

五加芪粉中总糖的含量测定

张聪, 樊丽博, 杨会鲜, 张继颖, 姚路路, 周冰, 张晓会

(国家兽用药品工程技术研究中心, 洛阳惠中兽药有限公司, 河南洛阳 471000)

摘要 [目的]建立五加芪粉中总糖的含量测定方法,以控制五加芪粉的质量。[方法]采用苯酚-硫酸比色法,检测波长为 494 nm,以无水葡萄糖为对照品对五加芪粉中总糖的含量进行测定。[结果]无水葡萄糖对照品溶液的线性范围为 0.342~1.035 mg/mL($r=0.9994$),平均加样回收率为 98.5%,RSD=3.3%($n=6$)。[结论]该研究确定的方法简单、可靠、准确,可用于测定五加芪粉中总糖的含量。

关键词 五加芪粉;总糖含量;苯酚-硫酸比色法

中图分类号 R 284.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)33-0147-02

Determination of Total Sugar in Wujiaci Powder

ZHANG Cong, FAN Li-bo, YANG Hui-xian et al (National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang Huizhong Veterinary Medicine Co. Ltd, Luoyang, Henan 471000)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a method for determining the total sugar content in Wujiaci powder to control the quality of Wujiaci powder. [Method] The phenol-sulfuric acid colorimetric method was used, the detection wavelength was 494 nm, and the content of total sugar in Wujiaci powder was determined by using anhydrous glucose as the reference substance. [Result] The linear range of the anhydrous glucose reference solution was 0.342-1.035 mg/mL ($r=0.9994$), the average recovery was 98.5%, and the RSD was 3.3% ($n=6$). [Conclusion] The method identified in this study is simple, reliable and accurate, and can be used to determine the total sugar content of Wujiaci powder.

Key words Wujiaci powder; Total sugar content; Phenol-sulfuric acid colorimetric method

五加芪粉是洛阳惠中兽药有限公司研制开发的新型中药免疫增强剂,已取得农业部三类新兽药注册证书。本品具有补中益气、扶正祛邪的功效,用于提高禽的机体免疫力,配合疫苗使用提高疫苗免疫效果。该制剂由黄芪和刺五加两味中药组成,研究表明黄芪多糖和刺五加多糖均具有显著的免疫促进作用^[1-3],为本品的主要有效成分。为有效控制五加芪粉的质量,需研究并建立其多糖含量测定方法,但由于多糖组成复杂,需将其水解为单糖后再进行测定,目前多采用葡萄糖作为对照品测定样品中多糖的相对含量。笔者建立了苯酚-硫酸比色法测定五加芪粉总糖的含量,并进行方法学考察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。五加芪粉,由洛阳惠中兽药有限公司提供;D-无水葡萄糖对照品(批号 110833-200904,中国食品药品检定研究院,99.5%)。

1.1.2 主要仪器。UV-2100 型紫外-可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;AB265-S 型电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司;恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司;HS3120 型超声波清洗器,上海楚定分析仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂。苯酚、硫酸为分析纯;水为纯化水。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备。取无水葡萄糖对照品适量,精密称定,加水制成含无水葡萄糖 0.6 mg/mL 的溶液,即得。

1.2.2 供试品溶液的制备。取供试品 50 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

1.2.3 苯酚-硫酸比色法。精密量取对照品溶液与供试品

溶液各 2 mL,置 25 mL 容量瓶中,精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速精密加入硫酸 5 mL,摇匀,置水浴中保温 15 min,取出,置冰水浴中冷却 3 min,加水稀释至近刻度,再置冰水浴中冷却 3 min,取出,加水至刻度,摇匀;另取水 2.0 mL,同上平行操作作为空白对照,按照紫外-可见分光光度法,在 494 nm 波长处测定吸光度,按外标法以吸光度计算供试品中多糖的含量^[4-5]。

1.2.4 方法学考察。

1.2.4.1 测定波长的选择。精密量取对照品溶液与供试品溶液各 2 mL,置 25 mL 容量瓶中,精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速精密加入硫酸 5 mL,摇匀,置水浴中保温 15 min,取出,置冰水浴中冷却 3 min,加水稀释至近刻度,再置冰水浴中冷却 3 min,取出,加水至刻度,摇匀;另精密量取水 2.0 mL,同上平行操作作为空白对照,按照紫外-可见分光光度法,在波长 400~600 nm 扫描。

