

DNS法探究泰山黄精九蒸九制过程多糖含量变化

鲍珊珊^{1*}, 张 倩², 刘富垒^{1,3#}

¹青岛大学附属泰安市中心医院泰山医学科学院、山东省医药卫生微环境智能响应生物医用材料重点实验室, 山东 泰安

²青岛大学附属泰安市中心医院药学部, 山东 泰安

³青岛大学附属泰安市中心医院肿瘤精确干预与转化医学实验室, 山东 泰安

收稿日期: 2025年4月29日; 录用日期: 2025年5月12日; 发布日期: 2025年8月20日

摘 要

目的: 建立3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法探究泰山黄精生品及九蒸九制各炮制品多糖含量变化。方法: 精密量取黄精多糖溶液2.0 mL, 加入盐酸溶液(6 mol/L) 2.0 mL摇匀后90℃水浴水解10 min, 滴加3滴甲基红试剂摇匀后用氢氧化钠溶液(6 mol/L)中和至浅黄色, 冷却后定容至10 mL得供试品溶液; 精密量取供试品溶液2.0 mL, 添加DNS试剂1.0 mL, 90℃水浴显色10 min, 冷却后测定吸光度。结果: 经过检测波长及条件的探索、方法学考察, DNS法测定泰山黄精多糖含量结果准确、可靠, 可重复, 溶液稳定。结论: 泰山黄精生品到二蒸二制多糖含量迅速下降, 二蒸二制到九蒸九制多糖含量变化不大。

关键词

3,5-二硝基水杨酸, 黄精, 黄精多糖, 含量测定

Changes of Polysaccharide Content during Nine-Steam and Nine-Processing of *Polygonatum sibiricum* on Mount Tai by DNS Method

Shanshan Bao^{1*}, Qian Zhang², Fulei Liu^{1,3#}

¹Taishan Academy of Medical Sciences and Shandong Provincial Key Medical and Health Laboratory of Microenvironment Response Biomedical Materials, The Affiliated Tai'an City Central Hospital of Qingdao University, Tai'an Shandong

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 鲍珊珊, 张倩, 刘富垒. DNS 法探究泰山黄精九蒸九制过程多糖含量变化[J]. 药物化学, 2025, 13(3): 258-265.
DOI: 10.12677/hjmce.2025.133027

²Pharmaceutical Department, The Affiliated Tai'an City Central Hospital of Qingdao University, Tai'an Shandong

³Tumor Precise Intervention and Translational Medicine Laboratory, The Affiliated Tai'an City Central Hospital of Qingdao University, Tai'an Shandong

Received: Apr. 29th, 2025; accepted: May 12th, 2025; published: Aug. 20th, 2025

Abstract

Objective: A 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) colorimetric method was established to explore the changes of polysaccharide content in raw *Polygonatum sibiricum* and processed *Polygonatum sibiricum* in Mount Tai. **Methods:** Accurately measure 2.0 mL of *Polygonatum* polysaccharide solution, add 2.0 mL of hydrochloric acid solution (6 mol/L) and shake it evenly, then hydrolyze it in a 90°C water bath for 10 min, add 3 drops of methyl red reagent and shake it evenly, then neutralize it with sodium hydroxide solution (6 mol/L) to light yellow, and after cooling, fix the volume to 10 mL to obtain a test solution; accurately measure 2.0 mL of test solution, add 1.0 mL of DNS reagent, develop color in 90°C water bath for 10 min, and then measure absorbance after cooling. **Results:** Through the exploration of detection wavelength and conditions and methodological investigation, DNS method for the determination of polysaccharide content of *Polygonatum sibiricum* in Mount Tai is accurate, reliable, repeatable and the solution is stable. **Conclusion:** The content of polysaccharide in crude *Polygonatum sibiricum* from Mount Tai to two-steaming and two-processing decreased rapidly, and there was little change from two-steaming and two-processing to nine-steaming and nine-processing.

