

气相色谱法测定新疆桑枝多糖中单糖组成及含量

孙莲, 孟磊, 阿布都许库尔·吐尔逊 (新疆医科大学药学院化学教研室, 新疆乌鲁木齐 830054)

摘要 [目的] 建立测定桑枝多糖中单糖的组成及含量的方法。[方法] 水提醇沉法提取桑枝多糖, CF_3COOH 水解多糖, 水解产物用盐酸羟胺、吡啶和醋酸酐衍生化, 生成糖腈乙酸酯衍生物, 气相色谱法测定桑枝多糖的单糖组成及含量。[结果] 新疆桑枝多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖等组成, 含量分别为鼠李糖(11.8 mg/ml)、阿拉伯糖(14.4 mg/ml)、木糖(1.6 mg/ml)、甘露糖(1.9 mg/ml)、葡萄糖(22.3 mg/ml)及半乳糖(28.0 mg/ml)。[结论] 该方法简便、灵敏、准确可靠, 可用于桑枝多糖中单糖的组成及含量测定。

关键词 桑枝; 多糖; 气相色谱法

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)19-06207-02

Determination of the Components and Contents of monosaccharides in Polysaccharide of Ramulus Mori from Xinjian by Gas Chromatography

SUN Lian et al (College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054)

Abstract [Objective] To establish a method for determining components and contents of monosaccharides in polysaccharides of Ramulus Mori. [Method] The polysaccharide was extracted by water and precipitated by alcohol, the polysaccharide was hydrolyzed by CF_3COOH . Hydrolyzate was derivatized with hydroxylamine hydrochloride, pyridine and acetic anhydride and sugar nitrile acetate derivatives were produced. The composition and content of monosaccharide of polysaccharides of Ramulus Mori were determined by GC. [Result] The polysaccharides of Ramulus Mori were composed of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose, galactose. The contents were rhamnose (11.8 mg/ml), arabinose (14.4 mg/ml), xylose (1.6 mg/ml), mannose (1.9 mg/ml), glucose (22.3 mg/ml) and galactose (28.0 mg/ml) respectively. [Conclusion] The method is simple, sensitive and accurate. It can be used to determine the contents and components of monosaccharides in polysaccharide of Ramulus Mori.

Key words Ramulus Mori; Polysaccharide; GC

桑枝(RAMULUS MORI)是桑科桑属植物桑(*Morus alba* L.)的一年生干燥嫩枝, 是中医常用的传统药材, 具有祛风活络、通利关节和燥湿利水之功效^[1]。桑枝中的主要功效成分为多糖、黄酮类和生物碱类。现代药理研究证明, 桑枝多糖具有抗炎、抗氧化、抗衰老、防癌、抗溃疡、解痉、抗菌、提高机体免疫功能以及降糖降脂等多种功能^[2-8]。测定桑枝多糖中单糖的组成及含量对桑枝的开发利用及药效学研究十分必要。笔者利用气相色谱法对桑枝多糖的组成及含量进行测定^[10], 以期对新疆桑枝的质量控制和开发利用提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。桑枝, 采自新疆喀什, 经新疆医科大学药学院天然药物教研室帕丽达·阿不力孜教授鉴定为桑的干燥嫩枝。

1.1.2 主要仪器。GC-2010 Plus 氢火焰离子化检测器, 购自岛津公司。

1.1.3 主要试剂。鼠李糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖, 均为生化试剂, 购自成都科龙化工试剂厂; CF_3COOH 、醋酸酐、盐酸羟胺、吡啶和氯仿均为分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件。色谱柱为 RTX-WAX 毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 检测器为 FID; 程序升温为 155 °C(保持 1 min), 以 0.4 °C/min 升至 160 °C(保持 2 min), 再以 0.5 °C/min 升至 169 °C, 以 0.2 °C/min 的升温速率升高到 172

