

# 山楂多糖的成分测定及其单糖组分分析研究

邓旭坤 江善青 穆俊段 欢舒广文 陈旅翼

(中南民族大学药学院, 武汉 430074)

**摘要** 目的: 研究山楂多糖的总多糖含量及单糖组分构成。方法: 用苯酚-硫酸法测定山楂多糖中的中性多糖含量, 用间羟基联苯法测山楂多糖中糖醛酸含量, 用红外光谱法初步探究山楂多糖官能团, 用气相色谱法分析山楂多糖中单糖组分。结果: 山楂多糖中中性多糖的含量为 72.00%; 糖醛酸的含量为 14.98%; 红外光谱分析表明山楂多糖可能为一种氨基多糖; 气相色谱法分析得山楂多糖的单糖组成为木糖、核糖、阿拉伯糖、鼠李糖、果糖、葡萄糖、半乳糖, 其质量分数分别为 5.53%、13.85%、14.26%、9.29%、8.37%、19.91%、21.93%。结论: 该方法比较便捷, 重复性好, 可用于山楂多糖中单糖的组成成分分析。

**关键词** 山楂多糖; 含量测定; 组分分析

中图分类号 O657.71; TQ464 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)03-0052-05

## Content Determination of Polysaccharide in Hawthorn and Component Analysis of Its Monosaccharide

Deng Xukun, Jiang Shanqing, Mu Jun, Duan Huan, Shu Guangwen, Chen Liyi

(College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** Objective: To study the total content of polysaccharide in hawthorn and its monosaccharide components. Methods: The content of neutral polysaccharide in hawthorn polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid method, the content of uronic acid in polysaccharides was determined by *m*-hydroxydiphenyl method, the functional group of the polysaccharide was preliminarily explored by FT-IR, and the monosaccharide components were analyzed by GC. Results: The content of neutral polysaccharide in hawthorn polysaccharide was 72.00%, and the content of uronic acid was 14.98%. FT-IR indicated that polysaccharide in hawthorn was probably a amino-polysaccharide. GC showed that the monosaccharide components of polysaccharide in hawthorn included xylose, ribose, arabinose, rhamnose, fructose, glucose and galactose, whose mass fraction were 9.29%, 13.85%, 14.26%, 5.53%, 8.37%, 19.91% and 21.93%, respectively. Conclusion: These methods are convenient and fast with good repeatability, which can be applied to component analysis of monosaccharide for polysaccharide in hawthorn.

**Keywords** polysaccharide in hawthorn; content determination; component analysis

山楂为蔷薇科植物山楂或山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.) 干燥成熟果实, 味酸、甘, 微温, 归肝、胃、脾经, 具有消食健胃、化浊降脂、行气散瘀的功效。山楂作为药食同源的常见中药之一, 日常应用广泛<sup>[1]</sup>。目前临床上主要用于心脑血管系统疾病及消化系统疾病, 也是常用的减肥药和辅助降血脂原料之一。植物多糖是天然有机化

合物中的大分子物质, 具有调节细胞生长与衰老、增强免疫、抗肿瘤、控制细胞分裂和分化等多方面的功能, 同时一些炎症反应、受体识别和免疫反应等都与多糖分子密切相关<sup>[2, 3]</sup>。作为山楂药材含量较高的活性成分之一的多糖, 其含量检测和单糖组成的研究对于山楂药材的质量控制和评价非常重要。另外, 如何获得产量高和高纯度大的竹节参多糖也是

收稿日期 2017-02-20

作者简介 邓旭坤(1972-) 男, 教授, 博士, 研究方向: 药理学, 中药炮制学, E-mail: dengxukun@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家科技部“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAI27B06); 国家自然科学基金资助项目(81073147)

研究的主要目标,本文对山楂多糖的提取、分离、纯化及其所总多糖含量和单糖组分进行了初步探究,以期对山楂的产品开发和应用提供科学依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

山楂购自山东省沂蒙市,经中南民族大学药学院万定荣教授鉴定为蔷薇科植物山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)干燥成熟果实。三氟乙酸(批号20120903)、盐酸羟胺(批号20120510)、葡萄糖(批号20130306)均购自国药集团化学试剂有限公司;阿拉伯糖(批号20121013)、D-半乳糖(批号20121208)、阿洛糖(批号20121109)、果糖(批号20121213)均购自合肥 BIOSHARP 生物科技公司;D-核糖(批号20120911)、木糖(批号20120317)、鼠李糖(批号20121010)均购自阿拉丁试剂股份有限公司,其他常规试剂均为分析纯。

