

夏枯草-泊洛沙姆温敏凝胶中多糖的测定

姜玲海¹, 冯 怡^{1*}, 沈 岚¹, 徐德生²

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

摘要:目的 研究去除泊洛沙姆对温敏凝胶中多糖测定干扰的方法, 并建立制剂中多糖的测定方法。方法 采用凝胶冷冻干燥, 醋酸乙酯萃取的前处理方法, 并以比色法检测制剂中多糖。结果 凝胶经醋酸乙酯萃取后可完全去除基质的干扰, 多糖保留率为 100.11% ($n=3$), 比色法检测制剂中多糖的量, 平均加样回收率为 102.57% ($n=9$)。结论 该前处理方法简便, 可操作性强, 基质干扰去除完全, 多糖保留率高, 含量测定方法稳定、重现性较好。

关键词:夏枯草温敏凝胶; 泊洛沙姆; 多糖

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)06-0853-03

夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗, 有清火, 明目, 散结, 消肿的功效^[1]。文献及前期研究表明夏枯草中所含多糖具抗病毒及提高免疫等作用^[2]。在分离纯化得到夏枯草多糖抗病毒有效部位的基础上, 本课题组以泊洛沙姆为基质制备了夏枯草多糖温敏凝胶, 但在制剂质量标准研究中发现, 泊洛沙姆对多糖的测定造成严重干扰, 因此寻找一种理想的前处理方法既可去除基质的干扰又可减少多糖的损失显得尤为重要。因此本实验通过采用凝胶冷冻干燥后醋酸乙酯萃取处理, 很好地控制了基质干扰, 建立了简便、稳定、操作性强的温敏凝胶中多糖的测定方法, 为以泊洛沙姆为主要基质的含多糖制剂中多糖的测定提供参考。

1 试剂与仪器

HP8453 可见紫外分光光度计(美国 Agilent 公司); ALPHA1-4 冷冻干燥仪(Maren Christ); LXJ-IIIB 低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂); 泊洛沙姆 407 (Poloxamer 407, Pluronic® F127, F127, 德国 BASF, 简称 P407); 泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188, Pluronic® F68, F68, 德国 BASF, 简称 P188); 试剂均为分析纯; 夏枯草多糖(自制, 质量分数为 50%~60%); 夏枯草多糖温敏凝胶(自制)。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定: 取无水葡萄糖对照品适量, 精密称定, 加蒸馏水制成 2.10 mg/mL 无水葡萄糖的溶液, 摇匀, 即得母液。取夏枯草多糖冷冻干燥品适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加蒸馏水使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 2.0 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.4 mg/mL

夏枯草多糖供试品溶液。精密吸取对照品、供试品溶液各 0.2 mL, 分别于冰浴中加入 5% 苯酚 0.8 mL, 涡旋混匀, 再加浓硫酸 4.0 mL, 加塞, 涡旋混匀, 于沸水浴中加热 10 min, 取出, 于冰水浴中冷却, 放至室温。以溶剂为空白, 于 400~800 nm 全波长扫描, 结果见图 1。无水葡萄糖对照品、夏枯草多糖在 483 nm 处均有最大吸收。故选择 483 nm 作为多糖的检测波长。

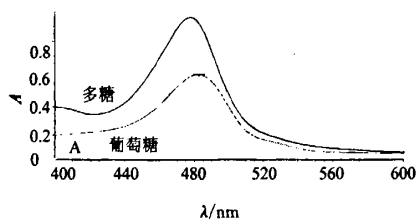


图1 夏枯草多糖和无水葡萄糖的全波长扫描图谱

Fig. 1 Scanning pattern of full wavelength for polysaccharides in *P. vulgaris* and anhydrous dextrose

2.2 标准曲线的制备: 分别自母液中精密吸取 0.05、0.15、0.25、0.50、1.0 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 20.15、60.44、100.70、201.50、403.00 $\mu\text{g/mL}$ 无水葡萄糖对照品溶液。精密吸取 0.2 mL 于具塞试管中, 分别于冰浴中加入 5% 苯酚 0.8 mL, 涡旋混匀, 再加浓硫酸 4.0 mL, 加塞, 涡旋混匀, 于沸水浴中加热 10 min, 取出, 于冰水浴中冷却, 放至室温, 以溶剂为空白, 于 483 nm 测定吸光度。以吸光度为横坐标, 质量浓度为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为: $C=0.3634 A-0.0171$, $r=0.9996$, 线性范围为 20.15~403.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 凝胶中泊洛沙姆对多糖测定的干扰及处理

收稿日期: 2007-09-18

基金项目: 上海市科委中药现代化专项(03DZ19521)

