

壮药黄根中多糖含量的测定

陆青兰¹, 陆海峰², 黄世稳¹, 韦雪平², 詹新堂², 陈征智², 杨晓莉², 莫潘秋³

(1. 右江民族医学院基础医学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院医学检验学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 建立壮药黄根中多糖含量的测定方法并对4批样品进行实测。方法 采用苯酚-浓硫酸法, 比色波长485 nm。结果 溶液的吸光度与葡萄糖浓度在20.0~120.0 μg/ml呈良好线性关系; 回归方程为 $A=0.0089C+0.0455$ ($R^2=0.9986$), 重现性 $RSD=0.368\%$ ($n=6$), 精密性 $RSD=0.258\%$ ($n=6$), 120 min内稳定性 $RSD=0.382\%$ ($n=7$), 平均回收率为 $(99.7\pm 1.02)\%$ ($n=6$), 测得4批黄根中多糖的含量在0.24%~0.30%之间。结论 该传统方法可用于壮药黄根中多糖的含量测定。

关键词: 黄根; 多糖; 苯酚-浓硫酸法; 含量测定

中图分类号: R282 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2018)05-0405-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.05.001

Determination of Polysaccharide Content from *Prismatomeris Tetrandra* (Roxb) K Schum (Zhuang Medicinal Herb)

Lu Qinglan¹, Lu Haifeng², Huang Shiwen¹, Wei Xueping², Zhan Xintang²,
Chen Zhengzhi², Yang Xiaoli², Mo Panqiu³

(1. School of Preclinical Medicine of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. School of Pharmacy of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 3. School of Medical Laboratory of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the determination of polysaccharide content from *Prismatomeris tetrandra* (Roxb) K Schum of Zhuang herb and to measure 4 batches of samples. **Methods**

The phenol-concentrated sulfuric acid method was used, and the colorimetric wavelength was 485 nm. **Results**

The absorbance of the solution showed a good linear relationship with glucose concentration between 20.0~120.0 μg/ml. The regression equation was $A=0.0089C+0.0455$ ($R^2=0.9986$). The repeatability was $RSD=0.368\%$ ($n=6$). The accuracy was $RSD=0.258\%$ ($n=6$). The stability in 120 min was $RSD=0.382\%$ ($n=7$). The average recovery rate was $(99.7\pm 1.02)\%$ ($n=6$). The content of polysaccharides in the four batches of samples were 0.24%~0.30%. **Conclusion** The traditional method mentioned above can be used to determine the content of polysaccharides in *Prismatomeris tetrandra* (Roxb) K Schum of the Zhuang herbs.

Key words: *Prismatomeris tetrandra* (Roxb) K Schum; polysaccharide; phenol-concentrated sulfuric acid method; content determination

基金项目:国家自然科学基金项目(81660694); 广西自然科学基金项目(2015JJAA40399); 广西教育厅重点科研项目(ZD2014100)

第一作者简介:陆青兰(1986-),女,主管检验技师,在读硕士研究生,研究方向:基础医学检验相关研究,E-mail:396875874@qq.com

通信作者简介:黄世稳(1962-),男,教授,硕士研究生导师,研究方向:壮药抗纤维化成分与作用机制研究,E-mail:shi.wen.huang@163.com

黄根为茜草科植物三角瓣花 [*Prismatomeris tetrandra* (Roxb) K Schum] 的根。具有利湿退黄、强壮筋骨、祛瘀生新、凉血止血等功效,在广西壮族民间用于治疗肝炎、风湿骨痛、跌打损伤、白血病、再生障碍性贫血、地中海贫血、矽肺等症^[1]。近年来,黄根用于治疗尘肺^[2]纤维化^[3]、肝纤维化^[4]、抗病毒^[5]等方面的研究不断深入。为探讨黄根多糖的药理作用,本课题组采用苯酚-硫酸法对黄根水提物的多糖含量进行了测定。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 北京普析 TU-1810 紫外可见分光光度计;德国 Sartorius BSA224S 电子分析天平;德国 Vacuubrand MZZCNT 真空泵;上海亚荣 RE-52A 旋转蒸发仪, YRDC-1015 低温恒温槽;上海精宏 DHG-9030A 电热恒温鼓风干燥箱等。

