

· 化学与分析 ·

二精丸多糖两种测定方法的比较

刘倩, 白素芬, 喇孝瑾, 王慧芳, 梁静, 喇万英*
(华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 选择一种准确、稳定、简便的二精丸多糖含量测定的方法。方法: 对硫酸-蒽酮法和苯酚-硫酸法测定二精丸多糖的含量进行比较。结果: 硫酸-蒽酮法和苯酚-硫酸法分别在 1.2 ~12 mg · L⁻¹ (r = 0.999 3) 和 1.5 ~15 mg · L⁻¹ (r = 0.999 1) 范围内呈线性关系; 精密度试验 RSD 分别为 0.13% 和 0.31%; 硫酸-蒽酮法在 3 h (RSD = 2.87%) 内稳定, 苯酚-硫酸法在 2 h (RSD = 2.89%) 内稳定; 含量测定结果分别为 53.79% 和 58.92%。结论: 苯酚-硫酸法测定二精丸多糖含量显色灵敏, 颜色稳定, 操作简便, 可作为测定二精丸多糖含量测定的方法。

[关键词] 二精丸; 多糖含量; 蒽酮-硫酸法; 苯酚-硫酸法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 08-0032-03

Comparison of 2 Polysaccharide Content Determining Methods in Erjing Wan

LIU Qian, BAI Su-fen, LA Xiao-jin, WANG Hui-fang, LIANG Jing, LA Wan-ying*
(North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To select a accurate stable and convenient method for determining Polysaccharide content in Erjing Wan. **Method:** Polysaccharide content in Erjing Wan was determined by two methods: athranone-sulfuric acid method and phenol-suifuric acid method. **Result:** The sugarin athranone-sulfuric acid method and phenol-suifuric acid method was liner in the range of 1.2 ~12 mg · L⁻¹ (r = 0.999 3) and 1.5 ~15 mg · L⁻¹ (r = 0.999 1) respectively. Athranone-sulfuric acid method was stable in 3 h, phenol-suifuric acid method was stable in 2 h; the sugar content was 53.79% and 58.92% respectively. **Conclution:** Phenol-suifuric acid method is sensitive、stable and convenient and can be applied to determine polysaccharide content in Erjing Wan.

[Key words] *Erjing Wan.* ; polysaccharide content; anthranone-sulfuric acid method; phenol-suifuric acid method

二精丸由黄精、枸杞子组成, 又名枸杞丸。《经济总录》云: “常服助气益精, 补填丹田, 活血驻颜, 长生不老。”现代研究发现枸杞多糖是枸杞子中的重要活性成分, 具有调节机体免疫力^[1]、延缓衰老^[2]和降血糖^[3]等药理作用。黄精多糖是黄精重要的有效成分, 具有增强免疫、降低血脂、血糖和延缓衰老等多种药理作用^[4]和极其重要的生物功能^[5], 引起

了人们的广泛重视。本文对二精丸多糖的测定方法进行了筛选, 比较了多糖含量测定常用的 2 种方法: 苯酚-硫酸法^[4]、硫酸-蒽酮法, 以选定一种方便快捷的适合二精丸多糖含量测定的方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器 722 分光光度计; 水浴锅, 电子天平, 干燥箱、循环水真空泵。

1.2 试药 D-无水葡萄糖对照品 (批号 110833-200503, 中国药品生物制品检定所, 供含量测定用); 95% 乙醇、浓硫酸、蒽酮、苯酚均为分析纯, 水为双蒸水。枸杞、黄精购自唐山医药公司, 经本院喇万英教授鉴定分别为宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥

[收稿日期] 2009-11-30
[基金项目] 科技部国际合作项目 (2008DFA10050)
[通讯作者] 喇万英, Tel: (0315) 3726323, E-mail: lwy@ncmc.edu.cn

成熟果实, 百合科植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取经 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成每 1 mL 中含无水葡萄糖 0.1 mg 的对照品溶液。