作者简介: 姜玲海(1982-), 女, 上海人, 硕士, 研究方向: 药物新剂型、新技术。E-mail: jlh_0129@163.com

* 通讯作者 冯 怡 Tel: (021)51322493 Fax: (021)51322491 E-mail: fyi@vip.sina.com

2.3.1 泊洛沙姆的对多糖测定的影响:取少量 P407、P188,分别溶胀后,自 2.1 检测波长的确定项下“于冰浴中加入 5%苯酚 0.8 mL”起操作,于 400~800 nm 全波长扫描,结果见图 2。P407、P188 在多糖最大吸收波长 483 nm 处均有吸收,对多糖的测定存在严重干扰。

2.3.2 泊洛沙姆干扰的去除:预试验中发现泊洛沙姆在室温下易溶于醋酸乙酯,而夏枯草多糖则不溶,同时又发现以醋酸乙酯对凝胶进行液液萃取时,极易发生胶凝,此胶凝现象降低了醋酸乙酯萃取率,故液液萃取并不适合温敏凝胶中基质与多糖的分离,因此考虑先将凝胶进行冷冻干燥后,再用醋酸乙酯萃取的方法分离基质与多糖。

取温敏凝胶空白基质(P407/P188)约 1 g,置 10 mL 塑料离心管中,精密称定,冷冻干燥。冷冻干燥样品加醋酸乙酯 2.0 mL,涡旋使完全溶解,5 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀再加醋酸乙酯 2.0 mL,同法萃取 1 次,沉淀于 50 ℃水浴挥尽醋酸乙酯。残渣用 0.2 mL 蒸馏水完全溶解,自 2.1 检测波长的确定项下“于冰浴中加入 5%苯酚 0.8 mL”起操作,于 400~800 nm 全波长扫描,结果见图 2。泊洛沙姆经醋酸乙酯萃取后,在多糖最大吸收波长 483 nm 处均无吸收,对多糖的测定无干扰。

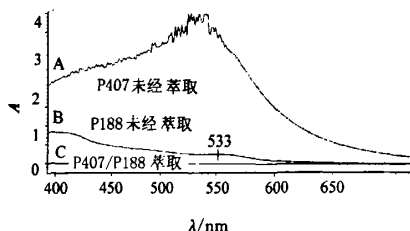


图 2 泊洛沙姆经醋酸乙酯萃取前后全波长扫描图谱

Fig. 2 Scanning patten of full wavelength for extracted or unextracted Poloxamer by ethyl acetate

2.4 醋酸乙酯萃取夏枯草多糖保留率的考察:从夏枯草温敏凝胶中取约 1 g 凝胶,置 10 mL 塑料离心管中,精密称定,冷冻干燥。冷冻干燥样品加醋酸乙酯 2.0 mL,涡旋使完全溶解,5 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀分别再加醋酸乙酯 2.0 mL,同法萃取 1 次,沉淀于 50 ℃水浴挥尽醋酸乙酯。残渣用蒸馏水完全溶解,转移至 100 mL 量瓶,加蒸馏水至刻度,摇匀,即得供试品溶液 1。取夏枯草多糖 0.03 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,自此溶液中精密移取 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液 2。分别自供试品溶液 1、2 中精密移取

0.2 mL 于具塞试管中,于 483 nm 处进行比色,结果多糖保留率的均值为 100.11%,RSD 为 3.22% ($n=3$)。结果表明,凝胶经醋酸乙酯萃取,夏枯草多糖并无损失,醋酸乙酯是样品处理的合适溶剂。

2.5 醋酸乙酯萃取用量的考察:取夏枯草温敏凝胶约 1 g,置 10 mL 塑料离心管中,精密称定,冷冻干燥。冷冻干燥样品分别加醋酸乙酯 1.0、2.0、3.0、5.0 mL,涡旋使完全溶解,5 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀分别再加醋酸乙酯 1.0、2.0、3.0、5.0 mL,同法萃取 2 次,沉淀 50 ℃水浴挥尽醋酸乙酯。残渣用蒸馏水完全溶解,转移至 100 mL 量瓶,加蒸馏水至刻度,摇匀,即得供试品溶液。分别自各供试品溶液中精密移取 0.2 mL 于具塞试管中,于 483 nm 处测定吸光度值,结果见表 1。醋酸乙酯萃取用量为 2.0 mL 时,制剂中多糖保留率最高,为 99.7%。故选择醋酸乙酯萃取用量为 2.0 mL。

表 1 醋酸乙酯用量对萃取剂中多糖保留率的影响 ($n=4$)

