

芜菁精制多糖的提取、鉴别及含量测定

乔丽洁^{1#}, 程煜凤^{1#}, 阿依夏古丽·巴斯卡¹, 莫罕美竟也², 刘展^{3*},
海力茜·陶尔大洪^{1*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 南安普顿大学商学院, 南安普顿 SO17 1BJ;
3. 新疆医科大学厚博学院, 克拉玛依 834000)

摘要: **目的** 提取芜菁精制多糖并且对分离得到的精制多糖进行鉴别与含量测定。**方法** 采用水提醇沉法提取粗多糖后, 采用DEAE-650纤维素柱对芜菁粗多糖洗脱, 从而得到芜菁精制多糖; 对分离得到的精制多糖进行理化鉴别; 采用紫外-可见分光光度法测定芜菁精制多糖含量。**结果** 分离得到的精制多糖由Molish反应的结果可知组分为糖类物质; 由斐林反应结果可知多糖组分中含具有还原性的基团; 由三氯化铁反应结果可知多糖组分中不含酚类化合物, 且醋酐-浓硫酸反应结果可知不含皂苷类化合物; 精制多糖的平均含量为581 mg/g。**结论** 该提取工艺经济, 简单, 稳定, 可作为芜菁精制多糖的提取分离方法, 而且得到的精制多糖含量高, 为后续进一步利用提供基础。

关键词: 芜菁; 精制多糖; 制备; 鉴别; 含量测定

Extraction, identification and content determination of *Brassica rapa* L. refined polysaccharides

QIAO Li-Jie^{1#}, CHENG Yu-Feng^{1#}, AYIXIAGULI Ba-Si-Ka¹, MOHANMEIJINGYE², LIU Zhan^{3*},

HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. College of business, University of Southampton, Southampton SO17 1BJ, England; 3. Houbo College, Xinjiang Medical University, Karamay 834000, China)

ABSTRACT: Objective To extract the refined polysaccharides from *Brassica rapa* L., identify and determine the content of the separated refined polysaccharides. **Methods** After the crude polysaccharide was extracted by water extraction and alcohol precipitation, DEAE-650 cellulose column was used to separate the refined polysaccharide and the physical and chemical identification of the refined polysaccharide was carried out. The content of polysaccharides from turnips was determined by ultraviolet-visible spectrophotometry. **Results** The refined polysaccharide obtained from the separation could be divided into saccharides according to the Molish reaction results; the reducing group

基金项目: 克拉玛依市创新人才工程项目(2017RC001A-19)

Fund: Karamay City Innovation talent Project (2017RC001A-19)

#乔丽洁和程煜凤为并列第一作者。

#QIAO Li-Jie and CHENG Yu-Feng are first author.

*通讯作者: 海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: hailiqian2471@sina.com

刘展, 讲师, 主要研究方向为分子生物学。E-mail: liuzhan365@163.com

*Corresponding author: HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong, Professor, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: hailiqian2471@sina.com

LIU Zhan, Lecturer, Houbo College, Xinjiang Medical University, Karamay 834000, China. E-mail: liuzhan365@163.com

was found in the polysaccharide according to the Fehling reaction results; the phenol compounds were not found in the polysaccharide according to the ferric chloride reaction results, and the results of acetic anhydride-concentrated sulfuric acid reaction showed there were no saponins. The average content of refined polysaccharides was 581 mg/g.

Conclusion This extraction process is economical, simple and stable, and can be used as a method to extract and separate the refined polysaccharide from *Brassica rapa* L..

