

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.07.002

蒽酮-硫酸显色法测定栽培白及的白及多糖含量*

李德旺, 邓芳[△], 汪胜

(湖南省衡阳市食品药品监督管理局检验检测中心, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 建立白及多糖的含量测定方法,比较栽培与野生白及的多糖含量差异。方法 采用水提醇沉法提取白及中的多糖,蒽酮-硫酸显色法、紫外分光光度法测定多糖含量。结果 蒽酮-硫酸显色法测定栽培白及的白及多糖含量准确度和稳定性均较好,精密度高;3年生栽培白及多糖含量与3年生野生白及相近,栽培变异较小。结论 蒽酮-硫酸显色法测定栽培白及的白及多糖含量可作为白及内在质量的评价方法,块茎繁殖栽培白及应3年后采挖。

关键词:白及;栽培;野生;白及多糖;蒽酮-硫酸显色法

中图分类号:R284.1;R282.71

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)07-0005-03

Content Determination of Polysaccharide in Cultivated *Rhizoma Bletillae* by Anthrone Sulfuric Acid Colorimetry

Li Dewang, Deng Fang, Wang Sheng

(Hengyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Hengyang, Hunan, China 421001)

Abstract: Objective To establish a method for content determination of polysaccharide in *Rhizoma Bletillae*, and to compare the difference of polysaccharide content between cultivated *Rhizoma Bletillae* and wild *Rhizoma Bletillae*. **Methods** The polysaccharides in *Rhizoma Bletillae* was extracted by water extraction, alcohol precipitation, and the content of polysaccharide was determined by anthrone sulfuric acid colorimetry and UV spectrophotometry. **Results** The content of polysaccharide in cultivated *Rhizoma Bletillae* determined by anthrone sulfuric acid colorimetry had good accuracy, stability and high precision. The polysaccharide content of the three years old cultivated *Rhizoma Bletillae* was similar to that of the three years old wild *Rhizoma Bletillae*, and the cultivation variation was small. **Conclusion** The content of polysaccharide in cultivated *Rhizoma Bletillae* determined by anthrone sulfuric acid colorimetry can be used as a method for evaluating the intrinsic quality of *Rhizoma Bletillae*. The cultivation of *Rhizoma Bletillae* should be cultivated after three years.

Key words: *Rhizoma Bletillae*; cultivation; wild; polysaccharide of *Rhizoma Bletillae*; anthrone sulfuric acid colorimetry

白及具有收敛、止血、清热利湿、消肿生肌之功效,用于治疗咳血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂、溃疡出血等症,富含白及胶^[1]。现代药理研究表明,白及胶能抑制肿瘤血管生成,兼有抗感染、抗肿瘤和促进凝血的功能^[2-3],其主要成分为大分子多糖^[4]。2015年版《中国药典(一部)》对白及的质量控制仅见性状、显微鉴别和薄层色谱鉴别,未对白及中具有药理活性的白及多糖进行质量控制。为评价栽培白及内在质量,本研究中采用蒽酮-硫酸显色法测定其多糖含量,并与野生白及进行比较,探讨其变异性。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent Cary 60 型紫外可见分光光度计(美国安捷伦公司);Mettler Ae 240 型电子天平(瑞士梅特勒公司);GZX-9146MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司);TG16-II 型医用离心机(湖南平凡科技有限公司)。

1.2 试药

D-无水葡萄糖(中国食品药品检定研究院,批号为110833-201506,浓度为100%);蒽酮(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号为20170706);硫酸(优级纯,国药集团化学试剂有限公司,批号为20170108);试验用水为试验室自制纯化水。野生白及(湖南衡岳中药饮片有限公司,采于湖南南岳后山区,批号为171003,171004);栽培白及(湖南衡岳中药饮片有限公司中药材种植基地,批号为160901,160902,171001,171002);市售白及(市场购入,产地云南,批号为20161201,170511),以上药材均经本中心副主任中药师王先教鉴定为兰科白及属植物白及 *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rehb. f. 的干燥块茎,且符合药典标准^[5]。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

试液:0.2% 蒽酮-硫酸溶液的配制,取蒽酮,精密

*基金项目:湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目[湘食药科 R201513]。

第一作者:李德旺(1988-),男,大学本科,药师,主要从事中药鉴定与检验工作,(电子信箱)329932645@qq.com。

[△]通信作者:邓芳(1977-),女,大学本科,副主任药师,主要从事中药鉴定与检验工作,(电子信箱)1021645460@qq.com。

称定 0.3012 g, 加 80% 硫酸溶液 100 mL 使溶解, 摇匀即得(棕色瓶保存或临用时配制)。

对照品溶液: 取 D-无水葡萄糖对照品, 精密称定 0.03238 g, 置 100 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(D-无水葡萄糖对照品使用以 100% 计, 即每 1 mL 中含 D-无水葡萄糖 0.3238 mg)。

