

于红梅,肖传刚,褚秀玲,等.淫羊藿多糖含量的测定方法[J].江苏农业科学,2015,43(8):314-315.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.104

淫羊藿多糖含量的测定方法

于红梅,肖传刚,褚秀玲,苏建青

(聊城大学农学院,山东聊城 252059)

摘要:采用苯酚-硫酸法对淫羊藿多糖含量进行测定。结果表明,淫羊藿粗多糖的平均得率为 5.81%,淫羊藿粗多糖中多糖的平均含量是 42.36%,淫羊藿中多糖平均含量为 2.46%。

关键词:淫羊藿;多糖;测定方法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0314-02

淫羊藿是小檗科淫羊藿属多年生草本植物,是我国传统中药之一,具有很高的药用价值,《本草纲目》记载:“茎、叶入药,辛温无毒,有坚筋骨、益精气、补腰膝、强心力等作用^[1]。”淫羊藿的主要有效成分为淫羊藿苷和淫羊藿多糖。有研究发现,多糖能控制细胞分裂和分化,调节细胞的生长与衰老,尤其在抗肿瘤、抗病毒、降血脂、增强免疫功能等方面的作用更明显^[2-3]。淫羊藿多糖是一种具有发展前景的免疫调节剂,本研究即通过苯酚-硫酸法测定淫羊藿多糖的含量^[4],为淫羊藿的应用提供有利的理论依据,并为多糖更深入的研究提供部分理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

HH-8 恒温水浴锅、RE52CS 旋转蒸发仪、B-220 恒温水浴锅、UV-1800 分光光度计、粉碎机、离心机、计时器、电子分析天平等。

淫羊藿干品(购自山东省聊城利民大药店)、浓硫酸、95%乙醇、苯酚、葡萄糖,均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 淫羊藿多糖标准曲线的建立 将 1.9 g 烘干的分析纯葡萄糖溶于 1 L 重蒸水中,制成 1.9 mg/mL 标准溶液^[5];然后取标准溶液 1、2、3、4、5、6、7、8 mL 分别用重蒸水稀释到 100 mL,制成浓度为 19、38、57、76、95、114、133、152 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液;取各浓度溶液 0.6 mL 置于干燥的洁净试管中,加入 50 mg/mL 苯酚溶液 1.2 mL,混合均匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,混合均匀,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min,于波长 490 nm 处测定吸光度^[6];重蒸水作为空白管对照。以糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标制得标准曲线。

1.2.2 粗多糖的提取与纯化 将购买来的淫羊藿干品粉碎过 40 目筛,制成淫羊藿干粉。称取 3 份淫羊藿干粉 5.00 g,置于 250 mL 容量瓶中,加入 125 mL 蒸馏水,浸泡 30 min,在

90 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 3 次,每次提取 2 h,离心,合并滤液,用旋转蒸发仪将提取液浓缩至 30 mL 左右,加入 95%乙醇,使得含醇量达到 70%,静置过夜,抽滤,室温恒温干燥,得到浅棕黄色的淫羊藿粗多糖固体,备用。

1.2.3 粗多糖的得率 将干燥得到的淫羊藿粗多糖称质量,减去滤纸的质量,计算可得淫羊藿粗多糖的得率。

1.2.4 样品溶液的制备 称取 0.19 g 淫羊藿粗多糖,溶解于 100 mL 容量瓶中定容,作为样品液。

1.2.5 精密度试验 精确吸取同一种样品溶液 4 mL,加水至 100 mL;再精确吸取上述样品液 0.6 mL,按照标准曲线方法操作,测吸光度,重复测定 5 次^[7-8]。

1.2.6 稳定性试验 精确吸取同一种样品溶液 4 mL,加水至 100 mL;再精确吸取上述样品液 0.6 mL,按照标准曲线方法操作,每隔 30 min 测 1 次吸光度^[7-8]。

1.2.7 重复性试验 精确吸取同一种样品溶液 4 mL,加水至 100 mL;再精确吸取上述样品液 0.6 mL,按照标准曲线方法操作,测吸光度,重复测定 5 次^[7-8]。

1.2.8 加样回收试验^[7-8] 精确吸取同一种样品溶液 4 mL,加水至 100 mL,精确吸取上述样品液 2 mL,分别加入浓度不同的葡萄糖标准溶液 2 mL;再精确吸取上述样品液 0.6 mL,按照标准曲线方法操作,测吸光度。

1.2.9 样品的含量测定 精确吸取样品溶液 4 mL,加水至 100 mL;再精确吸取上述样品液 0.6 mL,按照标准曲线方法操作,测吸光度。采用苯酚-硫酸法对淫羊藿多糖含量进行测定。

2 结果与分析

2.1 淫羊藿多糖测定方法的建立

通过对不同浓度葡萄糖标准溶液吸光度 D 的测定,结果显示不同浓度葡萄糖标准溶液与相应的吸光度 D 线性关系良好(图 1)。线性方程为 $y = 0.0057x + 0.0065$, $r^2 = 0.999$,表明葡萄糖浓度在 19 ~ 152 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.2 粗多糖的得率

