维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0570-05

# 葡聚糖 T20 作为白芨多糖含量测定标准品可行性研究

匡 扶,朱照静,马俐丽,程安媛

(重庆医科大学药学院药剂教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:采用星点设计—效应面法(Central composite design-response surface methodology,CCD-RSM),考察蒽酮—硫酸法测量白芨多糖含量的可行性和适用条件。方法:以葡聚糖 T20 为标准品,以多糖溶液与蒽酮试剂比例、水解显色时间、室温冷却时间为自变量,621.0nm 处的吸光度为因变量,对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合,考察因变量和自变量间的相互关系,采用效应面法优化蒽酮—硫酸法测量白芨多糖含量的适用条件。结果:当多糖溶液与蒽酮试剂比例为 1∶2,水解显色时间 8.00min,室温冷却放置 15.00min 时,测定葡聚糖 T20 和白芨多糖含量具有良好的相关性。结论:星点设计—效应面法可以用于评估以葡聚糖 T20 为标准品、蒽酮—硫酸法测量白芨多糖含量的可行性,并优化测量含量的适用条件。

【关键词】葡聚糖 T20;白芨多糖;星点设计 - 效应面法;蒽酮 - 硫酸法;含量测定

【中国图书分类法分类号】R931.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-16

# The study on feasibility of determinating the polysaccharide isolated from bletilla striata using dextron T20 as standard substance

*KUANG Fu,et al*

(*Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To optimize the condition of anthrone-sulfuric acid method to determine the polysaccharide isolated from Bletilla striata by central composite design/response surface methodology. *Methods*: Dextron T20 was a standard substance, independent variables were the ratio of the polysaccharide and anthrone-sulfuric acid, the time of color hydrolysis and the cooling time at room temperature, dependent variable was the UV absorption. nonlinear mathematic models were used to estimate the relationship between independent and dependent variables. Response surface methodology was used to optimize he condition of determination. *Results*: The optimum conditions of determination: the volume ratio of the polysaccharide and anthrone-sulfuric acid is 1:2; the time of color hydrolysis is 8.00 min; the cooling time at room temperature is 15.00min. On this condition, there was favorable correlation between the absorption of Dextron T20 and polysaccharide of Bletilla striata. *Conclusions*: Central composite design/response surface methodology can be used to evaluate the feasibility and applicable conditions of the anthrone-sulfuric acid method to determine the polysaccharide isolated from Bletilla striata using Dextron T20 as a standard substance.

【Key words】 Dextron T20; Polysaccharide of Bletilla striata; Central composite design, Response surface methodology; Anthrone-sulfuric acid method; Content determination

白芨多糖为兰科植物白芨(Bletilla striata(Thunb.) Reichb.f.)干燥块茎经水提醇沉法制得的一种高分子化合物,其主要有效成分为一种粘性多糖[1]。多糖含量测定方法主要有:蒽酮 - 硫酸法[2]、苯酚 - 硫酸法、地衣酚 - 硫酸法、3,5- 二硝基水杨酸盐(DNS)比色法等,所有测定方法都没有自身标准品,显色过程影响因素多,常导致测定结果的重现性和准确性均较差。CCD-RSM 是集数学和统计学方法于一体的实验设计方法[3],通过次数较少的实验,采用非线性数学模型拟合,可获得优化的实验条件。本实验采用 CCD-RSM 考察葡聚糖 T20 作标准品,蒽酮—硫酸法多糖含量测定的可行性和适用条件。

作者介绍:匡 扶(1982- ),女,硕士,研究方向:药物新剂型和新技术。

通讯作者:朱照静,男,教授,E-mail:zhaojing6271@yahoo.com.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

紫外可见分光光度仪(岛津 3150);电子分析天平(Met-

维普资讯 http://www.cqvip.com



tler AB204-E);电子恒温水浴锅(上海仪表 H-S·G-IC-2)。

1.2 试剂

葡聚糖 T20(Dextron,瑞典 Pharmacia,批号 20061126),白芨多糖(江阴市三盛生物技术有限公司,批号 20040716,标示含量 63.5%),蒽酮(分析纯,上海楷洋生物有限公司,批号 20051102)浓硫酸(分析纯,重庆川江试剂公司,批号 20070911),蒸馏水(自制)。