Table 1 Retention rate of polysaccharides in thermosensitive gel of *P. vulgaris* extracted by ethyl acetate with different quantities ($n=4$)

醋酸乙酯用量/mL	多糖保留率/%
1.0	91.8
2.0	99.7
3.0	85.4
4.0	82.8

2.6 醋酸乙酯萃取次数的考察:供试品按 2.5 醋酸乙酯萃取用量的考察项下方法操作,醋酸乙酯分别萃取 1、2、3、4 次,结果见表 2。醋酸乙酯萃取次数对制剂中多糖保留率影响不大,且多糖保留率均较高,为简化实验步骤并保证基质去除完全,实验中采用醋酸乙酯萃取 2 次处理样品。

表 2 醋酸乙酯萃取次数对制剂中多糖保留率的影响 ($n=4$)

Table 2 Retention rate of polysaccharides in thermosensitive gel of *P. vulgaris* extracted by ethyl acetate with different extracting times ($n=4$)

醋酸乙酯萃取次数/次	多糖保留率/%
1	94.41
2	98.80
3	96.74
4	99.51

2.7 方法学考察

2.7.1 稳定性试验:供试品溶液分别于 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 于 483 nm 波长处测定吸光度值,结果样品显色后至少 4 h 内,吸光度值基本稳定(RSD 为 0.26%)。

2.7.2 精密度试验:取同一质量浓度的葡萄糖对照品溶液连续测定 5 次,测定吸光度值,计算,结果吸光度值的 RSD 为 0.23%。

2.7.3 重现性试验:取同一批次样品 5 份,制备供试品溶液,测定,计算,结果样品中多糖质量分数的 RSD 为 2.3%。

2.7.4 加样回收率试验:取夏枯草温敏凝胶 0.5 g (含多糖约 5.2 mg),精密称定,分别加入 3.98、5.01、6.04 mg 无水葡萄糖对照品,制备供试品溶液,测定,计算回收率,结果平均加样回收率为 102.57%,RSD 为 1.79%($n=9$)。

2.8 温敏凝胶中多糖的测定:分别自 3 批夏枯草温敏凝胶中取约 1 g 凝胶,置 10 mL 塑料离心管中,精密称定,冷冻干燥。冷冻干燥样品加醋酸乙酯 2.0 mL,涡旋使完全溶解,5 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀分别再加醋酸乙酯 2.0 mL,同法萃取 1 次,沉淀于 50 ℃ 水浴挥尽醋酸乙酯。残渣用蒸馏水完全溶解,转移至 100 mL 量瓶,加蒸馏水至刻度,摇匀,即得供试品溶液。自供试品溶液中精密移取 0.2 mL 于具塞试管中,于 483 nm 处测定吸光度值,结果见表 3。

表 3 夏枯草温敏凝胶中多糖的测定结果($n=3$)

Table 3 Determination of polysaccharides in thermo-sensitive gel of *P. vulgaris* ($n=3$)

批号	多糖/%	RSD/%
060917	1.08	2.14
060918	1.06	1.17
060919	1.02	3.96

3 讨论

泊洛沙姆为聚氧乙烯(PEO)和聚氧丙烯(PPO)组成的 ABA 型嵌段共聚物,其高浓度水溶液具有受热反向胶凝的性质,即冷藏温度下是自由流动的液体而室温或体温时形成澄明的凝胶^[3]。泊洛沙姆在多糖定量测定中的干扰,可能是由于其在硫酸作用下脱水形成的化合物可与苯酚反应生成有色化合物,该物质与多糖经显色所得化合物颜色相近,因而造成严重干扰。经预实验发现泊洛沙姆在室温下易溶于醋酸乙酯,而夏枯草多糖则不溶,据此采用醋酸乙酯为萃取溶剂对多糖及基质进行分离。但因制剂本身为温敏凝胶,在温度达 29~30 ℃ 时即可发生相转变而成凝胶,以醋酸乙酯进行液液萃取时属于放热过程,凝胶的胶凝阻碍了醋酸乙酯的萃取,故液液萃取的方式并不适合温敏凝胶中基质与多糖的分离,因此采用先将制剂进行冷冻干燥后,再用醋酸乙酯萃取的方法分离基质与多糖,较符合温敏凝胶的特性,多糖保留率为 100.11%,是较为理想的样品前处理方法,为以泊洛沙姆为主要基质的多糖制剂中多糖的含量测定提供参考。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] Xu H X, Lee S H S, Lee S F, et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 44: 43.
- [3] Wei G, Xu H, Ding P T, et al. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use rheological and gamma scintigraphic studies [J]. *J Controlled Release*, 2002, 83(1): 65-74.

