

· 研究报告 ·

蒲地灌肠液中总多糖含量测定与方法学验证

王艺红^a, 陈锦珊^a, 许彩燕^b, 郑绍忠^a (解放军 175 医院/厦门大学附属东南医院, a. 制剂科; b. 药学科, 福建 漳州 363000)

[摘要] 目的 建立蒲地灌肠液中总多糖的含量测定方法。方法 采用苯酚-硫酸法显色, 紫外分光光度法在 488.8 nm 波长处测定总多糖的含量。结果 总多糖在 0~22.635 mg/L 范围内呈良好线性关系; 其回归方程为 $Y = 0.062\ 06\ X - 0.003\ 34$ ($r = 0.999\ 8$), 回收率为 98.36%, RSD 为 2.34% ($n = 6$)。结论 该方法灵敏、快速、准确、可靠, 可用于蒲地灌肠液中总多糖含量的测定。

[关键词] 蒲地灌肠液; 总多糖; 苯酚-硫酸法; 紫外分光光度法; 含量测定

[中图分类号] R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)03-0248-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.013

The methodology validation and content assay of total polysaccharides in Pudi Enema

WANG Yihong^a, CHEN Jinshan^a, XU Caiyan^b, ZHENG Shaozhong^a (No. 175 Hospital of PLA, the Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, a. Compounding Pharmacy; b. Central Pharmacy, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish the assay method for the total polysaccharide in Pudi Enema. **Methods** Phenol-sulfuric acid method was used for chromogenic reaction. The content of total polysaccharide was measured by UV spectrophotometry at 488.8 nm. **Results** The total polysaccharides calibration curve was at the range of 0~22.635 mg/L, with regression function being $Y = 0.062\ 06\ X - 0.003\ 34$ ($r = 0.999\ 8$). The recovery of calycosin was 98.36% (RSD = 2.34%). **Conclusion** This method is sensitive, rapid, accurate and reliable. It can be used to assay the content of total polysaccharide in Pudi Enema.

[Key words] Pudi Enema; phenol-sulfuric acid method; total polysaccharides; UV spectrophotometry; content assay

蒲地灌肠液是解放军 175 医院根据临床协定处方研制而成的中药复方制剂, 临床用于治疗慢性盆腔炎, 通过保留灌肠给药而发挥活血化瘀、抗菌消炎和增强免疫力等功效。处方由蒲公英、紫花地丁、柴胡、鱼腥草、当归、红花等 10 味中药组成, 其中鱼腥草、柴胡、当归等 7 味中药中含有多糖, 具有抗菌消炎、抗氧化及增强免疫力等作用^[1-4]。为加强该制剂的质量控制, 笔者参考有关文献^[5-7], 设计了其总多糖含量测定的方法并进行验证^[8]。

1 仪器与试剂

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(岛津公司); AUX220 型电子分析天平(岛津公司); 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市江南仪器厂)。浓硫酸等均为分

析纯, 苯酚为药用标准, 水为纯化水。无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所, 批号为 110833-200904), 蒲地灌肠液(自制, 批号为 20140102、20140103、20140104)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 5% 苯酚溶液 取苯酚 150 g、铝片 0.15 g、碳酸钠 0.075 g, 置 250 ml 圆底烧瓶中, 加热蒸馏, 收集沸点 182 °C 的蒸馏液, 常温下析出纯苯酚结晶约 35 g。称取纯苯酚结晶 5.0 g, 加水稀释定量至 100 ml, 摇匀后转移至 100 ml 棕色瓶中, 置冷处保存, 备用。

2.1.2 对照品溶液 精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 5.03 mg, 置 200 ml 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得葡萄糖对照品储备液 (25.15 mg/L)。精密量取储备液 50 ml 置 100 ml 容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液 (12.575 mg/L)。

