

瓜蒌多糖的提取及组分分析

屠婕红,余菁,盛静(浙江省嘉兴学院医学院;浙江 嘉兴 314001)

摘要:目的 从瓜蒌中提取多糖,纯化,并分析其单糖组成。方法 用水提醇沉法提取瓜蒌多糖,Saveg法去蛋白,再进行透析、Sephadex G-100分离,真空干燥得瓜蒌多糖,薄层色谱法和GC法分析。结果 瓜蒌多糖由三种单糖组成。结论 多糖组分是鼠李糖、阿拉伯糖和葡萄糖,各单糖的摩尔比为:1.0:2.4:4.7。

关键词:瓜蒌;多糖;组分分析;气相色谱

中图分类号:R284.2 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)03-0239-03

Extraction and component analysis of polysaccharide of *Fructus Trichosanthis*

TU Jie-hong, YU Jing, SHENG Jing(*The Medical School of Jiaxing College, Jiaxing 314001, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the isolation and composition of polysaccharides from Fructus Trichosanthis. **METHODS** A polysaccharide from Fructus Trichosanthis was isolated with hot water extraction, alcohol sedimentation, Saveg deprotein, Sephadex G-100 chromatography. The composed monosaccharide were identified by GC and thin-layer chromatography. **RESULTS** A polysaccharide from Fructus Trichosanthis was composed of three kinds of monosaccharide. **CONCLUSION** The component of polysaccharides are identified as rhamnose, arabinose and glucose with a molar ratio of 1.0:2.4:4.7.

KEY WORDS: *Fructus trichosanthis*; polysaccharide; component analysis; GC

瓜蒌为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim 或双边栝楼 *Trichosanthes rosthornii* Hamms 的干燥成熟果实。有清热涤痰,宽胸散结,润燥滑肠之功效。临床上广泛用于肺热咳嗽,痰浊黄稠,胸痹心痛,结胸痞满,乳痈,肺痈,肠痈肿痛,大便秘结等症^[1]。现代药理研究表明,瓜蒌有扩张冠状动脉,增加血流量,提高耐缺氧能力,降低血清胆固醇,抗菌,抗癌等多种作用^[2]。瓜蒌富含蛋白质、油脂、挥发油、甾醇、三萜、无机元素等化学成分,但对瓜蒌多糖成分的研究尚未见报导。越来越多的研究发现,多糖对人体具有极大的利用价值,许多中药所含多糖均有显著的药用功效,如免疫增强作用,降血糖作用,抗氧化作用等。笔者研究瓜蒌皮中水溶性多糖的提取、分离、纯化及组成,为瓜蒌多糖的进一步研究利用提供了一定的基础。

1 仪器及试剂

气相色谱仪(岛津 14C 型,日本岛津公司),自动收集仪(BSZ-100,上海沪西分析仪器厂),离心机(0412-1,上海手术器械厂)。

瓜蒌药材购于浙江平湖曹桥,经嘉兴市药检所副主任中药师朱山寅鉴定为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim 的干燥成熟果皮。Sephadex G-100, Pharmacia 公司进口分装。对照品:葡萄糖、木糖(上海化学试剂公司),半乳糖、鼠李糖、甘露糖(进口分装,上海化学试剂公司),果糖、阿拉伯糖、核糖(中国药品生物制品检定所)。其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 多糖的提取、分离与纯化^[3]