紫外分光光度计(ZF-6型,上海嘉鹏科技公司),傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet-6700,美国 Thermo Fisher),气相色谱仪(Agilent Technologies-6890N,检测器:FID),色谱柱(Agilent19091N-113 HP-INNOWax Polyethylene Glycol 30.0 m×320 μm×0.25 μm),透析袋(BIOSHARP,截留分子量为7000~14000)。

### 1.2 山楂多糖的提取、分离及纯化

取山楂药材,干燥,粉碎,取粉末100 g(全部能通过2号筛,不能通过3号筛),95%乙醇60℃回流3 h,脱脂;80%乙醇60℃回流2 h,脱单糖和低聚糖;过滤,药渣烘干(不高于50℃),加入纯化水(1:25 w/v),80℃提取3次,每次3 h,过滤,合并滤液,再浓缩至一定体积,加入乙醇,使溶液的乙醇浓度达约80%,4℃放置12 h,过滤,得到的沉淀物烘干,即得粗多糖。

取所得粗多糖,加适量热水溶解,进行流水透析48 h;取透析液,真空冷冻干燥,得精多糖<sup>[4]</sup>。

### 1.3 山楂多糖的中性多糖含量测定

#### 1.3.1 标准曲线的绘制

取一定量的葡萄糖(分析纯),105℃下干燥1 h,于干燥器中30 min,使之冷却。然后精密称定10 mg葡萄糖,蒸馏水定容至100 mL,得0.1 mg/mL的葡萄糖标液。分别精密量取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL的葡萄糖标准溶液于具塞试管中,各补水至2 mL,加入6%苯酚1 mL,振荡,再加入6 mL

的95%的浓硫酸,摇匀,于40℃水浴30 min。取出冷却至室温。在490 nm处检测其吸光度,并绘制标准曲线。再进行精密度、稳定性考察,重复性实验<sup>[5-8]</sup>。

#### 1.3.2 供试品含量测定

精密称定山楂多糖样品10 mg,测定方法同“1.3.1”。

### 1.4 山楂多糖的糖醛酸含量测定

#### 1.4.1 间羟基联苯溶液的配制

精密称取NaOH 0.5 g,溶解后定容至100.00 mL,得0.5% NaOH溶液;称取7.5 mg间羟基联苯,用5 mL 0.5% NaOH溶解,即可配成0.15%的间羟基联苯。

#### 1.4.2 标准品溶液的配制

精密称取4 mg葡萄糖醛酸标准品,溶解后定容至50.00 mL,即得到80 μg/mL的对照品溶液。

#### 1.4.3 四硼酸钠-硫酸溶液的配制

精密称取四硼酸钠0.475 g,溶解后定容至100.00 mL,即得0.0125 mol/L的四硼酸钠-硫酸溶液。

#### 1.4.4 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL于刻度试管中,加蒸馏水至0.5 mL,摇匀,置于冰水浴中加入0.0125 mol/L的四硼酸钠-硫酸溶液2.5 mL,震荡,再置于沸水浴中加热5 min,而后迅速冷却至室温,再加0.15%的间羟基联苯溶液50 μL,以加入标准品0 mL的试管作为空白,在525 nm的波长处,用紫外分光光度法测其吸光度,20 min内测定完成,以葡萄糖醛酸对应的吸光度,计算回归方程<sup>[9,10]</sup>。

#### 1.4.5 精密度试验

精密吸取标准品溶液适量,按法分别连续测定6次吸光度,计算RSD值。

#### 1.4.6 稳定性考察

取同一份供试品,每隔10 min测定吸光度,计算RSD值。

#### 1.4.7 重复性考察

取同一份供试品,在525 nm处测吸光度,连续测6次,计算RSD值。

#### 1.4.8 供试品溶液含量测定

精密称定山楂多糖样品10 mg,供试品溶液含量测定方法同“1.4.4”。

### 1.5 山楂多糖官能团分析

取光谱纯KBr少许,置于160℃环境下6 h使烘

干,而后置于干燥器中,备用.采用KBr压片法,取精制多糖2.0 mg, KBr 150.0 mg,研钵研细,以KBr空白片作对照组,在4000~400  $\text{cm}^{-1}$  区间扫描,观察谱峰情况<sup>[11]</sup>.

### 1.6 山楂多糖中单糖组分分析

#### 1.6.1 单糖对照品衍生化

精密称定鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、葡萄糖、阿洛糖、半乳糖、甘露糖、肌醇10种单糖对照品各10 mg于试管中,各加入盐酸羟胺12 mg和吡啶0.5 mL,置于电热干燥箱中,90℃环境下反应30 min,取出冷却至室温,之后加入0.5 mL醋酐,90℃反应30 min,氮气吹干后,用1.0 mL氯仿溶解,备用<sup>[12-14]</sup>.

