

# 蛇菰多糖的提取及测定

杨黎江,路金荣,王晓娟,沈放  
(昆明学院 生命科学与技术系,云南 昆明 650031)

**摘要:**以蛇菰为材料,采用水提醇沉法提取浓缩后获得蛇菰多糖,以改良苯酚—硫酸比色法测定其多糖量.研究表明,蛇菰中多糖的质量分数为0.38%;加样回收率为100.73%,*RSD*为1.61%.因此,水提醇沉法可作为蛇菰中多糖的提取方法,改良苯酚—硫酸比色法可以作为蛇菰中多糖的定量测定方法.

**关键词:**蛇菰;多糖;提取;水提醇沉法;苯酚—硫酸比色法

**中图分类号:**R284.2;O629.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2010)03-0044-03

## The Content Determination and Extraction of Polysaccharide in *Balanophora involucre* Hook. f.

YANG Li-jiang, LU Jin-rong, WANG Xiao-juan, SHEN Fang

(Department of Life Science and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650031, China)

**Abstract:** In order to determine the content of polysaccharide and confirm the polysaccharide extracting method in *Balanophora involucre* Hook. f. . Extracting polysaccharides from *Balanophora involucre* Hook. f. by the process that was water-decocting followed by alcoholic washing for precipitation. The result showed that the content of polysaccharides was determined by modified phenol-sulphate colorimetry. The contents of polysaccharides extracted in *Balanophora involucre* Hook. f. were 0.38%. Recoveries were 100.73% and relative standard deviation (*RSD*) are 1.61%. Therefore, the method of water-decocting followed by alcoholic washing can be used as the polysaccharides extracting, and the modified phenol-sulphate colorimetry can be used as determination of the content and the quality control for preparations of polysaccharides in *Balanophora involucre* Hook. f.

**Key words:** *Balanophora involucre* Hook. f. ; polysaccharide; extract; water extracting-alcohol precipitating; phenol-sulphate colorimetry

筒鞘蛇菰 (*Balanophora involucre* Hook. f. ) 又名文王一枝笔、鸡心七、鹿仙草,系蛇菰科蛇菰属植物,为拉枯族药“密都那此”.具有补肝益肾,止血生肌,调经活血,清热醒酒之功效<sup>[1]</sup>.拉枯族民间医生用其治疗肝炎、肝硬化腹水、消化道出血、神经官能症、阳痿、外伤出血、痔疮、痛经、醒酒等病症<sup>[2]</sup>.已有研究表明,蛇菰含有多糖、黄酮、蒽醌及强心苷等类成分,用于肝炎和肝硬化有一定疗效,对小白鼠实体型肝癌具有显著抑制作用,对晚期肝癌病人也有一定疗效<sup>[3]</sup>.研究证实,多糖类化合物除了具有营养的生理功能外,还有具有提高人体免疫力、抗肿瘤、降血压、降血脂及抑制癌细胞等方面的药理活性.蛇菰脂溶性成分的研究工作较多<sup>[4-6]</sup>,但是对于蛇菰多糖的研究还未见报道.因此,拟对蛇菰中多糖成分的提取和测定方法展开研究,以期对蛇菰中多糖成分的活性研究提供方法和依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

筒鞘蛇菰 (*Balanophora involucre* Hook. f. ),由翟书华于昆明市石林县圭山野外采集而得,并分类鉴定.

### 1.2 仪器

旋转蒸发仪(东京理化);UV-1600 双光束紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);电热恒温水浴锅;循环水式多用真空泵;干燥箱.试剂均为国产分析纯.

