

天花粉多糖的单糖组成分析及不同采挖期多糖含量比较

屠婕红, 陈伟光, 王照雷, 沈燕, 何嘉威(嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 从天花粉中提取纯化多糖, 在分析其单糖组成的基础上, 建立测定天花粉多糖含量的方法, 比较不同采挖时期天花粉中多糖含量的变化, 为确定天花粉适宜的采挖时间提供依据。方法 薄层色谱法和气相色谱法分析天花粉多糖的糖基组成, 多糖的含量测定采用改良的苯酚-硫酸法。结果 组成天花粉多糖的单糖残基为葡萄糖; 9月~12月及次年1月所采挖的5批药材多糖含量分别为7.51%, 6.16%, 10.40%, 18.90%和17.81%。结论 天花粉多糖是一种由葡萄糖组成的均多糖; 不同时期采挖的天花粉中多糖含量有显著差异, 以12月和1月采挖的天花粉中多糖含量最高, 所得结果对药材采收时间的确定有指导意义。

关键词: 天花粉; 多糖; 单糖组成; 含量

中图分类号: R282.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)07-0666-03

Monosaccharide Composition Analysis and Compare the Content of Polysaccharides in Different Harvest Time from *Trichosanthis Radix*

TU Jiehong, CHEN Weiguang, WANG Zhaolei, SHEN Yan, HE Jiawei(The Medical School of Jiaxing College, Jiaxing 314001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the isolation and composition of polysaccharides from *Trichosanthis Radix*. To determine and compare the content of polysaccharides in different harvest time. **METHODS** The monosaccharide composition was determined by GC and TLC. The content of polysaccharides was measured by modified phenol-sulfuric acid method. **RESULTS** The results indicated the polysaccharide was composed of glucose. The contents of polysaccharide were 7.51%, 6.16%, 10.40%, 18.90% and 17.81% respectively in five samples of *Trichosanthis Radix*. **CONCLUSION** The monosaccharide composition in polysaccharide from *Trichosanthis Radix* is glucose. The content of polysaccharides in *Trichosanthis Radix* of different harvest time is obviously different. The highest levels of polysaccharides among the samples are in December and January respectively. The results are useful to determinating the best harvest time of *Trichosanthis Radix*.

KEY WORDS: *Trichosanthis Radix*; polysaccharide; monosaccharide composition; content

天花粉为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥块根, 在历版中国药典中均有收载。现代研究表明, 天花粉具有终止妊娠、抗肿瘤、增强免疫和降血糖^[1]等功效。随着天花粉的开发利用, 国内对天花粉活性成分的药用研究逐渐增多, 但主要是集中在蛋白质上, 对天花粉多糖的研究少有报道。本课题组的研究表明: 天花粉多糖对人外周血单个核细胞(PBMC)有明显促增殖和活化作用, 并可诱导人 PBMC 高水平分泌产生 TNF- α 、IL-6, 初步证明了多糖是天花粉免疫增强作用的活性成分之一^[2]。因此, 天花粉中多糖含量的多少, 是体现药材质量的一个重要指标。为探讨不同采挖时间天花粉中多糖含量的差异, 选择适宜采挖时间, 本研究在分析天花粉多糖中单糖组成的基础上, 建立了测定天花粉中多糖含量的方法, 对同一产区、同一生长周期、采挖自

秋冬期 5 个不同月份的天花粉中多糖含量进行检测、分析和比较, 现将结果报告如下。

1 实验材料

1.1 药材及对照品

天花粉产于浙江平湖曹桥, 经嘉兴学院生药教研室王峻博士鉴定为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的块根, 生长周期均为 3 年, 采挖日期分别为: 2008-09-20、2008-10-20、2008-11-20、2008-12-20、2009-01-20, 洗净, 除去外皮, 纵剖成瓣, 干燥。单糖对照品: D-葡萄糖(纯度 $\geq 99.5\%$)、D-木糖、D-半乳糖、L-鼠李糖、D-甘露糖(批号: 20050926, 20040901, 2006202, 20011126, 20060527, 进口分装, 上海化学试剂公司), L-阿拉伯糖(批号: 1506-20001, 中国药品生物制品检定所), D-核糖(批号: 200-059-4, Sigma 公司), D-葡萄糖醛酸(批号: 48280, Fluka 公司)。

