

称定质量,用2%氢氧化钾溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液2 mL,置10 mL量瓶中,加4%盐酸2 mL,40℃水浴静置4 h,再加2%氢氧化钾甲醇溶液4 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 标准曲线制备:精密量取0.200 4 mg/mL 柴胡皂苷a对照品溶液0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 mL,置10 mL量瓶中,加2%氢氧化钾甲醇溶液稀释至刻度。分别精密量取上述溶液2.0 mL,置10 mL量瓶中,加4%盐酸2 mL,40℃水浴静置4 h,再加2%氢氧化钾甲醇溶液4 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。照高效液相色谱法(《中华人民共和国药典》2000版一部附录VID)试验,分别吸取上述稀释液各20 μ L,注入液相色谱仪,记录相应峰面积值。以峰面积值为纵坐标,柴胡皂苷a的浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 6\,377\,818.75 C - 1\,721.52$, $r = 0.999\,7$ 。结果表明,柴胡皂苷a浓度在0.010 02~0.080 16 mg/mL与峰面积线性关系良好。

2.5 稳定性试验:取本品0.5 g,制备供试品溶液,于0,1,2,3,4 h测定峰面积值。结果柴胡皂苷a峰面积的RSD=0.8%,表明在3 h内测定是稳定的。

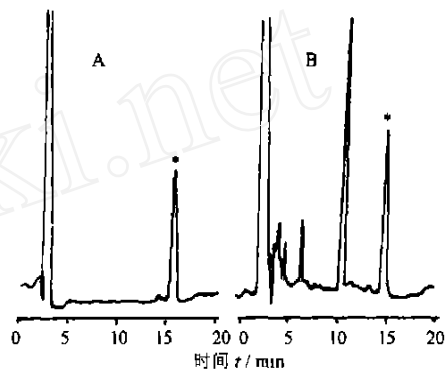
2.6 精密度试验:取柴胡皂苷a对照品溶液连续进样6次,测峰面积值。结果其RSD=1.4% ($n=6$)。

2.7 重现性试验:取本品0.5 g,精密称取5份,制备供试品溶液,进样测定,结果柴胡皂苷a的含量为0.245%,RSD=2.02% ($n=5$)。

2.8 回收率试验:取本品0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入2%氢氧化钾甲醇溶液22.5 mL,加0.200 4 mg/mL 柴胡皂苷a对照品溶液2.5 mL,密塞,称定质量,加热回流1 h,放冷,再称定质量,用2%氢氧化钾甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过。取续滤液2 mL,置10 mL量瓶中,加4%

盐酸2 mL,40℃水浴静置4 h,再加2%氢氧化钾甲醇溶液4 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。计算得平均回收率为99.0%,RSD=1.80% ($n=5$)。

2.9 样品含量测定:取柴胡药材,按供试品溶液方法处理,进样测定,色谱图见图1。结果见表1。



* -柴胡皂苷a

* -saikosaponin a

图1 柴胡皂苷a对照品(A)和柴胡(B)的HPLC图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of saikosaponin a reference substance (A) and Radix Bupleuri (B)

表1 柴胡中柴胡皂苷a的含量测定结果 ($n=3$)

Table 1 Saikosaponin a in Radix Bupleuri ($n=3$)

批号	柴胡皂苷a/%
1	0.245
2	0.341
3	0.214

3 讨论

文献报道的处理方法是强酸条件下25℃放置16 h,操作不便,经系统摸索,改进为在40℃放置4 h,易于操作,易于重复。

本法精密度高,重现性好,不仅对柴胡药材中柴胡皂苷a的含量测定可行,而且可应用于柴胡单味制剂和复方制剂,值得推广。

海芋中海芋多糖的组成和含量测定

程磊,周秀佳*

(上海中医药大学中药学院,上海 201203)

海芋为天南星科植物海芋 *Alocasia odora* (Roxb.) K. Koch 的干燥根茎或大根芋 *A. macrorrhiza* (L.) Schott 的根茎^[1]。具有清热解毒,消肿散结的功效。现广泛用于治疗各种癌肿,已成为上海

海芋为天南星科植物海芋 *Alocasia odora* (Roxb.) K. Koch 的干燥根茎或大根芋 *A. macrorrhiza* (L.) Schott 的根茎^[1]。具有清热解毒,消肿散结的功效。现广泛用于治疗各种癌肿,已成为上海

* 收稿日期:2003-09-21

作者简介:程磊(1976—),男,江苏阜宁人,上海中医药大学中药学院在读博士研究生,已发表论文16篇,主要从事生药学研究。
Tel: (021) 50808727 E-mail: m. chenglei@163.com

