

建立的方法有较好的重现性、精密度和稳定性,为乳块消片的质量控制以及衡量其质量的优劣提供依据。

参考文献:

[1] 聂晶,田颂九,王国荣. 中药指纹图谱的研究现状[J]. 中草

药, 2000, 31(12): 881-884.

[2] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 135-140.

[3] 谢培山. 中药制剂色谱指纹图谱(图像)鉴别[J]. 中成药, 2000, 22(63): 391-395.

天花粉多糖的提取、分离与纯化研究

黄晓兰¹, 吴惠勤¹, 王蔚², 黄芳¹, 林晓珊¹

(1. 中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070;

2. 广州中一药业有限公司, 广东 广州 510000)

摘要:目的 系统地研究天花粉多糖分析的样品前处理方法,包括提取、分离及纯化方法,为进一步开展天花粉多糖的组成及相对分子质量等分析研究,探讨其药理药效奠定基础。方法 试验了加热回流、不同温度浸提、超声波振荡等方法提取天花粉多糖,对天花粉多糖的沉淀分离条件进行了优化,并采用重结晶、透析、柱色谱等方法进行纯化,采用苯酚-硫酸分光光度法测定多糖的质量分数,并用核磁共振波谱法进行验证。结果 天花粉多糖于 45℃ 超声波振荡提取效果最佳,不同纯化方法所得天花粉多糖的质量分数不同,重结晶法得到的多糖质量分数为 58.8%,透析法得到的多糖质量分数为 51.3%,色谱柱纯化后的多糖质量分数最高可达 94%。结论 本研究建立了天花粉多糖的样品前处理分析方法,解决了天花粉中淀粉、蛋白以及柠檬酸等化合物的干扰问题,获得了质量分数较高的天花粉多糖,可用于天花粉多糖的进一步分析。

关键词:天花粉;多糖;分离;纯化

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1662-04

天花粉是葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥块根,又名栝楼根、蒹根,具有清热生津、消肿排脓的功效,用于治疗热病烦渴、肺热燥咳、内热消渴、疮疡肿毒^[1]。临床上常用的消渴症方如玉泉丸、玉液汤、玉女煎等均将天花粉作为主药。天花粉在增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗艾滋病病毒方面具有很好的功效^[2]。天花粉多糖具有降血糖的活性^[3]。天花粉中具有活性的多糖的量很低,而富含淀粉,虽然这些淀粉也属于多糖类,但没有降糖功效,并且对天花粉多糖的提取纯化干扰很严重。天花粉中含有的天花粉蛋白属于水溶性的天然高分子化合物,也严重干扰天花粉多糖的分离提取和分析。有关天花粉有效成分的提取分离的研究大多是针对天花粉蛋白^[4~7],对天花粉多糖的研究较少^[8,9]。因此本实验对天花粉多糖测定前处理中的提取、分离和纯化方法作了研究,比较了不同方法提取天花粉多糖,并优化了天花粉多糖的沉淀分离条件,采用重结晶、透析、柱色谱等方法纯化,然后采用分光光度法测定多糖,并采用核磁共振波谱法进行验证,得到了较满意的结果。

1 仪器与试剂

721N 型分光光度计,上海分析仪器厂;核磁共振波谱仪;超声波振荡仪。

无水乙醇、丙酮、苯酚、硫酸均为 AR 级;Sephadex G-50 和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶;葡萄糖,AR 级,质量分数大于 99.9%,使用前经 105℃ 烘 4 h;试验用水为 Millipore 超纯水。

2 方法与结果

2.1 天花粉多糖的测定:采用苯酚-硫酸分光光度法。称取一定量的天花粉多糖样品,用水溶解并定容,取 1 mL 溶液加入 1 mL 5% 苯酚,再加入 5 mL 浓硫酸摇匀,于沸水浴中反应 15 min,取出放置至室温,于 490 nm 波长处测定吸光度值。以水作空白,以葡萄糖溶液作对照同时测定,得到标准曲线,根据标准曲线方程计算出多糖的量。

