

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2023.05.004

# 苯酚-硫酸法测定消渴丸中多糖含量\*

黄秋凌<sup>1</sup> 雷婷<sup>1</sup> 何子昕<sup>1</sup> 宁娜<sup>1</sup> 陈新阳<sup>1</sup> 林瑞珍<sup>2</sup> 党蕾<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>广州白云山中一药业有限公司时尚中药研究院,广州 510530

<sup>2</sup>广东省中医院药学部,广州 510120

**摘要 目的** 建立消渴丸中多糖含量的测定方法。**方法** 以葡萄糖为对照,采用苯酚-硫酸法对消渴丸中的多糖进行显色,运用紫外-可见分光光度计测定吸光度,计算消渴丸中多糖的含量,并对该方法的精密度、重复性、加样回收率等进行分析。**结果** 该方法测得消渴丸中多糖含量在 0~0.0510 mg/mL 的线性范围内,相关系数为 0.9999。精密度实验相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.90%,重复性实验 RSD 为 1.38%,平均加样回收率为 98.77%,RSD 为 3.25%。**结论** 应用苯酚-硫酸法测定消渴丸中的多糖含量准确度高、精密度良好、重复性稳定、加样回收率高,适用于消渴丸中多糖含量的测定。

**关键词** 苯酚-硫酸法;多糖;消渴丸;含量测定

**中图分类号** R284.1 **文献标志码** A

## Determination of Polysaccharides in Xiaoke Pill by Phenol-sulfuric Acid Method

HUANG Qiuling<sup>1</sup>, LEI Ting<sup>1</sup>, HE Zixin<sup>1</sup>, NING Na<sup>1</sup>, CHEN Xinyang<sup>1</sup>, LIN Ruizhen<sup>2</sup>, DANG Lei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trendy Chinese Medicine Research Institute, Guangzhou Baiyunshan Zhongyi Pharmaceutical Co. LTD, Guangzhou 510530, China

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

**Abstract Objective** To establish a method for the determination of polysaccharide content in Xiaoke pill. **Methods** Using glucose as a control, the phenol-sulfuric acid method was used to color the polysaccharides in Xiaoke pill, and the absorbance was measured using a UV visible spectrophotometer to determine the content of polysaccharides in Xiaoke pill. The accuracy, repeatability, and sample recovery rate of this method were analyzed. **Results** This method determined the content of polysaccharides in Xiaoke pill within the linear range of 0 to 0.0510 mg/mL, with a correlation coefficient of 0.9999. The relative standard deviation(RSD) of the precision experiment was 0.90%, and the RSD of repeatability experiment was 1.38%. The average sample recovery rate was 98.77%, and the RSD was 3.25%. **Conclusion** The application of phenol-sulfuric acid method to determine the polysaccharide content in Xiaoke pill had high accuracy, good precision, stable repeatability and high sample recovery rate, making it suitable for the determination of polysaccharide content in Xiaoke pill.

**Key words** phenol-sulfuric acid method; polysaccharide; Xiaoke pill; content determination

消渴丸是由葛根、地黄、黄芪、天花粉、玉米须、南五味子、山药等 7 味中药和格列本脲组成的中西药复合制剂,具有滋肾养阴、益气生津之功效。消渴丸中所含地黄、黄芪、玉米须和葛根富含多糖成分,经现代药理学研究证明其具有调控血糖的作用<sup>[1-2]</sup>。但目前对消渴丸中多糖的研究或含量测定尚无报告,因此本研究对消渴丸

中多糖含量的测定条件进行探究。本研究主要利用多糖含量测定中最常用的苯酚-硫酸法<sup>[3-4]</sup>,对消渴丸中多糖含量的测定条件进行优化,并对该方法的精密度、重复性、加样回收率等进行研究,以期建立快速、准确的消渴丸中多糖含量的测定方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

主要实验仪器:Cary100 UV-VIS 紫外分光光度

\* 国家中医药管理局资助项目(No. ZYBZH-C-GD-07)