KEY WORDS: *Brassica rapa* L.; refined polysaccharides; extraction; identification; content determination

1 引言

芜菁(*Brassica rapa* L.)为十字花科芸薹属植物,在我国新疆和西藏等高海拔地区均有种植^[1]。作为一种药食两用的植物,以块根和种子入药,具有解毒、滋补、滋阴润肺、治疗哮喘、开胸顺气、平喘止咳的功效^[2-5]。研究发现,芜菁中含有多糖、黄酮、皂苷、生物碱、挥发油等多种化学成分^[6-10]。近年来研究发现芜菁多糖具有降血糖^[11,12]、抗氧化^[13]、抗疲劳^[14]等多种生理功能,具有较高的研究价值。

近几年课题组通过对比新疆不同地区芜菁中多糖含量,发现阿克苏柯坪县芜菁中多糖的含量最高。本实验用芜菁采自新疆阿克苏柯坪县,本课题组前期已经研究了芜菁粗多糖抗肿瘤^[15]、抗氧化^[16]的药理活性,但有关芜菁精制多糖的制备、鉴别及含量测定研究很少。课题组前期已优化粗多糖提取工艺^[15],该实验直接利用优化好的工艺进行粗多糖的提取,在之前研究的基础上继续深入研究。本研究采用 DEAE-650 纤维素柱对芜菁粗多糖洗脱,从而得到芜菁精制多糖,并对精制多糖进行鉴别及含量的测定,为后续芜菁精制多糖的活性研究以及相关保健产品的开发提供参考意义。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

芜菁,采自阿克苏柯坪县,经新疆医科大学教授帕丽达·阿不力孜鉴定为十字花科物芜菁的块根。

95%乙醇(分析纯,天津市北方天医化学试剂厂); 葱酮(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); L-葡萄糖(纯度 99%,江苏永健医药科技有限公司); DEAE-650 纤维素(上海化学试剂站分装厂); 浓硫酸(分析纯,河南升宏化工产品有限公司); α -萘酚(纯度 99%,南京化学试剂股份有限公司); 浓硫酸(纯度 98%,河南东科化工产品销售有限公司); 硫酸铜(纯度 $\geq 98\%$,河南沐辰化工产品有限公司); 酒石酸钾(分析纯,廊坊鹏彩精细化工有限公司); 氢氧化钠(分析纯,天津市北联精细化学品开发有限公司); FeCl_3 (分析纯,天津市致远化学试剂有限公司); 醋酐(分析纯,河南省洛阳市金盛化工有限公司)。

2.2 仪器与设备

UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司); DZF-603010A 型干燥箱(上海恒科学仪器有限公司); B-N 梅特勒型分析天平(上海托利多仪器有限公司); HH-4 型恒温水浴锅(国华电器有限公司); MODULYOD-230 型冷冻干燥箱(美国热电公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 药材预处理

将芜菁药材切成均匀薄片, 60 °C 进行干燥; 再粉碎至粉末状, 过 60 目筛, 得药材粉末, 室温放置备用。

2.3.2 芜菁精制多糖的制备与分离

称取芜菁粉末 100 g, 加入 3 倍体积 95%乙醇脱脂, 60 °C 水浴, 回流脱脂 2 次, 每次 2 h。过滤, 滤渣挥干溶剂, 加入干燥后滤渣的 30 倍体积蒸馏水, 90 °C 水浴加热, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 过滤后合并滤液, 浓缩。加 95%乙醇浓度调到终浓度 80%, 置于 4 °C 冰箱中隔夜静置, 次日进行抽滤, 收集沉淀。在沉淀物中加适量蒸馏水用玻璃棒搅拌待充分溶解, 将溶解好的液体装入 7000 Da 分子量的透析袋中进行透析; 收集透析好的溶液, 再进行常温减压浓缩, 浓缩至原体积的 1/30; 在 -80 °C 下进行预冻; 再冷冻干燥可得粉末状的芜菁粗多糖。

取芜菁粗多糖 5 g, 用一定量蒸馏水充分溶解后, 4500 r/min 15 min 离心 2 次, 另将上清液上样至已装填平衡完全的阴离子交换柱(DEAE-650M), 用 H_2O 洗脱, 收集含糖部分的洗脱液, 得到精制多糖部分, 再将所得组分进行常温减压浓缩, 浓缩至原体积的 1/30, 在 -80 °C 下进行预冻; 再冷冻干燥可得粉末状的芜菁精制多糖。

