

3,5-二硝基水杨酸法联合苯酚-浓硫酸法测定 不同产地黄精中多糖含量

张志君¹, 孙伟², 李永亮¹, 张朝凤^{1*}

(1. 中国药科大学中药学院生药药学研究室, 南京 211198; 2. 无限极(中国)有限公司, 广州 510665)

[摘要] 目的:建立一种操作简便,可排除黄精药材本身所含单糖干扰的多糖含量测定方法,建立合理客观地评价黄精药材的质量。方法:联合3,5-二硝基水杨酸法和苯酚-浓硫酸法,通过紫外分光光度法分别测定黄精原药材中还原糖和总糖的含量,取两者之差即为药材中多糖的含量,并从重复性、精密度、稳定性以及加样回收率等方面进行了方法学考察。结果:本方法具有良好的适用性,不同产地的黄精药材多糖含量测定结果表明云南产黄精药材中多糖含量较高。结论:本实验样品处理简单、方法的重复性、精密度、稳定性及加样回收率均符合要求,可用于评价黄精生药材的质量。

[关键词] 3,5-二硝基水杨酸法; 苯酚-浓硫酸法; 黄精; 多糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0106-04

Determination of Polysaccharide in Rhizoma Polygonatii by Phenol-Sulfuric Acid and DNS Methods

ZHANG Zhi-jun¹, SUN Wei², LI Yong-liang¹, ZHANG Chao-feng^{1*}

(1. Research Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Unlimited Extremely China Co., Guangzhou 510665, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simple determination method of polysaccharide in Rhizoma Polygonatii, which is not influenced by the content of monosaccharide. **Method:** The total sugar was determined by phenol-sulfuric acid method while the concentration of reducing sugar was determined by 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, the concentration of polysaccharide = C_t (the concentration of total sugar) - C_s (the concentration of reducing sugar). **Result:** It was used to evaluate the content of polysaccharide collected in different area, the concentrations of polysaccharide in Polygonatum Rhizoma collected from Yunnan province are relatively higher. **Conclusion:** The results showed above methods are convenient, stable and accurate, which can be used for quality evaluation of Polygonatum Rhizoma and its preparations.

[Key words] 3, 5-dinitrosalicylic acid method; phenol-sulfuric acid method; Polygonatii Rhizoma; determination of polysaccharide

黄精(Rhizoma Polygonatii)具有补肾益精、滋阴润燥之功效,用于治疗肾虚亏损、脾胃虚弱等症。《中国药典》(2010年版)收载其基源植物为黄精 *Polygonatum sibiricum* Red.、滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Heml. 和多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua。现代

研究表明黄精的主要化学成分是多糖、甾体皂苷、黄酮、维生素等物质,其中黄精多糖作为黄精药材的活性成分之一,具有抗病毒及激发免疫作用,已成为保健食品和医药行业的关注焦点^[1]。由于多糖是由多个单糖聚合而成的高分子化合物,《中国药典》中采用蒽酮-硫酸为试剂的比色法进行测定,而有关黄精多糖的检测方法已有多篇文献报道^[2-4],但多数是采用蒽酮-硫酸法、苯酚-硫酸法或3,5-二硝基水杨酸法等单一的方法。在进行多糖的含量测定时,由于原料、提取温度等因素影响,在所制备的样品溶

[收稿日期] 20110413(008)

[通讯作者] * 张朝凤,博士,副教授,从事生药活性成分及其质量标准, Tel:025-86185140, E-mail: njchaofeng@126.com

液中存在部分单糖的干扰,采用蒽酮-硫酸或苯酚-硫酸法只能测定样品的总糖含量,而采用3,5-二硝基水杨酸法(DNS法)却需要通过盐酸水解等手段来分别测定总糖和还原糖,然后取两者之差,样品溶液的制备比较繁琐。本实验中为了排除样品溶液中单糖的干扰并简化操作步骤,拟联合采用苯酚-硫酸法与DNS法测定黄精药材中多糖含量,并进行方法学验证,在此基础上对各地野生黄精药材进行多糖含量测定,以评价药材的道地性。

