

天麻多糖的分离及其单糖组成分析

李超¹, 王俊儒², 季晓晖¹, 路小利¹

(¹ 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100, ² 西北农林科技大学理学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:从天麻中提取分离天麻多糖(GBP-I, GBP-II), 并对其组成进行研究。天麻依次经热水浸提, 乙醇沉淀, Sevag 法除蛋白质, 有机溶剂洗涤、超滤, 得天麻多糖 GBP-I 和 GBP-II, 将 GBP-I 和 GBP-II 分别用 1mol/L 的盐酸在 100℃ 水解, 水解液经过离子色谱分析, 确定其单糖组成的种类和比例。GBP-I 和 GBP-II 两种多糖均由鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖组成。其中 GBP-I 中 5 种单糖的相对含量分别是 1.27%、5.41%、76.49%、6.32%、10.51%, GBP-II 中 5 种单糖的相对含量分别是 2.32%、8.49%、62.44%、10.22%、16.53%。

关键词:天麻多糖; 超滤; 离子色谱; 单糖

Isolation of *Gastrodia elata* Bl. polysaccharides and Analysis of its Composition of Monosaccharide

Li Chao¹, Wang Junru², Ji Xiao Hui¹, Lu Xiaoli¹

(¹The College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100;

²The College of Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Extraction and separation of Polysaccharide from *Gastrodia elata* Blume (GBP-I, GBP-II), study the composition of polysaccharides. The polysaccharides were extracted from *Gastrodia elata* Blume by hot water, respectively treated with ethanol precipitation and Sevag method, washing with organic solvent, ultrafiltration, then GBP-I and GBP-II were obtained. GBP-I and GBP-II were hydrolyzed with 1mol/L hydrochloric acid at 100℃, and ion chromatography was used to determinate the composition of monosaccharide of hydrolyzate. GBP-I and GBP-II were both composed of rhamnose, galactose, glucose, xylose and mannose the relative contents of rhamnose, galactose, glucose, xylose and mannose of GBP-I were 1.27%, 5.41%, 76.49%, 6.32%, 10.51%, and five monosaccharide of GBP-II were respectively 2.32%, 8.49%, 62.44%, 10.22%, 16.53%.

Key words: *Gastrodia elata blume* polysaccharides, ultrafiltration, ion chromatography, monosaccharide

天麻为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Blume)的干燥块茎, 古名赤箭^[1], 是中国的名贵中药。主要产于贵州、四川、陕西、云南等地。天麻具有平肝息风止痉之功效^[2], 主要用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风^[3]。研究表明天麻的主要成分为酚类和多糖, 但是目前对天麻的研究主要集中在酚类成分^[4], 对天麻多糖的提取分离以及组成成分研究报道甚少。近几年研究发现多糖具有辐射防护作用以及保护造血

组织、调节免疫功能等重要的药理作用^[5]。多糖已有的研究方法包括化学方法, 气相色谱法(或气相色谱-质谱法), 液相色谱法^[6]和毛细管电泳法, 其中化学方法只能测定总糖, 其他的分析方法则需要复杂的衍生化处理, 且灵敏度较差。离子色谱法^[7]是近几年发展起来的仪器分析方法, 这种方法不需要对样品进行衍生化处理即可直接分析单糖。本实验首次应用离子色谱对天麻多糖进行单糖组成分析, 为天麻多糖的深入研究奠

基金项目: 2005 年西北农林科技大学青年学术骨干支持计划、2005 年度教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0855)以及兰州大学应用有机化学国家重点实验室开放基金。

第一作者简介: 李超, 1981 年出生, 男, 陕西汉中, 在读硕士, 主要从事天然产物化学方面的研究。Email: lc-810424@sohu.com。

通讯作者简介: 王俊儒, 1966 年出生, 男, 陕西杨凌人, 博士, 教授, 主要从事植物资源化学和环境生物学研究。Email: wangjr07@163.com。

收稿日期: 2008-05-22, 修回日期: 2008-06-03。

定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

天麻采自陕西汉中 GAP 中药基地,经西北农林科技大学植物组鉴定为 *Gastrodia elata Blume*, 自然后粉碎,待用。

1.2 主要试剂

鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖五种单糖标准品(北京双环化学试剂厂),无水乙醇、正丁醇、氯仿、丙酮、乙醚、苯酚、浓盐酸(分析纯,天津化学试剂厂),氢氧化钠(Sigma 公司,美国)超纯水(蒸馏水再经过 Millipore 超纯水系统制备)。

