

云芝多糖含量的比色测定—酚—硫酸法

潘维新 杨敬荣 于燕玲 王丽华 董善士

Colorimetric Determination of the Polysaccharides from Polystictus Versicolor —Phenol—Sulfuric Acid Method

Pan Weixin Yang Jingrong Yu Yanling
Wang Lihua Dong Shanshi

【摘要】本文利用酚—硫酸法测定云芝多糖的含量，并建立回归方程。

云芝多糖是从深层培养的云芝菌丝体中提取的蛋白多糖体（简称PV—1）。

据文献报导，单糖、寡糖、多糖和它们的衍生物都可以用酚—硫酸处理，而得到橙黄色溶液，反应灵敏，颜色稳定。戊碳糖及其衍生物的特征吸收在480nm处，已糖及其衍生物的特征吸收在485~490nm处^[1]。鉴于以上原理，我们以葡萄糖为标准来测定云芝多糖的含量。

实 验 材 料

一、试药

浓硫酸 比重1.84 A.R规格 南京化学试剂厂产品
5%酚溶液(g/g) 重蒸馏的A.R规格酚
D(+)-葡萄糖 A.R规格，105°干燥4小时 北京化工厂产品

二、仪器

UV—300型紫外可见分光光度计 日本岛津
微量天平 十万分之一 北京光学仪器厂

三、样品

PV—1 南京药学院药用植物园提供
PSK 日本商品

实 验 与 结 果

一、吸收曲线的绘制

精密称取5—10毫克样品置于小烧杯中，加水使溶解，定量转移入500ml容量瓶中，再

加水至刻度，混匀。吸取该溶液2ml置于100ml碘量瓶中，加1ml 5%的酚溶液，混匀，迅速加5ml浓硫酸，振摇5分钟，置沸水浴中加热15分钟，然后置冷水浴中冷却30分钟。以酚-硫酸溶液为空白，从600~400nm处进行扫描，得到如下吸收曲线（如图1）

二、标准曲线的绘制

精密称定2.500、5.000、7.500、10.000、12.500、15.000毫克的葡萄糖分别置于小烧杯中，各加水使溶解，分别定量转移入500ml容量瓶中，加水至刻度，混匀。每2ml溶液中含葡萄糖为10、20、30、40、50、60微克。

分别吸取上述溶液2ml于100ml碘量瓶中，加1ml 5%酚溶液，混匀，迅速加5ml浓硫酸，振摇5分钟，置沸水浴中加热15分钟，然后置冷水浴中冷却30分钟。以酚-硫酸溶液为空白，于490nm处进行比色测定。