[作者简介] 王艺红, 本科, 主管药师, 研究方向: 医院制剂。Tel: (0596)2975793; Email: 375149657@qq.com

[通讯作者] 郑绍忠, 副主任药师, 研究方向: 医院制剂、临床药学。Tel: (0596)2975796; Email: 937701323@qq.com

2.1.3 1%、0.4%和0.2%供试品溶液 取批号为20140102的蒲地灌肠液100 ml,离心15 min (4 000 r/min),精密量取上清液1.0 ml,3份,分置100、250、500 ml容量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

2.2 总多糖含量测定方法学研究

2.2.1 测定波长、供试品溶液浓度考察 精密量取对照品储备液0.5、1.0 ml,1%、0.4%和0.2%供试品溶液各1.0 ml,水2.0 ml,分置6支15 ml具塞刻度试管中。前5管加水使成2.0 ml,各管加5%苯酚溶液1.0 ml,摇匀后分别加浓硫酸5.0 ml,振荡摇匀放置10 min,100 ℃水浴中保温显色15 min,取出置冰水浴冷却至室温。以第6管作参比管,采用UV-2550型紫外-可见分光光度计,在200~650 nm波长范围内扫描。结果见图1,5种溶液的最大吸收波长均为488.8 nm。对照品储备液0.5 ml,0.2%供试品溶液1.0 ml测得的吸光度值在0.6~0.8范围。考虑到试验平行性,后续统一取样1.0 ml用于测定。

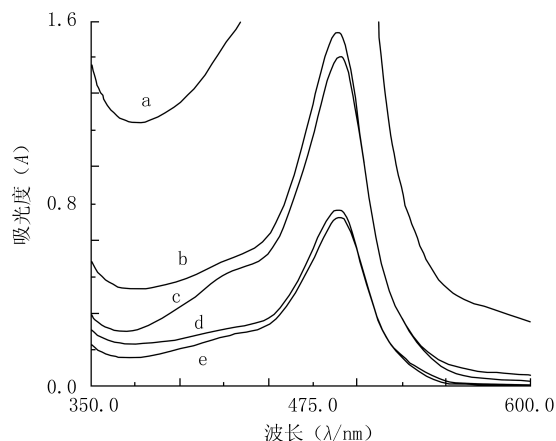


图1 供试品溶液和对照品溶液最大吸收波长扫描图
a:1%供试品溶液;b:0.4%供试品溶液;c:对照品储备液1.0 ml;d:0.2%供试品溶液;e:对照品储备液0.5 ml

2.2.2 5%苯酚溶液最佳用量考察 精密量取对照品溶液、0.2%供试品溶液(下称“供试品溶液”)各1.0 ml,各5份,分置15 ml具塞刻度试管中,分别加水1.0 ml,加5%苯酚溶液0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 ml,摇匀,加浓硫酸5.0 ml,按“2.2.1”项下进行显色处理,于488.8 nm波长处测定吸光度,结果见图2,5%苯酚溶液用量在0.8ml和1.2ml之间对吸光度的影响趋于平缓,为方便实验操作,确定5%苯酚溶液用量为1.0 ml。

2.2.3 浓硫酸最佳用量考察 精密量取对照品溶液、供试品溶液各1.0 ml,各5份,分置15 ml具塞

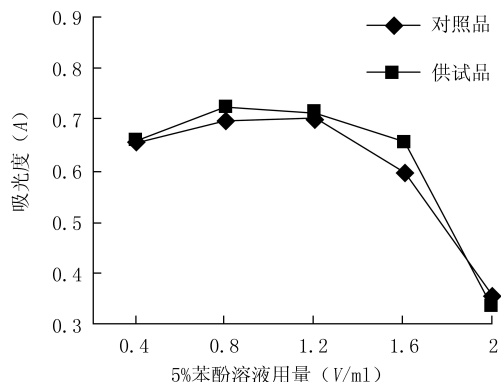


图2 5%苯酚溶液用量对吸光度的影响

刻度试管中,加水1.0 ml,加入5%苯酚溶液1.0 ml,摇匀后再分别加入浓硫酸3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 ml,按“2.2.1”项下进行显色处理,于488.8 nm波长处测定吸光度,结果见图3,浓硫酸用量为5.0 ml时,对照品溶液和供试品溶液吸光度最佳,故浓硫酸用量以5.0 ml为宜。