2.2 天花粉多糖的提取

2.2.1 提取方法的选择:取经粉碎后的天花粉,加入 10 倍量的水提取,比较了加热回流(100℃)、不同温度浸提和超声波振荡提取等方法结果见表 1。若按传统的加热回流提取方法,由于天花粉中富含淀粉,

收稿日期:2007-12-15

基金项目:广东省科技计划资助项目(2006B35605009)

作者简介:黄晓兰(1964—),女,广东潮州人,研究员,主要从事药物及食品分析工作。Tel:(020)87686536 E-mail:wenhxl@126.com

会使提取物完全成糊状,无法进行分离。采取直接加热浸提的方法,如果温度高于80℃,也同样会导致糊化,很难分离出清液;65℃时情况有所好转,但I₂液试验呈蓝色,表明仍然有淀粉干扰;45℃时I₂液试验呈无色,表明已不存在淀粉的干扰故确定最佳提取温度为45℃。而采用超声波振荡法可强化多糖的溶出效率,明显提高提取率,达到满意的效果。因此,确定采用45℃超声波振荡的提取方法。

表1 不同提取温度和提取方法效果的比较

Table 1 Comparison between various extracting temperatures and extracting methods

方法	现象	I ₂ 液试验
加热回流(100℃)	完全成糊状,无法分离出清液	蓝黑色
浸提	90℃ 成糊状,无法分离出清液	蓝黑色
	80℃ 粘稠状液体,很难分离出清液	深蓝色
	65℃ 浑浊液体,难于滤过	蓝色
	45℃ 液、固体较易分开,易于滤过	不变色
超声波振荡(45℃)	液、固体较易分开,易于滤过	不变色

2.2.2 提取溶剂用量的确定:取经粉碎后的天花粉100g,分别加入3、5、8、10倍量的水进行超声波振荡提取。结果表明,水用量为天花粉的3倍(即100g天花粉加300mL水)时,多糖提取不完全,提取率为62%,且由于溶剂太少,提取液较浓,造成滤过困难;水用量为天花粉的5倍时,多糖提取已完全,且提取液滤过顺利;水用量为天花粉的8、10倍时,多糖提取完全,且提取液滤过非常容易,提取率与5倍时接近,但后续浓缩过程较费时。综合考虑,确定提取剂用量为天花粉的5倍,即100g天花粉加500mL水。

2.2.3 提取时间的确定:取经粉碎后的天花粉100g,加入5倍量的水,分别超声提取0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0h,结果见表2。提取率先随着提取时间的延长而增加,提取2h后提取率已趋于稳定,不再增加。故确定提取时间为2h。

表2 不同提取时间的影响

Table 2 Effect of various extracting times

提取时间/h	提取率/%
0.5	71.2
1.0	87.4
1.5	94.6
2.0	98.5
3.0	99.3
4.0	100

2.2.4 最佳提取条件:天花粉块根粉碎成60目后,移取100g,加水500mL,超声提取2h,静置沉淀后,经真空抽滤得到提取液;残渣再加少量水超声波振

荡10min进行洗涤,经真空抽滤得到洗涤液;重复洗涤2次,合并提取液和洗涤液,60℃水浴浓缩定容至100mL。

2.3 天花粉多糖的分离:提取液中除了天花粉多糖外,还含有天花粉蛋白以及其他大量可溶于水的物质,这就需要将提取液中的天花粉多糖分离出来。由于植物多糖是大分子化合物,其在有机溶剂中的溶解度较小,在含一定比例有机溶剂的水溶液中会沉淀下来,因此通常采用加入有机溶剂的方法使多糖沉淀出来。但提取液中的天花粉蛋白也会随之沉淀下来,因此必须选择适合天花粉多糖的沉淀分离条件。

2.3.1 多糖沉淀剂的确定:比较了丙酮和乙醇溶液作沉淀剂的影响,结果见表3。可看出,丙酮沉淀多糖的效果较乙醇略好,但二者差别不是很大。考虑到乙醇成本较低,毒性小,对环境无污染,故选用乙醇作沉淀剂。