°C; 进样温度为 235 °C; 检测器温度为 280 °C; 分流比 10:1, 载气为高纯 N_2 , 进样量 10.0 μl。

1.2.2 桑枝多糖的提取。称干燥至恒重并过 60 目筛的桑枝粉 100.00 g, 加适量的水, 95 °C 时超声提取 30 min, 过滤, 滤渣再提取 30 min, 合并滤液, 将滤液浓缩至 100 ml, 加浓度 95% 乙醇至含醇量达 85%, 4 °C 时静置过夜, 离心分离, 得粗多糖。于上述粗多糖溶液中加入 2% 木瓜蛋白酶, 60 °C 时酶解 2 h, 再用 Sevag 法(氯仿: 正丁醇 = 4:1)除蛋白 12 次; H_2O_2 脱色, 醇沉并离心分离; 沉淀物自然干燥, 得淡黄色的桑枝多糖。

1.2.3 标准单糖的衍生化。精密称取鼠李糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖标准单糖各 10.0 mg 于具塞试管中, 加入 10.0 mg 的盐酸羟胺及 0.5 ml 的吡啶, 混匀后封管, 于 95 °C 水浴中反应 30 min, 取出冷至室温, 再于其中加乙酰酐 0.5 ml, 摇匀后封管, 于 95 °C 水浴中反应 30 min, 待乙酰化反应完成后, 70 °C 水浴中用 N_2 将产物吹干, 用氯仿 5.0 ml 溶解残渣, 进样 1.0 μl。

1.2.4 桑枝多糖的水解和衍生化。精密称取桑枝多糖 10.0 mg 于具塞试管中, 加入 4.0 mol/L CF_3COOH 1.0 ml, 摇匀, 110 °C 水浴中水解 12 h, 于 70 °C 水浴用 N_2 将产物吹干, 按“1.2.3”项下标准单糖衍生化的方法将水解产物衍生化, 进样 1.0 μl。

1.2.5 方法学考察。(1) 系统性试验。取适量对照品溶液和供试品溶液, 在上述色谱条件下进样, 考察系统适应性。(2) 线性关系的考察。分别精密吸取衍生化后的单糖标准溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 ml 于 6 个 10 ml 的容量瓶中, 用氯仿稀释至刻度, 配成一系列质量浓度不同的混合标准

基金项目 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2013211A055)。

作者简介 孙莲(1961-), 女, 江苏南京人, 教授, 硕士, 从事药物成分分析研究。

收稿日期 2014-05-28

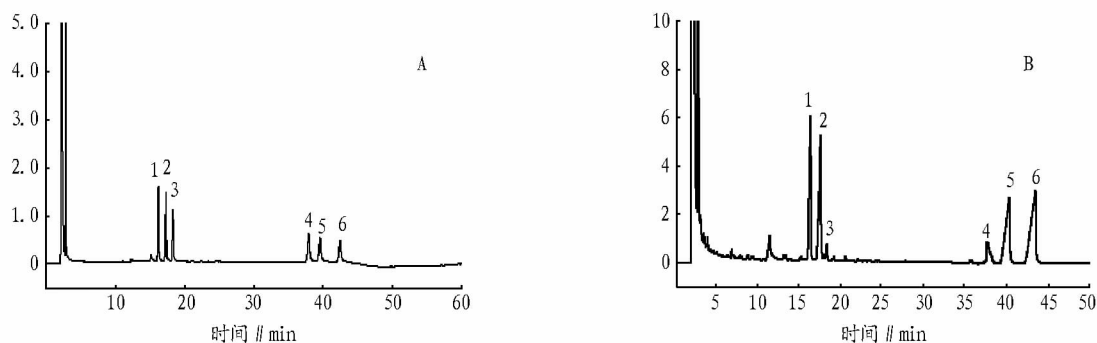
液,进样,记录峰面积,以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,计算各个单糖的标准曲线、线性范围、相关系数。(3)精密度试验。取同一混合标准品溶液,连续进样6次,测得峰面积,计算各单糖峰面积的 RSD 。(4)稳定性试验。吸取同一供试品溶液,在0、2、4、8、12 h各进样1次,记录峰面积,计算各单糖含量的 RSD 。(5)重复性试验。取6份桑枝多糖,按“1.2.4”项下水解和衍生化多糖,测得其中各单糖含量的 RSD 。(6)加样回收试验。取9份桑枝多糖,3份留为本底,在其他的6份中加入一定量的各标准单糖,按“1.2.4”项下水解和衍生化多糖,测定峰面积,带入标准曲线计算回收率,各单糖的平均回收率和 $RSD(n=6)$ 。