1.3 溶液配制

1.3.1 标准溶液配制 精密称取干燥至恒重的葡聚糖 T20 10.2mg,加水使溶解并稀释至 250ml,配成 40.8mg/L 的聚糖 T20 标准溶液。

1.3.2 蒽酮试剂 精密称取蒽酮 0.20g,加 100ml 浓硫酸使溶解,置棕色瓶中。

1.3.3 样品溶液配制 精密称取白芨多糖 16.0mg,加水使溶解并稀释至 250ml,配成 64.0mg/L 的样品溶液。

1.4 实验原理

蒽酮 - 硫酸法是糖类与浓硫酸在沸水浴中迅速脱水生成糖醛或其衍生物,再与蒽酮试剂缩合,形成蓝绿色溶液,在 620.0nm 处有最大吸收,吸收度与多糖的含量呈线性关系[4]。

1.5 最大吸收波长确立

分别精密吸取葡聚糖 T20 溶液、白芨多糖溶液各 2.00ml 于 15ml 具塞试管中,另取 2.00ml 蒸馏水作空白对照,将 3 支试管置于冰水浴中,分别加入 5.00ml 蒽酮试剂,沸水浴中 10.00min,室温放置 15.00min,在 450 ~ 800nm 扫描,在 621.0nm 处有最大吸光度。

## 2 方法与结果

表 1 3 个考察因素的代码水平及对应物理量

| 因素 | 水平 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | -1.732 | -1 | 0 | +1 | +1.732 |
| $X_{1(ml)}$ | 3 | 3.85 | 5 | 6.15 | 7 |
| $X_{2(min)}$ | 5 | 7.11 | 10 | 12.89 | 15 |
| $X_{3(min)}$ | 5 | 11.34 | 20 | 28.66 | 35 |

2.1 星点设计与测量结果

在单因素实验的基础上,选择蒽酮试剂加入量($X_1$)、水解时间($X_2$)和水解后放置时间($X_3$)三者为自变量,葡聚糖 T20 和白芨多糖在 621.0nm 处的吸收度为因变量(Y)。取多糖溶液 2.00ml,蒽酮试剂加入量 $X_1$:3.00 ~ 7.00ml,沸水浴水解时间 $X_2$:5.00 ~ 15.00min,水解后放置时间 $X_3$:5.00 ~ 35.00min。实验方案设计成 3 因素 5 水平,各因素水平的代码值和实际操作值按星点设计原理确定[3],各因素水平取值见表 1。分别考察葡聚糖 T20 和白芨多糖在 621.0 nm 波长下的吸光度与上述 3 因素间的关系,实验安排及测量结果见表 2。

2.2 模型拟合

以多糖在 621.0nm 处的吸光度为因变量,用 SAS 软件包对各因素进行多元非线性回归二项式拟合,通过拟合方程的回归系数 $R^2$ 对方程进行准确性检测,根据最优方程绘制效应面和等高线,确定优

表 2 实验安排及测量结果

| 实验代号 | 蒽酮试剂 $X_1$ | 水解时间 $X_2$ | 放置时间 $X_3$ | T20Abs(621.0nm)$Y_1$ | 白芨 Abs(621.0nm)$Y_2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 0.626 | 0.591 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | 0.449 | 0.422 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | 0.528 | 0.520 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | 0.376 | 0.403 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | 0.653 | 0.602 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | 0.447 | 0.451 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | 0.513 | 0.533 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | 0.374 | 0.409 |
| 9 | -1.732 | 0 | 0 | 0.533 | 0.521 |
| 10 | +1.732 | 0 | 0 | 0.399 | 0.360 |
| 11 | 0 | -1.732 | 0 | 0.527 | 0.532 |
| 12 | 0 | +1.732 | 0 | 0.471 | 0.457 |
| 13 | 0 | 0 | -1.732 | 0.551 | 0.472 |
| 14 | 0 | 0 | +1.732 | 0.564 | 0.480 |
| 15 ~ 20 | 0 | 0 | 0 | 0.5722 | 0.4835 |

注:15 ~ 20 组吸收度是其平均值。

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 3 葡聚糖 T20 二项式非线性估计结果

| | 估计值 | 标准误 | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| $b_0$ | 0.013 39 | 0.315 56 | 0.04 | 0.967 0 |
| $b_{vb}$ | 0.195 67 | 0.077 60 | 2.52 | 0.030 3 |
| $b_2$ | 0.039 02 | 0.029 01 | 1.35 | 0.200 3 |
| $b_3$ | 0.007 18 | 0.008 97 | 0.80 | 0.442 3 |
| $b_4$ | −0.028 24 | 0.006 40 | −4.41 | 0.001 3 |
| $b_5$ | −0.003 20 | 0.001 02 | −3.13 | 0.010 6 |
| $b_6$ | −0.000 095 62 | 0.000 113 57 | −0.84 | 0.419 5 |
| $b_7$ | 0.039 02 | 0.003 60 | 0.96 | 0.358 5 |
| $b_8$ | −0.000 200 82 | 0.001 20 | −0.17 | 0.870 4 |
| $b_9$ | −0.000 209 77 | 0.000 477 44 | −0.44 | 0.669 7 |

