

松果有效成分的研究

Ⅳ. 红松果多糖中酸性糖的含量测定

沈阳药科大学 (110015) 李好枝* 吕永俊 梁 卉*

大庆市第三人民医院 郭铁军

摘要 用硫酸-咔唑比色法测定了红松果多糖中酸性糖的含量,并考察了浓硫酸与咔唑的用量及反应温度、时间等因素对显色反应的影响,最大吸收波长520nm,测得酸性糖在1.0~7.0μg/ml浓度范围内与吸收度呈线性关系($r=0.9999$, $n=7$),平均回收率为99.0%~99.8%,RSD为1.3%~2.3% ($n=6$),最低检测浓度为0.05μg/ml。

关键词 红松果多糖 硫酸-咔唑法

松果多糖的生理活性很强,近年发现,其抗菌、抗癌活性有种种的差异,在前报^[1]测定了红松果多糖的总糖含量基础上,对抗癌活性更强的红松 *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc 松果多糖测定了其总糖含量。研究发现,松果多糖的抗癌活性随其酸性增强而增强^[2]。因此,对其总糖中的酸性糖定量具有特殊意义。现对红松松塔及其松子壳中多糖各流份的酸性糖含量进行了探讨。酸性糖的测定方法有硫酸-咔唑法^[3、5]、脱羧法^[6]等。我们采用硫酸-咔唑法测定,并对影响显色反应的各因素进行了考察。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂:WFZ-600D2型紫外可见分光光度计UV-260,型紫外可见分光光度计,XW-80旋涡混合器。

葡萄糖醛酸、浓硫酸、无水乙醇均为分析纯,咔唑(CR)、松果多糖(自制)。

1.2 试剂配制:0.1%咔唑-无水乙醇溶液:称取0.1g咔唑加无水乙醇溶解并稀释至100ml,摇匀。

葡萄糖醛酸标准溶液:精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖醛酸10.30mg,加水溶解并稀释至100ml,摇匀,成103.0μg/ml的标准溶液。

1.3 预试验及最大吸收波长的选择:精密称取105℃干燥恒重的葡萄糖醛酸5mg,置100ml容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀(浓度为50μg/ml)。精密量取溶液1ml至10ml具塞试管中,加入浓硫酸6ml,用旋涡混合器混匀,于沸水浴中加热20min冷至室温后加入0.1%咔唑-无水乙醇溶液0.2ml,混匀,再于沸水浴中加热10min,冷至室温后定量转移至10ml容量瓶中,并加浓硫酸至刻度。以1ml水同上操作制得空白液,用UV-260紫外可见分光光度计在400~600nm波长范围内扫描,确定最大吸收波长为520nm。

1.4 实验条件的选择:对吸收度有影响的因素有:浓硫酸用量,咔唑用量,加酸后沸水溶时间,加咔唑后水温温度及时间。

1.4.1 浓硫酸用量考察:精密量取葡萄糖醛酸溶液(浓度为50μg/ml)1ml,浓硫酸用量为3~6.5ml,加酸后沸水浴加热20min,加咔唑0.2ml,再于沸水浴加热10min,测得吸收度,

*Address: Li Haozhi, Department of Pharmaceutical Analysis, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang

**本校1993年56期药分专业毕业生

如表1所示。加入5ml浓硫酸时吸收度最大。

表1 硫酸、咪唑用量测得的吸收度 (A)

硫酸用量(ml)	3.0	4.0	5.0	5.5	6.0	6.5	咪唑用量(ml)	0.10	0.15	0.20	0.25
吸收度(A)	0.303	0.339	0.346	0.344	0.314	0.302	吸收度(A)	0.259	0.308	0.315	0.313

1.4.2 咪唑用量考察：加入浓硫酸5ml，其它条件同前，0.1%咪唑-无水乙醇溶液 用量 为 0.10~0.25ml，测得吸收度如表1，加入0.20ml咪唑-乙醇溶液时吸收度最大。

1.4.3 加酸后沸水浴加热时间考察：浓硫酸5ml，咪唑0.20ml，其它条件同上，沸水浴 加 热时间5~30min，吸收度测定结果如表2，加热25min可使反应完全，吸收度最大。

1.4.4 加咪唑后水浴温度考 察：浓硫酸5 ml，咪唑0.2ml，加酸后沸水浴25min，加 咪唑后水浴10min，温度范围为25~100℃， 测得吸收度如表3，90℃时吸收度最大，但考 虑沸水浴较易控制，故选用100℃。