#### 1.6.2 山楂多糖水解

精密称定山楂多糖10 mg置安瓿瓶中,加入10 mL 3 mol/mL三氟乙酸,置于电热干燥箱中,120℃水解6 h,室温冷却后用氮气吹干,得单糖,置于干燥器中保存备用.

#### 1.6.3 山楂多糖供试品制备

取多糖水解后的单糖样品按“1.6.2”法.

#### 1.6.4 空白溶液供试品的制备

空白溶液处理方法亦如上.

#### 1.6.5 气相色谱条件

载气:氮气(纯度99.999%),氢气流量50.0 mL/min;空气流量400 mL/min,氮气吹尾流量20.0 mL/min,恒定压力8.79 psi,平均线速度34 cm/s;气化室温度为240℃,检测器温度为260℃,色谱柱初温为140℃,维持3 min,以10℃/min升至240℃,保持11 min,分流比为20:1,进样量为1  $\mu\text{L}$ .

## 2 结果

### 2.1 山楂多糖中总多糖含量

用苯酚-硫酸法测山楂多糖中的中性多糖含量,用葡萄糖为对照品,以吸光度对浓度作图,得到山楂多糖的标准曲线: $Y = 0.416X + 1.829$ ,  $R^2 = 0.9940$  ( $n = 6$ ) 线性范围为0.02~0.14 mg/mL.经计算得山楂多糖中总多糖含量为72.00%.精密度试验的RSD值为1.37%;稳定性试验表明供试品在120 min内稳定,RSD值为1.86%;重复性试验的RSD值为1.61%.

### 2.2 山楂多糖中总多糖糖醛酸含量

用间羟基联苯法测得糖醛酸标准曲线为 $Y = 1.2966X + 0.0239$ ,  $R^2 = 0.9942$  ( $n = 6$ ) 线性范围为

0.010~0.050 mg/mL.经计算得到糖醛酸多糖含量为14.98%.精密度试验的RSD值为1.64%;稳定性试验表明供试品在120 min内稳定,RSD值为1.93%;重复性试验的RSD值为1.73%.

### 2.3 山楂多糖官能团分析

用红外光谱分析山楂多糖的组成成分,由图1可以看出,在3600~3200、3200~2800、1400~1200、1100~1000  $\text{cm}^{-1}$  这4个红外光谱区间内都出现了典型多糖物质的吸收峰.在2947.6  $\text{cm}^{-1}$  处明显的吸收峰可以推测其分子结构中甲基和亚甲基含量比较大;1629.1  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可能是乙酰基的酰胺基团,由于存在酰胺基团,提示其可能为一种氨基多糖;1150.2  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可能是C—O—H和吡喃糖环的C—O—C.

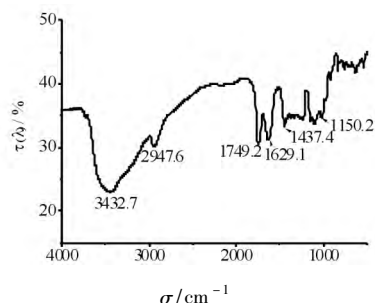
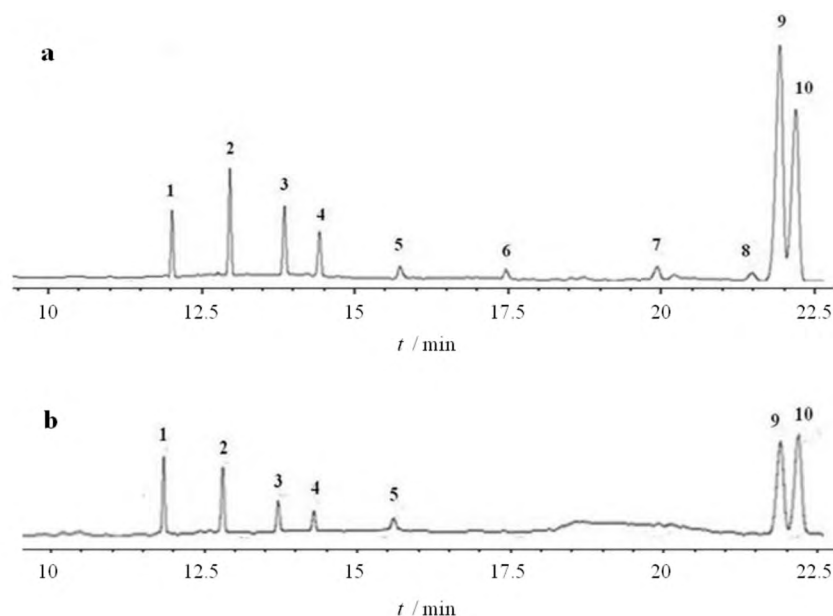