1.2.6 桑枝多糖中单糖的含量测定。根据保留时间及加标峰增高法,可确定新疆桑枝多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成。将“1.2.4”项下制备的桑枝供试品溶液进样10.0 μl ,测定其中各单糖的峰面积,由各单糖的标准曲线计算出桑枝多糖中单糖的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察 (1)系统性试验。图1表明,对照品溶液

和供试品溶液图谱在相同时间上有对应的吸收峰,各峰间分离度良好,彼此无干扰,表明系统适应性良好。(2)线性关系的考察。由表1可知,在各自范围内,各单糖浓度与峰面积的线性关系良好。(3)精密度试验。计算得各单糖峰面积的 RSD 分别为鼠李糖(1.2%)、阿拉伯糖(0.97%)、木糖(1.9%)、甘露糖(0.97%)、葡萄糖(2.4%)和半乳糖(1.1%),表明精密度良好。(4)稳定性试验。计算得各单糖含量的 RSD 分别为鼠李糖(1.2%)、阿拉伯糖(1.5%)、木糖(0.89%)、甘露糖(2.1%)、葡萄糖(1.2%)、半乳糖(2.9%),表明供试品溶液在12 h内稳定。(5)重复性试验。计算得各单糖含量的 RSD 分别为鼠李糖(1.2%)、阿拉伯糖(1.3%)、木糖(2.1%)、甘露糖(1.3%)、葡萄糖(1.7%)和半乳糖(2.8%),表明该方法重复性良好。(6)加样回收试验。计算得各单糖的平均回收率($n=6$)(RSD)分别为鼠李糖101.3%(1.4%)、阿拉伯糖104.5%(1.1%)、木糖97.6%(2.9%)、甘露糖97.2%(2.1%)、葡萄糖101.5%(1.2%)及半乳糖103.3%(1.5%),表明该方法准确,可靠,可用于桑枝多糖中单糖的组成及含量测定。



注:A为混合对照品(standard);B为样品(sample)。1为鼠李糖(Rhamnose);2为阿拉伯糖(Arabinose);3为木糖(Xylose);4为甘露糖(Mannose);5为葡萄糖(Glucose);6为半乳糖(Galactose)。

图1 GC图谱

表1 各单糖的回归曲线、线性范围、相关系数

单糖	回归曲线	线性范围//mg/ml	相关系数 R
鼠李糖	$Y=35\ 284X-10\ 845$	0.02~0.12	0.999 2
阿拉伯糖	$Y=21\ 948X-13\ 126$	0.02~0.12	0.999 6
木糖	$Y=30\ 734X-12\ 691$	0.02~0.12	0.999 3
甘露糖	$Y=25\ 785X-11\ 420$	0.02~0.12	0.999 4
葡萄糖	$Y=28\ 583X-12\ 235$	0.02~0.12	0.998 9
半乳糖	$Y=31\ 673X-10\ 567$	0.02~0.12	0.999 8

2.2 桑枝多糖中单糖的含量测定结果 根据保留时间及加标峰增高法,可确定新疆桑枝多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成。由各单糖的标准曲线计算出桑枝多糖中单糖的含量分别为鼠李糖(11.8 mg/ml);阿拉伯糖(14.4 mg/ml);木糖(1.6mg/ml);甘露糖(1.9 mg/ml);葡萄糖(22.3 mg/ml);半乳糖(28.0 mg/ml)。