$R^2$=0.903 1, $P$<0.000 5

表 4 白芨多糖二项式非线性估计结果

| | 估计值 | 标准误 | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| $b_0$ | 0.860 21 | 0.178 85 | 4.81 | 0.000 7 |
| $b_1$ | −0.006 67 | 0.043 98 | −0.15 | 0.882 4 |
| $b_2$ | −0.039 33 | 0.016 44 | −2.39 | 0.037 8 |
| $b_3$ | 0.000 167 | 0.005 09 | 0.03 | 0.974 4 |
| $b_4$ | −0.007 79 | 0.00 363 | −2.15 | 0.057 3 |
| $b_5$ | 0.000 919 31 | 0.000 579 05 | 1.59 | 0.143 5 |
| $b_6$ | 0.000 019 80 | 0.000 064 36 | 0.31 | 0.764 7 |
| $b_7$ | 0.002 97 | 0.002 04 | 1.46 | 0.175 5 |
| $b_8$ | 0.000 138 | 0.000 680 01 | 0.20 | 0.843 2 |
| $b_9$ | −0.000 105 | 0.000 270 59 | −0.39 | 0.706 4 |

$R^2$=0.944 5, $P$<0.000 1

表 5 葡聚糖 T20 简化处理后各系数

| | 估计值 | 标准误 | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| $b_1$ | 0.210 30 | 0.028 77 | 7.31 | <0.000 1 |
| $b_2$ | 0.047 94 | 0.014 27 | 3.36 | 0.004 0 |
| $b_4$ | −0.026 67 | 0.003 01 | −8.85 | <0.000 1 |
| $b_5$ | −0.003 00 | 0.000 716 31 | −4.18 | 0.000 7 |

表 6 白芨多糖简化处理后各系数

| | 估计值 | 标准误 | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| $b_0$ | 0.859 06 | 0.062 26 | 13.80 | <0.000 1 |
| $b_2$ | −0.040 61 | 0.012 34 | −3.29 | 0.004 9 |
| $b_4$ | −0.008 11 | 0.001 57 | −5.18 | 0.000 1 |
| $b_5$ | 0.000 893 70 | 0.000 496 81 | 1.80 | 0.092 2 |
| $b_7$ | 0.002 91 | 0.001 54 | 1.89 | 0.078 7 |

维普资讯 http://www.cqvip.com



化区，在优化区选择有代表性的显色条件进行验证，计算理论值与实际值之间的偏差。

通过非线性二项式拟合模型：$Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1^2+b_5X_2^2+b_6X_3^2+b_7X_1X_2+b_8X_1X_3+b_9X_2X_3$，其拟合结果分别见表 3 和表 4。

两者的二项式方程分别为：

葡聚糖 T20：

$Y_1=0.013\ 39+0.195\ 67X_1+0.039\ 02X_2+0.007\ 18X_3-0.028\ 24X_1^2-0.003\ 20X_2^2-0.000\ 09562X_3^2-0.039\ 02X_1X_2-0.000\ 200\ 82X_3X_1-0.000\ 209\ 77X_3X_2$

（$R^2=0.903\ 1$，$P<0.000\ 5$）

白芨多糖：

$Y_2=0.860\ 21-0.006\ 67X_1-0.039\ 33X_2+0.000\ 167X_3-0.007\ 79X_1^2+0.000\ 919X_2^2+0.000\ 019\ 80X_3^2+0.002\ 97X_1X_2+0.000\ 138X_3X_1-0.000\ 105\ X_3X_2$

（$R^2=0.944\ 5$，$P<0.000\ 1$）

两者拟合方程的复相关系数均较低，通过软件包对 9 个系数分别进行方差分析，为了防止意外丢失某些项，认为 $P>0.2$ 的项不可信，删除这些项，再进行非线性估计简化模型。简化处理后，再次拟合的结果见表 5 和表 6。

简化后的方程：

葡聚糖 T20：$Y_1=0.213X_1+0.047\ 94X_2-0.026\ 67X_1^2-0.003X_2^2$（$R^2=0.997\ 6$）

白芨多糖：$Y_2=0.859\ 06-0.040\ 61X_2-0.008\ 11X_1^2+0.000\ 893\ 7X_2^2+0.002\ 91X_1X_2$