Keywords

3,5-Dinitrosalicylic Acid, *Polygonatum sibiricum*, *Polygonatum sibiricum* Polysaccharide, Content Determination

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黄精又名仙人余粮、野生姜、鸡头参等，最早记载于《名医别录》，历代本草典籍中都对其有详细的形态描述[1]。泰山黄精最早详细记载于名医高宗岳的《泰山药物志》中，与泰山何首乌、泰山参、泰山紫草被誉为“泰山四大名药”，且居于首位[1][2]。黄精药理作用广、生物学活性多，其成分中黄精多糖含量较高，与之相关的研究也多[3]。

还原糖的含量测定方法有色谱法、滴定法、比色法等。比色法常用的有蒽酮-硫酸法、苯酚-硫酸法、DNS法，其中DNS法也被用于水果及制品、中草药等还原糖、总糖或多糖的含量测定，该方法的原理为在碱性条件下，还原糖将3,5-二硝基水杨酸的硝基还原成氨基生成橘红色化合物，在一定范围内，还原糖与颜色成正比[4][5]，用于黄精多糖的含量测定具有可行性。《中国药典》(2020年版)一部中收载的黄精多糖的测定方法为蒽酮-硫酸法[6]，也有文献采用苯酚-硫酸法[7][8]，这两种方法都会用到腐蚀性较强的硫酸，存在安全隐患、环境污染。本研究在查阅文献的基础上，对DNS法测定黄精多糖含量的检

测波长和条件进行考察,建立测定黄精多糖含量的方法,实现在无硫酸条件下测定黄精多糖含量,并用该方法测定泰山生黄精及九蒸九制各炮制品黄精多糖含量。

2. 材料

2.1. 仪器

GZX-9140MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司); SMF01 型磨粉机(浙江苏泊尔股份有限公司); ME104 型电子天平(METTLER TOLEDO); HH-4 型数显恒温水浴锅(金坛市友联仪器研究所); RE-2000A 型旋转蒸发仪(巩义市瑞力仪器设备有限公司); 2 型涡旋仪(Scientific Industries); Varioskan LUX 多功能微孔板酶标仪(ThermoFisher Scientific)。

2.2. 药品与试剂

鲜黄精(泰安市泰山四大名药开发有限公司); D(+)-无水葡萄糖(批号: 2230816004, 标准品, 北京索宝来科技有限公司); 氢氧化钠(批号: 20200224, 分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 盐酸(批号: 20210207, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇(批号: 20240102)、3,5-二硝基水杨酸(批号: 20230312)、苯酚(批号: 20230412)、无水亚硫酸钠(批号: 20230803)、酒石酸钾钠(批号: 20230412)、甲基红(批号: 20231008)均为分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司。

3. 方法

3.1. 溶液配制

DNS 试剂: 称量酒石酸钾钠 92.5 g 放入 1000 mL 烧杯中, 加入 250 mL 热纯化水溶解, 称量 DNS 3.15 g、量取 2 mol/L 氢氧化钠溶液 131 mL 加入到酒石酸钾钠溶液中, 再加入苯酚 2.5 g 和亚硫酸钠 2.5 g 搅拌溶解, 冷却, 用纯化水定容至 500 mL 棕色容量瓶中备用[9]。

D(+)-无水葡萄糖标准溶液: 精密称取 D(+)-无水葡萄糖标准品 0.0165 g 置 25 mL 容量瓶中, 加纯化水溶解, 定容, 摇匀后备用。

3.2. 生、熟黄精炮制品制备

生黄精: 去除鲜黄精须根, 洗净泥沙, 切段后放入 55℃干燥箱中干燥 12 h。

熟黄精: 去除鲜黄精须根, 洗净泥沙, 切段后放入蒸锅, 隔水蒸制 6 h, 取出沥水后放入 55℃干燥箱中干燥 12 h 得“一蒸一制”熟黄精。留样后重复操作得到蒸制 2 到 9 次的熟黄精[10]。

3.3. 黄精多糖溶液制备

按照《中国药典》(2020 年版)一部中载的黄精含量测定项下提取方法提取黄精多糖[6], 浓缩定容至 25 mL 容量瓶即得黄精多糖溶液。

3.4. 检测波长确定

DNS 法测定还原糖含量时波长的选择差异很大, 但范围在 400~700 nm [9] [11]-[13]。考虑到紫外可见分光光度法波长误差及 DNS 试剂的影响, 本研究对 DNS 法测定黄精多糖的最佳波长进行筛选, 在 400~700 nm 波长范围内对纯化水 + DNS 试剂、D(+)-无水葡萄糖标准品溶液 + DNS 试剂、黄精多糖供试品溶液 + DNS 试剂沸水浴显色后进行波普扫描, 每隔 1 nm 记录吸光度值, 绘制扫描曲线如图 1。

