

黄芪多糖的组成分析

蔡亚平*, 赵蕊, 朱丹

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要 目的: 为了对黄芪多糖的种类和相对分子质量的分布情况有一个大致的了解。方法: 本实验通过高效凝胶渗透色谱技术和乙醇分级法, 分析了黄芪多糖相对分子质量的分布情况。结果: 黄芪多糖按照相对分子质量分布, 明显分成 2 部分。结论: 黄芪多糖低相对分子质量部分是一个纯度很高的多糖, 具有一定的开发价值。

关键词 高效凝胶渗透色谱法; 重均相对分子质量; 黄芪多糖; 乙醇分级法

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)01-0081-03

Research on Composition of Astragalus Polysaccharides

CAI Ya-ping*, ZHAO Rui, ZHU Dan

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Land
Reclamation University, Daqing 163319, China)

[Abstract] **Objective:** To get a crude perception of the composition and the molecular weight of astragalus polysaccharides (APS). **Method:** Using high performance gel permeation chromatograph (HPGPC) and alcohol fractionation, we got a better outline of the composition of the polysaccharides and respectively analyzed their molecular weights. **Result:** The test results proved that APS breaks down to two parts with respect to their ranges of molecular weight. **Conclusion:** The part with low molecular weight exhibits the character of pure substance which is exploitable.

[Key words] high performance gel permeation chromatograph (HPGPC); astragalus polysaccharides; alcohol fractionation

黄芪多糖 (astragalus polysaccharides, APS) 是黄芪有效部位中含量最多的一种, 其主要生物活性表现为增强免疫力、脾脏增大、抗流感、抗肿瘤、防衰老及抗辐等功能^[1-2]。关于黄芪多糖的研究报道很多^[3-6], 但目前对于它的研究存在以下几个问题: 黄芪多糖的药理学研究对象为粗多糖, 含较多杂质, 虽然通过实验证明这种粗多糖具有很强的药理活性, 但很难确定到底是哪一个成分真正发挥了作用; 黄芪粗多糖的定量分析主要使用的是测定总糖的比色法, 不能如实的反映多糖的含量; 结构化学分析缺

乏, 没有准确确定化学结构式的多糖标准品, 使得这种多糖无法使用常规色谱技术进行定量分析。

高效凝胶渗透色谱技术 (HPGPC) 是最近 30 年来兴起, 并飞速发展的一门技术。采用分子排阻的原理, 它可以同时对小分子化合物和大分子化合物进行定性、定量研究, 克服了常规色谱技术的不足, 并且可以根据色谱峰的保留时间, 准确的测定各物质的相对分子质量。本实验使用了日本 TOSHOH 公司最近研发的 TSKgel GMPW_{XL} 型高效凝胶渗透色谱柱, 它可以同时对相对分子质量 $5 \times 10^3 \sim 800 \times 10^3$ 的分子进行准确的分离和归类。通过 HPGPC 法辅助乙醇分级沉淀法, 对具有药理活性的黄芪多糖的种类和相对分子质量分布进行了宏观的考察, 测定各部分黄芪多糖的相对分子质量范围, 这为该多糖的进一步提取和纯化提供了初步的依据。

收稿日期 20100902(002)

基金项目 黑龙江省中医管理局科研项目 (HZ2008-0388)

通讯作者 * 蔡亚平, 硕士, 讲师, E-mail: cypgogogo@126.com

1 仪器与药品

黄芪购于哈药集团世一堂中药饮片公司;右旋糖酐标准物质(中国计量科学研究院);试剂均为国产分析纯。TSKgel GMPW_{XL} 高效凝胶色谱柱(7.8 mm × 30 cm)、TSK guardcolumn PW_{XL} 高效凝胶色谱柱保护柱(4.0 cm × 6.0 cm, 日本 TOSOH 公司);Agilent Technology 1200 高效液相色谱仪(美国);示差折光检测器。

2 方法与结果

2.1 黄芪多糖的提取和纯化 称取干燥的黄芪 100 g, 用 1 000 mL 蒸馏水浸泡 2 h, 加热至沸, 微沸 30 min, 过滤, 再加入 500 mL 水煎煮 25 min, 过滤, 将 2 次滤液合并, 浓缩至每 1 mL 含有 0.2 g 黄芪的量为止。加入无水乙醇使其浓度达到 80%, 并恒温 25 ℃ 条件下放置 4 h, 离心沉淀, 将沉淀溶解于 500 mL 蒸馏水中, 再加入无水乙醇使其浓度达到 80%, 醇沉 4 h 后, 离心, 2 次水溶醇沉后的沉淀物, 经菲林试剂检测, 无还原糖反应, 即为黄芪粗多糖^[1]。