供试品溶液: 取经 60 °C 干燥 12 h 的白及供试品粉末 0.3 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加入 60 mL 水, 加热回流提取 1 h, 趁热用布氏漏斗滤过, 残渣及烧瓶用热水洗涤 3 次, 每次 10 mL, 合并滤液和洗液, 放冷, 转移至 100 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 溶液滤过, 精密量取续滤液 0.5 mL, 加入 4 mL 丙酮, 摇匀, 静置 10 min, 离心, 倾去上清液, 沉淀加水溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 精密量取 2 mL, 照标准曲线制备项下方法, 自“在冰水浴中缓缓加 0.2% 蒽酮-硫酸溶液至刻度”起, 依法测定吸光度, 计算百分含量。

2.2 检测波长选择

取对照品溶液, 稀释成 0.0097 g/L, 按标准曲线制备项下方法显色后, 在 200~800 nm 波长范围内扫描, 色谱图见图 1。选取最大吸收波长 582 nm 作为检测波长。

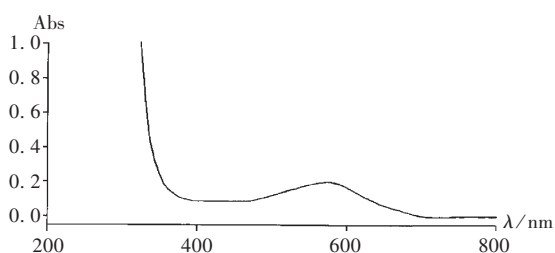


图 1 D-无水葡萄糖紫外吸收光谱图

2.3 方法学考察

标准曲线制备: 精密量取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL, 分别置 10 mL 具塞试管中, 各加水至 2.0 mL, 混匀, 在冰水浴中缓缓加 0.2% 蒽酮-硫酸溶液至刻度, 混匀, 放冷后置水浴中保温 10 min, 取出, 立即置冰水浴中冷却 10 min, 取出, 以相应试剂为空白。照紫外-可见分光光度法, 在 582 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(Y)为纵坐标、质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 24.11X - 0.001$, $R^2 = 0.996$ ($n = 6$)。结果表明, D-无水葡萄糖质量浓度在 3.238~19.428 μg/mL 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取对照品溶液(0.0971 g/L), 按拟订色谱条件, 重复进样 6 次, 测定。结果吸光度平均值为 0.2529, RSD 为 0.12% ($n = 6$), 表明仪器精密度高。

重复性试验: 称取样品(批号为 171001)6 份, 依法测定, 计算含量。结果平均含量为 34.44%, RSD 为

0.32% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取白及(批号为 171001), 依法制备供试品溶液, 分别于放置 20, 40, 60, 90, 120, 150 min 后上样测定。结果的 RSD 为 1.27% ($n = 6$), 供试品溶液在 90 min 内 D-无水葡萄糖吸光度基本稳定。

加样回收试验: 取样品(批号为 171001)精密称定 0.3 g 6 份, 分别精密加入 0.0324 mg 的 D-无水葡萄糖, 依法测定。结果见表 1。

表 1 D-无水葡萄糖加样回收试验结果($n = 6$)

样品含量 (g)	加入量 (g)	测得量 (g)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.1018	0.0324	0.1337	98.46	97.43	1.29
0.1023	0.0324	0.1333	95.68		
0.1013	0.0324	0.1330	97.84		
0.1016	0.0324	0.1334	98.15		
0.1013	0.0324	0.1324	95.99		
0.1033	0.0324	0.1352	98.46		

2.4 样品含量测定

结果见表 2。

表 2 不同批次白及多糖含量测定结果(以 D-无水葡萄糖计, $n = 6$)

样品	批号	含量(%)
栽培 2 年生	160901	19.85
2 年生	160902	20.23
3 年生	171001	34.04
3 年生	171002	32.76
野生	171003	28.46
野生	171004	35.14
市售	20161201	28.65
市售	170511	30.44

3 讨论

3.1 显色法选择

考察了苯酚-浓硫酸显色法, 其样品测定结果重复性较差, 且苯酚毒性较大, 易氧化, 试验前需进行纯化处理^[6-7], 操作烦琐; 而蒽酮-硫酸显色法测定结果较稳定, 操作简便, 故采用蒽酮-硫酸显色法进行测定。

3.2 样品提取方法选择

比较了以稀乙醇去杂质再水提的方法与水提醇沉法测定白及多糖含量, 2 种方法测定结果较接近, 但前者过滤时间太长, 后者操作简便, 故选择水提醇沉法。

3.3 方法优势

紫外分光光度法是一种常用的分析方法, 应用范围广, 成本较低, 操作快速、简便, 同时具有良好的稳定性和重复性^[8]; 2015 年版《中国药典(一部)》白及项下的相关检测项不能对其具有药理活性的相关成分进行相应评价, 方法精密度高、重复性和准确度高, 可作为评价