



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

## 黄芪多糖含量测定方法研究报告

### 前言

黄芪多糖是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根经提取、浓缩、纯化而成的水溶性杂多糖，淡黄色，粉末细腻，均匀无杂质，具引湿性。黄芪多糖由己糖醛酸、葡萄糖、果糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸等组成，可作为免疫促进剂或调节剂，同时具有抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、抗应激、抗氧化等作用。近年来，黄芪作为扶本固正类中草药饲料添加剂也已开始被用于畜牧业生产。

目前市场上的黄芪多糖规格繁多、价格各异，普遍存在着掺伪和以次充好的现象，如在黄芪多糖原料中添加红糖粉、葡萄糖、淀粉、糊精等。常用的苯酚-硫酸显色法，不能排除糊精、淀粉等添加成分的干扰，检测结果无参考意义。因此，寻找既适合黄芪多糖特点，又能排除红糖粉、葡萄糖、淀粉、糊精干扰的含量测定方法，对于有效杜绝黄芪多糖原料中的掺伪现象，具有非常重要的意义。

为此，我们对现有常用的多糖含量检测方法进行了仔细研究，确定了适合黄芪多糖特点的含量测定方法，整理成此报告，以供采购者参考。

### 一. (铜试剂沉淀) 葡聚糖的分光光度测定法

方法来源：白鸿，《保健食品功效成分检测方法》，2012，82-85

方法原理：分子量大于10000的高分子物质在80%乙醇溶液中沉淀，与水溶液中单糖和低聚糖分离，用碱性二价铜试剂选择性地从其他高分子物质中沉淀具有葡聚糖结构的多糖，再用苯酚-硫酸反应以碳水化合物形式比色测定其含量，其显色强度与粗多糖中葡聚糖的含量成正比，以此计算粗多糖含量。干扰因素试验表明，该法可有效排除蔗糖粉、葡萄糖、淀粉、糊精等的干扰。

#### 1.1 实验操作

##### 1.1.1 试剂配制

1) 乙醇溶液(80%)：20mL水中加入无水乙醇80mL，混匀。



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

- 2) 氢氧化钠溶液(100g/L): 称取10g氢氧化钠, 加水溶解并稀释至100mL, 加入固体无水硫酸钠至饱和, 备用。
- 3) 铜试剂储备液: 称取0.3gCuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 3.0g柠檬酸钠, 加水溶解并稀释至100mL, 混匀备用。
- 4) 铜试剂溶液: 取铜储备液50mL, 加水50mL, 混匀后加入固体无水硫酸钠12.5g并使其溶解。临用新配。
- 5) 洗涤剂: 取水50mL, 加入10mL铜试剂溶液, 50mL氢氧化钠溶液, 混匀, 临用新配。
- 6) 硫酸溶液(10%): 取10mL浓硫酸加入到80mL左右水中, 混匀, 冷却后稀释至10mL。
- 7) 苯酚溶液(50g/L): 称取精制苯酚5.0g, 加水溶解并稀释至100mL, 混匀。溶液置冰箱中可保存一月。
- 8) 葡聚糖标准储备溶液: 精密称在硫酸干燥器中干燥至恒重的葡聚糖标准品(葡聚糖T500, 购自都莱生物, 批号10115) 0.1005g, 加水溶解, 并定容至10mL, 混匀, 置冰箱中保存。此溶液每毫升含10.05mg葡聚糖。
- 9) 葡聚糖标准使用液: 吸取葡聚糖标准储备液1.00mL, 置于100mL容量瓶中, 加水至刻度, 混匀, 置冰箱中保存。此溶液每毫升含葡聚糖0.1005mg。

### 1.1.2 样品处理

#### 1) 试样提取:

自产黄芪粗多糖(水提, 80%乙醇沉淀所得, 黄色粉末, 批号170406);

自产精制黄芪多糖(黄芪粗多糖精制所得, 白色粉末, 批号170614)。

称取混合均匀的以上黄芪多糖样品各2.0g, 置于100mL容量瓶中, 加水80mL左右, 于沸水浴上加热2h, 冷却至室温后补加水至刻度, 混匀, 过滤, 弃去初滤液, 收集余下滤液供沉淀多糖。

