

3,5-二硝基水杨酸法测定樟芝中多糖的含量

王鹏亭, 赵宗杰, 周荣灵, 谢海涛*, 张向阳

(深圳市仁泰生物科技有限公司, 深圳 518047, 香港中医科学院, 香港 999077)

摘要: 建立了樟芝粗多糖的含量测定方法。以葡萄糖为对照品, 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色法, 测定樟芝中还原糖和总糖的含量, 并计算出总多糖的含量。研究结果表明多糖含量在 0.25mg/mL~1.00 mg/mL 范围内标准曲线具有良好的线性关系, 测得回归方程 $y=0.5979x-0.0378$ ($R^2=0.9996$)。还原糖和总糖的平均加样回收率分别为 101.65% (RSD=1.89%) 和 100.92% (RSD=2.45%)。樟芝中总多糖含量为 129.5mg/g~148.1mg/g。本方法灵敏、稳定、重复性好, 有助于樟芝质量控制方法的研究。

关键词: 樟芝; 多糖; 3, 5-二硝基水杨酸比色法

Determination of Polysaccharide in *Antrodia cinnamonea* by 3,5- Dinitrosalicylic Acid Colorimetry

WANG Peng-Ting, ZHAO Zong-Jie, ZHOU Rong-Ling, XIE Hai-Tao*, ZHANG Xiang-Yang

(Hong Kong Chinese Medical Science Academy, Hongkong 999077)

Abstract: To develop a method for the determination of polysaccharide in *Antrodia cinnamonea*(AC).To calculate the total polysaccharide content with the reducing sugar and total sugar content that be determined by 3,5- Dinitrosalicylic Acid Colorimetry with glucose as the standard substance. The results showed that: The calibration curve of polysaccharide was in good linearity over the range of 0.25mg/mL~1.00mg/mL,the regression equation was $y=0.5979x-0.0378$ ($R^2=0.9996$).The average recovery of total sugar solution and reducing sugar solution in the test were 101.65% with RSD,1.89% and 100.92% with RSD,2.45% respectively.The polysaccharide content of AC was 129.5mg/g~148.1mg/g.The method which can be used for the quality control of AC is convenient, accurate and sensitive with good reproducibility.

Key words: *Antrodia cinnamonea*; polysaccharide; 3,5-Dinitrosalicylic Acid

樟芝 (*Antrodia cinnamonea*) 为原产于台湾的珍贵药用真菌^[1], 樟芝含有多种生物活性物质, 具有保肝、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、解毒、抗炎等功效^[2-4], 有很高的药用价值, 因其子实体的生长只依赖于台湾保护树种——牛樟树, 故野生采集的数量远不能满足人们对樟芝的需求, 从而限制了其发展, 近年来, 樟芝深层发酵培养的研究进展迅速^[5], 逐渐成为国内外研究和开发的热点。

樟芝的生理活性物质以多糖类和三萜类化合物为主^[6-7]。多糖类一般的测定方法是运用苯酚-浓硫酸

法、蒽酮-浓硫酸法和 3, 5 二硝基水杨酸比色法(简称DNS法)^[8-10]。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计算出多糖类成分的含量。目前为止, 未有关于采用DNS法测定樟芝中多糖含量的文献报道。本研究首次建立DNS 比色法测定樟芝中水溶性多糖的含量, 并做了相应的方法学考察研究。

基金项目: 深圳市战略新兴产业发展专项资金项目

(CYZZ20130416170923767)

作者简介: 王鹏亭(1984—), 男(汉), 硕士, 主要从事药用真菌有效成分的提取及药效研究。

* 通讯作者: 谢海涛, 男(汉), 硕士, 香港中医科学院研究员, 主要从事樟芝的现代化研究。

1. 材料与仪器

1.1 仪器

BSA224S 赛多利斯分析天平, H2050R 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪), HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒), T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用)。

1.2 试剂与材料

DNS 试液的配制：将 6.3 g DNS 和 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 262 mL 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 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。

$1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准溶液：精密称取在 105°C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 100mg，置 100mL 量瓶中，加水适量使溶解并用水稀释至刻度，摇匀。

