

“永生源”铁皮石斛中多糖含量 测定方法的比较研究*

□刘宏源** 杨金燕 (广东永生源生物科技有限公司 饶平 515736)

黄松 黄斌 赖小平**

(广州中医药大学新药研究与开发中心 广州 510006)

摘要:目的:筛选铁皮石斛中多糖含量测定的最佳方法。方法:分别采用苯酚-浓硫酸比色法和3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)测定铁皮石斛中多糖的含量。结果:苯酚-浓硫酸法测定铁皮石斛中多糖含量偏高。结论:DNS法较为适合铁皮石斛中多糖含量测定,且所建立的方法操作简便、稳定、可重复,可用于铁皮石斛药材及其多糖类保健品的质量控制。

关键词:铁皮石斛 多糖 苯酚-浓硫酸比色法 3,5-二硝基水杨酸比色法 含量测定

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.05.024

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是兰科石斛属多年生附生草本植物,又名黑节草,为石斛药材中的上品,是我国传统名贵中药材之一,以味甘、质重、柔韧和粘性大者为佳。具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功效。铁皮石斛的有效成分主要是铁皮石斛多糖,且含量高,现代药理研究表明,铁皮石斛多糖具有较强的抗肿瘤、提高免疫功能和延缓衰老的作用^[1-4],是一种有价值的中药类免疫增强剂^[5]。

多糖类成分的含量测定方法大体分为色谱法和比色法。前者利用凝胶色谱技术,特点是结果准确但费用较高;后者经常使用的方法有苯酚-浓硫酸法,蒽酮-浓硫酸法和3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS

法)。在20世纪90年代,美国公职分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)将苯酚-浓硫酸法列为标准方法,但比色法中,前两种方法只能测定总糖含量而不能分别测出单糖与多糖的含量。与前两种方法相比较,DNS法的特点是在偏碱性条件下可以分别与还原糖及多糖水解的还原糖发生显色反应,故可以准确测定还原糖与总糖的含量从而求出多糖类成分的含量。到目前为止,未有关于采用DNS法测定铁皮石斛中多糖含量的文献报道。本文采用了苯酚-浓硫酸法和DNS法分别对铁皮石斛多糖含量进行测定,对两种方法进行了方法学考察,并对两种方法测得多糖含量的结果进行比较。

一、实验材料

1. 仪器与试剂

收稿日期: 2010-05-27

修回日期: 2010-06-17

* 广东省科技厅中药现代化专项(K5080016):砂仁等10种岭南药材规范化种植(养殖)关键技术研究,负责人:徐鸿华。

** 联系人:刘宏源,本科,主要研究方向:中药资源与开发,Tel:0768-8623338,E-mail:yongshengyuan@vip.163.com;赖小平,本刊编委,教授,博士生导师,广州中医药大学中药学院院长,主要研究方向:中药新药研究与开发,Tel:020-39358045,E-mail:lxp88@gzhtcm.edu.cn。

Thermo Helios γ 紫外-可见分光光度计(美国热电公司)。无水葡萄糖为中国药品生物制品检定所提供(批号:0833-9501),3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂为上海润捷有限公司产品;其它试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2. DNS 试液的配制

将 6.3g DNS 和 262mL $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液加到 500mL 含有 182g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加 5g 重蒸苯酚和 5g 无水亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后移入于 1000mL 容量瓶并用蒸馏水定容至刻度,混匀,贮于棕色瓶中,于暗处放置 7d 后使用。

3. 5% 苯酚溶液的配制

取苯酚 100g,加铝粉 0.1g 和碳酸氢钠 0.05g,常压蒸馏,收集 182°C 馏分。称取该馏分 5.0g,置 100mL 容量瓶中,加新鲜蒸馏水稀释至刻度,摇匀后,滤过至棕色试剂瓶中,得 5% 苯酚溶液(临用配制)。

4. 药材

鲜品铁皮石斛样品 3 批,两年生,由广东永生源生物科技有限公司提供,并经广州中医药大学陈健南研究员鉴定。

二、方法与结果

1. 苯酚-浓硫酸法

(1) 供试品溶液的制备。

取鲜品铁皮石斛,剪成不超过 3mm 的小段,研碎,混合均匀,取约 2.0g,精密称定,置 250mL 圆底烧瓶中,加水 200mL 加热回流 2h,放冷,转移至 250mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2mL,置 15mL 离心管中,精密加入无水乙醇 10mL,摇匀,冷藏 1h,取出,4000rpm 离心 20min,弃去上清液,沉淀加 80% 乙醇洗涤两次,每次 8mL,离心,弃上清液,沉淀加热水溶解,转移至 25mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得。

