

茯苓多糖的提取及含量测定

李俊 韩向晖 李仲洪 王振亚 王硕(兰州 730000 甘肃中医学院)

摘要 目的:建立茯苓多糖的含量测定方法。方法:用水乙醇沉法提取茯苓多糖,酚-硫酸法紫外分光光度法测定茯苓多糖的含量。结果: $\lambda_{\max} = 490\text{ nm}$,平均回收率为 98.3%,RSD 为 1.6%,线性范围为 5~40 $\mu\text{g/ml}$ 。结论:该方法快速、准确、重现性好,便于实际应用。

关键词 紫外分光光度法;茯苓多糖;提取;含量测定

Isolation and determination of pachyman in *poria cocos*(Schw.) wolf

Li Jun(Li J), Han Xianghui(Han XH), Li Zhonghong(Li ZH), et al(*Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000*)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a simple and accurate method for the determination of pachyman in *poria cocos* (Schw.) wolf. **METHOD:** The UV spectrophotometry was used to determine the content of pachyman. **RESULTS:** $\lambda_{\max} = 490\text{ nm}$, the average recoveries was 98.3%, RSD = 1.6% and the liner range was 5~40 $\mu\text{g/ml}$. **CONCLUSION:** The method was simple, rapid and accurate.

KEY WORDS UV, spectrophotometry, pachyman, extraction and determination

茯苓[*Poria cocos*(Schw.) Wolf]为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核,具有渗湿、健脾、利水等功能,茯苓多糖(pachyman)具有抑制肿瘤生长,调节机体免疫等功能,其药理作用被广泛运用于临床。本文用水提乙醇沉法提取茯苓多糖,酚-硫酸法测定其含量并考察了有关影响因素。该方法快速、灵敏、准确、重现性好,简便可行。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-754 紫外分光光度计(上海第二分析仪器厂)。

1.2 试剂与样品

1.2.1 样品 云苓(由兰州大药店提供,产地:云南),葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所);苯酚、浓硫酸均为分析纯。

1.2.2 5%苯酚试剂的配制 取苯酚加热蒸馏收集 182℃的馏分,吸取此馏分 10 ml 加水至 200 ml 置棕色瓶内,放冰箱备用。

1.2.3 对照品溶液的配制 精密称取 105℃干燥恒重的葡萄糖 50 mg 加水溶解并定容至 1000 ml 量瓶中,即得。

1.2.4 供试品溶液的配制 精密称取茯苓提取物 50 mg,加水溶解并定容至 500 ml 量瓶中,过滤,滤液备用,即得。

2 提取、精制

2.1 提取

准确称取茯苓 500 g,切成碎片,加入 4~6 倍量的水,回流提取 3 次,时间分别是 3、2 和 1 h。合并 3 次提

李俊,女。1987年毕业于兰州大学化学系,讲师

取液滤过,除去不溶性杂质,得 2000 ml 滤液。取 600 ml 减压蒸馏浓缩成 76 ml,在搅拌下加入乙醇,使含醇量达到 80%,静置 12h,离心,收集沉淀,加蒸馏水 60 ml 溶解煮沸,趁热滤除不溶物,滤液在搅拌下再加入乙醇,使含醇量达到 80%,放置,析出褐色沉淀后,低温干燥,即得茯苓多糖粗品。

2.2 精制

将粗品溶于 150 ml 蒸馏水中,煮沸,在搅拌下加入 1%鞣酸溶液,煮沸,离心,取上清液加入鞣酸溶液不混浊为止。加入 2%的活性炭,搅拌 10 min,趁热用布氏漏斗滤过,滤液放冷,加入乙醇使含醇量达到 70%,静置 24h,滤取析出物,用 70%乙醇 100 ml,反复洗涤沉淀,检查不含鞣酸为止。将湿品溶于 583 ml 的 20%的热乙醇中,置于有 50g 中性氧化铝的布氏漏斗中,减压后,再加入 60℃的热蒸馏水连续洗脱,流出液减压浓缩成 62.5 ml,加入乙醇使含醇量达到 70%,放置,滤取沉淀于低温(或冷冻)干燥,即得茯苓多糖纯品。

3 吸收波长和实验条件的选择

3.1 吸收波长的选择

精密吸取对照品溶液 1.0 ml,和供试品溶液 1.0 ml,分别置于 20 ml 的试管中,各精密加入 5%的苯酚液 1.0 ml,然后缓慢精密加入 5.0 ml 浓硫酸,摇匀,放置 30 min 后,在分光光度计上测定波长从 400~524nm 之间的吸收度,两者均在 490nm 处有最大吸收,故选择 490nm 波长测定。

