

团 体 标 准

T/CI XXXX—XXXX

甘草多糖与甘草黄酮的提取及含量检测

Extraction and content detection of licorice polysaccharide and licorice flavone

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 甘草的超声逆流提取	1
5 甘草多糖的检测	2
6 甘草黄酮的检测	3

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国国际科技促进会提出并归口。

本文件起草单位：江苏大学、江苏天晟药业有限公司、乌兹别克斯坦塔什干国立农业大学努库斯分校、正大天晴药业集团股份有限公司、扬子江药业集团有限公司。

本文件主要起草人：徐希明、王启龙、朱 源、季 浩、Elmurat Torenliyazov、史晋辉、赵 倩、曹 霞、余青桐。

甘草多糖与甘草黄酮的提取及含量检测

1 范围

本文件描述了豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)、胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)及光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)干燥根及根茎中甘草多糖和甘草黄酮的提取与含量检测方法。

本文件适用于甘草、胀果甘草、光果甘草的加工与检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

中华人民共和国药典(一部 2020年版)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

超声逆流提取 *ultrasonic countercurrent extraction*

植物原料和提取液在提取管中,呈相反方向连续推进和流动,形成连续逆流提取,并且提取管上有超声辅助提取,提取液浓度从进液口至出液口形成连续梯度,全程自始至终保持稳定的溶解度,使用最小量的提取溶媒,达到最大提取率。

3.2

甘草多糖 *glycyrrhiza polysaccharides*

甘草中由多个单糖分子缩合、失水而成,是一类分子机构复杂且庞大的糖类物质。

3.3

甘草总黄酮 *glycyrrhiza flavonoids*

甘草中两个具有酚羟基的苯环(A与B环)通过中央三碳原子相互连结而成的一系列化合物,其基本母核为2-苯基色原酮。

4 甘草的超声逆流提取

4.1 甘草提取前的处理

4.1.1 外观检查

按中华人民共和国药典(一部 2020年版)附录“药材取样法”取样及外观检查。

4.1.2 甘草鉴别试验

按中华人民共和国药典(一部 2020年版)鉴别项下进行。

4.1.3 甘草的净选、淘洗

将甘草置挑选台上除去杂质、筛去灰屑及非药用部分,将净选好的甘草投入洗药机,将甘草反复翻洗至药材无泥沙、土,出水管水质澄清,方可放出药材。

4.1.4 甘草的切制、粉碎

将洗净的药材置于切药机传送带上,调节传送带速度,使药材切制长度为1 cm~2 cm,启动设备进行切制;将切制好的甘草置于不锈钢烘盘内,平铺,厚度为20 mm~30 mm,送入烘箱内进行烘干,烘干后的药材置于粉碎机中粉碎至30目-40目。

4.2 甘草的超声逆流提取

4.2.1 进料

甘草的进料由喂送料斗和定量控制喂料器（螺旋输送机）组成，通过料斗缓冲将处理后的甘草提取原料连续、自动、均匀地进入定量控制喂料器中（螺旋输送机）。

4.2.2 提取溶液的选择和控制

4.2.2.1 提物溶液选用不同比例的乙醇：水混合溶剂，具体选择纯水、30%乙醇、60%乙醇，每个梯度的溶剂均占总提取液体积的1/3。

4.2.2.2 提取溶液的用量及比例控制由提取溶媒控制系统调控，提取溶媒控制系统包括溶媒存储、输送、定量控制、温度调节等装置。通过储罐、磁力泵、涡轮流量计、板式换热器和电动调节阀对溶媒输送量、比例和温度实施在线检测、自动控制。

4.2.3 甘草的超声逆流提取

甘草和梯度提取溶液在超声波连续逆流设备的提取管内，在温度50℃~60℃、常压下进行连续逆流超声提取90 min~150 min；提取系统、超声控制系统和搅拌由四段浸泡提取管、六段超声提取管和三台搅拌泵组成，通过人工设置，PLC程序自动控制。

