

# 比色法测定大蒜多糖提取物中总多糖含量

王瑞海, 柏冬, 刘丽梅\*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 建立大蒜多糖提取物中总多糖的含量测定方法。方法: 以葡萄糖为对照品, 硫酸-苯酚比色法测定大蒜多糖提取物中总多糖含量。结果: 样品经苯酚-硫酸显色后于 485 nm 处测定吸收度, 在此波长处溶液的吸光度与葡萄糖含量呈良好的线性关系; 线性范围 0.0116~0.0578 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.9995$ ), 加样回收率 101.4%, RSD 2.1%。结论: 该方法简单, 准确性、重复性良好, 可作为大蒜多糖提取物中总多糖质量的控制方法。

**[关键词]** 大蒜多糖提取物; 总多糖; 葡萄糖; 比色法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0158-04

## Content Determination of Total Polysaccharide in the Garlic Polysaccharide by Colorimetry

WANG Rui-hai, BAI Dong, LIU Li-mei\*

(Institute of Basic Theory, China Academic of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method for content determination of total polysaccharide in garlic polysaccharide. **Method:** Glucose was used as a reference substance, and phenol-sulfuric acid was applied as coloring reagent to determine the content of total polysaccharide. **Result:** The calibration curve of glucose showed good linearity in the range of 0.0116-0.0578 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.9995$ ). The average recovery rate was 101.4%, and RSD was 2.1%. **Conclusion:** The determination method is simple, sensitive and accurate, which can be used for evaluating the quality of total polysaccharide in the garlic polysaccharide.

**[Key words]** garlic polysaccharide; total polysaccharide; glucose; colorimetry

近年来研究发现, 大蒜多糖具有抗氧化、抗病毒、增强免疫力、保护肝脏等多种生物活性<sup>[1-2]</sup>, 是非常具有开发前景的天然植物活性成分。本实验以葡萄糖为对照品, 采用苯酚-硫酸比色法测定大蒜多糖提取物中总多糖含量, 为大蒜多糖提取物的质量控制提供依据。

### 1 材料

**1.1 仪器** 8453 紫外-可见分光光度计(美国, 安

捷伦), HW·SY11-K 型数显恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司), CX-250 型超声波清洗机(天海双龙医疗设备有限公司)。

**1.2 试剂** 苯酚(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂), 浓硫酸、95%乙醇(均为分析纯, 北京化工厂), D-无水葡萄糖对照品(供含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 批号 110833-200503), 大蒜生药材购自北京市东直门内南小街奥士凯菜市场, 产地山东金乡, 大蒜多糖提取物(实验室自制)。

### 2 方法与结果

**2.1 大蒜多糖提取物的精制** 取大蒜多糖提取物 5 g, 80%乙醇索氏回流提取 8 h, 滤过, 滤渣挥干溶剂后, 取 2 g 置于烧瓶中, 加蒸馏水 100 mL, 回流提取 60 min, 滤过, 加 95%乙醇使含醇量为 80%, 搅匀, 冰箱中静置过夜, 抽滤得粗多糖。将粗多糖配制成 1% 溶液, 用 Sevage 法脱蛋白<sup>[3]</sup>, 加入 30%

**[收稿日期]** 2011-12-21

**[基金项目]** “重大新药创制”科技重大专项平台子课题(2009ZX09301-005-11)

**[第一作者]** 王瑞海, 副主任技师, 从事中药学相关研究, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: betterhairui@126.com

**[通讯作者]** \* 刘丽梅, 研究员, 从事中药化学、质量、工艺研究, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: liulimeihrb@sina.com

$\text{H}_2\text{O}_2$ 脱色<sup>[4]</sup>,加入95%乙醇使溶液含醇量为80%,搅匀,冰箱中静置过夜,抽滤得下层多糖。以无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤多糖,60℃真空干燥,得白色的大蒜精多糖粉末。

**2.2 对照品溶液的配制** 取无水葡萄糖对照品5 mg,精密称定,置10 mL量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

### 2.3 供试品制备方法

**2.3.1 供试品纯化方法** 方法1:取大蒜多糖提取物约25 mg,精密称定,置100 mL烧瓶中,加入50 mL无水乙醇,加热回流60 min,放冷后用滤纸过滤,并用少量无水乙醇冲洗烧瓶,滤液也用同一滤纸过滤。滤纸及滤渣挥干乙醇后,置于烧瓶中,精密加入50 mL蒸馏水,称重后,加热回流30 min,放冷后,称重,用蒸馏水补足质量,过滤,取续滤液5 mL,置于50 mL量瓶中,蒸馏水定容至刻度,摇匀后,即得。方法2:取大蒜多糖提取物约25 mg,精密称定,加入10 mL热水,超声30 min后,转移至25 mL量瓶中,用水定容至刻度,摇匀后,10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取1 mL上清液,加水稀释并定容至10 mL,摇匀后,即得。

