

不同种源的太子参多糖含量及其单糖组成 GC-MS 研究

夏和先^{1,2,3}, 陈乃东^{1,2*}, 姚厚军^{1,2}, 王海军¹, 柯成¹, 孙叶超¹¹皖西学院生物与制药工程学院, 六安 237012; ²皖西中药与天然药物工程技术研究中心, 六安 237012; ³皖西卫生职业学院, 六安 237005

摘要: 研究不同种源太子参多糖含量以及单糖组成差异, 为太子参质量评价和临床用药提供参考依据, 采用水提-醇沉法提取太子参多糖, 以葡萄糖为标品, 蒽酮-硫酸比色法测定多糖含量。盐酸甲醇水解、三甲基硅烷(TMS)柱前衍生、气-质联用法(GC-MS)分析不同种源太子参多糖的单糖组成。结果表明, 组培太子参与野生太子参多糖的含量分别为 $19.05 \pm 1.38\%$ 、 $22.63 \pm 2.18\%$; 不同种源太子参多糖均由葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、半乳糖醛酸、阿拉伯糖、鼠李糖七种单糖组成, 但单糖的比例明显不同。如以多糖含量为标准, 野生太子参多糖含量高于组培太子参, 品质更佳; 多糖中单糖比例不同, 提示不同种源的太子参多糖结构可能存在不同。

关键词: 太子参; 多糖; 单糖组成; 气-质联用; 种源

中图分类号: R283.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.013

Contents and Mono-saccharide Compositions of Polysaccharides from Different Origins of *Pseudostellaria heterophylla*

XIA He-xian^{1,2,3}, CHEN Nai-dong^{1,2*}, YAO Hou-jun^{1,2}, WANG Hai-jun¹, KE Cheng³, SUN Ye-chao³¹College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China;²West Anhui Biotechnology Research Center of Natural Medicine and Traditional Chinese Medicine,West Anhui University, Lu'an 237012, China; ³West Anhui Health Vocational College, Lu'an 237005, China

Abstract: In order to provide references for the quality evaluation and clinical medication of *Pseudostellaria heterophylla*, the contents and monosaccharide compositions of polysaccharide from tissue-cultured *P. heterophylla* and its wild correspondence were investigated. The polysaccharides were extracted from *P. heterophylla* by a water-extraction and alcohol-precipitation method and the contents were determined by anthrone-sulfuric acid colorimetric method. The obtained polysaccharides were sequentially treated with 0.5 M HCl-methanol, trimethyl-silane derivatization and GC-MS analysis was carried out to study its monosaccharide compositions. The results showed that the contents of polysaccharide in tissue-cultured and wild *P. heterophylla* were $19.05 \pm 1.38\%$ and $22.63 \pm 2.18\%$, respectively. GC-MS analysis revealed that polysaccharide in tissue-cultured and wild *P. heterophylla* were both consisted of glucose, fructose, mannose, galactose, galacturonic acid, arabinose and rhamnose, but the proportion of monosaccharides varied remarkably in the polysaccharides from different origins.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla*; polysaccharide; monosaccharide composition; GC-MS; origin

太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miqi) Pax et Hoffm], 又名孩儿参、童参、四叶参或米参, 系石竹科多年生草本宿根性植物, 药食两用, 具益气健脾, 生津润肺, 养精益气之功效^[1,2]。现代医学研

究表明, 太子参具有抗疲劳、抗应激、增强机体免疫、镇咳、抗病毒作用。

近年来, 随着太子参功能性保健品、真空膨化系列产品的开发问世, 以及太子参的提取液在化妆品中的应用, 原药材市场需求量逐年加大, 野生资源日渐减少, 药材价格也随之攀升, 通过试管苗途径快速育种野外大规模栽培的组培太子参, 已逐渐替代野生太子参成为药用太子参主要来源, 研究组培太子参与野生太子参药效物质基础的相似性已成为太子参规范化栽培和临床用药亟需解决的问题, 目前已有

收稿日期: 2015-09-16 接受日期: 2015-11-04

基金项目: 安徽省教育厅科学研究重点项目 (KJ2014A281); 安徽省省级高校科学研究重大项目 (KJ2015ZD43); 国家自然科学基金 (NSFC81573536, NSFC81274021); 中国博士后基金面上项目 (2014M551791); 皖西学院学生研究性学习项目 (wxyx2015175, wxyx2015177)

