

3,5-二硝基水杨酸比色法测定猕猴桃根提取物中多糖

吴瑾瑾¹, 朱雨晴², 章德军², 石森林^{2*}

(1 杭州第四医院, 浙江 杭州 310005; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 建立猕猴桃根提取物中多糖的测定方法。方法 葡萄糖为对照品, 3,5-二硝基水杨酸比色法测定, 显色剂用量为 1.5 mL, 显色时间为 60 min, 测定波长为 480 nm。结果 线性范围为 18.05~72.18 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 还原糖加样回收率为 97.86% (RSD 为 1.50%), 总糖加样回收率为 97.29% (RSD 为 1.76%)。结论 本方法精密度高, 稳定性、重复性好, 可以用于测定猕猴桃根提取物中多糖。

关键词:猕猴桃根; 多糖; 3,5-二硝基水杨酸; 比色法

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)10-1649-02

猕猴桃根为猕猴桃科植物中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch 的根或根皮, 也叫藤梨根, 性寒, 味苦, 涩, 具清热解毒, 活血消肿, 祛风利湿等功效^[1]。猕猴桃根具有抗肿瘤、抗病毒等作用, 其药效物质基础主要为多糖^[2,3]。目前植物多糖的测定方法主要有硫酸苯酚法和硫酸蒽酮法, 但这两种方法只能测定总糖, 不能测定还原糖。为准确测定多糖含量, 便于猕猴桃根多糖提取物的工艺优化与质量控制, 本实验采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法, 建立了猕猴桃根提取物中多糖的测定方法。

1 仪器与试剂

UV-2450 紫外分光光度计, 日本岛津; WH-861 型涡旋混合仪, 太仓市科教器材厂; KH-520DB 型超声波清洗器, 昆山市禾创市超声仪器有限公司; XS105 Dual Range 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

猕猴桃根多糖提取物(A PPS), 自制; D-无水葡萄糖对照品(批号 110833-200503), 中国药品生物制品检定所; 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 其他所用化学试剂均系分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 显色液的配制^[4,5]: 配制 4.5% 的 NaOH 溶液与 1.0% 的 DNS 溶液适量, 取 4.5% NaOH 溶液 300 mL, 加入 1.0% DNS 溶液 880 mL 及酒石酸钾钠 255 g, 使溶解, 得试液 A。配制 10% NaOH 溶液, 量取 22 mL, 加入还原的结晶苯酚 10 g, 加水使

之溶解, 定容至 100 mL, 量取 69 mL 加入 6.9 g Na_2SO_3 使之溶解, 得试液 B。将试液 B 注入试液 A 中, 使之完全溶解后, 储于棕色试剂瓶中; 在室温下, 放置 7~10 d, 即得。

2.1.2 对照品溶液的配制: 精密称定 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品约 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 蒸馏水溶解完全后, 稀释定容, 混匀(质量浓度约 1.0 mg/mL), 置 4 °C 冰箱保存备用。

2.1.3 还原糖供试品溶液的配制: 精密称定 APPS 粉末约 30 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加适量蒸馏水使其溶解完全, 并用蒸馏水稀释定容, 摇匀, 滤过, 弃初滤液, 取续滤液, 备用。

2.1.4 总糖供试品溶液的配制: 精密称定 APPS 粉末约 20 mg, 置 50 mL 磨口三角瓶中, 加盐酸溶液 13.5 mL, 置沸水浴中 60 min, 取出自然冷却后, 加 40% NaOH 溶液调 pH 值至 7.0, 移入 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释定容, 摇匀, 滤过, 弃初滤液, 取续滤液, 备用。

2.2 标准曲线的绘制: 精密移取 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL 对照品浓溶液至 25 mL 量瓶, 加蒸馏水稀释定容, 再分别精密移取 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 DNS 试液 1.5 mL, 沸水浴 60 min, 自然冷却, 定容; 另取蒸馏水 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 同上操作, 为空白对照, 在 480 nm 处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度对相应的葡萄糖显色后的吸光度值进行线性回归, 结果回归方程为 $A = 22.86 C - 0.276$, $r = 0.9998$ 。结果表明葡萄糖在 18.05~72.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

①收稿日期: 2009-12-12

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(300431); 浙江省科技厅重点项目(2008C23068); 浙江省中医药管理局项目(2003KF001, 2007CA114)

作者简介: 吴瑾瑾(1973-), 女, 浙江义乌人, 副主任中药师, 研究方向: 中药制剂新技术与医院制剂研究。E-mail: hzbjwj@163.com

* 通讯作者 石森林 T el: 0571-86613524 E-mail: pjstone@163.com

2.3 精密度试验:精密移取 5.0 mL 对照品浓溶液至 25 mL 量瓶,加蒸馏水稀释定容,再分别精密移取 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加 DNS 试液 1.5 mL,沸水浴 60 min,自然冷却,定容,在 480 nm 处测定吸光度,依法重复测定 6 次。记录吸光度,计算得 RSD 为 0.20%。精密移取还原糖和总糖供试品溶液 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中,同上操作,结果 RSD 分别为 0.07%、0.15%。

