

# 苯酚-硫酸法测定清开灵注射液中总多糖的含量

王宏洁, 李鹏跃, 刘 婷, 司 南, 边宝林\*  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 建立以苯酚-硫酸法测定清开灵注射液中总多糖含量的方法。方法: 以苯酚-硫酸法显色, 以葡萄糖为对照品, 测定清开灵注射液中总多糖的含量。结果: 葡萄糖的检测浓度在  $5.037 \sim 125.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内与吸光度呈良好的线性关系 ( $r = 0.9984$ ); 平均回收率为  $100.02\%$ ,  $\text{RSD} = 2.30\%$  ( $n = 6$ )。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 可用于清开灵注射液中总多糖的含量测定。

**[关键词]** 清开灵注射液; 总多糖; 苯酚-硫酸法; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)11-0003-03

清开灵注射液由胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、栀子、水牛角、板兰根、黄芩苷、金银花 8 味药材组成<sup>[1]</sup>。具有清热解毒、化痰通络、醒神开窍作用。目前, 未见清开灵注射液中总多糖含量测定的报道。本文首次采用苯酚-硫酸测定法<sup>[2~3]</sup>, 对清开灵注射液中总多糖的含量进行了测定, 为更深入研究清开灵注射液提供了科学依据。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** UV-T6 型新世纪紫外可见分光光度计 (中国北京普析通用); 电热恒温水浴锅 (天津市泰斯

特仪器有限公司)。

**1.2 试药** D-无水葡萄糖 (中国药品生物制品检定所, 批号: 100736-200401); 清开灵注射液 (北京中医药大学药厂、山西太行药业有限公司、广州白云山制药有限公司); 水为娃哈哈纯净水, 硫酸试剂为分析纯。Sp825 大空吸附树脂: 日本三菱公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 5% 苯酚液的制备** 称取苯酚 100 g, 加铝条 0.1 g、 $\text{NaHSO}_4$  0.05 g, 用套式电热器加热蒸馏, 收集  $(180 \pm 2)^\circ\text{C}$  馏份, 称取温溶苯酚 5 g, 加少量水, 搅拌使溶解, 置于棕色量瓶中, 加水定容至 100 mL, 冷藏, 备用。

**2.1.2 葡萄糖标准贮备液制备** 精密称取  $105^\circ\text{C}$  干燥恒重葡萄糖 50 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加水溶解

**[收稿日期]** 2009-05-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金重大研究计划项目 (90709043)

**[通讯作者]** \* 边宝林, Tel: (010) 64021008; E-mail: bianbaolin2000@yahoo.com.cn

并稀释至刻度, 摇匀, 得 $1\,007.40\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液。冷藏备用。

**2.1.3 测定条件的优选** 多糖测定方法一般为斐林滴定法、比色法(即蒽酮-硫酸法和苯酚-硫酸法)。比色法的灵敏度较高、重复性好、干扰小、样品用量少。苯酚-硫酸法实验数据的稳定性、显色等方面更优于蒽酮-硫酸法, 因此本实验采用正交试验方法重点对苯酚-硫酸法的测定方法进行优选。本试验设计的测定条件因子水平见表 1, 正交设计见表 2。

表 1 测定条件因子水平设计

| 水平 | A(5% 苯酚液/mL) | B(浓硫酸/mL) | C(水浴温度/ min) |
|----|--------------|-----------|--------------|
| 1  | 0.6          | 4.0       | 室温/30        |
| 2  | 0.8          | 5.0       | 60℃/20       |
| 3  | 1.0          | 6.0       | 98℃/20       |

**2.1.4 实验方法** 精密吸取葡萄糖标准贮备液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 水定容, 葡萄糖样液浓度为 $0.1\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按表 2 分 3 组进行试验。