2.3.3 芜菁精制多糖溶液的配制

精密称取芜菁精制多糖粉末 10 mg, 用蒸馏水溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 配成 1 mg/mL 精制多糖溶液。

2.3.4 鉴别实验

(1) Molish 反应

量取精制多糖溶液 1 mL, 以 1 mL 蒸馏水作为对照, 加入 50 g/L 的 α -萘酚乙醇溶液 2~3 滴, 摇匀后, 沿试管壁缓缓加入浓硫酸 1 mL。如试液与浓硫酸交界处呈紫色环为阳性, 说明含有糖类成分。

(2)斐林反应

斐林 A: 将 3.5 g 含 5 个结晶水的硫酸铜溶于 100 mL 的水中即得淡蓝色的斐林 A 试剂。斐林 B: 将 17 g 含五结晶水的酒石酸钾溶于 20 mL 热水中, 然后加入 20 mL 含有 5 g 氢氧化钠的水溶液, 稀释至 100 mL 即得无色清亮的斐林 B 试剂。

向试管内加入精制多糖溶液 1 mL, 然后加入 1 mL 斐林试剂(A、B 液等体积混合均匀后再加入)。将试管放入盛有 50~60 °C 温水的大烧杯中加热约 2 min 后观察试管溶液的颜色变化。若溶液有砖红色沉淀产生, 说明溶液中含还原性基团。另一支试管用蒸馏水代替糖溶液, 其他操作一致, 观察现象。溶液有砖红色沉淀产生, 说明溶液中含还原性基团。

(3)三氯化铁反应量取精制多糖溶液 1 mL, 加入 1%FeCl₃ 溶液 1~2 滴, 观察其颜色变化, 若溶液颜色变为蓝色, 说明含有酚类化合物。

(4)醋酐-浓硫酸反应

将芫菁精制多糖溶于醋酐中, 加浓硫酸-醋酐, 观察其颜色变化, 如产生黄→红→紫→蓝等颜色变化, 最后褪色, 说明含有皂苷类化合物。

2.3.5 芫菁精制多糖的含量测定

(1) 标准品溶液的制备

精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖标准品 10.00 mg, 加蒸馏水溶解, 转移至 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度摇匀, 制成 0.1 mg/mL 的标准贮备液。

(2) 供试品溶液的制备

精密称取芫菁精制多糖粉末 20.00 mg, 加蒸馏水溶解, 转移至 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度摇匀, 配制成 0.2 mg/mL 的溶液。

(3) 蒽酮-硫酸溶液的配制

精密称取蒽酮粉末 50.00 mg, 加浓硫酸溶解并定容于 50 mL 容量瓶中, 混合均匀, 得到 1.0 mg/mL 蒽酮-硫酸溶液。

(4) 波长的选择

分别精密吸取 1 mL 葡萄糖对照品溶液和供试品溶液于具塞试管中, 各加水至 2.0 mL, 各加入 6 mL 蒽酮-硫酸试剂, 立即摇匀, 放置 15 min 后, 立即置于冰浴中 15 min, 取出, 另以未加葡萄糖的溶液为空白液, 于 400~800 nm 波长范围内扫描, 测得最大吸收波长。

(5) 标准曲线的绘制

精密量取标准品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 各加水至 2.0 mL, 迅速精密加入硫酸-蒽酮溶液 6.0 mL, 立即摇匀, 放置 15 min 后, 立即置于冰水浴冷却 15 min, 取出, 以相应的试剂为空白照紫外-可见分光光度法, 在最大吸收波长处测定吸光度, 以浓度为横坐标(X), 吸光度为总坐标(Y)绘制标准曲线。

