

松果有效成分的研究

Ⅲ.油松果多糖的含量测定

沈阳药学院药物分析教研室(110015) 李好枝* 吕永俊 白 钢 曹 征**

摘要 用苯酚-硫酸法进行了油松果多糖的含量测定,并考察了苯酚与浓硫酸的用量及反应温度等因素对显色反应的影响,最大吸收波长490nm,测得多糖在10~70 μ g/ml的浓度范围内与吸收度呈线性关系($r=0.9999$ $n=6$),平均回收率为99.9%,变异系数为1.2%,最低检测浓度为0.5 μ g/ml。

关键词 油松果多糖 苯酚-硫酸法

油松果多糖为近年新发现的具有抗癌、抗艾滋病等生理活性的植物提取物,其药理作用引人注目,而油松果多糖的含量测定方法未见报道。植物多糖含量测定方法有蒽酮法^[1]、苯酚-硫酸法^[2~4]、硫酸-吡唑比色法^[5]及提取重量法^[6]、GC^[7]法等。本文采用苯酚-硫酸法测定含量并对影响显色反应的各因素进行了考察,同时测定了几批样品,方法灵敏度高,试剂来源广泛。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂:WFZ-300D2型紫外可见分光光度计,XW-80旋涡混合器,日本岛津UV-260紫外可见分光光度计。

葡萄糖(A.R.),油松果多糖自制,苯酚、浓硫酸均为分析纯。

试剂配制:5%苯酚溶液的配制:取苯酚适量,沙浴蒸馏,收集180~182℃的馏分,称取此馏分12.5g,置250ml容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,避光,冷藏。

标准溶液的配制:精密称取105℃干燥恒重的葡萄糖9.92mg,置100ml容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,成99.2 μ g/ml的标准溶液。

1.2 最大吸收波长的选择:精密称取105℃干燥恒重的葡萄糖3mg,置100ml容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,使成30 μ g/ml的溶液。精密吸取该溶液1ml,加入5%苯酚溶液1ml,浓硫酸5ml,室温放置10min,然后置100℃恒温水浴加热15min,取出后立即放入冷水中冷却15min。以1ml水、1ml 5%苯酚溶液、5ml浓硫酸混合液做空白,用岛津UV-260紫外可见分光光度计在200~600nm范围内扫描,确定最大吸收波长为490nm。

1.3 实验条件的选择:对吸收度有影响的因素有:苯酚的用量,浓硫酸的用量,加酸后的放置时间,水浴温度及水浴中的放置时间。

1.3.1 5%苯酚用量考察:量取30 μ g/ml葡萄糖溶液1ml,浓硫酸用量6ml,加酸后放置10min,水浴温度25℃,水浴内恒温15min,5%苯酚溶液的用量为0.1~3ml(即5~150mg)测得吸收度数据如表1。从表1可以看出:当加入苯酚1.6ml时吸收度最大。

1.3.2 浓硫酸用量考察:加入5%苯酚溶液1.6ml,其他条件同1.3.1项下,浓硫酸用量为5~7ml,结果见表2。

1.3.3 加酸后放置时间的考察:5%苯酚溶液1.6ml,浓硫酸7ml,其他条件同1.3.1项下,测得吸收度数据表明,放置10min吸收值趋于稳定。

*Address: Li Haozhi, Department of Pharmaceutical Analysis, Shengyang College Pharmacy, Shengyang

**本院54期日语药学班学生

表1 不同用量的苯酚测得吸收度

苯酚用量 (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.8	0.9
吸 收 度	0.088	0.153	0.207	0.245	0.255	0.306	0.321	0.326

苯酚用量 (ml)	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.5	3.0
吸 收 度	0.327	0.339	0.359	0.370	0.337	0.333	0.279	0.239

1.3.4 水浴温度的考察: 加入5%苯酚溶液1.6ml, 浓硫酸7ml, 加酸后放置10min, 水浴恒温15min, 测得吸收度数据如表3。室温时吸收度最大。

表2 不同用量浓硫酸测得吸收度

浓硫酸用量 (ml)	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
吸 收 度	0.214	0.290	0.344	0.381	0.408	0.384