3.2 实验条件的选择

3.2.1 苯酚用量的选择 量取葡萄糖对照品溶液 1.0 ml,浓硫酸 5.0 ml,加酸后放置 30 min,加入 5%苯酚 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6,1.8,2.0,2.5 和 3.0 ml 测得吸收度 A 分别为 0.494,0.515,0.519,0.540,0.552,0.626,0.726,0.756,0.798,0.821,0.652 和 0.608,当 5%苯酚用量为 2.0 ml 时吸收度为最大。

3.2.2 浓硫酸用量的选择 量取葡萄糖对照品 1.0 ml,加苯酚 2.0 ml,浓硫酸用量为 5.0,5.5,6.0,6.5,7.0 和 7.5 ml,其它条件如 3.2.1 项下,测得吸收度 A 分别为 0.872,0.830,0.966,0.741,0.660 和 0.643,当浓硫酸用量为 6.0 ml 时吸收度最大。

3.2.3 反应时间的选择 加 5%苯酚溶液 2.0 ml,浓硫酸 6.0 ml,其它条件如 3.2.1 项,时间为 30,40,60,100 和 120 min 测得吸收度 A 分别为 0.750,0.749,0.751,0.763 和 0.747。吸收度 A 在 30 min 后变化不明显,并在 120 min 内保持稳定,因此反应时间选择 30 min。

3.2.4 反应温度的选择 取 5 支试管,实验步骤同 3.2.3,测定水浴温度在室温 20,45,65,85 和 100℃时

保温 30 min,吸收度 A 分别为 0.749,0.718,0.694,0.691 和 0.728。结果表明:吸光度在室温至 100℃温度范围内无显著差异。

综上所述,最佳反应条件是:5%苯酚 2.0 ml,浓硫酸 6.0 ml,加酸后放置 30 min,反应温度为室温。

3.3 标准曲线的绘制

精密量取葡萄糖对照品溶液 0.0,0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.7 和 0.8 ml 置于 20 ml 试管中,分别加水至 1.0 ml 再分别加入 5%苯酚溶液 2.0 ml,等充分混合后,然后加入浓硫酸 6.0 ml,再充分混合,放置室温,在 490nm 处测得吸收度分别为 0.121,0.249,0.495,0.614,0.730,0.815 和 0.913。求得标准曲线的回归方程: $A = 0.02282c + 0.02453$ ($r = 0.9994, n = 7$)。

4 重现性实验

分别吸取对照品溶液 0.5 ml 5 份置试管中,同前操作,吸光度为:0.614,0.612,0.614,0.613 和 0.615,结果 $RSD = 0.199\%$ ($n = 5$)。

5 样品含量测得

吸取供试品溶液 1.0 ml 3 份,分别置于 20 ml 试管中,加入 5%苯酚溶液 2.0 ml,混合后加入浓硫酸 6.0 ml,放置 30 min,在 490nm 处分别测得其吸收度 A 值: $A_1 = 0.871, A_2 = 0.872, A_3 = 0.876$,根据回归方程求出百分含量为 74.16%,74.27% 和 74.62%,平均含量 74.35%。

6 回收率试验

精密吸取葡萄糖对照品 5 份,分别加入不同量的已知葡萄糖含量的供试品液,以下操作按标准曲线下进行,结果见表 1。

表 1 回收率测得结果 ($n = 5$)

编号	样品量 / μg	葡萄糖加入量 / μg	回收量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	变异系数 / %
1	6.50	20.00	25.90	97.00		
2	7.10	20.00	26.17	96.57		
3	8.50	20.00	28.49	99.96	98.29	1.6
4	10.00	20.00	29.20	97.33		
5	11.35	20.00	31.53	100.57		

7 讨论与小结

7.1 多糖在强酸作用下水解生成单糖,并迅速脱水生成糠醛,糠醛与酚性物质如苯酚缩合成有色化合物,反应迅速,完全,有色物质稳定,并且有色物生成量与多糖浓度存在定量关系,这样用分光光度法在适当波长处可以得到多糖含量。本法简便快速,易行。

7.2 配制好的 5%苯酚溶液应冷藏避光保存,否则以苯酚-硫酸作空白时颜色加深,影响测定。

收稿日期:1998-09-21