材料：樟芝菌丝体（本实验室发酵所得），临用前将其在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 下烘至恒重后，粉碎至粉末，置干燥器中备用。

1.3 实验方法

1.3.1 检测波长的确定

准确吸取葡萄糖标准溶液和蒸馏水各 1.0mL，分别加入到 25mL 具塞试管中，再分别加入 DNS 试剂 2mL，混合均匀后沸水浴加热 5min，迅速流水冷却，加水定容至 25mL，再将葡萄糖显色液+蒸馏水（空白）、DNS 试剂+蒸馏水（空白）、葡萄糖显色液+DNS（空白）试剂分别在波长为 $360\sim 600\text{nm}$ 范围内进行扫描。

1.3.2 显色剂用量的确定

用移液管精确吸取 1mL 葡萄糖标准液加入到编号为 1~7 的 25mL 具塞试管中，均补水至 2mL，分别加入 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4mL DNS 试剂，沸水浴加热 5min，流水冷却后定容 25mL，在 540nm 波长下测定其吸光值。

1.3.3 显色时间的确定

分别吸取 1mL 葡萄糖标准液加入到编号为 1~9 的 25mL 具塞试管中，均补水至 2mL，各加入 2mL DNS，并分别在沸水浴中加热 2、3、4、5、6、7、8、10、12、15、20min，流水冷却后定容 25mL，在 540nm 波长下测定其吸光值。

1.3.4 标准曲线绘制

精确吸取葡萄糖标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6mL，分别置于 25mL 的具塞试管中，均补水至 2mL，再加入 DNS 溶液 2mL，混合均匀后，沸水浴 5min，迅速流水冷却，加水至刻度线。空白调零，以葡萄糖含量为横坐标，吸收度为纵坐标，绘制标准曲线。

1.3.5 供试品溶液的制备

精密称取樟芝菌丝体粉末 2.0g，置 250mL 蒸馏瓶中，加入蒸馏水 60mL， 90°C 热水浸提 2h， $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min。取上清，加入 200mL 95% 乙醇，充分振摇混匀，置冰箱中冷藏放置过夜。将上述溶液转至离心管中 $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min，残渣用 95% 乙醇洗涤 3 次，每次 20mL。将上述残渣用蒸馏水溶解至 100mL 容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，摇匀，备用。

1.3.6 还原糖供试品溶液的制备

按供试品溶液制备项下方法制备，即得牛樟芝菌丝体还原糖供试品溶液。

1.3.7 总糖供试品溶液的制备

精密量取上述供试品溶液 10mL，置三角锥形瓶中，加入 10mL 6mol/L HCl 溶液，封口，于沸水浴上加热 30min，取出冷却至室温，加一滴酚酞指示剂，用 6mol/L NaOH 溶液滴定溶液刚刚呈淡红色，置 50mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，摇匀，即得牛樟芝菌丝体总糖供试品溶液。

1.3.8 样品测定

精密量取上述还原糖、总糖供试品溶液各 2 mL，分别置于 25mL 的具塞试管中，将对照组补水至 2mL，再各加入 DNS 溶液 2mL，混合均匀后，沸水浴 5min，迅速流水冷却，加水至刻度，摇匀，照分光光度法[2005 年版《中华人民共和国药典》(一部)附录 VA]在 540 nm 波长处分别测定吸收度，计算出样品中总糖及还原糖的质量。按下式计算样品中多糖的百分含量（用 0.9 的系数校正）^[11]。

$$\text{多糖}(\%) = \frac{(\text{总糖质量} - \text{还原糖质量}) \times 0.9}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