试验用黄根饮片购自芷江侗族自治县药材公司中药饮片厂,经广西百色市食品药品检验所黄必奎主任药师鉴定为三角瓣花 [*Prismatomeris tetrandra* (Roxb) K Schum] 的根,粉碎后备用;乙醇、苯酚、硫酸等试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 黄根多糖的提取 称取干燥的黄根粗粉 50.00 g,移入索氏提取器内,用 500 ml 95%乙醇索氏回流提取 2 h,抽滤,滤渣用 500 ml 蒸馏水分两次在 80℃下超声提取 30 min,过滤并合并滤液,在 75℃下用旋转蒸发仪减压浓缩至 50 ml,加入 220 ml 95%乙醇,置入 5℃冰箱静置 24 h,抽滤,沉淀物用 150 ml 蒸馏水在超声波下复溶,用 Savage 法除去蛋白质后,再用旋转蒸发仪减压浓缩至干,置 80℃鼓风干燥箱干燥 4 h,得某批次黄根多糖粗品 m_0 (g) (如第一批次 $m_0 = 0.400$ g),置于干燥器中备用。

1.2.2 样品溶液的制备 精密称取某批次干燥至恒重的黄根多糖粗品 50.00 mg,置于小烧杯中,用少量蒸馏水溶解后,完全转移到 50.00 ml 容量瓶中,以蒸馏水定容至刻度,配成样品贮备液。精密吸取样品贮备液 4.00 ml,置于 50.00 ml 容量瓶中,以蒸馏水稀释定容,摇匀,得样品溶液,相当于每 ml 溶液含黄根多糖粗品 80.00 μg (即 $C_0 = 80.0$ $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

1.2.3 标准曲线的绘制

1.2.3.1 标准溶液的配制 精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 50.00 mg,置于 50.00 ml 容量瓶中,以蒸馏水定容至刻度,配成 1.00 mg/ml 的对照品贮备液。分别精密吸取对照品贮备液 1.00 ml、2.00 ml、3.00 ml、4.00 ml、5.00 ml、6.00 ml 置于 50.00 ml 容量瓶中,以蒸馏水稀释定容,摇匀,得 1~6 号对照品溶

液。

1.2.3.2 5%苯酚试液的配制 精密称取新精制的苯酚 2.63 g,置于小烧杯中加少量蒸馏水于 30℃温水水浴中超声使之溶解,完全溶解后移至 50.00 ml 容量瓶中加蒸馏水定容、摇匀,并用黑色塑料袋包装避光备用。

1.2.3.3 多糖含量测定波长的选定^[6] 分别精密吸取 2 号对照品溶液和样品溶液各 1.00 ml 于具塞刻度试管中分别精密加入 1.2.3.2 项下配制的 5%苯酚溶液 1.00 ml,迅速精密加入浓硫酸 5.00 ml,摇匀,沸水浴加热 15 min,冰水冷却,放至室温,用紫外可见分光光度计在 400~700 nm 波长范围进行扫描,结果样品与对照品溶液在 485 nm 处均有相同最大吸收峰,故确定 485 nm 为测定波长。

1.2.3.4 标准曲线的绘制^[6] 分别精密吸取 1~6 号对照品溶液 1.00 ml 于 25.00 ml 具塞刻度试管中,分别加入 5%苯酚试液 1.00 ml,摇匀,加入 5.00 ml 浓硫酸,立即摇匀。沸水浴加热 15 min,冰水冷却,放至室温,以蒸馏水同法做空白参比,在 485 nm 处测吸光度 (A)。以吸光度 (A) 为纵坐标,浓度 C ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 为横坐标,绘制标准曲线 (见图 1),得回归方程 $A = 0.0089C + 0.0455$, $R^2 = 0.9986$ 。结果表明,葡萄糖浓度在 20.0~120.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,其浓度与吸光度线性关系良好。

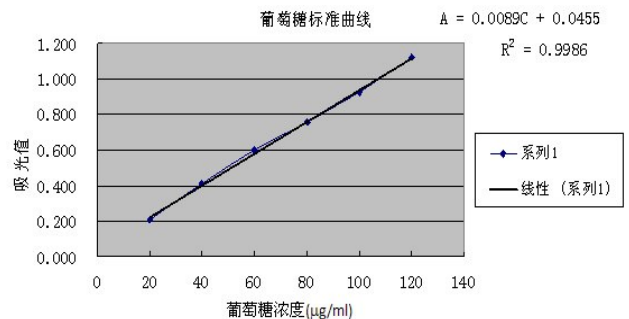


图 1 标准曲线

1.2.4 样品溶液中黄根多糖的含量测定 精密吸取 1.2.2 所得的样品溶液 1.00 ml 于试管中,按照 1.2.3.4 的方法测定吸光度 A,由回归方程计算样品液中葡萄糖浓度 C ($\mu\text{g}/\text{ml}$),按下式计算黄根中多糖的含量。

$$\begin{aligned} \text{黄根中多糖含量} \% &= C \cdot m_0 \times 100 \% / C_0 \cdot m \\ &= C \cdot m_0 \times 100 \% \div 80.0 \div 50.0 \\ &= 0.0250C \cdot m_0 \end{aligned}$$