4.2.4 排渣

由超声波连续逆流设备的排渣口排出甘草渣，由超声波连续逆流设备的排液口排出提取液；药渣处理系统包括药渣残留溶剂挤压回收、蒸脱回收，以及渣料输送等装置。通过连续渣料挤压机、连续渣料蒸脱机和螺杆输送机对渣料中的溶媒进行挤压回收、整齐蒸脱回收和输送排渣。

4.3 提取液的干燥

提取液在分离机中进行固液分离，得到分离液；在50℃~60℃下进行减压浓缩，浓缩至原体积的1/15至1/20，进行喷雾干燥，得到固体提取物。

5 甘草多糖的检测

5.1 原理

食品中相对分子质量 $>1 \times 10^4$ 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，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，以此计算食品中粗多糖含量。

5.2 试剂

5.2.1 实验用水均为纯化水。

5.2.2 乙醇：为无水乙醇。

5.2.3 氢氧化钠溶液（100 g/L）：称取 100g 氢氧化钠，加水溶解并稀释至 1 L，加入固体无水硫酸钠至饱和，备用。

5.2.4 铜试剂储备液：称取 3.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，30.0g 柠檬酸钠，加水溶解并稀释至 1 L，混匀，备用。

5.2.5 铜试剂溶液：取铜试剂储备液 50 ml，加水 50 ml，混匀后加入固体无水硫酸钠 12.5 g，并使其溶解。临用新配。

5.2.6 洗涤剂：取水 50 ml，加入 10 ml 铜试剂溶液，50 ml 氢氧化钠溶液，混匀。

5.2.7 硫酸溶液（10%）：取 100 ml 浓硫酸加入到 800 ml 左右水中，混匀，冷却后稀释至 1 L。

5.2.8 苯酚溶液（50 g/L）：称取精制苯酚 5.0 g，加水溶解并稀释至 100 ml，混匀。溶液置冰箱中可保存一个月。

5.2.9 葡聚糖标准储备溶液：准确称取相对分子质量 5×10^5 已干燥至恒重的葡聚糖标准品 0.5000 g，加水溶解，并定容至 50 ml，混匀，置冰箱中保存。此溶液每 1 ml 含 10.0 mg 葡聚糖。

5.2.10 葡聚糖标准使用液：吸取葡聚糖标准储备溶液 1.0 ml，置于 100 ml 容量瓶中，加水至刻度，

混匀，置冰箱中保存。此溶液每 1 ml 含葡聚糖 0.10 mg。

5.3 甘草多糖的纯化

无水乙醇对甘草提取液进行醇沉后，60 °C 下干燥，得甘草粗多糖。通过Sevag法脱蛋白，对甘草多糖进行纯化。具体方法如下：

- a) 向甘草粗多糖的溶液中加入适量的氯仿和正丁醇溶液，氯仿：正丁醇体积比为 1：4，振摇均匀。此时，样品中的蛋白变为不溶状态，变性蛋白会出现在水相和溶剂相界面之间；
- b) 用离心法除去变性蛋白质，重复使用 5 次以上能以较高的效率除去蛋白。

5.4 标准曲线的建立

精密吸取葡聚糖标准使用液 0、0.10 ml、0.20 ml、0.40 ml、0.60 ml、0.80 ml、1.00 ml，（相当于葡聚糖 0、0.01 mg、0.02 mg、0.04 mg、0.06 mg、0.08 mg、0.10 mg），分别置于 25 ml 比色管中，准确补充水至 2.0 ml，加入 50 g/L 苯酚溶液 1.0 ml，在旋转混合器中混匀，小心加入浓硫酸 10.0 ml，于旋转混合器上小心混匀，置沸水浴中煮沸 2 min，冷却后用分光光度计在 485 nm 波长处以试剂空白溶液为参比，1 cm 比色皿测定吸光度值，以葡聚糖浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