结果：

10微克	A=0.070	20微克	A=0.137	30微克	A=0.200
40微克	A=0.274	50微克	A=0.333	60微克	A=0.411

根据以上数据绘制C—A标准曲线，参见图一Ⅱ

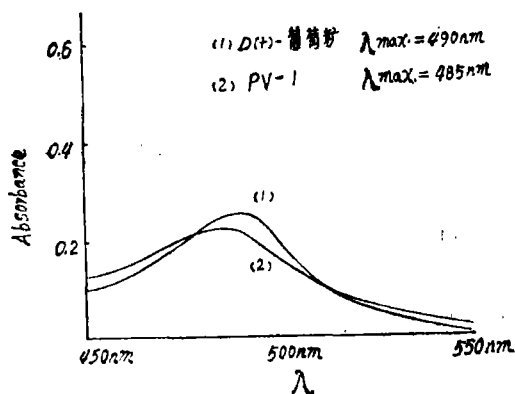


图 I D(+)-葡萄糖和
PV-I 的吸收曲线

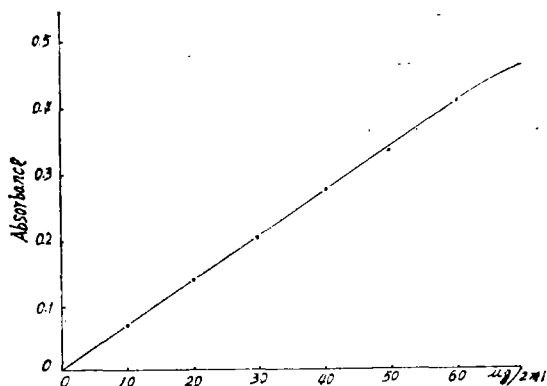


图 II D(+)-葡萄糖的标准曲线

但在实际应用中常感到标准曲线法精度不高，制作曲线又较为麻烦，故采用回归方程法克服上述缺陷。

设回归直线方程：

$$y = a + bx$$

将上述实验数据列回归计算表（如表1）

表 1 D(+)-葡萄糖的回归计算表

序号	x_i	y_i	x_i^2	y_i^2	$x_i y_i$
1	10	0.070	100	0.0049	0.700
2	20	0.137	400	0.01877	2.740
3	30	0.200	900	0.0400	6.000
4	40	0.274	1600	0.07508	10.96
5	50	0.333	2500	0.1109	16.65
6	60	0.411	3600	0.1689	24.66
Σ	210	1.425	9100	0.4186	61.71

注 x_i 代表浓度 C y_i 代表吸收值 A

$$a = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} = \frac{9100 \times 1.425 - 210 \times 61.71}{6 \times 9100 - (210)^2} = 0.0008$$

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} = \frac{6 \times 61.71 - 210 \times 1.425}{6 \times 9100 - (210)^2} = 0.006764$$

$$\therefore y = 0.0008 + 0.006764X$$

$$\text{即 } A = 0.0008 + 0.006764C$$

$$C = 147.9A - 0.1182$$

按上式计算标准品吸收值的校正值和欲测样品的含量

三、回收率试验

精密称定 3—5 毫克葡萄糖置于小烧杯中，加水使溶解，定量转移入 250ml 容量瓶中，再加水至刻度，混匀。吸取该溶液 2ml 按标准曲线项下操作，以酚-硫溶液为空白，在 490nm 处进行比色测定。按下列公式计算百分回收率。

表 2 D(+)-葡萄糖吸收值测得值与校正值的比较

序号	标准液 (微克/2ml)	测得值	校正值
1	10	0.070	0.068
2	20	0.137	0.136
3	30	0.200	0.204
4	40	0.274	0.271
5	50	0.333	0.339
6	60	0.411	0.407

$$\text{葡萄糖的百分回收率} = \frac{u \times 100}{\frac{W}{250} \times 2} = \frac{u \times 12500}{W}$$

u ：检出量（微克） W ：样品重量（微克）

表3 D(+)-葡萄糖的回收率试验

编号	加入量 (微克)	检出量 (微克)	百分回收率
1	46.80	48.09	102.7
2	34.96	34.78	99.47
3	38.32	37.89	98.88
4	30.88	30.94	100.2
极差	3.8%		

表4 D(+)-葡萄糖回收率的重显性试验

编号	加入量 (微克)	第一次测定检 出量(微克)	百分回收率	第二次测定检 出量(微克)	百分回收率
1	46.80	48.09	102.7	48.40	103.4
2	34.96	34.78	99.47	35.23	100.8

四、样品测定

精密称定3—4毫克样品于小烧杯中，加水温热使溶解，定量转移入100ml容量瓶中，再加水至刻度，混匀。吸取该溶液2ml按标准曲线项下操作。以酚—硫酸溶液为空白，于490nm处进行比色测定。按下列公式计算样品的百分含量。

$$\text{样品的百分含量} = \frac{u \times 100}{\frac{W}{100} \times 2} = \frac{u \times 5000}{W}$$

u: 检出量(微克) W: 样品重量(微克)

表5 云芝多糖的含量测定结果

样品名称	加入量 (微克)	检出量 (微克)	百分含量
PV-1	42.27	25.76	60.94
PSK	49.94	34.64	69.36

讨 论

一、绘制标准曲线和测定样品的条件要一致，尤其是酚的浓度和加入量更为重要。否则会造成比较大的误差。

二、测定的精密性，只要条件选择适当，操作细心，可以期待达到±5%以内。

三、根据文献报导和我们实验的结果，标准曲线的浓度10~60微克为好。浓度大于60微克，曲线逐渐向下弯曲，线性较差。

参 考 文 献

[1] Dubis M, et al: Anal Chem (28):350, 1956