

苯酚-硫酸法测定三七枸杞酒中多糖含量

孔庆龙^{1,2,3}, 余汪平^{1,2,3}, 郭冬梅^{1,2,3}, 朱卓^{1,2,3}, 侯代松^{1,2,3}, 游燕^{1,2,3*}

(1. 云南省药物研究所, 昆明 650111; 2. 云南白药集团创新研发中心, 昆明 650111;
3. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111)

摘要: **目的** 建立三七枸杞酒中多糖含量的测定方法。**方法** 三七枸杞酒中的多糖经苯酚-硫酸法显色后, 利用紫外-可见分光光度计在 490 nm 波长处进行比色测定。**结果** 苯酚-硫酸法测定三七枸杞酒中多糖方法稳定, 精密度高, 线性范围为 0.02~0.1 mg/mL, 相关系数为 $r^2=0.9998$, 平均回收率为 99.89%。**结论** 苯酚-硫酸法可作为三七枸杞酒中多糖含量测定的方法。

关键词: 多糖; 三七枸杞酒; 苯酚-硫酸法; 含量测定

Determination of polysaccharide in the alcoholic drink of SanqiGouqi by phenol-sulfuric acid colorimetry method

KONG Qing-Long^{1,2,3}, YU Wang-Ping^{1,2,3}, GUO Dong-Mei^{1,2,3}, ZHU Zhuo^{1,2,3}, HOU Dai-Song^{1,2,3}, YOU Yan^{1,2,3*}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 2. Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center, Kunming 650111, China; 3. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of polysaccharide content in the alcoholic drink of SanqiGouqi. **Methods** The phenol-sulfuric acid colorimetry method was performed at wavelength of 490 nm with phenol-sulfuric acid as a color reagent. **Results** The phenol-sulfuric acid colorimetry method had stability and high precision for determination of polysaccharide in the alcoholic drink of SanqiGouqi. The good positive linear relationship was shown in the range of 0.02~0.1 mg/mL, the correlation coefficient (r^2) was 0.9998, and the average recovery rate of added samples was 99.89%. **Conclusion** The established method is suitable for determination of polysaccharide in the alcoholic drink of SanqiGouqi.

KEY WORDS: polysaccharide; alcoholic drink of SanqiGouqi; phenol-vitriolic colorimetry; content determination

1 引言

三七和枸杞作为中国传统的药用资源, 其功效被人们广泛认可。三七枸杞酒是以三七为主要原料, 结合其他中药材配伍泡制而成的一种保健酒。其主要功效成分为枸杞多糖、三七多糖及三七皂苷类。研究表明, 三七多糖具有免疫调节^[1-5]、抗氧化^[6,7]等功效; 枸杞多糖具有抗氧化

^[8-10]、免疫调节^[11]、抗疲劳^[12]、抗癌^[13]等功效。通过三七和枸杞的配伍, 使 2 种多糖之间产生相互加强和补充, 达到更好的保健功效。因此, 作为重要的功能成分, 多糖含量的检测也成为重要的工作。

利用紫外分光光度法测定多糖含量, 《中国药典》^[14]已有记载, 但对不同药材所用试剂和条件均不相同, 且没有针对泡制酒的检测方法, 直接检测会造成结果不准确。

*通讯作者: 游燕, 高级工程师, 主要从事药物分析和质量研究。E-mail: yy81221@ynby-yimm.com

*Corresponding author: YOU Yan, Senior Engineer, Yunnan Institute of Materia Medica, No.24, Lengshuitang, Bijie Town, Xishan District, Kunming 650111, China. E-mail: yy81221@ynby-yimm.com

本研究按照《中国药典》和相关文献^[15]中枸杞多糖的检测方法,采用苯酚-硫酸法测定三七枸杞酒中多糖含量,对醇沉时乙醇加入量、水浴时间进行优化,以标准曲线相关系数,吸光值的精密性、稳定性、重复性及回收率的比较,得到最佳的检测方法。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

三七枸杞酒(云南省药物研究所自制);无水葡萄糖、苯酚(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);浓硫酸(分析纯,广州化学试剂厂)。

AG285 型电子分析天平(瑞典梅特勒-托利多公司);水浴锅(江苏科析仪器有限公司);UV2501 紫外分光光度计(日本岛津公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 葡萄糖标准溶液的制备

