

白及须根与块茎的多糖成分比较研究*

俞杭苏, 史珍珍, 吕迪, 潘平, 钱朝东, 陈建真, 丁志山[△]

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 比较白及须根与块茎中多糖的含量及组成。方法 采用水提醇沉法提取须根、块茎中的多糖成分;苯酚-浓硫酸法测定须根与块茎的总糖含量;DNS 测定须根与块茎中还原糖含量;运用 GC-MS 分析白及须根与块茎中多糖的单糖组分。结果 白及须根总糖含量低于块茎中含量,在总糖中还原性糖含量高于块茎;白及须根与块茎中的多糖中都含有葡萄糖和甘露糖,但须根中还含有半乳糖。结论 白及须根和块茎中总糖、还原糖、单糖成分有差异,白及须根中总糖含量没有块茎中高,但具有一定的潜在药用价值,值得进一步开发研究。

关键词: 白及;须根;块茎;多糖

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)02-0029-04

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reiehb.f. 的干燥块茎。其性味苦、甘、涩,微寒,归肺、肝、胃经。其功能与主治为收敛止血,消肿生肌。用于咯血,外伤出血,疮疡肿毒^[1]。主产于贵州、四川、云南浙江等省,以贵州产量最多,质量亦好^[2]。白及,《本经》主痈肿恶疮败疽,伤阴死肌,外疡消肿生肌之要药也。主胃中邪气者,能除胃热耳^[3]。现代科学研究表明^[4-8],白及的药理作用与其所含多糖有关,块茎多糖方面的研究有文献报道,而须根多糖未见报道。为了进一步了解白及须根的价值,缓解市场供需矛盾,充分利用白及资源,本文将对白及须根和块茎多糖含量、还原糖含量、单糖组分做一研究。

1 材料

1.1 器材

电子精密天平(型号:AR2130,Chaus Corp.Pine Brook,NJ,USA);电热恒温鼓风干燥箱(型号:DGG-9070A,上海森信实验仪器有限公司);自动平衡离心机(型号:LDZ5-2,北京医用离心机厂);旋转蒸发器(型号:R-201,上海申顺生物科技有限公司);真空干燥箱(型号:DZG-6050,上海森信实验仪器有限公司);可见分光光度计(型号:WFJ 2000,尤尼柯(上海)仪器有限公司);微量取样器;石英比色皿;安捷伦气质联用仪(Agilent Technologies 7890A 气

相色谱仪,5975C inert MSD 质谱仪)。

1.2 试剂

氯化钠(AR,上海试剂四赫维化工有限公司);苯酚(AR,上海试剂四赫维化工有限公司);浓硫酸(AR,衢州巨化试剂有限公司);3,5-二硝基水杨酸(CP,国药集团化学试剂有限公司);偏重亚硫酸钠(AR,上海化学试剂四厂);酒石酸钾钠(AR,金山县兴塔化工厂);三氟乙酸(AR,赛默飞世尔科技有限公司);醋酸酐(AR,衢州巨化试剂有限公司);冰醋酸(AR,衢州巨化试剂有限公司);甲醇(AR,衢州巨化试剂有限公司);硼氢化钠(AR,国药集团化学试剂有限公司);甲苯(AR,天津市永大化学试剂有限公司);甘露糖、葡萄糖、半乳糖(国药集团化学试剂有限公司);蒸馏水(实验室自制)。

白及药材购于江山宝珠农业有限公司,经浙江中医药大学丁志山教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reiehb.f. 的干燥体。

1.3 实验主要试剂配制

1.3.1 DNS 试剂的配制

称取 3,5-二硝基水杨酸 630mg、NaOH 2.1g,溶于 50mL 蒸馏水中。加入酒石酸钾钠 18.2g,苯酚 500mg,偏重亚硫酸钠 500mg,定容于 100mL。盛于棕色瓶中。

* 基金项目:浙江省新苗人才计划(2012R410038);2013 年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201310344004)

