

人参芦头多糖的初步研究

刘斌¹, 陈琴鸣^{1*}, 陈卫平¹, 刘根才², 戴德雄²

1. 丽水市食品药品检验所, 浙江 丽水 323000
2. 浙江维康药业有限公司, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 探讨人参芦头多糖的组成与质量分数及其相对分子质量分布。方法 采用紫外光谱扫描法分析人参芦头多糖的质量分数, 采用 TLC 法分析其单糖组成, 采用 HPLC-HPSEC 法测定多糖相对分子质量的分布, 用硫酸-咔唑法测定多糖的量。结果 紫外光谱扫描未发现在 260 和 280 nm 附近有特征吸收, 经 TLC 分析, 芦头多糖水解后的单糖成分为葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖及葡萄糖醛酸, 多糖相对分子质量分布为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$, 提取的人参芦头粗多糖含多糖按半乳糖醛酸计为 12.2% (RSD=0.6%, $n=6$)。结论 经提取分离纯化得到的人参芦头多糖中蛋白质及核酸等杂质较少, 不影响后续的多糖相对分子质量分布的测定, 采用硫酸-咔唑法定量测定较好。

关键词: 人参; 多糖; HPLC-HPSEC 法; 相对分子质量分布; 硫酸-咔唑法

中图分类号: R284.18 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2422-02

Analysis on polysaccharide in *Ginseng Radix et Rhizoma*

LIU Bin¹, CHEN Qin-ming¹, CHEN Wei-ping¹, LIU Gen-cai², DAI De-xiong²

1. Lishui Institute for Food and Drug Control, Lishui 323000, China
2. Zhejiang Welcome Pharmaceutical Co., Ltd., Lishui 323000, China

Key words: *Ginseng Radix et Rhizoma*; polysaccharide; HPLC-HPSEC method; relative molecular weight distribution; sulfuric acid carbazole method

人参多糖具有抗肿瘤、增强免疫、抗衰老等多种功能; 人参在临床上用于保健、抗肿瘤和治疗慢性肝炎^[1]。芦头是人参的入药部位, 但是很长时间内人们仅将芦头作为催吐药, 目前关于人参多糖的研究报道比较多^[2], 而对人参芦头多糖的研究较少。本实验开展了人参芦头多糖的提取、分离纯化和组成与定量及相对分子质量分布的研究工作。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 2000 ES 型蒸发光散射检测器 (Alltech 公司); TU—1901 紫外可见分光光度计 (北京普析通用); CP225D 型电子天平 (赛多利斯天平公司), RE—52AA 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂), TDL—40C 型离心机 (上海安亭科技有限公司), Shodex Ohpak SB—802/803/804 色谱柱 (日本昭和电工), GPC 分析软件。

葡聚糖对照品及鼠李糖 (Rha)、阿拉伯糖

(Ara)、木糖 (Xyl)、甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal)、葡萄糖 (Glu)、葡萄糖醛酸 (GluA) 单糖对照品由 Sigma 公司提供, 质量分数 $\geq 99.0\%$; 水为双蒸水; 其他试剂均为分析纯; 人参芦头由浙江维康药业公司提供, 经丽水市食品药品检验所李水福主任中药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 人参芦头多糖的制备

称取芦头 30 g, 粉碎, 加水 300 mL 于热水浴上提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液, 以 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 30% H_2O_2 溶液 60 mL, 于 50 °C 水浴中保温 3 h, 至溶液变为淡黄色半透明溶液, 于水浴中边搅拌边缓缓加入等体积 10% 三氯醋酸, 置冰箱内过夜, 3 500 r/min 离心 6 min, 取上清液于旋转蒸发仪上浓缩至约 50 mL, 缓缓加入 5 倍体积的无水乙醇, 置冰箱过夜, 经 4 号砂芯漏斗滤过, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤 3 次, 真空

收稿日期: 2011-04-12

基金项目: 浙江省分析测试科技计划研究项目 (2008F70063)

作者简介: 刘斌 (1984—), 男, 药师, 从事药品质量检验与研究。

*通讯作者 陈琴鸣 E-mail: cqm60224@126.com

干燥 5 h, 得人参芦头多糖。

2.2 人参芦头多糖的定性分析

2.2.1 紫外分析 紫外光谱扫描法, 在 200~400 nm 波长处扫描, 在 280 和 260 nm 波长处没有特征吸收表明不含有蛋白质和核酸^[4]。取人参芦头多糖提取物适量, 加水制成 1 mg/mL 的溶液, 进行紫外扫描, 280 及 260 nm 附近未发现特征吸收峰。

