

芦笋多糖提取、单糖组分分析及定量测定

季宇彬¹, 陈学军², 汲晨锋¹, 成秉臣¹, 李明泽²

(1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研发中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 提取芦笋多糖, 纯化后分析其单糖组分并测定总糖, 为今后芦笋多糖研究提供参考。方法 水提醇沉法提取粗多糖, Sevage 法除蛋白, H₂O₂ 脱色, 高效毛细管电泳 (HPCE) 测定单糖组成, 苯酚-硫酸法测定多糖。结果 芦笋粗多糖主要单糖组成为木糖、果糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖, 其质量分数分别为 3.44%、7.92%、10.52%、17.15%、41.85%。以单糖混合物为对照品测得粗多糖中总糖的质量分数为 79.14%。结论 高效毛细管电泳分离度高, 可用于单糖组分分析; 苯酚-硫酸法实验操作简便, 准确可靠, 可用于芦笋多糖的测定。

关键词: 芦笋; 多糖; 单糖组成; 苯酚-硫酸法

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)08-1159-03

Monosaccharide composition analysis and its content determination in polysaccharide extract from *Asparagus officinalis*

Ji Yu-bin¹, CHEN Xue-jun², Ji Chen-feng¹, CHENG Bing-chen¹, LI Ming-ze²

(1. Center of Research and Development of Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective To analyze the monosaccharide composition in the polysaccharide extract from *Asparagus officinalis*, determine the content of monosaccharide, and provide some references for further research. **Methods** The monosaccharide composition was determined by HPCE. Phenol-sulfuric method was used for the determination of the content of monosaccharide. **Results** The monosaccharide composition in polysaccharides from *A. officinalis* is Xyl, Fru, Rha, Ara, and Gal, their contents were 3.44%, 7.92%, 10.52%, 17.15%, and 41.85%, respectively. The content of polysaccharide is 79.14%, taking the mixture of monosaccharide compositions as reference substances. **Conclusion** HPCE can be used to analyze the monosaccharide composition in the polysaccharides with high precision of separation and the method of phenol-sulfuric acid is simple, convenient, and reliable.

Key words: *Asparagus officinalis* Linn.; monosaccharide composition; phenol-sulfuric acid method

芦笋 *Asparagus officinalis* Linn., 学名石刁柏, 又名龙须菜、文山竹、索罗罗、细百叶部, 是百合科天门冬属多年生草本植物。其含有皂苷、黄酮、多种氨基酸、多种维生素、硒、锌、铁及蛋白质、糖等多种营养成分。芦笋对高血压、心脏病、心动过速、疲劳、水肿、膀胱炎、排尿困难等症均有一定疗效。有防止癌细胞扩散的功能, 对淋巴瘤、膀胱癌、肺癌、皮肤癌及肾结石等有疗效^[1]。国内外对芦笋的药用研究, 特别是防癌、抗癌研究逐渐增多。本实验对芦笋中的多糖进行提取纯化、单糖组分分析及定量测定, 为芦笋多糖的开发利用提供参考。

1 材料

752 分光光度计 (上海光谱仪器厂); 高效毛细管电泳仪 (Beckman MDQ)。

L-(+) 鼠李糖 (进口分装, 北京化学试剂公司); 无水葡萄糖 (AR, 中国药品生物制品检定所); D-半乳糖 (上海伯奥生物科技有限公司); D-木糖 (国药集团化学试剂有限公司); D-(-) 阿拉伯糖 (Alfa Aesar); 果糖 (北京益利精细化学品有限公司); 其他试剂为 AR 级; 绿芦笋购自哈尔滨市透笼农贸市场。

2 方法与结果

2.1 芦笋多糖提取纯化

2.1.1 粗多糖提取^[2]: 取新鲜芦笋约 1 kg, 洗净后

收稿日期: 2006-03-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400592, 30300284); 黑龙江省自然科学基金项目 (D2004-02); 哈尔滨市后备带头人基金项目 (2004AFXXJ030)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 教授, 博士后, 博士生导师, 从事抗肿瘤药物研究。Tel: (0451) 84866001 E-mail: JYB@hrbcu.edu.cn

加入 95% 乙醇 1 000 mL 打浆, 室温下静置 48 h, 以除去单糖及其他醇溶性成分(生物碱、色素、苷类), 药渣充分干燥后加入适量蒸馏水, 90 °C 水煮 3 次, 每次 3 h。滤过后合并滤液, 减压浓缩后加 4 倍量 95% 乙醇(使醇终体积分数在 75%~80%), 静置 24 h 后抽滤。真空干燥后得芦笋粗多糖。称质量 2.9 g, 提取率 0.29%。

2.1.2 多糖纯化^[3~5]: 取定量的芦笋粗多糖制成一定质量浓度的多糖水溶液, 加入氯仿-正丁醇(4:1), 剧烈震荡 20 min, 离心(10 min, 5 000 r/min)。取上层水相同法反复除蛋白 8 次后, 氨水调节 pH 8, 缓慢滴加 30% H₂O₂ 至浅黄色, 50 °C 水浴中放置 30 min。流水透析 48 h, 蒸馏水透析 24 h, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 充分搅拌后于 4 °C 静置 24 h, 弃上清并抽滤, 沉淀物依次用无水乙醇、丙酮、乙醚多次洗涤, 真空干燥后得淡黄色粉末状精制芦笋多糖。

