuang 050011, China; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of polysaccharides in Sanhuang tangmin decoction. METHODS: The anthrone-sulfuric acid colorimetric method was used. Anhydrous glucose was employed as the standard reference and the absorbance was measured at the wavelength of 625 nm. The volume of the anthrone-sulfuric acid solution was 4.0 ml and heating time was 5 min. RESULTS: The glucose contents showed the fine linearity relation with the absorbance in the range of 5.0-13.4 μg/ml ($r=0.998\ 5$) with an average recovery of 93.8% (RSD=2.2%, $n=6$). RSD of precision test was lower than 2%, and RSDs of reproducibility and stability tests were all lower than 3%. The average concentration of polysaccharides in Sanhuang tangmin decoction was 8.6 mg/ml. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the content determination of polysaccharide in Sanhuang tangmin decoction.

KEYWORDS Sanhuang tangmin decoction; Polysaccharide; Anthrone-sulfuric acid colorimetry; Content determination

三黄糖敏汤由黄芪、黄精、黄连、枸杞子、知母、桑叶、麦冬、水蛭、荔枝核等9味中药组成, 具有增加糖尿病患者对胰岛素敏感性的功效, 可联合二甲双胍用于治疗2型糖尿病胰岛素抵抗症状^[1]。现代药理研究表明, 黄芪、黄精、枸杞子的主要成分分别为黄芪多糖、黄精多糖、枸杞子多糖, 以多糖为三黄糖敏汤发挥药效的重要物质基础。本研究建立了以蒽酮-硫酸比色法测定三黄糖敏汤中多糖含量的方法^[2-7], 旨在为制订三黄糖敏汤的质量控制标准提供依据。

1 材料

1.1 仪器

TU-1901型双光束紫外-可见分光光度(UV)计、UVWin 5紫外分析软件V5.1.1(北京普析通用仪器有限责任公司); BP 211D型电子分析天平(德国赛高利斯公司)。

1.2 试剂

葡萄糖(天津市百世化工有限公司, 批号: 20100220); 蒽

酮、硫酸、无水乙醇均为分析纯; 水为蒸馏水。

1.3 药材

枸杞子、荔枝核、黄连、麦冬、黄芪、黄精、知母、桑叶、水蛭(批号: 1310903、13120904、13062502、13070202、13100801、13100901、13111407、13111005、13121204)等药材均购自国药乐仁堂石家庄药材有限公司, 经国药乐仁堂石家庄药材有限公司主任药师李建新鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 三黄糖敏汤的制备

按三黄糖敏汤的处方分别称取枸杞子2.0 g、荔枝核1.8 g、黄连1.2 g、麦冬2.0 g、黄芪3.0 g、黄精3.0 g、知母1.2 g、桑叶2.0 g、水蛭0.6 g, 加10倍量的水浸泡30 min, 煎煮50 min, 收集煎煮液, 再加8倍量水煎煮30 min, 滤过, 合并滤液, 浓缩至100 ml, 即得。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密量取“2.1”项下的三黄糖敏汤1.5 ml, 以5 cm为半径、14 000 r/min离心10 min, 重复2次; 取上清液1.0 ml, 加乙醇9 ml, 于4℃下静置过夜, 再以6 cm为半径、10 000 r/min离心10 min, 弃去上清液; 残渣挥干乙醇, 得粗多糖, 加水使溶解, 并定容至100 ml量瓶中, 滤过, 取滤液, 即得。

^Δ 基金项目: 石家庄市科学研究与发展计划课题(No.101461553)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 医院药学。电话: 0311-86910187。E-mail: jshm2008@sina.com

通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 临床药理、药事管理。电话: 0311-86910187。E-mail: libai0083@126.com

2.2.2 对照品溶液 精密称取干燥至恒质量的葡萄糖0.1 g,置于100 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取10.0 ml,置于100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 蒽酮-硫酸试剂 精密称取蒽酮0.2 g,置于100 ml棕色量瓶中,加浓硫酸溶解并定容,即得。

2.3 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下的葡萄糖对照品溶液0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 ml,分别置于15 ml刻度试管中,加水至2.0 ml,摇匀,置冰水浴中,加入蒽酮-硫酸试剂4.0 ml,冰水浴中放置10 min,摇匀,置沸水浴中加热5 min,取出,置冰浴中冷却,于625 nm波长处测定吸光度(A)。以A为纵坐标、葡萄糖的质量浓度(c, μg/ml)为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $A=0.0547c+0.0083$ ($r=0.9985, n=6$)。结果表明,葡萄糖的质量浓度在5.0~13.4 μg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液0.7 ml,加水至2.0 ml,于625 nm波长处重复测定6次。结果,RSD=0.43%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密量取“2.2.1”项下供试品溶液0.6 ml,加水至2.0 ml,于制备0、15、30、45、60、75、90 min时进行测定。结果,RSD=0.79%($n=7$),表明供试品溶液在90 min内稳定性良好。