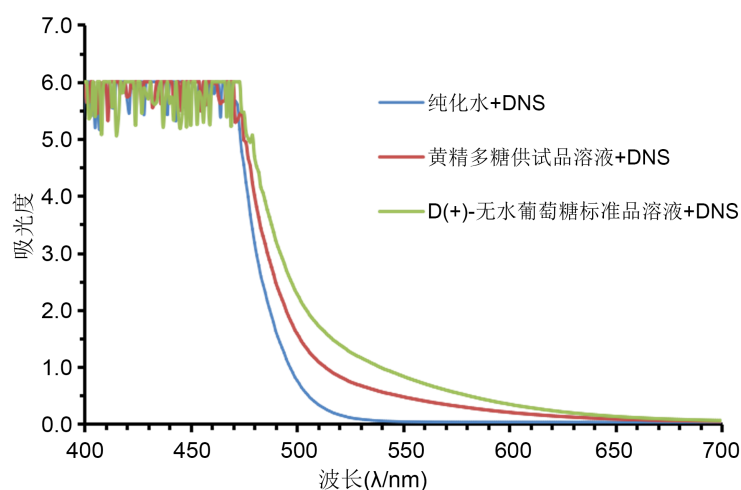


Figure 1. Spectral scan of 400~700 nm band
图 1. 400~700 nm 波段光谱扫描图

由图 1 可知在 400~480 nm 范围内三条光谱曲线吸光度都很高基本重叠在一起；630~700 nm 范围内吸光度很低，几乎接近于零；480~630 nm 之间三条吸光度迅速下降且曲线不重合。当波长为 540 nm 时，纯化水 + DNS 试剂的吸光度接近于零，说明水和 DNS 试剂对测定的干扰最小，故选择 540 nm 作为检测波长。

3.5. 检测条件考察

3.5.1. 水解时盐酸溶液用量

精密量取同一黄精多糖溶液 2.0 mL 6 份到 10 mL 具塞刻度试管中，分别精密加入盐酸溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL，混匀后沸水浴中水解 10 min，迅速冷却至室温后滴加 3 滴甲基红试剂，混匀后滴加氢氧化钠溶液中和至浅黄色，加纯化水稀释至 10 mL，混匀后得黄精多糖供试品溶液。精密量取各供试品溶液 2.0 mL，精密加入 DNS 试剂 2.0 mL，摇匀后放入沸水浴中显色 10 min，迅速冷却至室温后吸取显色溶液 200 μ L 于 540 nm 波长处测定吸光度，绘制曲线如图 2(a)。盐酸溶液用量在 0.5 至 2.0 mL 时吸光度逐渐增大，随着盐酸溶液用量的增加吸光度基本不变，因此，水解时盐酸溶液用量选择 2.0 mL。

3.5.2. 水解时间

精密量取同一黄精多糖溶液 2.0 mL 6 份，精密加入盐酸溶液 2.0 mL 分别水解 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15 min，其他条件同“3.5.1”，显色后测定吸光度如图 2(b)，水解时间在 2.5~7.5 min 时吸光度逐渐升高，7.5~15 min 之间有波动但相差不大，10 min 时吸光度最高，选择 10 min 作为盐酸水解时间。

3.5.3. 水解温度

精密量取同一黄精多糖溶液 2.0 mL 6 份，分别置 50, 60, 70, 80, 90, 100 $^{\circ}$ C 水浴水解 10 min，其他条件同“3.5.1”，显色后测定吸光度如图 2(c)，水解温度从 50 $^{\circ}$ C 到 90 $^{\circ}$ C 吸光度逐渐增大，90 $^{\circ}$ C 到 100 $^{\circ}$ C 下降，因此水解温度设定为 90 $^{\circ}$ C。

3.5.4. DNS 试剂用量

精密量取同一黄精多糖溶液 2.0 mL 6 份，分别精密加入 DNS 试剂 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mL，其他条件同“3.5.1”，显色后测定吸光度如图 2(d)，DNS 试剂添加 0.5 和 1.0 mL 时吸光度较高，添加 1.0 mL 时最高，随着添加量增大吸光度逐渐降低，DNS 试剂用量选用 1.0 mL。

3.5.5. 显色时间

精密量取同一黄精多糖溶液 2.0 mL 6 份, 分别在沸水浴显色 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 min, 其他条件同“3.5.1”, 显色后测定吸光度如图 2(e), 显色时间在 5 min 之后吸光度趋于稳定, 10 min 和 15 min 时吸光度基本一致, 从节能的角度考虑显色时间选择 10 min。

