

藏药蕨麻多糖的光谱性质及单糖组成分析

夏莲^{1 2 3} 孙志伟^{1 3} 李国梁^{1 3} 索有瑞¹ 尤进茂^{1 2*}¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²山东省曲阜师范大学化学与化工学院 生命有机分析重点实验室, 曲阜 273165; ³中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要:本研究对藏药蕨麻多糖进行了分离提纯,并测定其水溶性多糖含量为 99.4%;通过紫外光谱与红外光谱分析表明,蕨麻多糖为分子量较小的 α -吡喃糖,并含有氨基糖;蕨麻多糖的水解单糖经过 NMP 衍生后进行毛细管电泳分析,测得其单糖组成为木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、岩藻糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸,含量分别为 3.945、77.445、17.568、17.646、3.942、2.165、65.268、13.037 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 33.484 $\mu\text{g}/\text{mg}$,与 GC-MS 的定性分析结果一致。

关键词:蕨麻;多糖;光谱性质;单糖组成

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Spectral Properties and Monosaccharides Composition Analysis of Polysaccharide from *Potentilla anserina* L.XIA Lian^{1 2 3}, SUN Zhi-wei^{1 3}, LI Guo-liang^{1 3}, SUO You-rui¹, YOU Jin-mao^{1 2*}

¹Key Laboratory of Life-Organic Analysis of Shandong Province, College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; ²Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; ³Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The polysaccharide of *Potentilla anserine* L. was extracted and purified, and its contents was determined as 98.4% by phenyl-sulfuric acid method. The polysaccharide was identified by IR spectrum and UV scanning spectrum. The IR spectrum indicates that the characteristic absorption peaks at 3600-3200, 3200-2800, 1400-1200, 1200-1000 cm^{-1} , and 845 cm^{-1} belonged the characteristic peak of α -pyranose. In addition, the peak at 1630 cm^{-1} assigned to the C=O of acetamide moiety stretching vibration meant that amino sugars existed in the polysaccharide. A method was developed for the separation of derivatized carbohydrates of *Potentilla anserine* L. using 1-naphthyl-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) as derivatization reagent by capillary zone electrophoresis, and the results shows that the monosaccharides compositions of the polysaccharide from *Potentilla anserine* L. are xylose, arabinose, glucose, rhamnose, mannose, fucose, galactose, glucuronic acid and galacturonic acid with contents of 3.945, 77.445, 17.568, 17.646, 3.942, 2.165, 65.268, 13.037 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and 33.484 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectively, which are consistent with the results carried out by GC-MS.

Key words: *Potentilla anserine* L.; polysaccharide; spectral properties; monosaccharide composition

蕨麻(*Potentilla anserine* L.)为蔷薇科委陵菜属植物鹅绒委陵菜的根,为藏医常用药,又名戳玛、卓老酒曾、延寿果、人参果、仙人果等。蕨麻分布很广,但据《新华本草纲要》记载“只在青藏高原,本种始有块根发育”^[1]。本药具有应用历史悠久、民族药特征明显等特点,深受藏族同胞的喜爱,是当地人的“常用上药”^[2]。现代药理学表明:蕨麻具有健脾

胃、收敛止血、补血益气、生津利痰之功效,主治脾虚腹泻、贫血及营养不良等症^[3],另有报道蕨麻具有治疗黄疸性及病毒性肝炎的功效^[4,5]。据文献记载,蕨麻中含有鞣质、糖类、蛋白质、脂肪酸及委陵菜苷等成分^[6-9],但对蕨麻多糖的研究还仅限于总糖含量的测定^[10,11]。

研究表明,多糖类物质不仅具有能够提高免疫系统功能,而且具有较高的抗癌等生物活性^[12,13]。不同植物中提取的多糖其生物活性也有很大差别,主要取决于多糖的单糖组成,分子量以及链构象^[14]。因此,对多糖的单糖组成分析具有重要意义。本研