表 2  $L_9(3^4)$  正交设计表

| 因素                | A<br>(5% 苯酚) | B<br>(硫酸量) | C<br>(温度) | 补水量<br>(mL) | 吸收度          |
|-------------------|--------------|------------|-----------|-------------|--------------|
| 1                 | 1            | 1          | 1         | 2.4         | 0.038        |
| 2                 | 1            | 2          | 2         | 0.2         | 0.239        |
| 3                 | 1            | 3          | 3         | 1.0         | 0.801        |
| 4                 | 2            | 1          | 2         | 1.4         | 0.006        |
| 5                 | 2            | 2          | 3         | 2.2         | 0.715        |
| 6                 | 2            | 3          | 1         | 0           | 0.656        |
| 7                 | 3            | 1          | 3         | 0.4         | 0.111        |
| 8                 | 3            | 2          | 1         | 1.2         | 0.105        |
| 9                 | 3            | 3          | 2         | 2           | 0.941        |
| K1                | 1.078        | 0.155      | 0.799     | 1.694       | 3.612        |
| K2                | 1.377        | 1.059      | 1.186     | 1.006       | 13.046 54    |
| K3                | 1.157        | 2.398      | 1.627     | 0.912       | CT 1.449 616 |
| $\Sigma(K_j/2)$   | 4.396 9      | 6.895 9    | 4.692 1   | 4.713 4     |              |
| $\Sigma(K_j/2)/3$ | 1.465 6      | 2.298 6    | 1.564 0   | 1.571 1     |              |
| $S_j$             | 0.016 0      | 0.849 0    | 0.114 4   | 0.121 5     |              |
| MAX               | 1.377        | 2.398      | 1.627     | 1.694       |              |
| MIN               | 1.078        | 0.155      | 0.799     | 0.912       |              |
| R                 | 0.299        | 2.243      | 0.828     | 0.782       |              |

在具塞试管中, 先加葡萄糖样液 1.0 mL, 按表 2 进行补水, 同时以水作空白对照, 加相应的苯酚液, 摇匀, 迅速加浓硫酸沿壁滴加, 振荡摇匀后置于相应温度的水浴中, 保温定时取出, 自来水水浴冷却 5 min, 室温放置 10 min 后于 488 nm 处测吸光度。分析结果  $A_2B_3C_3$  为最佳提取方法。

**2.1.5 检测波长的确定** 分别吸取一定量的葡萄糖对照品溶液显色后在 800~ 400 nm 波长范围内扫描。结果表明, 葡萄糖对照品和供试品的最大吸收峰位一致, 均位于 488 nm 波长处, 故本试验选用 488 nm 作为检测波长。

**2.1.6 标准曲线的绘制** 精密量取葡萄糖标准贮备液 0.05, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 加水稀释至 10 mL。精密加入 5% 苯酚液 0.8 mL, 混匀, 冰水浴, 再精密加入浓硫酸 6.0 mL, 然后在 98℃水浴中加热 20 min, 自来水水浴冷却 5 min, 室温放置 10 min 后于 488 nm 处测吸光度, 以空白溶液为对照。以吸光度对葡萄糖检测浓度进行线性回归, 得回归方程为  $Y=8.357X+0.010\,8$ ,  $r=0.998\,4$ 。结果表明, 葡萄糖检测浓度在 $5.037\sim 125.9\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

**2.1.7 供试品溶液的制备** 精密称吸取清开灵注射液 25 mL, 于水浴上蒸至 5 mL, 混匀, 精密吸取 1 mL, 加入 5 mL 无水乙醇, 搅拌, 室温放置 5 min, 滤过, 残渣加适量水洗置于蒸发皿中, 于水浴上蒸至 10 mL, 混匀。精密吸取 1.5 mL, 加入到已处理好的大孔吸附树脂柱中(树脂用量: 10 mL, 柱:  $\Phi 1.5\,\text{cm}$ ), 用水洗置 100 mL 量瓶中, 摇匀, 作为备用液。

**2.1.8 测定方法** 精密吸取上述备用液 1 mL, 精密加入 5% 苯酚液 0.8 mL, 混匀, 再精密加入浓硫酸 6.0 mL, 然后在 98℃水浴中加热 20 min, 自来水水浴冷却 5 min, 室温放 10 min 后于 488 nm 处测吸光度。以空白溶液为对照。