2.4 稳定性试验:精密移取还原糖供试品溶液、总糖供试品溶液各 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中,按照以上显色操作,分别在 0、20、40、60、80、100、120 min 测定吸光度,计算得 RSD 分别为 2.01%、0.57%。

2.5 重现性试验:精密量取 APPS 粉末 6 份(约 30 mg),置 25 mL 量瓶中,加适量蒸馏水使其溶解完全,并用蒸馏水稀释定容,摇匀,滤过,弃初滤液,取续滤液,按照以上还原糖显色操作,在 480 nm 测定吸光度,计算还原糖的质量分数为 6.04%,RSD 为 0.56%。

精密称定 APPS 样品粉末 6 份(约 20 mg),按总糖供试品溶液的配制项下配制溶液,精密称取 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中,以上总糖显色操作,计算得总糖的质量分数为 55.52%,RSD 为 1.00%。

2.6 回收率试验:精密称定 APPS 样品粉末 9 份(约 20 mg),置 25 mL 量瓶,分成 3 组后按多糖量的 80%、100%、120% 分别加入葡萄糖对照品 8.0、10.0、11.5 mg,加适量蒸馏水使其溶解完全,并用蒸馏水稀释定容,摇匀,滤过,弃初滤液,取续滤液,按照以上还原糖显色操作,计算,结果平均回收率为 97.86%,RSD 为 1.50%。

精密称定 APPS 样品粉末 9 份(约 10 mg),置 50 mL 量瓶,分成 3 组后按多糖量的 80%、100%、120% 分别加入葡萄糖对照品 8.1、10.0、12.6 mg,按照以上总糖显色操作,计算,结果平均回收率为 97.29%,RSD 为 1.76%。

2.7 样品测定:取 3 批 APPS 适量,精密称定,配制还原糖供试品溶液和总糖供试品溶液,精密移取溶液 2.0 mL 分置 10 mL 量瓶中,显色,在 480 nm 测

定吸光度,同时按标准曲线的绘制项操作,测定,以标准曲线法定量,计算 APPS 粉末中的总糖、单糖,结果见表 1。

表 1 猕猴桃根中多糖的测定结果($n=3$)

Table 1 Polysaccharides in *Actinidia Chinensis Radix* ($n=3$)

批次	总糖/ %	单糖/ %	多糖/ %
1	58.75	6.94	51.81
2	58.31	7.02	51.29
3	58.07	6.81	51.26

3 讨论

植物多糖常用苯酚-硫酸法与硫酸-蒽酮法测定,但该两种方法均不能排除单糖的干扰,而且浓硫酸遇水剧烈放热,从而导致显色条件难以控制,影响测定结果,浓硫酸具有严重的腐蚀性,不便操作^[6],因此本实验采用 DNS 法测定猕猴桃根中多糖。

由于单糖是还原糖,还原糖在碱性条件下加热被氧化成醛酸等产物,DNS 则被氧化成棕红色的产物。在一定的浓度范围内,还原糖的质量浓度与棕红色物质的颜色深浅成正比,在一定波长条件下测定吸光度,根据标准曲线计算还原糖;然后用酸水解法使其降解成还原性单糖,再测定样品中总糖,总糖的量减去还原糖的量即得多糖。

实验考察了猕猴桃根多糖的水解条件、DNS 用量与检测波长,结果发现,APPS 量与盐酸量按照 1 mg:1.5 mL 比例,加热(沸水浴)时间 60 min 较好;DNS 用量以 1.5 mL 为宜,480 nm 作为检测波长。

- 参考文献:
- [1] 吴瑾瑾,石森林,张小寅,等.浙产猕猴桃属植物根、茎、叶中多糖的比较[J].中草药,2006,37(7):1099-1100.
 - [2] 杨艳杰,何弘水.猕猴桃根提取物抗氧化及保肝作用的研究[J].安徽农业科学,2008,36(19):8059-8061.
 - [3] 楼丽君,吕定量,胡增仁,等.猕猴桃根抗肿瘤作用研究[J].中国药理学通报,2007,23(6):808-811.
 - [4] 田芳年,马连荣,莫肖云,等.DNS 法测定红枣总糖含量[J].化工技术与开发,2009,38(9):45-47.
 - [5] 夏春森,韦史利,钟艳红.3,5-二硝基水杨酸比色法测定黄芪多糖的含量[J].中国民族民间医药,2009,18(8):13-14.
 - [6] 张莉,李海生,白虹珊.银耳孢糖胶囊中多糖的 3,5-二硝基水杨酸测定法及与硫酸-苯酚法的比较[J].天津药学,2008,20(3):14-17.