3.5.6. 显色温度

精密量取同一黄精多糖溶液 2.0 mL 6 份, 分别在 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃, 100℃水浴显色 10 min, 其他条件同“3.5.1”, 显色后测定吸光度如图 2(f)。显色温度从 50℃~80℃吸光度逐渐上升, 80℃、90℃、100℃时吸光度差异较小, 90℃稍高, 故选择 90℃作为显色温度。

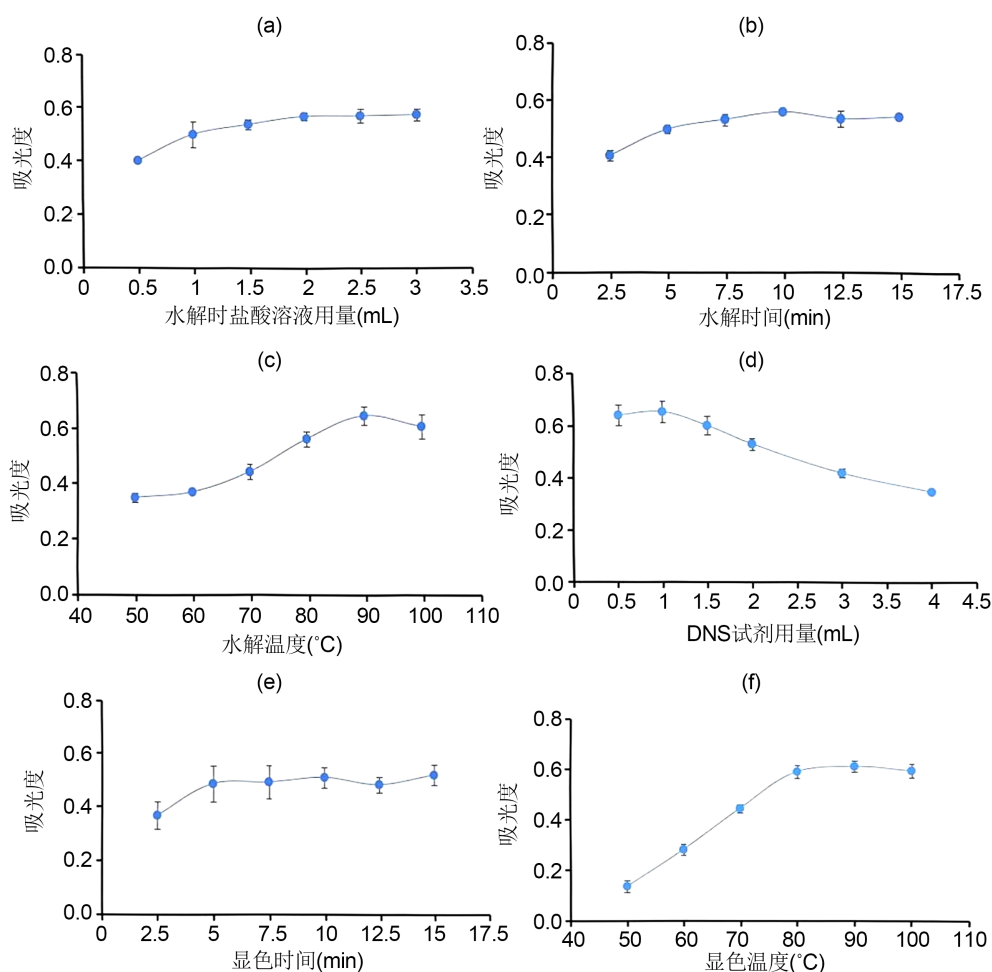


Figure 2. Detection condition. (a) Dosage of hydrochloric acid solution during hydrolysis; (b) Hydrolysis time; (c) Hydrolysis temperature; (d) Dosage of DNS reagent; (e) Color development time; (f) Color development temperature

图2. 检测条件。(a) 水解时盐酸溶液用量; (b) 水解时间; (c) 水解温度; (d) DNS 试剂用量; (e) 显色时间; (f) 显色温度

3.6. 方法学考察

3.6.1. 标准曲线绘制

精密吸取 D(+)-无水葡萄糖标准品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 2.0 mL, 分别置 10 mL 试管中, 加

纯化水至 2.0 mL，摇匀即得系列质量浓度溶液。以 2.0 mL 纯化水作空白溶液，各精密加入 DNS 试剂 1.0 mL，摇匀，放入 90℃ 水浴显色 10 min，取出放入冰水浴冷却，静置至室温，分别吸取各溶液 200 μ L 在 540 nm 处测定吸光度，以质量浓度(C, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线如图 3，得回归方程 $A = 3.5902C - 0.1473$ ， $R^2 = 0.9998$ ($n = 6$)，表明 D(+)-无水葡萄糖质量浓度在 0.0608~0.6080 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

