

200~ 400 nm 有最大吸收。α-溴苯酮和 2, 4 -二溴苯乙酮为常用衍生生化试剂, 将脂肪酸衍生化成苯乙酮酯, 由于采用 18-冠-6 醚为相转移催化剂, 使酯化反应活能降低, 衍生生化反应速度快, 酯化率高。

3.3 国外报道的有关脂肪酸的含量测定的色谱条件多为 C₁₈柱, 或采用梯度洗脱, 但是由于脂肪酸的极性过小, 在 C₁₈柱的保留时间很长, 分离时间长达 80 min。本实验曾尝试过 C₁₈柱, 结果油酸与软脂酸无法达到基线分离。使用 C₈反相柱, 以乙腈-水 (80 : 20) 为流动相等度洗脱, 油酸与软脂酸可以达到基线分离, 而且分析时间在 35 min 之内。

References

[1] Lin Q S. *Chemical Constituent of Chinese Traditional Herb Drug* (中草药成分化学) [M]. Beijing: Science Press, 1977.
 [2] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical

Publishers, 1999.
 [3] Su X R. Study of *Fructus B ruceae* oil on antitumor [J]. *J Shenyang Pharm Coll* (沈阳药学院学报), 1979 (1): 15-18.
 [4] Kong L H, Wang S L, Lu Z, et al. Determination of oleic acid content and its stability in *Yourukeliji of Java B ruceae (B ruceae javanica)* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26 (2): 72-75.
 [5] Sun L L, Wang S L. Determination of oleic acid in *Fructus B ruceae* oil emulsion by GC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(2): 98-100.
 [6] Uchida T, Goto T. High performance liquid chromatographic analysis of serum long-chain fatty acids by direct derivatization method [J]. *J Chromatogr (B)*, 1992, 596: 181-184.
 [7] Hatsumi M, Kimaya S I, Higo sawa K. Microanalysis of fatty acids in plasma of experimental animals and humans by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr (B)*, 1986, 380: 247-255.
 [8] Puttmann M, Krug H, Von Ochsenstein E, et al. Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the Picomole Range [J]. *Clin Chem*, 1993, 39(5): 825-832.
 [9] Weinkove C, Reed P. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC [J]. *Clin Chem*, 1994, 40(9): 1707-1712.

银耳多糖中糖醛酸含量的测定

姜瑞芝¹, 陈英红¹, 杨勇杰², 高其品^{3*}

(1. 吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学生命科学院, 吉林 长春 130023; 3. 吉林省药品检验所, 吉林 长春 130021)

摘要: 目的 建立一种操作简单、快速、准确地测定银耳多糖中糖醛酸的方法。方法 考察中性糖在咔唑法和间羟基联苯法中对糖醛酸测定的干扰, 考察加入氨基磺酸对中性糖的抑制作用。并对银耳多糖中糖醛酸进行测定。结果 中性糖在咔唑法和间羟基联苯法中均有不同程度的干扰。对糖醛酸中酸性杂多糖配制质量浓度超出一定范围时, 两种方法测得糖醛酸的结果会与实际值有较大误差。结论 测定银耳多糖采用间羟基联苯法, 同时待测样品质量浓度配制在 0.25~ 0.50 mg/mL 时, 所测结果更接近于实际值。

关键词: 银耳多糖; 糖醛酸; 咔唑法; 间羟基联苯法

中图分类号: R 286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)09-0991-03

Determination of uronic acids in polysaccharide from *Tremella fuciformis*

JIANG Rui-zhi¹, CHEN Ying-hong¹, YANG Yong-jie², GAO Qi-pin³

(1. Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China; 2. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China; 3. Jilin Institute for Drug Control, Changchun 130021, China)

Key words: *Tremella* polysaccharide (TP); uronic acids; carbazole method; meta-hydroxydiphenyl method

