

文章编号:1000-582X(2005)10-0111-04

## 浮萍多糖总糖含量测定与评价\*

周菁,王伯初,王阳

(重庆大学生物工程学院 教育部生物力学与组织工程重点实验室,重庆 400030)

**摘要:**草本植物浮萍中提取的多糖类化合物经实验证明具有免疫增强活性.探索浮萍多糖提取物总糖含量的测定方法并对该方法进行评价,同时将其用于浮萍多糖生产制备中的质量控制.采用分光光度法,分别经苯酚-硫酸和蒽酮-硫酸显色,测定浮萍多糖提取物中的总糖含量,并通过线性和范围、精密度、稳定性和准确度等指标评价该方法.实验结果显示苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法测浮萍多糖所需设备简单、操作快速、结果稳定、灵敏度高,可将其作为浮萍多糖提取物中总糖含量测定的有效方法.

**关键词:**浮萍;多糖;含量测定;评价

**中图分类号:**R282.71

**文献标识码:**A

浮萍(*Herba Spirodela seu Lemnae*)为浮萍科植物紫背浮萍(*Spirodela Polyrhiza* (L.) Schleid.)或青萍(*Lemna minor* L.)的全草,在中国各地分布广泛、资源丰富,作为传统中药入药.浮萍多糖<sup>[1-2]</sup>是本研究组从浮萍中提取的主要水溶性成分,经初步药效学试验,发现浮萍多糖能够明显改善环磷酰胺致免疫力低下KM小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的功能,并显著提高健康KM小鼠的碳粒廓清能力,提示浮萍多糖是一种很有发展前景的免疫调节剂原料药.笔者采用硫酸-苯酚法和硫酸-蒽酮法对浮萍多糖中的有效部位即总糖的含量进行了测定,并通过线性和范围、精密度、稳定性和准确度等指标对两种方法进行了评价和比较.

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料和主要仪器

浮萍药材购自太极集团沙坪大药房,重庆大渡口中药材公司中药饮片厂,产地四川,经紫外光谱鉴别为紫萍*Spirodela Polyrhiza* (L.) Schleid.的干燥全草;重蒸苯酚(北京鼎国生物技术发展中心),葡聚糖(上海化学试剂公司,分子量2万),其余试剂均为分析纯,实验用水为单蒸水、三蒸水和去离子水;电子分析天平(上海恒平科学仪器有限公司),756MC紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司).

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 浮萍多糖的提取分离

取粉碎后的浮萍药材,以1:20的料水比加水,NaOH调pH至9,沸水提取2次.合并滤液,减压浓缩,滴加10%三氯乙酸至pH 2~3,5~10℃静置过夜后离心取上清,超滤(截留分子量6000),取浓缩液加入4倍体积无水乙醇,冷藏静置后取沉淀,将沉淀溶于水,重复醇沉操作6次,取沉淀溶解后冷冻干燥得浅棕色浮萍多糖粉末<sup>[3-4]</sup>.

##### 1.2.2 苯酚-硫酸法测定总糖含量

1) 最大吸收波长的选择:精密吸取一定浓度的样品溶液1.0 mL加入具塞试管,补水至2.0 mL,精密加入6%重蒸酚溶液1.0 mL,迅速加入浓硫酸5.0 mL,盖上塞,摇匀,静置10 min后,置30℃水浴10 min,按分光光度法在380~580 nm波长范围内测定吸光度,确定其最大吸收波长,得 $\lambda_{\max} = 485 \text{ nm}$ <sup>[5-8]</sup>.

2) 标准曲线的制备:精密称取105℃干燥至恒重的葡聚糖对照品100.0 mg,置1 L容量瓶中,加水适量使溶解,稀释至刻度,摇匀,得0.1 g/L葡聚糖对照品溶液.精密吸取0.20 mL,0.40 mL,0.60 mL,0.80 mL,1.00 mL,1.20 mL,1.40 mL上述溶液加入具塞试管,

\* 收稿日期:2005-05-21

作者简介:周菁(1978-),女,重庆人,重庆大学博士研究生,主要从事天然药物化学方向研究.

补水至 2.0 mL,照 1)项下自“精密加入 6%重蒸酚溶液 1.0 mL”起,依此方法于 485 nm 处测定吸光度,同样处理蒸馏水为空白.以吸光度为纵坐标,糖的含量微克数为横坐标,得标准曲线,经计算回归方程为  $A = 0.0522C - 0.0932$ ,  $r = 0.9997$  ( $n = 7$ ),葡聚糖浓度在 2.51 ~ 17.57  $\mu\text{g/mL}$  范围内与吸光度呈良好的线性关系.