1.3 仪器

超滤仪(vivaflo50 型,德国 Sartorius 公司),离子色谱仪(2550 型,美国 Dionex 公司),GP50 四元梯度泵,ED50 电化学检测器,RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、离心机(TDL-40B 型,上海安亭科学仪器厂),电子天平(UVW120 型,日本 SHIMADZU 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 粗多糖的提取 将天麻干粉 100g 用 85%乙醇浸提 5 次,过滤,弃取滤液。待残渣自然凉干后,加入蒸馏水浸提 3 次,每次 6h,过滤,合并收集上清液。将滤液减压浓缩至 200ml,加入 3 倍体积的无水乙醇,静置过夜,离心分离出沉淀物,干燥得黄色粗多糖 6.05g。

1.4.2 除色素 将粗多糖配置成水溶液加入少量活性炭在 60℃水浴中加热搅拌 30min 脱色,趁热过滤。得到的溶液浓缩至 1mg/ml。

1.4.3 除蛋白(Sevage 法)^[8] 将除过色素的多糖溶液转入 2L 分液漏斗中然后缓慢加入 Sevage 试剂(氯仿:正丁醇=4:1)300ml,充分振荡 30min,静置 20min,弃取有机溶剂层和变性蛋白质层,在加入 300ml Sevage 试剂,反复以上操作,直至有机相和多糖溶液相之间无絮状物出现为止。

1.4.4 洗涤及干燥 将以上处理过的多糖溶液加入 3 倍体积的无水乙醇静置过夜,离心分离出沉淀,将沉淀的多糖依次用无水乙醇,丙酮,乙醚反复洗涤后过滤,低温烘干得到淡黄色的天麻多糖 4.82g。

1.5 天麻多糖的分级分离及性质鉴定

1.5.1 天麻多糖的超滤^[9]分离 将天麻多糖配置成 3%的水溶液,用 Vivaflo50 超滤仪进行超滤分离。选择截留分子量为 10kD 的聚醚砜超滤膜。循环液流量应控制为 200~400ml/min,Speed 设为 3。将天麻多糖溶液按分子量分为 10kD 以上和 10kD 以下天麻多糖溶

液,浓缩用无水乙醇沉淀得到白色的分子量为 10KD 以上天麻多糖 GBP-I 2.69g 和分子量为 10kD 以下天麻多糖 GBP-II 1.43g。

1.5.2 多糖基本性质测定^[10] 溶解性测定,苯酚-硫酸反应,Molisch 试剂反应,斐林试剂反应,三氯化铁反应,双缩脲反应,马斯亮蓝反应,碘-碘化钾反应。

1.6 天麻多糖组成的离子色谱分析

1.6.1 单糖标准溶液的配制 用分析天平分别称取鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖各 100mg 置于 50ml 烧杯中,加入 5ml 超纯水溶解,转移至 50ml 容量瓶中,再用少许超纯水淋洗烧杯数次,并转移至容量瓶中,定容,得各单糖浓度 2000mg/L 的混合储备液。用移液枪分别吸取上述储备液 0、25、50、150、750、1500 μ l 于 50ml 容量瓶中,用超纯水定容至刻度,得到浓度分别 0、1、2、6、30、60mg/L 的标准溶液。

1.6.2 多糖的水解^[11] 称取天麻多糖 GBP-I、GBP-II 各 3.0mg 放入 10ml 具塞试管中,加入 1mol/L 的盐酸 3ml,封口在沸水水浴中充分水解 10h,之后在旋转蒸发仪上蒸干,加蒸馏水溶解,并定容至 3ml。用 0.2 μ m 的一次性滤头过滤,直接进样分析。

1.6.3 色谱条件 Dionex Carbo PAC PA10 (4mm \times 250mm) 阴离子糖分离柱,CarboPAC Guard (3mm \times 25mm) 糖前置柱,流动相为 2.5mmol/L 的氢氧化钠溶液,进样量 20 μ l,柱温 30℃。在分析样品前,用先用 0.2mol/L 的 NaOH 溶液再生色谱柱 10.0h,然后用 2.5mmol/L 的 NaOH 溶液平衡 2.0h。

2 结果与分析

2.1 多糖理化性质的测定

GBP-I、GBP-II 均为白色粉末,吸湿性强,能溶于水,尤其能溶于热水,不溶于的甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚等有机溶剂。糖溶液呈透明状态,与双缩脲、考马斯亮蓝反应均呈阴性,表明不含蛋白质;与碘-碘化钾反应呈阴性,表明不含淀粉;与 Molisch 试剂反应呈阳性,出现紫色环,表明含有糖类物质;与苯酚-硫酸反应呈橙黄色,与斐林试剂反应呈阴性,表明不含游离单糖;与三氯化铁反应呈阴性,表明不含多酚类物。