△ 通信作者, Corresponding author, E-mail: danglei\_zhongyi@163.com

计(安捷伦科技中国有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Milli-Q 超纯水系统(密理博中国有限公司);ZKF030 电热真空干燥箱(广州沪瑞明仪器有限公司);电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);Sartorius BS 224 S 型十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);METTLER TOLEDO XP26 百万分之一电子天平(梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司)。

消渴丸粉末由广州白云山中一药业有限公司生产提供,生产批号:XS0001、XS0002、XS0003、X01051、X01052、X01053;D-无水葡萄糖购自于中国食品药品检定研究院,批号:110833-201707;无水乙醇、浓硫酸、苯酚等均为分析纯;蒸馏水由实验室自制。

## 1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制 取烘干至恒重的 D-无水葡萄糖标准品 5 mg,精密称定,置于 50 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释到刻度,摇匀即得每毫升含葡萄糖 0.1 mg 的对照品。

1.2.2 样品前处理 称取消渴丸粉末和量取无水乙醇以 1:40(g:mL)的料液比,在 90℃ 水浴中加热回流提取 1 h,静置 15 min,以 4500 rpm 离心 10 min,过滤,将上清液转移至 100 mL 容量瓶中,残渣中加入 30 mL 蒸馏水后充分摇匀,随后置于 90℃ 水浴中加热回流 1 h,再以 4500 rpm 离心 10 min,过滤;合并上清液,加蒸馏水定容至刻度,摇匀。精密量取上述溶液 2 mL 于离心管中,向离心管中加入 18 mL 无水乙醇,充分混匀,于 4℃ 静置 1 h,以 4500 rpm 离心 15 min,弃上清液;再向离心管中加入 10 mL 95%乙醇溶液,充分混匀,以 4500 rpm 离心 15 min,弃上清液,沉淀中加入热水 10 mL 溶解,并转移至 10 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

1.2.3 标准曲线制作 精密吸取 1.2.1 中制备的标准溶液 0.00 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL 置于 25 mL 具塞玻璃试管中,分别加蒸馏水补至 2.0 mL,加入 1.0 mL 5%苯酚溶液及 5.0 mL 浓硫酸溶液,混匀,置于 80℃ 水浴中加热 15 min,取出,放置冷却至室温。以水为参照,于 490 nm 波长处测定吸光度值,平行测定 3 次。以葡萄糖浓度(C)为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得出回归方程和计算相关系数(R<sup>2</sup>)。

1.2.4 测定方法 精密吸取供试品溶液 1.0 mL 于具塞玻璃试管中,加水补至 2.0 mL 后,按照标准曲线的制备方法及测定条件,测定供试品的吸光度值。

1.2.5 精密度实验 取 X01053 批次的消渴丸粉末 1.0 g,共 6 份,精密称定,按 1.2.2 制备及 1.2.4 测定方法测定吸光度值。根据 1.2.3 中标准曲线的回归方程计算出供试品中的多糖浓度(C)和其相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)。

1.2.6 重复性实验 取 6 批次(XS0001、XS0002、XS0003、X01051、X01052、X01053)的消渴丸粉末各 1.0 g,精密称定,按 1.2.2 制备及 1.2.4 测定方法测定吸光度值,平行测定 3 次,根据 1.2.3 中标准曲线的回归方程计算出供试品中的多糖浓度(C)和其 RSD。

1.2.7 加样回收率实验 取 X01053 批次的消渴丸粉末 1.0 g,共 6 份,精密称定,按 1.2.2 制备及 1.2.4 测定方法测定吸光度值,平行测定 3 次,根据 1.2.3 中标准曲线的回归方程计算出供试品中的多糖浓度(C),并计算其所含多糖质量。另取 6 份上述已制备的消渴丸多糖供试样品液 1.0 mL,分别加入浓度为 1000 mg/mL 的葡萄糖溶液 2.4 mL,平行测定 3 次,按 1.2.4 测定方法测定吸光度值,根据 1.2.3 中标准曲线的回归方程计算出供试品中的多糖浓度(C)后,计算加样回收率和其 RSD。加样回收率=[(测得混合后供试样品液所含多糖质量-测得供试样品液所含多糖质量)/加入葡萄糖质量]×100%。

