

红花多糖的提取与含量测定

张晓莉¹, 李玉婷¹, 王亚贤^{2*}, 石学魁¹, 李福娟¹, 桂金秋¹

(1. 牡丹江医学院病原生物学教研室, 黑龙江 牡丹江 157011;

2. 黑龙江中医药大学微生物与免疫学教研室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 研究红花多糖的提取及含量测定, 为开展红花多糖的抗肿瘤作用机制提供理想药物。方法: 采用水提醇沉法从红花药材中提取并分离出红花粗多糖, 用 Sevage 法除去蛋白质, 过氧化氢脱色; 采用苯酚-硫酸显色, 用分光光度法测定多糖含量。结果: 红花多糖的浓度与吸光度在 5 ~50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈良好的线性关系, 回归方程: $Y=0.01749X-0.03165$, $r=0.9994$ 。多糖质量分数为 96.048%。结论: 含量测定方法操作简便, 灵敏度高, 稳定, 重现性好。该方法可为开展红花多糖的抗肿瘤作用研究提供理想的实验药物。

[关键词] 红花多糖; 分光光度法; 提取; 纯化; 含量测定

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0019-03

Extraction and Assaying of Safflower Polysaccharide

ZHANG Xiao-li¹, LI Yu-ting¹, WANG Ya-xian^{2*}, SHI Xue-kui¹, LI Fu-juan¹, GUI Jin-qiu¹

(1. Teaching and Research Section of Pathogenic Biology, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. Department of Microbiology and Immunology, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective: To study the extraction and assaying of Safflower polysaccharide (SPS), and to provide suitable experimental drug specimen for exploring the anti-carcinoma effect of SPS. **Method:** Water extracting and ethanol precipitating methods were applied to extract polysaccharide from Safflower. By Sevage method, protein can be removed, and by oxidation method to decolor the polysaccharide. After phenol-sulphuric acid coloring, the polysaccharide content was determined by the method of absorption spectrometry. **Result:** The standard curve was liner in the concentration range of 5 ~50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with correlation coefficient of $r=0.9994$, the linear regression equation was $Y=0.01749X-0.03165$, the contents of polysaccharide from Safflower was 96.048%. **Conclusion:** This methods have advantages of simple operation, good stability, high accuracy and good reproducibility. This extraction technology could be used to extract Safflower polysaccharide for studies on its anti-carcinoma effect.

[Key words] safflower polysaccharide (SPS); spectrophotography; extraction; purification; assaying

红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥管状花, 性温, 味辛, 具有活血散瘀等功效, 临床应用非常广泛。红花化学成分复杂, 生物活性广泛。

研究发现红花多糖 (safflower polysaccharide, SPS) 具有免疫调节功能, 且有抗肿瘤作用^[1-2]。为了进一步开发利用红花这一药用植物资源, 本实验用水提醇沉法制得红花粗多糖, 并进行适当的精制, 采用分光光度法进行多糖的含量测定, 为进一步研究其抗肿瘤作用机制提供理想的实验用药。

1 材料

红花药材购于哈尔滨益寿堂药店。95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚、葡萄糖、苯酚、三氯甲烷、正丁醇等, 均为分析纯。

[收稿日期] 20100122(005)

[第一作者] 张晓莉, 硕士, 教授, 研究生导师, 主要从事内分泌免疫、中药免疫调节方面的研究。Tel: (0453) 6586656, E-mail: zhangxiaoli59@126.com。

[通讯作者] * 王亚贤, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药现代化多学科免疫学研究。Tel: (0451) 82193649, E-mail: wangyxmail@yahoo.com.cn。

TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), TDL-40B 台式离心机(上海安亨科学仪器厂), 数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂), 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

Savage 液的配制: 三氯甲烷-正丁醇(4:1) 混合液, 临用时配制。**5% 苯酚的配制:** 取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g 和 NaHCO_3 0.05 g, 常压蒸馏, 收集 180 馏分。冷却后取馏分 5 g, 加蒸馏水溶解并定容到 100 mL, 混匀, 装入棕色瓶中放入冰箱备用。

2 方法与结果

2.1 红花粗多糖的提取 实验前将红花用 60 恒温干燥箱再烘 1 次。取干燥的红花 450.16 g 充分浸渍, 沸水煮提 4 次, 每次 1 h, 注意边提边搅拌。合并滤液并浓缩, 浓缩前后体积比为 4:1。加入 4~5 倍体积的 95% 乙醇, 放入 4 冰箱内静置 24 h。对醇沉的多糖沉淀进行离心, $4\ 000 \sim 5\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min, 沉淀用去离子水溶解, 反复用乙醇沉淀 2 次。60 烘干, 为棕黄色固体, 称重, 得粗多糖 27.03 g, 粗多糖得率为 6.005%。

