

文蛤多糖的提取及含量测定[△]

尹华*, 袁强, 储云月

(浙江中医学院药学系, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 确定文蛤多糖提取的最佳工艺,以苯酚-硫酸显色,分光光度法测定文蛤多糖含量。方法 采用超声波提取,酸水解法进行处理;利用苯酚-硫酸显色,标准曲线在 490nm 处分光光度法测定。结果 超声提取 30min,提取 2 次,料水比 1:20 为最佳工艺。曲线在 4.848~24.242 mg·L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系,回归方程: $C=28.69A+0.229$ ($r=0.9992$); 平均回收率为 100.67%, RSD 为 2.83% ($n=6$)。结论 本实验文蛤多糖的提取及含量测定操作简便,结果准确,重现性好,可用于文蛤多糖的提取与含量测定。

关键词:文蛤;多糖;提取工艺;含量测定

中图分类号:R931.74,R927.2,TQ460.6 文献标识码:A 文章编号:1002-3461(2006)01-0048-04

Extraction and determination of polysaccharides from *Meretrix meretrix* Linnaeus

YIN Hua, YUAN Qiang, CHU Yun-yue

(Department of Pharmacy, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract; Objective To study the optimum extraction process of polysaccharides from *Meretrix meretrix* Linnaeus. A spectrophotometry method for content determination of polysaccharides from *Meretrix meretrix* Linnaeus was established with Phenol-sulfuric acid coloration.

Methods The samples were extracted by ultrasonic wave, dissolved in 50mL, 4mol·L⁻¹ HCl and heated to hydrolyze by acid. The contents of polysaccharides from *Meretrix meretrix* Linnaeus were determined by spectrophotometry at 490nm. **Results** Extracted for thirty minutes by ultrasonic wave, two times, and acidic hydrolysis were the optimum technology. The calibration curve was linear over the range of 4.848~24.242mg·L⁻¹. The regression equation was $C=28.69A+0.229$ ($r=0.9992$). The average recovery rate was 100.67% and RSD was 2.83% ($n=6$). **Conclusion** The method was proved to be simple, accurate and reliable, and could be used to extract and determine the polysaccharides from *Meretrix meretrix* Linnaeus.

Key words: *Meretrix meretrix* Linnaeus; polysaccharides; extraction; determination

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)属帘蛤科动物,又名花蛤、黄蛤、圆蛤等,我国沿海均有分布。文蛤肉为文蛤的软体部分,味咸性平,蛤壳味咸,性微寒,具清肺化痰、软坚散结、利水消肿、制酸止痛、扶正祛邪之功效,常用以治疗各类结核、肾虚、糖尿病以及肿瘤等

疾病^[1]。

文蛤中含有大量的多糖及一定量的核酸、蛋白质、氨基酸、矿物质和微量元素,其中多糖及核酸是文蛤提取物中具有重要生物活性的成分,据文献报道^[1~4]文蛤多糖具有调节机体免疫功能,抗突变、降血糖、抗肿瘤、抗

[△]基金项目:浙江省教育厅科研基金资助项目(No. 20000218)

* 作者简介:尹华,女,副教授 Tel: (0571) 86613604; 13905714729; E-mail: maryyinhu@163.com

衰老等药理作用。本实验对文蛤多糖的提取工艺及含量测定进行研究, 以期对文蛤的合理利用提供科学依据。

1 仪器与试剂

UV-2501PC 型分光光度计(日本岛津); KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 万分之一电子分析天平(德国塞多利斯); 电子恒温不锈钢水浴锅 DZKW-4 (上海东星建材试验设备有限公司)。

葡萄糖标准液(卫生部上海生物制品研究所); 苯酚、盐酸、硫酸均为分析纯; 文蛤产自舟山海域, 经浙江中医学院药学系资源鉴定教研室陈锡林副教授鉴定为文蛤 *Meretrix meretrix* Linnaeus。

2 实验方法与结果

2.1 提取工艺的优化

2.1.1 提取方法的考察: 称取 2 份等量的文蛤肉, 剪碎, 加同量的蒸馏水, 分别用超声波和水煎法提取, 各提取 2 次, 合并提取液, 经浓缩, 采用苯酚-硫酸比色法进行含量测定(详见 2.2.2 供试品溶液的制备), 结果显示 2 种提取方法得率相差不大, 考虑到实验操作的简便性, 因此采用超声波提取法。

2.1.2 加水量的考察: 称取 3 份文蛤肉, 每份 10g, 各加水 100, 200, 300mL, 其后处理同 2.1.1, 结果表明以 200mL 加水量文蛤多糖含量最高, 故控制加水量为 1:20。

2.1.3 超声提取时间的考察: 称取等量的文蛤肉 3 份, 剪碎后各加入适量蒸馏水, 然后分别超声处理 30, 60, 90min, 其后处理同 2.1.1。结果表明超声提取 30min 即可将多糖提取完全, 故超声提取时间控制为 30 min。