收稿日期:2014-12-11

作者简介:俞杭苏(1990-),女,浙江新昌人,在读硕士研究生,研究方向:中药活性成分研究及新药开发。

[△]通信作者:丁志山,E-mail:zjtcmdzs@sohu.com

2 实验方法

2.1 多糖制备

称取白及须根和块茎粉末各 10g,以 1:50 的比例加入蒸馏水回流提取两次,每次 1.5h,用 4 层纱布过滤 2 次,合并 2 次滤液,纱布水洗,并将水洗液并入滤液。向滤液中缓慢加入 95%乙醇,边加边搅拌至溶液乙醇终浓度为 80%,4℃静置过夜。次日离心取沉淀备用,上清液置旋转蒸发器上回收乙醇。上述醇沉得到的初提物按文献^[9],用 Sevag 法除去蛋白,蒸干,称量备用。

2.2 硫酸苯酚法测定总糖含量^[10]

2.2.1 标准曲线的制备

精密称取甘露糖、葡萄糖适量配成 0.2mg/mL 甘露糖和葡萄糖 (w/w 为 4:1) 溶液。分别取 40, 80, 160, 280, 320 μ L 甘露糖葡萄糖溶液,分别加入 360, 320, 240, 120, 80 μ L 蒸馏水混匀,再向各组中加入 200 μ L 6%的苯酚溶液(w/w)混匀,再向各组中加入 1mL 的浓硫酸混匀反应 15min 后以 400 μ L 蒸馏水反应做空白对照,在 490nm 处测定吸光度,记录结果,绘制标准曲线。

2.2.2 样品中总糖含量测定

精密称取上述干燥须根、块茎初提物适量配成浓度为 0.5, 0.25mg/mL 的样品溶液,然后取 120 μ L 样品溶液,加 280 μ L 蒸馏水混匀,然后一次加 200 μ L 6%苯酚、1mL 浓硫酸混匀,反应 15min,平行 3 组,空白组加 400 μ L 蒸馏水,200 μ L 苯酚,1mL 浓硫酸。在 490nm 波长测定吸光度记录结果。

2.3 DNS 法测还原糖^[11]

2.3.1 标准曲线的制备

精密称取葡萄糖标准品适量配成浓度为 1mg/mL。分别取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6mL 葡萄糖标准品,分别加 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4mL 蒸馏水混匀,再分别向各组加入 0.75mL DNS 溶液混匀,100℃水浴 5min 后定容至 10mL 后以 1mL 蒸馏水反应做空白对照在 540nm 处测定吸光度,记录结果,绘制标准曲线。

2.3.2 样品中还原性糖含量测定

精密称取上述真空干燥须根、块茎粗提物适量配成样品浓度为 5, 10mg/mL 的样品溶液,然后分别取 1, 0.9mL (加 0.1mL 蒸馏水)样品溶液,加 DNS 试剂 0.75mL,平行 3 组,空白组加 1mL 水,0.75mL DNS 试剂,沸水浴 5min,然后定容至 10mL。在

540nm 处测吸光度,记录结果。

2.4 GC-MS 分析多糖成分^[12]

2.4.1 样品乙酰化处理

分别称取白及须根、块茎粗提物样品各 2mg,加入旋蒸瓶中,加 2mol/L 的三氟乙酸(TFA)4mL,在 110℃封管水解 2h;将水解液低于 40℃减压蒸干,然后加入 3mL 甲醇蒸干;重复上述操作 4~5 次,以完全除去 TFA;然后溶于 3mL 蒸馏水中,加 20~30mg 硼氢化钠(NaBH_4),于室温下间歇振荡还原 3h;用冰醋酸中和过量的 NaBH_4 ,至溶液不再产生气泡为止,pH 在 4~5 之间,加入 3mL 甲醇,减压浓缩蒸干,重复 4~5 次,以除去反应副产物硼酸及水分;置于真空干燥器中过夜;次日,110℃烘箱中加热 15min,充分除去残留水分;加入 4mL 醋酐,100℃反应 1h,冷却;加入 3mL 甲苯,减压浓缩蒸干,重复 4~5 次,以除去多余的醋酐;将乙酰化后的产物用 3mL 氯仿溶解后转移至分液漏斗,加入少量蒸馏水充分振荡后,除去上层水溶液,重复多次;氯仿层以适量的无水硫酸钠干燥,定容至 10mL,待 GC-MS 分析。