表2 加酸后不同沸水浴时间测得 的吸收度 (A)

时间(min)	5	10	15	20	25	30
吸收度(A)	0.277	0.313	0.312	0.316	0.324	0.322

表3 加咪唑后不同水浴温度测得的吸收度 (A)

水浴温度(℃)	25	40	55	70	80	90	100
吸收度(A)	0.226	0.251	0.288	0.336	0.364	0.378	0.367

1.4.5 加咪唑后沸水浴加热时间的考察：加咪唑后在沸水浴中加热，加热时间为5~20min 其它条件同上，测得吸收度如表4，沸水浴加热10min后吸收度趋于稳定。

因此，选择最佳反应条件为：浓硫酸 5ml，加酸后沸水浴加热 25min，加0.1% 咪唑-无水乙醇溶液0.2ml，加咪唑后 沸水 浴加热10min。

表4 加咪唑后不同沸水浴时间测 得的吸收度 (A)

时间(min)	5	10	15	20
吸收度(A)	0.344	0.342	0.342	0.342

1.5 标准曲线的制备：精密量取葡萄糖醛 酸标准溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7ml置10ml具塞试管中，分别加水使成 1ml，再分别加入浓硫酸5ml，置旋涡混合器上混匀，于沸水浴加热25min，取出后立即冷 至室温，加0.1%咪唑-无水乙醇溶液0.2ml，混匀，再于沸水浴中加热10min，冷至室温，定量 转移至10ml容量瓶中，加浓硫酸至刻度，摇匀。另取1ml水同上操作制得空白液，在520nm波 长处测定吸收度。求得标准曲线的回归方程为： $A = 0.0707C + 0.0001429$ ($r = 0.9999$ ， $n = 7$)。

1.6 回收率实验：用标准添加法（以样品1测得的酸性多糖结果为本底值），按“标准曲 线的制备”项下操作，测得回收率为99%，RSD为1.3%（n=6）。

1.7 稳定性实验：取样品1 5mg置50ml容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，超声10min， 过滤。取滤液1ml按标准曲线项下操作，放置一定时间测定吸收度，结果14h内吸收度不变， 具较好的稳定性。

1.8 样品含量测定：精密称取样品1、2各5ml，样品3、4各7mg，分别置50ml容量瓶中，按 “稳定性实验”项下操作，测定结果如表5。

计算式：含量% = $\frac{C \times V \times D}{W} \times 100\%$ (下转第350页)

最佳配比，芍药甙峰与相邻峰的分离度为1.65 ($R>1.5$)，图2。
 4.2 通过实验所得峰面积与峰高值的数据，经回归分析，峰面积的RSD为0.99%，故定量选用峰面积值计算。

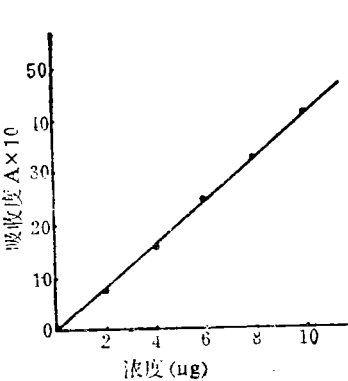


图1 标准曲线

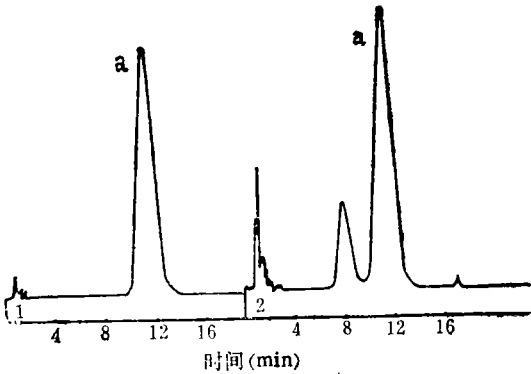


图2 白芍总甙HPLC谱

1-对照品 2-供试品 a-芍药甙峰

参 考 文 献

1 原田正敏，编集．紫用生药的成分定量．日本，
 广川书店，平成元

北京：中国医药科技出版社，1994
 （1994-12-06收稿）

2 王宝琴主编．中成药质量标准与标准物质研究．

（上接第348页）

式中C为样品葡萄糖醛酸浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ） V为取样量（ml） D为稀释倍数500 W为样品重量

