

苯酚硫酸一步法测定白芍提取物中总糖含量

杨哲萱¹, 周立红², 章顺楠², 叶正良³, 柳文媛^{1*}

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; 2. 天士力制药集团股份有限公司, 天津 300410;
3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402)

[摘要] 目的: 建立白芍提取物中总糖含量的测定方法。方法: 通过单因素试验确定实验的最大吸收波长, 硫酸浓度, 显色液用量, 加热时间和显色时间。实验条件确定后, 从加样回收率, 重复性, 线性和范围几方面进行方法学验证。同时, 将优化后的方法与传统方法进行对比。结果: 最佳实验条件为: 硫酸与水的体积比为 5:1; 显色液体积为 5 mL; 加热时间为 50 min; 显色时间为 15 min。在最佳实验条件下, 葡萄糖标准溶液在 0.019 ~ 0.189 mg 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 7.488X - 0.0002$ ($R^2 = 0.9995$)。三个比例的加样回收率为 102.00%, 102.15%, 95.86%, RSD 分别为 2.08%, 1.51%, 2.24%; 6 份样品的重复性 RSD 为 2.4%。结论: 该方法准确可靠, 操作简单, 也可用于其他中药提取物的质量控制。

[关键词] 白芍提取物; 总糖; 苯酚; 硫酸; 单因素试验

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0139-04

[doi] 10.11653/syfy2013180139

Determination of Saccharide in Extracts of *Paeonia Albiflora* by One-step Phenol-Sulfuric Acid Method

YANG Zhe-xuan¹, ZHOU Li-hong², ZHANG Shun-nan², YE Zheng-liang³, LIU Wen-yuan^{1*}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2. Tasly Pharmaceutical Group Company Limited, Tianjin 300410, China;
3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Limited, Tianjin 300402, China)

[Abstract] **Objective:** The aim is to establish the determination method of saccharide in *Paeonia albiflora* extracts. **Method:** The volume ratio of sulfuric acid and water, the volume of color liquid, 100 °C water bath time, and ice bath time were studied by single-factor experiment. **Result:** The optimum experimental conditions were as following: 5:1 of the volume ratio of sulfuric acid and water, 5 mL color liquid, 100 °C water bath for 50 min, and ice bath for 15 min. In the optimum experimental conditions, the standard solutions of glucose possessed good linear with absorbance when its concentration was 0.019-0.189 mg. The linear equation was $Y = 7.488X - 0.0002$ ($R^2 = 0.9995$). The recovery ratio of three degrees was 102%, 102.15%, 95.86%, the RSD was 2.08%, 1.51%, 2.24%. The RSD of six samples was 2.4%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reliable. It can be used for the quality control of traditional Chinese medicine.

[Key words] *Paeonia albiflora*; saccharide; phenol; sulfuric acid; single-factor experiment

[收稿日期] 20121213(016)

[第一作者] 杨哲萱, 在读硕士生, 从事现代药物分析研究,
Tel: 022-86342806, E-mail: yangzhexuan@hotmail.com

[通讯作者] * 柳文媛, 博士, 副教授, 从事药物分析研究, Tel:
025-83271038, E-mail: liuwenyuan8506@163.com

白芍是毛茛科植物芍药的干燥根^[1], 是一种传统中药材, 具有抗炎、抗病毒、抗心肌缺血、免疫调节等药理作用^[2]。对于白芍的成分研究主要集中在芍药苷、芍药酮等物质。近年来有研究表明, 白芍多糖也具有抗肿瘤活性^[3], 但白芍提取物中糖的快速有效含量测定方法还未见有报道。

由于糖类在强无机酸中为特有的脱水反应生成醛类,它们和各种酚类缩合产生特有的有色物质,因此常用苯酚硫酸法和蒽酮硫酸法作为多糖的含量测定方法。但有研究表明不同的多糖和单糖显色反应后显示出不同的最大吸收峰,苯酚硫酸法比蒽酮硫酸法更为稳定,而且蛋白质会对蒽酮硫酸法产生一定干扰^[4-5],所以苯酚硫酸法应用更为广泛。但传统的苯酚硫酸法操作复杂,重复性和准确性较差,在实际应用中受到一定的局限。本实验中采用苯酚和硫酸混合配制成显色液的方法,为白芍中多糖成分测定提供依据。

1 材料

Evolution 201 型紫外分光光度计(美国赛默飞世尔公司),DK-S28 型电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司),XS 205 型电子天平(梅特勒-托利多公司)。

