

• 科研交流 •

紫外分光光度法测定灵芝菌丝体发酵液中多糖的含量

王旭 邸峰 周富荣(北京市药品检验所 北京 100035)

灵芝菌丝体发酵液为灵芝液的半成品,多糖为其中的有效成分。多糖的含量测定方法有很多,经典法为苯酚-硫酸、蒽酮-硫酸显色的方法,其原理均为糖类遇硫酸脱水形成糠醛衍生物,与苯酚或蒽酮缩合形成有色物质进行测定。成份利用糖类被硫酸氧化脱水生成的糠醛衍生物在紫外区有一定特征吸收的性质,采用紫外分光光度法测定了灵芝菌丝体发酵液中多糖的含量。本方法简便快速,重现性好。

1 仪器、药品与试剂

紫外分光光度计 日立 U2000; 电动离心沉淀机 0~4000 转。样品由北京扬格保健品厂提供; 对照品: 无水葡萄糖, 分析纯; 硫酸, 优级纯北京化工厂; 其他试剂均系分析纯。

2 实验方法与结果

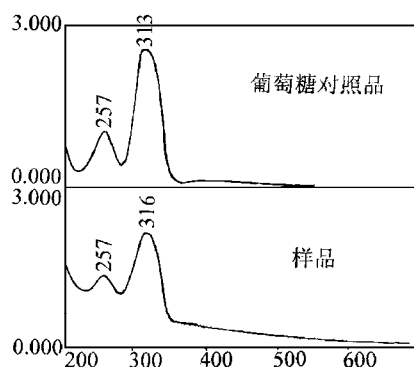


图1 紫外吸收图

2.1 最大吸收波长的测定 取样品 2ml, 置离心管中, 加无水乙醇 8ml, 静置后离心, 弃去上清液, 沉淀加 80% 乙醇洗涤后, 离心, 取沉淀物适量与无水葡萄糖对照品适量, 加硫酸置 60℃ 水浴中加热 2h, 放冷, 以相应试剂为空白, 在 700~200nm 的波长处扫描测定吸收度, 结果均在 257 和 318nm 的波长处有

最大吸收, 选择在 257nm 处测定, 见图 1。

2.2 测定条件的确定

2.2.1 提取条件的选择^[1] 选用 80% 乙醇使多糖沉淀, 经检查第二次洗涤液中糖反应呈阴性, 故采用 80% 乙醇洗涤一次。

2.2.2 显色条件的确定 选用硫酸显色法, 测定温度为 60℃。取灵芝菌丝体发酵液, 加 4 倍量无水乙醇, 静置, 离心, 取沉淀适量, 加硫酸混匀, 在 60℃ 水浴中加热, 定时取样, 在 257nm 的波长处测定吸收度。另取无水葡萄糖对照品适量, 加硫酸同法显色测定, 结果样品与对照品在 2h 内反应完全, 故选择显色加热时间为 2h。

2.2.3 稳定性实验 取无水葡萄糖对照品, 显色后定时测定吸收度, 结果在 2h 内吸收度无变化, 见下表。

测定时间(h)	0	0.5	1	2
吸收度	0.789	0.787	0.787	0.788

2.2.4 干扰物质的测定 据文献[3]记载, 80% 乙醇沉淀物中伴有蛋白沉淀, 蛋白与硫酸显色后在 257nm 有吸收, 故测定其中蛋白的干扰。取灵芝菌丝体发酵液 2ml, 加无水乙醇 8ml, 离心, 弃去上清液, 沉淀加水 2ml 使溶解, 加 40% 三氯醋酸至沉淀完全, 离心, 取沉淀物加水 2ml 使溶解, 取 100μl 蒸干, 加硫酸 10ml, 60℃ 水浴加热 2h, 在 257nm 处测定吸收度, 结果吸收度为 0.012, 故认为基本无干扰, 为了简化操作, 取 80% 乙醇沉淀物直接测定。

2.3 标准曲线 取无水葡萄糖对照品 30mg, 精密称定, 置 10ml 量瓶中, 加水使溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 20, 40, 60,

80, 100 μ l, 分别置具塞试管中, 置水浴中蒸干, 精密加入硫酸 10ml, 在 60 C 水浴中加热 2h, 置冰浴中放 2min, 在 257nm 的波长处测定吸收度, 以吸收度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制曲线, 结果为一直线, 回归方程为 $Y = 0.942x + 0.03$ ($r = 0.9995$) 实验结果表明无水葡萄糖在 60~300 μ g 范围内与吸收度成正比。

2.4 重现性实验 取样品溶液, 同法测定 6 次, 结果 $RSD\%$ 为 0.0%。见下表

样品	1	2	3	4	5	6
含量(%)	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09

2.5 回收率 取本品 10ml, 加无水乙醇 40ml, 混匀, 静置 1h 后离心, 弃去上清液, 沉淀物加 80% 乙醇 50ml 洗涤一次, 弃去洗液, 残渣加水转移至 10ml 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。精密吸取上述溶液 70 μ l, 加入标准曲线项下无水葡萄糖溶液 30 μ l, 蒸干, 残渣精密加入硫酸 10ml, 置 60 C 水浴中加热 2h, 在 257nm 的波长处测定吸收度, 结果见表 1:

2.6 测定法 精密吸取样品 2ml, 置离心管中, 加无水乙醇 8ml, 混匀, 静置 1h, 离心 3~5min, 弃去上清液, 沉淀物加 80% 乙醇 10ml 洗涤一次, 静置 1h, 离心 3~5min, 弃去上清

液, 沉淀加水适量使溶解, 并转移至 2ml 量瓶中, 加水分次洗涤容器, 洗液并入同一量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。精密量取 100 μ l 置水浴上蒸干, 精密加入硫酸 10ml, 照标准曲线制备项下自“置 60 C 水浴中加热 2h”起, 依法测定吸收度, 以标准曲线上读出供试品溶液中葡萄糖的含量, 即得。

表 1 回收率结果

	1	2	3	4	5	6	7
测得总量(μ g)	163.14	166.50	162.22	164.66	164.66	164.05	162.53
样品含量(μ g)	73.50	73.50	73.50	73.50	73.50	73.50	73.50
葡萄糖加入量(μ g)	91.65	91.65	91.65	91.65	91.65	91.65	91.65
葡萄糖检出量(μ g)	89.64	93.00	88.72	91.16	91.16	90.55	89.03
回收率(%)	97.81	101.47	96.80	99.47	99.47	98.80	97.14
平均回收率(%)	98.71	RSD(%) 1.64					

3 讨论

蛋白等杂质加硫酸显色可有吸收, 干扰测定。可采用三氯醋酸沉淀法除去蛋白, 三氯醋酸对测定无影响。采用硫酸显色的测定糖的方法简便, 准确。曾有人采用此方法测定人参皂甙的含量, 亦得到较好的结果。

参考文献

- 1 高国才, 程旻. 灵芝多糖的提取及其冲剂的研制. 现代应用药学, 1991, 8(5): 19~20

(收稿: 1997-03-27)