地区中医抗癌的最有特色的常用药之一^[2]。海芋提取物也被用于治疗免疫抑制疾病^[3]。近年来,大量药理及临床研究表明,多糖类化合物是一种免疫调节剂,能激活免疫受体,提高机体的免疫功能,是很好的抗癌辅助治疗药物^[4]。有关海芋活性成分的文献报道很少^[5],未见有关于其多糖成分的研究。本实验研究了海芋中海芋多糖的提取、分离、纯化方法及多糖组份和含量测定。

1 材料、仪器和试剂

薄层色谱预制板硅胶G(福山生化试剂厂), HP8453E 紫外-可见光光谱仪,透析袋(德国,滤过相对分子质量为12 000~14 000)。

海芋由上海群力草药店提供,经本院周秀佳教授鉴定为天南星科植物海芋 *A. odora* (Roxb.) K. Koch 的干燥根茎。重蒸酚(华美生物工程公司),葡萄糖 [$d-(+)$ glucose, 上海生工生物工程有限公司], 木糖 [$d-(+)$ xylose], 果糖 [$D-(-)$ fructose] 购自中国医药集团上海化学试剂公司, 半乳糖 [$D-(+)$ -galactose, 上海恒信化学试剂有限公司], 鼠李糖 [$L-(+)$ -rhamnose], 阿拉伯糖 [$L-(+)$ -arabinose], 甘露糖 [$D-(+)$ mannose] 为中国医药集团上海化学试剂公司 Fluka 进口分装, 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法和结果

2.1 多糖的提取和分离: 海芋根茎粉碎后以95%乙醇冷浸,药渣挥尽乙醇,沸水提取3次,合并提取液,浓缩至小体积,加3倍体积预冷95%乙醇,抽滤收集沉淀,用95%乙醇清洗后得到粗多糖。粗多糖经鞣酸液和三氯醋酸去蛋白,透析,得总多糖(AOP)。乙醇分级沉淀,50%乙醇沉淀得多糖A(AOP-A),浓度提至75%得多糖B(AOP-B),冷冻干燥得到褐色冻干粉。

2.2 多糖的组成分析

2.2.1 多糖的酸水解: 分别取AOP-A、AOP-B各10 mg,加入2 mol/L 硫酸3.0 mL,110℃烘箱中水解8 h。水解后,加入固体碳酸钡中和,4 000 r/min离心,取上清液适当浓缩,进行TLC分析。

2.2.2 TLC分析: 称取Glu, Xyl, Man, Gal, Fru, Rha, Ara各25 mg,分别溶于1.5 mL重蒸水中,待用。薄层色谱条件: 采用硅胶G(20 cm×10 cm)薄层色谱板,展开剂正丁醇-丙酮-水(4:5:1),显色剂为 α -萘酚-硫酸试剂^[6],于100℃烘7 min。结果见表1。初步确定海芋多糖由3种单糖:D-葡萄糖、D-半乳糖和D-甘露糖组成,甘露糖的Rf值虽然

比多糖B大了一点,但仍有重叠区域。

表1 海芋多糖水解产物和各种单糖的TLC色谱数据

Table 1 TLC data of different monosaccharides and polysaccharide hydrolysis products of *A. odora*

样 品	Rf 值	斑点颜色
Xyl	0.61	紫
Gal	0.45	玫瑰红
Glu	0.519	玫瑰红
Man	0.525	玫瑰红
Fru	0.47	蓝
Ara	0.53	蓝
Rha	0.71	橙
AOP-A	0.45 0.519	淡玫瑰红
AOP-B	0.45 0.519	淡玫瑰红

2.3 总多糖的含量测定

2.3.1 标准曲线的制备: 精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖50 mg,加水溶解并加至100 mL量瓶刻度,即得葡萄糖对照品溶液。精密吸取对照品溶液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,分别置50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液各2.0 mL于具塞试管中,加入1.0 mL 5%苯酚溶液,再加入5.0 mL浓硫酸,静置5 min,摇匀,水浴(100℃)加热10 min,30℃再显色30 min。冷却后在490 nm波长处测定吸光度,空白对照以蒸馏水代替。以吸光度为横坐标,葡萄糖浓度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y = 16.641X + 0.0034$, $r = 0.9994$ 。葡萄糖在2.5~15.0 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度线性良好。

2.3.2 换算因子的测定: 精密称取80℃干燥至恒重的总多糖10.2 mg加水溶解并加至100 mL量瓶刻度,取2 mL按标准曲线项下的方法测定吸光度,从回归方程中求出多糖供试液中葡萄糖浓度,按下式计算换算因子^[7,8],测得 $f = 2.5703$ 。

$$f = W / CD$$

W: 多糖质量(μg); C: 多糖中葡萄糖的浓度($\mu\text{g/mL}$);

D: 多糖的稀释倍数。

2.3.3 供试品溶液的制备: 精密称取海芋粗粉0.2 g置250 mL平底烧瓶中,加95%乙醇100 mL,超声提取两次,每次1 h。滤过,蒸干乙醇,加水40 mL超声提取两次,每次40 min。合并两次提取液,加水至100 mL量瓶刻度,备用。