2.2 红花多糖的分离纯化

2.2.1 反复冻融除杂 粗多糖用蒸馏水溶解后置 -20 冷冻 2 d, 室温缓慢融化, 离心($4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 15 min, 弃去沉淀。重复至无沉淀为止。

2.2.2 Seavage 法除蛋白质 按多糖水溶液体积 1/4~1/3 加入 Seavage 试剂混合, 充分振摇后静置, 离心($4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 除去蛋白层, 取上清重复操作, 至无游离蛋白为止(多糖溶液在 280 nm 处无紫外吸收)。反复多次, 需经 10 次以上才能将游离蛋白除尽。

2.2.3 脱色 向脱完蛋白质的糖液中加入氨水, 调 pH 在 8~9, 加入一定量的 H_2O_2 (15%), 在 50 下保温 2 h, 样品水溶液变成浅棕色, 置于冰箱 24 h, 除去沉淀部分。糖液浓缩, 加无水乙醇(1:4) 置冰箱过夜, 离心弃去上清液。

2.2.4 洗涤 沉淀物先后用无水乙醇、丙酮、无水乙醚脱脂纯化, 除去其脂溶性成分, 洗涤 3 次。干燥后即得精制多糖 1.72 g, 为淡黄色粉末状物质, 得率为 0.382%。

2.3 含量测定

2.3.1 葡萄糖标准溶液的制备 精密称取 105 干燥至恒重的无水葡萄糖 10 mg, 置于 100 mL 量瓶

中, 以蒸馏水定容至刻度, 配制成 $100\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液。从储备液中精密吸取 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 葡萄糖溶液分别加于 20 mL 的具塞试管中, 并分别加蒸馏水补至 2.0 mL, 配制成 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准系列溶液。取 2.0 mL 蒸馏水作为空白调零。

2.3.2 最大吸收波长的确定 精密吸取 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准葡萄糖液和 $40\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 精制红花多糖溶液各 1.0 mL, 分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 再迅速沿管壁加入 5.0 mL 浓硫酸, 混匀, 封口, 室温放置 30 min。对照液取 1.0 mL 蒸馏水加于具塞试管中, 以下操作相同, 在 430~530 nm 扫描, 确定最大吸收波长。由图 1 可知, 采用苯酚-硫酸法显色葡萄糖和红花多糖均在 488 nm 处有最大吸收, 可用葡萄糖作为红花多糖的标准对照品用于含量测定。

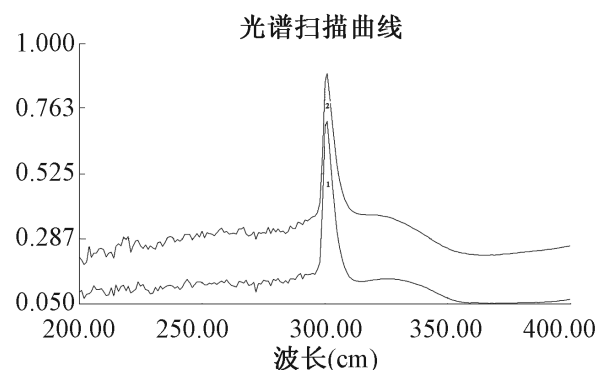


图 1 葡萄糖和红花多糖的紫外扫描曲线
1. 葡萄糖; 2. 红花多糖

2.3.3 稳定性试验 按 2.3.2 方法操作, 对同一样品分别在 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 处测定吸光度, 结果如表 1 所示。结果在 180 min 时吸光度开始下降, 说明多糖溶液在 150 min 以内比较稳定, RSD 1.36% (前 6 次)。

2.3.4 精密度试验 精密称取精制多糖样品 10 mg, 按样品溶液制备和样品含量测定项下方法操作, 测定吸光度, 连续测定 8 次, 其吸光度平均值 0.157, RSD 为 1.76%, 表明此方法精密度良好。

2.3.5 重复性试验 精密称取多糖样品 6 份, 按样品溶液制备方法, 分别制备 6 份浓度为 $0.1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 按测定标准曲线的方法测定其吸光度, RSD 2.77%, 重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取 60 干燥恒重的精制红花粗多糖 20 mg, 置于 100 mL 量瓶中定容。再吸取上述溶液 1.0 mL 定容至 10 mL。精密吸取多糖样品溶液 1.0 mL 共 9 份(每份含多糖 19.2096 μg), 置于 20 mL 试管中, 分别精密加入 10, 30, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准溶液 1.0 mL 各 3 份, 按测定

标准曲线的方法操作, 计算加样回收率, 见表 1。

表 1 葡萄糖加样回收率测定结果

加入葡萄糖量 / μg	测得总量 / μg	回收率 / %	均值 / %	RSD / %
10	28.973 2	97.64		
10	29.034 1	98.25		
10	29.101 2	98.92		
30	49.342 1	100.44		
30	48.120 9	96.37	98.99	2.06
30	49.557 2	101.16		
50	69.201 6	99.98		
50	70.174 2	101.93		
50	67.337 9	96.26		