公式中 C 为测得样品水溶液的葡萄糖浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$); m_0 为某批次提取的黄根多糖粗品的重量 (g); m 为黄根粗粉重量 (g); C_0 为待测样品水溶液中

黄根多糖粗品的浓度($\mu\text{g/ml}$)

1.2.5 重现性试验 重复 1.2.4 项测定 6 次($n=6$),考察测定方法的重现性。

1.2.6 精密度试验 分别精密量取 2 号对照品溶液 6 份,每份 1.00 ml,按 1.2.3.4 项下方法测定吸光度 A,考察仪器精密度。

1.2.7 稳定性试验 精密吸取按 1.2.2 项下方法制备的第一批次样品溶液 1.00 ml,按 1.2.4 项方法于 0 min、20 min、40 min、60 min、80 min、100 min、120 min 测定多糖含量,考察其稳定性。

1.2.8 加标回收率试验 精密吸取第一批次已知含量的同一样品溶液 6 份,每份 1.00 ml 置于试管中,并分别精密加入 1.2.3.1 中配制的 1~6 号葡萄糖对照品溶液各 1.00 ml,混合均匀后,再分别精密吸取加标混合液 1.00 ml(相当于样品和标样各取 0.50 ml 混合)按照 1.2.4 方法直接测定葡萄糖含量,计算加标回收率。

2 结果

2.1 重现性及黄根中多糖的含量 用第一批次样品平行测定吸光度 A 值 6 次,结果见表 1,黄根中多糖含量的相对标准偏差(RSD)值为 0.368% ($n=6$),表明方法重现性好。测得样品葡萄糖平均含量 $C=28.0 \mu\text{g/ml}$,按 1.2.4 公式计算得第一批次黄根样品中多糖平均含量为 0.28%。不同批次黄根样品中多糖含量测定结果见表 2。多糖含量最低为 0.24%,最高为 0.30%。

表 1 第一批次黄根中多糖含量测定结果 ($n=6$)

样品测量次序	吸光度 A	测得样品葡萄糖浓度 C($\mu\text{g/ml}$)	黄根中多糖含量(%)	多糖平均含量(%)	RSD (%)
1	0.295	28.0	0.280		
2	0.295	28.0	0.280		
3	0.294	27.9	0.279	0.280±0.001	0.368
4	0.296	28.1	0.281		
5	0.297	28.2	0.282		
6	0.295	28.0	0.280		

表 2 不同批次黄根样品中多糖含量测定结果

样品批次	吸光度 A	测得样品葡萄糖浓度 C($\mu\text{g/ml}$)	多糖粗品重量 m_0 (g)	黄根中多糖含量(%)
1	0.295	28.0	0.400	0.280±0.001
2	0.235	21.3	0.451	0.240±0.001
3	0.284	26.8	0.416	0.279±0.001
4	0.316	30.4	0.394	0.299±0.001

2.2 精密度 结果见表 3,RSD 为 0.258% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

表 3 2 号标样多次测定结果 ($n=6$)

测量次序	吸光度 A	测得样品葡萄糖浓度 C($\mu\text{g/ml}$)	葡萄糖实际浓度($\mu\text{g/ml}$)	相对标准差 RSD (%)
1	0.414	41.4		
2	0.413	41.3		
3	0.412	41.2	40.0	0.258
4	0.413	41.3		
5	0.411	41.1		
6	0.413	41.3		

2.3 稳定性 结果见表 4,RSD 为 0.382%,表明在 120 min 内显色稳定性好。

表 4 第一批样品在不同时间测定结果 ($n=7$)

时间 (min)	吸光度 A	测得葡萄糖浓度 C($\mu\text{g/ml}$)	黄根中多糖含量(%)	多糖平均含量(%)	RSD (%)
0	0.295	28.0	0.280		
20	0.296	28.1	0.281		
40	0.295	28.0	0.280		
60	0.297	28.2	0.282	0.280±0.001	0.382
80	0.295	28.0	0.280		
100	0.294	27.9	0.279		
120	0.294	27.9	0.279		