图1 山楂多糖组分的红外光谱分析

Fig.1 Infrared spectrum analysis of polysaccharides in Hawthorn

### 2.4 山楂多糖组分分析

单糖的成分组成可以根据出峰时间确定,各个单糖的相对质量分数可以通过峰面积归一化法求得.在实验确定的色谱条件下,将10种对照品的单糖衍生物单独进样,依次记录各个单糖样品的保留时间,再将10种对照品混合后再衍生化所得的溶液进样,确认各单糖衍生物的峰位置,最后将供试品溶液和空白溶液分别进样,记录色谱图2(见图a和b).图a中单糖样品色谱峰的保留时间鼠李糖(12.85 min),核糖(13.69 min),阿拉伯糖(14.48 min),木糖(15.00 min),果糖(16.16 min),甘露糖(17.69 min),阿洛糖(19.89 min),肌醇(21.27 min),葡萄糖(21.70 min),半乳糖(21.90 min).图b中多糖山楂的图谱中出现了鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、葡萄糖、半乳糖这7个吸收峰,它们的保留时间分别为12.85,13.69,14.48,15.00,16.16,21.70,21.90 min.通过面积归一化法进行计算多糖成分中各单糖的组分,单糖的质量分数结果见表1.



1) 鼠李糖; 2) 核糖; 3) 阿拉伯糖; 4) 木糖; 5) 果糖; 6) 甘露糖; 7) 阿洛糖; 8) 肌醇; 9) 葡萄糖; 10) 半乳糖

图2 混合标准品(a)和山楂多糖供试品(b)的GC色谱图

Fig. 2 GC chromatograms of mixed monosaccharide standards (a) and polysaccharide samples (b)

表1 山楂多糖单糖的组分和质量分数( $n=3$ )

Tab. 1 Monosaccharide composition and mass fractions of polysaccharide in Hawthorn.

单糖组分	出峰时间 $t/\text{min}$	质量分数/%
鼠李糖	12.85	9.29
核糖	13.69	13.85
阿拉伯糖	14.48	14.26
木糖	15.00	5.53
果糖	16.16	8.37
葡萄糖	21.70	19.91
半乳糖	21.90	21.93

### 3 讨论

山楂是我国传统的药食同源中药,不仅有丰富的营养成分,还有广泛的药理作用。山楂多糖是其重要的生物活性物质,具有抗疲劳、增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤以及降血脂的药理作用<sup>[15]</sup>。闫启光研究发现山楂能增强小鼠的免疫力<sup>[16]</sup>。李刚等<sup>[17]</sup>研究发现山楂活性多糖还具有抗肿瘤作用。山楂多糖在药用和保健食品的开发潜力巨大,利用前景非常乐观<sup>[18]</sup>。因此,对山楂中多糖成分的含量及其单糖组成的检测,对于山楂的药效物质基础的研究及药材质量评价和控制意义重大。

本文在提取山楂多糖时温度控制在 $60^{\circ}\text{C}$ 以下,有利于保护其中对热不稳定的成分,使其不容易水解。采用95%的乙醇脱脂溶性成分,流水透析进一

步纯化。本文尝试采取苯酚-硫酸法测定其中性多糖的含量,联合运用间羟基联苯法测定山楂多糖中糖醛酸的含量,可以全面地反映出山楂多糖中总多糖含量。利用傅里叶红外光谱技术推测出山楂多糖可能是一种氨基多糖。进一步运用气相色谱法分析山楂多糖中单糖组成,参照各单糖标准品,结果确定了山楂多糖中含有鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、葡萄糖、半乳糖等单糖组分。经计算各单糖的质量分数依次为9.29%、13.85%、14.26%、5.53%、8.37%、19.91%、21.93%。气相图谱中另外有约10%质量分数的杂峰,其中18.90 min处的峰较为明显,由于没有较明确的标准品进行对照,该物质可能是其它某种单糖抑或是某种未知物质,有待更深入的检测分析进行确认。