2.3.7 标准曲线的绘制 向 2.3.1 的葡萄糖标准系列溶液及蒸馏水中加入 5% 的苯酚溶液 1.0 mL, 混匀, 再迅速沿管壁加入 5.0 mL 浓硫酸, 摇匀, 封口, 室温放置 30 min。在最大吸收波长 488 nm 处测定吸光度, 以吸光度 (A) 为纵坐标, 以葡萄糖标准溶液质量浓度 ($C, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归。得标准曲线的回归方程: $Y = 0.01749x - 0.03165$, $r = 0.9994$, 葡萄糖对照品质量浓度在 $5 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.3.8 换算因子 (f) 的测定 精密称取 60 干燥恒重的精制红花多糖 20 mg, 置于 100 mL 量瓶中定容。再吸取上述溶液 1.0 mL 定容至 10 mL。吸取 2.0 mL 上述溶液按 2.3 项下测定吸光度, 按下式计算换算因子^[3]: $f = W / (C \times D)$, 式中: W 为多糖质量 (mg), C 为多糖液中葡萄糖的浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), D 为多糖的稀释倍数。测得换算因子 $f = 2.4695$, RSD 1.385% ($n = 3$)。

2.3.9 样品中多糖含量的测定 精密称取精制多糖 20 mg, 定容于 100 mL 量瓶中, 摇匀得样品液。再吸取上述溶液 2.0 mL 定容至 20 mL。吸取待测样品液 1.0 mL, 按标准曲线制备的方法测其吸光度值, 代入回归方程, 得葡萄糖质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按下式计算多糖质量分数^[3]: 多糖质量分数% = $C \times D \times f / W \times 100\%$

其中, C 为样品液的葡萄糖质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), D 为样品的稀释倍数, f 为换算因子, W 为样品的质量 (mg)。

2.4 紫外光谱鉴定 精密称取精制多糖样品 1 mg, 配制成 0.1% 水溶液, 以蒸馏水做空白对照, 于 200 ~ 400 nm 处进行紫外扫描。获得的多糖在 260 nm 和 280 nm 处无紫外吸收, 表明不含蛋白质、多肽

表 2 红花多糖质量分数测定

No	A 值	多糖 / %	平均含量 / %	RSD / %
1	0.108	98.589	96.048	2.24
2	0.104	95.765		
3	0.102	94.354		
4	0.101	93.648		
5	0.107	97.883		

和核酸, 所得到的多糖纯度较好。

精密吸取 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准葡萄糖液和 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 精制红花粗多糖溶液各 1.0 mL, 分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 再迅速沿管壁加入 5.0 mL 浓硫酸, 混匀, 封口, 室温放置 30 min。对照液取 1.0 mL 蒸馏水加于具塞试管中, 以下操作相同, 在 200 ~ 400 nm 范围内扫描, 曲线如图 1 所示。由图可知, 红花多糖和葡萄糖的紫外吸收光谱极其相似, 均在 301 nm 处有最大吸收峰。进一步表明红花多糖纯度较高。

3 讨论

本实验采用水提醇沉法制得红花粗多糖, 再通过冻融除杂、sevage 法除蛋白质、双氧水脱色, 经过无水乙醇、丙酮、无水乙醚脱脂纯化, 得精制多糖; 然后用苯酚-硫酸显色, 分光光度法在 488 nm 处测定多糖质量分数, 为 96.048%; 紫外光谱鉴定证实多糖纯度较好。实验结果表明该方法简便可靠, 灵敏度高, 稳定, 重现性好, 可为红花资源的开发及应用提供相关参考依据, 亦为红花多糖抗肿瘤作用机理的研究提供了理想的实验用药。本实验中提取的粗多糖得率 (6.005%) 及精制多糖 (0.382%) 均较低, 文献记载红花中多糖质量分数 (5.62% ~ 10.22%)^[4], 可能是提取、纯化过程中丢失较多, 将继续探讨。对于红花多糖中单糖组分的分析确定及抗肿瘤机制有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 黄虹, 俞曼雷, 翟世康, 等. 红花多糖的免疫活性作用 [J]. 现代免疫学, 1982, (6): 7.
- [2] 何素芳, 王志刚, 任爱农, 等. 红花多糖对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及瘤细胞 VEGF, Ki67 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 795.
- [3] 段志芳, 章炜中, 黄丽华. 紫背天葵多糖提取与含量测定 [J]. 中成药, 2007, 29(2): 274.
- [4] 郭美丽, 付立波, 张芝玉, 等. UV, HPLC 测定红花中黄色素、多糖和腺苷的含量 [J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(8): 550.

[责任编辑 仝燕]