白芍提取物,复杂中药水提取物和复杂中药醇提取物(天士力制药集团股份有限公司提供),浓硫酸(优级纯,批号 090729,购于天津市制剂三厂),苯酚(优级纯,批号 20090725,购于天津市津科精细化工研究所),D-无水葡萄糖(批号 110833-200503,购于中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 显色液的制备 将 50 mL 浓硫酸缓缓加入 10 mL 水中冷却至室温,加入 0.6 g 苯酚晶体搅拌使其溶解配成显色液。

2.1.2 无水葡萄糖对照品贮备液的制备 将 D-无水葡萄糖对照品置于五氧化二磷减压干燥器中干燥 16 h。取干燥至恒重的葡萄糖 50 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,纯化水溶解并定容至刻度,摇匀,制得葡萄糖贮备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取提取物 500 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 2 mL,置 100 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 实验条件的选择

2.2.1 最大吸收波长的选择 准确移取葡萄糖贮备液 3.0 mL,置于 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得对照品样品。分别精密量取对照品溶液、供试品溶液各 2.0 mL,分别置 10 mL 具塞试管中。将具塞试管置于冰水浴中,分别加入显色液 5.0 mL,摇匀,静置 5 min 后,加盖玻璃塞,并于 100 °C 热水浴中加热 50 min,取出,置冰水浴中冷却 15 min。以水

为空白,在 350 ~ 800 nm 进行扫描。扫描图见图 1,通过供试品扫描图和对照品扫描图对比,发现两者的最大吸收波长均在 489 nm,所以确定选择 489 nm 作为检测波长。

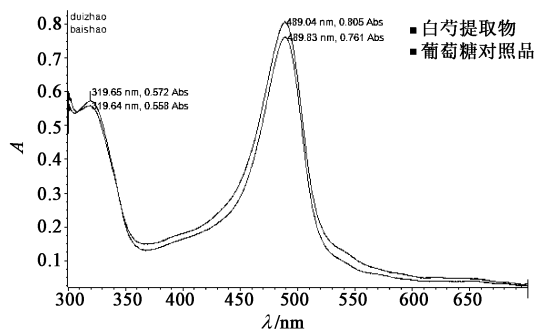


图 1 供试品白芍提取物,对照品葡萄糖可见光区(350 ~ 800 nm)扫描图

2.2.2 硫酸浓度的选择 分别将 30, 40, 50, 60, 70 mL 浓硫酸缓缓加入 10 mL 水中冷却至室温,加入 0.6 g 苯酚晶体搅拌使其溶解配成 5 份不同硫酸浓度的显色液。

取供试品溶液 2 mL(5 份)分别置 10 mL 具塞试管中。将具塞试管置于在冰水浴中,分别加入上述显色液 5.0 mL,摇匀,静置 5 min 后,加盖玻璃塞,并于 100 °C 热水浴中加热 50 min,取出,置冰水浴中冷却 15 min。以相应试剂为空白,在 489 nm 波长处测定吸收度。以显色液中硫酸体积为横坐标,吸光度为纵坐标作图。由图 2 可以看出随着硫酸浓度的增加,吸光度增大,当硫酸用量为 50 mL 时,吸光度达到最大,灵敏度最大。当硫酸浓度继续增加后,吸光度下降,可能是由于缩醛(或缩酮)在酸溶液中可逆的形成糖造成的。故本实验选择显色液最佳用量为 5.0 mL。

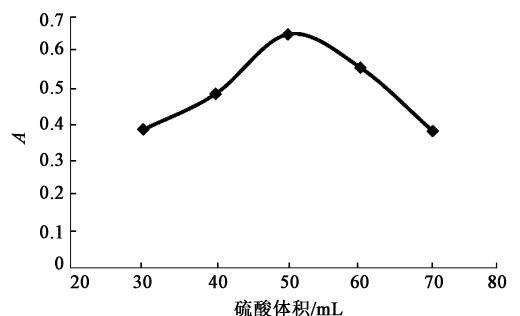


图 2 不同硫酸体积对吸光度的影响

2.2.3 显色液用量的选择 取供试品溶液 2 mL(5 份)分别置 10 mL 具塞试管中。将具塞试管置于在冰水浴中,分别加入显色液 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL,摇匀,静置 5 min 后,加盖玻璃塞,并于

100 ℃热水浴中加热 50 min,取出,置冰水浴中冷却 15 min。以相应试剂为空白,在 489 nm 波长处测定吸光度。以显色液体积为横坐标,吸光度为纵坐标作图。由图 3 可以看出,显色液用量增加,吸光度增大,当显色液用量为 5.0 mL 时,吸光度达到最大,再增加显色液用量,溶液体积增大,样品浓度下降,吸光度降低。故本实验选择显色液最佳用量为 5.0 mL。