收稿日期: 2009-10-15 接受日期: 2010-06-12

基金项目: 国家自然科学基金(20075016); 中国科学院“百人计划”项目(328)

* 通讯作者 E-mail: jmyou6304@163.com

究利用紫外光谱、红外光谱、毛细管电泳以及气相色谱-质谱联用等方法对蕨麻多糖的单糖组成进行了研究,为进一步开发利用藏药蕨麻提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂及主要仪器

蕨麻植物样品 8 月份采自青海玉树地区,经中国科学院西北高原生物研究所藏药中心周昌范研究员鉴定。

1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)由本实验室合成^[15];单糖标准品(sigma公司,美国);硼砂(分析纯,徐州试剂二厂);水为 Milli-Q 超纯水;其它试剂均为分析纯。

CARY 300 紫外可见光度计(Varian公司), Nicolet 10DX-FTIR 红外光谱仪。HP6890 和 HP5973 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司),HP-3D 毛细管电泳仪(美国,Agilent公司)配备二极管阵列检测器;毛细管,总长 58.5 cm,有效长度 50 cm,内径 50 μm (河北省永年锐泽色谱器件有限公司)

1.2 实验方法

1.2.1 蕨麻多糖的提取、分离纯化及水解

干燥、研细的蕨麻根块 100 g 加 100 mL 乙醇和乙醚(体积比 1:1)混合液,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流 3 h 去脂,抽滤,沉淀物溶于 100 mL 85% 的乙醇,超声波提取 30 min 去单糖,抽滤,沉淀物加水溶解后超声波提取 90 min,抽滤,旋转蒸发滤液,得 60 mL 粘稠液,补加 3 倍体积 95% 的乙醇,静止放置 24 h,离心,沉淀物加水溶解后用氯仿-正丁醇(体积比 4:1)萃取三次(脱蛋白);上清液继续补加 95% 乙醇至乙醇浓度为 90%,放置 24 h,离心沉淀,沉淀物于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,得蕨麻粗多糖。

取蕨麻粗多糖 10 mg 于安培瓶中,加 3 mol/L 的三氟乙酸 2 mL 溶解后封口,于 110 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 10 h,放冷后 N_2 吹干。

1.2.2 总糖含量的测定

精密量取 1 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液 0.05, 0.25, 0.75, 1.0, 1.25 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中,加水稀释至 10 mL。准确加入 5% 的苯酚溶液 1 mL,混匀,冰水浴,再精密加入浓硫酸 5 mL 后 98 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 20 min,自来水水浴冷却 5 min,室温放置 10 min,以空白溶液为对照于 488 nm 处测吸光度。以吸光度(A)对葡萄糖检测浓度(C)进行线性回归。

吸取 10 μg /mL 的样品液 1 mL,测定吸光度,多次测量取平均值,通过回归方程求得相应糖浓度值,计算总糖含量。

1.2.3 蕨麻多糖紫外-可见光谱与红外光谱分析

制备 0.1 mg/mL⁻¹ 蕨麻多糖水溶液,在 400 ~ 190 nm 范围内扫描;蕨麻多糖以溴化钾压片,在波数 4000 ~ 400 cm^{-1} 范围内进行红外光谱扫描。

1.2.4 蕨麻多糖水解单糖的毛细管电泳分析

NMP 的标记过程:向 2 mL 安瓿瓶中加入 200 μL (0.05 M) NMP 乙腈溶液、20 μL 单糖标准品混合液(0.01 M)、20 μL 17% 氨水,封口后于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 35 min,取出放冷后用氮气吹干,加 2 mL 乙腈-水(体积比为 4:1)溶解后进样分析。

毛细管电泳条件:采用 58.5 cm \times 50 μm id 毛细管(有效柱长 50 cm),55 mmol/L 硼酸盐缓冲溶液(pH 9.46),柱温 20 $^{\circ}\text{C}$,分离电压 22 kV,进样 10 s,不加任何添加剂。

1.2.5 蕨麻多糖水解单糖的气相色谱-质谱分析

乙酰化过程:取 10 mg 蕨麻多糖经水解后,加入盐酸羟胺 5.0 mg,吡啶 100 μL ,振荡混匀,放入 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热反应 30 min。取出后冷却至室温,加 100 μL 醋酸酐,90 $^{\circ}\text{C}$ 下继续反应 30 min 进行乙酰化,冷却至室温,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中将反应产物用 N_2 吹干,加入 800 μL 氯仿重新溶解,取 1 μL 进行 GC-MS 分析。

气相色谱分析条件:载气为高纯氦气;进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$;程序升温,起始温度 100 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 170 $^{\circ}\text{C}$,再以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 260 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;载气流速 1.2 mL/min,分流比 20:1;EI 离子源,电子能量 70 eV;质荷比扫描范围 55 ~ 550,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 蕨麻多糖的提取率及总糖含量

蕨麻块根经去脂、去单糖后,利用水提醇沉法提取粗多糖,经 savage 法除蛋,得多糖 252.0 mg。

以吸光度(A)对葡萄糖检测浓度(C)进行线性回归,得回归方程为 $C = 0.2137A - 0.0159$ ($r = 0.9994$)。结果表明,葡萄糖检测浓度在 22.31 ~ 114.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。由回归方程计算得蕨麻多糖水溶性多糖的含量为 98.4%

2.2 蕨麻多糖紫外-可见光谱分析

紫外光谱图中,195 nm 处显示多糖的特征吸收,在 260 nm 和 280 nm 处无蛋白、核酸吸收峰^[16],表明多糖中无蛋白、多肽及核酸的存在。

2.3 蕨麻多糖的红外光谱分析

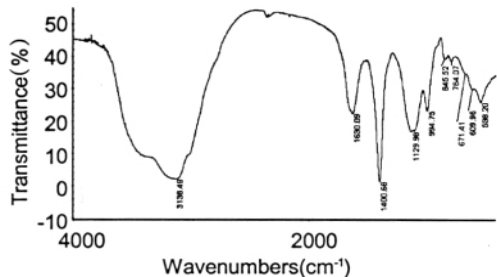


图 1 蕨麻多糖的红外光谱图

Fig. 1 The IR spectrum of polysaccharide from *Potentilla anserina* L.

蕨麻多糖经红外光谱分析如图 1,在 3600 ~ 3200、3200 ~ 2800、1400 ~ 1200 cm^{-1} 和 1200 ~ 1000 cm^{-1} 这 4 个谱段内都出现了典型多糖物质的吸收峰,分别为 O-H 键和分子内或分子间氢键的伸缩震动,C-H 键的伸缩震动,C-H 变角震动,C-O-H 和吡喃环的 C-O-C 两种 C-O 键形成的伸缩震动,1630 cm^{-1} 附近的吸收峰为酰胺基团中乙酰基的特征吸收,表明蕨麻多糖中有氨基糖的存在;在 845.45 cm^{-1} 处的吸收为 α -吡喃型糖的特征吸收,而 890 cm^{-1} 附近无吸收,说明蕨麻多糖成苷的半缩醛羟基主要为 α 构型的吡喃糖,而没有 β 构型;2921 cm^{-1} 处的吸收峰不明显,提示其分子结构中甲基和亚甲基含量比较小^[17],体现为分子链较短,相对分子量较小。

2.4 蕨麻多糖水解单糖的毛细管电泳分析

单糖缺乏常规的紫外生色基团,所以单糖的衍

生化是获得高灵敏紫外检测的必要步骤。Suzuki 等^[18]以 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)为衍生试剂,利用活泼碳(C-4)和还原糖的还原端之间的缩合反应进行糖类的测定。本文以本课题组合成的 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)作柱前衍生剂,实现了蕨麻多糖水解单糖在毛细管区带电泳模式下的分离和定量,为蕨麻多糖的应用开发提供了可靠理论依据。单糖衍生反应过程见图 2(以甘露糖为代表单糖)。

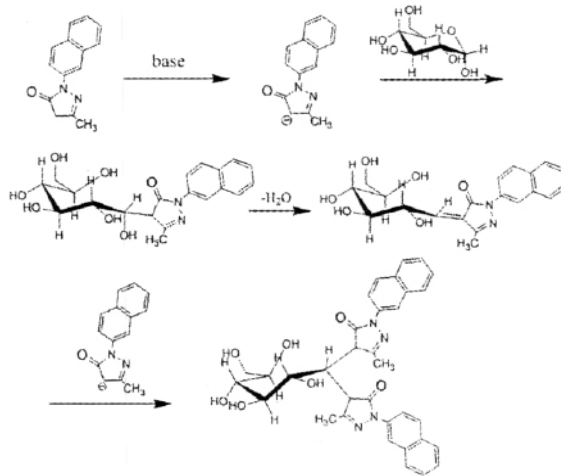


图 2 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)与还原性单糖衍生反应示意图

Fig. 2 Derivatization scheme of 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) with reductive saccharides

NMP 标记的糖类衍生物在 250 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,依据峰面积对单糖浓度进行线性回归,所得各单糖衍生物的线性回归方程、相关系数和检出限见表 1。

表 1 单糖衍生物的线性回归方程、相关系数、检测限及保留时间和峰面积的重现性 (n = 6)

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and repeatabilities for peak area and retention time of saccharide derivatives (n = 6)

单糖 Carbohydrates	线性回归方程 Regression equation*	相关系数 Relative coefficient	迁移时间相对标准偏差 RSD of migration time (%)	峰面积相对标准偏差 RSD of migration time (%)	检测限 Detection limits ($\mu\text{mol/L}$) (S/N = 3)
木糖 Xyl	$Y = 1.906X - 0.257$	0.9996	0.48	4.8	0.89
阿拉伯糖 Ara	$Y = 2.046X + 0.425$	0.9997	0.48	4.6	0.85
葡萄糖 Glc	$Y = 1.419X + 0.788$	0.9991	0.46	3.4	1.26
鼠李糖 Rha	$Y = 1.540X - 1.634$	0.9980	0.44	3.5	1.49
甘露糖 Man	$Y = 1.732X - 1.765$	0.9989	0.44	3.8	1.34
岩藻糖 Fuc	$Y = 1.872X - 0.305$	0.9995	0.46	4.3	1.60
半乳糖 Gal	$Y = 2.231X - 0.301$	0.9998	0.47	3.2	1.02

葡萄糖醛酸 GlcUA	$Y = 1.273X - 1.890$	0.9998	0.48	4.2	2.19
半乳糖醛酸 GalUA	$Y = 2.157X - 3.327$	0.9996	0.45	3.3	1.44

* Y: 峰面积 (peak Area) X: 单糖浓度 (concentration of monosaccharide) $\mu\text{mol/L}$.

蕨麻多糖水解单糖按上述方法衍生后进样分析,电泳分离见图3。用线性回归方程定量,经多次

测量得单糖含量见图4。图中峰1、峰2、峰3为未知成分,推测为氨基糖。

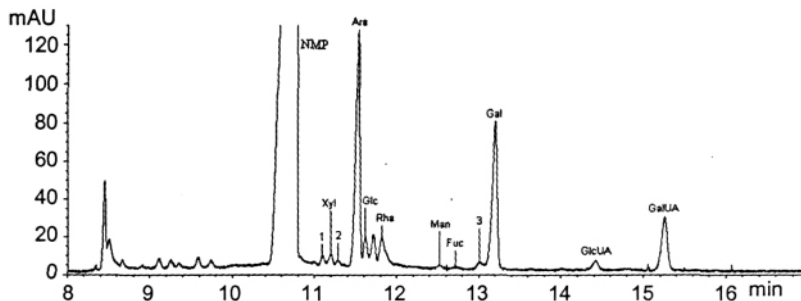


图3 蕨麻多糖水解单糖的毛细管区带电泳分离图

Fig. 3 Chromatograms of saccharides from *Potentilla anserine* L. sample by capillary zone electrophoresis

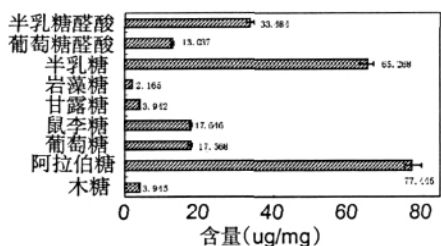


图4 蕨麻多糖中各单糖含量

Fig. 4 Quantitative of saccharides separated from *Potentilla anserine* L.

2.5 蕨麻多糖水解单糖的气相色谱-质谱分析

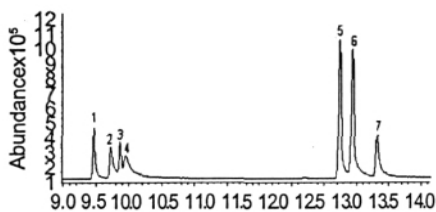


图5 蕨麻多糖水解单糖乙酰化衍生物的总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatogram of acetylated derivatives of saccharides from *Potentilla anserine* L. sample

蕨麻多糖水解单糖经乙酰化后,用GC-MS分析其单糖组成,总离子流图见图5。结果显示:蕨麻多糖的组成单糖主要为鼠李糖(1,Rha)、岩藻糖(2,Fuc)、阿拉伯糖(3,Ara)、木糖(4,Xyl)、甘露糖(5,Man)、葡萄糖(6,Glc)和半乳糖(7,Gal),与毛细管电泳分析结果一致。由于糖醛酸容易发生内酯化,直接乙酰化衍生非常困难^[19],因此蕨麻多糖水解单

糖的GC-MS分析,两种糖醛酸未能检测到。

3 结论

蕨麻多糖经提取、分离纯化后,进行总糖含量的测定,结果显示,蕨麻多糖总糖含量为98.4%;紫外光谱分析表明,在195nm有多糖的特征吸收,而没有蛋白、多肽及核酸存在;红外光谱分析结果显示,845.45、1630 cm^{-1} 附近的吸收分别为 α -吡喃型糖的特征吸收和酰胺基团中乙酰基的特征吸收,且甲基的特征吸收2921 cm^{-1} 不明显,因此,蕨麻多糖为分子量较小的 α -吡喃糖,并含有氨基糖。毛细管电泳分析显示,蕨麻多糖的单糖组成主要是木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、岩藻糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸,含量分别为3.945、77.445、17.568、17.646、3.942、2.165、65.268、13.037 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和33.484 $\mu\text{g}/\text{mg}$,与GC-MS的定性分析结果一致。本文对藏药多糖的单糖组成的定性定量分析为蕨麻在食品、医药和保健方面的开发应用提供可靠的科学依据。

参考文献

- 1 Wu ZY (吴征镒). Xinhua Herbal Scheme (新华本草纲要). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1990: 106.
- 2 Qinghai institute of biology (青海生物研究所), Tongren Longwu dispensary (同仁县隆务诊所). Qinghai Altiplano Medicament Illustrated Handbook (青海高原药物图鉴). Xining: Qinghai People's Press, 1972: 56.

- 3 Chen HQ(陈惠清), Zhang RX(张瑞贤), Huang LQ(黄璐琦) *et al.* The literature review of *Potentilla anserina* L. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志) 2000 25:311
- 4 ZhaoYL, Cai GM, Hong X *et al.* Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserina* L. *J Phytomed* 2008; 15: 253.
- 5 Zhang XQ(张新全), Zhao YL(赵艳玲), Shan LM(山丽梅) *et al.* Study on protective mechanism of JMS on chemical liver injury. *Pharm J Chin PLA*(解放军药学报), 2004 20: 259.
- 6 Chu L(褚良), Wang LB(王立波), Zhang Z(张哲) *et al.* Studies on the chemical composition *Potentilla anserina* L. *Mod Chin Med*(中国现代中药) 2008 10(3): 10.
- 7 Hong X(洪霞), Cai GM(蔡光明), Xiao XH(肖小河). Triterpenoids from roots of *Potentilla anserina* L. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2006 37: 165.
- 8 Pi L(皮立), Hu FZ(胡凤祖). The GC-MS analysis of the lipid compounds from *Potentilla anserina* L. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2007 38: 1625.
- 9 Wei W(韦薇), Chen F(陈锋), Shen AH(沈爱华). Chemical composition and pharmacological research on *Potentilla anserina* L. *Mod Med J China*(中国现代医药杂志), 2008 10: 131.
- 10 Yang H(杨桦), Jia X(贾旭), Yi H(易红). Determination of polysaccharide in root of Tibetan medicine *Potentilla anserina* L. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2001 32: 29.
- 11 Liu CL(刘春兰), Lei MK(雷美康), Deng YH(邓义红) *et al.* Extraction and analysis of water soluble polysaccharide of *Potentilla anserina* L. *J Central Univ Nationalities, Nat Sci* (中央民族大学学报, 自科版) 2007 16(1): 16.
- 12 Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 2000 3: 523-533.
- 13 Chen HX, Zhang M, Qu ZS *et al.* Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). *Food Chem* 2008 106: 559-563.
- 14 Jin Y, Hang ZL, Chen L *et al.* *Carbohydr Res* 2003 338: 1517-1521.
- 15 Sun ZW(孙志伟), Liu LJ(刘凌君), Hu BJ(户宝军). Preparation of 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone as pre-column derivatization reagent for separation and determination of saccharides using HPLC-MS. *Chin J Chromatogr*(色谱) 2008 26: 200.
- 16 Shen T(沈同), Wang JY(王镜岩). *Biochemistry*(生物化学). Beijing: Higher Education Press, 1990. 347.
- 17 Chen XQ(陈小强), Ye Y(叶阳), Cheng H(成浩). Spectral analysis of crude tea polysaccharides extracted by different methods. *Spectr Spectr Anal*(光谱学与光谱分析), 2009 29: 1083.
- 18 Suzuki S, Tanaka R, Takada K. Analysis of sialo-N-glycans in glycoproteins as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2001 910: 319-329.
- 19 Li B(李波), Xu SY(许时婴). Determination of uronic acid from polysaccharide with GC. *Chin J Chromatogr*(色谱) 2004 22: 560.

~~~~~

(上接第 442 页)

- 3 Beijing institute of botany, Chinese Academy of Sciences. The Picture Index of Senior China Plant. Beijing: Science Press, 1975 4: 708.
- 4 Ma XM, Liu Y, Shi YP. Phenolic derivatives with free-radical-scavenging activities from *Ixeridium gracile* (DC.) Shih. *Chem & Biodiver* 2007 9: 2172-2181.
- 5 Yang AM, Liu X, Lu RH *et al.* Triterpenoids from *Pyrethrum tatsienense*. *Pharmazie* 2006 61: 70-73.
- 6 Mahato SB, Kundu AP. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 1994 37: 1517-1575.
- 7 Qi SH, Wu DG, Ma YB *et al.* Studies on chemical constituents of *Lagerstroemia guilinensis*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2002 33: 879-880.
- 8 Liu RH, Kong LY. Lipid constituents from *Euphorbia humifusa* wild. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2005 17: 437-439.
- 9 Sugama K, Hayashi K, Mitsuhashi H. Eremopilenolides from *Petusesites japonicus*. *Phytochemistry* 1985 24: 1531-1535.
- 10 Al-Easa HS, Rizk AM, Ahmed AA. Guaianolides from *Picris radicata*. *Phytochemistry* 1996 43: 423-424.
- 11 Bhandari SPS, Gang HS, Agrawal PK *et al.* Ursane triterpenoids from *Nepeta eriostachia*. *Phytochemistry*, 1990 27: 3956-3958.