分别精密量取上述供试品溶液各1 mL于10 mL具塞试管中,分别加5%苯酚溶液1.0 mL,摇匀后加入浓硫酸5.0 mL,摇匀后室温放置10 min,沸水浴10 min,取出置于冰水浴中冷却放置至室温。以试剂空白为参比在485 nm波长处测定吸光度。以吸光度/称样量表示样品含量,方法1测定结果为0.020 2,方法2测定结果为0.018 4。样品经乙醇回流后,由于去除了脂溶性杂质,减少了对样品中多糖测定的干扰,多糖含量更加准确,故选择方法1作为供试品溶液的制备方法。

对照品和供试品溶液显色后,均在485 nm有最大吸收,故选择485 nm作为测定波长。

**2.3.2 乙醇回流时间** 取大蒜多糖提取物约25 mg,共3份,精密称定,分别置于100 mL烧瓶中,加入50 mL无水乙醇,分别加热回流30,60,90 min,放冷后用滤纸过滤,并用少量无水乙醇冲洗烧瓶,滤液也用同一滤纸过滤。滤纸及滤渣挥干乙醇后,置于烧瓶中,精密加入50 mL蒸馏水,称重后,加热回流60 min,放冷后,称重,用蒸馏水补足质量,过滤,取续滤液5 mL,置于50 mL量瓶中,蒸馏水定容至刻度,摇匀后,即得。

分别精密量取上述3份供试品溶液各1 mL于10 mL具塞试管中,分别加5%苯酚溶液1.0 mL,摇

匀后加入浓硫酸5.0 mL,摇匀后室温放置10 min,沸水浴10 min,取出置于冰水浴中冷却放置至室温,以试剂空白为参比在485 nm波长处测定吸光度,以吸光度/称样量表示样品含量,实验结果分别为0.015 7,0.017 2,0.016 1。由实验结果可见,回流60 min所测定的样品含量较高,故样品除杂时选择乙醇回流60 min。

综合以上实验结果,确定供试品溶液的制备方法为取大蒜多糖提取物约25 mg,精密称定,置100 mL烧瓶中,加入50 mL无水乙醇,加热回流60 min,放冷后用滤纸过滤,并用少量无水乙醇冲洗烧瓶,滤液也用同一滤纸过滤。滤纸及滤渣挥干乙醇后,置于烧瓶中,精密加入50 mL蒸馏水,称重后,加热回流60 min,放冷后,称重,用蒸馏水补足质量,过滤,取续滤液5 mL,置于50 mL量瓶中,蒸馏水定容至刻度,摇匀后,即得。

### 2.4 显色条件的优化

**2.4.1 加入苯酚量的优化** 取2.3.2项下60 min回流制备的供试品溶液1 mL,于10 mL具塞试管中,共3份,分别加5%苯酚溶液0.5,1.0,1.5 mL,摇匀后加入浓硫酸5.0 mL,摇匀后室温放置10 min,沸水浴10 min,取出置于冰水浴中冷却放置至室温。以试剂空白为参比在485 nm波长处测定吸光度,测定结果分别为0.411,0.442,0.457。由实验结果可见,加入1 mL与1.5 mL 5%苯酚所测定的吸光度相差不大(<0.5%),故选择加入1 mL 5%苯酚显色。

**2.4.2 加入硫酸量的优化** 取2.3.2项下60 min回流制备的供试品溶液1 mL,于10 mL具塞试管中,共3份,均加入5%苯酚溶液1.0 mL,摇匀后分别加入浓硫酸4.0,5.0,6.0 mL,摇匀后室温放置10 min,沸水浴10 min,取出置于冰水浴中冷却放置至室温。以试剂空白为参比在485 nm波长处测定吸光度,测定结果分别为0.432,0.442,0.447。加入5 mL与6 mL硫酸,所测定的吸光度相近(<0.5%),故选择加入5 mL硫酸显色。

**2.4.3 加热时间的优化** 取2.3.2项下60 min回流制备的供试品溶液1 mL,于10 mL具塞试管中,共3份,均加入5%苯酚溶液1.0 mL,摇匀后加入浓硫酸5.0 mL,摇匀后室温放置10 min,分别沸水浴10,20,30 min,取出置于冰水浴中冷却放置至室温。以试剂空白为参比在485 nm波长处测定吸光度,测定结果分别为0.465,0.454,0.456。可见,加热10 min所测定的吸光度最大,故选择加热10 min作为