关于 DNS 法测定波长的选择一直存在着争论, 众多文献选定的最佳波长及其确定依据也各不相同, 为了确定 DNS 法在测定牛樟芝多糖过程中的最佳波长, 将相关因素进行波谱扫描, 结果如图 1。由图 1 葡萄糖显色液+DNS 显色剂曲线可以看出, 最大吸光度值处的波长为 490nm, 为了提高检测灵敏度, 通常情况下应该选择吸光度值最大处的波长, 但是由于 DNS 显色剂在 490nm 处有较大的吸收, 且显色期间由于部分 DNS 显色剂与待测液中还原糖相结合, 消耗了部分显色剂, 从而造成测定吸光度时, 作为空白参照的溶液中 DNS 显色剂含量大于葡萄糖显色液中 DNS 含量, 致使检测结果比真实值偏低, 因此检测波长不选 490nm。所以最大吸收波长并非最佳工作波长, 根据“吸收最大, 干扰最小”原则从图 1 还可以看出, DNS 显色剂+蒸馏水在波长 $\leq 520\text{nm}$ 时, 都有一定的吸光值, 而在 530nm 以后, DNS 显色剂+蒸馏水的吸光值接近于 0, 故本实验最终确定的测定波长选为 540 nm。

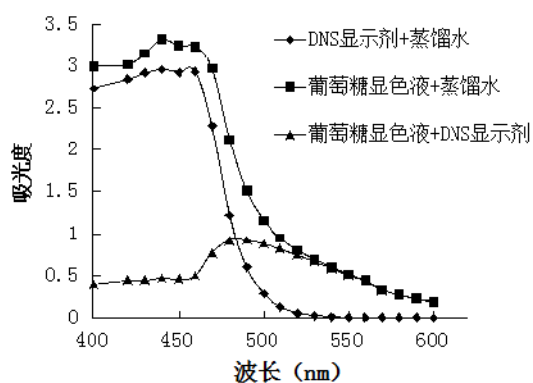


图 1 葡萄糖溶液吸收光谱图

Fig.1 The absorption spectrum with glucose solution

2.2 显色剂用量的确定

由图 2 可以看出, 当 DNS 显色剂用量在 2mL 以内时, 随着 DNS 试剂用量的增加, 吸光度值增大, 且浮动较大, 当 DNS 用量在 2~5mL 时, 吸光度值

比较稳, 增长缓慢, 浮动较小。因此, 为了减小 DNS 试剂对吸光值测定的影响, DNS 试剂的用量不应该小于 2.0mL, 因此在本实验中 DNS 试剂的用量采用的是 2.0mL。

2.3 显色时间的确定

由图 3 可以明显看出, 当沸水浴加热时间在 5min 内时, 随着水浴时间的增长, 吸光度增大。当沸水浴加热时间增加到 5min 后, 吸光度变化趋于稳定, 说明显色反应在沸水浴加热 5min 时既已全部完成, 故选择 5min 作为最佳显色反应时间。

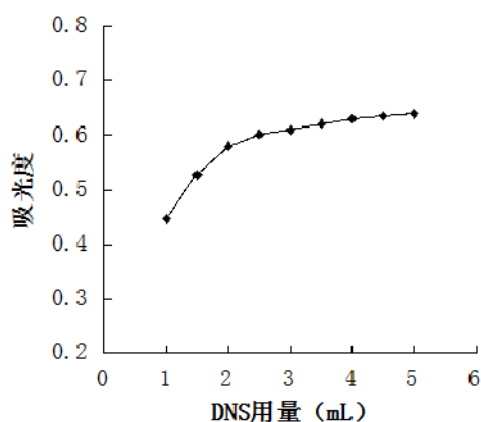


图 2 不同显色剂用量的吸光度值

Fig.2 The absorption determination with different DNS

dosage

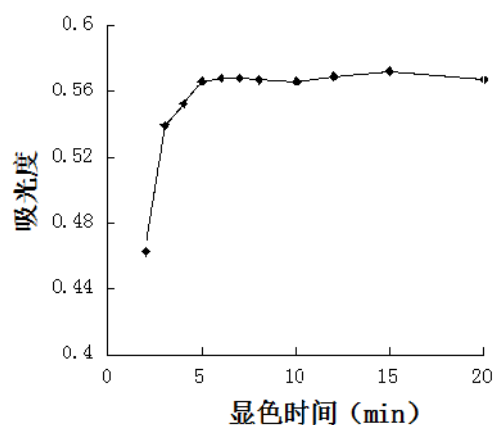


图 3 不同沸水浴加热时间的吸光度值

Fig.3 The absorption determination with different boiling

water bath time

2.4 标准曲线的制备

从图 4 中可以看出, 葡萄糖的含量和相应的吸

光度数值之间有一定的线性关系，其回归方程为： $y=0.5979x-0.0378$ ， $R^2=0.9996$ ，线性关系良好。为了提高反应的显色灵敏度和稳定性，DNS显色剂中加有酒石酸钾钠，但酒石酸钾钠却减弱了亚硫酸钠对还原糖的保护作用，从而造成部分葡萄糖的破坏

