

• 质量标准 •

稀针嗜蓝孢孔菌多糖分析方法研究

朱胤龙*, 陈萍, 张亚环

(陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003)

[摘要] 目的: 用紫外分光光度法建立稀针嗜蓝孢孔菌多糖的定量分析方法。方法: 采用苯酚-硫酸法, 以葡萄糖含量为指标, 用 $L_9(3^4)$ 正交试验法选择最佳显色条件, 检测波长为488 nm。结果: 苯酚-浓硫酸二因素对多糖含量有显著影响, 以葡萄糖表示, 本法在(3.223~12.89) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内, 吸收度与浓度有良好的线性关系, 平均回收率96.60%, RSD为1.71%。结论: 本法快速、简便、灵敏度、重复性好, 不受蛋白质干扰, 亦可用于混有糖苷的粗多糖的测定。

[关键词] 稀针嗜蓝孢孔菌; 多糖; 正交试验; 紫外分光光度法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)09-0001-03

Study on Determination of Polysaccharide in *Fomitiporia robusta* (P. Karst.) Fiasson

ZHU Yin-long*, CHEN Ping, ZHANG Ya-huan

(Shan Xi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish UV method to determine polysaccharide in *Fomitiporia robusta* (P. Karst.) Fiasson. **Method:** The parameter of colorimetric method was optimized through $L_9(3^4)$ orthogonal design with the index of glucose, by the use of phenyl hydrate-sulfuric acid, at the 488 nm. **Result:** The significant effects of phenyl hydrate-sulfuric acid volume on glucose content were discovered. The average of recovery was 96.6% and RSD 1.71% for glucose with in good linear relation in (3.223~12.89) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0.999 1. **Conclusion:** The proposed method is sensitive, rapid and accurate. It can be used to assay polysaccharide with method indicant.

[Key words] *Fomitiporia robusta* (P. Karst.) Fiasson; polysaccharide; orthogonal design; UV

稀针嗜蓝孢孔菌是首次发现的生长在我国秦岭北麓的野生真菌, 本品经北京中国科学院微生物研究所张小青教授鉴定为锈草孔菌科真菌 *Fomitiporia robusta* (P. Karst.) Fiasson & Niemela. 的干燥子实体。民间主要用于克山病、心律不齐、胃病及癌症的治疗, 我们从该真菌中分离得到的孢孔菌多糖提取物,

药理研究表明该品具有调血脂及脂代谢、免疫增强作用, 是其扶正固本有效成分。本品未收载于中国药典、地方标准中, 国内外也未见有其理化成分和含量测定方面的研究报道, 为评价药材质量, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法进行多糖分析研究对建立药材标准具有一定的指导意义。

1 仪器与试剂

DMS-200型紫外可见分光光度仪(美国 Varian 公司), FW-200型高速万能粉碎机(北京中信伟业科技公司), 高速离心机(河北省吴桥电机厂), WH 861旋涡混合器。

硫酸、苯酚、95%乙醇、碳酸氢钠均为分析纯; 无

[收稿日期] 2007-11-19

[基金项目] 国家中医药管理局新药开发专项课题(D2X024A), 陕西省科学技术研究发展计划项目(2002K11-G6(4))

[通讯作者] * 朱胤龙, Tel: (029) 81066267; E-mail: cp3049033@163.com

水葡萄糖经 105 °C 干燥后, 备用; 水为二次蒸馏水。稀针嗜蓝孢孔菌采集于秦岭北麓。

5% 苯酚溶液配制: 取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g 与碳酸氢钠 0.05 g, 蒸馏收集 182 °C 馏分, 吸取此馏分 10 mL 加水至 200 mL, 置棕色瓶中, 即得。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖 0.107 42 g, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取上述溶液 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度。精密吸取上述溶液 3.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入 5% 苯酚 1 mL, 混匀, 再加入浓硫酸 6 mL 并计时, 加水至刻度, 旋涡混合 5 min, 放置 1 min, 加水至刻度, 混匀, 室温下放置 20 min, 再加水至刻度, 备用。