2.2 单糖组成分析

2.2.1 衍生试剂的配制: 称取 α -萘胺 143.2 mg 和 NaBH₃CN 35 mg, 溶于 450 μ L 无水甲醇中, 再加入 41 μ L 冰醋酸, 置于冰箱中待用^[6]。

2.2.2 单糖的 α -萘胺衍生^[7]: 用重蒸水配成 20 mg/mL 的各种单糖对照品溶液, 各取 200 μ L, 加 40 μ L 衍生试剂置于安瓿管中封管, 80 °C 恒温 2 h 衍生化。然后各加入三氯甲烷和重蒸水各 1 mL, 反复离心萃取 3 次, 取上层水相滤过后, 冷藏备用。

2.2.3 多糖水解液的制备^[8,9]: 取纯化后的芦笋多糖 20 mg, 加入 1 mol/L H₂SO₄ 1 mL, 封管 100 °C 恒温水解 8 h, 冷却后用碳酸钡完全中和, 放置过夜, 滤过, 取 200 μ L, 同上述单糖的衍生方法进行衍生。

2.2.4 电泳条件: 电压 15 kV; 压力进样 1.03×10^5 Pa, 30 s; 柱温 25 °C; 检测波长 210 nm; 缓冲液: 硼砂缓冲液 75 mmol/L (pH 10.5); 清洗液: 0.1 mol/L HCl, 0.1 mol/L NaOH, 重蒸水。

2.2.5 电泳分析将衍生化的对照品及样品液经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 然后进行毛细管电泳, 分别平行做 3 份, 每份测 3 次, 根据各吸收峰的峰面积来计算各单糖组成的质量分数。将 6 个单糖对照品分别进行电泳分析, 得出各个单糖的出峰时间, 与混合单糖对照品电泳谱图对照, 鉴别出混合单糖对照品电泳谱图中各个单糖对照品的电泳峰。将芦笋多糖的谱图与混合单糖对照品谱图对照, 根据出峰时间的对应关系, 可以确定芦笋多糖的单糖组成, 见图 1。结果表明, 芦笋多糖以半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、果糖、木糖为主组成, 其质量分数分别为 41.85%、

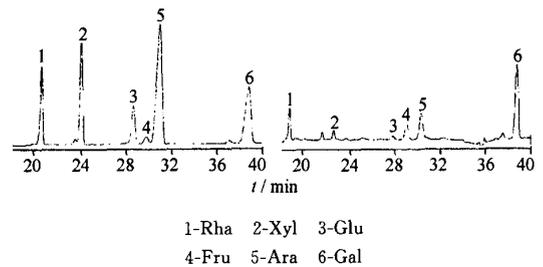


图 1 单糖混合对照品(A)和芦笋多糖(B)的毛细管电泳图谱

Fig. 1 HPLC Electrophoretogram of monosaccharides reference substance (A) and *A. officinalis* polysaccharide (B)

17.15%、10.52%、7.92%、3.44%, 还有少量的葡萄糖和 1 种未知成分(可能为岩藻糖)。

2.3 多糖的测定

2.3.1 苯酚溶液的制备: 取苯酚 50 g, 加入铝片 0.5 g, 碳酸氢钠 0.025 g, 常压蒸馏, 取 182 °C 馏份。精密称取 5 g 定容至 100 mL, 充分溶解混匀, 置棕色瓶中放入冰箱备用。

2.3.2 样品溶液的制备: 精密称取纯化芦笋多糖 100 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 放入冰箱中备用。

2.3.3 标准曲线的制备: 精密称取 105 °C 干燥至恒重的木糖、果糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖对照品各 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水至刻度。按芦笋多糖中单糖组成比例配制单糖混合对照品溶液(质量浓度 1 mg/mL)。精密吸取此溶液 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 摇匀。各精密吸取 1 mL 置干净试管中, 各管再加入 5% 苯酚 1 mL, 混匀, 迅速加入浓硫酸 5 mL, 摇匀, 静置 5 min 后, 放入 85 °C 水浴中加热 20 min, 取出冷却置室温。在 490 nm 处测定吸光度。以质量浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 经回归处理得线性回归方程为 $A = 0.0059C - 0.0085$, $R^2 = 0.9984$ 。

2.3.4 精密度试验: 精密吸取 1 mg/mL 的混合单糖对照品溶液 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 吸取此溶液 1 mL, 测定吸光度, 连续测定 5 次, RSD 值为 0.2%。

2.3.5 回收率试验: 精密称取 1 mg/mL 样品溶液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 使质量浓度为 0.1 mg/mL, 分别吸取此溶液 0.5 mL 于 5 支玻璃试管中, 再分别吸取对照品溶液(质量浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL) 各 0.5 mL 于玻璃试管中, 加入苯酚和硫酸测吸光度(以蒸馏水