2.2 流动相条件的优化

调节淋洗液 NaOH 溶液的浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5mmol/L,分析含有鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖 5 种单糖的标准溶液。当 NaOH 溶液当的浓度大于 2.5mmol/L 时,鼠李糖和半乳糖分离效果较好,但木糖和甘露糖分离较差;当 NaOH 溶液浓度进一步变大,鼠李糖和半乳糖分离完好,但木糖和甘露糖在色谱图上呈现出在色谱峰顶分叉或完全变成一个

峰;当 NaOH 溶液的度低于 2.5mmol/L 时,鼠李糖和半乳糖的分离效果变差,甚至变成一个峰。综合各单糖的分离情况,选用 2.5mmol/L NaOH 溶液作为分离的流动相较为理想。

2.3 色谱柱温度的优化

以 2.5mmol/L NaOH 溶液作为流动相,改变柱温,考察柱温对单糖混合溶液分离的影响。当柱温超过 40℃时,木糖和甘露糖的分离较差;柱温低于 25℃时,

各色谱峰的峰宽变大,灵敏度有一定程度的损失;在 25~30℃时,峰形较好,组分基本被分离。因此,优化的柱温为 30℃。

2.4 单糖标准溶液的分析

在流动相为 2.5mmol/L NaOH 溶液,柱温 30℃的优化分离条件下,分析标准溶液,其分离情况见图 1。由图 1 可知,鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖 5 种单糖分离情况良好,达到了完全分离。

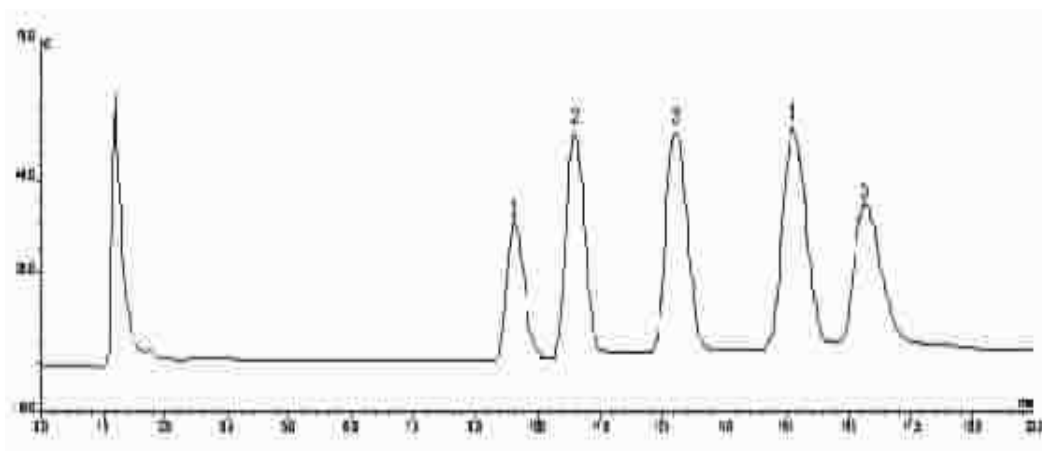


图 1 标准样品的离子色谱图

注:1- 鼠李糖(rhamnose);2- 半乳糖(galactose);3- 葡萄糖(glucose);4- 木糖(xylose);5- 甘露糖(mannose)。下同。