2.4.2 对照品乙酰化处理

对照品乙酰化处理同样品。

2.4.3 GC-MS 条件

UA-5 毛细管柱(30m $\times$ 0.25mm, 0.25 μ m),程序升温:柱初温 120℃,以 5℃/min 升至 200℃,再以 2℃/min 升至 215℃,最后以 20℃/min 升至 270℃,进样量为 0.2 μ L,分流比 1:30,接口温度 250℃,离子源温度 250℃,质量数扫描范围 40~500amu,扫描时间 0.28s。

3 结果与分析

3.1 苯酚-浓硫酸测定样品总糖含量

3.1.1 标准曲线的制备

根据各浓度对应的吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制出标准曲线得出标准曲线(图 1),标准品浓度在 0.01mg $\cdot$ mL⁻¹~0.045mg $\cdot$ mL⁻¹与吸光度之间

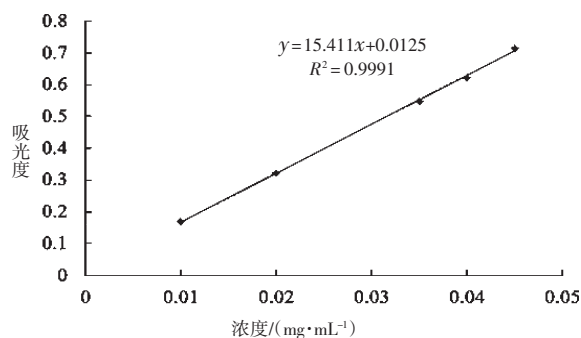


图 1 苯酚-硫酸法标准曲线

呈良好线性关系。

3.2.2 样品中总糖含量测定

根据苯酚-浓硫酸标准曲线,测得须根多糖浓度 0.022mg/mL,块茎多糖浓度 0.0194mg/mL,须根总糖占粗提物的 58.56%,块茎占 103.64%,须根和块茎干燥粉末中多糖含量分别为 (0.020 ± 0.0032) g/g、 (0.382 ± 0.0125) g/g。白及块茎中总糖含量占粗提物的 103.64%,原因是由于多糖在硫酸的作用下先水解成单糖,并迅速脱水生成糖醛衍生物,然后与苯酚生成橙黄色化合物,不同种类的多糖经反应生成橙黄色深浅不一的化合物。因此,为了使测量值与真实值能够更加接近,本实验在进行硫酸苯酚法测定总糖含量的过程中采用甘露糖:葡萄糖=3:1 的混合糖作为标准品,同时测得的结果也仅代表相对于标准品的多糖含量。

3.3 DNS 测定须根块茎中还原性糖含量

3.3.1 标准曲线的制备

根据各浓度对应的吸光度为纵坐标,浓度为横

坐标,绘制出标准曲线得出标准曲线(图 2),标准品浓度在 $0.06\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\sim0.034\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与吸光度之间呈良好线性关系。

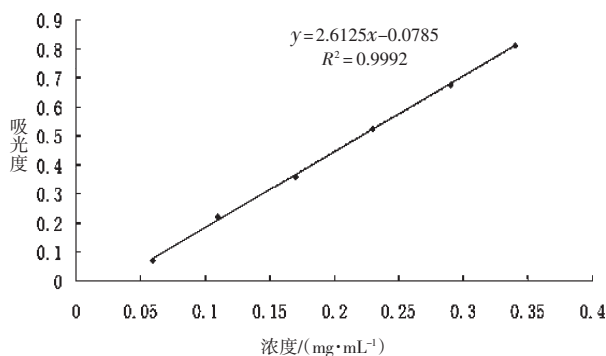


图2 DNS 法标准曲线

3.3.2 样品中还原性糖含量测定

须根和块茎多糖中还原性糖数据见表 1,DNS 测定须根还原性糖占初提物的 46.07%,块茎占 30.59%,须根和块茎干燥粉末中还原性糖含量分别为 (0.016 ± 0.0025) g/g、 (0.113 ± 0.0037) g/g。