称取无水葡萄糖对照品 10.0 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加适量水溶解后定容摇匀,即得 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液,备用。

2.2.2 供试样品的制备

量取 100 mL 三七枸杞酒样品,加入 4 倍体积的无水乙醇,剧烈振荡,过夜沉淀。离心取沉淀,真空冷冻干燥,将沉淀置于 100 mL 容量瓶中,加少量水溶解摇匀,定容至 100 mL。

2.2.3 标准曲线的绘制

分别量取葡萄糖标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于 20 mL 具塞比色管中,加水补至 1 mL,以蒸馏水为空白对照,加入 5% 苯酚溶液 1 mL,迅速加入浓硫酸 5 mL,混合均匀后沸水浴 20 min,冷却至室温。于 490 nm 波长处测定吸光度 A ,绘制标准曲线,得回归方程。

2.2.4 样品分析

量取供试品溶液 0.1 mL,置于 20 mL 具塞刻度试管中,按照 2.2.3 项下的方法,自“加水补至 1 mL”起,依法测定吸光度值,从标准曲线上读出供试品溶液中含葡萄糖的重量,计算,即得。

3 结果与分析

3.1 乙醇加入量的选择

苯酚-硫酸分光光度法是利用多糖在硫酸的作用下,水解成单糖分子,并迅速脱水生成糖醛衍生物,然后与苯酚形成有色化合物的原理来进行多糖检测,而白酒中本身就含有大量单糖会造成测量结果偏高,因此需要加入乙醇将多糖沉淀出来进行测定。

分别考察了加入 2、3、4、5 倍体积的无水乙醇对吸光值的影响,结果见表 1。

表 1 乙醇加入量对吸光值的影响

Table 1 Effect of ethanol volume on the absorbance

乙醇加入量/倍	吸光值
2	1.211
3	1.985
4	2.078
5	2.099

4 倍体积和 5 倍体积的乙醇加入量对吸光度影响区别不大,为节约原料,选择 4 倍体积乙醇加入量。

3.2 水浴时间

分别考察了保温时间为 15、20、25、30 min 对吸光度值的影响,结果见表 2。

表 2 水浴时间对吸光值的影响

Table 2 Effect of water bath time on the absorbance

水浴时间/min	吸光值
15	0.189
20	0.205
25	0.209
30	0.208

水浴时间对吸光度值的影响不明显,为了保证显色反应完全,且方便操作,选择 20 min 为供试品的水浴时间。

3.3 方法学考察

3.3.1 标准曲线的绘制

标准曲线回归方程 $Y=10.182X-0.0146$, $r^2=0.9998$,线性范围为 0.02~0.1 mg/mL,见图 1。

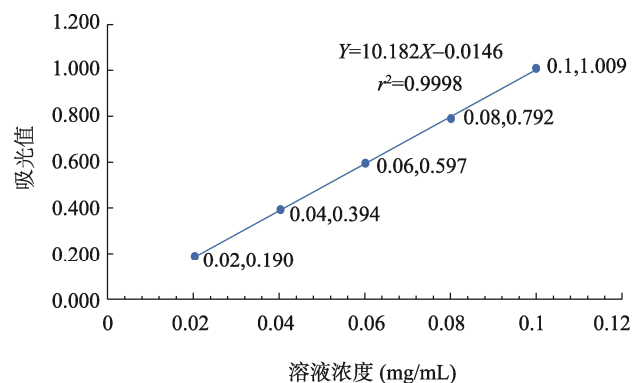


图 1 标准曲线

Fig. 1 Standard curve

3.3.2 精密度试验

吸取葡萄糖标准溶液 0.6 mL,以相应的溶剂为空白,按实验方法于 490 nm 处连续测定吸光度值 6 次,计算 RSD 值为 0.43%,说明仪器精密度良好,见表 3。

表 3 精密度试验
Table 3 Precision test

试验	吸光值
1	0.600
2	0.599
3	0.597
4	0.603
5	0.601
6	0.604
平均	0.601
RSD/%	0.43

3.3.3 稳定性试验

对同 1 份显色后的供试品, 在 490 nm 处, 分别放置 0、5、10、15、20、25、30 min 后按实验方法测定吸光度值, 计算 RSD 为 0.76%, 说明样品放置 30 min 稳定性良好, 见表 4。