（$R^2=0.937\ 1$）

二项式方程简化前后，复相关系数变化幅度不大，说明删除 $P>0.2$ 的项不会对模型造成显著影响，简化方程仍然具有较高的可信度。从以上两个方程可以看出，因素一（蒽酮试剂加入量）和因素二（沸水浴水解显色时间）对多糖显色程度有较大影响，因素三（放置时间）在 5.00 ~ 35.00min 内没有显著影响。

### 2.3 模型优化与预测

根据所建立的数学模型描绘三维效应面图 1 和图 2，在优化区域内多糖水解显色充分，吸光度值较大，从效应面的较优区域直接读取较佳测量条件范围，两者所选择的较佳条件通过叠加，判断葡聚糖 T20 作为白芨多糖含量测定标准品的可行性，筛选适用范围，从而提高白芨多糖含量测定的准确度。

从图 3 和图 4 中可知，含有相等质量多糖的葡聚糖 T20 和白芨多糖溶液，其测定含量时的效应面图不能完全重叠，即等质量浓度的多糖溶液在相同显条件下吸光度不是完全相同，所以葡聚糖 T20 不是在所有条件下都可以作白芨多糖的标准品。从图 5 可知，等质量浓度葡聚糖 T20 和白芨多糖在阴影面积区内吸光度相差较小，即 $X_1$ 为 3.75 ~ 4.50ml、$X_2$ 为 6.00 ~ 9.00min，葡聚糖 T20 可作为白芨多糖含量测定的标准品。在优化范围内随机选取 3 个具有代表性的点，分别考察白芨多糖和葡聚糖 T20 在相应条件下的吸光度，将其预测值与模型实测值比较，计算偏差[偏差＝（预测值－实际值）/ 预测值 × 100%]，检测所得偏差分别为 6.43% 和 4.82%，偏差均较小，优化区是可信的。此区域内，以葡聚糖 T20 为标准品，测定白芨多糖含量具有良好的相关性。

综合考虑操作方便，降低检测成本等因素后确定以葡聚糖 T20 为标准品测量白芨多糖含量的条件为：蒽酮试剂 4.00ml（多糖溶液与蒽酮试剂的体积比为 1:2）、沸水浴水解显色时间8.00min、水解后放置时间 15.00min。