3 结论与讨论

试验以浓度为4.0 mol/L的 H_2SO_4 、 CCl_3COOH 、 CF_3COOH 为水解液,以水解产物中的葡萄糖峰面积为参考指标,发现 CF_3COOH 为水解液时,水解效果最好。同时,考

察了不同浓度的 CF_3COOH (1.0、2.0、4.0、6.0 mol/L)水解桑枝多糖12 h,结果表明,4.0 mol/L CF_3COOH 水解桑枝多糖,葡萄糖峰面积最大,多糖水解的较彻底。以4.0 mol/L CF_3COOH 为水解液水解桑枝多糖2、4、6、8、10、12及24 h,结果发现水解2、4、6、8、10、12及24 h时,葡萄糖的峰面积分别为156 234、225 431、294 675、358 921、436 533、455 346及459 838,由此可见,水解12 h与24 h时,无多大区别,故试验选择4.0 mol/L的 CF_3COOH 水解桑枝多糖12 h。

试验以水提醇沉法提取桑枝多糖, CF_3COOH 水解多糖,水解产物用盐酸羟胺、吡啶和醋酸酐衍生化,生成糖腈乙酸酯衍生物,气相色谱法测定桑枝多糖的单糖组成及含量。结果表明,该方法简便、灵敏、准确可靠,可用于桑枝多糖中单糖的组成及含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:280.
- [2] 孙莲,严寒信,姑再努尔·阿布力孜. 新疆桑枝 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 新疆医科大学学报,2014,19(36):2830-2832.

差异显著性检验,试验数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 日粮中添加微生态制剂对小尾寒羊增重的影响 由表2可知,在初始体重无显著差异的情况下,经过90 d育肥,试验组和对照组期末体重出现差异。试验组和对照组期末体重分别为 (43.57 ± 4.05) 和 (39.46 ± 3.19) kg,试验期内试验组和对照组平均增重分别为 18.86 和 16.09 kg,试验组增重比对照组提高 17.22%,2组差异显著 ($P < 0.05$),平均日增重分别为 209.56 和 178.78 g。试验组和对照组料肉比分别

为 6.06 和 6.99。日粮中添加微生态制剂后,小尾寒羊羔羊日增重提高,料肉比降低,表明在日粮中添加微生态制剂可以增加小尾寒羊对饲料的利用效率,提高小尾寒羊的育肥性能。

2.2 日粮中添加微生态制剂对小尾寒羊体尺指标的影响 从表3可以看出,试验组公、母羊体高、体长、胸围和十字部高均比对照组略高,但差异不显著,尤其是与体重密切相关的体长和胸深均有不同程度增加,表明日粮中添加微生态制剂对小尾寒羊体尺虽然没有显著影响,但有促进小尾寒羊生长发育的趋势。

表2 微生态制剂对小尾寒羊增重的影响

组别	始重//kg	末重//kg	增重//kg	日增重//g	料肉比
对照组	23.37 ± 2.26	39.46 ± 3.19	16.09	178.78	6.99
试验组	23.71 ± 2.19	43.57 ± 4.05	18.86	209.56	6.06

表3 微生态制剂对小尾寒羊体尺指标的影响

组别	体高	体长	胸围	十字部高	胸深
对照组	70.39 ± 2.65	70.12 ± 2.54	80.66 ± 4.05	73.85 ± 2.78	31.46 ± 1.12
试验组	72.06 ± 2.71	71.32 ± 3.16	82.07 ± 4.12	74.79 ± 3.25	32.76 ± 1.25

2.3 日粮中添加微生态制剂对小尾寒羊屠宰性能的影响 分别从试验组和对照组随机选出6只小尾寒羊,公母各半,屠宰后测定屠宰性能。从表4可以看出,试验组和对照组胴体重分别为 (23.7 ± 0.69) 和 (20.1 ± 0.85) kg,屠宰率分