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2008CA108)

作者简介: 屠婕红, 女, 副教授 Tel: (0573)83643848 E-mail: jxtjh@139.com

1.2 仪器与试剂

UV-2401 型紫外分光光度计(日本岛津公司), 14C 型气相色谱仪(日本岛津公司), BSZ-100 自动收集仪(上海沪西分析仪器厂), CRYODOS-50 冷冻干燥机(西班牙艾提艾斯科学医药公司), 0412-1 离心机(上海手术器械厂), 2FQ-85A 旋转蒸发仪(上海医疗器械厂), DZF-1B 型真空干燥器(上海跃进医疗器械厂), 预制硅胶 G 薄层板(福山生化试剂厂), 透析袋(美国, 过滤相对分子质量为 3 500)。苯酚(分析纯), 重蒸馏后配成 5% 水溶液, 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖的单糖组分分析

2.1.1 多糖的提取纯化 称取天花粉干燥粉末 500 g, 石油醚回流脱脂 8 h, 药渣加 15 倍水量, 70 °C 提取 2 h, 重复 3 次, 离心, 合并上清液, 减压浓缩至原有体积的 1/4, 加 95% 乙醇使醇终浓度为 80%, 室温下静止 10 h, 析出多糖粗品沉淀。用三氯乙酸(TCA)法脱蛋白, 使溶液中 TCA 浓度达 6%, 放置, 离心除去蛋白质沉淀, UV 扫描 260, 280 nm 无蛋白质和核酸的吸收峰。上清液对蒸馏水透析 48 h, 浓缩透析液, 加三倍量 95% 乙醇醇析多糖, 静置 24 h, 沉淀用无水乙醇、丙酮和乙醚依次洗涤, 冷冻干燥得 23.2 g 白色粉末状多糖, 提取率为 4.64%。

2.1.2 多糖水解样品的制备 取 20 mg 天花粉多糖

干燥样品, 加入 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液 5 mL, 置 120 °C 烘箱中封管水解 4 h, 取出冷却后加碳酸钡中和至 pH 7~8, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心除去硫酸钡沉淀, 上清液减压蒸发至干, 获得多糖水解物, 备用。

2.1.3 TLC 分析 取少量天花粉多糖水解产物, 加适量水溶解, 进行硅胶薄层色谱, 以乙酸乙酯-甲醇-乙酸-水(13:3:3:3)为展开剂, 苯胺-邻苯二甲酸显色, 110 °C 烘烤 10 min 至显色清晰。对照标准单糖: 葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、鼠李糖和核糖的 R_f 值, 初步测定多糖样品中的单糖残基种类, 并参照刘翠平等^[3]所述方法判断是否含有糖醛酸。结果样品显示一个棕色斑点, R_f 值为 0.397, 根据与标准单糖斑点 R_f 值比较, 初步判定水解产物不含糖醛酸, 由葡萄糖组成。

2.1.4 气相色谱法 精密称取 10 mg 天花粉多糖水解产物, 加入 10 mg 盐酸羟胺, 0.5 mL 吡啶, 置 90 °C 水浴中加热反应 30 min 并振荡。取出后冷至室温, 加入 0.5 mL 乙酸酐, 在 90 °C 下继续反应 30 min 进行酰化(生成具有挥发性的糖腈乙酸酯), 反应产物直接进行气相色谱分析。单糖对照品按样品方法酰化, 进行 GC 分析。色谱条件: OV-225 弹性石英毛细管柱(0.32 mm×30 m); 柱温 80~180 °C, $15 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 程序升温, 180 °C 维持 25 min, 180~220 °C, $3 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 程序升温, 220 °C 维持 30 min。FID 检测器和进样口温度均为 260 °C; 载气为 N_2 , 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 $1 \mu\text{L}$ 。结果见图 1。