3) 样品测定:精密称取样品 50.0 mg,置 250 mL 容量瓶中,加水适量使其溶解,稀释至刻度,摇匀.精密吸取上述溶液 1.0 mL 加入具塞试管,补水至 2.0 mL,照 1)项下自“精密加入 6%重蒸酚溶液 1.0 mL”起,依法测定吸光度,随行空白,计算.

### 1.2.3 蒽酮-硫酸法测定总糖含量

1) 最大吸收波长的选择:精密吸取一定浓度的样品溶液 0.5 mL 加入具塞试管,补水至 1.0 mL,精密加入 4.00 mL, 2 g/L 的蒽酮试剂(2 g 蒽酮溶于 1 L 浓硫酸),迅速浸于冰水浴中冷却,各管加完后一起浸于沸水浴中,盖上塞,自水浴重新煮沸起,准确煮沸 10 min 后立即取出,用自来水冷却,在暗处室温放置 10 min 后于 520 ~ 720 nm 波长范围内测定吸光度,确定其最大吸收波长,得  $\lambda_{\text{max}} = 625 \text{ nm}$ <sup>[5,9]</sup>.

2) 标准曲线的制备:精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡聚糖对照品 100.0 mg,置 1 L 容量瓶中,加水适量使溶解,稀释至刻度,摇匀,得 0.1 g/L 葡聚糖对照品溶液.精密吸取 0.05 mL, 0.10 mL, 0.20 mL, 0.30 mL, 0.40 mL, 0.60 mL, 0.80 mL 上述溶液加入具塞试管,补水至 1.0 mL,照 1)项下自“精密加入 4.00 mL, 2 g/L 的蒽酮试剂”起,依法于 625 nm 处测定吸光度,同样处理蒸馏水为空白.以吸光度为纵坐标,糖的含量微克数为横坐标,得标准曲线,经计算回归方程为  $A = 0.0357C - 0.0081$ ,  $r = 0.9977$  ( $n = 7$ ),葡聚糖浓度在 2 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  范围内与吸光度呈良好的线性关系.

3) 样品测定:精密称取样品 50.0 mg,置 250 mL 容量瓶中,加水适量使溶解,稀释至刻度,摇匀.精密吸取上述溶液 1.0 mL 加入具塞试管,照 1)项下自“精密加入 4.00 mL, 2 g/L 的蒽酮试剂”起,依法测定吸光度,随行空白,计算.

### 1.2.4 测定方法的评价

1) 精密度及总糖含量计算:取供试品溶液,按样品测定方法操作,一次开机后重复测定吸光度 ( $n = 5$ ),计算相对标准差 RSD 得日内精密度;取供试液样品 ( $n = 5$ ) 置冰箱冷冻,自配制样品之日开始,按样品测定方法每天取出一份测定,计算相对标准差 RSD 得日间精密度.根据日内吸光度测定值计算总糖平均含量<sup>[10-11]</sup>.

2) 显色稳定性:取供试品溶液,按样品测定方法操作,每隔 5 min 测定一次吸光度,共测 10 次,观察吸光度有无明显变化.

3) 准确度:采用加样回收率实验.精密称取葡聚糖标准品 10.0 mg、15.0 mg、25.0 mg、35.0 mg、40.0 mg,分别置 250 mL 容量瓶中,加水适量使溶解,稀释至刻度.精密吸取 0.5 mL 已知含量的样品溶液,共 5 份,分别加入 0.5 mL 浓度不同的葡聚糖标准品溶液,摇匀.按样品测定方法测定吸光度,计算回收率平均值和相对标准差(RSD).按纯应用化学国际联合会(IUPAC)所推荐的加样回收率( $R$ )计算公式为:

$$R = [(M - P)/A] \times 100\%$$

式中, $P$  为一个已准确测定的药量; $M$  为( $A + P$ )药量混合后进行回收实验所得测定值的均值; $A$  为标准品加入量.

## 2 实验结果

### 2.1 苯酚-硫酸法测定样品

1) 精密度试验及样品总糖平均含量.精密度试验结果见表 1.

表 1 苯酚-硫酸法精密度试验结果

精密度	吸光度				均值	RSD/%	
日内精密度	0.571	0.609	0.620	0.583	0.641	0.605	4.7
日间精密度	0.586	0.621	0.544	0.559	0.593	0.581	10.4

样品总糖平均含量( $C$ )的计算公式为:

$$C = \frac{[(A + 0.0932)/0.0522]nV}{M} \times 100\%$$

式中, $A$  为日内吸光度测定均值; $n$  为稀释倍数; $M$  为待测样品质量,  $\mu\text{g}$ ;  $V$  为样品溶液的总体积, mL. 经计算样品总糖平均含量为 53.5%.