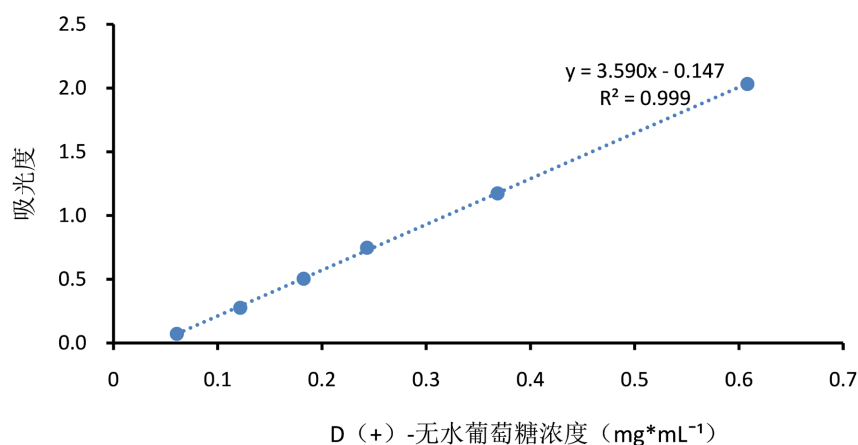


Figure 3. D(+)-anhydrous glucose standard curve

图 3. D(+)-无水葡萄糖标准曲线

3.6.2. 精密度

用吸取对照品溶液为 0.6 mL 的试管里的溶液，吸取 6 次，每次 200 μ L 在 540 nm 处测定吸光度，求得 D(+)-无水葡萄糖含量，计算 RSD 为 0.74% ($n = 6$)，表明仪器精密度良好。

3.6.3. 加样回收率

精密量取已知浓度为 1.15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄精多糖溶液 18.0 mL，加入精密称定的 D(+)-无水葡萄糖 23.8 mg，摇匀，精密量取溶液 2.0 mL 6 份，分别置 10 mL 具塞刻度试管中，按照确定的检测条件显色后测定吸光度，计算黄精多糖含量，回收率在 98.09%~101.49%，RSD 为 1.28% ($n = 6$)。

3.6.4. 重复性

精密称定 60℃ 干燥至恒重的泰山烘黄精细粉约 0.25 g 6 份，按照“3.3”的方法制备黄精多糖溶液，新建的检测方法测定吸光度，计算黄精多糖含量，结果黄精多糖的平均含量为 26.94 mg，RSD 为 2.36% ($n = 6$)。

3.6.5. 溶液稳定性

随机选取重复性试验显色后的溶液，分别在 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min 时吸取 200 μ L 在 540 nm 处测定吸光度，计算黄精多糖含量，RSD 为 0.21% ($n = 8$)，结果表明溶液在 2 h 内稳定。

3.7. 多糖含量测定

精密移取生黄精及九蒸九制各炮制品多糖溶液 2.0 mL，精密加入盐酸溶液 2.0 mL 混匀，90℃ 水浴水解 10 min，迅速冷却至室温后滴加 3 滴甲基红试剂混匀，滴加氢氧化钠溶液中和至浅黄色，定容至 10 mL 混匀，精密移取各供试品溶液 2.0 mL，以 2.0 mL 纯化水做空白，精密加入 DNS 试剂 1.0 mL，摇匀后放入 90℃ 水浴显色 10 min，迅速冷却至室温后测定吸光度，计算黄精多糖含量，绘制曲线如图 4。

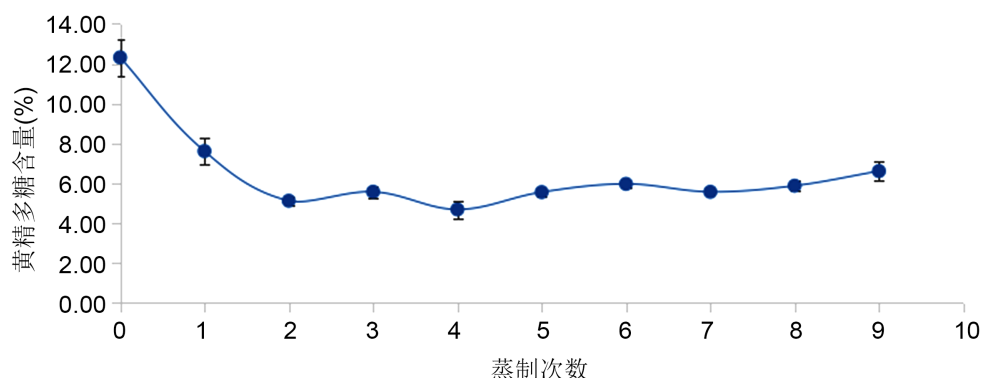


Figure 4. Variation curve of polysaccharide content of *Polygonatum* from 0 to 9 times of steaming
图 4. 0~9 次蒸制黄精多糖含量变化曲线