表 4 稳定性试验
Table 4 Stability test

放置时间/min	吸光值
0	0.203
5	0.205
10	0.207
15	0.207
20	0.207
25	0.207
30	0.207
平均	0.206
RSD/%	0.76

3.3.4 重复性试验

取供试样品 5 份, 按实验方法于 490 nm 处测定吸光度, 计算 RSD 为 1.29%, 说明该方法的重复性良好, 见表 5。

表 5 重复性试验
Table 5 Repeatability test

样品	吸光值
1	0.203
2	0.199
3	0.206
4	0.201
5	0.203
平均	0.202
RSD/%	1.29

3.3.5 加样回收试验

精确移取供试样品 0.2 mL 于 3 支 20 mL 比色管内, 分别加入葡萄糖标准溶液 0.3、0.4、0.5 mL, 按实验方法于 490 nm 处测定吸光度, 结果见表 6。由表 6 可知, 该方法测定三七枸杞酒中多糖的回收率在 98.86%~101.26% 之间, 平均回收率为 99.89%, 方法准确度满足测定要求。

3.4 样品测定

取供试样品 5 份, 每份 0.1 mL, 按实验方法于 490 nm 处测定吸光度, 结果见表 7。由此可见, 每 100 mL 样品含多糖的量平均为 21.59 mg。

表 6 加样回收试验
Table 6 Recovery of added samples test

	本底值/mg	加标量/mg	吸光度	计算值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
低浓度	0.04	0.03	0.701	0.0703	100.94		
	0.04	0.03	0.699	0.0701	100.28	100.83	0.50
	0.04	0.03	0.702	0.0704	101.26		
中浓度	0.04	0.04	0.798	0.0798	99.52		
	0.04	0.04	0.797	0.0797	99.27	99.19	0.38
	0.04	0.04	0.795	0.0795	98.78		
高浓度	0.04	0.05	0.903	0.0901	100.24		
	0.04	0.05	0.896	0.0894	98.86	99.65	0.71
	0.04	0.05	0.901	0.0899	99.85		

表7 样品测定
Table 7 Determination of samples

样品	吸光度	多糖浓度/(mg/mL)	多糖含量/mg	平均含量(mg)
1	0.206	0.0217	21.67	
2	0.206	0.0217	21.67	
3	0.203	0.0214	21.4	21.59
4	0.208	0.0219	21.9	
5	0.202	0.0213	21.3	

4 结论

苯酚-硫酸法测定三七枸杞酒中多糖方法稳定, 精密度高, 线性范围为 0.02~0.1 mg/mL, 相关系数为 $r^2=0.9998$, 平均回收率为 99.89%。苯酚-硫酸法可作为三七枸杞酒中多糖含量测定的方法。在本研究试验条件下, 需先将酒中多糖用乙醇沉淀出来后进行测定, 乙醇加入量选择 4 倍、5 倍时对多糖沉淀程度影响不大, 为节约原料, 选择 4 倍体积的乙醇加入量。水浴时间在 15~30 min 范围内, 水浴温度和时间对吸光度值的影响不显著, 但是为了保证显色反应完全, 且方便操作加热时间为 20 min。

三七和枸杞作为中国传统的保健品和药食两用资源, 用来泡酒更是普遍的食用方法。随着人们健康观念的日益加强, 像三七枸杞酒这样的保健酒将会有广阔的市场前景, 多糖作为三七和枸杞中主要活性成分, 其含量检测必定成为产品质量检测的一项重要, 本研究为以后的产品检测提供了技术参考。