天然药物提取的多糖以酸性杂多糖的形式存在较多, 通常对其中糖醛酸的测定方法有咔唑法^[1]和间羟基联苯法^[2]。但在实际工作中发现, 采用以上两种经典方法测定酸性杂多糖中糖醛酸的含量时, 中

性糖对测定结果有很大的干扰, 使得酸性杂多糖的组份分析结果无法解释。文献报道^[3], 氨基磺酸可抑制中性糖的干扰。为建立一种准确、快速测定酸性杂多糖中糖醛酸的方法, 本实验选用了糖醛酸含量低

* 收稿日期: 2003-12-10

基金项目: 国家重点科技项目 (96-901-06-68)

作者简介: 姜瑞芝(1959—), 女, 长春人, 研究员, 主要从事多糖研究及新药开发。Tel: (0431) 6816839

E-mail: zhongyanjrz@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Tel: (0431) 7939919 E-mail: gaoqipin@chinabyte.net

的酸性杂多糖——银耳多糖, 对其中糖醛酸含量的测定方法进行了研究。

1 仪器与试剂

752 型紫外分光光度计; 银耳多糖 (*Tremella polysaccharide*, TP) 由本实验室提供, 中性糖占 80%, 糖醛酸占 10%, 其中性糖由岩藻糖 (Fuc)、木糖 (Xyl)、甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal)、葡萄糖 (Glu) 组成, 质量分数分别为 22%、28%、45%、1.5%、3.5%; 糖醛酸为葡萄糖醛酸 (GluA); 所用试剂均为分析纯。Fuc、Xyl、Man、Gal、Glu、GluA 对照品均购自 Sigma 公司, 纯度为 99%。Dowex 1 树脂购自 Sigma 公司。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备: 分别取岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 配成 1 mg/mL 的溶液。

2.2 氨基磺酸对两种方法测定中性糖结果的影响: 分别取两组对照品溶液各 0.5 mL, 加水至 1 mL, 各加 75 mmol/L 硼酸钠-硫酸溶液 2.4 mL, 水浴加热 15 min, 两组分别加咪唑、间羟基联苯显色, 以不加对照品溶液为空白, 测定吸光度 (A) 值, 结果见表 1。另分别取两组对照品溶液各 0.5 mL, 加水至 1 mL, 各加 4 mol/L 氨基磺酸溶液 100 μL, 同上操作, 结果见表 1。

表 1 氨基磺酸对中性糖和糖醛酸抑制作用

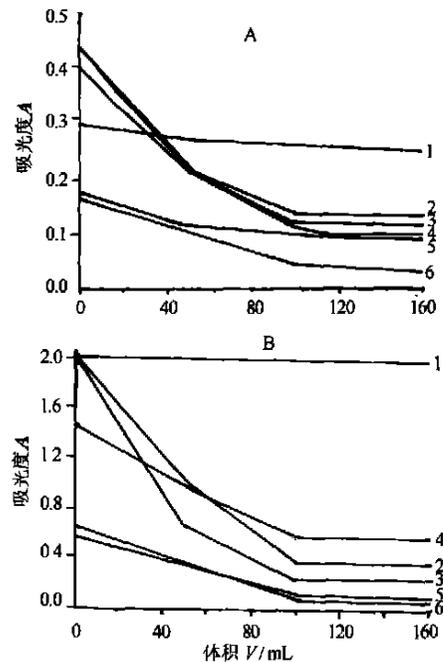
Table 1 Inhibition of sulfamate to neutral sugars and uronic acid

对照品	不含氨基磺酸(A 值)		含氨基磺酸(A 值)	
	咪唑法	间羟基联苯	咪唑法	间羟基联苯
Fuc	0.667	0.163	0.061	0.042
Xyl	> 2.000	0.439	0.389	0.133
Man	0.581	0.174	0.120	0.075
Glu	1.467	0.396	0.583	0.110
Gal	0.992	0.241	0.284	0.102
GluA	> 2.020	0.292	1.948	0.255