(6) 精制多糖的含量测定

分别吸取 5 份供试品溶液 1 mL, 按照标准曲线绘制中的方法测定吸光度, 根据标准曲线得到芫菁精制多糖含量。

3 结果与分析

3.1 鉴别反应

分离得到的精制多糖由 Molish 反应的结果可知组分为糖类物质; 由斐林反应结果可知多糖组分中含具有还原性的基团; 由三氯化铁反应结果可知多糖组分中不含酚类化合物, 且醋酐-浓硫酸反应结果可知不含皂苷类化合物。鉴别反应的现象和结果如表 1 所示。

3.2 最大吸收波长的测定

在 400-800 nm 波长范围内扫描, 扫描结果如图 1 所示, 测得对照品和样品的最大吸收波长均为 625 nm。

3.3 多糖含量测定

所得回归方程 $Y=39.898X-0.0796$, $r^2=0.9999$, 线性范围在 0.005~0.018 mg/mL 范围内呈良好的线性关系,。根据标准曲线, 测得精制多糖平均含量为 581 mg/g($n=5$)。

3.4 方法学考察

3.4.1 精密度实验

精密量取供试品溶液 1 mL, 按照标准曲线制备的方法测定吸光度($n=6$)。测得吸光度的平均值是 0.473, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.8%, 仪器精密度良好。结果详见表 2。

3.4.2 稳定性实验

精密量取芫菁多糖溶液 1 mL, 按照标准曲线制备的方法测定吸光度($n=5$)。120 min 内每间隔 30 min 测定吸光度, RSD=1.3%。表明供试品溶液在 120 min 内稳定性良好。结果详见表 3。

表 1 鉴别反应现象和结果
Table 1 Identify reaction phenomena and results

	现象	结果
Molish 反应	溶液交界处出现紫色环	阳性, 说明溶液中含糖
斐林反应	溶液有砖红色沉淀产生	阳性, 说明溶液中含还原性基团
三氯化铁反应	溶液无颜色变化	阴性, 说明无酚类化合物
醋酐-浓硫酸反应	溶液无颜色变化	阴性, 说明无皂苷类化合物

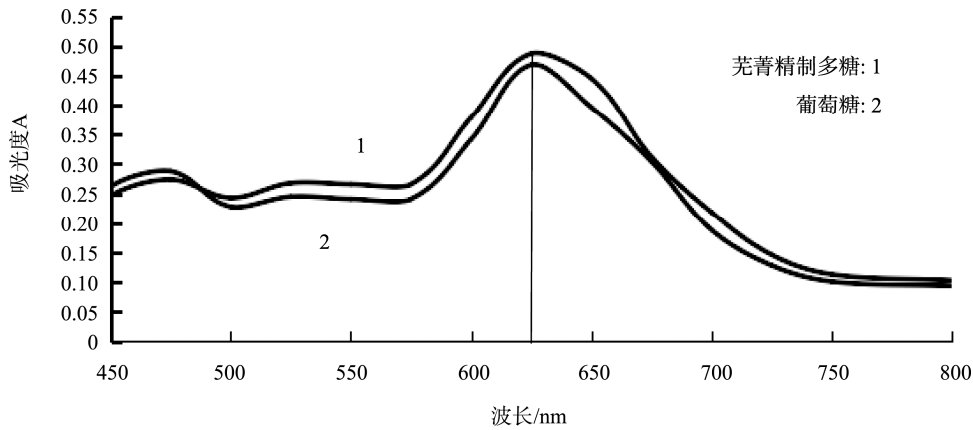


图 1 扫描最大吸收波长
Fig.1 Scanning maximum absorption wavelength

表 2 精密度实验结果
Table 2 Precision test results

序号	吸光度	平均吸光度	RSD/%
1	0.460	0.473	1.8
2	0.478		
3	0.481		
4	0.472		
5	0.482		
6	0.467		