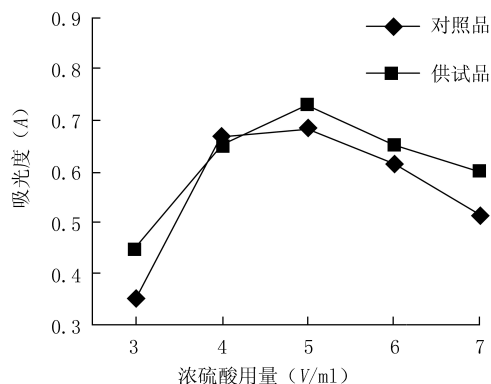


图3 浓硫酸用量对吸光度的影响

2.2.4 显色反应最佳温度考察 精密量取对照品溶液、供试品溶液各1.0 ml,各5份,分置15 ml具塞刻度试管中,加水1.0 ml,加入5%苯酚溶液1.0 ml,摇匀后分别加浓硫酸5.0 ml,按“2.2.1”项下方法分别在60 ℃、70 ℃、80 ℃、90 ℃、100 ℃水浴中进行显色处理,于488.8 nm波长处测定吸光度,结果见图4,显色温度为80 ℃时,对照品溶液和供试品溶液吸光度最佳,故显色反应最佳温度为80 ℃。

2.2.5 显色反应最佳时间考察 精密量取对照品溶液、供试品溶液各1.0 ml,各5份,分置15 ml具塞刻度试管中,加水1.0 ml,加入5%苯酚溶液1.0 ml,摇匀后分别加浓硫酸5.0 ml,振荡摇匀放置10 min,置80 ℃水浴中分别显色5、10、15、20、25 min后,取出置冰水浴冷却至室温,于488.8 nm波长处测定吸光度,结果见图5,显色反应时间在

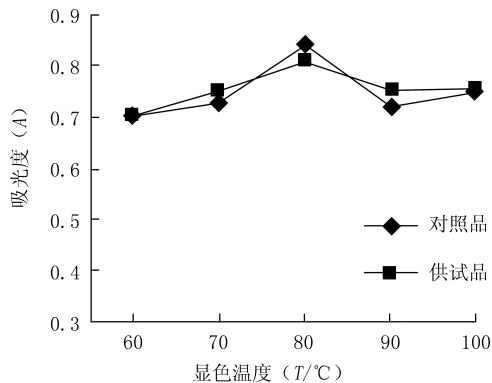


图4 显色温度对吸光度的影响

15 min时吸光度最佳,超过15 min以后吸光度呈下降趋势,故显色反应最佳时间为15 min。

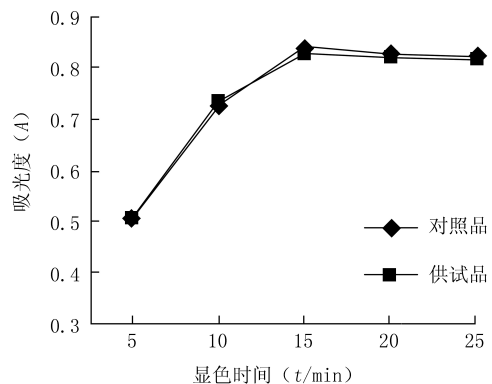


图5 显色时间对吸光度的影响

2.2.6 测定方法 综合以上考察结果,确定蒲地灌肠液总多糖的含量测定方法为:精密量取供试品上清液1.0 ml,加水定容至500 ml。再精密量取稀释液1.0 ml,加水1.0 ml,加5%苯酚溶液1.0 ml,摇匀后加浓硫酸5.0 ml,振荡摇匀放置10 min,置80 °C水浴显色15 min后,取出置冰水浴冷却至室温,于488.8 nm波长处测定吸光度,计算总多糖含量。