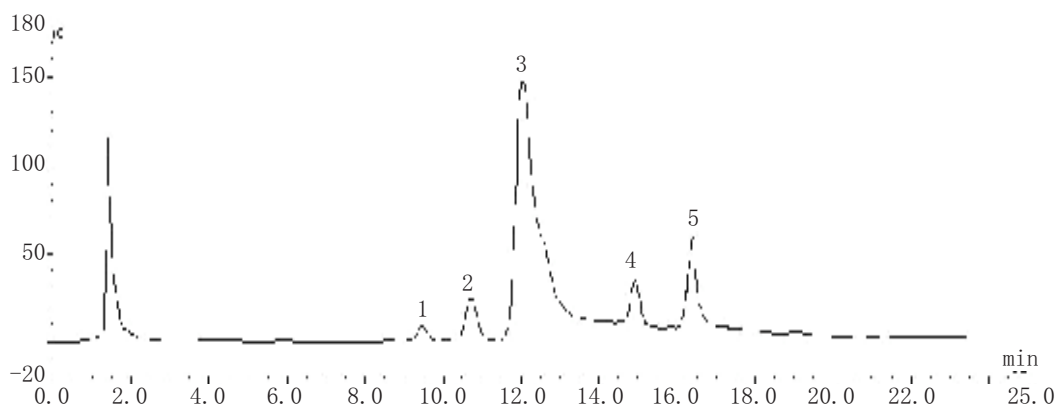


图 2 GPB-I 水解物的离子色谱图

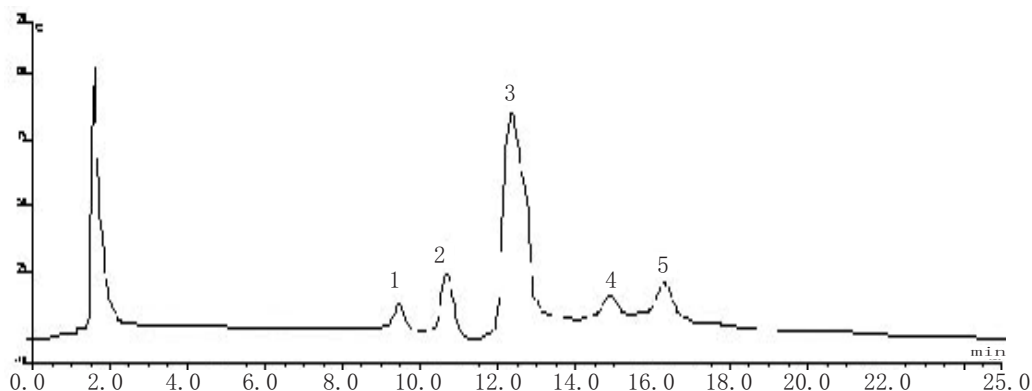


图 3 GPB-II 水解物的离子色谱图

表 1 GBP-I、GBP-II 中单糖的组成比例

单糖名称	峰面积 (nC · min)		相对含量 (%)	
	GBP-I	GBP-II	GBP-I	GBP-II
鼠李糖	1.948	2.249	1.27	2.32
半乳糖	8.300	8.187	5.41	8.49
葡萄糖	117.348	60.532	76.49	62.44
木糖	9.696	9.908	6.32	10.22
甘露糖	16.121	16.025	10.51	16.53

2.5 天麻多糖的单糖分析

天麻多糖的离子色谱结果参见结果表明两种天麻多糖均由葡萄糖、木糖、甘露糖、鼠半乳糖李糖组成。其中,GBP-I 中 5 种单糖的比例是 1.27%、5.41%、76.49%、6.32%、10.51%,GBP-II 中种单糖的比例是 2.32%、8.49%、62.44%、10.22%、16.53%。

3 结论

3.1 物质的提取

本实验通过水提、醇沉、有机溶剂洗涤等化学方法从天麻中得到粗多糖,再通过超率分离的到的两种水溶性多糖 GBP-I 和 GBP-II。其中 GBP-I 为分子量大于 10kD 的多糖,其得率为 2.69%;GBP-II 为分子量小于 10kD 的多糖,其得率为 1.43%,两种多糖均为淡黄色粉末,吸湿性强,易溶于水,不溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂。

3.2 天麻多糖的单糖组分分析测定

利用离子色谱 - 电化学检测法,可以有效、准确地分析天麻多糖的单糖组分。这种分析方法的灵敏度高,可以达到 $\mu\text{g/L}$,样品不用衍生化处理,适合植物多糖样品中单糖的分离测定。在本实验中通过色谱条件的优化,确定流动相的浓度为 2.5mmol/L NaOH 溶液,柱温为 30℃,在这种条件下标准品与样品中的单糖都得到了很好的分离。

3.3 天麻水溶性多糖进行单糖组成的分析

本实验首次利用离子色谱方法对天麻水溶性多糖

进行单糖组成的分析。通过离子色谱分析可以知道天麻水溶性多糖主要由鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖组成,其中分子量在 10kD 以上的 GBP-I 中五种单糖的比例是 1.27%、5.41%、76.49%、6.32%、10.51%,GBP-II 中五种单糖的比例是 2.32%、8.49%、62.44%、10.22%、16.53%。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005 年版一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005:39-40.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985
- [3] 孙星衍. 神农本草经[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:220.
- [4] 郝小燕, 谭宁华, 周俊. 黔产天麻的化学成分 [J]. 云南植物研究, 2000,22(1):81-84.
- [5] 田庚元, 冯宇澄, 林颖. 植物多糖的研究进展[J]. 中国中药杂志, 1995,20(7):441.
- [6] 黄雪松. 单糖与糖胺的水相乙酰化及其气相色谱测定 [J]. 色谱, 2003,21(5):527-530.
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化技术研究. 上海:上海科学技术出版社,1992:6-8.
- [8] Franz G. Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts[J]. Plant Medical, 1989,55: 493-497.
- [9] 王厚廷, 乔善义, 杨明. 超滤法提取六味地黄汤活性多糖的工艺研究 [J]. 解放军药学报, 2001, 17(2): 69271-69274.
- [10] 黄伟坤, 等. 食品检验与分析[M]. 北京:轻工业出版社,1989.
- [11] 王忠民, 吴谋成, 李小定. 葡萄多糖的分离及其组成单糖的分析[J]. 河南农业大学学报, 2003, 37(1): 94-96.