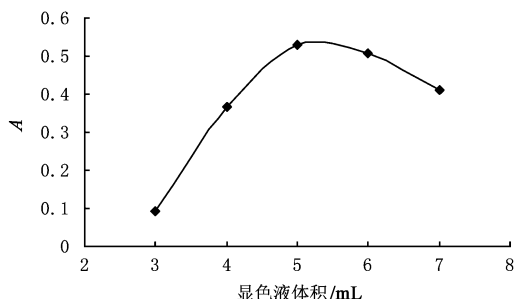


图 3 不同显色液体积对吸光度的影响

2.2.4 加热时间的选择 取供试品溶液 2 mL (6 份) 分别置于 10 mL 具塞试管中。将具塞试管置于在冰水浴中,分别加入 5.0 mL 显色液,摇匀,静置 5 min 后,加盖玻璃塞,并于 100 ℃热水浴中分别加热 10, 20, 30, 40, 50, 60 min,取出,置冰水浴中冷却 15 min。以相应试剂为空白,在 489 nm 波长处测定吸收度。以加热时间为横坐标,吸光度为纵坐标作图。由图 4 可以看出加热时间延长,吸光度增大。加热时间在 40 ~ 60 min,吸光度比较稳定,精密度高,故本实验选择加热时间为 50 min。

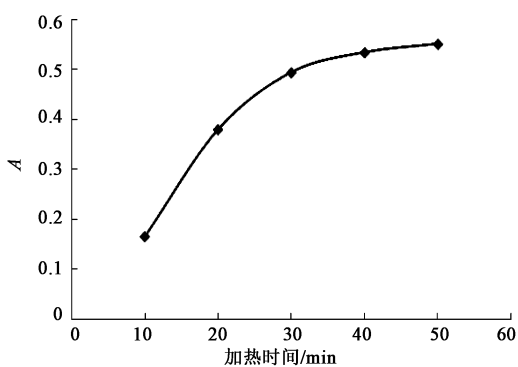


图 4 不同加热时间对吸光度的影响

2.2.5 显色时间的选择 取供试品溶液 2 mL (6 份) 置于 10 mL 具塞试管中。将具塞试管置于在冰水浴中,分别加入 5.0 mL 显色液,摇匀,静置 5 min 后,加盖玻璃塞,并于 100 ℃热水浴中加热 50 min,取出,置冰水浴中分别冷却 5, 10, 15, 20, 25, 30 min。以相应试剂为空白,在 489 nm 波长处测定吸收度。以显色时间为横坐标,吸光度为纵坐标作

图。由图 5 可以看出显色时间过短时,吸光度不稳定,在显色时间在 15 ~ 30 min 区间内,吸光度稳定,精密度高,故本实验选择显色时间为 15 min。

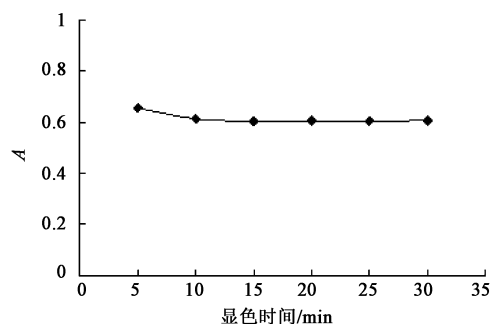


图 5 不同显色时间对吸光度的影响

2.3 方法学验证

2.3.1 线性与范围 准确移取葡萄糖贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中,加水至刻度。分别取上述溶液 2.0 mL 置 10 mL 具塞试管中。将具塞试管置于在冰水浴中,加入 5.0 mL 显色液,摇匀,静置 5 min 后,加盖玻璃塞,并于 100 ℃热水浴中加热 50 min,取出,置冰水浴中冷却 15 min。以相应试剂为空白,在 489 nm 波长处测定吸收度。以葡萄糖的质量作为横坐标,以其对应的吸光度作为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程为 $Y = 7.488X - 0.0002$ ($R^2 = 0.9995$),表明在 0.019 ~ 0.189 mg 线性关系良好。

2.3.2 重复性 精密称取白芍提取物 6 份,按照 2.1.3 项下,制备供试品溶液。然后,按照 2.3.1 项下,从“取上述溶液 2.0 mL 置 10 mL 具塞试管中”开始依法进行测定。6 份样品平行操作测定其总糖含量,计算得 6 份样品的含量平均值为 46.736%, RSD 2.4%,说明方法重复性良好。