2.2 样品溶液的制备 精密称取 60 °C 干燥至恒重的枸杞、黄精粉末各半, 混匀加 5 倍量 95% 乙醇浸泡 0.5 h, 加热回流 1 h, 过滤, 残渣加 5 倍量 80% 乙醇回流 1 h, 过滤, 残渣加水温浸 2 次, 第 1 次加 10 倍量水, 温浸 3 h(水浴温度 80°C), 第 2 次加 8 倍量水, 温浸 1 h。合并滤液, 浓缩, 加乙醇使含醇量达 80%。过滤, 干燥, 即得二精丸提取物。精密称取二精丸提取物 0.03 g, 加水溶解, 定容于 250 mL 量瓶中, 摇匀即得。

2.3 硫酸-蒽酮法测定二精丸多糖的含量

2.3.1 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL 置 10 mL 具塞刻度试管中, 各加水至 2.0 mL, 摇匀, 在冰水浴中缓慢滴加 0.2% 蒽酮-硫酸溶液至刻度, 摇匀, 冷却后置沸水浴中保温 10 min, 取出, 立即置冰水浴中冷却 10 min, 取出, 以相应试剂为空白。照紫外-可见分光光度法, 在 620 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(Y)为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 建立回归方程 $Y = 3.57 \times 10^{-2} X + 2.22 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9993$)。表明浓度在 1.2 ~ 12 mg · L⁻¹ 内线性关系良好。

2.3.2 空白溶液的制备 取水约 2.0 mL, 置 10 mL 具塞试管中, 在冰水浴中缓慢滴加 0.2% 蒽酮-硫酸溶液至刻度, 摇匀, 放冷后置沸水浴中反应 10 min, 立即取出置冰水浴中冷却 10 min, 即得空白溶液。

2.3.3 精密度试验 分别精密量取对照品溶液 1 mL, 按 2.3.1 项下的方法重复测定 6 次, RSD 为 0.13%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取 6 份枸杞、黄精粉末, 分别制备样品溶液, 按 2.3.1 项下的方法进行测定, RSD 为 1.683%。

2.3.5 稳定性考察 精密吸取按“2.2”项下方法制备的样品溶液 1.0 mL, 自“加水至 2.0 mL”起, 按照 2.3.1 项下方法每隔 0.5 h 测定吸光度, 连续 6 h, 考察其稳定性。结果表明, 样品溶液在 3 h 内显色稳

定, RSD 为 2.87%。

2.3.6 回收率试验 精密称取 D-无水葡萄糖对照品适量, 加入到一定量已混合的已知浓度的枸杞、黄精粉末中, 制备样品溶液, 按 2.3.1 项下的方法进行测定, 计算回收率。加样回收率为 98.36%。

2.3.7 二精丸多糖含量测定 精密量取样品溶液 1 mL, 置 10 mL 具塞刻度试管中, 照 2.3.1 项下的方法测定, 自“加水至 2.0 mL”起, 依法测定吸光度, 计算, 即得。二精丸多糖的含量为 53.79%。

2.4 苯酚-硫酸法测定二精丸多糖的含量

2.4.1 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL, 分别置 10 mL 具塞刻度试管中, 各加水至 2.0 mL, 摇匀, 各精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速精密加入硫酸 5 mL, 摇匀, 放置 10 min, 置 40 °C 水浴中保温 15 min, 取出后迅速冷却至室温, 以相应试剂为空白。按紫外-可见分光光度法, 在 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 对照品溶液质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 4.67 \times 10^{-2} X - 2.21 \times 10^{-2}$, $r = 0.9991$, 结果表明, 无水葡萄糖在 1.5 ~ 15 mg · L⁻¹ 质量浓度与吸收度线性关系良好。

2.4.2 空白溶液的制备 取水约 2.0 mL, 置 10 mL 具塞干燥试管中, 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, 放置 10 min, 置 40 °C 水浴中保温 15 min, 取出后迅速冷却至室温, 即得空白溶液。

2.4.3 精密度试验 分别精密量取对照品溶液 1 mL, 按 2.4.1 项下的方法重复测定 6 次, 吸光度的 RSD 为 0.31%, 结果表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取 6 份枸杞、黄精粉末, 分别制备样品溶液, 按 2.4.1 项下的方法进行测定, RSD 为 1.776%。

2.4.5 稳定性考察 精密吸取按“2.2”项下方法制备的样品溶液 1.0 mL, 加水至 2.0 mL, 按照 2.4.1 项下方法每隔 0.5 h 测定吸光度, 连续 6 h, 考察其稳定性。结果表明, 样品溶液在 2 h 内显色稳定, 可进行测定。RSD 为 2.89%。