2) 沉淀粗多糖: 精密取 1) 中滤液5.0mL, 置于5mL离心管中, 加入无水乙醇20mL, 混匀5min., 以3000rpm离心5min, 弃去上清液。残渣分别用80%乙醇溶



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

液数毫升洗涤，离心后弃上清液，反复3次操作。得残渣，用水溶解并定容至5.0mL，混匀，供沉淀葡聚糖。

3) 沉淀葡聚糖：精密吸取 2) 溶液2mL，置于20mL离心管中，分别加入100g/L氢氧化钠溶液2.0mL，铜试剂溶液2.0mL，沸水浴中煮沸2min，冷却，以3000rpm离心5min，弃去上清液。此处未见沉淀出现，测定无法进行。（按照本方法规定，残渣应分别用洗涤液2毫升洗涤，离心，弃去上清液，反复3次操作，残渣用10%硫酸溶液2.0 mL溶解并转移至50mL容量中，加水稀释至刻度，混匀。此溶液为试样测定液。）

### 1.2 补充实验：铜试剂沉淀多糖

1) 沉淀葡聚糖标准使用液：直接取 10mg/ml 的葡聚糖对照溶液 5ml，按照上述步骤操作，明显可见蓝色沉淀析出；

2) 沉淀香菇多糖：取市售香菇多糖样品 2.0g，按照上述步骤操作，有明显沉淀析出；

3) 沉淀黄芪多糖：取自制黄芪多糖粗品，精制黄芪多糖，市售黄芪多糖（合作企业提供）等多批，按照上述步骤多次操作，完全无固体沉淀析出。

### 1.3 实验讨论

该方法中碱性酮无法沉淀出黄芪多糖可能与下面原因有关：

该方法“注释”中明确指出：“本方法测定的水溶性多糖含有10个以上单糖残基”，而常用该法测定的香菇多糖、灵芝多糖、茯苓多糖等系由 $\beta$ -(1-3)或 $\beta$ -(1-6)糖苷键链接的葡聚糖；而梁图<sup>(1)</sup>等的研究中，黄芪多糖结构为1→4连接线性葡聚糖。因此，我们判断，黄芪多糖特有的结构，导致其不适用该方法进行含量测定。

由于该方法可有效排除蔗糖粉、葡萄糖，淀粉，糊精等的干扰（上述辅料不能被铜试剂所沉淀），因此，有些客户要求用该法进行黄芪多糖含量测定。

但事实证明，该方法不适用于黄芪多糖的含量测定。

参考文献：



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

1) 基于部分酸水解-亲水作用色谱-质谱的黄芪多糖结构表征; 梁图, 傅青, 辛华夏, 李芳冰, 金郁, 梁鑫淼; 《色谱》, 2014, 32 (12) 1306-1312

## 二. 粗多糖的蒽酮-硫酸分光光度测定法 (酶水解+80%醇沉处理样品)

方法来源: 白鸿, 《保健食品功效成分检测方法》, 2012, 76-78

方法原理: 多糖经乙醇沉淀分离后, 去除其他可溶性糖及杂质的干扰, 糖与硫酸在沸水浴中加热脱水生成羟甲基呋喃甲醛 (羟甲基糠醛), 再与蒽酮缩合成蓝绿色化合物, 其呈色强度与溶液中糖的浓度成正比, 在 620nm 波长下比色定量。由于比色法测定多糖并非特异性反应, 样品中的其他碳水化合物 (单糖, 双糖, 糊精, 淀粉) 均能与显色剂显色, 所以建议样品处理除 80%乙醇沉淀外, 应加入 $\alpha$ -淀粉酶及糖化酶 (如葡萄糖苷酶) 处理, 以避免淀粉, 糊精等的干扰。