1.2.4.2 线性关系考察。称取无水葡萄糖对照品 5 份,分别约为 15.0、22.5、30.0、40.0、50.0 mg,精密称定,分别置于 50 mL 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度分别为 0.342 3、0.437 8、0.638 8、0.833 8、1.034 8 mg/mL 的对照品溶液。精密量取 5 个不同浓度的对照品溶液各 2 mL,分别置 25 mL 容量瓶中,按照“1.2.3”方法测定。以吸光度(Y)为纵坐标、无水葡萄糖对照品溶液浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,计算线性回归方程。

1.2.4.3 精密度试验。取“1.2.4.2”制备的 0.638 8 mg/mL 无水葡萄糖对照品溶液 2 mL,置 25 mL 容量瓶中,按照“1.2.3”方法连续测定 6 次,测得葡萄糖吸光度,计算 RSD。

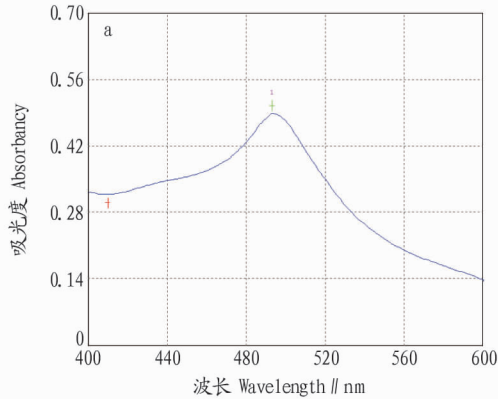
1.2.4.4 重复性试验。精密称取同一批号的供试品(批号 20120201)50 mg,按照“1.2.2”方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,测定吸光度,计算总糖的平均含量和 RSD。

1.2.4.5 稳定性试验。取同一份供试品溶液,分别于 0、5、

10、15、20、30 min 测定吸光度,计算 RSD。

1.2.4.6 加样回收率试验。称取已知含量的供试品(批号 20120201)25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,精密加入无水葡萄糖对照品 15 mg,加水溶解并定容至刻度,摇匀,平行操作 6 份,按照“1.2.3”方法测定吸光度,计算平均回收率和 RSD。

1.2.5 样品的含量测定。取 3 批供试品,按照“1.2.2”方法



制备供试品溶液并测定,计算总糖的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 测定波长的选择。图 1 表明,按“1.2.4.1”方法操作,对照品溶液和供试品溶液均在 494 nm 左右有最大吸收,故选择 494 nm 作为样品的测定波长。

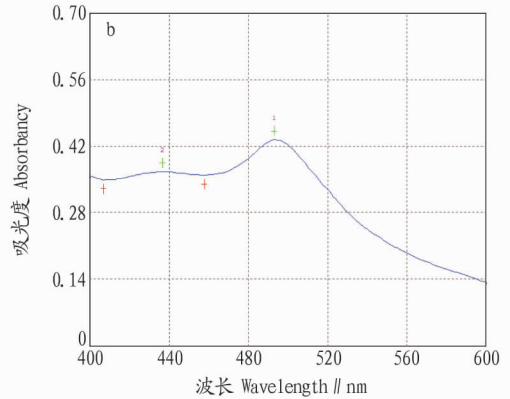


图 1 对照品溶液(a)和供试品溶液(b)紫外扫描图

Fig. 1 UV scan of reference solution (a) and test solution (b)

2.1.2 线性关系的考察。按“1.2.4.2”方法操作,以吸光度(Y)为纵坐标、无水葡萄糖对照品溶液浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得出线性回归方程为 $Y=0.7927X-0.0288$ ($r=0.9994$),表明 0.342~1.035 mg/mL 葡萄糖浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.3 精密度试验。按“1.2.4.3”方法操作,连续测定 6 次,测得葡萄糖吸光度 RSD 为 0.2%,表明该方法精密度良好。

2.1.4 重复性试验。按“1.2.4.4”方法操作,测得总糖的平均含量为 619 mg/g, RSD 为 1.2%,表明该方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验。按“1.2.4.5”方法操作,计算吸光度的 RSD 为 1.7%,表明供试品溶液在 30 min 内稳定性良好。

2.1.6 加样回收率试验。按“1.2.4.6”方法操作,由表 1 可见,平均回收率为 98.5%, RSD 为 3.3%,表明该方法准确可靠,可用于五加芪粉中总糖的含量测定。

表 1 回收率试验结果

Table 1 Recovery rate test results

编号 No.	样品称量 Sample weighing//mg	对照加入量 Control addition amount//mg	测得总量 Measured total//mg	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
1	25.4	15.4	30.45	95.4	98.5	3.3
2	24.1	14.6	29.76	101.0		
3	23.9	13.8	29.10	102.9		
4	26.2	15.5	31.09	95.4		
5	25.4	14.8	30.11	96.5		
6	24.7	14.0	29.30	99.7		