显色时间。

**2.4.4 加热温度的优化** 取 2.3.2 项下 60 min 回流制备的供试品溶液 1 mL, 于 10 mL 具塞试管中, 共 3 份, 均加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀后加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀后室温放置 10 min, 分别置于 100, 80, 60 °C 水浴中均加热 10 min, 取出置于冰水浴中冷却放置至室温。以试剂空白为参比在 485 nm 波长处测定吸光度, 测定结果分别为 0.465, 0.469, 0.470。由实验结果可见, 供试品在各温度显色后相差不大, 但实验结果表明供试品溶液在 100 °C 下反应后溶液吸光度重复性优于 80, 60 °C, 故选择 100 °C 作为显色温度。

综合以上实验结果, 确定大蒜多糖提取物中总多糖含量的显色方法为, 取对照品溶液、供试品溶液各 1 mL 于 10 mL 具塞试管中, 分别加 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀后加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀后沸水浴 10 min, 取出置于冰水浴中冷却放置至室温。以试剂空白为参比在 485 nm 波长处测定吸光度。

**2.5 方法学考察**

**2.5.1 标准曲线的制备** 分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 (0.057 8 g·L<sup>-1</sup>) 2, 4, 6, 8, 10 mL, 用蒸馏水分别定容于 10 mL 量瓶中。分别精密量取各对照品溶液 1 mL, 按 2.4 项下方法显色后, 以试剂空白为参比在 485 nm 波长处测定吸光度。所测结果为 0.154, 0.343, 0.517, 0.682, 0.877。以吸光度为纵坐标, 葡萄糖对照品溶液质量浓度 (g·L<sup>-1</sup>) 为横坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为  $Y = 15.43X - 0.020 (r = 0.999 5)$ 。结果表明葡萄糖在 0.011 6 ~ 0.057 8 g·L<sup>-1</sup> 与吸光度呈良好的线性关系。

**2.5.2 精密度试验** 精密吸取 2.5.1 项下对照品溶液 (0.0347 g·L<sup>-1</sup>) 1.0 mL, 按 2.4 项下方法显色后, 以试剂空白为参比在 485 nm 波长处连续测定 6 次吸光度, 结果 RSD 0.27% (n = 6), 说明本方法精密密度良好。

**2.5.3 重复性试验** 取大蒜多糖提取物样品约 25 mg, 共 6 份, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份, 每份精密吸取 1 mL, 按 2.4 项下方法显色后, 以试剂空白为参比在 485 nm 波长处测定吸光度。样品中总多糖的平均含量为 71.03%, RSD 2.6% (n = 6), 说明本方法重复性良好。

**2.5.4 稳定性试验** 取 2.5.3 项下 1 份样品 1 mL, 按 2.4 项下方法显色后, 以试剂空白为参比显色后 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 测量吸光度。结果吸光度的 RSD 0.3% (n = 7), 说明样品显色后 1 h

内稳定性良好。

**2.5.5 加样回收率试验** 取已知含量的大蒜多糖提取物 (71.03%) 约 12.5 mg, 共 6 份, 精密称定, 精密加入大蒜精多糖溶液 10 mL (0.693 g·L<sup>-1</sup>) (以葡萄糖计合多糖 7.30 mg), 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份, 每份精密吸取 1 mL, 按 2.4 项下方法显色后, 以试剂空白为参比在 485 nm 波长处测定吸光度。以外标一点法计算多糖含量, 计算回收率, 结果见表 1。由表 1 可知, 本方法平均回收率为 101.4%, RSD 2.1% (n = 6), 说明本方法准确性良好。

表 1 大蒜多糖提取物中葡萄糖加样回收率试验

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
12.97	9.21	7.30	16.72	102.8		
12.82	9.11	7.30	16.63	103.1		
12.99	9.23	7.30	16.75	103.1		
12.62	8.96	7.30	16.28	100.2	101.4	2.1
12.62	8.96	7.30	16.10	97.8		
12.73	9.04	7.30	16.45	101.5		

**2.6 换算因子的测定** 取大蒜精多糖适量 15 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得 0.3 g·L<sup>-1</sup> 精制多糖溶液。分别精密吸取精制多糖溶液和葡萄糖对照品溶液 1.0 mL, 按照 2.4 项下方法显色后, 以试剂空白为参比在 485 nm 波长处测定吸光度。按以下公式计算葡萄糖对照品与大蒜精制多糖之间的换算系数:  $f = 1/C$  (C 以葡萄糖计精制多糖中多糖浓度), 计算得换算系数为 1.054 (n = 6)。