### 1.3 筒鞘蛇菰粗多糖的提取

取适量蛇菰,用95%乙醇室温浸泡脱脂,残渣室温干燥切片.将脱脂后的蛇菰加8倍量水于100℃提取60min,过滤,再加入6倍量水于100℃提取60min,过滤,合并滤液.滤液减压浓缩至一定体积.浓缩液加入乙醇,使乙醇的体积分数分别达50%,70%,80%,静置过夜,六层纱布过滤,合并沉淀物,无水乙醇洗涤3次,50℃烘

收稿日期:2010-03-25

**作者简介:**杨黎江(1969—),女,云南昆明人,副教授,硕士,主要从事生理学、药理学及生物化学研究;路金荣(1988—),女,山东济南人,2008级生物科学专业学生,主要从事天然产物开发研究;王晓娟(1988—),女,云南昆明人,2008级生物技术及应用专业学生,主要从事天然产物开发研究.

**通讯作者:**沈放(1973—),女(满族),辽宁凤城人,讲师,硕士,主要从事生物化学、天然产物开发和药理学研究,E-mail:fs\_@163.com.

干,取出块状干品研磨成粉末密闭保存,得蛇菰多糖。

#### 1.4 还原糖的定性试验

通过氨性硝酸银(Tollen)试剂法、苯酚硫酸法和 $\alpha$ -萘酚硫酸法,验证蛇菰提取物是否具有还原性多糖。

#### 1.5 葡萄糖标准溶液的制备

精密称取葡萄糖 100.0 mg,干燥恒重,加蒸馏水定容至 100 mL 得到质量浓度为 1.00 mg/mL 的葡萄糖标准液。

#### 1.6 供试品蛇菰多糖溶液的制备

精密称取蛇菰多糖 10.0 mg,用蒸馏水配制成质量浓度为 1.00 mg/mL 的供试品蛇菰多糖储备液。

#### 1.7 多糖的测定方法<sup>[7-9]</sup>

多糖测定法有蒽酮比色法、苯酚—硫酸比色法、碱性铜试剂法、高锰酸钾滴定法和直接滴定法等,现多糖的测定多采用苯酚—硫酸比色法。

##### 1.7.1 反应温度选择

鉴于多糖干燥的温度,并参考文后有关文献[7,10]选定反应温度为 40 ℃。

##### 1.7.2 反应时间选择

精密吸取标样溶液、对照品溶液各 20  $\mu$ L,加入蒸馏水 180  $\mu$ L,苯酚溶液 0.4 mL,混匀,迅速加入浓硫酸 2 mL,混匀,40 ℃水浴,分别于 5,10,15,20,25 min 测定吸光度  $A_{490}$ ,由吸光度的变化选择最佳反应时间。

##### 1.7.3 测定方法的可靠性验证

精密吸取标样溶液、对照品溶液各 10,15,20,25  $\mu$ L,按上法操作,40 ℃水浴 15 min,测定吸光度。以各样品  $A_{490}$  值为纵坐标,含量为横坐标做图,从供试品和对照品溶液的曲线来验证测定方法的可靠性。

#### 1.8 标准曲线的测定

精密吸取葡萄糖标准液 2,4,6,8,10,12,14 mL,分别定容至 100 mL。分别吸取上述溶液各 0.2 mL(含糖 4~28  $\mu$ g),加入苯酚溶液 0.4 mL,混合后迅速加入浓硫酸 2 mL,混匀,40 ℃水浴 15 min,在 490 nm 波长处测定吸光度  $A_{490}$ ,并绘制标准曲线,每个样品做 4 个平行。

#### 1.9 精密度试验

精密吸取 6 份葡萄糖标准溶液各 2 mL,如上法操作,测定吸光度,并计算含量(质量分数,下同)和 RSD。

#### 1.10 样品的含量测定和重现性试验

精密称量 3 份干燥蛇菰多糖 4 mg,加入蒸馏水配制成质量浓度为 1 mg/mL 溶液备用。测定按照 1.8 中标准曲线测定方法进行,测定样品中的蛇菰多糖的含量并计算 RSD。