### 2.1 实验操作

#### 2.1.1 试剂配制

- 1) 80% (V/V) 乙醇溶液: 20mL 水中加入无水乙醇 80mL, 混匀。
- 2) 葡萄糖标准溶液: 准确称取无水葡萄糖 0.4964g 加水溶解, 并定容至 50ml, 此溶液 1ml 含 9.928mg 葡萄糖, 再取 1ml 置于 100ml 容量瓶加水定容至刻度 (稀释 100 倍, 0.09928mg/ml)。
- 3) 80%硫酸溶液 (W/V): 量取蒸馏水 20ml 置于锥形瓶, 量取浓硫酸 80ml 缓慢加入, 混匀, 静置冷却至室温, 待用。
- 4) 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.5): 31.5ml (0.2mol/L) 磷酸氢二钠与 68.5ml (0.2mol/L) 磷酸二氢钠混合摇匀。
- 5) 0.1%蒽酮硫酸溶液: 取 0.1g 蒽酮, 缓慢加入 80%硫酸溶液 100ml, 至蒽酮溶解完, 溶解后呈黄色至绿色透明溶液。

#### 2.1.2 样品处理

##### 1) 试样提取:

自产黄芪粗多糖 (水提, 80%乙醇沉淀所得, 黄色粉末, 批号 170406);  
自产精制黄芪多糖 (黄芪粗多糖精制所得, 白色粉末, 批号 170614)。



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

称取混合均匀的以上黄芪多糖样品各 2.0g，置于 100mL 容量瓶中，加水 80mL 左右，于沸水浴上加热 2h，冷却至室温后补加水至刻度，混匀，过滤，弃去初滤液，收集余下滤液。

## 2) 酶水解

### A. $\alpha$ -淀粉酶水解

取 50ml 上述提取液置于 100ml 具塞锥形瓶中，冷却至 60°C 以下，加 1ml 10% 淀粉酶液（取北京奥博星 $\alpha$ -淀粉酶 2.5g 于 25ml 容量瓶中，加水至刻度定容）和 0.5ml 0.2M 磷酸盐缓冲液，加塞，置 58°C 酶解 1 小时；

### B. 糖化酶水解

继续往前一步水解液中分别加 0.5g 糖化酶（北京奥博星）于 58°C 以再水解 60min 后取出（用碘液检验是否水解完全，如不完全可延长水解时间至酶解液加碘液不变蓝色为止），于电炉上小心加热至沸腾灭酶，冷却，定容，过滤，取滤液沉淀粗多糖。

3) 沉淀粗多糖：分别准确吸取上滤液 5ml ( $V_2$ )，置于 50ml 离心管中，加入无水乙醇 20ml，混匀，与 4°C 冰箱静置 4 小时以上，以 4000r/min 离心 5min，弃去上清液，残渣用 80% (V/V) 乙醇溶液数毫升洗涤，离心后弃去上清液，反复操作 3 次。残渣用水溶解并定容至 10-25ml ( $V_3$ )（根据糖浓度而定）。

### 2.1.3 标准曲线的绘制

准确吸取葡萄糖标准使用液 0ml、0.20ml、0.40ml、0.60ml、0.80ml、1.00ml（相当于葡萄糖 0, 0.01, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10mg）置于 10ml 容量瓶中，补加水至 2.0ml，加入 0.1% 蒽酮硫酸溶液 6.0ml，小心摇匀，置沸水浴中 10min，取出，在流水中冷却 20min，用分光光度计在 625nm 波长处以试剂空白为参比，1cm 比色皿测定吸光度值。以葡萄糖质量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

### 2.1.4 样品测定

分别准确吸取样品待测液适量 ( $V_4$ )（含糖 0.02~0.100mg），按标准曲线



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

绘制步骤于625nm波长下测定吸光度值并求出样品含量。

$$X = \frac{m_1 \times V_1 \times V_3}{m_2 \times V_2 \times V_4} \times 100 \quad (\text{以葡萄糖计})$$

X---样品中粗多糖含量 (mg/100g)

m<sub>1</sub>---样品测定液中葡萄糖的质量 (mg)

m<sub>2</sub>---样品质量 (g)

V<sub>1</sub>---样品提取液总体积 (ml)

V<sub>2</sub>---沉淀粗多糖所用样品提取液体积 (ml)

V<sub>3</sub>---粗多糖溶液体积 (ml)

V<sub>4</sub>---测定用样品液体积 (ml)

### 2.1.5 实验结果

#### 1) 标准曲线:

葡萄糖取样量 (ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
葡萄糖的质量 (mg)	0.019856	0.039712	0.059568	0.079424	0.09928	0.119136
吸光度 (A)	0.131	0.256	0.36	0.479	0.6	0.727