参考文献

- [1] Gao H, Wang F, Lien EJ, et al. Immunostimulating polysaccharides from *Panax notoginseng* [J]. *Pharm Res*, 1996, 13: 1196-1200.
- [2] Zhu Y, Pettolino F, Mau SL, et al. Characterization of cell wall polysaccharides from the medicinal plant *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 1067-1076.
- [3] Zhu Y, Pettolino F, Mau SL, et al. Immunoactive polysaccharide-rich fractions from *Panax notoginseng* [J]. *Planta Med*, 2006, 72: 1193-1199.
- [4] Wu YL, Wang D. Structural characterization and DPPH radical scavenging activity of an arabinoglucogalactan from *Panax notoginseng* root [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 241-245.
- [5] 钟媛媛, 杨晓涵, 张要武, 等. 三七多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. *华西药学杂志*, 2016, 31(6): 573-576.
Zhong YY, Yang XH, Zhang YW, et al. Impact of *Panax* polysaccharides on immune function in mice [J]. *West China J Pharm Sci*, 2016, 31(6): 573-576.
- [6] 陈为, 张友成, 周苗苗, 等. 三七多糖对微波辐射大鼠血清氧化指标的影响研究[J]. *中国辐射卫生*, 2009, 18(2): 184-185.
Chen W, Zhang YC, Zhou MM, et al. Experimental study on effect of the polysaccharides in *Panax notoginseng* on oxidation index of the rat serum under the microwave radiation [J]. *Chin Radiol Health*, 2009, 18(2): 184-185.
- [7] 李世英, 谢云亮, 于忠慧. 三七多糖对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2015, 32(11): 996-998.
Li SY, Xie YL, Yu ZH. Protection of Notoginseng polysaccharide on rat ischemia-reperfusion injury [J]. *J Apopl Nerv Dis*, 2015, 32(11): 996-998.
- [8] Ho YS, Yu MS, Yik SY, et al. Polysaccharides from wolfberry antagonizes glutamate excitotoxicity in rat cortical neurons [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(8): 1233-1244.
- [9] Yang Y, Li W, Li Y, et al. Dietary *Lyciumbarbarum* polysaccharide induces Nrf2/ARE pathway and ameliorates insulin resistance induced by high-fat via activation of PI3K/AKT signaling [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2014: 145641. doi: 10.1155/2014/145641.
- [10] Amagase H, Sun B, Borek C. *Lyciumbarbarum* (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults [J]. *Nutr Res*, 2009, 29(1): 19-25.
- [11] Chiu K, Chan HC, Yeung SC, et al. Modulation of microglia by wolfberry on the survival of retinal ganglion cells in a rat ocular hypertension model [J]. *J Ocular Biol Dis Inf*, 2009, 2(2): 47-56.
- [12] 张雅莉, 黄晓旭, 黄珍茹, 等. 枸杞多糖及其配伍茶多酚缓解小鼠体力疲劳作用的研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2016, 36(5): 661-665.
Zhang YL, Huang XX, Huang ZR, et al. Study on the effects of *Lyciumbarbarum* polysaccharides (LBP) and LBP combined with tea polyphenols on relieving the physical fatigue in mice [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ (Med Sci Ed)*, 2016, 36(5): 661-665.
- [13] Zhu CP, Zhang SH. *Lyciumbarbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(1): 149-156.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科出版社, 2015.
Chinese pharmacopoeia commission. *Pharmacopoeia of the people's republic of China 2015 edition, volume I* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [15] 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.
Li L, Jin WJ. Comparative analysis on the determination methods of *Lyciumbarbarum* polysaccharide content [J]. *Food Res Dev*, 2016, 37(11): 143-146.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



孔庆龙, 硕士, 主要研究方向为保健品、新食品开发。
E-mail: 13238660658@163.com



游 燕, 高级工程师, 主要研究方向为药物分析和质量研究。
E-mail: yy81221@ynby-yimm.com



《果蔬加工和质量安全控制专题》征稿函

我国是果蔬生产大国,水果蔬菜的总产量在世界名列前茅,果蔬产品也成为我国较好的经济来源之一。蔬菜、水果等农产品的质量安全越来越受到全社会关注,在生产阶段和加工、包装、储运等采后阶段进行质量安全风险控制显得越来越必要和紧迫。

鉴于此,本刊特别策划了“果蔬加工和质量安全控制”专题,由甘肃农业大学副校长毕阳教授担任专题主编。专题将围绕(1)果蔬加工(加工新方法、新工艺、新技术等);(2)果蔬生产控制(农药残留、重金属超标、真菌毒素等有害物在线监测与控制);(3)采后控制(包装和储运等过程中的产品质量控制和果蔬腐烂的安全控制);(4)果蔬的营养与品质、功能成分的提取;(5)功能型果蔬制品、鲜切果蔬等产品开发及果蔬的综合利用或您认为本领域有意义的问题展开讨论,计划在 2017 年 10 月出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣,本刊特邀请您为本专题撰写稿件,综述、研究论文、研究简报均可,以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2017 年 9 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部