表1 须根与块茎总糖和还原糖的含量

	须根			块茎		
	1	2	3	1	2	3
总糖吸光度	0.3493	0.3447	0.3443	0.3112	0.3204	0.3043
总糖浓度/(mg/mL)	0.0222	0.0219	0.0218	0.0194	0.02	0.0189
平均浓度/(mg/mL)		0.0220			0.0194	
总糖占粗提物/(%)		58.56			103.64	
总糖含量/(mg/g)		20±3.2			382±12.5	
还原糖吸光度	0.5077	0.535	0.5273	0.638	0.6423	0.6418
还原糖浓度/(mg/mL)	0.2244	0.2348	0.2319	0.2743	0.2759	0.2757
平均浓度/(mg/mL)		0.2304			0.2753	
还原糖占粗提物		46.07%			30.59%	
还原糖含量/(mg/g)		16±2.5			60.1±2.0	

3.4 多糖 GC-MS 分析

GC-MS 结果:图 3-4 是各个对照品单糖混合样品经乙酰化后的 GC-MS 图,结合文献^[13]和 NIST 化学数据库分析,3 个峰所对应的是六乙酰化葡萄糖醇、六乙酰化甘露糖醇和六乙酰化半乳糖醇,分别对应对照品的葡萄糖、甘露糖和半乳糖。对照品和白及样品相比较,白及须根多糖的峰 4、5、6 分别与对照品的峰 1、2、3 的保留时间一致,结合文献^[14]和 NIST 化学数据库分析,白及须根多糖中含有葡萄糖、甘露糖和半乳糖三种单糖;白及块茎多糖中峰 7、8 分别与对照品的峰 1、2 的保留时间一致,则白