(2) 标准曲线的制备。

取 105°C 干燥至恒重的葡萄糖对照品约 9.0mg,精密称定,置 100mL 量瓶中,加水适量使溶解并加水稀释至刻度,摇匀。精密量取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 分别置 10mL 具塞试管中,各加水至 1.0mL,精密加入 5% 苯酚溶液 1.0mL,摇匀,再精密加硫酸 5.0mL,摇匀,置沸水浴中加热 20min,取出,置冰浴中冷却 5min,以相应试剂为空白,按紫外-可见分光光度法(中国药典 2005 年版一部附录 V A)^[6],在

488nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。得线性回归方程: $Y=9.6468X-0.0522$, $r=0.9999$ 。表明葡萄糖浓度在 $18.12\sim90.06\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

(3) 显色稳定性试验。

精密量取葡萄糖对照品 0.6mL,加水至 1.0mL,按标准曲线项下方法操作,每隔 30min 测定吸光度。结果 RSD 为 0.05%,表明该显色在 3h 内稳定。

(4) 精密度试验。

取同一供试品溶液,依法重复测定吸光度, RSD 为 0.06%($n=6$)。结果表明精密度良好。

(5) 重复性试验。

取同一批次样品 6 份,按样品测定方法测定,计算多糖含量,结果多糖含量的 RSD 为 2.13%,表明方法重复性良好。

(6) 样品的测定。

取各批鲜品铁皮石斛样品约 2.0g,精密称定,按上述方法制备成供试品溶液。精密量取 1.0mL 置具塞试管中,按标准曲线制备项下方法,自“精密加入 5% 苯酚溶液 1.0mL”起,依法测定吸光度,从标准曲线上读取供试品溶液中无水葡萄糖的量,铁皮石斛多糖含量以无水葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)计,分别按鲜品和干燥品计算,结果见表 1。

2. 3,5-二硝基水杨酸(DNS 法)

(1) 供试品溶液的制备。

取鲜品铁皮石斛,剪成不超过 3mm 的小段,研碎,混合均匀,取约 4.0g,精密称定,置 100mL 圆底烧瓶中,加水 40mL 回流提取 2 次,每次 1h,乘热滤过,药渣继续加水 10mL 回流提取 1h,滤过,残渣加少量热水洗涤,合并滤液及洗涤液,冷却至室温,定容至 100mL,摇匀,备用。

(2) 还原糖供试品溶液的制备。

按上述方法制备。

(3) 总糖供试品溶液的制备。

精密量取上述供试品溶液 5.0mL,置 25mL 量瓶

表 1 苯酚-浓硫酸法测定铁皮石斛中多糖含量结果($n=3$, %)

样品编号	水溶性多糖 (以鲜品计)	水溶性多糖 (以干燥品计)	RSD
T ₀₉₁₂₀₆	4.26	29.73	1.45
T ₀₉₁₂₀₆	5.15	31.52	1.32
T ₀₉₁₂₀₆	3.51	29.54	1.24

中,加盐酸(1→2)10mL,置沸水浴中 40min,取出放冷后,加入酚酞一滴,摇匀,加 40%氢氧化钠溶液调 PH 至微红色,流水冷却至室温,加水定容至刻度,摇匀,备用。

(4)标准曲线的制备。

取 105℃干燥至恒重的无水葡萄糖对照品约 50mg,精密称定,置 50mL 量瓶中,加水适量使溶解并加水稀释至刻度,摇匀。精密量取对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0mL 分别置 10mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密量取以上系列对照品溶液各 2.0mL,分别置 25mL 量瓶中,各精密加入 DNS 试剂 6.0mL,置沸水浴中加热 15min,流水冷却至室温,加水稀释至刻度,以相应试剂为空白。按紫外-可见分光光度法(中国药典 2005 年版一部附录 V A),在 520nm 的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。得线性回归方程: $Y=1.6775X-0.1091$, $r=0.9997$,表明葡萄糖浓度在 $0.1\sim 0.8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

(5)稳定性试验。

分别精密量取还原糖和水溶性总糖供试品溶液 2.0mL,按上述方法测定,间隔 30min 测定 1 次,连续测定 3h,测得还原糖和水溶性总糖的吸光度的 RSD 分别为 0.08%和 0.10%,表明还原糖和水溶性总糖供试品溶液在 3h 内稳定。

(6)精密度试验。

取同一供试品溶液,依法重复测定 6 次,记录吸光度,计算 RSD 为 0.10%,表明仪器精密度良好。

(7)重复性试验。

取同一批次样品 6 份,按上述方法分别制备还原糖和总糖供试品溶液,进行测定,还原糖和水溶性总糖含量的 RSD 分别为 1.10%和 1.20%。表明该方法重复性良好。