2.4 加标回收率 结果见表 5,平均回收率为 99.7%,RSD 为 1.02%。

3 讨论

苯酚-硫酸比色法测定黄根多糖的原理是黄根多糖成分在浓硫酸的作用下,水解成单糖,并迅速脱水生

表 5 样品加标回收率试验结果 (以葡萄糖含量计, $n=6$)

编号	每 1 ml 加标混合液中样品葡萄糖的量(μg)	每 1 ml 加标混合液中加入葡萄糖的量(μg)	加标混合液中葡萄糖的含量($\mu\text{g/ml}$)	测得吸光度 A	实测得加标样品葡萄糖的含量($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	14.0	10.0	24.0	0.257	23.6	98.3		
2	14.0	20.0	34.0	0.350	34.2	100.6		
3	14.0	30.0	44.0	0.441	44.4	101.0		
4	14.0	40.0	54.0	0.523	53.6	99.3	99.7±1.0	1.02
5	14.0	50.0	64.0	0.615	64.0	100.0		
6	14.0	60.0	74.0	0.698	73.3	99.0		

成糠醛衍生物,与苯酚缩合成有色化合物,再用分光光度法测定其黄根多糖含量。本法是多糖含量测定最经典最常用的方法,较简单、可靠,实验结果证实该法可作为黄根多糖含量的测定方法之一。黄根水提物干粉制备的样品溶液直接采用苯酚-硫酸显色,紫外-可见分光光度法测定多糖专属性好,吸收峰无干扰,而且与葡萄糖对照溶液的最大吸收波长一致,也与文献^[6]改进方法一致。一般多糖提取多采用水提醇沉淀法或醇提后水提法^[7],而本实验综合使用了两种方法,先用95%乙醇回流除去大部分其他小分子和糖苷等杂质,再用水提醇沉淀法除去单糖、低聚糖等杂质,还进行了除蛋白处理,大大减少了各种杂质对测定的影响,但同时也增加了操作步骤,造成多糖在提取过程中损失过多,所测得含量相对偏低。多糖作为一种具有特殊生物学活性功能的物质,日益受到重视。如枸杞多糖^[6]、香菇多糖^[7]、牛蒡多糖^[8]等具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、调节免疫等功效。黄根多糖的提取分离和功效等方面的研究至今尚未见有文献记载。

本次试验采用苯酚-浓硫酸比色法测定黄根多糖的含量在0.24%~0.30%之间,该测定方法重现性、精密性及稳定性良好。本课题组的研究成果为黄根多糖的提取提供了方法借鉴,将在今后的研究中进一步

完善和研究其功效。

参考文献:

- [1] 梁启成,钟鸣.中国壮药学[M].南宁:广西人民出版社,2005:382.
- [2] 曾婷.中药黄根联合N-乙酰半胱氨酸治疗尘肺的疗效及临床分析[J].工业卫生与职业病,2016,42(5):374-375,379.
- [3] 邓家刚,刘颖,黄诗思,等.治疗肺纤维化的药物:CN2016-10987467.9[P].2017-02-15.
- [4] 何飞,覃佩莉,黄若干,等.黄根片对急性肝损伤和肝纤维化作用的研究[J].中药药理与临床,2016,32(2):157-161.
- [5] 彭政,田炜,蓝富,等.黄根提取物抗乙型肝炎病毒活性的初步研究[J].广西医科大学学报,2017,34(6):820-822.
- [6] 李良,金文娟.枸杞多糖含量测定方法的比较分析[J].食品研究与开发,2016,37(11):143-146.
- [7] 周勇,易延遂,杨晓敏,等.香菇中多糖含量测定方法的比较研究[J].食品研究与开发,2016,37(13):124-128.
- [8] 孟宇,吕俊,齐世美.牛蒡多糖对K562细胞增殖的抑制及其机制的探讨[J].右江民族医学院学报,2014,36(1):10-11.

收稿日期:2018-08-13;修回日期:2018-10-08

●读者·作者·编者●

统计学方法的描述

统计学方法的描述应尽可能详细。描述时应注意如下事项:①定量资料:近似服从正态分布的定量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表达,呈偏态分布采用 $M(Q_R)$ 表达,应根据采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;②定性资料:应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验;③回归分析:应结合专业知识和散布图、选用合适的回归类型,不应盲目套用直线回归分析,对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价;④统计结果的表达:应写明所用统计方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t=6.166, \chi^2=5.126, F=6.886, P=0.026$);当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出95%CI;⑤统计结果的解释:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$)时,应表述为对比组之间的差异具有统计学意义,而不应表述为对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异。