根据所得数据制作散点图,在 0.019856-0.119136mg, 范围内线性关系良好, 得

回归方程  $A=5.9442m+0.0124$ ,  $R^2=0.9993$



成都锦泰和医药化学技术有限公司

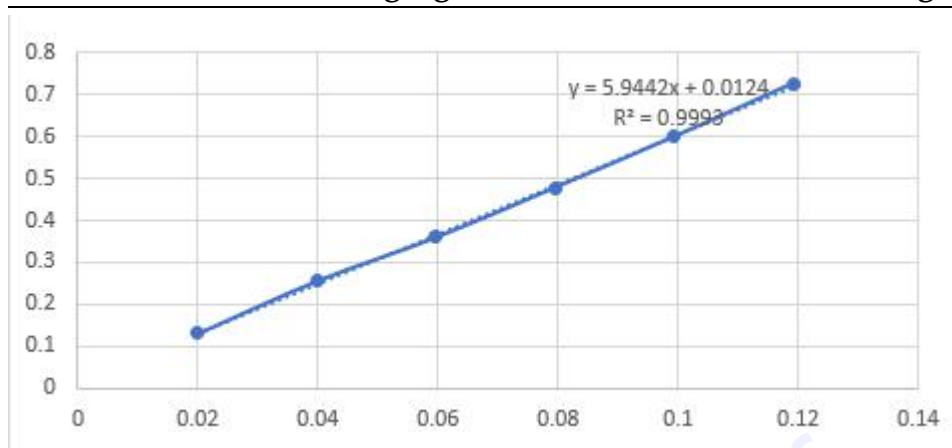
Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com



## 2) 样品含量测定

分别测得上述样品吸光度，带入公式计算含量。

自产黄芪粗多糖（水提，80%乙醇沉淀所得，黄色粉末，批号 170406） 18.23%  
（以葡萄糖计）；

自产精制黄芪多糖（黄芪粗多糖精制所得，白色粉末，批号 170614） 65.32%  
（以葡萄糖计）。

## 2.2 补充实验：

称取糊精适量，分别采用不同的样品处理方法，然后采用蒽酮-硫酸分光光度测定法进行测量。

### 糊精的多糖含量测定

样品处理方法	含量（以葡萄糖计）
溶于水后直接测定	<b>108.50%</b>
80%乙醇沉淀后测定	<b>49.69%</b>
酶处理+80%乙醇沉淀后测定	<b>1.45%</b>

采用蒽酮-硫酸分光光度测定法进行多糖含量的测定，样品处理应采用酶处理+80%乙醇沉淀的方法，确实能有效排除蔗糖粉、葡萄糖，淀粉，糊精等的干扰，得到更真实可靠的结果。

## 三. 粗多糖的苯酚-硫酸分光光度测定法（酶水解+80%醇沉处理样品）

方法来源：白鸿，《保健食品功效成分检测方法》，2012，73-76



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

方法原理：多糖样品经 $\alpha$ -淀粉酶及糖化酶（如葡萄糖苷酶）处理，乙醇沉淀分离后，去除其他可溶性糖及杂质的干扰，再与苯酚-硫酸作用成橙红色化合物，其呈色强度与溶液中糖的浓度成正比，在 485nm 波长下比色定量。

### 3.1 实验操作

#### 3.1.1 试剂配制

- 1) 80% (V/V) 乙醇溶液：20mL水中加入无水乙醇80mL，混匀
- 2) 葡萄糖标准溶液：准确称取无水葡萄糖0.5061g（购自科龙化工）加水溶解，并定容至50ml，此溶液1ml含10.122mg葡萄糖，再取1ml置于100ml容量瓶加水定容至刻度（稀释100倍，0.10122mg/ml）。
- 3) 5%苯酚溶液 (W/V)：称取精制苯酚5.0g，置于100ml容量瓶，加水溶解并稀释至刻度线，混匀。
- 4) 0.2mol/L磷酸盐缓冲液 (pH6.5)：31.5ml (0.2mol/L) 磷酸氢二钠与68.5ml (0.2mol/L) 磷酸二氢钠混合摇匀。