## 2 结果

### 2.1 最大吸收波长检测结果

根据实验方法,在紫外-可见分光光度计上 200 nm~800 nm 范围内扫描吸收曲线,测得消渴丸多糖溶液的最大吸收波长在 490 nm。

### 2.2 标准曲线制备及线性考察

以葡萄糖浓度(C)为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标,绘制标准曲线。测定相关数据见表 1,绘制图见图 1。标准曲线:  $A = 15.443C - 0.0042$ ,  $R^2 = 0.9999$ 。葡萄糖浓度在 0~0.0510 mg/mL 范围内与吸光度值之间呈现良好的线性关系。

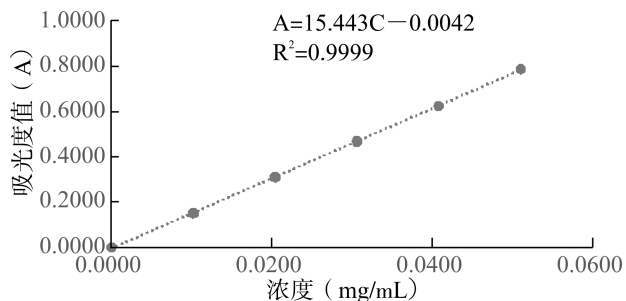


图 1 标准溶液曲线图

表 1 标准曲线建立相关数据

序号	编号	类型	浓度(mg/mL)	吸光度值(A)
1	葡萄糖 0	标准样品	0.0000	0.0000
2	葡萄糖 1	标准样品	0.0102	0.1503
3	葡萄糖 2	标准样品	0.0204	0.3092
4	葡萄糖 3	标准样品	0.0306	0.4677
5	葡萄糖 4	标准样品	0.0408	0.6232
6	葡萄糖 5	标准样品	0.0510	0.7872

### 2.3 精密度考察结果

计算测得浓度的精密度实验 RSD 值为 0.90%，见表 2。

表 2 精密度实验结果

编号	吸光度值(A)	测得浓度(mg/mL)
X01053-1	0.3627	0.0238
X01053-2	0.3646	0.0239
X01053-3	0.3720	0.0244
X01053-4	0.3644	0.0239
X01053-5	0.3637	0.0238
X01053-6	0.3659	0.0240
平均值	/	0.0239
RSD(%)	/	0.90

表 4 X01053 批次的加样回收率实验结果

编号	药粉质量(g)	吸光度值(A)	测得浓度(mg/mL)	加入葡萄糖质量(mg)	供试品中多糖质量(mg)	混合后多糖质量(mg)	回收率(%)
X01053-1	1.0036	0.7315	0.0476	2.4	2.380	4.7640	99.33
X01053-2	1.0094	0.7494	0.0488	2.4	2.392	4.8799	103.66
X01053-3	1.0039	0.7297	0.0475	2.4	2.440	4.7523	96.35
X01053-4	1.0071	0.7402	0.0482	2.4	2.391	4.8203	101.22
X01053-5	1.0018	0.7210	0.0470	2.4	2.386	4.6960	96.25
X01053-6	1.0026	0.7216	0.0470	2.4	2.401	4.6999	95.79
平均值	/	/	/	/	/	/	98.77
RSD(%)	/	/	/	/	/	/	3.25

## 3 讨论

消渴丸由古代经典名方“消渴方”和“玉泉散”化裁而来，用地黄、山药、五味子以滋养肺阴、胃阴、肾阴，山药、五味子配黄芪以补益肺气、胃气，又有固肾摄精之功，地黄配天花粉、玉米须、葛根以清肺热、胃热而生津<sup>[5]</sup>。经现代药理学研究发现，组方中多种药物具有调控血糖的作用<sup>[1-2]</sup>。消渴丸作为中西药复合制剂，其中的格列本脲能更好地提高组方中中药部分的降糖效果，实现中西药合理配伍<sup>[6-7]</sup>。