* 通讯作者 E-mail: 2004end@163.com

不同种源太子参化学成分相似性的研究^[3,4],然而,基于不同种源太子参多糖组成的对比研究尚未见报道。

本实验对不同种源太子参多糖的含量进行测定,在此基础上,采用四甲基硅烷(TMS)法对太子参多糖的单糖进行柱前衍生化处理,GC-MS 联用技术对多糖的单糖组成及含量进行了对比研究,为太子参的质量控制和规范化栽培标准提供参考,为开发和利用太子参资源提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Trace1300-RSQ 气-质联用仪(美国热电),杰瑞尔 DK-8D 三孔三温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司),洪旋 RE-2000 旋转蒸发器(上海洪旋实验仪器有限公司),立式压力蒸汽灭菌器 LS-100LD 灭菌锅(江阴滨江医疗设备有限公司),XB 120A 天平(上海天平仪器厂),202A-型数显电热恒温干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司),SHB-111S 循环水式多用真空泵(郑州长城料工贸有限公司),TGL-20M 台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)等。

1.2 材料与试剂

1.2.1 材料

供试品太子参采于安徽省霍山县,品种经安徽省省级 2011 协同创新——霍山石斛产业化开发协同创新中心主任陈乃富鉴定为太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miqi) Pax ex Pax et Hoffm] 组培植株、野生植株,鲜品用水洗净,至通风处阴干、粉碎、备用。实验设三组重复。

1.2.2 试剂

盐酸(AR,汕头市西陇化工有限公司),甲醇(AR,上海振兴化工一厂),吡啶(AR,西陇化工有限公司),六甲基二硅胺烷(阿拉丁),三甲基氯硅烷(阿拉丁),正己烷(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),无水乙醇(AR,上海振兴化工一厂),三氯甲烷(AR,汕头市西陇化工股份有限公司),丙酮(AR,汕头市西陇化工厂有限公司),无水乙醚(AR,双四牌,上海振兴化工一厂),正丁醇(AR,天津博迪化工股份有限公司),肌醇(上海源聚生物科技有限公司),D-(+)-葡萄糖(批号:ZY130915,上海紫一试剂厂),D-果糖(批号:ZY130910,上海紫一试剂厂),D-甘露糖(批号:ZY130910,上海紫一试剂厂),

L-阿拉伯糖(批号:ZY130910,上海紫一试剂厂),L-(+)-鼠李糖(批号:ZY130915,上海紫一试剂厂),D-(+)-半乳糖(批号:ZY130922,上海紫一试剂厂),D-(+)-半乳糖醛酸(批号:BCBK3704V, SIGMA 试剂公司)。

2 实验方法

2.1 粗多糖的提取

精密称取干燥至恒重的供试品粉末 5.0 g,索氏提取器中无水乙醇脱脂至回流液无色,残渣在通风橱中挥干溶剂,以料液比(1:50 g/mL)加入蒸馏水,85 °C 下水浴回流提取 3 h,提取 3 次,合并滤液,减压浓缩,3000 rpm 离心 15 min,分取上清液获太子参总多糖提取液,定容,备用^[5-7]。实验设三次重复。

2.2 多糖的含量测定

精密吸取 1.0 mL 在“2.1”项制备的总多糖提取液,置于 10 mL 具塞刻度试管,在冰水浴中缓缓精密加入 0.2% 蒽酮-硫酸溶液 4.0 mL,摇匀,冷却后置沸水浴中保温 10 min 后取出,冰水浴中冷却 10 min,于 628 nm 下测吸光度值(A)。以葡萄糖为对照品制标准曲线,得回归方程 $A = 6.4333C + 0.0183$, $R^2 = 0.9949$,线性范围 0.1 ~ 2.5 mg/mL, A 为吸光度, C 为浓度。

精密量取总多糖提取液,加入无水乙醇至乙醇的浓度为 76%,4 °C 冰箱中保存 24 h 后 5000 rpm 离心 15 min,沉淀依次用乙醇,丙酮和乙醚反复洗涤数次,溶解在适量蒸馏水,按 Sevag 法脱蛋白,冷冻干燥,得精制多糖,测得葡萄糖对组培太子参和野生太子参多糖的换算因子分别为 1.939 和 2.516,计算出供试样品中多糖含量。收集精制多糖,备用。