2.2 含量测定 由表 2 可知,五加芪粉中总糖的含量为 613~623 mg/g,相对偏差为 0.16%~0.44%。

表 2 样品含量测定结果

Table 2 Sample content determination results

批号 No.	样品平均含量 Average sample content//mg/g	相对偏差 Relative deviation//%
20120201	623	0.16
20120202	613	0.18
20120203	618	0.44

3 结论与讨论

多糖含量的测定方法有苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法等,其中苯酚-硫酸法是常用测定多糖含量的方法,可用于甲

化糖、戊糖和多聚糖等的测定,方法简单,准确性较好,灵敏度高,适用范围广泛^[6-7]。

黄芪为五加芪粉的君药,黄芪多糖为黄芪提升免疫的主要有效成分,因此方法研究过程中参考了黄芪多糖注射液的含量测定方法^[8],但其供试品溶液制备方法繁琐,而且测定过程中对照品和供试品溶液经苯酚-硫酸显色后定容至 10 mL,五加芪粉使用其方法测定结果偏差较大。该研究中的方法供试品溶液制备过程简便,测试溶液最终定容至 25 mL,平行样品测定结果偏差较小。五加芪粉采用这 2 种方法测定结果一致。

该研究中的方法扫描对照品溶液和供试品溶液的最大

(下转第 160 页)

的提取率最高,研磨提取法的最低。闪式提取法的提取率较研磨提取法的提高了 138.89%,较回流法提取的提高了 57.32%。对于白及总酚提取而言,回流提取法溶剂消耗量大、耗时长,持续加热能耗高,提取率不高;研磨提取法提取量小、提取率较低;闪式提取法提取时间短,而且能够最大限度保护提取总酚的活性,操作简便,提取效率高,安全、环保、经济。

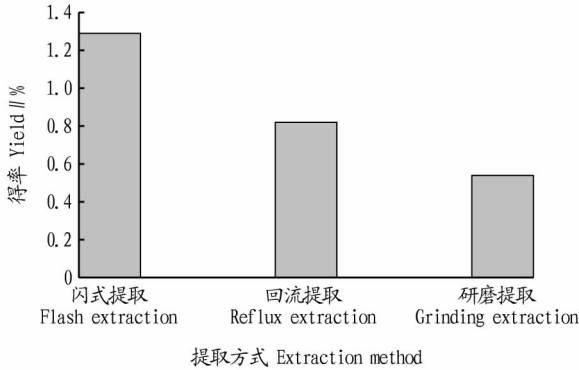


图5 3种提取方法提取白及中总酚得率比较

Fig. 5 Comparison of the extraction of total phenol from *B. striata* by three extraction methods

2.4 不同样地栽培白及新生茎的总酚含量差异 按优化获得的最佳闪式提取组合条件,提取测定 5 个样地的 7 份栽培白及样本新生茎的总酚含量,结果如图 6。由图 6 可知,5 个样地 7 份栽培白及样本,其新生茎的总酚含量高低为 MS>YS>NS>ZJ>HJ>HS>TR。其中,HS(湖北狭叶白及)、TR(湖南桑植引种自贵州铜仁白及)的新生茎总酚含量较低,其中

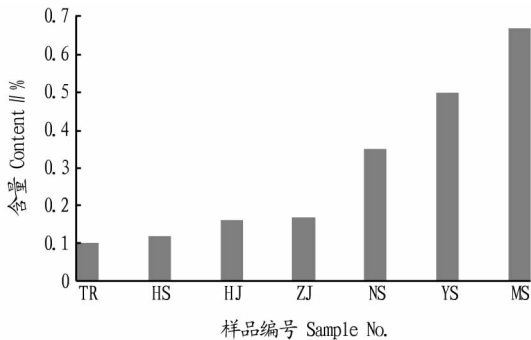


图6 7份栽培白及新生茎部位的总酚含量差异

Fig. 6 Total phenol contents difference in 7 kinds cultivated *B. striata* in newborn stem site

(上接第 148 页)

吸收波长均在 494 nm 左右,而目前苯酚-硫酸法测定多糖含量时测定波长一般为 490 nm,这可能是由于供试品溶液浓度的不同导致显色后溶液的最大吸收波长不一致,五加芪粉在 490 和 494 nm 波长条件下测定的结果一致,但 494 nm 波长下的灵敏度更高,因此,确定测定波长为 494 nm。