别为 48.50% 和 47.16%;净肉重分别为 (20.35 ± 0.46) 和 (16.92 ± 0.44) kg,净肉率分别为 40.50% 和 38.25%。因此,无论屠宰率还是净肉率,试验组都高于对照组,表明日粮中添加微生态制剂能够提高小尾寒羊的屠宰性能。

表4 微生态制剂对小尾寒羊屠宰性能的影响

组别	体重//kg	胴体重//kg	净肉重//kg	屠宰率//%	净肉率//%
对照组	39.58 ± 1.57	20.1 ± 0.85	16.92 ± 0.44	47.16	38.25
试验组	43.88 ± 1.64	23.7 ± 0.69	20.35 ± 0.46	48.50	40.50

3 讨论

该试验研究表明在日粮中添加微生态制剂能够促进育肥羊生长发育,显著提高羔羊的育肥性能和屠宰性能,提高养殖效益,这与高飞^[2]的研究结果相一致。

研究表明,在消化道内微生态制剂中芽孢杆菌、酵母菌等能够消耗氧气,为瘤胃微生物发酵提供厌氧环境,同时微生态制剂代谢产生大量的维生素和氨基酸等,能够促进纤维素分解菌等微生物的生长,可以提高日粮中干物质的表观消化率,提高养分利用效率,促进蛋白质和脂肪的合成,从而提高动物的生产性能^[4]。在消化道内,微生态制剂中的菌类通过优势种群作用、生物夺氧作用、生物拮抗作用和分泌抗菌

物质等作用,提高机体抗病能力和免疫力,维护肠道的健康,提高肠道的消化吸收功能,从而提高饲料的消化吸收率^[5]。

参考文献

- [1] 王金文. 小尾寒羊种质特性与利用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2010:21-29.
- [2] 高飞. 微生态制剂饲料饲喂肉羊效果研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(10):131-133.
- [3] 赵有璋. 羊生产学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003:70-87.
- [4] 张志焱, 张建梅, 刘红莲, 等. 复合微生态制剂对育肥羔羊生长性能、养分表观消化率及血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(1):113-115.
- [5] 吴家泉, 刘爱君. 微生态制剂对肉羊生产性能和肉品质的影响[J]. 中国饲料添加剂, 2012(2):27-29.
- [6] 李明月, 牟英, 李善福, 等. 桑枝95%乙醇提取物抗炎作用的实验研究[J]. 山西中医学院学报, 2003, 4(2):13-14.
- [7] 耿鹏, 朱元元, 杨洋, 等. 桑枝生物碱与儿茶素的降血糖作用[J]. 中草药, 2007, 38(8):1228-1230.
- [8] 马永雷, 张雨青, 周丽霞. 桑枝皮醇提物的抗氧化和对 α -糖苷酶活性的抑制作用[J]. 蚕业科学, 2010, 36(1):143-146.
- [9] 李琳, 刘先明, 马永雷, 等. 从桑枝皮醇提物萃取的不同组分及其体外生物活性[J]. 蚕业科学, 2010, 36(4):680-686.
- [10] 李孟璇, 管福琴, 孙摇视, 等. 桑枝中苯并呋喃类化合物结构鉴定及抗肿瘤性的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 12(12):3343-3344.
- [11] 洪德志, 时连根. 桑枝多糖对糖尿病模型小鼠的降血糖作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(6):806-809.
- [12] 费建明, 赵丽华, 占鹏飞, 等. 桑枝皮多糖对小鼠的免疫调节试验[J]. 蚕业科学, 2009, 35(4):907-912.
- [13] 吴韶辉, 蔡妙珍, 李似姣, 等. 柱前衍生化气相色谱法分析豌豆根尖粘液中的多糖[J]. 分析化学, 2009, 37(3):429-432.

(上接第6208页)