龙血竭胶囊的 HPLC 指纹图谱研究

高秀丽,蒋倩,张敏

(贵阳医学院药学院,贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 用 HPLC 法对龙血竭胶囊指纹图谱进行研究。方法 采用色谱条件:Eclipse XDB-ODS 柱(150 mm×4.6 mm),流动相为乙腈-水,梯度洗脱进行色谱分离;检测波长为 275 nm;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 40 ℃,以龙血素 B 作为参照物。结果 初步建立了龙血竭胶囊的 HPLC 指纹图谱,并进行相似度评价。结论 方法简单可行,能够有效地控制龙血竭胶囊的内在质量。

关键词:龙血竭胶囊;指纹图谱;HPLC;相似度

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)06-0855-04

血竭为传统名贵中药,有“活血之圣药”的美誉,

含多种黄酮类、皂苷类、甾醇类、萜类和其他化合物,

收稿日期:2007-09-30

作者简介:高秀丽(1965—),女,副教授,硕士,1990 年毕业于华西医科大学药学院,2001—2003 年作为英国 Portsmouth 大学访问学者,2003—2004 年作为英国 Manchester 大学访问学者,现为贵阳医学院实验室管理与设备处副处长,在药理学系分析测试中心任教,从事药物质量及其新药开发研究,药物药理学研究。Tel:(0851)6908468 E-mail:xiuli.gao@hotmail.com

夏枯草-泊洛沙姆温敏凝胶中多糖的测定

作者：[姜玲海](#), [冯怡](#), [沈岚](#), [徐德生](#)
作者单位：[姜玲海, 冯怡, 沈岚\(上海中医药大学, 上海, 201203\)](#), [徐德生\(上海中医药大学附属曙光医院, 上海, 200021\)](#)
刊名：[中草药](#)  
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(6)

参考文献(3条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [Xu H X;Lee S H S;Lee S F](#) [Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*](#) 1999
3. [Wei G;Xu H;Ding P T](#) [Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use rheological and gamma scintigraphic studies](#)[外文期刊] 2002(01)

本文读者也读过(10条)

1. [周军](#), [郭丹](#), [陈志祥](#), [王凯平](#) [当归多糖铁中多糖含量测定方法的建立](#)[会议论文]-2007
2. [席与斌](#), [吴允孚](#), [陈刚](#), [XI Yu-bin](#), [WU Yun-fu](#), [CHEN Gang](#) [夏枯草多糖的分离及抗氧化活性研究](#)[期刊论文]-[广东药学院学报](#)2010, 26(6)
3. [简美玲](#), [郑基煊](#), [毛润乾](#) [夏枯草药材资源开发研究](#)[期刊论文]-[广东农业科学](#)2011, 38(5)
4. [熊双丽](#), [李安林](#), [XIONG Shuang-li](#), [LI An-lin](#) [夏枯草多糖的清除自由基及抗氧化活性](#)[期刊论文]-[食品研究与开发](#)2010, 31(11)
5. [朱永宁](#), [杨爱岗](#), [刘菁琰](#), [李帆](#), [冯宝民](#), [王永奇](#) [荨麻根提取物中多糖的测定](#)[期刊论文]-[中草药](#)2007, 38(8)
6. [姜玲海](#), [冯怡](#), [沈岚](#), [徐德生](#), [JIANG Ling-hai](#), [FENG Yi](#), [SHEN Lan](#), [XU De-sheng](#) [去除温敏凝胶中泊洛沙姆对多糖含量测定干扰的方法学研究](#)[期刊论文]-[中药材](#)2007, 30(11)
7. [孙玲](#) [补骨脂多糖的含量研究](#)[期刊论文]-[临床合理用药杂志](#)2010, 3(8)
8. [姜玲海](#), [冯怡](#), [徐德生](#), [姜艳](#), [张勇](#), [张惠珍](#), [JIANG Ling-hai](#), [FENG Yi](#), [XU De-sheng](#), [JIANG Yan](#), [ZHANG Yong](#), [ZHANG Hui-zhen](#) [夏枯草多糖抗单纯性疱疹病毒及相关免疫活性初步研究](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#)2007, 18(11)
9. [许军](#), [彭红](#), [陶欣荣](#), [陈浩](#) [家种白花蛇舌草多糖含量的测定](#)[期刊论文]-[中国中医药科技](#)2007, 14(4)
10. [张瑞](#), [Zhang Rui](#) [夏枯草多糖对HIV-1感染者PBMC诱生细胞因子水平及细胞凋亡影响的实验研究](#)[期刊论文]-[河南中医学院学报](#)2005, 20(1)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200806018.aspx