前期的研究主要关注消渴丸中的小分子化合物在协同降糖中的作用和机制<sup>[8]</sup>，并针对消渴丸中多个小分子化合物构建了定量测定方法<sup>[9-10]</sup>。目前，多糖作为天然降糖物质受到专家学者的重点关注<sup>[11-12]</sup>，消渴丸中所含药材如地黄、黄芪、玉米须和葛根中的多糖成分，已被证实具有良好的调控血糖作用，然而尚缺乏对消渴丸中多糖成分的含量测定研究。

### 2.4 重复性考察结果

计算测得浓度的重复性实验 RSD 值为 1.38%，见表 3。

表 3 重复性实验结果

批号	吸光度值(A)	测得浓度(mg/mL)
XS0001	0.3823	0.0250
XS0002	0.3807	0.0249
XS0003	0.3732	0.0244
X01051	0.3739	0.0245
X01052	0.3802	0.0249
X01053	0.3872	0.0253
平均值	/	0.0249
RSD(%)	/	1.38

### 2.5 加样回收考察结果

经测定，该方法的平均加样回收率为 98.77%，RSD 值为 3.25%。见表 4。

本研究通过苯酚-硫酸比色法测定消渴丸中多糖含量，选择最大的吸收波长，建立吸光度值-葡萄糖浓度的线性回归方程，并进行精密度实验、重复性实验和加样回收实验。结果显示，最大吸收波长为 490 nm，吸光度值-葡萄糖浓度的线性回归方程： $A = 15.443C - 0.0042$ ，相关系数为  $R^2 = 0.9999$ ，线性范围为 0~0.0510 mg/mL。精密度实验平均吸光度值为 0.3656，RSD 为 0.90%，表明仪器精密性良好，检测结果的随机误差较小；重复性实验平均吸光度值为 0.3796，RSD 为 1.38%，表明该方法重复性稳定，检测结果的随机误差较小；平均加样回收率 98.77%，RSD 为 3.25%。

综上，通过精密度实验、重复性实验、加样回收率实验，表明采用苯酚-硫酸法测得的消渴丸中多糖含量准确度高、精密度良好、重复性稳定、加样回收率高，适用于消渴丸中多糖含量的测定。

郁症状,并能正向调整睡眠,延长睡眠时间,减少觉醒次数<sup>[10]</sup>。研究显示,新型抗抑郁药阿戈美拉汀起效快,对伴有失眠、焦虑、抑郁症临床疗效显著<sup>[11-12]</sup>。菊淀粉型寡糖同系物是巴戟天寡糖的主要成分,能提高脑内 NE、5-HT 及多巴胺水平,减轻细胞内钙离子超载,抗氧化应激,保护神经细胞,发挥抗抑郁作用<sup>[13-14]</sup>。本研究结果显示,与单用阿戈美拉汀相比,巴戟天寡糖联合阿戈美拉汀治疗脑梗死后抑郁疗效显著。

综上,巴戟天寡糖联合阿戈美拉汀治疗脑梗死后抑郁患者的临床疗效显著,能明显降低患者的抑郁评分,提高 NE、5-HT 含量,值得临床推广。

参 考 文 献

[1] 陈金凤,方明旺,肖成汉,等. 中国老年人日常生活活动能力与抑郁症状的关系研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(22):2852-2855,2862.

[2] 闵文蛟,马小红,李涛,等. 5-羟色胺和去甲肾上腺素转运蛋白基因多态性与抑郁症易感性的关联分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(4):388-392.

[3] 于志军,么宪伟,段新,等. 阿戈美拉汀治疗老年卒中后抑郁的临床疗效比较[J]. 中南药学, 2014, 12(7):708-710.