2.3.2 沉淀剂比例的确定:考察了不同比例的丙酮和乙醇溶液作沉淀剂的影响,结果见表3。可看出,60%丙酮和80%乙醇沉淀多糖效果较好。丙酮和乙醇的量较低时,沉淀出的是相对分子质量较大的蛋白质,丙酮和乙醇的量太高时,沉淀出的是小分子有机物等杂质。

表3 不同溶剂及其比例对天花粉多糖的分离效果

Table 3 Isolation of polysaccharide from *Radix Trichosanthis* by various solvents and their concentration

沉淀剂		多糖/%
丙酮	30%	5.2
	50%	18.6
	60%	26.3
	70%	10.2
乙醇	50%	8.4
	65%	13.4
	80%	23.2
	90%	9.1

2.3.3 最佳沉淀条件:在提取液中加入无水乙醇100mL使乙醇体积分数达到50%,离心,弃去沉淀,以除去蛋白质和残留的淀粉。清液加入4倍体积无水乙醇,使乙醇体积分数达到80%,沉淀出多糖。沉淀于60℃水浴烘干得到天花粉粗多糖。

2.4 天花粉粗多糖的纯化:天花粉粗多糖质量分数不高,只有23%~25%,主要是由于还含有部分蛋白质、小分子有机物等杂质,因此需要进行进一步纯化。植物多糖常用的纯化方法有重结晶、透析、柱色谱等。

2.4.1 重结晶法纯化:经预试验,采用50%乙醇洗涤和80%乙醇沉淀进行反复重结晶,得到天花粉多糖,经3次重结晶后的天花粉多糖质量分数可达到58.8%,基本上可满足药效试验的要求(大于50%)。

2.4.2 透析纯化:将天花粉粗多糖溶于水,放入透析袋中以水透析48 h,每隔6 h换1次水,浓缩得到天花粉透析多糖,其含多糖质量分数为51.3%,也可满足药效试验的要求。但透析过程耗时太长,透析液浓缩也较慢,故未予采纳。

2.4.3 过阴离子交换柱纯化:天花粉粗多糖经高效液相色谱和核磁共振波谱分析,发现含有较多的柠檬酸,因此采用阴离子交换柱进行纯化,以除去柠檬酸根离子及其他阴离子型化合物。分别考察了阴离子交换柱的柱床高度(20、10、5 cm),上样量(1.0、0.5、0.2 g),淋洗液体积流量(1、2 mL/min)以及淋洗体积(100、200、300 mL)。在上述每种试验条件下收集淋洗液每份5~10 mL,分别测定柠檬酸和多糖。结果当淋洗体积为100 mL时柠檬酸已基本除去,但多糖仍被吸附在柱上;直到当淋洗体积为300 mL时,多糖才能被洗脱下来。因此最终确定过阴离子交换柱的纯化条件为:柱床高度5 cm,上样量0.5 g,水作淋洗液,体积流量2 mL/min,淋洗体积300 mL。在此条件下可将天花粉粗多糖中柠檬酸根离子除去94.3%,同时吸附于阴离子交换柱上的多糖90%以上能被洗脱下来。

2.4.4 凝胶色谱柱纯化:过阴离子交换柱后的天花粉多糖,再经过Sephadex色谱柱进一步纯化,将不同相对分子质量段的多糖分开。选择Sephadex G-50和Sephadex G-100两种葡聚糖凝胶柱填料进行预试验,结果Sephadex G-50有较好的分离效果。因此采用Sephadex G-50凝胶柱进行分离纯化。

进一步分别对凝胶柱的柱床高度、上样量、淋洗液流量、总淋洗体积等条件进行优化。在所述每种试验条件下收集淋洗液每份25~50 mL,采用苯酚-硫酸分光光度法分别测定吸光度进行考察。

(1)考察了葡聚糖凝胶柱的柱床高度为60、100 cm时的分离情况。结果柱床高度为60 cm时,不能将天花粉多糖与杂质分离开来;而柱床高度为100 cm时,可以很好地将天花粉多糖与杂质分离开来。

(2)考察了上样量为1.0、0.5、0.2 g时凝胶柱的分离情况。结果天花粉粗多糖上样量为1.0、0.5、0.2 g时,凝胶柱的分离效果相差不大,为节省时间,提高效率,选择1.0 g上样量。

