

- colon cancer cells [J]. *Life Sci*, 2016, 151: 224-234. Doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.083.
- [8] VIGNANI F, BERTAGLIA V, BUTTIGLIERO C, et al. Skeletal metastases and impact of anticancer and bone-targeted agents in patients with castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 44: 61-73. Doi: 10.1016/j.ctrv.2016.02.002.
- [9] GUO L, DUAN L, DONG X, et al. Metabolic profile of miltirone in rats by high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 107: 473-479. Doi: 10.1016/j.jpba.2015.01.043.
- [10] GUO L, DUAN L, DONG X, et al. A simple and sensitive LC-MS/MS method for determination of miltirone in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 973C: 33-38. Doi: 10.1016/j.jchromb.2014.10.008.
- [11] TAN J. Synthesis of Chalcone derivatives and anti-breast cancer screening [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(3): 318-325.
- [12] YANG X C, WANG Y B, MUHEBULI A, et al. Synthesis of Chalcone isoliquieitigenin compounds and its anti-cervical cancer activity [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(1): 1-6.

收稿日期: 2016-04-12

## 茯苓多糖的提取及其分子量测定

刘颖<sup>1</sup>, 王文晔<sup>2</sup>, 姜红<sup>2\*</sup> (1.湖北中医药大学, 武汉 430000; 2.湖北省食品药品监督检验研究院, 武汉 430000)

**摘要:** 目的 优化茯苓多糖的提取工艺, 测定茯苓多糖分子量及其分布。方法 采用正交试验设计对影响茯苓多糖提取的因素(超声时间、料液比、提取温度、提取时间)进行优化; 以葡萄糖为对照品通过苯酚硫酸法测定茯苓多糖的含量; 高效尺寸排阻色谱-多角度激光光散射-示差折光联用(HPSEC-MALLS-RI)测定其分子量及其分布。结果 茯苓多糖的最佳提取工艺为超声时间 30 min, 液料比 1 : 50, 提取温度 100 °C, 提取时间 4 h; 茯苓多糖含量为 93.5%; 测得茯苓多糖组分 A 的重均分子量为  $4.671 \times 10^6 (\pm 1.003\%)$  Da, 分子量分布为 12.3%, 组分 B 的重均分子量为  $6.144 \times 10^4 (\pm 2.466\%)$  Da, 分子量分布为 87.7%。结论 本方法简便准确, 可作为测定多糖分子量分布的方法。

**关键词:** 茯苓; 多糖; 提取; 分子量

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)11-1402-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.011

### Isolation and Molecular Weight Determination of *Poria Cocos* (Schw.) Wolf

LIU Ying<sup>1</sup>, WANG Wenxi<sup>2</sup>, JIANG Hong<sup>2\*</sup> (1.Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430000, China; 2.Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To optimize the extraction conditions of polysaccharides from *Poria cocos* (Schw.) Wolf and to determine the molecular weight (*M<sub>w</sub>*) and its distribution. **METHODS** Orthogonal test design was employed to optimize the extraction conditions of polysaccharides from *Poria cocos* (Schw.) Wolf. The ultrasonic time, solid-liquid ratio, extraction temperature and extraction time were respectively taken into account. The total carbohydrate content was determined by the phenol-sulfuric acid method, with glucose as the standard. The *M<sub>w</sub>* and its distribution was determined by HPSEC-MALLS-RI. **RESULTS** The optimal extract condition of polysaccharide was as follows: the ultrasonic time was 30 min, solid-liquid ratio was 1 : 50, extraction temperature was 100 °C and extraction time was 4 h. The total carbohydrate content was 93.5%. Polysaccharides *M<sub>w</sub>* of component A and component B from *Poria cocos* (Schw.) Wolf were determined to be  $4.671 \times 10^6 (\pm 1.003\%)$  Da,  $6.144 \times 10^4 (\pm 2.466\%)$  Da, and the *M<sub>w</sub>* distribution of A and B were determined to be 12.3% and 87.7%. **CONCLUSION** This method is simple and accurate, it can be used to determine the molecular weight and its distribution of polysaccharides.