而不显色，故当葡萄糖浓度 ≤ 0.2 mg/mL时，其吸光度值要低于真实数值。该标准曲线表明，葡萄糖浓度在 0.25 mg/mL~1.00 mg/mL 之间显色灵敏、稳定且线性良好。

表 1 稳定性实验结果

Tab.1 The results of the stability test

时间	时间 (min)												RSD (%)
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
还原糖	0.181	0.180	0.181	0.181	0.180	0.181	0.182	0.183	0.184	0.184	0.185	0.185	1.02
总糖	0.769	0.768	0.769	0.769	0.770	0.770	0.771	0.771	0.773	0.774	0.775	0.776	0.34

表 2 样品加样回收率实验结果

Tab.2 The results of recovery test (n=5)

种类	批次	样品量 (mg)	加样量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
还原糖供试品溶液 2mL	1	0.36	0.40	0.78	103.53	101.65	1.89
	2	0.34	0.40	0.76	103.27		
	3	0.37	0.40	0.78	101.40		
	4	0.38	0.40	0.77	98.75		
	5	0.34	0.40	0.75	101.28		
总糖品溶液 2mL	1	1.39	0.40	1.80	100.62	100.92	2.45
	2	1.22	0.40	1.58	97.85		
	3	1.36	0.40	供试 1.83	104.24		
	4	1.32	0.40	1.76	102.36		
	5	1.27	0.40	1.67	99.53		

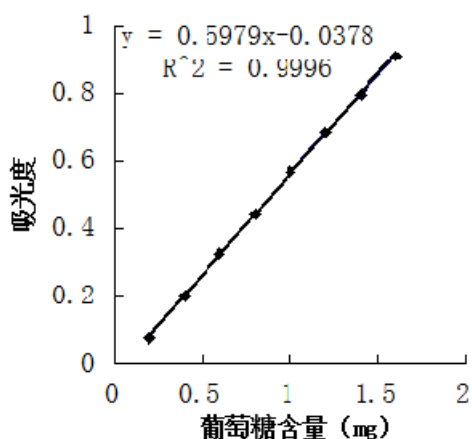


图 4 葡萄糖标准曲线

Fig.4 The standard curve of glucose

2.5 方法学考察

2.5.1 精确度实验

取同一组还原糖供试品溶液连续测定 10 次，其吸光度值分别为 0.172、0.172、0.173、0.172、0.174、0.173、0.173、0.174、0.172、0.173，其数值相对标准偏差 RSD=0.456%，说明仪器精确度良好。

取同一组总糖供试品溶液连续测定 10 次，其吸光度值分别为 0.772、0.772、0.775、0.773、0.772、0.773、0.773、0.773、0.774、0.773，其数值相对标准偏差 RSD=0.122%，说明仪器精确度良好。

2.5.2 重复性实验

取同一批样品 5 份, 按还原糖供试品溶液制备方法制备, 依法测定, 计算还原糖含量分别为 0.96%、0.88%、0.92%、0.93%、0.92%, 还原糖平均含量为 0.92%, RSD=3.11%(n=5), 说明本方法重复性好。

取同一批样品 5 份, 按总糖供试品溶液制备方法制备, 依法测定, 计算还原糖含量分别为 15.70%、16.85%、16.12%、15.96%、16.43%, 还原糖平均含量为 16.21%, RSD=2.74%(n=5), 说明本方法重复性好。

2.5.3 稳定性实验

分别取还原糖、总糖供试品溶液 2 mL, 按样品测定方法测定, 显色反应完成后 0~2 h 内每隔 10min 测定 1 次, 结果由表 1 可知, 还原糖及总糖供试品在 0~2h 内吸光度值基本稳定不变, 说明还原糖、总糖供试品溶液经显色反应后在 2h 内都是稳定的。