2.3 多糖单糖组成的 GC-MS 分析

2.3.1 多糖的酸解及柱前衍生化

精密称取干燥至恒重的组培、野生太子参多糖各 50.0 mg、标准单糖各 20.0 mg,分别加入 5 mg 的肌醇,置于具塞试管中,向各管加入 1.5 mL 的 0.5 M 的盐酸甲醇溶液,吹入氮气,塞紧试管塞,80 °C 水浴反应 16 h。氮气吹干试管中残留溶剂,加入 2.0 mL 的吡啶:六甲基二硅胺烷:三甲基氯硅烷(10:2:1)溶液,吹入氮气,塞紧试管塞后 80 °C 水浴反应 30 min。氮气吹干,残渣用 3.0 mL 的正己烷溶出,0.45 μm 的微孔滤膜过滤,得单糖 TMS 衍生化产物,备用^[8,9]。

2.3.2 GC-MS 分析条件

TG-5 熔融石英毛细管柱 (30 × 0.25 mm, 膜厚度为 0.25 μm); GC 条件: 进样口温度 250 °C, 载气为氦气, 载气流速 1.0 mL/min。柱起始温度 125 °C, 以 1.5 °C/min 升至 155 °C, 再以 0.9 °C/min 升至 171 °C, 再以 9 °C/min 升至 180 °C, 分流进样, 分流比为 20:1, 进样量为 1.0 μL; MS 条件: 电子电离离子源 (EI), 漂移管和离子源温度分别为 250 °C 和 280 °C, 质量扫描范围为 50 ~ 350 amu^[19]。

3 结果与分析

3.1 多糖含量测定结果

在本实验条件下测得组培太子参和野生太子参多糖含量分别为 19.05 ± 1.38%、22.63 ± 2.18%。野生太子参多糖含量略高于组培太子参多糖含量。

3.2 太子参多糖单糖组成 GC-MS 分析结果

TFA (三氟乙酸) 法是多糖的柱前衍生化-GC-MS 分析常用方法, 然而, TFA 衍生化很难获得稳定的果糖衍生化产物。TMS 柱前衍生化法, 虽然产物中异构体较多, 增加了多糖酸解产生的单糖衍生化产物的种类, 提高了 GC-MS 分离难度, 但可以制备稳定的果糖衍生化产物。而太子参中含有果糖, 因此, 实验采用 TMS 衍生化。

3.2.1 多糖的单糖组成鉴定结果

3.2.1.1 标准单糖 GC-MS 分析图谱

实验通过与标准单糖保留时间对比和质谱对比来鉴定太子参多糖中的单糖组成。实验采取的七种单糖经 TMS 衍生化的 GC-MS 分析结果如图 1 所示:

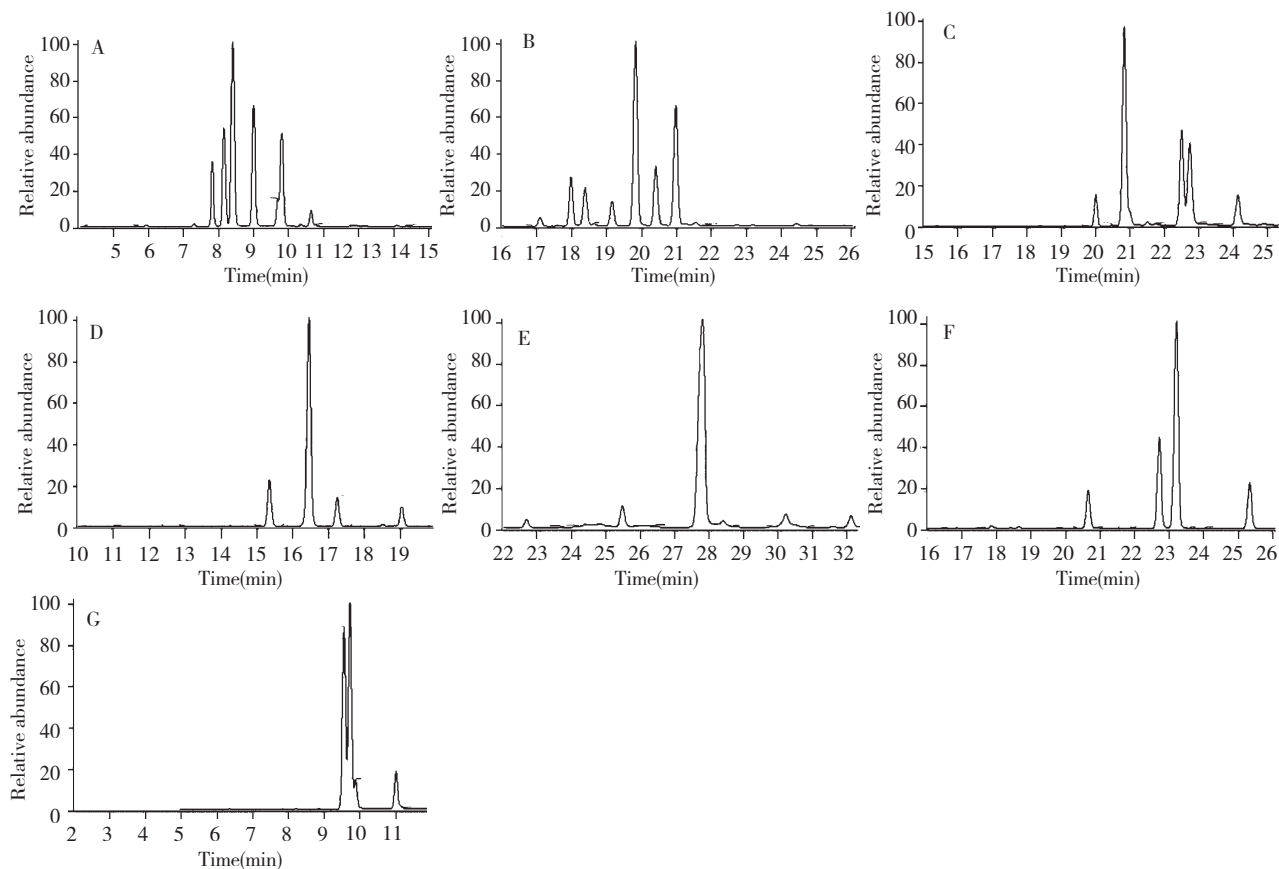


图 1 阿拉伯糖 (A)、半乳糖 (B)、半乳糖醛酸 (C)、甘露糖 (D)、果糖 (E)、葡萄糖 (F) 及鼠李糖 (G) 标准品的 GC-MS 总离子流图

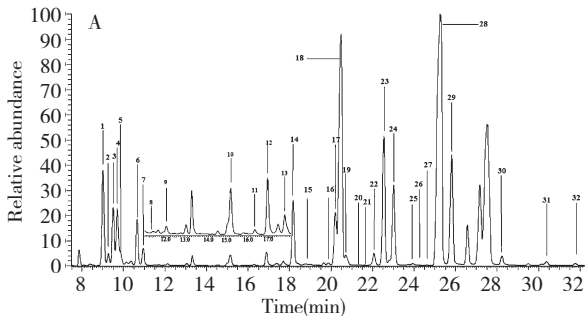
Fig. 1 GC-MS total ion chromatograms of pectinose (A), galactose (B), galacturonic acid (C), mannitose (D), fructose (E), glucose (F) and rhamnose (G) standards

经过 TMS 衍生化, 每种标准单糖都会生成几个异构体, 但每种标准单糖可以生成的单糖衍生物种

类不同, 在本实验构建的 GC-MS 条件下, 每种标准单糖经过 TMS 衍生化产物具有稳定、互不重叠、特

异的 GC-MS 糖谱(图 1)。

3.2.1.2 不同种源太子参多糖单糖的 GC-MS 分析图谱



不同种源太子参多糖单糖 TMS 衍生化产物的 GC-MS 分析结果如图 2 所示:

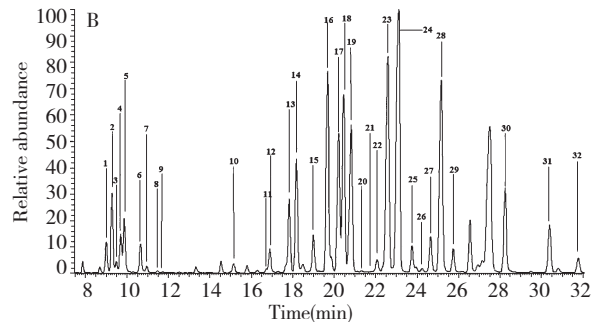


图 2 组培(A)及野生(B)太子参多糖的单糖 TMS 衍生化产物的 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 GC-MS total ion chromatograms of tissue-cultured (A) and wild (B) *P. heterophylla*

通过对比标准单糖 TMS 衍生化产物标准图谱(图 1)及太子参多糖单糖 TMS 衍生化产物的 GC-MS 图谱(图 2)可以判定:太子参多糖 GC-MS 图谱中编号 1、2、5、6、8 的色谱峰为阿拉伯糖 TMS 衍生化产物峰,色谱峰 3、4、7、9 为鼠李糖产物峰,色谱峰 10、11、12、15 为甘露糖产物峰,色谱峰 13、14、16、17 为半乳糖产物峰,色谱峰 18、24、25、28 为葡萄糖产物峰,色谱峰 19、20、21、22、26、27、31 为半乳糖醛酸产物峰,色谱峰 23、29、30、32 为果糖产物峰。不同种源太子参多糖均为阿拉伯糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、半乳糖醛酸和果糖组成的杂多糖,表明不同种源太子参之间多糖结构具有一定的稳定性。

3.2.2 太子参多糖的单糖含量的半定量测定结果

在本实验中,标准单糖仅用作定性,测定糖谱。因为 TMS 衍生化后生成了各种异构体,很难找到标准对照品。在 GC-MS 分析中,当标准品缺乏时,采用峰面积作为衡量质量的一个参考依据(半定量)。参考相关文献报道^[10-12],采用半定量法对不同种源太子参多糖中单糖的含量进行测定,结果见表 1。可见,种源对太子参多糖中单糖的含量比例有显著影响,其中葡萄糖、果糖、阿拉伯糖和鼠李糖在组培太子参多糖中含量达 90.43%,是组培太子参多糖的主要单糖。葡萄糖、半乳糖、果糖和半乳糖醛酸在野生太子参多糖中含量达 88.09%,是野生太子参多糖的主要单糖。

表 1 不同种源太子参多糖中单糖的组成及其单糖含量(%)

Table 1 The composition and contents of monosaccharides in the polysaccharides from different origins of *P. heterophylla* (%)

	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose	甘露糖 Mannose	半乳糖 Galactose	半乳糖醛酸 Galacturonic acid	阿拉伯糖 Arabinose	鼠李糖 Rhamnose
组培太子参 Tissue-cultured <i>P. heterophylla</i>	57.21	16.76	1.57	6.67	1.43	9.43	7.03
野生太子参 Wild <i>P. heterophylla</i>	36.05	17.01	2.93	23.78	11.25	7.39	1.59

4 结论与讨论

野生太子参多糖含量高于组培太子,如以多糖含量为标准,野生太子品质更佳;不同种源的太子参多糖均由葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、半乳糖醛酸、阿拉伯糖、鼠李糖七种单糖组成,但单糖的比例明显不同,在组培太子参多糖中,葡萄糖含量达 57.21%,而在野生太子参中,葡萄糖含量为

36.05%;野生太子参多糖中半乳糖醛酸含量约为组培太子参多糖中半乳糖醛酸的 8 倍,提示不同种源的太子参多糖结构可能存在不同,这种变化是否会影响到组培太子参和野生太子参药理活性的相似性(药效提高还是下降),尚待进一步的药理学研究。