2 讨论与小结

本法测定原理为酸性多糖在强酸作用下水解成糖醛酸，在硫酸存在下与吡唑反应生成含羰基的紫红色产物，在适当波长下测定其含量。本法简便易行，灵敏度高，最低检出浓度为 $0.05\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 生成的紫红色产物遇水不稳定，因此在显色反应后的定量转移过程中应保持无水操作。

2.3 葡萄糖醛酸标准溶液应置冰箱保存，可在一周内使用，或者临时配制。

2.4 样品来源不同，其酸性糖含量也不同。红松塔多糖中酸性糖高于红松子壳多糖中的酸性糖含量。

表5 样品含量测定

样品号*	测得吸收度（A）	含量（%）	平均含量（%）
1	0.120	16.3	16
	0.122	16.4	
	0.126	17.1	
	0.173	23.3	
2	0.175	23.7	23.9
	0.176	23.7	
	0.044	4.43	
3	0.043	4.30	4.36
	0.043	4.30	
	0.050	5.07	
4	0.049	5.00	5.13
	0.052	5.22	

*样品1-红松塔多糖Ⅱ 2-红松塔多糖Ⅰ，
 3-红松子壳多糖Ⅱ 4-红松子壳多糖Ⅰ

参 考 文 献

1 李好枝，等．中草药，1994，25（4）：185

5 张岩洪，等．中成药，1988（10）：34

2 Sakagami H, et al. Jpn J Cancer Res 1986, 77: 59

6 翟永信，等．现代食品分析手册．北京：北京大学出版社，1988．

3 Bitter T, et al. Anal Biochem, 1962（4）：330

（1994-08-23收稿）

4 李向高，等．中药通报，1987，12（6）：40

ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

Studies on the Chemical Constituents of Indian Mockstrawberry

(*Duchesnea indica*)

Peng Jiangnan, Lu Yunru and Chen Dechang

Nine compounds were isolated from *Duchesnea indica* (Andr) Focke which was used as an anticancer herb in traditional Chinese medicine. They were identified as fumaric acid (I), fumaric acid monomethyl ester (II), daucosterol (III), brevifolin (IV), kaempferitrin (V), pomolic acid (VI), ursolic acid (VII), euscaphic acid (VIII) and β -sitosterol (IX). The former six compounds were obtained for the first time from the genus *Duchesnea* Smith and brevifolin was obtained for the first time from family *Rosaceae*.

(Original article on page 339)

Studies on the Chemical Constituents of Guangxiqianhu

(*Peucedanum guangxiense*)

Huang Ping, Lu Chunqiong, Lai Maoxiang, et al

Five compounds isolated from the root of *Peucedanum guangxiense* Shan et Shen were identified as (+)-praeruptorin B, isoimperatorin, phellopterin, bergapten and β -sitosterol respectively on the basis of physical and chemical properties and spectral data.

(Original article on page 342)

Studies on Effective Composition of Pinecone IV. Determination

of Acid Polysaccharides in Polysaccharides of

Cone of Korean Pine (*Pinus koraiensis*)

Li Haozhi, Guo Tiejun, et al

Acid polysaccharides in pinecone were determined quantitatively by sulfuric acid-carbazole colorimetry and the influence of amount of sulfuric acid carbazole, reaction temperature and time for color-reaction were investigated. The maximum absorption was found to be at 520nm. The absorbance was a linear function of concentrations between 0 and 7 $\mu\text{g/ml}$ acid polysaccharides ($r=0.9999$, $n=7$). Analytical recovery was 91.0%~99.8%. RDS was 1.3%~2.3% ($n=6$). The minimum detectable concentration was 0.05 $\mu\text{g/ml}$.

(Original article on page 347)

Quantitative Determination of Paeoniflorin in Paeonialbiflosides by HPLC

Qian Yanan, Liu Xinshun, et al

Quantitative determination of paeoniflorin in paeonialbiflosides by HPLC was described. The average recovery was found to be 101.08%, and relative standard deviations (RSD) 1.90%. The calibration curve was linear in the range from 2.0 $\mu\text{g/ml}$ to 10.0 $\mu\text{g/ml}$ with $r=0.9999$. It was shown that the method is convenient, sensitive and with good reproducibility.

(Original article on page 349)