表3 不同水浴温度测得的吸收度

水浴温度 (°C)	室温	45	65	85	100
吸 收 度	0.409	0.393	0.359	0.331	0.295

因此, 最佳反应条件为: 5%苯酚溶液1.6ml, 浓硫酸7ml, 加酸后放置10mi, 水浴温度与室温相同即可, 水浴恒温15min。

1.4 标准曲线的制备: 精密量取葡萄糖标准溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7ml置10ml容量瓶中, 分别加水使成1ml, 再分别加入5%苯酚溶液1.6ml, 于旋涡混合器上充分混合, 然后加浓硫酸7ml, 再于旋涡混合器上充分混合, 放置10min, 加水至刻度, 混匀, 置25℃水浴恒温15min。取出放置至室温, 加水至刻度, 混匀。另取10ml容量瓶加水1ml, 5%苯酚溶液1.6ml, 浓硫酸7ml, 按上述方法操作制得的溶液作空白, 在490nm测定吸收度。

求得标准曲线的回归方程为 $A = 0.0683C + 0.004857$ ($r = 0.9999$, $n = 6$)。

1.5 回收率实验: 以标准添加法按标准曲线项下操作, 测得回收率为99.1%, 变异系数为1.08% ($n = 6$); 重复一次实验为100.6%, 变异系数为1.4% ($n = 6$)。平均回收率为99.9%, 变异系数为1.2% ($n = 6$)。

表4 稳定性实验

间隔时间 (h)	0	0.5	1	2	4	6
吸收度	0.087	0.087	0.085	0.083	0.080	0.077

1.6 稳定性实验: 取样品P₅ 1ml, 按标准曲线项下操作, 放置一定时间测定吸收度, 结果见表4。可见在2h内颜色变化较小, 不影响测定。

1.7 样品含量测定: 精密称取样品T₃、P₃、T₄、P₄、T₅、P₅、T₆、P₆各3.0mg分别置100ml容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 超声10min, 过滤, 分别取滤液1ml按标准曲线项下操作, 测定结果如表5:

表5 含量测定结果

样品 No.	T ₃			P ₃			T ₄			P ₄		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
吸 收 度	0.007	0.009	0.011	0.009	0.008	0.009	0.029	0.028	0.028	0.056	0.061	0.062
含量(%)	1.04	2.02	2.99	1.99	1.51	1.99	11.59	11.11	11.11	25.73	28.25	28.75
平均含量(%)	2.02			1.83			11.3			27.6		

续表5

样品 No.	T ₅			P ₅			T ₆			P ₆		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
吸 收 度	0.100	0.096	0.099	0.033	0.034	0.033	0.035	0.032	0.035	0.064	0.064	0.065
含量(%)	45.8	43.9	45.3	13.7	14.2	13.7	14.3	12.9	14.3	28.6	28.6	29.1
平均含量(%)	45.0			13.9			13.8			28.7		

2.2 神经网络的容错能力：神经网络模型中，知识信息采取分布式存储，个别单元损坏不会引起错误，因此用神经网络进行预报识别容错能力强，可靠性高。

本研究中，将神经网络最后一个隐节点（隐蔽层第8个神经元）删去，即相关权重置为零，得到的神经网络模型记为模型B，原来的模型记为模型A，对4个“未知”样本的评价见表4。可见，神经网络具有较强的容错、抗干扰能力。

2.3 评价速度：训练好的神经网络在对未知样本进行评价时仅需作少量的加法和乘法，因此评价速度快。如果做成专用硬件或用并行机则速度更快。

表4 个别神经元损坏对网络性能的影响

神经网络A的预测结果			预测级别	神经网络B的预测结果			预测级别
0.900559	0.104597	0.097790	1	0.968387	0.036847	0.359765	1
0.901169	0.084736	0.112101	1	0.968595	0.029427	0.395605	1
0.133143	0.867304	0.100082	2	0.341896	0.681578	0.365709	2
0.263603	0.732728	0.093121	2	0.447673	0.673080	0.347405	2

3 结语

神经网络以其高度的识别能力，比较适合于中药质量的评价。其评价准确率高，容错能力强，速度快。如果能结合中药药理指标进行分析，则结果更客观。

可以预料，随着神经网络理论的进一步发展，可望开辟中药质量评价的新途径。

参 考 文 献

1 苏薇薇，等. 沈阳药学院学报，1988，5（2）：89

2 王 玺，等. 沈阳药学院学报，1990，71（1）：5

3 尹红凤，等. 人工神经网络原理，1990，3（1）：1

4 欧兴长，等. 药学通报，1984，19（7）：37

(1993-03-01收稿)