2.2 HPHPC 相对分子质量标准曲线的建立 精密称量右旋糖酐标准物质, 加入蒸馏水配制成 5 g·L⁻¹ 右旋糖酐标准物质的标准溶液, 使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤备用。采用 HPGPC, 流动相为 0.1 mol·L⁻¹ Na₂SO₄ 水溶液, 柱温 50 ℃, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 示差折光检测器。以右旋糖酐标准溶液标定色谱柱, 进样量 5 μL, 得到各相对分子质量多糖的保留时间 t_R , 将标准右旋糖酐 M_w 的对数 (Y) 和保留时间 (X) 进行回归, 得回归方程 $\lg Y = -0.464 4 X + 13.082$ ($r = 0.998 9$)^[1]。

2.3 黄芪多糖相对分子质量的分布情况考察 称取 0.5 g 干燥恒重的黄芪多糖, 溶解于 2 mL 蒸馏水中, 制成黄芪多糖的溶液, 将溶液置于离心机中, 4 000 r·min⁻¹, 离心 1 h, 取 1 mL 上清液, 加入 1 mL 蒸馏水稀释。使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤备用。取黄芪多糖的样品溶液进行 HPGPC 分析, 进样量 25 μL, 分析方法同 2.2。可得到黄芪多糖的 HPGPC 图^[1], 如图 1。

图 1 有 2 个色谱峰, 即峰 1, 峰 2, 峰 3, 其保留时间分别为 17.829, 20.053, 22.09 min, 代入 2.2 的回归方程, 得到其 M_w 分别为 61 433, 6 698, 7.92×10^5 。

2.4 用乙醇分级法分析黄芪多糖的组成 采用恒温沉淀分级法, 将 2.5 g 黄芪多糖溶于蒸馏水, 用 500 mL 量瓶定容, 待充分混匀后, 制成黄芪多糖的

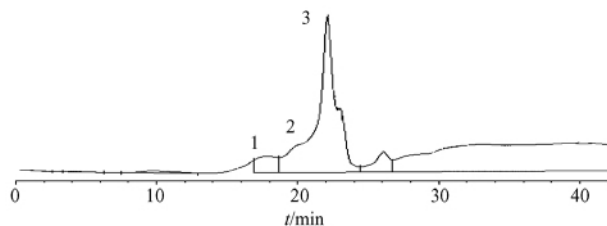


图 1 黄芪多糖的 HPGPC

溶液, 离心除去少量胶状沉淀后, 取 8 份 20 mL 的黄芪多糖溶液, 分别置于 8 个锥形瓶中, 再分别加入无水乙醇, 使溶液中乙醇达 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 在 20 ℃ 恒温 3 h 后, 用 3 μm 微孔滤膜过滤, 将沉淀用水溶解后并定容, 分别用硫酸-酚法测定不同乙醇体积分数下所沉淀的多糖量^[10]。不同体积分数乙醇溶液的沉淀中多糖的含量测定结果见图 2。