2.3 总多糖含量测定方法学验证

2.3.1 标准曲线与回归方程 精密量取对照品溶液0.0、0.3、0.6、1.0、1.4、1.8 ml,分置6支15 ml具塞刻度试管中,照“2.2.6”项下处理,以第1管作参比,在488.8 nm处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度值为横坐标进行线性回归,得曲线方程 $Y=0.06206X-0.00334$ ($r=0.9998$),表明葡萄糖浓度在0~22.635 mg/L范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.3.2 稳定性试验 精密量取供试品溶液1.0 ml,照“2.2.6”项下处理,以2 ml水同法处理作参比溶液,在488.8 nm处分别于0、0.5、1、2、3、4 h时测定

吸光度,测得总多糖含量分别为13.254、13.157、13.118、12.907、12.755、12.508 mg/L,均值为12.9498 mg/L, $RSD=2.18\%$ ($n=6$),说明显色后的样品溶液在4 h内稳定。

2.3.3 重复性试验 精密量取供试品溶液1.0 ml,6份,照“2.2.6”项下处理,以2 ml水同法处理作参比溶液,在488.8 nm处测定吸光度,测得总多糖含量分别为13.028、13.087、12.866、12.557、12.774、13.095 mg/L,均值为12.901 mg/L, $RSD=1.64\%$ ($n=6$)。

2.3.4 回收率试验 精密量取对照品溶液和已知含量的供试品溶液各0.5 ml,6份,照“2.2.6”项下处理,以2.0 ml水同法处理作参比溶液,在488.8 nm处测定吸光度,计算总多糖含量(mg/L),回收率计算结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

序号	供试品加入量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	6.4505	6.2875	12.795	100.91		
2	6.4505	6.2875	12.560	97.17		
3	6.4505	6.2875	12.822	101.34	98.36	2.34
4	6.4505	6.2875	12.636	98.38		
5	6.4505	6.2875	12.479	95.88		
6	6.4505	6.2875	12.518	96.50		

2.4 蒲地灌肠液中试产品总多糖含量测定 取留样室蒲地灌肠液3批(批号为20140102、20140103、20140104),照“2.2.6”项下测定,测得总多糖含量分别为12.729、13.205、12.183 mg/L,3批中试产品的总多糖含量分别为5.09%、5.28%和4.87%。

3 讨论

苯酚-硫酸法^[5-7]测定多糖含量被广泛应用于中药制剂,其原理是多糖经浓硫酸水合时,产生的高温使其迅速水解成单糖,并快速脱水生成糖醛衍生物,后者与苯酚缩合成有色化合物,在488.8 nm波长处有特征吸收。其吸光度与含量成正比,故可用于测定样品中多糖含量。采用苯酚-硫酸法测定多糖含量时,常用葡萄糖作为标准品,建立葡萄糖与苯酚-硫酸显色后在特定波长处吸光度与葡萄糖浓度的标准曲线,计算得出回归方程和相关系数,其测定结果为蒲地灌肠液总多糖含量的一个间接指标。

相关研究表明,在使用苯酚-硫酸法测定多糖含量时,影响结果的因素较多,包括苯酚用量、硫酸用

量、反应温度、反应时间等^[9,10]。为使测定结果可靠,笔者对显色反应条件,包括5%苯酚溶液用量、硫酸加入量、显色温度和规定温度下水浴时间等进行考察,各考察因素对测定结果均有一定影响。实验时,应注意严格按考察选定的条件进行试验。苯酚-硫酸法对有机物十分敏感,供试品溶液制备和测定过程应注意避免有机物的污染,如不宜使用易产生纤维的物质擦拭移液管口、烧杯和比色皿等。另外,应注意硫酸的纯度,笔者实验时曾用某厂的分析纯硫酸,加入参比管后参比液本应无色的却显微红色,经更换其它厂家硫酸后实验得以继续,提示硫酸中的杂质对显色反应有影响。

综上所述,通过方法学效能指标(线性关系、稳定性、重复性、回收率等)的验证,表明苯酚-硫酸法可以用于蒲地灌肠液总多糖的含量测定,且技术操作简单,稳定性好,经济可行,结果准确可靠。

【参考文献】

[1] 马新方,李勇.鱼腥草多糖体内抗氧化活性研究[J].中医研

究,2011,24(2):19-20.