2.5.4 加样回收率试验

5 批樟芝菌丝体粉样品各取一份, 每份约 2.0g, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 分别取还原糖、总糖供试品溶液 2 mL, 分别准确加入无水葡萄糖对照品适量。分别测定各组样品溶液加样前后还原糖含量及总糖含量, 计算回收率, 见表 2。结果表明, 还原糖供试液和总糖供试液的平均加样回收率分别为 101.65%和 100.92%, 它们的 RSD 分别为 1.89%和 2.45%。这说明, 该方法中还原糖和总糖的回收性良好。

2.5.5 样品含量测定

5 批樟芝菌丝体粉测定结果见表 3。经 5 批样品含量测定结果表明, 樟芝菌丝体粉中总多糖含量为 129.5~148.1mg/g。

5 个批次的樟芝菌丝体为深圳市仁泰生物科技有限公司樟芝联合实验室发酵所得, 从测定结果来看, 不同批次的樟芝菌丝体粉多糖含量差别不大, 说明该樟芝深层液体发酵工艺比较稳定。

表 3 5 批樟芝样品含量测定结果

Tab.3 The results of 5 batches of AC sample content test

批次	还原糖 (%)	总糖 (%)	总多糖 (%)
1	0.89	17.34	14.81
2	0.84	15.23	12.95
3	0.92	16.98	14.45
4	0.95	16.54	14.03
5	0.85	15.92	13.56
平均值 (%)	0.89	16.40	13.96

3. 讨论

通常选用苯酚-硫酸法或硫酸-蒽酮比色法进行总糖测定。由于这两种方法只能测定样品中的总糖含量, 对多糖的纯度要求较高, 若样品纯化不彻底, 单糖去除不完全, 则会使测定结果偏高。而 DNS 法测定多糖含量可排除单糖带来的误差, 目前为止, 尚未有关于采用 DNS 法测定樟芝多糖含量的相关报道。本试验为首次建立 DNS 法测定樟芝中水溶性多糖的含量, 所建立的方法经方法学考察结果表明, 具有重复性好、安全简便、准确灵敏等特点。

参考文献

- [1] Chang T T, Chou W N. *Antrodia cinnamomea* sp.nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan[J]. Mycol.Res,1995,99:756-758
- [2] 浦跃武, 熊冬生. 樟芝的研究及其应用现状[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25 (2) : 171-173
- [3] Fa K N, Yang C M, Chen P C, et al. Anti-metastatic effects of antrodan, the *Antrodia cinnamomea* mycelia glycoprotein, in lung carcinoma cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74:476-482.
- [4] Tsai T C, Tung Y T, Kuo Y H, et al. Anti-inflammatory effects of *Antrodia camphorata*, a herbal medicine, in a mouse skin ischemia model[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 159:113-121
- [5] Zhang H, Xia Y J, Wang Y L, et al. Coupling use of surfactant and *in situ* extractant for enhanced production of Antrodin C by submerged fermentation of *Antrodia camphorata*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 79:194-199

-
- [6] Lu M C, Mohamed El-Shazly, Wu T Y, et al. Recent research and development of *Antrodia cinnamomea*[J]. *Pharmacology & Therapeutics*,2013,139(2):124-156
- [7] 陈菲, 刘训红, 杨念云, 等. 樟芝的研究概述[J]. *中药材*, 2011, 34 (11) 1804-1808
- [8] 郭晓蕾, 朱思潮, 翟旭峰, 等. 硫酸蒽酮法与硫酸苯酚法测定灵芝多糖含量比较[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28 (9) :2000-2002
- [9] 李强, 唐微, 石园园, 等. 蒽酮-硫酸法和 3,5-二硝基水杨酸法测定杜仲水提液多糖含量[J]. *食品工业科技*, 2010, 31 (10) :370-374
- [10] 刘华, 周堃, 贾薇, 等. 药用真菌樟芝菌丝体多糖提取工艺及活性的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28 (6) :243-245
- [11] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1994:6