**KEY WORDS:** *Poria cocos* (Schw.) Wolf; polysaccharides; extraction; molecular weight

茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 为寄生在松树根上的菌类植物, 其原生物为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核, 是 1 种常见的东亚传统药用真菌,

主要分布在中国、韩国、日本和北美。茯苓味甘、淡、性平, 入药具有利水渗湿、益脾和胃、宁心安神的作用。随着科学研究的不断深入, 研究者

作者简介: 刘颖, 女, 硕士 Tel: 15927279489 E-mail: vivi-ly@foxmail.com

\*通信作者: 姜红, 女, 主任药师 Tel: 15697185050

E-mail: hbyjsjh@163.com

们发现茯苓多糖约占整个茯苓菌核干重的70%~90%，大量研究表明茯苓多糖具有多种药理作用，其中抗肿瘤和免疫调节功能<sup>[1]</sup>愈来愈引起人们的关注。

测定多糖分子量及其分布的方法很多，有端基分析法、拉乌尔法、凝胶渗透色谱法、气相渗透法等，其中高效分子排阻色谱法(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)具有设备和操作简单、分辨率高、分离效率高、重复性好等优点，HPSEC法测定的是高分子物质分子量(molecular weight,  $M_w$ )的相对值，MALLS法测定的是高分子物质  $M_w$  的绝对值，两者联用可实现不同  $M_w$  高聚物的快速分离分析。近年来，高效尺寸分子排阻色谱-十八角激光散射仪联用法以快速、高效、稳定等特点被 WHO 推荐纳入多糖质控体系<sup>[2-4]</sup>。高效尺寸排阻色谱-多角度激光光散射-示差折光联用(HPSEC-MALLS-RI)能够直接测出样品的绝对分子量，不需要相同结构的对照品绘制标准曲线，能准确地测定物质的重均、数均和 Z 均分子量及分子量分布。测定的分子量范围很广可以从几十万到几百万道尔顿，同时还可获得样品的聚集态信息(棒状、无规则线团或球形)<sup>[5-7]</sup>。

本实验通过正交试验优化茯苓多糖的最佳提取工艺，并采用 HPSEC-MALLS-RI 联用技术测定其分子量及分布，为茯苓资源的开发和利用提供良好的基础。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Evolution300 紫外分光光度计(Thermo, USA); TSK gel PW-M 凝胶色谱柱, 两柱串联(TSK, Japan); Wyatt DAWN HELEOS-II 十八角激光光散射仪(Wyatt Technology Co, USA); Waters2414 示差折光检测器(Waters, USA); Milli-Q 超纯水机(Millipore, USA); LC-250 超声清洗仪(济宁市中区鲁超仪器厂)。

### 1.2 试剂与样品

硫酸钠、乙醇、苯酚、浓硫酸、葡萄糖均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司；茯苓于 2015 年 3 月采自云南省大理州永平县苏屯村，经武汉轻工大学陈平教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓(*Poria cocos* F.A. Wolf)的干燥菌核。

## 2 方法

### 2.1 茯苓多糖的提取

**2.1.1 茯苓样品的处理** 将干燥茯苓菌核切块，经粉碎机粉碎，过 60 目筛，取粉末适量，加入 80% 乙醇溶液，70 °C 回流提取 2 h，重复上面步骤 2 次，取滤渣晾干，称重，得脱脂茯苓粉末，用于提取实验。

**2.1.2 正交试验设计** 多糖是一种极性大分子，一般溶于水而难溶于乙醇，所以一般采用水提醇沉法<sup>[8]</sup>。本实验采用超声辅助热水提取法<sup>[9-10]</sup>，即在热水浸提前对样品进行超声，通过正交试验对其工艺进行优化。

根据本实验前期单因素试验测定结果，精密称取茯苓 5 g，平行 9 份，置圆底烧瓶中，以超声时间、料液比、提取温度、提取时间为考察因素，每个因素设立 3 个水平，采用  $L_9(3)$  正交表进行正交试验，具体见表 1。