将干燥得到的淫羊藿粗多糖称质量,减去滤纸的质量,计算可得淫羊藿粗多糖的得率(表 1),淫羊藿粗多糖得率的平均值为 5.81%。

收稿日期:2014-08-17

基金项目:聊城大学博士科研启动基金(编号:31805)。

作者简介:于红梅(1989—),女,山东淄博人,硕士研究生,主要从事动物疫病发生机理与防控研究。E-mail:914890749@qq.com。

通信作者:褚秀玲,副教授,硕士生导师,主要从事中兽药研究。

E-mail:chuxiul@163.com。

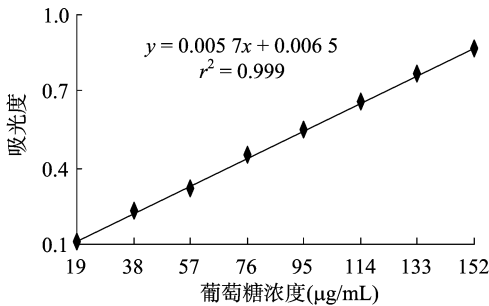


图1 葡萄糖标准品曲线

表 1 淫羊藿粗多糖的提取率

样品编号	滤纸质量 (g)	总质量 (g)	淫羊藿粗 多糖质量 (g)	淫羊藿 粗多糖得率 (%)
1	0.538 4	0.827 9	0.289 5	5.79
2	0.526 5	0.817 5	0.291 0	5.82
3	0.525 5	0.817 0	0.291 5	5.83

2.3 精密度试验

精密度试验结果如表 2 所示,样品 1、样品 2、样品 3 的 RSD 分别为 0.42%、0.37%、0.45%,表明精密度满足试验要求。

表 2 样品测定的精密度试验结果

样品 编号	吸光度					RSD (%)
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次	
1	0.195	0.199	0.189	0.197	0.191	0.42
2	0.205	0.203	0.197	0.203	0.207	0.37
3	0.170	0.168	0.174	0.177	0.166	0.45

2.4 稳定性试验

稳定性试验结果如表 3,样品 1、样品 2、样品 3 在 150 min 内的稳定性 RSD 分别为 0.49%、0.38%、0.44%,即试验在 150 min 之内稳定性良好。

表 3 样品测定的稳定性试验结果

样品 编号	吸光度						RSD (%)
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	
1	0.195	0.197	0.202	0.189	0.202	0.198	0.49
2	0.205	0.201	0.196	0.207	0.202	0.203	0.38
3	0.170	0.168	0.164	0.173	0.177	0.172	0.44

2.5 重复性试验

重复性试验结果如表 4,样品 1、样品 2、样品 3 的 RSD 分别为 0.37%、0.34%、0.36%,表明重复性良好。

表 4 样品测定的重复性试验

样品 编号	吸光度					RSD (%)
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	
1	0.195	0.192	0.197	0.195	0.202	0.37
2	0.205	0.202	0.196	0.199	0.202	0.34
3	0.170	0.169	0.175	0.166	0.172	0.36

2.6 加样回收试验

按照标准曲线方法操作测得吸光度,结果如表 5,加样回收率的平均值为 99.21%,说明该试验方法可行。

表 5 样品测定的加样回收试验

葡萄糖浓度 (μg/mL)	样品浓度 (μg/mL)	理论含糖量 (μg)	吸光度	计算得含 糖量(μg)	回收率 (%)
38	76	57.0	0.330	56.75	99.57
57	76	66.5	0.386	66.59	100.10
76	76	76.0	0.432	74.65	98.20
95	76	85.5	0.488	84.47	98.80
114	76	95.0	0.543	94.10	99.10
1 331	76	104.5	0.599	103.90	99.50

2.7 样品的含量测定

通过应用苯酚-硫酸法对淫羊藿多糖含量进行测定,结果如表 6 所示,测得淫羊藿粗多糖的平均得率为 5.81%,淫羊藿粗多糖中多糖的平均含量是 42.36%,淫羊藿中多糖平均含量为 2.46%。

表 6 样品含量测定

样品编号	吸光度	淫羊藿粗多糖中 多糖含量(%)	淫羊藿中 多糖含量(%)
1	0.195	43.51	2.52
2	0.205	45.82	2.67
3	0.170	37.74	2.20

3 结论

采用苯酚-硫酸法对淫羊藿多糖含量进行测定,测得淫羊藿粗多糖的平均得率为 5.81%,淫羊藿粗多糖中多糖的平均含量是 42.36%,淫羊藿中多糖平均含量为 2.46%。淫羊藿中的主要成分是淫羊藿苷和淫羊藿多糖,因此,对于淫羊藿多糖含量进行测定是评价其质量的标准之一,为淫羊藿的应用提供更有利的理论依据,同时也为多糖的研究提供部分理论基础。本试验采用水提醇沉法提取淫羊藿多糖,该方法简单、易操作,并对提取的多糖进行醇沉纯化,使得结果更准确。通过精密度试验和加样回收试验结果可知,苯酚-硫酸法方法可靠、重复性高、显色性稳定性较好等,适合作为淫羊藿多糖含量的测定方法。

参考文献:

[1]陈 旋,张 翼,张剑波. 植物多糖的研究进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(13):1000-1005.
[2]郭宝林,罗崇念,肖培根. 淫羊藿多糖研究进展[J]. 中国中药杂志,1998,23(7):52-53.
[3]苟春林,张 艳,李 健. 宁夏枸杞多糖的提取分离与组成[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):246-247.
[4]徐晓飞,陈 健. 多糖含量测定的研究进展[J]. 食品科学,2009,30(21):443-448.
[5]刘宝岩. 淫羊藿多糖提取方法的优化[J]. 广西轻工业,2009,25(12):7-8,23.
[6]柳凤祥,张万福. 淫羊藿多糖的超声波提取与含量测定研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2008,39(4):533-535.
[7]胡 涛,黎云祥. 四川淫羊藿多糖的含量测定[J]. 西华师范大学学报:自然科学版,2006,27(4):400-402.
[8]王 超,张曜武. 改良-差示酚磺法的建立及对淫羊藿多糖的含量测定[J]. 西北药学杂志,2011,26(4):257-259.