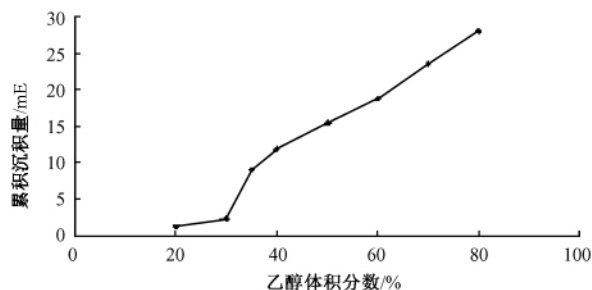


图 2 不同乙醇浓度下所沉淀黄芪多糖的变化曲线

3 讨论

从图 1 可以看出在 15 ~ 20 min, 出峰的部分为峰 1 和峰 2, 是 2 个连续平坦的宽峰, 这部分多糖相对分子质量几乎是均匀连续分布, 其 M_w 在 10^9 到 6.4×10^5 , 这样高相对分子质量的多糖其水溶性很差; 在 22 min 左右处出现 1 个很尖锐的窄峰, 对应的相对分子质量为 7.92×10^5 , 这个低相对分子质量的多糖, 水溶性很好, 实验也证明它遇水即溶, 同时在水溶液中有很高的稳定性。根据图 2 可以辅助性地判断出黄芪多糖分成两部分。乙醇浓度低于 40% 沉积的部分, 为高相对分子质量的黄芪多糖, 这部分多糖具有较高的黏性, 水溶性很差, 上清液呈现浑浊的外观; 乙醇体积分数高于 40% 的沉积部分, 为低相对分子质量的部分, 这部分多糖的黏性较小, 水溶性好, 其水溶液稳定, 上清液呈现澄清的外观。可通过调节乙醇的浓度, 很容易将两者分离。

从图 1 上看两区相对分子质量分散情况是有很大差别的, 高相对分子质量区的谱峰宽而平, 用不均匀指标 HI ($HI = \overline{M}_w / \overline{M}_n$) 判断, 其值在 1.8 ~ 2.5, 这

两点都说明高相对分子质量区是一个高度分散区。低相对分子质量区的谱峰窄而尖,与单相对分子质量多糖的谱峰很相似,初步测得 HI 值在 0.99 ~ 1.04 ($\overline{M}_n$ 用冰点下降法测得),这是一个接近 1 的数据,这两点都说明它是一个接近单相对分子质量的多糖^[1]。通过乙醇分级法建立的图 3 也可以得出相类似的结论。

4 结论

从图 1 可以看出,它按照相对分子质量分布情况,明显分成 2 个区;即高相对分子质量区和低相对分子质量区,前者相对分子质量分散性大;后者相对分子质量分散性小,并集中显示出单相对分子质量的特征。两者很容易用乙醇分级法分离。实验证明,这 2 部分多糖的混合物,具有很强的提高免疫力和抗衰老活性^[6-6],但很难说清,这种强大的药理活性到底来源于这 2 种多糖中的哪一种。所以对这 2 两种多糖的分离和深入研究是非常必要的。高相对分子质量部分的黄芪多糖的分子结构复杂,提取纯化困难,很难确定空间化学结构式,使得这部分多糖无法使用常规手段测定含量;而黄芪的另一部分低相对分子质量多糖,结构简单,纯度高,便于纯化和化学结构确定,却在以往的研究中被忽略,这可能是一种浪费。根据作者查阅的资料,在注射的给药条件下,低相对分子质量多糖的生物活性明显高于黄芪高相对分子质量多糖^[6],所以对它开发和研究是必要的。高效凝胶渗透色谱法辅助乙醇分级法,不仅证明了这种多糖的存在,并为这种多糖的进一步研究提供了依据。

参考文献

- [1] 吴丽,刘婷婷,梁剑锋,等. 黄芪多糖的分离和纯化 [J]. 食品与药品, 2007, 9(4): 62.
- [2] 蔡莉. 黄芪多糖研究现状与进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(15): 896.
- [3] 刘星锴,王美英,吴厚生,等. 黄芪多糖的分离及其免疫活性的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1994, 16(1): 23.
- [4] 邹一愚,顾学裘,陈骥,等. 双多糖多相脂质体的研究 [J]. 沈阳药学院学报, 1998, 4(3): 170.
- [5] Keiji kajimura, Yasuhiro takagami, Keiichi miyano. Polysaccharide of Astragali Radix Enhances IgM Antibody Production in Aged Mice [J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(11): 1478.
- [6] 罗燕,谷新利,鲁枝子,等. 黄芪多糖分级组分对鸡血清中 IL-2 含量的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(1): 32.
- [7] 韩学忠. 五味子多糖提取纯化、分级及应用 [J]. 中医药学报, 2005, 33(6): 35.
- [8] 林兴,蒋伟哲,焦杨,等. 玉郎伞多糖的分离纯化和组成性质研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 901.
- [9] 王培培,于广利,杨波,等. 选育羊栖菜与野生羊栖菜中褐藻胶与褐藻糖胶组成分析 [J]. 中国海洋药物杂志, 2009, 28(3): 39.
- [10] 蔡亚平,韩学忠. 五味子多糖分级注射剂的分级含量和性质测定研究 [J]. 中成药, 2010, 32(7): 136.
- [11] 王艺,蔡亚平,黄莉莉. 中药研究理论与方法 [M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2008: 84.

[责任编辑 邹晓翠]