表 3 稳定性实验结果
Table 3 Results of stability experiment

时间/min	吸光度	平均吸光度	RSD/%
0	0.527	0.521	1.3
30	0.528		
60	0.516		
90	0.522		
120	0.512		

3.4.3 重复性实验

精密称取同一批次芜菁精制多糖 10.00 mg, 按照所确定条件进行平行实验测定吸光度, 计算芜菁多糖的含量

表 4 重复性实验结果
Table 4 Results of repetitive experiments

序号	吸光度	多糖含量/(mg/g)	平均多糖含量/(mg/g)	RSD/%
1	0.505	571	581	1.5
2	0.510	567		
3	0.539	596		
4	0.521	590		
5	0.505	566		
6	0.520	596		

($n=6$)。结果显示, 精制多糖的平均含量是 581 mg/g, RSD=1.5%, 表明该方法的重复性良好。结果详见表 4。

3.4.4 加样回收率实验

精密称取高、中、低浓度的芜菁多糖(高、中、低 3 个水平各重复 3 次, 共 9 次), 在最大吸收波长处测定吸光度, 计算回收率。结果测定平均回收率为 98.1%, RSD=1.8%。表明实验方法的误差较小, 准确度较高。结果详见表 5。

4 结论与讨论

本研究对芜菁精制多糖进行提取, 并且对分离得到的精制多糖进行鉴别与含量的测定, 实验提取粗多糖后, 采用 DEAE-650 纤维素柱分离得到精制多糖。采用定性反应鉴别, 该鉴别方法具有反应迅速、现象明显等特点, 是一种快速的定性方法。目前有关测定芜菁精制多糖含量报道鲜少, 所以本研究用紫外分光光度法测定芜菁精制多糖含量, 测得精制多糖平均含量为 581 mg/g, 并进行方法学考察。实验结果表明, 该方法操作简单, 结果准确, 且重现性好, 可在一般实验条件下进行操作, 符合常规实验要求。该实验为后期芜菁精制多糖的进一步开发利用提供了一定的科学依据。

表 5 加样回收率实验结果
Table 5 Test results of recovery of added samples

序号	加标量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	2.52	97.0	98.1	1.8
2	2.49	98.2		
3	2.49	99.3		
4	5.00	97.4		
5	5.01	100.0		
6	4.99	96.1		
7	7.26	98.4		
8	7.24	98.2		
9	7.25	98.3		

参考文献

[1] 宋曙辉, 刘庞源, 何洪巨, 等. 不同品种芜菁营养成分及硫苷含量分析[J]. 营养学报, 2016, 38(6): 610–612.
Song SH, Liu PY, He HJ, *et al.* Analysis of nutritional components and glucosinolates in turnip [J]. Acta Nutr Sin, 2016, 38(6): 610–612.

[2] 王花, 乜国雁, 张萍, 等. 高原药食两用植物芜菁醚提取物对衰老小鼠免疫器官和 SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 58–60.
Wang H, Mo GY, Zhang P, *et al.* Effects of ether extract from turnip on immune organs and levels of SOD, MDA and GSH-Px in aged mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2014, 25(1): 58–60.

[3] 杨燕, 马慧萍, 张汝学, 等. 急性高原病发病机制的研究进展[J]. 分子生物学, 2010, 16(17): 2561–2563.
Yang Y, Ma HP, Zhang RS, *et al.* Progress in the pathogenesis of acute altitude sickness [J]. Mor Biomed, 2010, 16(17): 2561–2563.

[4] 楚秉泉. 西藏芜菁的抗缺氧功能成分分离及其作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
Chu BQ. Separation and anti-hypoxia mechanisms of functional compound from Tibetan turnip(*Brassica rapa* L.) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.

[5] 王宇. 藏药蔓菁提高缺氧耐受力的保健食品开发及质量控制初步研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
Wang Y. Preliminary study on the development and quality control of health food for improving hypoxia tolerance of Tibetan medicine Manjing [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2014.