2.3 不同剂量的氨基磺酸对中性糖、酸性糖抑制作用的影响: 取对照品溶液和银耳多糖溶液 (1 mg/mL) 各 0.5 mL, 加水 0.5 mL, 分别加入 0、50、100、120、140、160 μL 4 mol/L 氨基磺酸溶液, 操作方法同 2.2, 结果见图 1。

2.4 氨基磺酸对银耳多糖中糖醛酸测定的影响

2.4.1 不含氨基磺酸: 取糖醛酸 10 mg, 加水溶解配成 50 μg/mL 溶液; 另取银耳多糖 10 mg, 加水配成 1 mg/mL 溶液。取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 加水至 1 mL, 冰浴中加入四硼酸钠硫



1-Glu A 2-Xyl 3-TP 4-Glu 5-Man 6-Fuc
图 1 间羟基联苯法(A)和咪唑法(B)中不同剂量氨基磺酸的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of sulfamate with different volume in meta-hydroxydiphenyl method (A) and carbazole method (B) on uronic acid from TP

酸溶液 2.4 mL, 水浴加热 20 min 后, 加咪唑显色, 在 525 nm 处测定吸光度 (A) 值。以 A 为纵坐标, 糖醛酸质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为: $A = -0.00660 + 0.00603 X$, $r = 0.9951$, 线性范围: 10~50 μg; 另取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4 mL, 加水至 0.4 mL, 以下操作同上, 加间羟基联苯显色, 求得回归方程为: $A = -0.0128 + 0.0230 X$, $r = 0.9979$, 线性范围: 5~20 μg。通过以上方程求得银耳多糖中糖醛酸的含量, 结果见表 2。

2.4.2 含氨基磺酸: 分别取 2.4.1 中糖醛酸溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL, 加氨基磺酸 100 μL, 以下操作同上。分别加咪唑、间羟基联苯显色。咪唑法求得回归方程为 $A = 0.142 + 0.00323 X$, $r = 0.9990$, 线性范围在 0.1~0.5 mg; 间羟基联苯法求得回归方程为: $A = 0.0330 + 0.000409 X$, $r = 0.9906$, 线性范围在 0.1~0.5 mg。通过方程求得银耳多糖中糖醛酸的含量, 结果见表 2。

2.5 通过校正因子计算银耳多糖中糖醛酸含量: 取银耳多糖 40 mg, 葡萄糖醛酸 4 mg, 分别加 2 mol/L 三氟乙酸水解 1.5 h, 吹干, 少量蒸馏水溶解, 通过 Dowex 1 树脂, 40 mL 蒸馏水洗脱, 树脂再用 1 mol/L 盐酸 20 mL 洗脱, 收集为酸性糖部分^[4]。采用咪唑

法和间羟基联苯法求得校正因子 ($f = m_{\text{实际量}} / m_{\text{测得量}}$), 分别为 $f_{\text{咔}} = 1.25$ ($n = 5$), $f_{\text{间}} = 1.23$ ($n = 5$)。通过校正因子计算出银耳多糖中糖醛酸质量分数分别为 12.65% ($n = 5$), 12.76% ($n = 5$)。

表 2 银耳多糖中糖醛酸的测定结果 ($n = 5$)

Table 2 Quantitative determination of uronic acids from TP ($n = 5$)