#### 3.1.2 样品处理（与“二、粗多糖的蒽酮-硫酸分光光度测定法”相同）

##### 1) 试样提取：

自产黄芪粗多糖（水提，80%乙醇沉淀所得，黄色粉末，批号 170406）；

自产精制黄芪多糖（黄芪粗多糖精制所得，白色粉末，批号 170614）。

称取混合均匀的以上黄芪多糖样品各 2.0g，置于 100mL 容量瓶中，加水 80mL 左右，于沸水浴上加热 2h，冷却至室温后补加水至刻度，混匀，过滤，弃去初滤液，收集余下滤液。

##### 2) 酶水解

###### A. $\alpha$ -淀粉酶水解

取 50ml 上述提取液置于 100ml 具塞锥形瓶中，冷却至 60°C以下，加 1ml 10% 淀粉酶液（取北京奥博星 $\alpha$ -淀粉酶 2.5g 于 25ml 容量瓶中，加水至刻度定容）和 0.5ml 0.2M 磷酸盐缓冲液，加塞，置 58°C酶解 1 小时；

###### B. 糖化酶水解





成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

继续往前一步水解液中分别加 0.5g 糖化酶(北京奥博星)于 58°C 以再水解 60min 后取出(用碘液检验是否水解完全,如不完全可延长水解时间至酶解液加碘液不变蓝色为止),于电炉上小心加热至沸腾灭酶,冷却,定容,过滤,取滤液沉淀粗多糖。

3) 沉淀粗多糖: 分别准确吸取上滤液 5ml (V<sub>2</sub>), 置于 50ml 离心管中, 加入无水乙醇 20ml, 混匀, 与 4°C 冰箱静置 4 小时以上, 以 4000r/min 离心 5min, 弃去上清液, 残渣用 80% (V/V) 乙醇溶液数毫升洗涤, 离心后弃去上清液, 反复操作 3 次。残渣用水溶解并定容至 10-25ml (V<sub>3</sub>) (根据糖浓度而定)。

### 3.1.3 标准曲线的绘制

准确吸取葡萄糖标准使用液 0ml、0.20ml、0.40ml、0.60ml、0.80ml、1.00ml (相当于葡萄糖 0mg、0.02mg、0.04mg、0.06mg、0.08mg、0.10mg) 置于 25ml 容量瓶中, 补加水至 2.0ml, 加入 5% 苯酚溶液 1.0ml, 混匀, 小心加入浓硫酸 10ml, 小心混匀, 置沸水浴中 2min, 冷却至室温, 用分光光度计在 485nm 波长处以试剂空白为参比, 1cm 比色皿测定吸光度值。以葡萄糖质量为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线。

### 3.1.4 样品测定

准确吸取样品测定液适量 (V<sub>4</sub>) (含糖 0.02~0.08mg) 置于 25ml 容量瓶中, 补加水至 2.0ml, 然后按上法测定吸光度值。从标准曲线上查出葡萄糖含量, 计算样品中粗多糖含量, 以葡萄糖计。

$$m_1 \times V_1 \times V_3$$

$$X = \frac{\quad}{m_2 \times V_2 \times V_4} \times 100 \quad (\text{以葡萄糖计})$$

$$m_2 \times V_2 \times V_4$$

X---样品中粗多糖含量 (mg/100g)

m<sub>1</sub>---样品测定液中葡萄糖的质量 (mg)

m<sub>2</sub>---样品质量 (g)

V<sub>1</sub>---样品提取液总体积 (ml)



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

$V_2$ ----沉淀粗多糖所用样品提取液体积 (ml)

$V_3$ ----粗多糖溶液体积 (ml)

$V_4$ ----测定用样品液体积 (ml)