2.1.4 酸解条件的考察: 对酸解时加入的盐酸量进行了考察。称取文蛤肉 3 份各 10g, 剪碎后分别加入蒸馏水 200mL, 超声提取 30min, 各提取 2 次, 合并提取液浓缩至 10mL, 各取浓缩液 2mL 分别加入 4mol · L⁻¹ 的盐酸 50, 80, 100mL, 之后处理同 2.1.1。结果表明酸解时加入 4mol · L⁻¹ 盐酸为

50mL 时最佳。

2.2 溶液的制备

2.2.1 葡萄糖对照品溶液的制备

精密吸取 1.00mg · mL⁻¹ 的葡萄糖标准液 1.00mL, 置于 5mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

称取文蛤肉 10g, 加蒸馏水 200mL, 超声提取 30min, 倾出上清液, 加入同量水再提取一次; 弃去肉渣, 合并上清液, 并浓缩至 10mL(相当于每 1mL 提取液含文蛤肉 1g)。精密吸取浓缩液 2mL, 加入 4mol · L⁻¹ 的盐酸 50mL, 沸水浴中水解 2h, 冷却, 用 10mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液中和至 pH 约 6.8, 移入 100mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液作为供试品溶液。

供试液处理及测定波长的确定: 精密量取供试品溶液 0.80mL, 置于 25mL 容量瓶中, 加蒸馏水至 4.0mL, 摇匀, 加入 2% 苯酚溶液 2.5mL, 摇匀, 迅速均匀地滴加浓硫酸 10.0mL, 稍置片刻, 摇匀, 室温中放置 10min 后, 置沸水浴中 15min, 取出, 冰浴冷却, 用紫外分光光度计测定吸收曲线, 结果表明其最大吸收波长为 490nm, 故确定 490nm 为测定波长(见图 1)。

2.2.3 空白溶液的制备

不加文蛤浓缩液, 其余操作同“2.2.2 供试品溶液的制备”。

2.3 空白试验

取供试品溶液、葡萄糖对照品溶液及空白溶液在相同显色条件下测定吸收曲线, 结果显示空白溶液在此液长下无吸收, 表明该显色条件对文蛤多糖成分测定无干扰, 吸光度为被测成分的响应, 确证了该分析方法的可行性(见图 1, 2, 3)。

2.4 线性关系的考察

精密吸取 200μg · mL⁻¹ 葡萄糖对照品溶液 0.00, 0.40, 0.80, 1.20, 1.60, 2.00mL, 分别置于 25mL 容量瓶中, 加蒸馏水至 4.0mL, 摇匀, 加入 2% 苯酚溶液 2.5mL, 摇匀,

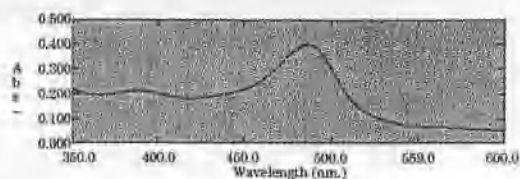


图 1 供试品溶液的吸收曲线

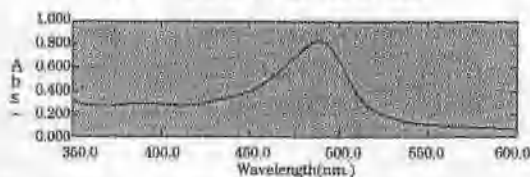


图 2 葡萄糖对照品溶液的吸收曲线

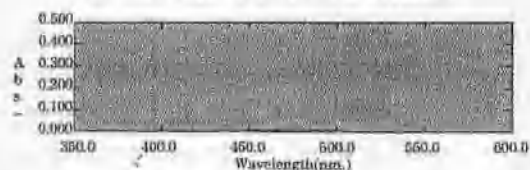


图 3 空白溶液的吸收曲线

迅速均匀地滴加浓硫酸 10.0 mL, 稍置片刻, 摇匀, 室温中放置 10 min 后, 置沸水浴中 15 min, 取出, 冰浴冷却, 在 490 nm 波长处测定各溶液的吸光度。以浓度 C 为纵坐标, 吸光度 A 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程及相关系数为: $C = 28.69A + 0.229$, $r = 0.9992$ ($n = 5$)。结果表明葡萄糖在 $4.8480 \sim 24.242 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内吸光度与浓度呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取葡萄糖对照品溶液及供试品溶液各 0.80 mL, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 自“加水至 4.0 mL……”起, 依法操作, 分别在 490 nm 波长处平行测定 6 次, 记录吸光度 (A)

值, 计算 RSD ($n = 6$)。结果平行测定 6 次对照品溶液吸光度均值为 0.326, $RSD = 0.00\%$; 供试品溶液吸光度均值为 0.380, $RSD = 0.00\%$; 表明本方法的精密度高。

2.6 稳定性试验

精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 0.80 mL, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 自“加水至 4.0 mL……”起, 依法操作, 分别在 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 h 后于 490 nm 波长处测定吸光度, 结果对照品溶液和供试品溶液吸光度的 RSD 分别为 0.64% 和 1.25%, 表明对照品溶液和供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重现性试验