2) 显色稳定性试验:10 次吸光度测定值分别为 0.599、0.597、0.598、0.601、0.599、0.602、0.600、0.596、0.595、0.593, 40 min 内显色无明显变化.

3) 加样回收率试验:见表 2.

表 2 苯酚-硫酸法加样回收率试验结果

样品量/ $\mu\text{g}$	葡聚糖加入量/ $\mu\text{g}$	吸光度	测定值/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
53.5	20.0	0.369	70.9	87.0	86.6	0.99
	30.0	0.428	79.9	88.0		
	50.0	0.538	96.7	86.4		
	70.0	0.648	113.6	85.9		
	80.0	0.705	122.3	86.0		

### 2.2 蒽酮-硫酸法测定样品

1) 精密度试验及样品总糖平均含量.精密度试验结果见表 3.

表3 蒽酮-硫酸法精密度试验结果

精密度	吸光度				均值	RSD/%	
日内精密度	0.523	0.477	0.556	0.503	0.499	0.512	5.8
日间精密度	0.529	0.548	0.475	0.438	0.507	0.499	8.8

样品总糖平均含量(C)的计算公式为:

$$C = \frac{[(A + 0.0081)/0.0357]nV}{M} \times 100\%$$

式中, A 为日内吸光度测定均值; n 为稀释倍数; M 为待测样品质量,  $\mu\text{g}$ ; V 为样品溶液的总体积, mL. 经计算样品总糖平均含量为 36.4%.

2) 显色稳定性试验: 10 次吸光度测定值分别为 0.516、0.520、0.517、0.519、0.504、0.503、0.497、0.501、0.485、0.476, 15 min 内显色无明显变化.

3) 加样回收率试验: 见表 4.

表4 蒽酮-硫酸法加样回收率试验结果

样品量/ $\mu\text{g}$	葡聚糖加入量/ $\mu\text{g}$	吸光度	测定值/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	20.0	0.367	52.5	80.3		
	30.0	0.427	60.9	81.6		
36.4	50.0	0.547	77.7	82.6	80.7	1.7
	70.0	0.652	92.5	80.2		
	80.0	0.703	99.6	79.0		

### 3 讨论

#### 3.1 测定方法的建立

总糖含量测定是多糖类药物质量控制的重要指标,也是保证其样品的稳定性的可靠依据. 浮萍多糖总糖含量测定包括浮萍多糖提取物中的大部分多糖和少量低聚糖、单糖的测定. 在对多糖和低聚糖的测定进行测定时,因得到相应的多糖和低聚糖对照品较困难,尤其当多糖组成不明或较复杂时,往往以测定其水解产物单糖来表示总糖的相对含量.

笔者选用了苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法两种方法进行浮萍多糖总糖含量测定研究,其基本原理是,糖类与强酸加热产生糠醛或糠醛衍生物,然后通过显色剂缩合成有色络合物,再进行比色定量<sup>[6]</sup>. 发色反应的机理迄今尚未了解,因而进行总糖定量分析时的操作条件有其经验性,应根据待检测的糖类的类型和实验条件选择适当的分析方法.

苯酚-硫酸试剂与糖类反应产生黄橙色,根据单糖组成的不同在 480~490 nm 处有最大吸收(戊糖和糖醛酸在 480 nm,己糖在 490 nm),全部糖类都可以参加反应. 蒽酮-硫酸试剂与糖类反应产生蓝绿色,在 620~625 nm 处有最大吸收,参与反应的糖类主要是己糖<sup>[6]</sup>. 本实验中用分光光度法测定总糖含量时,苯酚-硫酸和蒽酮-硫酸两种显色方法对样品总糖含量

测定结果的影响较大,这可能与浮萍多糖中的单糖组成有关. 另外,对同多糖进行含量测定时制作标准曲线宜用相应的标准多糖或用校正系数校正,而对杂多糖而言,应按其单糖比配制对照品溶液及主要单糖的标准曲线的校正系数加以校正计算<sup>[5]</sup>. 因为浮萍多糖的单糖组成尚未确定,故本实验含量测定方法有待进一步研究.