表 1 正交试验的因素水平表

Tab. 1 Factor levels of the orthogonal

水平	因素			
	超声时间/min (A)	料液比 (B)	提取温度/°C (C)	提取时间/h (D)
1	30	1:30	80	2
2	40	1:40	90	3
3	50	1:50	100	4

**2.1.3 多糖提取率** 多糖提取率=(多糖溶液浓度×稀释倍数×溶液体积)/药材质量×100%。

### 2.2 茯苓多糖含量测定

**2.2.1 溶液的配制** 6%苯酚: 取 6 g 苯酚加热溶解，定容至 100 mL 量瓶中，4 °C 下避光保存；1 g·L<sup>-1</sup> 葡萄糖标准溶液: 精密称取 1.000 g 葡萄糖，用蒸馏水定容于 1 000 mL 量瓶中，4 °C 下避光保存。

**2.2.2 标准曲线的绘制** 分别量取 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 葡萄糖对照品溶液(1 g·L<sup>-1</sup>)到 100 mL 量瓶中，加蒸馏水定容，各取 1 mL 加入试管中，依次加入 0.5 mL 6%苯酚溶液和 2.5 mL 浓硫酸，摇匀，冷却至室温后于 490 nm 处测吸光值。

**2.2.3 样品含量的测定** 配制一定浓度的茯苓多糖样品，按照上述标准曲线的操作测定其吸光度，代入回归方程，即可得其含量。

### 2.3 茯苓多糖分子量测定

**2.3.1 色谱条件** 流动相: 0.7%硫酸钠，TSK gel

PW-M 两柱串联, 柱温 37 °C, 示差折光检测器温度 40 °C, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 20 μL。

**2.3.2 样品溶液的配制** 称取茯苓多糖样品 50 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相使其充分溶胀, 定容过夜。

**2.3.3 分子量及其分子量分布测定的具体步骤** 取充分溶胀熬的茯苓多糖样品, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 进样。记录色谱图, 经 Astra V 软件分析即可得其分子量以及分布结果。

### 3 结果

#### 3.1 葡萄糖标准曲线

测得葡萄糖溶液浓度为 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg·mL<sup>-1</sup> 时的对应吸光度分别为 0.181, 0.314, 0.463, 0.615, 0.757, 由此数据以葡萄糖的浓度为  $X$  轴, 吸光度为  $Y$ , 其回归方程为  $Y=14.53X+0.0301$  ( $r^2=0.9995$ )。

#### 3.2 提取工艺

如表 2, 由  $K$  值可以确定各因素的最优水平是  $A_1, B_3, C_3, D_1$ , 由极差  $R$  值可知, 各因素对多糖提取率的影响次序为: 提取温度>料液比>超声时间>提取时间, 由此可见反应温度对水溶性多糖提取率影响最大。茯苓水溶性多糖的最佳提取条件为:  $A_1B_3C_3D_1$ , 虽然在 9 组正交试验中, 通过验证提取率最高的是  $A_1B_3C_3D_3$ : 超声时间 30 min, 料液比 1:50, 提取温度 100 °C, 提取时间 4 h, 但考虑到时间对其提取率影响不大, 缩短时间可减少工作量, 提高生产效率, 因此最终选择  $A_1B_3C_3D_1$  进行验证, 提取率分别为: 5.23%, 5.35%, 5.31%, 确定水溶性多糖的最佳提取工艺为: 超声时间 30 min, 料液比 1:50, 提取温度, 100 °C, 提取时间 2 h。

#### 3.3 茯苓多糖含量

按确定的最优提取条件:  $A_1B_3C_3D_1$  配制一定浓度的多糖样品溶液, 依次加入 0.5 mL 6% 苯酚溶液和 2.5 mL 浓硫酸<sup>[11]</sup>, 摇匀, 冷却至室温后于 490 nm 处测吸光度。将吸光度值代入标准曲线回归方程得此样品的含量为 93.5%。