#### 1.11 回收率试验

精密制备 3 份已知含量的蛇菰多糖溶液,在 3 份

溶液中分别加入葡萄糖标准溶液 2 mL,运用苯酚—硫酸法测定  $A_{490}$  并计算其含量和回收率。

加样回收率 =

$$\frac{\text{样品中总糖量} - \text{样品中葡萄糖量}}{\text{加入标准无水葡萄糖的量}} \times 100\%$$

## 2 试验结果

### 2.1 蛇菰多糖的定性

通过氨性硝酸银(Tollen)试剂法、苯酚硫酸法和 $\alpha$ -萘酚硫酸法进行多糖定性,结果表明,蛇菰提取物在 3 种方法的检测中均表现出阳性反应。

### 2.2 蛇菰多糖测定条件的确定

#### 2.2.1 反应条件的确定

鉴于多糖干燥的温度,并参考文后有关文献[10]选定反应温度为 40 ℃。

精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 20  $\mu$ L,水浴,分别于 5,10,15,20,25 min 测定吸光度  $A_{490}$ ,选择最佳反应时间。结果如图 1。

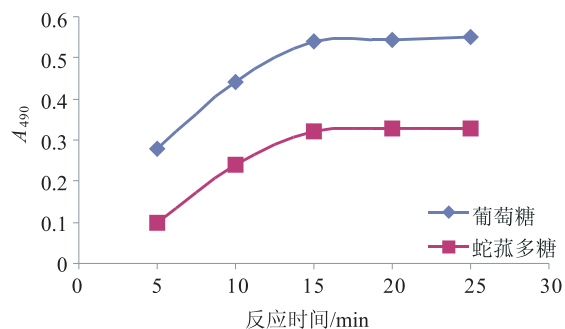


图1 苯酚硫酸法反应时间对蛇菰多糖含量测定的影响

结果表明,15,20,25 min 时测定数值较为接近,与 5,10 min 时测定的数据有较为明显的差别,由此看来,当反应达到 15 min 时反应较为完全,应选择 15 min 为本试验的反应时间。

#### 2.2.2 苯酚硫酸法测定蛇菰多糖的可靠性验证

精密吸取蛇菰多糖溶液、葡萄糖标准液各 10,15,20,25  $\mu$ L,运用苯酚硫酸法测定各样品  $A_{490}$  值,验证测定方法的可靠性。结果如图 2:

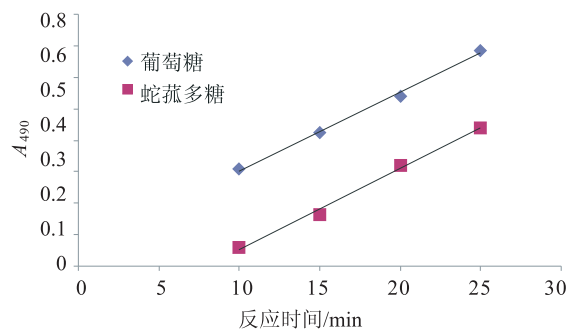


图2 苯酚硫酸法测定蛇菰多糖的可靠性

结果表明,蛇菰多糖的稀释曲线与葡萄糖标准品曲线相互平行无交叉,并表现出良好的剂量依存关系。因此,运用苯酚硫酸法测定蛇菰多糖的含量是

可靠的.

### 2.3 蛇菰多糖含量测定

#### 2.3.1 标准曲线的测定

葡萄糖标准液经测定后绘制标准曲线,如图3.

试验结果表明,无水葡萄糖在  $4 \sim 28 \mu\text{g}$  之间,呈良好的线性关系,  $y = 0.0263x + 0.0284$ ,  $R^2 = 0.9985$ . 精密度试验结果表明,仪器精密度较好,  $RSD = 1.43\%$ .