2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末 1.0 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加水 100 mL, 加热回流 1 h, 趁热用脱脂棉滤过, 如上重复 1 次, 合并两次滤液, 浓缩, 移至 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。精密吸取 1 mL 加无水乙醇 8 mL, 旋涡混合, 离心, 取沉淀, 加水溶解, 置 10 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 精密吸取 3 mL, 同对照品的制备项下的方法, 自“加 5% 苯酚溶液 1 mL 起”, 操作, 备用。

2.3 最大吸收波长的选择 分别吸取上述对照品和供试品溶液, 经苯酚-硫酸显色后, 二者在 200~600 nm 做全波长扫描, 确定最大吸收波长为(488 ± 2) nm。

2.4 显色条件的选择 参考有关文献^[14], 确定苯酚浓度为 5%, 以显色剂苯酚用量、硫酸用量及反应温度和时间为考察因素。因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平表

因素	A	B	C	D
水平	5% 苯酚(mL)	浓硫酸(mL)	反应温度(°C)	反应时间(min)
1	1.0	5	40	20
2	1.2	6	50	40
3	1.4	7	60	60

精密吸取 0.268 5 mg·mL⁻¹ 无水葡萄糖溶液 1.0 mL, 共 9 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 按正交表的设计试验, 分别加入不同量 5% 苯酚, 旋涡混合 5 min, 放置 1 min, 再分别加入不同量的浓硫酸, 置于不同温度水浴锅中保温不同时间, 取出, 室温下放置 20 min, 再加水补至刻度, 混匀, 于 488 nm 处测定吸收度, 计算, 即得。结果见表 2。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

试验号	因素				试验指标 吸收度
	A 5% 苯酚(mL)	B 浓硫酸(mL)	C 反应温度(°C)	D 反应时间(min)	
1	1.0	5	40	20	0.341
2	1.0	6	50	40	0.402
3	1.0	7	60	60	0.374
4	1.2	5	50	60	0.215
5	1.2	6	60	20	0.271
6	1.2	7	40	40	0.272
7	1.4	5	60	40	0.292
8	1.4	6	40	60	0.307
9	1.4	7	50	20	0.294
K ₁	1.12	0.85	0.92	0.91	
K ₂	0.76	0.98	0.91	0.97	
吸 K ₃	0.89	0.94	0.94	0.90	直观分析最佳显色条件: A ₁ B ₂ C ₂ D ₂
收 k ₁	0.37	0.28	0.31	0.30	
度 k ₂	0.25	0.33	0.30	0.32	
k ₃	0.30	0.31	0.31	0.30	
R	0.12	0.03	0.01	0.02	

表 3 吸收度方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.021988623	2	0.0109943311	167.51	< 0.01
B	0.0030243998	2	0.0015121999	23.04	< 0.05
C	0.0001312662	2	0.0000656331	*	
D	0.0009535921	2	0.0004767960	7.26	> 0.05

由表 2 3 吸收度的极差及方差分析结果表明: 各因素作用主次为 A > B > D > C, 其中 A 因素有极其显著性差异 (P < 0.01), B 因素有显著性差异 (P < 0.05), C、D 因素无显著性差异 (P > 0.05), 最佳工艺为 A₁B₂C₂D₂; 即苯酚用量、硫酸用量是主要因素, 最佳显色条件为: 5% 苯酚 1 mL、浓硫酸 6 mL、反应时间为 40 min, 反应温度为 50 °C。

2.5 标准曲线的制备 精密量取 0.537 1 mg·mL⁻¹ 无水葡萄糖溶液 0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 配制成 7 个不同浓度的对照品系列溶液。精密量取上述各溶液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 分别加 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 旋涡混匀, 迅速滴加浓硫酸 6.0 mL, 旋涡混匀, 于 50 °C 水浴中保温 40 min, 取出, 置水中冷却至室温, 再加水补至刻度, 混匀, 以第一份为空白, 照分光光度法^[11], 于 488 nm 的波长处测定吸收度, 以

吸收度为纵坐标,以浓度为横坐标,绘制工作曲线。回归方程为: $Y = 0.0438X - 0.0018$, $r = 0.9991$, 葡萄糖在 $(3.223 \sim 12.89) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,吸收度与浓度有良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密量取对照品溶液 $(21.484 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 及供试品溶液(批号: 021208)各 3 mL,按标准曲线项下方法操作,重复测定 6 次,分别测定吸收度,结果精密度良好。