取同一批文蛤肉样品 5 份各约 10 g, 精密称定, 根据“2.2.2”方法进行供试品溶液的制备和吸光度测定。计算多糖的含量及 RSD ($n = 5$)。结果样品中文蛤多糖的平均含量为 1.17%, RSD 为 3.84%, 表明重现性良好。

2.8 加样回收率试验

根据重现性试验得出的平均吸光度 (A) = 0.389 代入回归方程计算文蛤肉中文蛤多糖的含量为 1.17%。精密称取同一批文蛤肉样品 6 份, 每份约 5 g, 各加入等量的 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖对照品, 按“2.2.2 供试品溶液的制备”项下方法制备及处理, 测定其吸光度。根据加样回收率公式: $\text{回收率} \% = (C - A) / B \times 100$, (式中 A : 样品所含被测成分值; B : 加入纯品量; C : 实测值)。计算得平均回收率为 100.67%, RSD 为 2.83% ($n = 6$), 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

实验号	称重	样品含量(A)	加入纯品量(B)	实测值(C)	回收率(%)
	g	mg	mg	mg	
1	5.002	58.52	58.50	117.14	100.2
2	5.007	58.58	58.60	118.58	102.4
3	5.012	58.64	58.60	119.10	103.2
4	5.000	58.50	58.50	114.33	95.4
5	5.004	58.55	58.50	118.44	102.4
6	5.008	58.59	58.60	117.44	100.4

注: 平均回收率(%) = 100.67%, $RSD = 2.83\%$

2.9 样品含量测定

取 3 批不同批次的文蛤样品,精密称定,按“2.2.2 供试品溶液的制备”项下方法制备,和测定,计算样品中多糖的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(n=3)

批号	含量(%)	RSD(%)
20030311	4.37	2.60
20030426	1.04	2.62
20030428	1.17	3.84

3 讨论

本实验的最佳提取方法由单因素考察而确定。比较超声法与水煎法提取,两者差别不大,考虑到操作的简便性,选择超声波法提取。因文蛤肉中含有大量的蛋白质、脂肪等成分,因此需进行除蛋白等处理,对动物多糖除蛋白、脱脂等去除杂质的方法有酶降解法、碱处理法、酸降解法等^[9],考虑到实验操作的可行性及实验条件的限制,本实验采用酸解法进行预处理。

据文献报道,多糖含量可采用滴定分析法、苯酚-硫酸显色法、蒽酮显色法等方法进行测定^[7-9]。其中以苯酚-硫酸显色法较为可靠和常用,往往作为测定各种多糖的首选方法,但该方法要求较高,如对照品选择应与供试品中单糖中结构相符;水解须完全;显色剂的加入量及显色时间需控制等。采用本实验

条件并注意上述因素测定文蛤肉中多糖的含量,其结果令人满意。另外,还需注意苯酚易氧化,在测定中应避免光及操作迅速。

通过对 3 个批次文蛤样品多糖含量的测定,发现 3 者含量相差较大,其原因可能与各批文蛤的品种、产地、大小、季节、文蛤的新鲜程度等有关。因此,实验前需对文蛤原材料进行鉴定。

参考文献:

- [1] 中国科学院南海海洋研究所海洋生物研究室. 南海海洋药用生物[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 65.
- [2] 罗运满, 吴冬明, 倪大石. 文蛤肉的药理作用[J]. 中国海洋药物, 1996, 15(2): 14.
- [3] 赛昌贵, 黄芳, 黄罗生, 等. 文蛤多糖抗癌免疫药理作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1999, 18(2): 15.
- [4] 徐秀兰, 李黎明, 张传儒. 文蛤水解液降糖及降脂作用的实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(6): 298.
- [5] 刘琦, 何木, 边忠芳, 等. 文蛤的生物学研究[J]. 黑龙江医药, 1997, 10(1): 3.
- [6] 周永. 多糖类抗肿瘤作用的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2001, 28(3): 129.
- [7] 丁钢强, 于村, 张双凤, 等. 食品多糖含量不同测定方法的研究[J]. 实用预防医学, 2000, 7(5): 325.
- [8] 廖建民, 张瑾, 沈于龙. 超声波法提取海带多糖的研究[J]. 药物生物技术, 2002, 9(3): 157.
- [9] 叶振南, 邵家坪, 陆惠文. 粗多糖的提取、分离及结构研究[J]. 中国药事, 2000, 5(14): 329.

(收稿日期: 2005-04-07)

附件:(此表复印放大至 A4 有效)

**“以岭医药杯”第八届全国青年药学工作者最新科研成果交流会
报名回执表(请务必正楷填写)**

姓名		性别	
出生时间		职务	
民族		职称	
单位名称			
详细地址			
邮政编码		E-mail	
联系电话	(请写明区号)		
传真		移动电话	
文章题目			
其他作者			
备注			

注:此表和论文务必于 2006 年 3 月 10 日前寄至中国药学会学术部。