

灵芝多糖的含量测定研究

北京医科大学药学院(100083) 李晓晖* 李书平** 何云庆 李荣芷 崔书民***

摘 要 以苯酚-硫酸法对灵芝多糖含量进行测定,并用正交试验设计选择最佳显色条件,该法灵敏度高,重现性好,平均回收率为 99.1%,RSD=1.23%($n=5$)。

关键词 灵芝多糖 苯酚-硫酸法 正交设计 含量测定

近年来研究发现,多糖具有多方面的生物活性^[1],并从药用植物和真菌中发掘出许多有生物活性的多糖,用于治疗免疫系统严重损伤的癌症以及免疫缺损的慢性疾病^[2,3]。灵芝多糖为灵芝属药用真菌灵芝 *Ganoderma lucidum* 提取所得多糖,药理研究发现它具有免疫增强作用,是灵芝扶正固本有效成分^[4]。为了比较、评价以多糖为有效成分的药材和药品质量,多糖含量测定方法研究具有重要意义。目前应用较多的多糖含量测定方法是苯酚-硫酸法,但影响该法显色的因素较多,难以选择最佳实验条件。本实验以正交设计 $L_9(3^3)$ 优化显色条件^[5],研究苯酚-硫酸法对灵芝多糖含量测定的方法,为多糖含量测定方法的条件优选提供了有意义的参考。

1 试剂与仪器

硫酸、95%乙醇、无水葡萄糖均为分析纯,苯酚为 182℃馏分,所用水为蒸馏水;灵芝粗多糖由本室提供;721 分光光度计,WH861 旋涡混合器,旋转薄膜蒸发器。

2 条件与方法

2.1 实验条件

2.1.1 最大吸收波长的选择:精密吸取 50.4 $\mu\text{g/mL}$ 无水葡萄糖溶液 1.0 mL 置 10 mL 容量瓶中,加入 1.6 mL 5%苯酚,混匀,加入 7.5 mL 浓硫酸并计时,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,加水至刻度,混匀,

备用。以蒸馏水替代糖溶液如上法配制空白,用 721 分光光度计在 470~510 nm 测定吸收度,确定最大吸收波长 $497\pm 1\text{ nm}$ 。

2.1.2 显色条件的选择:以显色剂苯酚用量、硫酸用量及反应时间为考察因素,采用正交设计优选最佳显色条件,因素与水平见表 1。实验结果见表 2,结果表明,硫酸用量是影响显色条件最主要因素。最佳显色条件为 $A_3B_3C_2$ 即苯酚 1.6 mL,浓硫酸 7.5 mL,放置时间为 26 min。

表 1 $L_9(3^3)$ 正交设计表

因素	A	B	C
水平	5%苯酚(mL)	浓硫酸(mL)	反应时间(min)
1	1.2	6.5	16
2	1.4	7.0	26
3	1.6	7.5	36

2.2 方法与步骤

2.2.1 样品的预处理:称取灵芝粗多糖适量,用 95%乙醇洗涤至用斐林试剂检测单糖呈阴性,自然干燥,即得待测灵芝多糖。

2.2.2 供试液的配制:精密称取干燥恒重的灵芝多糖 0.1000 g 置 50 mL 容量瓶中,加水热溶解,冷至室温,定容,摇匀;取 2.0 mL 至 100 mL 容量瓶中,定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 标准曲线的制备:精密称取无水葡萄糖对照品适量制成 0.102 mg/mL 的对照品溶液,分别稀释至 1.02、2.04、3.06、4.08、5.10 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 个不同浓度的对照品系列

* Address: Li Xiaohui, School of Pharmacy, Beijing Medical University, Beijing

** 现在中国航空工业中心医院

*** 烟台市生物研究所

溶液。精密吸取系列溶液 1.0 mL 置 10 mL 容量瓶中,按“最大吸收波长的选择”项下方法测定吸收度,求得标准曲线回归方程为: $A=10^{-3}+6.26\times10^{-3}C$, $r=0.9998(n=7)$ 。在 10~70 μg 范围内符合 Beer 定律。