(8)加样回收率试验。

取同一批已知含量鲜品铁皮石斛样品约 2.0g,精密称定,分别精密加入葡萄糖对照品 15、80、

160mg,按上述方法制备所需供试品溶液,进行测定,计算回收率。还原糖和总糖的低、中、高 3 个加入量的回收率($n=3$)分别为 101.18%(RSD=0.59%)、98.05%(RSD=0.91%)、103.18%(RSD=1.65%)和 99.93%(RSD=0.32%)、100.59%(RSD=0.65%)、101.84%(RSD=1.39%)。符合测定要求。

(9)样品测定

取约 4.0g 各批次鲜品铁皮石斛样品,精密称定,按上述方法制备成还原糖和总糖供试品溶液。精密量取上述还原糖和总糖供试品溶液各 2.0mL,置 25mL 量瓶中,按标准曲线制备项下的方法,依法测定吸光度,从标准曲线上读出供试品溶液中葡萄糖的量,铁皮石斛多糖含量以无水葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)计,分别按鲜品和干燥品计算,结果见表 2。

多糖含量(%)=总糖含量(%) - 单糖含量(%)

三、讨 论

从方法学考察结果看,两种测定方法均具有精密密度、重复性、稳定性良好,操作简便等特点。理论上均具有可行性。但从 3 批样品多糖测定的结果可以看出,苯酚-浓硫酸法测得的结果(以干燥品计)分别为 29.73%、31.52%、29.54%,而 DNS 法分别为 23.45%、29.19%、20.15%,苯酚-浓硫酸法测得的结果明显高于 DNS 法,这主要是由于两种测定方法测定原理不同造成的。DNS 法是在偏碱性条件下分别与还原糖及多糖水解的还原糖发生显色反应,通过准确测定还原糖与总糖的含量,从而求出多糖类成分的含量;而苯酚-浓硫酸法只能测定总糖含量而不能分别测出单糖与多糖的含量。苯酚-浓硫酸法测定过程中,为了去除单糖及其它小分子化合物对测定结果的干扰,通过水提醇沉的方法进行处理。但通过与 DNS 法的测定结果比较分析,猜测其中仍有单糖成分去除不完全,有残留,最终使得测定结果偏高。苯酚-浓硫酸法中使用的浓硫酸,具有严重的腐蚀性,给实验操作带来极大的不便。

综合比较分析,作者认为 DNS 法应用于测定铁皮石斛中的多糖含量具有更大的优势。DNS 法所需仪器简单、操作方便,成本低,结果准确可靠等特点适合于铁皮石斛及其制剂的质量控制。

参考文献

- 1 王世林,郑光植,何静波,等.黑节草多糖的研究.云南植物研究,

表 2 DNS 法测定铁皮石斛中多糖含量结果($n=3$,%)

样品编号	水溶性多糖 (以鲜品计)	水溶性多糖 (以干燥品计)	RSD
T ₀ 91206	3.37	23.45	2.45
T ₁ 091206	4.75	29.19	1.72
T ₂ 091206	2.27	20.15	2.64

- 1988,10(4):389.
- 2 杨虹,王顺春,王峥涛,等.铁皮石斛多糖的研究.中国药学杂志,2004,39(4):254~256.
- 3 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等.铁皮石斛原球茎多糖 DCP1a-1 的理化性质及抗肿瘤活性.天然产物研究与开发,2007,19(3):578~583
- 4 张红玉,戴关海,马翠,等.铁皮石斛多糖对 S180 肉瘤小鼠免疫功能的影响.浙江中医杂志,2009,44(5):380~381
- 5 高建平,金若敏,吴耀平,等.铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究.中药材,2002,25(7):487~489.
- 6 国家药典委员会.中华人民共和国药典.北京:化学工业出版社,2005.

Comparative Studies on Determination of Polysaccharide in *Dendrobium officinale*

Liu Hongyuan¹, Yang Jinyan¹, Huang Song², Huang Bin², Lai Xiaopin²

(1. Guangdong Yongshengyuan Biological Technology Co., Ltd., Raoping 515736, China;

2. New Drug R&D Center, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This work aimed to select a better assay method for polysaccharide in *Dendrobium officinale*. Phenol-sulfuric acid colorimetry and 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry (DNS) were respectively adopted to determine water-soluble polysaccharide. The content of polysaccharide determined by phenol-sulfuric acid colorimetry was higher than by 3, 5-dinitrosalicylic acid colorimetry. The results showed that 3, 5-dinitrosalicylic acid colorimetry is more suitable for the determination of polysaccharide in *D. officinale*. This method has been proven to be simple, stable and repeatable, thus may be used for the quality control of crude *D. officinale* and medical care preparations containing polysaccharide extracted from *D. officinale*.

Keywords: *Dendrobium officinale*, Polysaccharide, Phenol-sulfuric acid colorimetry, 3, 5-Dinitrosalicylic acid colorimetry, Content determination

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立巍)