#### 3.4 分子量及分布测定

由茯苓多糖分子量色谱图可知茯苓多糖由组分 A 和组分 B 组成, 结果见图 1。由 Astra V 软件分析其分子量。显示分子量大的组分所占比例小, 分子量小的所占比例大。结果见表 3。

表 2 正交试验结果

Tab. 2 Orthogonal test results

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	4.28
2	1	2	2	2	4.29
3	1	3	3	3	5.62
4	2	1	2	3	4.02
5	2	2	3	1	4.97
6	2	3	1	2	4.32
7	3	1	3	2	4.71
8	3	2	1	3	3.84
9	3	3	2	1	4.57
K1	14.19	13.01	12.44	13.82	
K2	13.31	13.10	12.88	13.32	
K3	13.12	14.51	15.30	13.48	
k1	4.73	4.34	4.15	4.61	
k2	4.44	4.37	4.29	4.44	
k3	4.37	4.84	5.10	4.49	
R	0.36	0.50	0.95	0.17	
优水平	$A_1$	$B_3$	$C_3$	$D_1$	
优组合	$A_1B_3C_3D_1$				

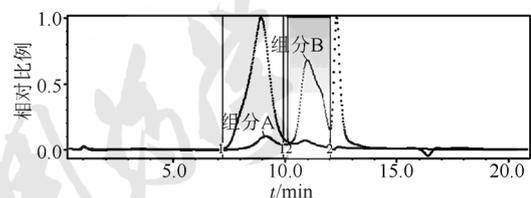


图 1 HPSEC-MALLS-RI 图谱结果

Fig. 1 Plot of HPSEC-MALLS-RI

表 3 茯苓多糖分子量和分子量分布的结果

Tab. 3 Pachyman results of  $M_w$  and  $M_w$  distribution

茯苓多糖	组分 A	组分 B
$M_w$	$4.671 \times 10^6 (\pm 1.003\%)$	$6.144 \times 10^4 (\pm 2.466\%)$
$M_n$	$3.038 \times 10^6 (\pm 1.004\%)$	$4.164 \times 10^4 (\pm 2.385\%)$
$M_w/M_n$	1.538	1.475
占比/%	12.3	87.7

利用多角度激光光散射仪, 可以测定样品的绝对分子量和均方旋转半径(R.M.S), 通过 R.M.S 对重均相对分子质量( $M_w$ )作图, 分析曲线斜率可以获得高分子在溶液中的构象信息<sup>[12]</sup>。

对茯苓多糖的空间构象进行表征, 结果显示, 茯苓多糖多为团状, 斜率为 0.37, 见图 2。

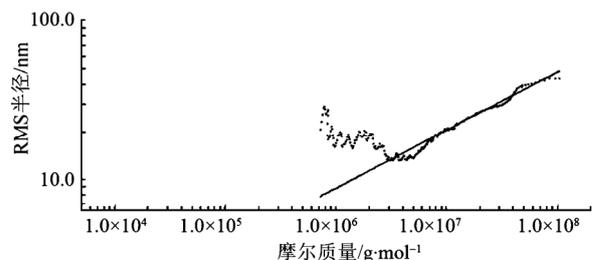


图 2 茯苓多糖在硫酸钠中的空间构象图

Fig. 2 Spatial conformation of pachyman in  $Na_2SO_4$

## 4 讨论

由于超声作用引起的机械震荡和空化效应产生的微射流会促进提取剂固体表面扩散以及多糖分子从固体主体流向液相主体,从而提高了液相体积的效能,这种方法不仅不会改变有效成分的结构,还缩短了提取时间,提高了提取效率,节省了能源,已经得到广泛的应用。本研究是在超声辅助的基础上采用热水提取法,通过正交试验对水溶性茯苓多糖的提取工艺进行了优化,得到了最佳提取工艺。但是经过优化后的工艺提取率仍然很低,经查阅的文献上报道运用微波,酶法等方法提取水溶性茯苓多糖的得率也不高,制约了茯苓溶性多糖的进一步研究、应用和工业化生产,因此考虑利用其他提取方法来获得更高的提取率。