2.7 显色稳定性试验 精密量取葡萄糖对照品溶液 $(21.484 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 和供试品溶液(批号: 021208)各 3 mL,显色后,每隔 5 min、10 min 或 1 h、2 h 测定一次吸收度,共测 13 次,结果表明:对照品溶液和供试品溶液在显色 40 min 后,吸收度达到最高值,且在 8 h 内保持稳定。

2.8 重复性试验 取同一批样品(批号: 031015)粉末 1.0 g,精密称定,按供试品溶液和标准曲线制备方法操作,分别制备出 5 份供试品溶液,于 488 nm 处测定吸收度,计算多糖含量。结果:多糖平均值为 $9.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.44% ($n = 5$),表明样品重复性良好。

2.9 回收率试验 取已知含量的样品(批号: 031015)粉末 1.0 g,精密称定,共 6 份,置圆底烧瓶中,加水 100 mL,加热回流 1 h,趁热用脱脂棉滤过,如上重复 1 次,合并两次滤液,浓缩,移至 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。精密吸取 1 mL 加无水乙醇 8 mL,旋涡混合,离心,取沉淀,加水溶解,置 10 mL 量瓶中,并稀释至刻度,作为供试品溶液备用。分别精密吸取供试品溶液 3 mL,置于 10 mL 量瓶中,精密加入浓度为 $5.371 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10.742 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖对照品各 1 mL,按照供试品溶液制备方法进行测定,按下式计算回收率,结果见表 4。

表 4 加样回收率试验结果

序号	称样量 (g)	已知量 (μg)	加入量 (μg)	吸收度 (A)	测得量 (μg)	回收 (μg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RDS
1	1.0043	19.40	53.71	0.315	71.86	52.45	97.66	96.60	1.71
2	1.1158	21.56	53.71	0.319	72.81	51.26	95.43		
3	1.0878	21.02	53.71	0.325	74.25	53.24	99.12		
4	1.0462	20.21	107.42	0.546	124.59	104.38	97.17		
5	1.0025	19.37	107.42	0.533	121.66	102.30	95.23		
6	1.0852	20.97	107.42	0.539	122.99	102.03	94.98		

表 4 结果表明:本法有良好的回收率。

2.10 稀针嗜蓝孢孔菌药材多糖的含量测定 取稀针嗜蓝孢孔菌药材粉末 1.0 g,6 批,分别按上述供试品溶液分析方法进行测定,结果见表 5。

表 5 6 批样品多糖含量测定结果

批号	取样量 (g)	5% 苯酚 (mL)	浓硫酸 (mL)	吸收度		吸收度 均值	含量 (%)
				A1	A2		
010910	2.1058	1	6	0.288	0.290	0.289	0.488
010911	2.1044	1	6	0.340	0.342	0.341	0.567
021220	1.1715	1	6	0.247	0.245	0.246	0.805
021225	1.0273	1	6	0.261	0.255	0.258	0.962
031124	1.1094	1	6	0.247	0.251	0.249	0.811
040215	1.1094	1	6	0.244	0.240	0.242	0.791

根据 6 批样品测定结果,考虑到药材来源、制剂生产、贮藏等因素,暂定本品按干燥品计算,含稀针嗜蓝孢孔菌多糖以葡萄糖计($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)计,不得少于 0.40%。

3 讨论

本文以稀针嗜蓝孢孔菌有效成分之一水溶性多糖作为其内在质量控制指标,这些多糖类为葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、鼠李糖等组成,但由于影响显色的因素较多,难以选择最佳实验条件,故采用正交试验法优选测定条件,结果苯酚-硫酸法显色稳定,灵敏度高、快速、简便且重复性好,不受蛋白质干扰,亦可用于混有糖苷的粗多糖的测定。为该品种的标准化的科学化提供了坚实的理论依据和支持。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005:附录 28.
[2] 李晓晖,李书平,何去庆,等. 灵芝多糖的含量测定研究[J]. 中草药,1997,28(9):531-533.
[3] 王家好. 灵芝提取物中多糖的含量测定[J]. 中成药,1996,18(8):13-15.
[4] 周金黄. 中药免疫药理学[M]. 北京:人民军医出版社,1994. 141-143.