[6] 李雅双, 刘杰, 包瑛, 等. 芜菁水溶性多糖的结构分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8): 175–180.
Li YS, Liu J, Bao Y, *et al.* Structure analysis of water-soluble polysaccharides from turnips [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(8): 175–180.

[7] Ninomiya M, Efdi M, Inuzuka T, *et al.* Chalcone glycosides from aerial parts of *Brassica rapa* L. hidabeni'turnip [J]. Phytochem Lett, 2010, 3(2): 96–99.

[8] Itoh T, Ninomiya M, Nozawa Y, *et al.* Chalcone glycosides isolated from aerial parts of *Brassica rapa* L. 'hidabeni'suppress antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells [J]. Bioorga Med Chem, 2010, 18(19): 7052–7057.

[9] 刘浩, 蒋思萍, 杨玲玲, 等. 芜根粗总皂苷对糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 西北农林科技大学学报(社会科学版), 2012, 40(6): 23–27.
Liu H, Jiang SP, Yang LL, *et al.* Hypoglycemic effect of total saponins from coriaceous root on diabetic mice [J]. J Northwest A&F Univ(Soc Sci Ed), 2012, 40(6): 23–27.

[10] 蔡倩, 陈琨, 王桃梅, 等. 保留指数辅助 GC-MS 对宁夏芜菁挥发性成分分析[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(19): 145–149.
Cai Q, Chen K, Wang TM, *et al.* Retention index assisted GC-MS analysis of volatile components in Ningxia turnip [J]. Food Res Dev, 2016, 37(19): 145–149.

[11] 李冠, 王静. 新疆芜菁多糖降血糖作用的研究[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(3): 471–479.
Li G, Wang J. Hypoglycemic function of polysaccharides from *Brassica rapa* L. of Xinjiang [J]. Xinjiang Agric Sci, 2011, 48(3): 471–479.

[12] 海仁古丽·麦提提, 祖丽皮艳·阿布力米特, 海力茜·陶尔大洪. 芜菁中性多糖降血糖作用研究的初步探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 387–392.
Hairenguli M, Zulipiyana A, Hailiqian T. Preliminary study on the hypoglycemic effect of neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L. [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(2): 387–392.

[13] 李雅双, 连路宁, 刘杰, 等. 芜菁多糖提取工艺及清除自由基活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(5): 235–240.
Li YS, Lian LN, Liu J, *et al.* Extraction optimization and radical scavenging activity of the polysaccharides from *Brassica rapa* L. [J]. Food Ferment Ind, 2014, 40(5): 235–240.

[14] 唐伟敏, 金露, 谢亮华, 等. 芜菁多糖的分离纯化、化学结构及其抗疲劳动物试验研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 28–37.
Tang WM, Jin L, Xie LH, *et al.* Purification, structural characterization and anti-fatigue effect *in vivo* of Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) polysaccharide [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2018, 18(12): 28–37.

[15] 陈卓尔, 李敏, 王小静, 等. 维药恰麻古多糖结构特征及其免疫活性的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017.
Chen ZE, Li M, Wang XJ, *et al.* Structural characteristics and immune

activity of polysaccharide from *Radix chamaeae* [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2017.

- [16] 侯宝林. 维药恰麻古儿多糖抗氧化及抗肿瘤作用的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2010.

Hou BL. Experimental study on antioxidation and antitumor effects of polysaccharide from vitiligo [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2010.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



乔丽洁, 硕士研究生, 主要研究方向为天然药物研究与开发。
E-mail: 920328388@qq.com



程煜凤, 高级实验师, 主要研究方向为天然药物研究与开发。

E-mail: chengyufengcyf@163.com

海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然药物研究与开发。

E-mail: hailiqian2471@sina.com

刘 展, 讲师, 主要研究方向为分子生物学。

E-mail: liuzhan365@163.com