2.3.4 回收率试验: 称取海芋粗粉0.1 g,加入总多糖10 mg,按供试品溶液的制备方法操作,最后将待测液稀释4倍,吸取2 mL按标准曲线项下方法测定含量,计算回收率。结果平均回收率为98.64%,RSD为3.07% ($n = 3$)。

2.3.5 样品含量的测定: 样液稀释4倍后, 精密吸取2 mL, 按标准曲线项下的方法测定供试液中葡萄糖含量, 按下式计算海芋中的多糖含量, 结果海芋中多糖含量为17.29%, RSD = 1.81% ($n = 3$)。

$$\text{多糖含量} = CDf/W \times 100\%$$

W: 样品质量(μg); C: 样品溶液中葡萄糖的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); D: 样品溶液多糖的稀释倍数; f: 稀释因子

3 讨论

大多数文献中的单糖 TLC 色谱显色往往采用苯胺-邻苯二甲酸, 而本实验采用 α -萘酚-硫酸显色, 因为苯胺-邻苯二甲酸无法显色己酮糖(果糖), 且其显色区别较小, 而 α -萘酚-硫酸颜色区别较明显。在本实验中, 阿拉伯糖、果糖都因其颜色不同而直接可以排除。但有两点需注意: 一是显色时间要控制好, 时间过长会使整个薄层板变成黑色, 从第一个斑点出现至所有斑点出现只在最后1 min完成; 二是显色结束后应立即记录颜色, 否则颜色会发生变化, 尤其是紫色和蓝色, 会引起错误的结论。

董群等^[9]提出对于由不同单糖构成的杂多糖, 应采用与杂多糖组成相同的混合单糖制作标准曲线。但此法的前提是必须先获得单糖组成的物质的量比, 这通常需要通过高效液相凝胶色谱来确定。本

实验采用的含量测定以葡萄糖代替各种单糖的改良苯酚-硫酸法仍不失为一种简单易行的方法。

References

- [1] Yang C L. *Poisonous H erbs* (毒药本草) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1993.
- [2] Tian Y, Ke Y, Zhou X J, et al. Common-used anticancer herbs "Sheliugu" in Shanghai [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1999, 22(9): 439-441.
- [3] Zhou J Y. Prescription of *A locasia* used to treat immunosuppression disease [J]. *World Phytomed* (国外医药·植物药分册), 2001, 16(3): 129-129.
- [4] Wang J, Gong X G. Advances in the studies on the antitumor activity and immunomodulating action of polysaccharides [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2001, 22(1): 52-54.
- [5] Ke Y, Zhou X J, Bo Q M. Studies on the antitumor effect of *A locasia macrorrhiza* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1999, 22(5): 252-253.
- [6] Sun W J. *Extraction, Separation and Preparation of Natural Medicinal Components* (天然药物成分提取分离与制备) [M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Medicine-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1999.
- [7] Liu J R, Jiang F S, Dan J M, et al. Ultrasound extract and content determination of polysaccharides of *Eremurus indenensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(4): 322-323.
- [8] Wang D, Lin L, Yuan C L, et al. Analysis on content of polysaccharides of *Samen Plantaginis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(10): 896-897.
- [9] Dong Q, Zheng L Y, Fang J N. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharides [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 31(9): 550-553.

HPLC 法测定清肺抑火片中黄芩苷的含量

张义友, 傅红*, 包淑英, 王振中, 刘洪利, 黄振宇*

(天津市医药教育中心, 天津 300400)

清肺抑火片由《中华人民共和国药典》2000年版一部清肺抑火丸处方化裁而来, 由黄芩、栀子、知母、浙贝、黄柏、苦参、桔梗、前胡8味中药组成。具有清热止咳、化痰通便的功效。用于肺热咳嗽、痰黄黏稠、口干咽痛、大便干燥等疾病。黄芩在处方中为君药, 黄芩的主要成分为黄芩苷, 测定黄芩苷的含量能够反映和控制该片剂的内在质量。本实验采用 RP-HPLC 测定其中黄芩苷的含量, 为控制清肺抑火片的质量提供依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, SPD-10A

紫外分析仪, CTO-10AS 柱温箱, DGU-12A 脱气机。浙大 N2000 双通道色谱分析系统, KQ-2500E 数据超声波清洗器。

黄芩苷对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号: 715-200111; 甲醇、四氢呋喃为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为二次蒸馏水。

各药材由天津市医药教育中心标本室提供, 经本校王振中药师鉴定。清肺抑火片由天津市中药制药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Shim-pack VP-ODS (150 mm ×

* 收稿日期: 2003-11-18

作者简介: 张义友(1967—), 男, 天津市人, 讲师, 1989年毕业于天津师范大学, 2001年北京大学研究生课程进修班药专业结业, 主要从事药物研究及物理化学、有机化学教学工作。

* 通讯作者 Tel: (022) 26650800