4. 结论与讨论

泰山黄精生品到二蒸二制多糖含量迅速下降,二蒸二制到九蒸九制多糖含量变化不大。黄精多糖含量变化趋势与杨圣贤等[14]的研究基本一致。

《中国药典》(2020 年版)一部中提取的黄精多糖溶液定容体积为 250 mL,溶液浓度较低,由于 DNS 法需用盐酸溶液将黄精多糖溶液水解、氢氧化钠溶液中和,稀释至 10 mL,所以对黄精多糖溶液进行了浓缩,定容体积为 25 mL。检测波长范围是参考相关文献设定的,参考相关文献中的检测条件,对黄精多糖的每个检测条件设计并进行预实验,根据预实验结果对检测条件进行调整,确定了本研究的考察条件。

还原糖的含量测定方法中色谱法仪器设备昂贵、使用维护繁琐;滴定法检测结果易受滴定终点和人为因素影响。在 3 种比色法中,与苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法相比较,DNS 法使用的盐酸溶液腐蚀性低,不但能有效降低安全隐患、避免污染环境,而且仪器要求低、杂质干扰少,可用于黄精多糖含量快速批量测定[15]。

基金项目

山东省医药卫生科技项目(202313021398),泰安市科技创新发展项目(2024NS342)。

参考文献

- [1] 张西梅, 张蕾, 亓晓乐, 等. 泰山地区黄精的本草考证[J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37(6): 88-93.
- [2] 王光辉, 王琦, 时元林. 泰山四大名药[J]. 山东中医杂志, 2006(3): 203-204.
- [3] Cui, X., Wang, S., Cao, H., Guo, H., Li, Y., Xu, F., et al. (2018) A Review: The Bioactivities and Pharmacological Applications of *Polygonatum Sibiricum* Polysaccharides. *Molecules*, **23**, Article 1170. <https://doi.org/10.3390/molecules23051170>
- [4] 刘彩华, 曾嘉童, 包竹君, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定芒果的可溶性糖含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(9): 2892-2900.
- [5] 高文军, 李卫红, 王喜明, 等. 3,5-二硝基水杨酸法测定蔓菁中还原糖和总糖含量[J]. 中国药业, 2020, 29(9): 113-116.
- [6] 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: 319-320.
- [7] 龙杰凤, 陈文经, 李金巧. 黄精多糖提取工艺及降糖活性研究[J]. 亚太传统医药, 2024, 20(4): 49-53.
- [8] 郭安君, 李雪影, 李晓炜, 等. 多花黄精多糖提取工艺优化及抗氧化机制研究[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2024, 47(5): 678-684.

-
- [9] 中华人民共和国农业部. NY/T2742-2015 水果及制品可溶性糖的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法[S]. 北京: 农业部农产品质量安全监管局, 2015.
- [10] 林雨, 余亮, 魏馨瑶, 等. 黄精炮制前后的化学成分变化及其减毒增效研究[J]. 中药材, 2021, 44(6): 1355-1361.
- [11] 廖祥兵, 陈晓明, 肖伟, 等. DNS 法定量测定还原糖的波长选择[J]. 中国农学通报, 2017, 33(15): 144-149.
- [12] 王莉丽, 梅文泉, 陈兴连, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定大米中水溶性糖含量[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(9): 168-173.
- [13] 詹梦涛, 娄水珠, 刘仙花, 等. 3,5-二硝基水杨酸法测定液体糖中总糖含量[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2020, 29(4): 317-321.
- [14] 杨圣贤, 杨正明, 陈奕军, 等. 黄精“九蒸九制”炮制过程中多糖及皂苷的含量变化[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2015, 12(5): 141-144.
- [15] 黄紫嫣, 王婧, 丁华, 等. 全自动还原糖测定仪法与斐林试剂滴定法对比研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(S2): 398-402.