(上接第186页)

计算式：

$$\text{含量}(\%) = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100\%$$

式中W为样品重量

(mg)，C为样品葡萄糖浓度(μg/ml)，V为采样量(ml)，D=10.00

2 讨论与小结

2.1 本法的原理为多糖在强酸作用下水解生成单糖，并迅速脱水成糠醛，糠醛与酚性物质如苯酚缩合成有色化合物。用分光光度法在适当波长处测定多糖含量，本法简便易行，灵敏度高，最低检出量为0.5μg/ml。

2.2 本法应特别注意操作中酸的加入方式。将酸直接加到溶液表面产生的颜色较沿容量瓶壁加入产生的颜色深，故笔者用前者加法。

2.3 配制好的5%苯酚溶液应冷藏避光保存，否则以苯酚-浓硫酸作空白时颜色变深，影响测定。

2.4 应用蒽酮法分别测定样品含量并与本法进行对照，其中P₃含量无法测出，故笔者认为对于油松果多糖的含量测定，苯酚-硫酸法优于蒽酮法。

参 考 文 献

1 张永恒，等. 中草药，1987，18（9）：13

2 朱立文，等. 中成药研究，1987（6）：11

3 冯青然，等. 中药通报，1988，13（11）：36

4 李满飞，等. 中草药，1990，21（10）：10

5 李向高，等. 中药通报，1987，12（6）：40

6 贺正全，等. 中药材，1987（3）：40

7 李铁林，等. 分析化学，1982，10（5）：272

(1993-06-02收稿)

the content of baicalin in this preparation. As a result of stability test, the shelf life at 25°C is estimated to be 1.97 years.

(Original article on page 182)

Studies on Effective Compositions of Pinecone Ⅱ. Determination of Polysaccharides in Cone of Chinese Pine (*Pinus tabulaeformis*)

Li Haozhi, Lu Yongjun, Bai Gang, et al

Quantitative determination of polysaccharides in pine cones by phenol-sulfuric acid method was studied, and the effects of concentration of phenol-sulfuric acid and reaction temperature on color formation were investigated. It was found that the absorbance is linearly correlated to polysaccharide concentrations between 10~78µg/ml ($r=0.9999$). The analytical recovery was 99.8%, CV% was 1.2% and the minimal detectable concentration was 5µg/ml.

(Original article on page 185)

Artificial Neural Network Method for Quality Estimation of Traditional Chinese Medicine

Cai Yudong, Gong Jiawen, Cheng Zhaonian, et al

An artificial neural network method for quality estimation of traditional Chinese medicine was suggested, and quality of Hou-Po was estimated by the proposed method in comparison with the analytical results of gas-liquid chromatography. The successful rate reached 100%. The results showed that the neural network method is reliable, and therefore may be referred to as an effective technique for the quality estimation of traditional Chinese medicine.

(Original article on page 187)

Protective Effect of Paeonol Against Ischemia Reperfusion Damage in Cardiac Mitochondria Membrane of Rats

Zhang Weiguo and Zhang Zhishan

60mg/kg·d ip, of paeonol were given to rats for 15 days. The myocardial ischemia reperfusion injury model was produced by occluding the left coronary artery and releasing the occlusion in rats. This significantly decreased myocardial Ca^{++} -ATPase activities and CH/PL radical, FFA content, improved mitochondrial membrane fluidity and kept them away from oxygen free radical damage. These results indicated that paeonol has membrane protective effect on myocardial ischemia reperfusion injury probably by inhibiting the oxygen free radicals and subsequent lipid peroxidation.

(Original article on page 193)

An Inquiry into Preparing Diarrhea Model of Mice and Application of Diarrhea Index

Zhou Gannan, Hu Zhihua, Wang Yaxian, et al

In Order to screen antidiarrhea drugs, the standard operation of mice diarrhea model replicated with leave of *Cassia angustifolia* vahl was introduced. In experiments, diarrhea index expressed with loose stool incidence rate multiplied by loose stool grade was used as main index. It thoroughly mirrors indi.