1 mL 为对照),结果回收率 98.65%,RSD 值 0.6%。
2.3.6 样品测定:吸取样品溶液 3 mL(3 份),分别置于 50 mL 量瓶中,蒸馏水定容,吸取 1 mL 置于试管中,各管再加入 5% 苯酚 1 mL,混匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,摇匀,放入 85 °C 中加热 20 min,取出冷却置室温。在 490 nm 处测定吸光度。结果见表 1。

表 1 芦笋多糖的测定结果

Table 1 Determination of polysaccharide in *A. officinalis*

序号	A 值	芦笋多糖/%
1	0.272	79.24
2	0.271	78.95
3	0.272	79.24

3 讨论

本实验先后采用 18、16、15、12、5 kV 不同电压条件,结果在 15 kV 电压下电泳电流稳定,谱图清晰,分离效果好。采用 HPCE 测定芦笋多糖的单糖组分,其缓冲盐浓度和 pH 值对单糖组分的分离度影响较大,选用硼砂作缓冲溶液,分别配制 50 mmol/L, pH 9.5、pH 10、pH 10.5;75 mmol/L, pH 9.5、pH 10、pH 10.5;100 mmol/L, pH 9.5、pH 10、pH 10.5 的硼砂缓冲液,通过比较发现,75 mmol/L, pH 10.5 的硼砂缓冲液分离度最好。

本实验采用水提醇沉法提取芦笋粗多糖,运用 Sevage 法除蛋白, H₂O₂ 脱色,纯化后的多糖以 HPCE 分析单糖组成,苯酚-硫酸比色法测定多糖。通过芦笋多糖和混合单糖的毛细管电泳图谱比较,

可以鉴别出大部分单糖组分。毛细管电泳技术对多糖组分分离效果清晰、时间短、定量准确、进样量少,获得了较好的结果。按照各单糖的质量分数制作混合标准曲线,苯酚-硫酸法测芦笋多糖,测定结果更接近真实值。

References:

[1] Sun C Y, Zhao B T, Yu Z F, et al. The Development of chemical components in *Asparagus officinalis* and their medical effects [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2004, 23 (5): 1-5.
[2] Ye K Z, Li B N, Wang K L, et al. Extraction and separation of polysaccharide [J]. *Guangzhou Food Sci Tech* (广州食品工业科技), 2004, 20 (3): 144-145.
[3] Ye Y. Separation, purification and manufacturing of plant polysaccharide [J]. *Chin Food Add* (中国食品添加剂), 2001, 5: 29-31.
[4] Ma L, Tan X L, Liu X M, et al. Different de-protein processes for extraction of polysaccharide from *Spirul in Platensis* [J]. *Food Sci* (食品科学), 2004, 25 (6): 116-120.
[5] Li Z M, Wang B C, Zhou J, et al. Comparison of three methods of removing protein from polysaccharide extract in the plant [J]. *J Chongqing Univ* (重庆大学学报), 2004, 27 (8): 57-59.
[6] Geng Y, Wang N B, Li H Y, et al. Composition analysis of polysaccharides from pollen by capillary electrophoresis [J]. *Shandong Sci* (山东科学), 2001, 14 (4): 10-13.
[7] Ding K, Fang J N. Capillary electrophoresis of polysaccharides and its application [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1999, 17 (4): 346.
[8] Chen C T, Sheu S J. Separation of coumarins by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Chromatogr A*, 1995, 7 (10): 323.
[9] Sheu S J, Lu C F. Determination of six bioactive components of Hsiao-Chi-Tang by capillary electrophoresis [J]. *High Resol Chromatogr*, 1995, 18: 269.

红花黄色素提取工艺的研究

初 阳^{1,2}, 宋洪涛^{1*}, 陈大为², 李 丹², 罗轶凡²

(1. 南京军区福州总医院 药学科, 福建 福州 350025; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 对红花黄色素的提取工艺进行优化。方法 采用单因素试验法和正交试验法,以红花黄色素的提取率为主要考察指标,以红花黄色素在固形物中的质量分数及总出膏率为参考指标,对提取工艺进行考察。结果 红花黄色素的提取率的最佳提取工艺:以 12 倍量水浸泡 30 min,70 °C 下动态提取 2 次,每次 20 min。结论 该工艺可提高红花中红花黄色素的提取率。

关键词:红花;红花黄色素;正交试验

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)08-1161-04

Extracting process for safflower yellow in *Carthamus tinctorius*

CHU Yang^{1,2}, SONG Hong-tao¹, CHEN Da-wei², LI Dan², LUO Yi-fan²

(1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China;

收稿日期:2005-11-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200363),辽宁省博士启动基金资助项目(2001102042)

作者简介:初 阳(1980—),女,辽宁沈阳人,2003 级硕士研究生。Tel: (024) 23986318 E-mail: chuyang1980@yahoo.com.cn

* 通讯作者 宋洪涛 Tel: (0591) 83707254 E-mail: sohoto@sohu.com