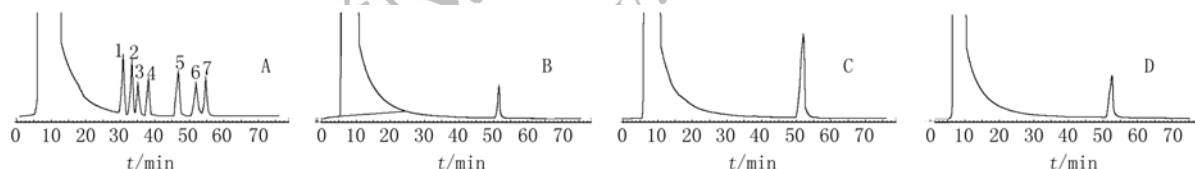


图 1 气相色谱图

A-各种标准单糖; B-多糖水解产物; C-葡萄糖对照品; D-多糖水解产物+葡萄糖; 1-鼠李糖; 2-核糖; 3-阿拉伯糖; 4-木糖; 5-甘露糖; 6-葡萄糖; 7-半乳糖

Fig 1 GC chromatogram

A-chemical reference substance; B-polysaccharide hydrolysis products; C-glucose; D-polysaccharide hydrolysis products + glucose; 1-rhamnose; 2-ribose; 3-arabinose; 4-xylose; 5-mannose; 6-glucose; 7-galactose

天花粉多糖完全水解物的糖腈乙酸酯衍生物, 气相色谱分析显示为单一峰, 其保留时间与 A 中 6 号峰(葡萄糖)一致; 对比 C 的保留时间和 D(样品中加入葡萄糖后仍然显 1 个峰, 同时峰高增高, 说明 B 和 C 为同一单糖), 结果与薄层色谱一致, 可以确定该多糖是由葡萄糖组成的均多糖。

2.2 多糖的含量测定

2.2.1 标准曲线的制备 精密称取 105 °C 干燥至

恒重的葡萄糖 50 mg, 加水溶解并加至 200 mL 量瓶刻度, 得葡萄糖对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度、摇匀。精密吸取上述溶液各 2.0 mL, 于具塞试管中, 加入 1.0 mL 5% 苯酚溶液, 再加入 5.0 mL 浓硫酸, 静置 5 min, 摇匀, 水浴(100 °C)加热 10 min, 30 °C 再显色 30 min。冷却后在 490 nm 波长处测定吸光度, 以 2 mL 蒸

馏水按同样显色操作为空白。以吸光度为横坐标,葡萄糖浓度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.0179X+0.008$, $r=0.9996$, 表明葡萄糖浓度在 $5\sim35\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与吸光度线性关系良好。

2.2.2 样品溶液的制备 精密称取不同月份采挖的天花粉粉末各 1 g, 加 5 mL 石油醚脱脂 2 h, 过滤, 挥去溶剂, 药渣加 15 mL 蒸馏水在 70 ℃ 水浴中提取 2 次, 每次 2 h, 并随时搅拌补水。离心($3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 合并上清液, 加乙醇使其含醇量达 80%, 放置过夜, 抽滤。将沉淀加水溶解, 蒸馏水透析 48 h, 并定容到 100 mL 量瓶中。

2.2.3 加样回收率试验 精密量取已知天花粉多糖含量的供试品溶液($17.16\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)1 mL, 共量取 6 份, 分别精密加入 $250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖对照品溶液 0.6, 0.6, 0.8, 0.8, 1.0, 1.0 mL, 加水稀释至 50 mL, 精密吸取上述溶液各 2.0 mL, 按“2.2.1”项下测定。另取 2.0 mL 蒸馏水同法操作做空白。求得平均回收率为 100.8%, RSD 为 1.91%($n=6$)。