2.6 重复性试验

精密量取三黄糖敏汤适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,精密量取0.6 ml,加水至2.0 ml,于625 nm波长处重复测定6次。结果,RSD=2.2%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密量取“2.2.1”项下已知质量浓度的供试品溶液0.4 ml,共6份,分别精密加入对照品溶液0.3 ml,加水至2.0 ml,于625 nm波长处进行测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
34.5	30.2	62.9	92.7	93.8	2.2
34.5	30.2	61.9	90.7		
34.5	30.2	63.2	95.1		
34.5	30.2	62.8	93.6		
34.5	30.2	63.7	96.8		
34.5	30.2	62.9	94.1		

2.8 样品含量测定

精密量取“2.2.1”项下供试品溶液0.6 ml,共3份,分别加水至2.0 ml,于625 nm波长处进行测定,计算样品含量(以葡萄糖计),结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

样品编号	吸光度	质量浓度, mg/ml	平均质量浓度, mg/ml
1	0.4845	8.7	8.6
2	0.4811	8.6	
3	0.4833	8.6	

3 讨论

本研究采用蒽酮-硫酸比色法,其测定原理是:糖与硫酸反应的中间产物糠醛及其衍生物与蒽酮反应生成绿色配位化合物,该化合物的量即可反映出多糖的含量。本研究以葡萄糖

为对照品,依据此反应原理,绘制标准曲线,计算供试品中多糖的含量。

合适的显色条件是本研究成功的关键。根据影响反应的关键因素,本研究对蒽酮-硫酸试剂用量和反应时间进行了优化:精密量取葡萄糖对照品溶液1.0 ml,共4份,分别置于15 ml带刻度的试管中,加水至2.0 ml,置冰水浴中,分别加入蒽酮-硫酸试剂3.0、4.0、5.0、6.0 ml,于冰水浴中放置10 min,摇匀,置沸水浴中加热10 min,取出,置冰水浴中冷却;以相应试液为空白进行测定。结果试剂用量为4.0 ml时效果最佳。本研究还对反应时间进行了考察:精密量取葡萄糖对照品溶液1.0 ml,共4份,分别置于15 ml带刻度的试管中,加水至2.0 ml,置冰水浴中,加入蒽酮-硫酸试剂4.0 ml,冰水浴中放置10 min,摇匀,分别置沸水浴中加热5、10、15、20 min,取出,置冰水浴中冷却后测定。结果沸水浴加热5 min时的效果最好。

目前,对汤剂多糖的提取常用水提醇沉法^[8-11],利用多糖不溶于乙醇的性质使多糖沉淀,达到初步纯化的目的。水提醇沉是现在提取多糖应用最多的一种方法,其工艺成本低、安全性好。其中,多糖能否完全提取是影响测定准确度的重要因素。本研究采用醇沉法提取多糖,为考察多糖是否提取完全,将醇沉离心后的上清液置圆底烧瓶45℃旋蒸,溶液蒸干后加入1 ml水,超声助溶,醇沉,得残渣后再进行残留多糖的测定。结果表明,残留多糖量占总多糖的比例<10%。考虑到试验时间的问题,本研究未进行二次醇沉。

综上所述,该方法简单、准确、重复性好,可用于三黄糖敏汤中多糖含量的测定。需要注意的是,蒽酮-硫酸试剂容易变质,应避光保存,最好现配现用。

参考文献

- [1] 白莉,董振咏,钱玉忠,等.三黄糖敏汤联合二甲双胍治疗2型糖尿病胰岛素抵抗疗效观察[J].河北中医杂志,2013,35(8):1166.
- [2] 钟岩,初丽伟.蒽酮-硫酸法测定灵芝多糖的含量及其不确定度的评定[J].化学分析计量,2009,18(5):7.
- [3] 李芳亮,王锐,孙磊,等.响应面优化蒽酮-硫酸法测定水溶性沙棘叶多糖含量[J].光谱实验室,2012,29(1):185.
- [4] 谭敏,邱细敏.白术多糖含量两种测定方法的比较[J].现代中药研究与实践,2012,26(2):73.
- [5] 朱伟.蒽酮-硫酸比色法测定香菇多糖含量[J].北方药学,2011,8(8):8.
- [6] 林丽,王琰,王福星,等.基于硫酸-蒽酮法对不同产地藏药线叶龙胆多糖的含量测定[J].中国中药杂志,2014,39(14):2774.
- [7] 王爱民,王永林,郑林,等.白及药材中多糖的含量测定[J].中国中药杂志,2009,34(22):2963.
- [8] 刘玉红.四君子汤中多糖的提取和含量测定[J].亚太传统医药,2009,5(2):43.
- [9] 边洪荣,娄桂芹,张庆波,等.黄芪桂枝五物汤不同剂量配比多糖含量测定[J].中药材,2007,30(6):729.
- [10] 刘晓河,梁惠花,郭春燕,等.桃红四物汤中多糖的提取及含量测定[J].张家口医学院学报,2003,20(1):11.
- [11] 陈虹,张志敏,张大鹏,等.全真一气汤多糖的提取和多糖中总糖的含量测定[J].临床医学工程,2011,18(6):917.

(收稿日期:2014-11-07 修回日期:2014-12-08)

(编辑:孙冰)