及块茎多糖由葡萄糖和甘露糖组成。故白及须根多糖与白及块茎多糖所含单糖种类存在差别,即白及须根多糖比白及块茎多糖组分中多半乳糖。

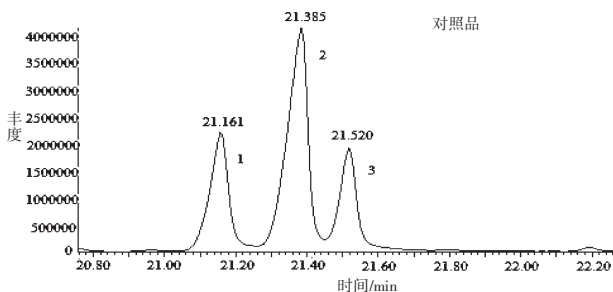


图3 乙酰化后对照品单糖混合样品的 GC 图

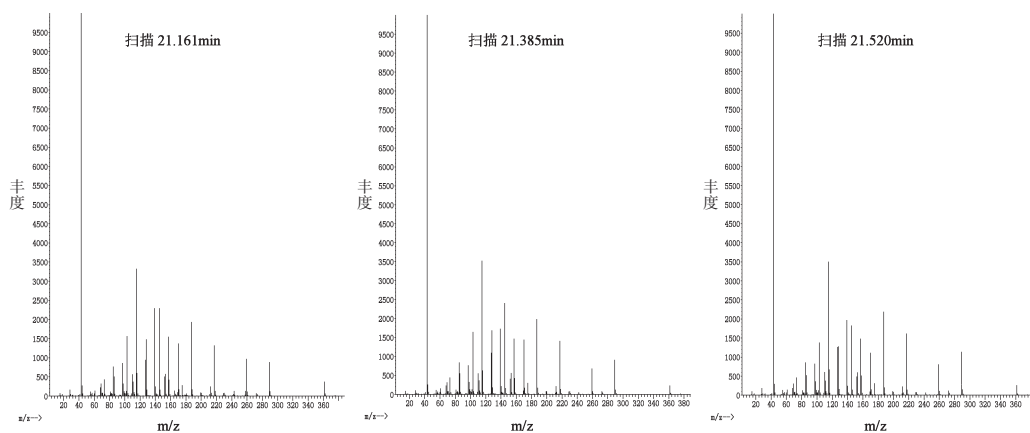


图 4 乙酰化后对照品单糖混合样品的质谱图

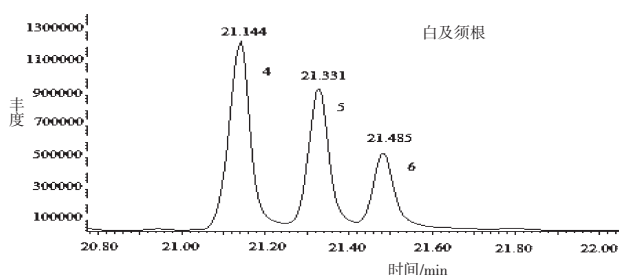


图 5 白及须根多糖乙酰化样品的 GC 图

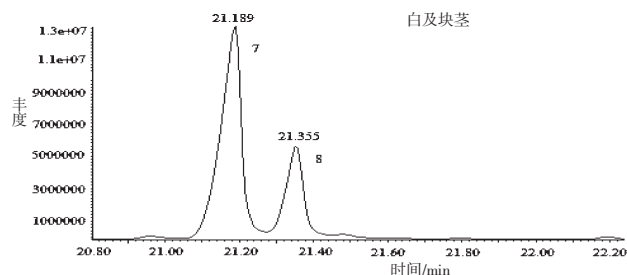


图 6 白及块茎多糖乙酰化样品的 GC 图

4 讨论

根据实验结果可知,白及块茎中多糖含量高于须根,而须根中的还原糖在多糖含量中高于块茎。有文献记载,块茎中多为非单分子或双分子的还原糖,是大分子的多糖,而须根多糖中大分子多糖的含量明显较低,因此须根中的单分子或双分子的还原糖含量较块茎高,同时,使用 GC-MS 分析须根与块茎多糖成分,须根比块茎多半乳糖。

白及多糖具有多方面的免疫活性,如促进网状内皮系统的吞噬功能^[15],增强天然杀伤性细胞的活性^[16],活化巨噬细胞^[17],诱导免疫调节因子的表达^[18]。将药物与多糖的复合物包以脂质体,可使结合的药物更易被吸收利用,并增加药物的导向性^[19]。通过对白及块茎和须根多糖比较研究可知,白及须根具有一定的潜在药用价值,值得进一步开发研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 95.
- [2] 宋立人, 洪恂, 丁绪亮, 等. 现代中药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 640-641.
- [3] 张永刚, 张竞. 白及粉治疗消化性溃疡两例例析[J]. 实用中医内科杂志, 2003, 17(1): 52-52.
- [4] 罗仕华, 郑传胜, 黎维勇, 等. 白及多糖体外抗肿瘤实验研

究[J]. 中成药, 2004, 36(1): 165-168.

- [5] 王红英. 白及甘露聚糖抗胃溃疡及抗炎、镇痛作用的实验研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(1): 119-121.
- [6] 张烨, 李绮玲, 韩霞. 白及胶对宫颈糜烂大鼠免疫功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(2): 338-340.
- [7] 庞素秋, 王国权, 吴双, 等. 白及多糖对大鼠深Ⅱ度烫伤创面的保护作用[J]. 中药材, 2013, 36(11): 1819-1823.
- [8] 吕小波, 黄春球, 武正才, 等. 白及多糖对胃溃疡大鼠防治作用的实验研究[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(1): 30-32.
- [9] 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000, 43(3): 20-21.
- [10] 杨勇杰, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 苯酚-硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. 中成药, 2005, 27(6): 706-708.
- [11] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426-428.
- [12] 宋坤, 赵保堂, 殷振雄, 等. 籽瓜多糖的提取分离及单糖组分的 GC-MS 分析 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 238-245.
- [13] 葛青, 张安强, 孙培龙. 桑黄子实体多糖的分离纯化及单糖组成研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 291
- [14] 刘福强, 王艳萍, 韩丹, 等. 白及多糖的提取及其相对分子质量测定和结构研究[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2291-2293. (下转第 52 页)

2012;135.