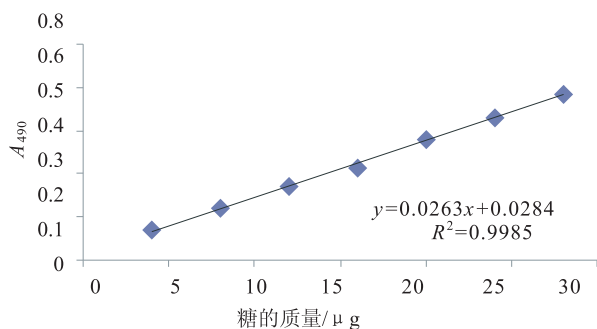


图3 葡萄糖标准液标准曲线

#### 2.3.2 蛇菰多糖含量测定

蛇菰多糖样品经含量测定,样品数  $n = 3$ ,平均吸光度  $A = 0.613$ . 以蛇菰多糖样品量计,样品中含多糖  $11.13\%$ . 以生药量计,蛇菰中含多糖  $0.38\%$ . 回收率试验结果表明,蛇菰多糖的加样回收率为  $100.73\%$ ,  $RSD = 1.61\%$ .

## 3 讨论

根据多糖的性质,多糖在水中的溶解性较大,却不溶于高浓度的乙醇溶液,因此可利用高浓度乙醇分级沉淀,分离纯化获得多糖. 多糖的提取方法较多,很多中药材中多糖的提取均使用水提醇沉法<sup>[7,8,10-11]</sup>,本文采用高浓度乙醇脱脂后进行水提醇沉提取蛇菰多糖,通过一系列试验确定了提取方法的可靠性. 多糖可被酸水解成单糖,单糖可同苯酚、蒽酮、呋唑类发生颜色反应<sup>[12]</sup>,反应后颜色的深浅和样品中糖的含量成正比,运用分光光度计进行比

色就可测定样品中糖的含量. 因此,本文采用了文献报道中多糖含量测定常用的方法——苯酚—硫酸法进行蛇菰多糖含量测定,通过试验确定了运用苯酚—硫酸法测定蛇菰多糖的反映温度 ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 和反应时间 ( $15\text{ min}$ ). 此法简便易行,显色稳定,灵敏度高,效果较好.

试验结果表明,本试验较为成功地提取了蛇菰多糖,并建立了相应的测定方法,为进一步蛇菰多糖的研究打下了一定的基础.

### [参考文献]

- [1] 邓泽,仓汉德,张绍云. 复方鹿仙草糖浆的研制[J]. 中国民族民间医药杂志, 2003, 65(3): 361-362.
- [2] 思茅地区民族传统医药研究所. 拉祜族常见病[M]. 昆明: 云南民族出版社, 1986.
- [3] 张绍云,宋昆生,王海春,等. 拉祜族药“密都那此”的研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1999, 39(4): 220-221.
- [4] 滕荣伟,王德祖,杨崇仁. 蛇菰的化学成分[J]. 云南植物研究, 2000, 22(2): 225-233.
- [5] 夏新中,韩宏星,屠鹏飞. 简鞘蛇菰的三萜及甾醇成分研究[J]. 中草药, 2001, 32(1): 6-9.
- [6] 潘剑宇,周媛,邹坤,等. 简鞘蛇菰的化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(3): 327-331.
- [7] 董群,郑丽伊,方积年. 改良的苯酚—硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(9): 550.
- [8] 郭胜伟,蔡宝昌. 白参菌多糖的提取及含量测定[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(12): 1065-1067.
- [9] SAHA S K, BREWER E F. Determination of the concentrations of oligo-saccharides, complex type carbohydrates and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method[J]. Carbohydr Res, 1994, 254: 157-161.
- [10] 沈放,王德斌. 当归多糖对酪氨酸酶活性的影响[J]. 昆明师范高等专科学校学报, 2005, 27(4): 61-62.
- [11] 徐翠莲,杜林洳,樊素芳,等. 多糖的提取、分离纯化及分析鉴定方法研究[J]. 河南科学, 2009, 27(12): 1524-1529.
- [12] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.