### 3.1.5 实验结果

#### 1) 标准曲线:

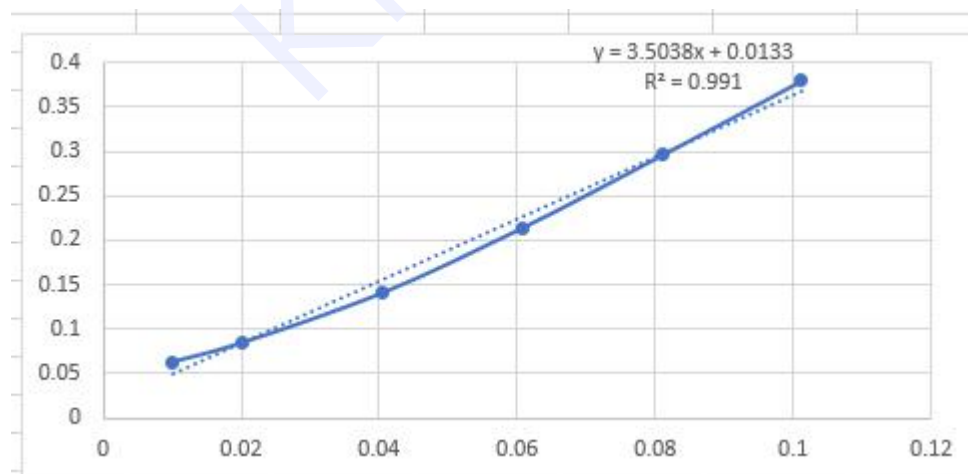
##### 1) 加淀粉酶, 糖化酶组对照品吸光度原始数据:

以相应的试剂作空白。紫外分光光度法在 485nm 波长处测定

在此波长测定各吸光度值, 记录实验结果, 见表

葡萄糖的质量 (mg)	0.010122	0.020244	0.040488	0.060732	0.080976	0.10122
吸光度 (A)	0.063	0.085	0.141	0.214	0.296	0.380

根据所得数据制作散点图, 在 0.010122-0.10122mg, 范围内线性关系良好, 得回归方程  $A = 3.5038m + 0.0133$ ,  $R^2 = 0.991$



#### 2) 样品含量测定

分别测得上述样品吸光度, 带入公式计算含量。

自产黄芪粗多糖 (水提, 80%乙醇沉淀所得, 黄色粉末, 批号 170406) 22.25%



成都锦泰和医药化学技术有限公司

Chengdu King-tiger Pharm-Chem. Tech. Co., LTD

Tel: 0086-28-85317716

Fax: 0086-28-85317710

E-mail: sales@king-tiger.com

Website: www.king-tiger.com

(以葡萄糖计)；

自产精制黄芪多糖（黄芪粗多糖精制所得，白色粉末，批号 170614） 71.72%

(以葡萄糖计)。

在样品处理方法相同的条件下，采用苯酚-硫酸法的检测结果较蒽酮-硫酸法的稍高。分析可能原因在于两种方法中，水解多糖的硫酸浓度不一样，前者浓度稍高，水解更完全所导致。

如黄芪粗多糖（批号 170406）样品不经酶水解+80%醇沉处理，直接溶解后采用本法测定，则测得多糖含量为 68.9%。虽然本样品未添加任何辅料，但结果仍相差较大的原因在于样品未经过 80%醇沉，测定的含量结果中包含了单糖的含量。

综上所述：

- 1) 个别客户要求按“(铜试剂沉淀)葡聚糖的分光光度测定法”进行黄芪多糖的含量测定，经实验证实，该方法不适用于黄芪多糖的含量测定。
- 2) 由于目前市场上的黄芪多糖普遍存在着掺伪和以次充好的现象，在检测黄芪多糖含量时，为得到真实可靠的结果，不论采用何种显色方式，样品均应先采用 $\alpha$ -淀粉酶及糖化酶（如葡萄糖苷酶）处理。
- 3) 建议黄芪多糖的检测方法采用“粗多糖的苯酚-硫酸分光光度测定法（酶水解+80%醇沉处理样品）”，方法来源详见“白鸿，《保健食品功效成分检测方法》，2012，73-76”，该方法即适合黄芪多糖特点，又能通过酶处理、乙醇沉淀等步骤排除红糖粉、葡萄糖，淀粉，糊精及小分子多糖的干扰，可有效杜绝黄芪多糖原料中的掺伪现象。检测结果为较大分子多糖（分子量大于 10000）的准确含量。

实验设计：苏俊

撰写者：苏俊

审定者：陈谨

2017.8