表 2 正交试验结果

	A	B	C	吸收度
	5%苯酚(mL)	浓硫酸(mL)	反应时间(mL)	
1	1.2	6.5	16	0.264
2	1.2	7.0	26	0.289
3	1.2	7.5	36	0.334
4	1.4	6.5	16	0.264
5	1.4	7.0	26	0.297
6	1.4	7.5	36	0.339
7	1.6	6.5	16	0.276
8	1.6	7.0	26	0.336
9	1.6	7.5	36	0.353
I j	0.887	0.814	0.939	
II j	0.900	0.922	0.906	
III j	0.965	1.026	0.907	
I j= I j/3	0.296	0.271	0.313	
II j= II j/3	0.300	0.307	0.302	
III j= III j/3	0.322	0.342	0.302	
R	0.026	0.071	0.011	

结论:最佳显色条件为 $A_3B_3C_2$ 。

2.2.4 精密度试验:精密吸取 1.0 mL 供试液按“标准曲线的制备”项下操作,分别测定吸收度,求得 $RSD=1.00\%(n=5)$ 。

2.2.5 重现性及多糖含量测定:精密称取灵芝多糖约 0.1000 g,按“供试液的配制”和“标准曲线的制备”项下操作,分别测定吸收度,求得多糖平均含量为 85.6%, $RSD=0.53\%(n=5)$,结果见表 3。

2.2.6 显色稳定性:样品显色后,每隔 5 min 或 10 min 测定一次吸收度,共测 10 次,结果表明在显色 20 min 内吸收度稳定。

2.2.7 回收率试验:采用加样回收法。精密称取干燥恒重的灵芝多糖 0.0500 g,精密加

入约 0.0400 g 无水葡萄糖对照品,按“供试液的配制”和“标准曲线的制备”项下操作,测定吸收度,平均回收率为 99.1%, $RSD=1.23\%(n=5)$ 。

表 3 重现性及多糖含量测定

样品号	1	2	3	4	5
灵芝多糖(g)	0.0960	0.1076	0.1003	0.0946	0.1043
吸收度 A	0.207	0.230	0.217	0.205	0.224
多糖含量(%)	85.7	85.0	86.0	86.1	85.4

3 结果与讨论

3.1 影响苯酚-硫酸法显色的因素较多,目前所见文献报道均为固定其他条件进行单因素考察,不仅实验次数多,且所选择的条件并不一定为最佳显色条件。本实验以正交设计 $L_9(3^3)$ 考察了苯酚用量、浓硫酸用量及反应时间三因素三水平,对苯酚-硫酸法测定多糖含量的最佳显色条件进行了探索,取得了较满意结果。实验表明,硫酸用量是影响显色的主要因素,显色最佳条件为:5%苯酚 6 mL、浓硫酸 7.5 mL、反应时间 26 min,为多糖含量测定方法的条件选择提供了一种有意义的参考。

3.2 苯酚-硫酸法显色稳定,灵敏度高,重现性好,不受蛋白质干扰,可用于混有糖肽的粗多糖含量测定。

参 考 文 献

1 顾学裘,等.抗衰老·抗癌中药的研究及展望.北京:中国医药科技出版,1989.22
2 方积年.国外医学-药学分册,1981,(4):222
3 方积年.国外医学-抗生素分册,1982,3(2):107
4 李荣芷,等.北京医科大学学报,1987,19(6):431
5 正交试验设计法编写组.正交试验设计法.上海:上海科技出版社,1979.18

(1996-10-04 收稿)

On the Determination of Polysaccharides in Lingzhi(*Ganoderma lucidum*)

Li Xiaohui, Li Shuping, He Yunqing, et al

Colorimetric method for the determination of polysaccharides in *Ganoderma lucidum* was developed by the use of phenyl hydrate-sulfuric acid and optimized by orthogonal experimentations. The method was rapid and accurate with good reproducibility. The average recovery was 99.1%, and the relative standard deviation 1.23%.