从HPSEC-MALLS-RI图谱分析显示茯苓多糖含有2种组分,依次称为组分A、组分B,组分A的 $M_w$ 为 $4.671 \times 10^6 (\pm 1.003\%)$ 且占总量的12.3%,而组分B的 $M_w$ 为 $6.144 \times 10^4 (\pm 2.466\%)$ ,含量较高,占总量的87.7%,两组分的分子量分布宽度( $M_w/M_n$ )皆 $<2$ ,说明其均一性良好。

## REFERENCES

[1] LI J, HAN X H, LI Z H, et al. Isolation and determination of pachyman in *Poria cocos*(Schw.)Wolf [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2000, 17(1):49-50.

- [2] WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines [S]. WHO Tech Rep Ser, 2011, 962: 115-171.
- [3] WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines[S]. WHO Tech Rep Ser, 2013, 977: 91-153.
- [4] WHO. WHO position paper on Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2006, 81(47): 445-452.
- [5] 左渠. 激光散射原理及在分子生物学中的应用[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1994: 48, 229.
- [6] 耿艳. 简析多角度激光散射仪的原理及应用[J]. 科技创新与应用, 2013, (13): 52.
- [7] ZHONG X W, HUANG Q Q, XI T F. Determination of molecular weight and molecular weight distribution of chitosan by mals in conjunction with refractive index detector [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(9): 1258-1260.
- [8] 张兆旺, 孙秀梅. 中药水提醇沉淀法应用中注意的问题[J]. 山东中医药大学学报, 1995, 19(6):421-422.
- [9] LIN R, ZHANG F D, HUANG B F, et al. Extraction process of sweet potato polysaccharide by ultrasonic [J]. Sub Agri Res(亚热带农业研究), 2005, 1(4): 66-68.
- [10] LIU S L, HUANG L D, GUO L Q, et al. Orthogonal design for optimization of ultrasonic extracting procedure for total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(2): 136-139.
- [11] YANG Y J, JIANG R Z, CHEN Y H, et al. Determination of sugars in heteropoly saccharide by phenol-sulfuric acid method [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2005(6):706-708.
- [12] LEE J H, HAN J A, LIM S T. Effect of pH on aqueous structure of maize starches analyzed by HPSEC-MALLS-RI system [J]. Food Hydrocoll, 2009, 23(7): 1935-1939.

收稿日期: 2016-01-28

## 不同年份、不同产地西红花药材的质量研究

任红<sup>1,3</sup>, 姚建标<sup>2</sup>, 金辉辉<sup>2</sup>, 王如伟<sup>1,2\*</sup> (1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.浙江康恩贝制药股份有限公司, 杭州 310051; 3.浙江现代中药与天然药物研究院有限公司, 杭州 310051)

**摘要:**目的 通过对不同年份、不同产地的西红花药材进行质量分析,评价储藏年份以及产地对药材质量的影响。方法 收集不同年份、不同产地的西红花药材,对其进行质量考察,主要包括药材鉴定和含量测定。结果 随着储存年份的延长,西红花药材有不同程度的褪色情况,且西红花总苷含量呈降低趋势;比较不同产地的西红花药材,结果发现,建德、上海产的西红花药材西红花总苷含量 $>10\%$ ,国外的西红花药材部分批次没有达到药典要求。结论 随着保存年份的增加,西红花药材的外观性状以及西红花苷含量会有较大改变,采取特殊的保存措施能抑制其含量的降低;且不同产地的西红花药材中西红花苷含量也不同,国产药材西红花苷含量较高,可能与加工和保存方法有关。

**关键词:** 不同年份; 不同产地; 西红花总苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)11-1405-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.012

作者简介: 任红,女,硕士 Tel: 13575711633  
(0571)87774668 E-mail: wangrw@conbagroup.com

E-mail: 563631415@qq.com

通信作者: 王如伟,男,博士,职教授级高工

Tel: