

大花红景天多糖 RCPS 分离纯化及单糖组成分析

宋学伟, 任 磊, 韩泳平*, 崔志斌, 黄家钡

西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041

摘 要 采用水提醇沉方法提取大花红景天粗多糖 RCP(rhodiola crenulata polysaccharide), 并通过乙醇分级沉淀, Sevag 法脱除蛋白, 葡聚糖凝胶柱色谱纯化等手段, 得到一种多糖 RCPS。采用苯酚-硫酸法测定了总糖含量, UV 和 IR 等方法考察了多糖性质, 凝胶渗透色谱-示差检测法测定多糖的纯度及分子量范围及分布, GC 法鉴定单糖组成及其摩尔比值。结果表明, 多糖 RCPS 为淡黄色粉末状物质, 易溶于水, 总糖含量为 99.11%。紫外光谱分析显示, 在 195 nm 波长处有明显吸收峰, 在 260 和 280 nm 等处无吸收峰, 说明被测物为多糖, 且不含核酸及蛋白质; 红外吸收光谱分析表明, 在 3 424.83, 2 934.10, 1 742.11, 1 438.96, 1 261.40, 1 103.54, 832.86 cm^{-1} 处均有明显的多糖特征吸收, 主要由鼠李糖, 阿拉伯糖, 木糖, 甘露糖, 葡萄糖, 半乳糖和半乳糖醛酸组成, 其摩尔比值为

1 : 2.96 : 0.21 : 0.26 : 0.08 : 0.58 : 0.15。

关键词 大花红景天; 多糖; 分离纯化; 单糖组成
中图分类号: O629.1/R291.2 **文献标识码**: A

文章编号: 1000-0593(2008)03-0642-03

引 言

大花红景天, 藏名“扫罗玛尔布”, 是景天科红景天属植物。最早收载于《四部医典》, 为藏医常用药, 用于治疗咳嗽、咳血、白带、跌打损伤等。红景天具有扶正固本、调和阴阳、益气补血、通脉养心、促脑益智、滋补强身的功效。近代药理学研究表明, 红景天制剂不仅具有抗缺氧、抗寒冷、抗疲劳、抗微波辐射等功效, 而且还具有延缓机体衰老、防止老年疾病、滋补强壮、扶正固本等作用, 在军事医学、航天医学、运动医学和保健医学等方面都具有十分重要的意义^[1-3]。

目前对于红景天属植物的研究, 以东北高山红景天为主, 且多集中于其苷和苷元部位, 对西藏产大花红景天及其多糖部位的研究还很不充分^[4-6]。为了更加合理地开发利用大花红景天这种名贵的藏药资源, 我们对其中的多糖部位进行了系统研究, 从中分离得到一种多糖成分 RCPS, 并利用红外光谱、紫外光谱、气相色谱和高效凝胶渗透色谱等方法, 对其理化性质及单糖组成进行了探讨。

1 实验部分

1.1 材料仪器

Waters 201 型凝胶色谱仪(含 515 泵, 2410 示差检测器, 美国 Waters 公司), DM-30 $\times 5$ m 透析袋(3500dol 美国) 红外光谱仪, Unicam UV 500 紫外-可见分光光度计(美国 Thermo electron 公司), GC-14B 气相色谱仪(日本岛津公司), OV-225 弹性石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm), Sephadex G100(瑞典 Pharmacia 公司)。试剂均为国产分析纯。

1.2 方法与结果分析

1.2.1 粗多糖的提取

大花红景天根状茎粉碎后, 加入 10 倍重量的蒸馏水, 浸泡 2 h, 置于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流 2 h, 过滤, 将药渣用 8 倍的蒸馏水回流 2 h, 过滤, 再将药渣用 8 倍的蒸馏水回流 2 h, 过滤, 直至药液用硫酸苯酚试剂检查无糖反应为止。合并三次药液, 药渣另外处理。合并液用旋转蒸发仪于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中减压浓缩至合适体积, 加入 3 倍量 95%乙醇沉淀, 静置过夜, 抽滤。依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤, 收集沉淀物。真空干燥得棕褐色粉末粗多糖 RCP。

1.2.2 多糖 RCPS 的分离纯化

将粗多糖 RCP 溶解为 2%的水溶液, 加入 95%乙醇至乙醇浓度到 30%, 静置过夜, 离心分离沉淀, 得 RCP1, 再加入 95%乙醇至乙醇浓度到 50%, 静置过夜, 离心分离沉淀, 得 RCP2, 再加入 95%乙醇至乙醇浓度到 70%, 静置过夜, 离心分离沉淀, 得 RCP3。

收稿日期: 2006-08-28, 修订日期: 2006-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371778)和教育部留学回国人员科研启动基金项目(2004527)资助

作者简介: 宋学伟, 1982 年生, 西南民族大学有机化学专业硕士研究生 *通讯联系人 e-mail: yphan65@tom.com

RCP3 经 Sevag 法脱蛋白, H_2O_2 法脱色后上 Sephadex G100 柱层析(650 mm $\times$ 20 mm), 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液进行洗脱, 流速为 $30 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 每管收集 4 mL, 苯酚硫酸法检测糖分布(图 1)。合并高峰部分, 经透析, 浓缩, 醇沉, 真空干燥得 RCPS。RCPS 为淡黄色粉末, 溶于水, 不溶于二甲亚砜, 乙醇等有机溶剂。

1.2.3 总糖含量的测定

以葡萄糖为标准对照, 采用苯酚-硫酸法测定 RCPS 的总糖含量。吸取 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品液 1 mL, 测定吸光度, 通过标准曲线法求得相应糖浓度值, 计算总糖含量为 99.11%。

1.2.4 红外、紫外光谱分析

红外光谱: 取 2~3 mg 的 RCPS 样品, 以 KBr 压片, 测其红外光谱吸收。图 1 为其红外光谱图, 显示出了明显的多糖特征吸收峰。在 3424.83 , 2934.10 , 1742.11 , 1438.96 , 1261.40 , 1103.54 , 832.86 cm^{-1} 等处均有多糖的特征吸收, 3424.83 cm^{-1} 处吸收峰主要是由多糖的配糖体羟基(缩合)伸缩振动引起的; 2934.10 cm^{-1} 处的吸收峰与碳氢键的伸缩振动相对应; 1742.11 cm^{-1} 处的吸收峰为糖醛酸的特征吸收, 提示 RCPS 为一酸性多糖, 832.86 cm^{-1} 处的吸收峰为甘露糖的特征吸收, 提示多糖中可能有 α -吡喃甘露糖存在。

紫外光谱: 以 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ RCPS 溶液在 $190 \sim 400 \text{ nm}$ 范围内扫描。在图 2 紫外光谱图中, 195 nm 处显示多糖的特征吸收^[7], 在 260 和 280 nm 处无蛋白、核酸吸收峰, 表明多糖中无蛋白、多肽及核酸的存在。

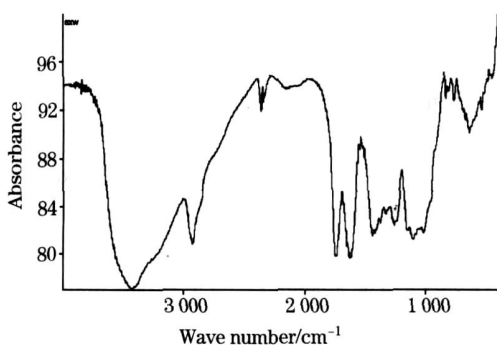


Fig. 1 IR spectrum of RCPS

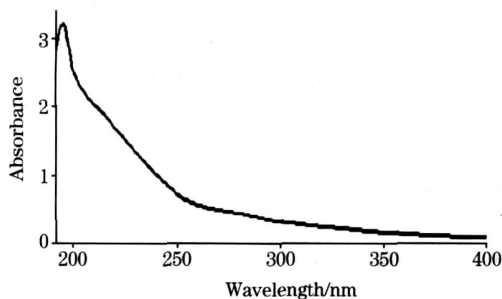


Fig. 2 UV spectrum of RCPS

以硫酸-吡啶反应, 双缩脲反应, 碘-碘化钾反应, FeCl_3 试液反应, 斐林试剂检测 RCPS, 除了硫酸-吡啶反应显阳性

外, 其余反应均显阴性, 证明 RCPS 中含有糖醛酸, 不含多酚类, 蛋白, 还原糖等成分, 与红外光谱, 紫外光谱实验结果一致。

1.2.5 RCPS 纯度检查及分子量测定

常压凝胶柱层析法 取 2 mg RCPS 溶于最少量蒸馏水中, 上 Sephadex G100 柱层析, 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液进行洗脱, 流速为 $48 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 每管收集 1.5 mL, 苯酚硫酸法检测糖分布, 结果为单一狭窄对称峰, 见图 3。

高效凝胶渗透色谱法 取 RCPS 样品溶于 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中, 配成 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 在 Waters ultra-hydrogel linear 色谱柱(300 mm $\times$ 7.8 mm)上进样分析, 进样量为 $10 \mu\text{L}$, 洗脱液为 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 运行 18 min, 以 Waters 2410 示差检测器测定浓度, 记录图谱。以标准 Dextran 标准分子量系列作出相关分子量曲线方程, 求出 RCPS 分子量分布。结果检测出为单一对称峰(见图 4)。

以上实验证明 RCPS 是纯度较高的多糖组分。标准分子量曲线方程为: $\log M_v = 26.4 - 4.77T + 0.390T^2 - 0.013T^3$ ($r = 0.9854$), 求得 RCPS 重均分子量约为 27 876。

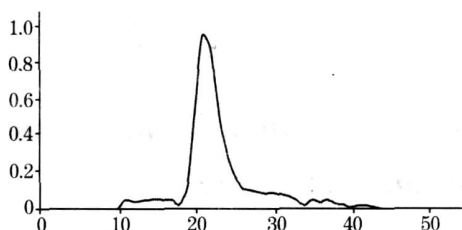


Fig. 3 Chromatogram of RCPS on sephadex G-100

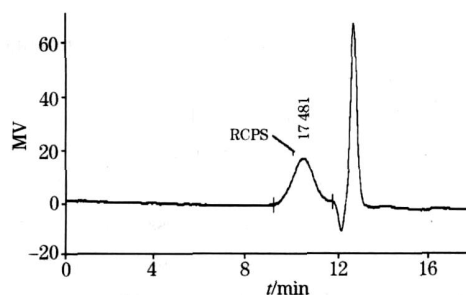


Fig. 4 Gel permeation chromatogram (GPC) of RCPS

1.2.6 单糖组成分析

取 10 mg 的 RCPS 样品, 加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氟乙酸 2 mL, 110°C 下水解 6 h, 取出, 加入少量甲醇, 于旋转蒸发仪上减压浓缩, 重复操作, 以除尽三氟乙酸, 最后真空干燥过夜。水解产物加入 0.5 mL 无水吡啶, 10 mg 的盐酸羟胺, 90°C 下反应 30 min, 取出, 冷却至室温, 然后加入 0.5 mL 无水乙酸酐 90°C 下继续反应 30 min 进行乙酰化, 反应产物浓缩至干, 加入 0.5 mL 氯仿溶解后进行气相色谱分析。取各单糖对照品适量, 按上述步骤进行乙酰化后进行气相色谱分析。根据 RCPS 水解样品的 GC 图与各单糖标准品的 GC 图可以确定由鼠李糖, 阿拉伯糖, 木糖, 甘露糖, 葡萄糖, 半乳

糖和半乳糖醛酸组成,其摩尔比值为

1 : 2.96 : 0.21 : 0.26 : 0.08 : 0.58 : 0.15。

2 讨 论

实验得到了一个纯度较高的大花红景天多糖 RCPS。通过红外光谱、紫外光谱等仪器及化学方法分析了其性质,证明 RCPS 含有糖醛酸,不含多酚类、蛋白、核酸和还原糖等

成分。高效凝胶渗透色谱法测得多糖的重均分子量为 27 876 DoI。RCPS 由鼠李糖,阿拉伯糖,木糖,甘露糖,葡萄糖,半乳糖和半乳糖醛酸组成,其摩尔比值为 1 : 2.96 : 0.21 : 0.26 : 0.08 : 0.58 : 0.15。RCPS 与文献[8]所得高山红景天多糖 RSA 在单糖组成、分子量方面均有所不同,与文献[4]比较,其单糖组成有很大的不同,可能跟提取分离的条件有关。本工作为大花红景天多糖的进一步研究提供了基础。

参 考 文 献

- [1] SONG Yue-ying, HAN Hui-wen, HAO Su-yun, et al(宋月英,韩慧文,郝素云,等). Acta Academies Medicines CPAPF(武警医学院学报), 2004, 13(1): 66.
- [2] LI Gang, ZHANG Shu-yu, ZHAO Guo-jun(李 刚,张述禹,赵国君). Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities(中国民族医药杂志), 2004, 10(3): 40.
- [3] LI Jing, ZHU Bi-de(李 静,祝彼得). Sichuan Journal of Anatomy(四川解剖学杂志), 2005, 13(4): 37.
- [4] Xu J F, Su Z G, Feng P S. Journal of Biotechnology, 1998, 61: 69.
- [5] LI Hua-bin, CHEN Feng. Journal of Chromatography A, 2001. 932: 91.
- [6] HAN Li-ping, LIANG Zhong-yan, ZHANG Li-ping, et al(汉丽萍,梁忠岩,张丽萍,等). Chinese Pharmaceutical Journal(中国药学杂志), 2002, 37(6): 418.
- [7] HE Feng-ga, Hasenqimeng(贺锋嘎,哈森其木格). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(2): 321.
- [8] LUO Chuan-huan, SHU Rong(骆传环,舒 融). Chinese Journal of Pharmaceuticals(中国医药工业杂志), 1997, 28(10): 463.

Purification and Composition Analysis of Polysaccharide RCPS from *Rhodiola Crenulata*

SONG Xue-wei, REN Lei, HAN Yong-ping*, CUI Zhi-bin; HUANG Jia-kun

Ethnic Pharmaceutical Institute of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract Hot water extracting and ethanol precipitating method was employed to isolate polysaccharides. RCP (Rhodiola crenulata polysaccharide) was fractionally precipitated with EtOH. RCP3 (Rhodiola crenulata polysaccharide 3) was one of the three fractions. RCPS was obtained after RCP3 was purified by deproteinization; decolourization and gel chromatography on Sephadex G100. The homogeneity and molecular masses of RCPS were proved by HL GPC. The amount of total carbohydrates of RCPS was measured with phenol-sulfuric acid method. IR spectrometry and UV-spectrophotometer were used to determine the characteristic absorption of RCPS. The monosaccharides contained in the RCPS were analyzed by GC. The amount of total carbohydrates in RCPS is 99.11 %. The molecular weight was 27 876. IR spectrometry analysis indicated that RCPS showed typical signals of acid polysaccharide, including signals at 3 424.83, 2 934.10, 1 742.11, 1 438.96, 1 261.40, 1 103.54 and 832.86 cm^{-1} ; UV-spectrophotometer analysis indicated that RCPS showed a signal of polysaccharide at 195 nm and no signals of protein, nucleic acid at 260 and 280 nm. The monosaccharide constituents of RCPS were Rha, Ara, Xyl, Man, Glu, Gal and GalA, and their molar proportions were 1 : 2.96 : 0.21 : 0.26 : 0.08 : 0.58 and 0.15, respectively.

Keywords Rhodiola crenulata; Polysaccharide; Isolation and purification; Monosaccharide constituent

(Received Aug. 28, 2006; accepted Nov. 28, 2006)

* Corresponding author