1 材料

所采集的野生黄精药材,均在中国药科大学植物园引种种植,经淮阴师范学院赵丽琴副教授鉴定。葡萄糖(南京化学试剂有限公司,批号080560329),3,5-二硝基水杨酸,苯酚,浓硫酸,其他化学试剂均为国产分析纯。

GZX-9240ME型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),1/10万天平(北京赛多利斯天平有限公司),UV-2450型紫外分光光度计(日本岛津),HH-4恒温水浴锅(常州国华仪器厂),SHB-3型循环水泵(河南长城仪器厂)。

2 溶液的配制

2.1 葡萄糖对照溶液的配制 精密称取烘干至恒重的葡萄糖适量,用蒸馏水溶解并定容,分别配制的1,0.08 g·L⁻¹的葡萄糖对照溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取无杂质的黄精药材粉末各1 g,加入10 mL石油醚(60~90℃)热回流脱脂30 min,回收石油醚,挥干溶剂加入蒸馏水100 mL,热回流提取2 h,取上清液,过滤,精密吸取1 mL作为DNS法测定用的还原糖供试品溶液。另取上清液1 mL,加入蒸馏水定容至50 mL,精密吸取1 mL作苯酚-硫酸法测定用总糖供试品溶液。

2.3 苯酚溶液的配制 精密称取2.5 g苯酚,用蒸馏水溶解并定容于50 mL量瓶中。

2.4 DNS溶液的配制 取0.65 g DNS溶于适量蒸馏水中,再加入32.5 mL的2 mol·L⁻¹的NaOH溶液,再加入4.5 g丙三醇,用蒸馏水定容于100 mL。

3 标准曲线的制作

分别精密吸取1 g·L⁻¹葡萄糖对照品溶液各0,0.2,0.6,1.0,1.4,1.8 mL,加入蒸馏水至4 mL,再分别精确加入5 mL的DNS溶液,混匀后置沸水浴中煮沸5 min,冷却至室温,定容至10 mL,以空白管为对照,在540 nm处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,葡萄糖浓度(g·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线 $Y=5.765X+0.0311$ ($r=0.9993$),在0.2~1.8 mg

呈线性关系,用于DNS法测定还原糖。

精密量取84 mg·L⁻¹的葡萄糖对照品溶液各0,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 mL于6只10 mL量瓶中,分别加入蒸馏水定容至2 mL,再分别精密加入1 mL的5%苯酚溶液和7 mL的浓硫酸溶液,摇匀,水浴加热20 min,冷却至室温,以空白管为对照,在490 nm测定吸光度,以吸光度为纵坐标,葡萄糖浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线 $Y=0.0059X-0.0015$ ($r=0.9995$),0~168 μg呈线性关系,用于苯酚-硫酸法测定总糖。

4 方法学验证和实验结果

4.1 多糖提取方法的考察

4.1.1 加水量的选择 原料(8号样品)与水体积比分别为1:60,1:80,1:100,1:120,热回流提取2 h,采用苯酚-硫酸法测定总糖供试品溶液的吸光度(表1),发现加水量影响总糖提取率,呈上升趋势,但水量过多,则提取液浓缩时间较长,所以选择原料与水的比例为1:100。

表1 不同加水量对黄精总糖提取率的影响($n=3$)

不同比例	A
1:60	0.215
1:80	0.286
1:100	0.387
1:120	0.394

4.1.2 浸提时间的选择 按照供试品溶液的制备方法,加入100 mL水,分别在100℃条件下,热回流提取1,2,3,4 h,采用苯酚-硫酸法测定总糖供试品溶液的吸光度,结果发现提取2 h,即可达到较多的多糖得率。提取时,时间过长则可能使得多糖被破坏,使多糖得率降低。

表2 不同提取时间对黄精总糖提取率的影响($n=3$)

不同时间/h	A
1	0.227
2	0.387
3	0.391
4	0.346

4.2 重复性试验 分别取药材粉末6份,按照供试品溶液的制备方法,再根据DNS法测定用的还原糖供试品溶液,苯酚-硫酸法测定用总糖供试品溶液,结果RSD分别1.22%,1.57%。