## 3 讨 论

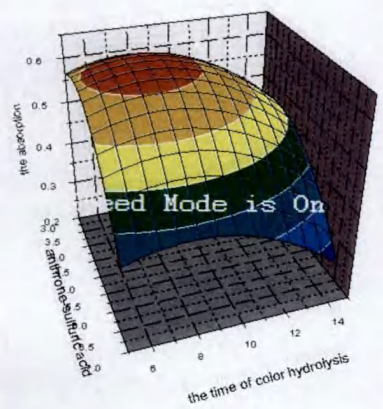



图 1 葡聚糖 T20 效应面图

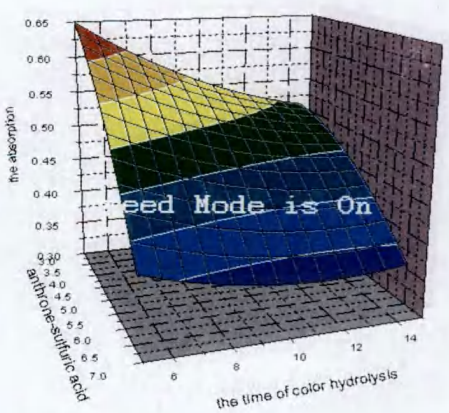



图 2 白芨多糖效应面图

维普资讯 http://www.cqvip.com



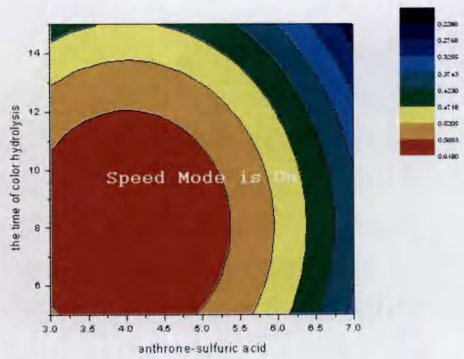



图 3 葡聚糖 T20 效应面等高图

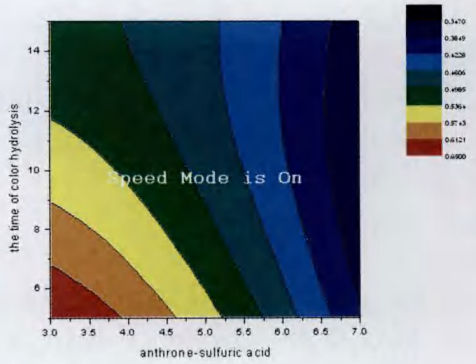



图 4 白芨多糖效应面图等高图

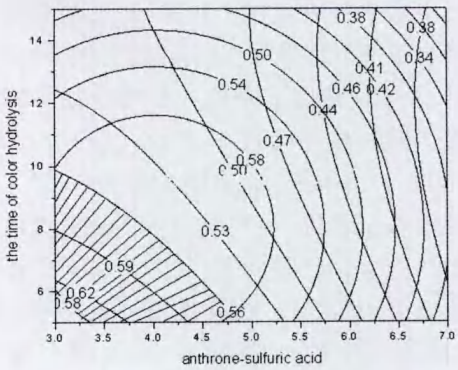



图 5 葡聚糖 T20 与白芨多糖效应面重叠等高图

### 3.1 CCD-RSM

CCD-RSM 主要用于处方和工艺的优化筛选[3]，通过建立数学模型判断各因素对效应值的影响程度，目前尚未见用于含量测定条件优化的报道。多糖的显色反应受多因素影响，引入星点设计可考察各因素对效应值的影响，同时考察各因素间的交互作用。通过效应面法可直观准确的判定含量测定的优化区域，从而判断葡聚糖 T20 作标准品的可行性。

### 3.2 影响多糖含量测定的因素

目前多糖自身没有标准品，在制作标准曲线的标准品的选用上普遍存在争议。目前研究人员的多选用葡萄糖这一单糖作为标准品，因其价格低廉，来源丰富。但水溶性多糖均由 β(1-3)或 β(1-6)糖苷键连接葡聚糖构成主链和支链，有的甚至就是 β-葡聚糖，比色法不能区分单糖和聚糖，多糖含量测定的准确性在很大程度上取决于标准品。比色法通常用浓硫酸短时间水解多糖，对于分子量较小的多糖，高浓度的硫酸可以在较短时间内将其水解成聚糖和单糖，但当多糖的分子量较大时，水解程度很难控制的。因此，葡萄糖做标准品，势必对大分子的多糖样品的含量测量带来很大的误差。国内外学者的研究表明：当标准品与被测样品的结构类似时，比色法测定得到的结果准确[5]；大分子多糖分别采用葡萄糖和葡聚糖做标准品测定含量时，前者测的结果偏高[6,7]。

### 3.3 葡聚糖 T20 作为标准品

葡聚糖和白芨多糖的结构类似，但标准品葡聚糖 T20 的分子量分布极窄，白芨多糖的分子量分布较宽，不适宜的水解显色条件下，水解程度不同，导致其相关性较差。从图 3 和 4 也可以看出葡聚糖 T20 的最大吸光度值区域与白芨多糖的最大吸光度值区域不能完全重合。图 5 的阴影部分所代表的水解显色条件下，含有等质量多糖的葡聚糖 T20 和白芨多糖的吸光度呈显良好的线性关系，这一条件范围内，葡聚糖 T20 才可作为白芨多糖含量测定的标准品，测量值才能更接近多糖含量的真实值。

## 参 考 文 献

[1] 郑虎占，董泽宏.中药现代研究与应用[M]. 北京：人民卫生出版社，1997.1592-1610.

[2] 芦金清，张亚东.白芨胶的实验研究[J]. 中成药，1996；18(12)：2.

[3] Wu W，Cui GH. Central composite design-response surface methodology and its application in pharmaceutics[J]. Foreign Med Sci (Pharm)，2000；27(5)：292-298.

[4] 易剑平，毕雅静，宋秀荣，等.蒽酮—硫酸法测定枸杞多糖质量分数的研究[J]. 北京工业大学学报，2005；31(6)：642-646.

[5] Hall MB. Challenges with nonfiber carbohydrate methods[J]. Animal Science，2003；81(12)：3226-3232.

[6] 胡居吾，范青生，肖小年.粗多糖测定方法的研究[J]. 江西食品工业，2005；1(1)：16-18.

[7] 李明元.真菌粗多糖测定方法的研究[J]. 食品研究与开发，2007；5(28)：118-121.

(责任编辑：冉明会)