(3)考察了淋洗液流量为1、2、3、5 mL/min时的分离情况。结果淋洗液流量为1、2 mL/min时,可以将天花粉多糖与杂质分离开来,而淋洗液流量较大时,天花粉多糖与杂质分离效果较差,且两种天花粉多糖不能分离开来,只有一个多糖峰。

(4)考察了总淋洗体积为300、500、1 000、2 000、3 000 mL时的情况。结果表明,当淋洗体积为500 mL时多糖已完全被淋洗下来,500 mL以后的吸光度均接近于0。

在上述优化试验条件下,以淋洗体积对吸光度作图得到淋洗曲线,见图1。可看出,凝胶色谱柱将天花粉粗多糖分为两部分,第一个峰称为天花粉多糖I,第二个峰称为天花粉多糖II。

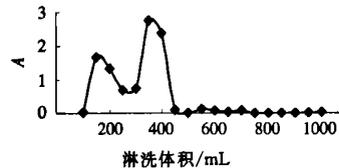


图1 天花粉多糖经过Sephadex G-50色谱柱的淋洗曲线

Fig. 1 Elution curve of polysaccharide from *Radix*

Trichosanthis on Sephadex G-50 column

2.4.5 最佳纯化条件:天花粉粗多糖先用50%乙醇洗涤,再用80%乙醇沉淀,反复重结晶3次,得到天花粉结晶多糖。取0.5 g天花粉结晶多糖溶于少量水中,过预先装好的5 cm高的阴离子交换柱,水作淋洗液,体积流量为2 mL/min,弃去前100 mL淋洗液,分别收集第101~300 mL淋洗液,于60℃水浴烘干。取样品1.0 g溶于少量水中,过预先装好的100 cm高的Sephadex G-50葡聚糖凝胶柱,水作淋洗液,体积流量为2 mL/min,弃去前100 mL淋洗液,分别收集第101~275 mL和第276~500 mL淋洗液,于60℃水浴烘干,分别得到天花粉多糖I和II。2.5 天花粉多糖的鉴定:将得到的天花粉多糖采用苯酚-硫酸法测定其质量分数,结果天花粉多糖I质量分数达87%~94%,天花粉多糖II的质量分数为38%~46%。说明天花粉多糖II中仍含有小分子杂质干扰,这部分杂质有待于进一步研究。

将天花粉多糖彻底烘干水分,用氘代水溶解,作核磁共振-氢谱(¹H-NMR)分析,结果见图2。可看出,天花粉多糖I的多糖峰远大于天花粉粗多糖,说明前者的多糖质量分数大大高于后者,这与苯酚-硫酸法的测定结果是一致的。

3 讨论

本研究采用超声波提取、80%乙醇沉淀方法提取分离出天花粉多糖,并采用重结晶、过阴离子交换

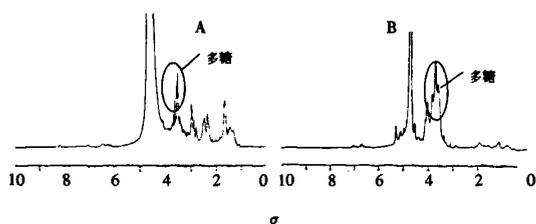


图2 天花粉粗多糖(A)和精制多糖(B)的核磁共振谱图
Fig. 2 NMR of crude (A) and refined (B) of *Radix Trichosanthis* polysaccharide