[3] 林文注,王佩. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:129.

[4] Lund I,Lundeberg T,Kowalski J,et al. Evaluation of varia-

tions in sensory and pain threshold assessments by electro-cutaneous stimulation [J]. Physiother Theory Pract,2005,21(2):81-92.

(编辑:徐建平)

The Experimental Observation of Horizontal Wrist and Vertical Finger Needling Manipulation Taking on the Effects of Pain Threshold in Healthy Adults

GAO Kun, LIAO Ying-ye[△]

(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, 650500 China)

ABSTRACT: Horizontal wrist and vertical finger needling manipulation is clinical experience summary on my study of manipulation of acupuncture. This paper introduces the operation technique and characteristics of the manipulation. We observed the effects of pain threshold taking by horizontal wrist and vertical finger needling manipulation in healthy adults. The results show that the horizontal wrist and vertical finger needling manipulation can achieve better regulation of acupuncture effect on pain threshold in health adults.

KEY WORDS: horizontal wrist and vertical finger needling manipulation; twirling, lifting and thrusting techniques; pain threshold; acupuncture analgesia

(上接第 32 页)

[15] Shimizu N,Tomoda M,Kanari M,et al. An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Astragalus mongholicus* [J]. Chem Pharm Bull,1991(11):2969.

[16] Yamaoka Y,Kawakita T,Kaneko M,et al. A polysaccharide fraction of *Shosaikoto*-To active in augmentation of natural killer activity by oral administration[J]. Biol Pharm Bull,1995,18(6):846.

[17] Yoshizawa Y,Enomoto A,Todoh H,et al. Activation of manne macrophage by polysaccharide fractions from ma-

rine algae(*Porphyra yezonesis*)[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993,57(11):1862.

[18] Liu F,Fung MC,Ooi VE,et al. Induction in the mouse of gene expression of immunomodulating cytokines by mushroom polysaccharide --protein complexes [J]. Life Sci, 1996,58(21):1795.

[19] McCormack B,Gregoriadis G. Drug-in-cyclodextrin-in liposomes:a novel concept in drug delivery [J]. IntJ Pharm, 1994,12(2):249.

(编辑:杨阳)

Comparative Study of Polysaccharide in Fibrous Root and Tuber of *Bletilla striata*

YU Hang-su, SHI Zhen-zhen, LYU Di, PAN Ping, QIAN Chao-dong, CHEN Jian-zhen, DING Zhi-shan[△]

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: Objective Compare the content and composition of polysaccharide in fibrous root and tuber of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. . **Methods** Extract the polysaccharide of the fibrous root and tuber of *Bletilla striata* with water extraction and ethanol precipitation; Phenol-sulfuric acid method and 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) method were carried out to evaluate the polysaccharide of the pseudobulb part of *Bletilla striata*; using GC-MS analysis of fibrous root and tuber of monosaccharide composition of polysaccharides. **Results** The fibrous root polysaccharide content is lower than the polysaccharide content in the tubers; The reducing sugar content is higher than the tuber; The fibrous root and tuber of polysaccharide containing glucose and mannose, but also contain galactose in fibrous root. **Conclusion** The fibrous root and tuber of *Bletilla striata* in the content of total sugar, reducing sugar, monosaccharide composition are plants. This is regrettable because phytoalexins or different, polysaccharide content of tubers is more than fibrous, but has certain potential medicinal value, is worth further development.

KEY WORDS: *Bletilla striata*; fibrous roots; tubers; polysaccharide