**2.1.9 重复性试验** 按照供试品溶液的制备方法同时制备 6 份样品, 进行多糖反应测定。结果表明重复性良好, RSD 为 3.39%。

**2.1.10 精密度实验** 取重复性试验样品 1 份, 于 488 nm 处测吸光度 6 次。RSD 为 0.00%。结果表明精密度良好。

**2.1.11 稳定性性试验** 按供试品溶液的制备方法制备样品 1 份, 按 2.1.8 方法进行反应, 于 0, 15, 30,

45, 60, 90, 270 min 于 488 nm 处测吸光度。结果表明样品在 90 min 内稳定。RSD 为 0.64%。

**2.1.12 加样回收率测定** 精密吸取 2.1.7 备用液 0.75 mL, 精密吸取葡萄糖标准贮备液 2.5 mL, 加入到已处理好的大孔吸附树脂柱中(树脂用量: 10 mL, 柱:  $\Phi$ 1.5 cm), 用水洗置 100 mL 量瓶中, 摇匀, 按 2.1.8 方法进行反应、测定, 测得吸光度值分别代入回归方程计算加样回收率。结果见表 3。

| 表 3 加样回收率 |             |               |             |             |            |              |            |
|-----------|-------------|---------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| 序号        | 取样量<br>(mL) | 样品中<br>含量(mg) | 加入量<br>(mg) | 测得量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | 平均回收<br>率(%) | RSD<br>(%) |
| 1         | 0.75        | 2.774 3       | 2.518       | 5.255 5     | 98.52      | 100.02       | 2.30       |
| 2         | 0.75        |               |             | 5.375 1     | 103.27     |              |            |
| 3         | 0.75        |               |             | 5.231 5     | 97.57      |              |            |
| 4         | 0.75        |               |             | 5.2914      | 99.94      |              |            |
| 5         | 0.75        |               |             | 5.2555      | 98.52      |              |            |
| 6         | 0.75        |               |             | 5.3512      | 102.32     |              |            |

**2.1.13 样品的测定** 取各样品按 2.1.7 的方法进行制备, 按照 2.1.8 的方法进行测定, 测得吸光度值计算样品的含量, 结果见表 4。

| 表 4 不同生产厂家、不同批号样品的多糖含量(mg•mL <sup>-1</sup> ) |       |         |      |
|----------------------------------------------|-------|---------|------|
| 序号                                           | 生产厂家  | 批号      | 测定含量 |
| 1                                            | 北中医药厂 | 811503A | 7.71 |
| 2                                            |       | 812506A | 6.47 |
| 3                                            |       | 810906A | 8.04 |
| 4                                            | 山西太行  | 080822  | 3.93 |
| 5                                            |       | 080820  | 3.69 |
| 6                                            | 广州白云山 | 080137  | 6.28 |
| 7                                            |       | 071220  | 5.09 |

3 结论

清开灵注射液被《中国药典》2005 年版一部收载, 但在其项下组方中只记录了药材的名称, 没有标明各味药材的用量, 因此, 计算注射液中多糖含量时, 不能显示与其相关联的生药材之间的关系。

正交试验结果显示, 正交试验中 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub> 的实验结果最高, 即: 5% 苯酚液 0.8 mL, 加入浓硫酸 6.0 mL, 然后在 98 ℃水浴中加热 20 min。

在供试品溶液的制备中, 对样品制备的条件进行了优化, 对 5, 10, 15 mL 树脂用量, 以及 5 倍, 10 倍水洗脱树脂柱的用量进行了优选, 实验结果表明: 树脂用量 10 mL 水洗脱树脂柱体积 5 倍, 即可将多糖成分全部洗下, 为了试验数据的准确性, 故采用水洗脱树脂柱体积 10 倍量。

对 3 个不同生产厂家生产的不同批次的清开灵注射液中的多糖进行了测定。结果显示, 生产的清开灵注射液中的多糖含量差异较大。山西太行药业有限公司生产清开灵注射液中的多糖含量为最低, 两个批号分别为 3.93, 3.69 mg•mL<sup>-1</sup>。北京中医药大学药厂生产清开灵注射液中的多糖含量为最高, 3 个批号分别为 7.71, 6.47, 8.04 mg•mL<sup>-1</sup>。本方法简单、准确、重复性好, 适用于清开灵注射液中总多糖的含量测定。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 610.  
[2] 李 辉, 罗佳波. 苯酚-硫酸法测定围乐颗粒中总多糖的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 685-686.  
[3] 田广文, 陈德育, 李学俊, 等. 猪苓多糖苯酚-硫酸法测定条件的优选[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 75-78.