#### 3.2 测定方法的评价

生物样品含量测定方法在建立时应考虑主要的定量分析方法认证的分析参数,如线性度和线性范围、精密度、准确度和稳定性等<sup>[10-12]</sup>. 精密度是指用该方法测定同一匀质样品的一组测量值彼此符合的程度,通常以重复测定次数( $n \geq 5$ )的测定值的相对标准差(RSD)来表示,并可分为日内精密度和日间精密度,日内精密度应争取达到 5% 以内,不能超过 10%,日间精密度应控制在 15% 以内;准确度是指测得结果与真实值接近的程度,由于“真实值”无法准确知道,通常采用加样回收率试验来表示,其结果越接近 100% 表明分析方法准确度越高,但实际上往往达不到 100%,生物样品分析时一般控制回收率范围为 85%~115% (样品药浓  $\geq 200 \mu\text{g/L}$ ) 及 80%~120% (样品药浓  $< 200 \mu\text{g/L}$ )<sup>[13]</sup>,但只要每次测得的回收率稳定在某一水平上(甚至 50% 以上)时也可采用,回收率的 RSD 一般应为 2% 以内;线性度是在给定范围内获取与样品中供试物浓度成正比的试验结果的能力,目前广泛采用的表示方法是用标准曲线的相关系数( $r$ ),要求控制  $r \geq 0.990$ ;显色反应中生成的有色物质经过一段时间后可能因为发生沉淀或分解而影响显色的稳定,显色稳定性用于评估实验中供试样品的稳定显色时间<sup>[14]</sup>. 实验结果表明,苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法简单快速,显色稳定,精密度高,准确度较好,可以作为浮萍多糖总糖含量测定的有效方法. 将两种显色方法进行比较又可以发现,蒽酮试剂很不稳定,放置一段时间后就因氧化带有褐色,影响发色,故需当天配制,而苯酚-硫酸试剂虽也是临用现配,但相比之下更为稳定,操作也更简单,并且蒽酮-硫酸法反应条件控制较严,如反应温度、显色时间、试剂和溶液的初始温度等因素对显色状态的影响比苯酚-硫酸法更为明显.

#### 参考文献:

- [1] OVODOVA R G, GOLOVECHENKO VV, SHASHKOV A S, et al. Structure and Physiological Activity of Lemnan, Lemna Minor L. Pectin[J]. Bioorg Khim, 2000, 26(10): 743-751.
- [2] GOLOVECHENKO VV, OVODOVA R G, SHASHKOV A S,

- et al. Structural Studies of the Pectic Polysaccharide from Duckweed *Lemna Minor* L[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 89-97.
- [3] XU HX, LEE SHS, LEE S F, et al. Isolation and Characterization of an Anti-HSV Polysaccharide from *Prunella Vulgaris*[J]. *Antiviral Research*, 1999, 44: 43-54.
- [4] NAVARINI L, GILLI R, GOMBAC V, et al. Polysaccharides from Hot Water Extracts of Roasted *Coffea Arabica* Beans: Isolation and Characterization [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, (3): 71-81.
- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [6] 吴平. 食品分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1983. 159-165.
- [7] 汪显阳, 姚春艳, 张佩文. 六味地黄丸中多糖含量测定研究[J]. *中医药研究*, 2000, 16(4): 42-45.
- [8] 何进, 梁运祥, 阎淳泰. 枸杞多糖中中性糖的含量测定[J]. *中草药*, 1996, 27(2): 85-86.
- [9] MAZUMDER S, GHOSAL PK, PUJOL CA, et al. Isolation, Chemical Investigation and Antiviral Activity of Polysaccharides from *Gracilaria Corticata* (*Gracilariaceae*, *Phodophyta*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2002, 31: 87-95.
- [10] 刘文英. 药物分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [11] 刘昌孝. 药物评价实验设计与统计学基础[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2001.
- [12] 李晓晖, 李书平, 何云庆, 等. 灵芝多糖的含量测定研究[J]. *中草药*, 1997, 28(9): 530-531.
- [13] 曾经泽. 生物药物分析[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [14] 梁生旺, 刘伟. 中药制剂定量分析[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001.

## Determination and Evaluation of Saccharides Content in Extract of *Herba Spirodela* Seu *Lemnae* Polysaccharides

ZHOU Jing, WANG Bo-chu, WANG Yang

(College of Bioengineering, Chongqing University, Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering Under the State Ministry of Education, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** In the course of searching immunomodulators from natural herbal sources, the polysaccharide has been isolated from the water extract of duckweed (*Herba Spirodela* seu *Lemnae*). The authors aim at investigating the methods that determine the content of total saccharides in the mixture, accordingly, to be used as a quality control in the procedure of producing polysaccharides from duckweed. The contents of saccharides in the extraction were mensurated by spectrophotometry of sulphuric acid-phenol and sulphuric acid-anthrone. And the validity of methods was evaluated through some indexes such as linearity and range, precision, stability, and accuracy. The results reveal the methods are convenient, rapid, accurate, and high sensitive, thereby leading to a wide and effective use in determining the saccharides contents in polysaccharides extraction from *Herba Spirodela* seu *Lemnae*.

**Key words:** *Herba Spirodela* seu *Lemnae*; polysaccharides; content determination; evaluation

(编辑 陈移峰)