瓜蒌皮粉碎,过 20 目筛,取 200g, 95%乙醇浸泡 2d 脱脂,药渣加水 3000mL,煮沸 4 h,放置,8 层纱布压滤,残渣重复煮沸提取 4 h,过滤,合并滤液,离心分离,上清液,60℃减压浓缩至原来体积的 1/4,浓缩液加 4 倍量的乙醇,冰箱放置 24 h,吸出多糖粗品。用 Saveg 法,氯仿-正丁醇(4:1)脱蛋白,以 3000 r/min 离心 20 min,除去蛋白质胶状沉淀,重复操作 4 次,直至紫外测定在 260, 280 nm 波长处无蛋白质和核酸的吸收峰。上清液对蒸馏水透析 48 h,除去氯仿和正丁醇。浓缩透析液至 100mL,加 95%乙醇 320mL 醇析多糖,静置 24 h,过滤,沉淀物 40℃减压干燥,得浅黄色瓜蒌粗多糖(1.8595g)。称取 100 mg,用 Sephadex G-100 柱色谱分离,蒸馏水洗脱,控制流速 10mL/20min,硫酸酚法测定吸收度,收集有多糖的洗脱液,再浓缩脱盐即得所需的多糖。提取分离流程见图 1。

2.2 样品完全酸水解

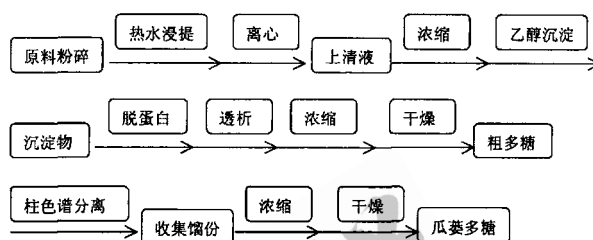


图 1 多糖提取分离流程

Fig 1 The isolation procedure of polysaccharide

取 20mg 多糖干燥样品,加入 2.0mol/L 的硫酸溶液 5mL,置 120℃烘箱中封管水解 4h,取出冷却后加碳酸钡中和至 pH 值为 7~8,3000 r/min 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。

2.3 水溶性多糖的单糖组分分析

2.3.1 硅胶薄层色谱法 取少量瓜蒌多糖水解产物,加适量水溶解,同时取各种标准单糖及糖醛酸配成水溶液,分别点样于同一预制硅胶 G 薄层板上,以醋酸乙酯-甲醇-乙酸-水(13:3:3:3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷苯胺-邻苯二甲酸显色剂,110℃烘烤 10 min 至显色清晰。结果样品有三个斑点。

2.3.2 纸色谱法 取少量瓜蒌多糖水解产物,加适量水溶解,同时取各种标准单糖及糖醛酸配成水溶液,分别点样于同一色谱纸上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷显色剂苯胺-邻苯二甲酸溶液,105℃加热 10 min 至显色清晰。结果样品有三个斑点。

2.3.3 气相色谱法 气相色谱条件:OV-225 弹性石英毛细管柱(0.32mm×30m);柱温 80~220℃,5℃/min 程序升温,220℃维持 30 min;检测器(FID)和进样口温度均为 260℃;载气为 N₂, 40kPa。

精密称取各种单糖标准品各 10mg 于同一梨形瓶中,按样品方法进行衍生化,进行 GC 分析。气相色谱分析图见图 2。精密称取 10mg 瓜蒌多糖水解产物,加入 10mg 盐酸羟胺,0.5mL 吡啶,置 90℃水浴中加热反应 30 min 并振荡。取出后冷至室温,加入 0.5mL 醋酸酐,在 90℃下继续反应 30 min 进行酰化,反应产物直接进行气相色谱分析。气相色谱分析图见图 3。