方法	糖醛酸/%
不含氨基磺酸	
咔唑法	30.12
间羟基联苯法	22.57
含氨基磺酸	
咔唑法	23.58
间羟基联苯法	16.30

2.6 银耳多糖测定结果: 取糖醛酸适量, 加水配成 0.05 mg/mL 溶液, 分别取 0.1、0.2、0.3、0.4 mL 加水至 0.4 mL, 加 75 mmol/L 硼酸钠-硫酸溶液 2.4 mL, 水浴加热 15 min, 加间羟基联苯显色, 得回归方程为: $A = 0.034 + 0.0152X$, $r = 0.9994$ 。按上述方法操作, 加咔唑显色, 得回归方程为: $A = 0.0405 + 0.0252X$, $r = 0.9970$ 。另取银耳多糖分别配成 0.20、0.25、0.50、0.75 mg/mL 溶液, 分别取 0.2 mL 加水至 0.4 mL, 按上述两种方法测定糖醛酸质量分数。间羟基联苯法测得结果分别为: 9.07%、12.21%、12.69%、14.02% ($n = 5$)。咔唑法测得结果分别为: 16.47%、18.33%、18.95%、19.78% ($n = 5$)。

3 讨论

从表 1 结果得出测定糖醛酸的咔唑法和间羟基联苯法均可使中性糖在 525 nm 处有不同程度的吸收, 且发现中性糖对咔唑法的干扰更明显。同时也显示出氨基磺酸在两种方法中对中性糖的显色具有较强的抑制作用。说明对酸性杂多糖中糖醛酸含量测定时, 中性糖的存在对测定结果的干扰是随酸性糖

含量的降低而误差增大, 表 2 结果已证明了这一推测。氨基磺酸的加入对每种中性糖均有不同程度的抑制作用。表 1 可见, 咔唑法中氨基磺酸对中性糖的平均抑制率为 77%, 间羟基联苯法的抑制率为 66%, 均达不到完全抑制。为了考察氨基磺酸的加入量对中性糖、酸性糖的抑制率的关系, 实验对不同剂量氨基磺酸和各单糖及样品在两种测定方法中的吸光度值(A)作曲线(图 1)。结果显示, 氨基磺酸加入量对中性糖的抑制作用在一定范围内成正比, 超出范围, 氨基磺酸抑制作用呈恒定趋势, 且两种方法对糖醛酸也有 10% 的抑制作用, 所以对糖醛酸含量低的酸性杂多糖加氨基磺酸法测定糖醛酸是不合适的。如果把校正因子求得的银耳多糖中糖醛酸的结果作为实际含量, 那么 2.6 项结果显示, 采用间羟基联苯法对糖醛酸含量低的酸性杂多糖配制质量浓度在 0.25~0.50 mg/mL 时, 所测得的结果与实际值非常接近。

综上所述, 咔唑法和间羟基联苯法均为糖醛酸测定的经典方法, 但天然多糖中糖醛酸含量往往偏低, 由于中性糖的干扰而产生较大的误差。利用校正因子求得糖醛酸含量, 虽然可以避免这些误差, 但是实际过程繁琐, 不适合快速测定。本实验通过把样品配制成低质量浓度, 采用间羟基联苯法, 可使样品中中性糖的干扰降至最低, 所得结果更接近于实际值。

References

- [1] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330-334.
- [2] Blomkrantz N, Aasboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54: 484-489.
- [3] Filisetti-Cozzi T M C C, Carpita N C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars [J]. *Anal Biochem*, 1991, 197: 157-162.
- [4] Jones T M, Albershem P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell [J]. *Plant Physiol*, 1972, 49: 926-936.

RP-HPLC 法测定类风关巴布剂中雷公藤甲素的含量

陈凌云¹, 叶建晨¹, 张卫兵^{2*}

(1. 温州市药品检验所, 浙江 温州 325028; 2. 温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000)

类风关巴布剂是温州医学院附属第一医院“穴位贴敷治疗类风湿关节炎研究”课题组研制的治疗

类风湿关节炎的外用制剂, 由涂膜剂改良而成。该制剂主要是雷公藤、防风、丹参等中药饮片的醇提取

* 收稿日期: 2004-02-06

基金项目: 浙江省中医药科研课题(2000C83)

作者简介: 陈凌云(1969—), 女, 浙江温州人, 主管中药师, 1989年毕业于浙江中医学院, 主要从事中药材及中成药质量分析。

Tel: (0577) 88513920 E-mail: cly-nanyang@163.com