2.4.6 回收率试验 精密称取 D-无水葡萄糖对照品适量, 加入到一定量已混合的已知浓度的枸杞、黄精粉末中, 制备样品溶液, 按 2.4.1 项下的方法进行测定, 计算回收率。加样回收率为 99.24%。

2.4.7 二精丸多糖含量测定 精密量取样品溶液

1 mL, 置 10 mL 具塞刻度试管中, 照 2. 4. 1 项下的方法测定, 自“加水至 2. 0 mL”起, 依法测定吸光度, 计算, 即得。二精丸多糖的含量为 58. 92%。

2. 5 硫酸-蒽酮法与苯酚-硫酸法的比较, 见表 1

表 1 硫酸 - 蒽酮法与苯酚 - 硫酸法比较

项目	硫酸 - 蒽酮法	苯酚 - 硫酸法
精密度(RSD)	0. 13%	0. 31%
相关系数	0. 999 3	0. 999 1
重复性试验	1. 683%	1. 776%
稳定性	3 h 内稳定(RSD 为 2. 87%) 2 h 内稳定(RSD 为 2. 89%)	
加样回收率	98. 36%	99. 24%
含量	53. 79%	58. 92%

3 结论

本文采用硫酸-蒽酮法和苯酚-硫酸法对二精丸多糖进行了测定。硫酸-蒽酮法测定多糖的原理是依据多糖经浓硫酸脱水生成糠醛或其衍生物, 与蒽酮试剂起缩合反应, 生成蓝绿色化合物。糖类与蒽酮的显色深度不同, 果糖显色最深, 葡萄糖次之, 半乳糖、甘露糖较浅, 五碳糖显色更浅, 故测定糖的混合物时, 常因不同糖类的比例不同造成误差。苯酚-硫酸法测定多糖的原理是依据糖经浓硫酸处理后脱水产生的糠醛或其衍生物, 再与苯酚缩合生成橙黄色物质于 490 nm 处比色^[6]。苯酚-硫酸法可用于甲基化的糖、戊糖和多聚糖的测定, 方法简单, 灵敏度高, 实验时基本不受蛋白质存在的影响。从表 1 数据的比较可以看出, 在精密度、相关系数、重复性试验及稳定性方面上, 硫酸-蒽酮法均优于苯酚-硫酸法。加样回收率方面苯酚-硫酸法均优于硫酸-蒽酮法, 在含量测定中, 硫酸-蒽酮法测定粗多糖的含量

比苯酚-硫酸法低。其原因可能是二精丸中的多糖组成中五碳糖占一定比例, 在蒽酮-硫酸法测定中显色较浅, 因此测得含量较低。而苯酚-硫酸法较适合戊糖的含量测定。综合考虑, 选择苯酚-硫酸法用于二精丸多糖的含量测定。

4 讨论

在测定二精丸多糖的试验中, 与苯酚-硫酸法相比, 硫酸-蒽酮法在精密度、相关系数、重复性及稳定性方面具有一定优势, 而其加样回收率稍低, 质量分数结果较低, 可能是由于二精丸中多糖组成中戊糖有一定的比例, 在测定中受到一定限制, 因此选择苯酚 - 硫酸法作为二精丸多糖的质量分数测定方法。

[参考文献]

[1] 李英杰, 齐春会, 张永祥. 枸杞多糖免疫调节作用机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(10) : 882.

[2] 李晶, 欧芹, 孙洁. 枸杞多糖对衰老大鼠蛋白质氧化损伤影响的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27 (24) : 2384.

[3] 王玲, 张才军, 李维波, 等. 枸杞多糖 2D 对四氧糖尿病小鼠高血糖的防治作用[J]. 河北中医, 2000, 22(2) : 159.

[4] 任汉阳, 曹俊岭, 张瑜, 等. 黄精的临床研究近况[J]. 河南中医, 2004, 24 (1) : 79.

[5] 任汉阳, 薛春苗, 张瑜, 等. 黄精粗多糖对温热药致阴虚模型小鼠免疫器官重量及血清中 IL-2 含量的影响[J]. 河南中医学院学报, 2004, 19 (3) : 12.

[6] 夏秀华, 王海鸥. 银杏叶多糖两种测定方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11) : 124.

[责任编辑 顾雪竹]