5.5 甘草多糖的测定

采用硫酸苯酚法对甘草多糖进行测定。精密吸取样品测定液 2.0 mL 置于 25 mL 比色管中，加入 50 g/L 苯酚溶液 1.0 mL，在旋转混匀器上混匀后，小心加入浓硫酸 10.0 mL 后于旋转混匀器上小心混匀，置沸水浴中煮沸 2 min，冷却至室温，用分光光度计在 485 nm 波长处，以试剂空白为参比，1 cm 比色皿测定吸光度值。根据事先建立的标准曲线计算葡聚糖含量，进一步计算样品中粗多糖含量。同时做样品空白实验。计算公式如下：

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \times V_1 \times V_3 \times V_5 \times 100}{m_3 \times V_2 \times V_4 \times V_6} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 样品中粗多糖含量（以葡聚糖计）（mg/100g）；

m₁ —— 样品测定液中葡聚糖的质量（mg）；

m₂ —— 样品空白液中葡聚糖质量（mg）；

m₃ —— 样品质量（g）；

V₁ —— 样品提取液总体积（mL）；

V₂ —— 沉淀粗多糖所用样品提取液体积（mL）；

V₃ —— 粗多糖溶液体积（mL）；

V₄ —— 沉淀葡聚糖所用粗多糖溶液体积（mL）；

V₅ —— 样品测定液总体积（mL）；

V₆ —— 测定用样品测定溶液体积（mL）。

5.6 含量测定

甘草多糖含量不得少于 3.0 %。

6 甘草黄酮的检测

6.1 原理

采用紫外-可见分光光度法检测甘草提取液中总黄酮的含量，提取液中的黄酮类成分可被亚硝酸钠还原，与硝酸铝生成络合物，在氢氧化钠溶液碱性条件下开环，生成 2-基查耳酮而使溶液显特征的橙红色，采用紫外分光光度计在 510 nm 波长处测定吸光度，以芦丁为对照品，采用标准曲线法计算样品中总黄酮的含量。

6.2 试剂及仪器

6.2.1 常用试剂：纯化水、无水乙醇、甲醇。

- 6.2.2 5%亚硝酸钠溶液:称取 5 g 亚硝酸钠 (NaNO₂), 加水溶解成 100 mL。
- 6.2.3 10%硝酸铝溶液:称取硝酸铝 (Al(NO₃)₃·9H₂O) 10 g, 加水溶解成 100 mL。
- 6.2.4 氢氧化钠试液:取氢氧化钠 (NaOH) 4.3 g, 加水解成 100 mL。
- 6.2.5 芦丁对照品溶液:取芦丁对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。
- 6.2.6 仪器:紫外分光光度仪、超声仪、离心机、分析天平。

6.3 前处理

取本品0.15 g(M), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇25 ml(V1), 密塞, 摇匀, 超声处理5 min, 放置3 h 以上, 滤过, 精密量取续滤液2 ml, 置25 ml量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

6.4 标准曲线的制备

精密量取对照品溶液1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、6 ml, 分别置25 ml(V3)量瓶中, 各加水至6 ml, 加5%亚硝酸钠溶液1 ml, 使混匀, 放置6 min, 加10%硝酸铝溶液1 ml, 摇匀, 放置6 min, 加氢氧化钠试液10 ml, 再加水至刻度, 摇匀, 放置15 min, 以相应的试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法(通则0401), 在500 nm的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

6.5 甘草总黄酮测定法

精密量取供试品溶液2 ml(V2), 置25 ml量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“加水至6ml”起, 依法测定吸光度, 同时精密量取供试品溶液 2 ml, 置25 ml量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为空白溶液。从标准曲线上读出供试品溶液中芦丁的量(C), 计算, 即得。

$$X = \frac{C \times V1 \times V3 \times 100}{M \times V2 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

x ——试样中总黄酮百分含量, 以芦丁(C₂₇H₃₀O₁₆)计, g/100g (mL);

C ——标准曲线上读出供试品溶液中总黄酮的浓度, mg/mL;

V1——试样定容体积, mL;

V2——吸取供试液体积, mL;

V3——显色定容体积, mL;

M ——试样取样量, g(mL)。

计算结果以重复条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示, 保留三位有效数字。

6.6 含量测定

甘草黄酮含量不得少于4.0%。