4.3 精密度试验 分别精密吸取3 mL还原糖供试品溶液和1 mL总糖供试品溶液各6份,分别按照3

项的操作方法进行测定,考察 DNS 法和苯酚-硫酸法的精密度,结果 RSD 分别为 1.23% ,1.02% 。

4.4 稳定性试验 分别精密吸取 3 mL 还原糖供试品溶液和 1 mL 总糖供试品溶液各 1 份,分别按照 3 项的操作方法进行测定,在 0,10,20,30,60,90 min 测定吸光度,考察苯酚-硫酸法和 DNS 法的精密度。

结果 RSD 分别为 2.81% ,1.95% 。

4.5 加样回收率试验 分别称取还原糖含量和总糖含量已知的无杂质黄精药材(安徽霍山产)粉末 1.0 g,共 6 份,精密称定,精确加入葡萄糖对照品适量,按照 2.2 项制备各供试品溶液,根据上述方法分别在 490,540 nm 处测定吸光度,计算。见表 3。

表 3 黄精中多糖加样回收率的试验

样品 /g	样品还原糖含量 /mg	样品总糖含量/mg	加入还原糖的量/mg	测定还原糖的量/mg	回收率 /%	平均回收率及 RSD/%	测定总糖的量/mg	回收率 /%	平均回收率及 RSD/%
1.013	62.5	333.3	31.2	94.8	101.7		358.2	98.1	
1.021	62.9	335.9	31.2	93.3	98.7		363.4	98.9	
1.016	62.7	334.2	62.4	124.4	98.9	99.72	397.6	100.3	99.08
1.015	62.6	333.9	62.4	124.7	99.5	(1.07)	399.6	101.0	(1.18)
1.014	62.6	333.6	93.6	155.6	99.0		420.2	97.9	
1.006	62.1	331.0	93.6	156.1	100.5		418.9	98.3	

5 结果与讨论

联合 3,5-二硝基水杨酸法和苯酚-浓硫酸法,通过紫外分光光度法分别测定黄精原药材中还原糖和

总糖的含量,多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量,不同产地黄精多糖的含量结果见表 4。

研究结果显示云南采集的黄精生药材(1~4

表 4 不同来源的黄精生药材及其易混品的多糖含量

序号	产地(采集人)	品种	总糖含量		多糖含量 %
			苯酚-浓硫酸法	DNS 法	
1	云南富民县(王琼)	滇黄精	41.04(0.483)	8.15(0.507)	32.89
2	云南昆明阿子营(王琼)	滇黄精	31.98(0.376)	7.75(0.484)	24.23
3	云南安宁县(王琼)	黄精	33.53(0.394)	5.42(0.345)	28.11
4	云南昆明市(王琼)	黄精	36.89(0.433)	4.12(0.267)	32.77
5	广西南宁(苏大荣)	黄精	25.54(0.300)	6.34(0.399)	19.20
6	广西桂林(苏大荣)	多花黄精	36.11(0.424)	4.67(0.300)	31.44
7	江苏南京植物园(朱艳)	多花黄精	38.09(0.430)	8.71(0.541)	29.38
8	陕西渭南(孙伟)	黄精	32.90(0.387)	6.17(0.386)	26.73
9	安徽霍山(赵利琴)	多花黄精	25.97(0.305)	5.24(0.333)	20.73
10	安徽天目山(赵利琴)	多花黄精	26.02(0.306)	3.91(0.254)	22.11
11	安徽六安(赵利琴)	长梗黄精	18.68(0.218)	2.56(0.174)	16.12
12	湖北赤壁(吴刚)	湖北黄精	23.36(0.274)	2.86(0.192)	20.50
13	吉林长白山(安海成)	热河黄精	25.41(0.298)	2.37(0.162)	23.04

号)中多糖含量普遍相对偏高,并且药材外观上也体现出较为粗大肥厚,而在江苏南京植物园栽培的黄精药材(7号),虽然总糖含量也偏高,药材个体也较大,但其多糖含量相对较低。目前常用的多糖含量的比色测定方法主要是苯酚-浓硫酸法、硫酸-蒽酮法和 DNS 法,前两种方法只能测定样品中的总糖