- [2] 吴红森,王晓鹏,王磊.鱼腥草多糖的抑菌作用[J].中国野生植物资源,2012,31(5):24-26.
- [3] 季晓,宣槐斌,黄宝康.明党参活性成分及药理作用研究进展[J].药学实践杂志,2015,33(2):102-105.
- [4] 杜柯,孙润广,赵凯,等.柴胡多糖的结构和抗氧化活性分析[J].生物加工过程,2011,9(4):45-48.
- [5] 张彦丽,阿布都热合曼·合力力,阿依吐伦·斯马义.苯酚-硫酸法测定维吾尔药昆仑雪菊多糖含量的研究[J].药物分析杂志,2010,30(11):2205-2207.
- [6] 韩丹,王艳萍,毕亚静,等.白芨多糖提取方法的优选及其理化性质研究[J].药学实践杂志,2013,31(1):35-37.
- [7] 余学英,常明泉,陈芳,等.萘酚染色法测定维地红涂剂中多糖的含量[J].药学实践杂志,2014,32(5):352-356.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版四部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:374-377.
- [9] 屠婕红,陈伟光,王照雷,等.天花粉多糖的单糖组成分析及不同采收期多糖含量比较[J].中国现代应用药学,2011,28(7):666-668.
- [10] 吴明侠,崔永霞,王晶娟,等.野菊花中总多糖提取条件的研究[J].中国现代应用药学,2011,28(2):133-136.

【收稿日期】 2016-02-17 【修回日期】 2016-07-19

【本文编辑】 顾文华

(上接第223页)

制P-gp的活性,降低细胞对化疗药物的外排作用,增加化疗药物在肿瘤细胞内的蓄积,以期达到更好的抑制肿瘤的效果。

本研究首先建立了DOX和ELC两种药物的体外分析方法,为纳米粒的包封率和载药量的测定提供了研究基础。采用纳米沉淀法成功制备了共载DOX和ELC的PLGA纳米粒,其粒径在50nm左右,分布均匀,通过处方优化,使纳米粒装载的两种药物达到最佳协同比例。后续药效学研究还需通过体外细胞实验和体内抗肿瘤实验进一步考察。

【参考文献】

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859):105-111.
- [2] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009, 138(4):645-659.
- [3] Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, et al. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms[J]. Semin Cancer Biol, 2014, 31:16-27.
- [4] Hubensack M, Müller C, Höcherl P, et al. Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(5):597-607.
- [5] Karla PK, Earla R, Boddu SH, et al. Molecular expression and functional evidence of a drug efflux pump (BCRP) in hu-

man corneal epithelial cells[J]. Curr Eye Res, 2009, 34(1):1-9.

- [6] Nieto Montesinos RM, Beduneau A, Lamprecht A, et al. Liposomes co-loaded with elacridar and tariquidar to modulate the P-glycoprotein at the blood-brain barrier[J]. Mol Pharm, 2015, 12(11):3829-3838.
- [7] Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, et al. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer [J]. J Control Release, 2006, 116(3):275-284.
- [8] Singh MS, Lamprecht A. Cargoes P-gp inhibitors via nanoparticle sensitizes tumor cells against doxorubicin [J]. Int J Pharm, 2015, 478(2):745-752.
- [9] Planting AST, Sonneveld P, Gaast AVD, et al. A phase I and pharmacologic study of the MDR converter GF120918 in combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 55(1):91-99.
- [10] Cheng J, Teply BA, Sherifi I, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery[J]. Biomaterials, 2007, 28(5):869-876.
- [11] Zhu H, Chen H, Zeng X, et al. Co-delivery of chemotherapeutic drugs with vitamin E TPGS by porous PLGA nanoparticles for enhanced chemotherapy against multi-drug resistance[J]. Biomaterials, 2013, 35(7):2391-2400.

【收稿日期】 2017-01-18 【修回日期】 2017-03-31

【本文编辑】 顾文华