[4] 王轶,郭婷婷,尹勇玉,等. 菊淀粉型巴戟天寡糖对慢性应激模型小鼠抑郁、焦虑样行为的改善及对调节性 T 细胞数量的调节作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2022, 36(6):426-434.

[5] 中华医学会精神科分会. CCMD-3 中国精神障碍分类与诊断标准[M]. 3 版. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 32-39.

[6] 张明园. 精神科评定量表手册[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993: 27-28.

[7] 姚媛,周艺,周婷婷. 抑郁症致病机制及中药治疗抑郁症的机制研究[J]. 药事实践杂志, 2018, 36(3):193-197.

[8] 李晓英,张心华,姜秋波. 选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物在儿童青少年中使用的自杀风险研究进展[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(18):2098-2102.

[9] 宁征远,谢姗姗,李健,等. 阿戈美拉汀对脑梗死后抑郁病人血清去甲肾上腺素、5-羟色胺的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(17):2688-2690.

[10] 刘永超,何广宏,周春艳. 新型抗抑郁药阿戈美拉汀研究进展[J]. 中国药业, 2021, 30(18):120-123.

[11] 宁征远. 重复低频经颅磁刺激联合阿戈美拉汀治疗老年抑郁症的临床疗效[J]. 东南国防医药, 2019, 21(1): 62-64.

[12] 杜莉辉,黄金荣,邹称林等. 阿戈美拉汀治疗抑郁症的临床研究[J]. 中国当代医药, 2021, 28(10):106-108,116.

[13] 曹重阳,韩露,王克,等. 巴戟天寡糖联合帕罗西汀治疗抑郁症临床评价[J]. 中国药业, 2020, 29(6):148-150.

[14] 慕永刚,邓朔,张素贞,等. 巴戟天寡糖对抑郁症患者血浆 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(8): 926-929.

(收稿日期:2023-07-23)

(上接第 310 页)

参 考 文 献

[1] 李玉琴,俄洛吉,巩海凤,等. 基于 NLRP3 通路探讨山药多糖对妊娠糖尿病大鼠胎盘滋养层细胞自噬侵袭的影响[J]. 中医导报, 2022, 28(6):35-39.

[2] 田文国,刘毅,盖晓红,等. 地黄治疗 2 型糖尿病作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(23):7575-7584.

[3] 巴媛媛,王莹,朴美子. 苯酚-硫酸法测定瓦尼木层孔菌菌丝体多糖含量的条件优化[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5):389-391.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[5] 邹章,钟趣宜,苏鸿,等. 一种治疗糖尿病的药物组合物及其制备方法:中国, CN200610075069. 6[P]. 2006-11-15.

[6] 黎元元,倪青,谢雁鸣,等. 消渴丸治疗 2 型糖尿病临床应用专家共识[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24):5291-5293.

[7] 袁永亮,杜玥,宋之臻,等. 消渴丸中药成分与格列本脲协同作用治疗糖尿病的生物分子网络机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(12):971-980.

[8] 周杰,孙一蕊,邓海鸣,等. 消渴丸化学成分的研究[J]. 中成药, 2013, 35(10):2205-2209.

[9] 蔡振世. UPLC-MS/MS 法同时快速测定消渴丸中 3 种成分的含量[J]. 海峡药药, 2022, 34(12):52-55.

[10] 叶文才,苏碧茹,范春林,等. 治疗糖尿病的中药复方制剂消渴丸 HPLC 指纹图谱的建立方法及其 HPLC 指纹图谱:中国, CN201310179700. 7[P]. 2015-09-30.

[11] 徐昕. 多糖降血糖作用及其机制研究进展[J]. 医学信息, 2023, 36(2):180-183.

[12] 王云鹏,张晓苗,谢卫红,等. 天然活性多糖降血糖功能的研究进展[J]. 食品工业, 2023, 44(6):238-242.

(收稿日期:2023-07-10)