柱、凝胶色谱柱等手段进行纯化,解决了天花粉中淀粉、蛋白等水溶性高分子化合物以及柠檬酸等阴离子化合物的干扰问题。经苯酚-硫酸分光光度法测定,核磁共振波谱验证,表明获得了纯度较高的天花粉多糖。此结果为进一步开展天花粉多糖的组成及相对分子质量等分析研究,对探讨天花粉多糖的药理、药效,进一步开发天花粉多糖新药具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册. 上海:上海人民出版社, 1975.
- [2] 洪 缨, 顾海鸥. 天花粉药理研究进展[J]. 北京医药, 1994, 3: 32-35.
- [3] Hikino H, Yoshizawa M A, Suzuki Y, et al. Isolation and hypoglycemic activity of trichosans A, B, C, D, and E; glycans of *Trichosanthes kirilowii* roots [J]. *Planta Med*, 1989, 55: 349-350.
- [4] 金善炜, 孙孝先, 汪绍福, 等. 天花粉蛋白的化学[J]. 化学学报, 1981, 39(9): 917-924.
- [5] 田庚元, 孙孝先, 唐天宝, 等. 低温离心分离、精制天花粉蛋白[J]. 中草药, 1989, 20(2): 13-14.
- [6] 袁惠东, 夏其昌, 张祖传. 用Blue Sepharose CL-6B快速纯化天花粉蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(4): 369-373.
- [7] 林国庆, 邵靖宇. 天花粉蛋白研究新进展[J]. 科技通报, 1996, 12(2): 122-125.
- [8] 田庚元, 李寿桐, 唐天宝, 等. 天花粉多糖的研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1985, 17(5): 582-586.
- [9] 王 莉, 鲁建江, 顾承志, 等. 天花粉多糖的微波提取及含量测定[J]. 药学实践杂志, 2001, 19(3): 168-169.

淡竹叶中荜草苷的微波萃取-HPLC 法测定

薛月芹, 袁 珂*, 楼炉煊, 葛斌斌

(浙江林学院天然药物研发中心, 浙江 临安 311300)

摘要:目的 从淡竹叶中提取黄酮苷类成分,并测定荜草苷的量。方法 采用微波萃取技术提取黄酮苷,在640 W的功率下,用10倍量70%乙醇为溶剂微波萃取2 min 制备供试品溶液,并采用RP-HPLC法测定荜草苷。色谱条件:色谱柱为Diamonds C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-水-冰醋酸(40:70:1);柱温:25℃;检测波长:340 nm。结果 荜草苷在0.014~0.280 mg/mL 线性关系良好;荜草苷的平均回收率为96.18%,RSD为1.96%。浙江、福建产淡竹叶中黄酮苷成分的量比较高,而广西、重庆等地生长的淡竹叶中有效成分的量较低。结论 采用微波萃取技术提取淡竹叶中的荜草苷,并采用HPLC法定量的方法简便、准确,结果稳定、重现性好,可作为淡竹叶及其制剂质量控制的方法。

关键词:淡竹叶;荜草苷;微波萃取;高效液相色谱

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1665-03

淡竹叶主要分布于江苏、安徽、浙江、福建、湖南、湖北、贵州、云南等省,性淡、微涩、寒,味甘、苦,具有清热除烦、解渴利尿、明目解毒和止血的功能^[1]。淡竹叶在我国具有悠久的药用历史,是一味著名的清热解毒良药。淡竹叶中含有大量对人体有益的活性物质,包括黄酮类、生物活性多糖、氨基酸类、芳香成分和其他微量元素^[2]。竹叶提取物的功能因子主要是黄酮苷,淡竹叶黄酮具有多方面的生物活性,如抗脂质过氧化、抗衰老、清除自由基,阻断亚硝

基化,降低血脂及胆固醇,抗菌消炎、抗病毒,增强免疫功能,抑制移植性肿瘤在宿主体内的生长等方面的作用^[3,4]。淡竹叶黄酮以其巨大的资源优势,良好的药理活性已成为一种非常有前途的天然药物,是具有广阔开发前景的新型药用资源。微波萃取技术以其具有的快速、高效、安全,节省溶剂和能源、尤其是可以避免长时间高温加热引起的有效成分分解等特点已被广泛应用于多种植物的提取,并取得了显著成效^[5]。本实验采用微波萃取方法快速提取淡

收稿日期:2007-12-20

基金项目:浙江省森林培育重中之重学科开放基金项目(200510)

作者简介:薛月芹(1980-),女,山东泰安人,硕士,主要从事药用植物质量控制研究。E-mail:yueqinxue2007@yahoo.com.cn

*通讯作者 袁 珂 Tel:(0571)63743607 E-mail:yuan_ke001@163.com