**2.7 样品含量测定** 取 3 批大蒜多糖提取物约 25 mg, 精密称定, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 每份精密吸取 1 mL, 按 2.4 项下方法显色后, 以试剂空白为参比在 485 nm 波长处测定吸光度, 外标一点法测定样品中多糖含量, 结果分别为 70.53%, 75.29%, 72.30%。

**3 讨论**

苯酚-硫酸法为测定多糖的经典方法之一。显色的苯酚、硫酸用量, 显色时间、温度, 放置时间等因素均会影响测定效果, 本实验对各影响因子进行了单因素考察, 确定了最佳显色条件。

硫酸-苯酚法测定的原理是, 硫酸-苯酚试剂与单糖脱水形成的糠醛衍生物缩合成有色物质, 在 485 nm 处有最大吸收, 吸收值与糖含量呈线性关

## 白及须根和块茎总酚含量的测定

周云凯, 李伟平, 田莎莎, 马丹丹, 蒋福升, 丁志山\*  
(浙江中医药大学, 杭州 310053)

**[摘要]** 目的:测定白及块茎和须根中总酚的含量。方法:以没食子酸为对照品,采用 folin-酚比色法测定白及块茎和须根中的总酚含量。采用 TLC 对白及须根和块茎进行定性比较。结果:采用 folin-酚比色法测定白及中总酚含量,准确度好,精密度高。没食子酸对照品在 5~25  $\mu\text{g}$  的范围内线性良好,标准曲线方程为  $Y = 0.0332X + 0.0001$ 。白及须根中的总酚含量为 0.895%,块茎中的总酚含量为 0.394%。TLC 结果表明,白及须根的斑点比块茎多。结论:白及须根中总酚含量高于块茎。

**[关键词]** 白及;总酚;须根;块茎;薄层色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0161-04

## Determination of Total Polyphenol Content in Different Parts of Rhizoma Bletillae Striatae

ZHOU Yun-kai, LI Wei-ping, TIAN Sha-sha, MA Dan-dan, JIANG Fu-sheng, DING Zhi-shan\*  
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the total polyphenol content in the fibrous roots and tubers of Rhizoma Bletillae Striatae. **Method:** The content of total polyphenol in the fibrous roots and tubers of Rhizoma Bletillae Striatae was detected by folin colorimetry method using gallic acid as index, then using TLC method to qualitative compare fibrous roots with tubers of Rhizoma Bletillae Striatae. **Result:** There was a good linearity in the range of 5-25  $\mu\text{g}$  for the gallic acid, the standard curve equation was  $Y = 0.0332X + 0.0001$ . The total polyphenol content in the fibrous roots was 0.895% while tubers was 0.394%. **Conclusion:** the total Polyphenol

**[收稿日期]** 20110906(001)

**[基金项目]** 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2011C22047);江山市面上科技计划项目(2010B16);浙江省大学生科技创新活动计划项目(2010R410058)

**[第一作者]** 周云凯,硕士研究生,从事中西医结合基础研究,E-mail:571248lucky@163.com

**[通讯作者]** \*丁志山,教授,博士生导师,E-mail:zjtcmdzs@163.com

系<sup>[5]</sup>。但是不同单糖与硫酸-苯酚试剂显色后的最大吸收波长有一定差异,其标准曲线的斜率也不尽相同,如使用某一种单糖做标准曲线,则会造成较大误差。对于杂多糖,单纯以某一单糖作标准曲线来计算多糖含量与真实含量存在较大误差。采用测定换算因子的校正方法,可有效消除单纯以某一种单糖作标准曲线引起的误差。该方法简便快速,测得值更接近真实值。

大蒜多糖提取物中总多糖含量测定结果的准确性,对开发和利用大蒜多糖提取物有现实意义。本文采用方法操作简便、显色稳定、重复性好、灵敏度高,可作为大蒜多糖提取物的含量测定方法。

### [参考文献]

- [1] 蔡飞,吴金良,陈金和.对病毒性心肌炎小鼠心肌酶的影响[J].咸宁学院学报,2003,17(1):1.
- [2] 郑颖,王辉,郭国庆.抗氧化活性及其对 PC12 细胞增殖的影响[J].暨南大学学报:医学版,2008,29(4):110.
- [3] 冯颖,王晶晶,孟宪军,等.无梗五加果粗多糖提取精制工艺研究[J].食品研究与开发,2006,27(8):42.
- [4] 刘昌盛,黄凤洪,夏伏建.茶皂素脱色工艺研究[J].粮食与油脂,2004(12):26.
- [5] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987:6.

[责任编辑 蔡仲德]