含量,当样品中单糖去除不完全,则会使测定结果偏高,而 DNS 法测定总糖时需水解,不同样品的水解时间不确定,难以量化水解是否完全从而给实验操作带来的极大不便,最近曾报道采用 DNS 法联合蒽酮-浓硫酸法测定杜仲水提取液中多糖的含量^[6]。本文为首次建立 DNS 法联合苯酚-浓硫酸法测定黄

金铁锁体外抗氧化活性研究

袁琳¹, 马银海¹, 尹震花², 王微², 顾雪竹³, 康文艺^{2*}

1. 昆明学院 化学科学与技术系, 昆明 650214; 2. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004;
3. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究金铁锁体外抗氧化活性。方法: 采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、清除[2, 2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS)自由基及铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)测定法, 对金铁锁体外抗氧化活性进行评价, 并阳性对照没食子酸丙酯(PG)、丁基羟基茴香醚(BHA)和二丁基羟基甲苯(BHT)比较。结果: 金铁锁 3 个提取物体外抗氧化活性均弱于阳性对照 PG, BHA, BHT。在 3 个提取物中, 金铁锁乙酸乙酯提取物清除 ABTS 自由基(IC₅₀ = 40.54 mg·L⁻¹)及还原 Fe³⁺ 的能力[TEAC = (696.9 ± 2.42) μmol·g⁻¹]较强; 正丁醇清除 ABTS 自由基(IC₅₀ = 83.38 mg·L⁻¹)及还原 Fe³⁺ 的能力[TEAC = (166.1 ± 1.06) μmol·g⁻¹]次之, 石油醚提取物最弱。结论: 金铁锁乙酸乙酯部位体外抗氧化活性较强。

[关键词] 金铁锁; 抗氧化活性; 二苯代苦味酰基; [2, 2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐]; 铁离子还原/抗氧化能力

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)06-0109-04

Antioxidant Activity of *Psammosilene Tunicoides* in vitro

YUAN Lin¹, MA Yin-hai¹, YIN Zhen-hua², WANG Wei², GU Xue-zhu³, KANG Wen-yi^{2*}

1. Chemical Science and Technology Department, Kunming University, Kunming 650214, China;
2. Institute of Chinese Materia, Henan University, Kaifeng 475004, China;
3. Institute of Chinese Materia Medica, Traditional Chinese Medical Research Institute, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity *Psammosilene tunicoides* in vitro. **Method:** Antioxidant activities of *P. tunicoides* were evaluated by the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

[收稿日期] 20111122(011)

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(210203)

[第一作者] 袁琳, 博士, 副教授, 从事天然药物开发与研究, Tel: 0871-5098482, E-mail: sunrainyl@gmail.com

[通讯作者] * 康文艺, 教授, 从事中药活性成分及新药研究, Tel: 0378-3880680, E-mail: kangwenyi@hotmail.com

精中水溶性多糖的含量, 方法学考察显示其具有重复性好、操作简便、快速、准确等特点。结果表明将联合采用苯酚-浓硫酸法与 DNS 法结合, 可除去药材中单糖的影响, 从而客观地评价黄精多糖的含量, 将来可用于作为黄精药材及制定其炮制工艺的质量标准。

[参考文献]

- [1] 李迪明, 符波, 施杰. 黄精炮制前后黄精多糖药理作用的研究[J]. 新疆医学院学报, 1997, 20(3): 164.
[2] 王晓丹, 田芳, 史桂云, 等. 不同产地黄精中多糖含量

的比较[J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(9): 657.

- [3] 衣小凤, 郭晏华. 黄精总多糖含量分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(9): 190.
[4] 杨云, 万焱, 许小华, 等. 黄精中还原糖含量与饮片加工方法和时间的相关性研究[J]. 中药材, 2008, 31(11): 1631.
[5] 张莹, 钟凌云. 炮制对黄精化学成分和药理作用影响研究[J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(4): 77.
[6] 李强, 唐微, 石园园, 等. 蒽酮-硫酸法和 3,5 二硝基水杨酸测定杜仲水提液多糖含量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 370.

[责任编辑] 蔡仲德