2.2.4 重复性试验 精密吸取同一供试品溶液(12 月份批)0.2 mL, 共吸 6 份, 分别置 2 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 按“2.2.1”项下操作, 计算得多糖含量的 RSD 为 1.83%, 符合要求。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(12 月份批)0.2 mL, 分别置 2 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 按“2.2.1”项下操作。分别放置 0.5, 1, 1.5, 2., 2.5, 3, 3.5, 4 h, 测定吸光度, 计算得 RSD 为 0.67%。结果表明供试品溶液在 4 h 内稳定。

2.2.6 样品测定 精密吸取不同月份采挖的天花粉多糖供试品溶液各 0.20 mL, 置 2 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 按“2.2.1”项下操作。分别测定吸光度, 由回归方程 $X=(Y-0.008)/0.0179\times 0.9$ 计算总多糖含量, 式中 0.9 为转化系数, 由于多糖是以水解产生的单糖参与反应的, 由标准曲线直接计算得到的是单糖的含量, 需进一步转化为相应多糖的含量^[4-5]。测定结果见表 1。

3 结论与讨论

完全酸水解后薄层色谱及气相色谱分析显示: 天花粉多糖是一种由葡萄糖组成的均多糖。本实验中, 先提取纯化天花粉中多糖成分, 在确定其单糖组成为葡萄糖的基础上, 直接以组成的葡萄糖作标准曲线。若该多糖是由不同糖残基构成的杂多糖, 则需采用与杂多糖组成相同的混合单糖作标准曲线, 使测得结果更接近真实值。

表 1 不同采挖期天花粉中多糖的含量($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The contents of polysaccharides from *Trichosanthis Radix* in different harvest time($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

采挖日期	多糖含量/%
2008-09-20	7.51±0.43
2008-10-20	6.16±0.21
2008-11-20	10.40±0.47
2008-12-20	18.90±0.44
2009-01-20	17.81±0.98

为保证采样的代表性, 每批采挖量在 10 根以上, 除去外皮, 纵剖成瓣, 低温烘干, 混合粉碎成 60 目细粉, 以四分法缩分取样。苯酚-硫酸法测定多糖含量的原理是: 多糖被浓硫酸水合产生的高温迅速水解, 产生单糖, 单糖在强酸条件下与苯酚反应生成橙色衍生物, 因此单糖、寡糖和低聚糖对测定有干扰, 在样品溶液制备过程中, 醇沉可以去除这些干扰成分, 少量残留干扰物通过透析的办法去除。

天花粉属于根类药材, 一般在秋、冬二季采挖, 此时生长停止, 花叶凋谢, 进入休眠期及早春发芽前, 根部贮存的大量营养物质还没有分解, 所以有效成分含量较高。作者含量测定结果显示, 即使在秋、冬二季, 不同月份采挖的天花粉中多糖含量差异也非常显著, 以 12 月份和 1 月份采挖的天花粉中多糖含量最高。所得结果对以多糖含量为指标控制药材质量及选择适宜的药材采收时间具有一定指导意义。

REFERENCES

- [1] LI Z H, LU Y, LIU J X. The chemical constituents and pharmacological activities of *Radix Trichosanthis* [J]. *World Notes Plant Med*(国外医药 植物药分册), 2003, 18(1): 1-4.
- [2] XU S L, ZHAO G Z, TU J H, et al. Immunocompetence effects of polysaccharide of nakegourd root on human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2010, 35(6): 745-749.
- [3] LIU C P, DONG Q, FANG J N. New simple method to detecturonic acids in polysaccharide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2001, 32(5): 404-407.
- [4] DONG Q, ZHENG L Y, FANG J N. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharides [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 1996, 31(9): 550-553.
- [5] ZHANG W J. The Research Techniques of Glycoconjugates Biochemical(糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2003: 21-22.

收稿日期: 2010-10-21