### 参 考 文 献

- [1] 王坦,苗明三,苗艳艳. 山楂的现代研究特点分析[J]. 中医学报, 2015, 30(5): 708-710.
- [2] 陈文娟,陈建福. 血柚皮多糖的碱法提取及其抗氧化活性研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2014, 23(3): 22-27, 32.
- [3] 王建,龚兴国. 多糖的抗肿瘤及免疫调节研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 22(1): 52-55.
- [4] Tong L, Ye L, Guan X, et al. Immunopotentiating and antitumor activities of a polysaccharide from *Pulsatilla*

- chinensis* (Bunge) Regel [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 54(3): 225-229.
- [5] 朱海涛, 楚亚琴, 陈黎. 正交试验优选蒽酮-硫酸法测定白芨多糖含量条件[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(20): 1714-1718.
- [6] 韦练, 郭力, 陈佳江, 等. 3,5-二硝基水杨酸法测定石斛多糖含量的研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1330-1332.
- [7] 孙晓燕, 蔡昌利, 徐丽莉, 等. 多糖含量测定方法的比较[J]. *现代中药研究与实践*, 2015(3): 58-62.
- [8] 辛敏, 刘轩, 詹欣, 等. 硫酸-紫外法与苯酚-硫酸法测定千两茶中总多糖的比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(3): 62-65.
- [9] 陈巧巧, 万琴, 王振中, 等. 人参多糖中糖醛酸含量测定方法的建立[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 121-124.
- [10] 王慧, 热娜·卡斯木, 樊珍珍. 新疆赤芍多糖中糖醛酸含量的测定[J]. *亚太传统医药*, 2013, 9(2): 12-14.
- [11] Huang F, Zhang R, Yi Y, et al. Comparison of physicochemical properties and immunomodulatory activity of polysaccharides from fresh and dried litchi pulp [J]. *Molecules*, 2014, 19(19): 3909-3925.
- [12] 邓旭坤, 吴非, 陈旅翼, 等. 气相色谱法分析大麻药多糖成分中单糖组成[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2015, 34(2): 48-51.
- [13] Yang W, Wang Y, Li X, et al. Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117: 1021-1027.
- [14] Jia X, Zhang C, Qiu J, et al. Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from *Rhynchosia minima* root. [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 132: 67-71.
- [15] 吕玲霞, 辛立红, 管仁伟, 等. 山楂多糖药理作用和提取工艺研究进展[J]. *药物评价研究*, 2016, 39(6): 1081-1085.
- [16] 闫启光. 山楂多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. *中国中医药咨讯*, 2009(6): 134.
- [17] 李刚, 梁新红, 葛晓虹. 山楂化学成分及其保健功能特性[J]. *江苏调味副食品*, 2009, 26(6): 25-27, 30.
- [18] 刘家兰, 徐晓玉. 山楂的药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2009(S1): 63-66.

(上接第51页)

## 5 小结

侗族是一个崇水的民族, 侗寨的风雨桥是侗民近水的楼台. 侗族医药以水立论, 由液态水的溶解性与流动性认知到水作为人体内气血津液的载体, 参与物质能量信息传递的基础作用. 并从传递速度的过快与过慢总结出滑与塞两类疾病, 涉及内外妇儿各科. 消化、循环、呼吸、泌尿、内分泌、神经、生殖各大系统的相关疾病, 具有强大的理论包容性.

侗医按照塞者散之、滑者收之的治疗原则, 选择酸涩味的收性药物治疗滑病, 选择芳香味的散性药物治疗塞病. 同时认识到影响传导的内在病因是水的承载与气的推动的能力, 通过理气血的药物来调节物质、能量与信息的传导速度, 具有逻辑的一贯性与结构的优美性<sup>[7]</sup>.

人体的大部分由水构成, 水参与了人体内几乎一切生理过程和代谢反应, 抓住水这个人体生理病

理的枢纽, 可以解释很多目前现代医学和中医学不能解释的疑难杂症, 并衍生出众多的治疗方法. 在这方面侗医无疑具有理论的独创性.

## 参 考 文 献

- [1] 张民. 侗族古歌[M]. 贵阳: 贵州民族出版社, 2015.
- [2] 郭航远, 池菊芳, 沈静, 等. 水与健康[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2012.
- [3] 洪宗国. 气、经络与宏观生命科学[J]. *中医药学刊*, 2002, 8(20): 412.
- [4] 萧成纹. 侗族医药探秘[M]. 长沙: 岳麓书社, 2004.
- [5] 汪冶, 田兰, 田华咏. 中国侗医药史[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2014.
- [6] 龙运光, 萧成纹, 吴国勇, 等. 中国侗族医药[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2011.
- [7] 洪宗国, 杨光忠, 王德彬, 等. 侗医药思想梳理与理论架构探讨[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35(4): 40-42.