2.3.3 加样回收实验 准确称取已知含量的白芍提取物 0.2550 g,置于 100 mL 量瓶中加水溶解,并稀释至刻度,作为供试品溶液。精密称定干燥至恒重的葡萄糖 54.39 mg 置于 100 mL 量瓶中,纯化水溶解并定容至刻度,摇匀后作为标准品溶液。取供试品溶液 2 mL,共 9 份,分别置于 100 mL 量瓶中。再分别加入对照品溶液 2, 4, 6 mL,各 3 份,加水稀释至刻度。精密量取上述溶液 2 mL,置于 10 mL 具塞试管中,照 2.3.1 项下的方法,自“将试管置于在冰水浴中”起,依法测定吸光度。加样回收实验结果见表 1,平均回收率为 102.00%, 102.15%, 95.86%, RSD 分别为 2.08%, 1.51%, 2.24%,说明方法准确度高。

2.4 与传统苯酚硫酸方法对比 取 2 批提取物(记

表 1 白芍中多糖加样回收率考察

加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
54.39	167.67	99.54	102.00	2.08
54.39	169.67	103.23		
54.39	169.67	103.23		
108.78	224.43	101.95	102.15	1.51
108.78	226.43	103.79		
108.78	223.09	100.72		
163.17	273.50	98.04	95.86	2.24
163.17	269.83	95.79		
163.17	266.49	93.75		

注:提取物称样量均为 255 mg,提取物中糖含量均为 113.53 mg。

为 A,B)500 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加水超声溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 2 mL,置 100 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,得到供试品溶液。然后,按照 2.3.1 项下,从“取上述溶液 2.0 mL 置 10 mL 具塞试管中”开始依法进行测定,以此作为新方法测的结果。同时,取供试品溶液 2.0 mL 置 10 mL 具塞试管中,按照传统苯酚硫酸法^[6-10]测的样品中总糖含量。A,B 2 个批次用 2 种方法测得实验结果的偏差分别为 0.43%,1.58%。结果表明,新方法与传统方法测的结果基本一致,表明苯酚与硫酸配制成显色液后,样品中多糖仍然能够与硫酸缩合完全,证明实验结果的准确有效。

3 讨论

传统的苯酚硫酸法的影响因素较多,如硫酸的加入量、加热时间、反应温度等,这些都直接影响方法的准确性和重复性。优化后的苯酚硫酸一步法的优点在于首先将硫酸稍微稀释一下,排除浓硫酸遇水放出的热量的影响,然后冷却后加入苯酚晶体,配置成显色液。通过沸水浴加热,保证反应系统温度的一致,很好地提高检测的重复性,又简化实验操作,减少了偶然误差和系统误差^[11]。同时,硫酸滴入的位置和速度对其结果都不会造成显著影响^[12]。

优化后的苯酚硫酸一步法,准确性好,具有更高的精密度和重复性,同时操作简单,更适用于实际应用中的大批量样品检测,在中药提取物中总糖的质量控制中具有广阔的应用前景。

[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,2010:96.
- [2] 陈彦,杜冰,傅蓓蓓. 白芍水溶性多糖研究[C]. 上海:华东六省一市生物化学与分子生物学会 2003 年学术交流会议论文集,2003.
- [3] 高小荣,田庚元. 白芍多糖 BSP-1-2 的化学和抗肿瘤活性研究[C]. 武汉:第八届全国中药和天然药物学术研讨会与第五届全国药用植物和植物药学术研讨会论文集,2005.
- [4] 黄瑞松. 中草药多糖含量测定方法概述[J]. 中国药师,2005(1):68.
- [5] 于村,丁钢强,俞莎,等. 香菇多糖测定的方法学研究[J]. 中国公共卫生,2000,16(3):245.
- [6] 王宏洁,李鹏跃,刘婷,等. 苯酚-硫酸法测定清开灵注射液中总多糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,12(11):3.
- [7] 王瑞海,柏冬,刘丽梅. 比色法测定大蒜多糖提取物中总多糖含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):158.
- [8] 徐丽媛,吕永磊,王丹,等. 南方菟丝子不同炮制品多糖含量的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):119.
- [9] 于晓辉,刘自扬,杨尽松,等. 薄层色谱法与苯酚硫酸法联用控制黄芪多糖粗粉质量[J]. 安徽农业科学,2010,38(14):7312.
- [10] 王华洋,耿东升. 莲威阿那奇处方水提浸膏中总糖含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):47.
- [11] 徐光域,颜军,郭晓强,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学,2005,26(8):342.
- [12] 谷陟欣,辛秀,刘淑娃,等. 改进硫酸-苯酚法测定阿胶口服液口中粗多糖含量[J]. 西部中医药,2011,24(11):34.

[责任编辑 顾雪竹]