2.2.2 人参芦头多糖中单糖组成的 TLC 鉴别

(1) 对照品及供试品溶液的制备: 精密称取 Rha、Ara、Xyl、Man、Gal、Glu、GluA 等对照品各 25 mg 加水制成约 0.1 mg/mL 的对照品溶液。另精密称取人参芦头多糖各 10 mg 分别置 2 支安瓿中, 各加入 2 mol/L 的 H₂SO₄ 2 mL 溶解后封管, 于 105 °C 条件下水解 8 h, 切开封管, 用 BaCO₃ 中和水解液, 4 000 r/min 离心, 上清液吹氮浓缩一倍得组分的完全酸水解溶液。

(2) 显色剂的配制及显色结果: A 为: 0.015 mol/L 高碘酸钠溶液 (加热溶解), B 为: 0.1 mol/L 联苯胺的 50% 乙醇溶液 10 mL, 加 0.2 mol/L 盐酸 1 mL, 加丙酮 2 mL (避光放置)。将薄层板先以试剂 A 喷雾至略显润湿后, 置于 35 °C 烘箱中氧化 6~8 min 后再用试剂 B 喷雾, 此时背景呈蓝色, 斑点白色。经多次点样、显色后, 检识到 Glu、Ara、Rha、Gal 及 GluA。

2.2.3 人参芦头多糖中单糖组成的相对分子质量分布^[3]

(1) 色谱条件 将 Shodex Ohpak SB-804/803 HQ 色谱柱串联使用, 以纯水作为流动相, 体积流量 0.4 mL/min, 采用蒸发光散射检测器 (ELSD), 漂移管温度 50 °C, 气体体积流量 (N₂) 2.8 L/min, 撞击器: 开。

(2) 标准曲线的制备 精密称取相对分子质量分别为 180、2 500、7 100、21 400、84 400、133 800 的葡聚糖对照品, 加水制成 5 mg/mL 的溶液, 分别用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 各取 30 μL 注入色谱仪, 记录色谱图, 采用 GPC 软件, 以洗脱体积 (Y) 和相对分子质量 (X) 进行拟合得到标准曲线: $Y = -0.2934X + 9.9739$, $r = 0.9911$ 。

(3) 供试品溶液的制备及其测定 取人参芦头多糖, 加水制成 1 mg/mL 的溶液, 进样, 测定保留

时间, 将保留时间与体积流量的乘积, 即保留体积代入标准曲线计算待测多糖的相对分子质量, 结果表明其主要含有相对分子质量为 93 000 ($n=6$, RSD=3.2%)、35 000 ($n=6$, RSD=3.9%)、3 500 ($n=6$, RSD=3.2%)、1 550 ($n=6$, RSD=1.2%) 的单糖以及少量相对分子质量约为 170 的单糖。

2.3 芦头多糖的测定^[4]

2.3.1 对照品溶液与供试品溶液的制备 精密称取于 60 °C 减压干燥至恒定质量的半乳糖醛酸对照品 100.3 mg, 置 100 mL 量瓶中加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀制成 1 mg/mL 的溶液作为对照品溶液。

精密称取人参芦头多糖 100.4 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀制成 1 mg/mL 的溶液作为供试品溶液。

2.3.2 多糖测定 精密量取上述对照品溶液及供试品溶液各 1 mL 置比色管中, 分别精密加水 1 mL 与 0.25 mol/L 硼砂硫酸溶液 6 mL, 置水浴加热 30 min, 放冷, 再分别精密加入 0.125% 吡啶无水乙醇溶液 0.4 mL, 置水浴加热 10 min, 放冷至室温, 分光光度法在 530 nm 处测定吸光度。结果表明, 人参芦头含芦头多糖按粗品以半乳糖醛酸计为 12.2% ($n=6$, RSD=0.6%)。

3 结论

通过提取制备的人参芦头多糖, 经 HPSEC 分析, 其中含有 3 种主要的多糖成分, 相对分子质量分别为 930 000、350 000 和 1 550。由硫酸-吡啶法测得其多糖的量按半乳糖醛酸计为 12.2%, 水解后测得其主要由葡萄糖和葡萄糖醛酸组成, 其单糖组成摩尔比及分离纯化与初级结构确定等方面, 还需进一步研究。

参考文献

- [1] 季宇彬. 中药多糖的化学与药理 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [2] 张彬, 林瑞超, 冯芳. 人参多糖的研究概况 [J]. 中国药事, 2004, 18(9): 566-569.
- [3] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规程 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [4] 国家食品药品监督管理局试行标准. [S]. 2002.