该研究建立了五加芪粉中总糖含量的测定方法,方法学考察表明,该方法精密性、重复性良好,可准确测定总糖的含量,从而有效控制五加芪粉的质量。

参考文献

[1] 刘树民,张娜. 刺五加多糖的现代研究进展[J]. 中医药信息,2014,31

TR 最低,仅有 0.10%;MS(湖北米氏白及)新生茎总酚含量最高,达 0.67%。采用 SPSS 20.0 分析白及样本总酚含量与样地海拔(表 1)相关性,得 $r=0.571$, $0.400<|r|<0.600$,该结果反映样本总酚含量与样地海拔相关性不显著。

3 结论

闪式提取器凭借其适用范围广,能适用于植物根、茎、叶、花等软、硬材料的快速提取,目前在中药材有效成分提取上的应用十分广泛。试验中首次运用闪式提取法提取白及总酚,优化得出的最佳提取工艺条件:提取时间 100 s、乙醇体积分数 55%、提取电压 160 V、提取料液比 1:40,在此条件下白及提取液中总酚得率为 1.38%。以该最佳提取组合条件提取测定比较了 7 份栽培白及样本新生茎的总酚含量,其最低者为 TR(湖南桑植引种自贵州铜仁白及),仅 0.10%,最高者是 MS(湖北米氏白及),达 0.67%。经初步分析表明,白及总酚含量与样地海拔的相关性不显著。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:95.
- [2] 马世宏,金玲,王守香,等. 中药白芨在牙膏中的应用研究[J]. 中国野生植物资源,2009,28(3):32-35.
- [3] 马世宏,金玲,揭遂,等. 白芨-丹皮酚包合物在化妆品中的应用研究[J]. 日用化学品科学,2009,32(6):30-33.
- [4] 梁宇轩,何晓梅,朱富成,等. 白及主要生物活性物质及药理作用研究进展[J]. 湖南农业科学,2018(3):107-109.
- [5] JIANG F S, LI W P, HUANG Y F, et al. Antioxidant, antityrosinase and antitumor activity comparison: The potential utilization of fibrous root part of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. [J]. PLoS One, 2013, 8(2): 1-11.
- [6] SUN A J, LIU J Q, PANG S, et al. Two novel phenanthraquinones with anticancer activity isolated from *Bletilla striata* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(9): 2375-2379.
- [7] 徐静,商志伟,杨森,等. 唇形科植物酚酸类化合物的生物活性与生产应用[J]. 贵州农业科学,2017,45(8):94-98.
- [8] 杨毅,艾萍,杨丽萍,等. 白及薄层色谱条件的改进和主要色素斑点化学成分的鉴定[J]. 亚太传统医药,2009,5(9):23-25.
- [9] 徐贵华,关荣发,叶启乾,等. 不同成熟期蜜桔中酚酸的组成与分布[J]. 食品科学,2008,29(2):137-141.
- [10] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物,2007,5(6):401-407.
- [11] 周云凯,李伟平,田莎莎,等. 白及须根和块茎总酚含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):161-164.
- [12] 翁夏蒙,鲁光耀,王蕊妮,等. 白及愈伤组织总酚含量测定以及抗氧化活性研究[J]. 中药材,2013,36(1):32-35.
- [13] 陈黎,楚亚琴,王启斌,等. 鄂西北地区白及中总酚含量的测定[J]. 中国药师,2013,16(11):1679-1682.
- [14] 蔡英豪,龚宁,李德琴,等. 白及原药茎褐变过程中总酚及相关酶活性的变化[J]. 北方园艺,2013(6):97-99.

(2):116-119.

- [2] 段雪磊,马奎红,包永占,等. 刺五加免疫调节功能的研究进展[J]. 中兽医学杂志,2015(6):72-75.
- [3] 李钦,胡继宏,高博,等. 黄芪多糖在免疫调节方面的最新研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):199-206.
- [4] 陈芬芳,苏建青,褚秀玲. 刺五加多糖含量测定方法的建立[J]. 畜牧与饲料科学,2014,35(9):19-20.
- [5] 张洪波,任春晓. 黄芪叶提取及黄芪多糖测定方法研究[J]. 黑龙江医药,2005,18(1):6-8.
- [6] 杨莉,王志华,陶健生. 黄芪中黄芪多糖含量测定方法的比较[J]. 中国医药工业杂志,2005,36(9):562-563.
- [7] 张媛媛,张彬. 苯酚-硫酸法与萘酚-硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究[J]. 食品科学,2016,37(4):158-163.
- [8] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版二部)[S]. 北京:中国农业出版社,2016.