参考文献

1 Liu XH (刘训红), Kan YM (阚毓铭). Research progress

- of *Radix Pseudostellariae*. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11:1131-1132.
- 2 Yan CG(晏春耕). The research and application of medicinal plants of *Radix Pseudostellariae*. *Res Prac Mod Chin Med* (现代中药研究与实践), 2008, 22(2):61-65.
 - 3 Yang CG(杨昌贵), Jiang WK(江维克), Zhou T(周涛), et al. Comparative analysis of polysaccharide and amino acid content in different provenances of *Pseudostellaria heterophylla* from Guizhou province. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2014, 16(1):32-38.
 - 4 Zhu Y(朱艳), Qin MJ(秦民坚), Hang YY(杭悦宇), et al. RAPD analysis on *Pseudostellaria heterophylla* from different provenances. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 2007, 16(3):19-22.
 - 5 Yang SP(杨树平), Wen AP(温爱平), Wu DM(吴冬梅), et al. Extraction and determination of polysaccharide in sunflower pith. *Chin J Tradit Chin Med* (中国中药杂志), 2003, 28:887-888.
 - 6 Li JH(李金花), Nong SS(农石生), Wei LP(韦柳培), et al. Extraction and content determination of polysaccharide from mango leaves. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2012, 33:135-137.
 - 7 Wang DC(王德才), Li TD(李同德), Gao LJ(高丽君). Determination of *Radix Angelicae dahurica* polysaccharides extraction and content. *China Tradit Chin Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2008, 15:283-284.
 - 8 Doco T, O'Neill MA, Pellerin P. Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives. *Carbohydr Polym*, 2001, 46:249-259.
 - 9 Zenaida G, Olga M, Álvaro G, et al. Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size exclusion chromatography. *Food Chem*, 2012, 131:367-374.
 - 10 Socaci SA, Socaci C, Tofană M, et al. In-tube Extraction and GC-MS analysis of volatile components from wild and cultivated sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Carpatica*) berry varieties and juice. *Phytochem Anal*, 2013, 24:319-328.
 - 11 Tan HS, Hu, DD, Song JZ, et al. Distinguishing *Radix Angelica sinensis* from different regions by HS- SFME/GC-MS. *Food Chem*, 2015, 186:200-206.
 - 12 Wang YM, Yi LZ, Liang YZ, et al. Comparative analysis of essential oil components in *Pericarpium Citri Reticulatae* Viride and *Pericarpium Citri Reticulatae* by GC-MS combined with chemometric resolution method. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46:66-74.

(上接第 590 页)

- 10 Guo LW(郭立玮), Li LJ(李玲娟), Dong J(董洁). Study on membrane separation process of Chinese medicine's water extraction based on the method of computer chemistry. *Membr Sci Technol* (膜科学与技术), 2011, 31:196-204.
- 11 Wei SC(魏舒畅), Chen FY(陈方圆), Yan ZP(闫治攀), et al. Optimization of technological conditions for enzymatic extraction of total polysaccharide and saponin from *Radix Hedysari* by quadratic general rotary unitized design. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2014, 36:286-290.
- 12 Madaeni SS, Fane AG, Wiley DE. Factors influencing critical flux in membrane filtration of activated sludge. *J Chem Technol Biotechnol*, 1999, 74:539-543.
- 13 Neal PR, Li H, Fane AG, et al. The effect of filament orientation on critical flux and particle deposition in spacer filled channels. *J Membr Sci*, 2003, 214:165-178.
- 14 Robert HN. Theory of the back propagation neural network. *Int Joint Conference on Neural Networks*, 1989:593-605.
- 15 Moody JO, Antsaklis PJ. The dependence identification neural network construction algorithm. *IEEE Trans Neural Netw*, 1996, 7:3-15.
- 16 Yao LZ(姚立忠), Li TF(李太福), Yi J(易军), et al. Visualize black-box of NN model and its application in dimensionality reduction. *Comput Sci* (计算机科学), 2012, 39:247-251.
- 17 Bao XH(包旭宏), Wang JL(王继龙), Wei SC(魏舒畅), et al. Enzymatic extraction process of calycosin glucoside and pormononetin in *Astragali Radix* with quadratic general rotary unitized design. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45:2641-2646.
- 18 Tang JP(汤建萍), Zhou CS(周春山), Ding LW(丁立稳). Extraction and purification of amino acids in litchi pit by enzyme-membrane method. *Fine Chemicals* (精细化工), 2006, 23:1211-1215.
- 19 Li ZW(李振武), Zhang XL(张效林), Zhang WH(张卫红), et al. Comprehensive extraction process of active constituents in tea. *Chin J Chem Eng* (化学工程), 2006, 34:46-50.
- 20 Liu JH(刘军海). Research on extraction of tea polysaccharide by ultrafiltration. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2007, 28:124-129.