根据标准单糖与样品的保留时间比较,确定组成单糖种类,并根据各峰面积计算其摩尔比。

3 结果与讨论

3.1 通过水提、脱蛋白、透析、醇沉方法从瓜蒌皮中获得不含蛋白质、核酸的瓜蒌多糖粗品,得率为 0.9298%。

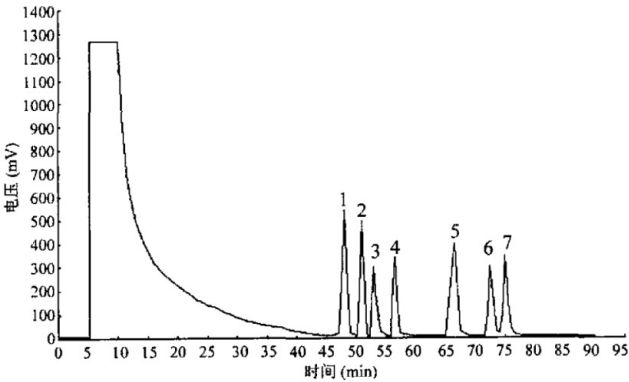


图 2 标准单糖的气相色谱图

Fig 2 Chrom atogram for chemical reference substance

1. 鼠李糖 (rhamnose) 2 核糖 (ribose) 3 阿拉伯糖 (arabinose)
4 木糖 (xylose) 5 甘露糖 (mannose) 6 葡萄糖 (glucose)
7. 半乳糖 (galactose)

3 2 瓜蒌多糖完全水解后, 薄层色谱和纸色谱均发现有三个斑点, 经与单糖标准品对照, 初步确定三种单糖成分分别为鼠李糖、阿拉伯糖和葡萄糖。气相色谱分析结果表明有三种单糖, 分别为鼠李糖、阿拉伯糖和葡萄糖, 摩尔比为: 1. 0: 2. 4: 4. 7, 按此比例计算三种单糖的含量为: 鼠李糖 12. 1%、阿拉伯糖 26. 3%, 葡萄糖 61. 6%。

3 3 多糖水解成单糖时, 需准确把握水解时酸的浓度、温度和时间等条件, 若水解不完全, 则会导致分析结果不正确。

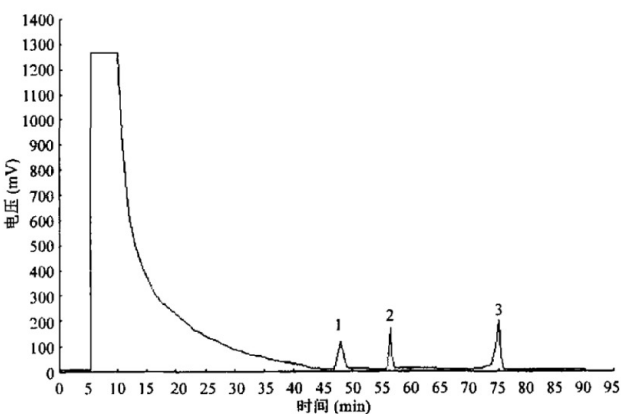


图 3 水溶性多糖的气相色谱图

Fig 3 Chrom atogram for water soluble polysaccharide

1. 鼠李糖 (rhamnose) 2 阿拉伯糖 (arabinose) 3 葡萄糖 (glucose)
3 4 多糖生物活性多样, 对其药理作用, 有待进一步研究开发。

参考文献

[1] 中国药典 2000年版一部 [S]. 2000: 84
[2] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 (1) [M]. 北京: 学苑出版社, 1993: 260
[3] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 第 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 21

收稿日期: 2004-03-08

Ion pair HPLC assay of metformin in hydrochloride in human plasma

LN Guan-yang ZHANG X iu-hua ZHANG Chun-hong (The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE A HPLC method was established for the assaying of metformin in human plasma. **METHODS** The mobile phase was composed of methanol 0.15 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (containing 0.03 mmol·mL⁻¹ sodium heptanesulfonate and adjusted to pH 4.7 by phosphoric acid) (40:60), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection was carried out with a UV detection at 232 nm, column temperature was at 37°C. **RESULTS** The calibration curve of metformin was linear between 0.25 μg·mL⁻¹ ~ 4.0 μg·mL⁻¹, ($r = 0.9993$, $n = 6$). Absolute recovery was more than 80%, with in-day and between-day RSD were both less than 10%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, and accurate, and it is suitable for the determination of metformin in human plasma.

KEY WORDS ion pair HPLC; metformin; assay