

· 基础研究 ·

九香虫及相似品的多糖组成分析[△]李莎¹, 宋淑敏², 晏仁义², 马晓晶³, 陈科力¹, 黄璐琦^{1,3}, 李娟^{1,3*}

1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065;
2. 天津益倍生物科技集团有限公司, 天津 300457;
3. 中国中医科学院 博士后科研流动站/中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700

[摘要] 目的: 分析九香虫及相似品的多糖组成。方法: 采用水提醇沉法提取多糖, 利用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 通过柱前衍生化 HPLC 分析单糖组成, 使用 SIMCA-P 软件进行主成分分析(PCA)。结果: 小皱蝽的多糖含量相对偏高, 其次为无刺蝽; 九香虫等的多糖主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖等单糖组成, 而小皱蝽的多糖主要由葡萄糖组成; 从主成分分析来看, 除九香虫外, 其他品种能聚合为一类。结论: 九香虫及相似品多糖含量、单糖组成存在明显差异。

[关键词] 九香虫; 九香虫相似品; 多糖; 单糖组成

[中图分类号] R282.74; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1273-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190311002

Analysis of Polysaccharide Composition of *Aspongopus chinensis* and Its AdulterantsLI Sha¹, SONG Shu-min², YAN Ren-yi², MA Xiao-jing³, CHEN Ke-li¹, HUANG Lu-qi^{1,3}, LI Juan^{1,3*}

1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
2. Tianjin Yibi Biotechnology Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China;
3. Post-doctoral Research Station, China Academy of Chinese Medical Sciences/National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the polysaccharide composition of *Aspongopus chinensis* and its adulterants. **Methods:** Polysaccharides were extracted by water extraction and alcohol precipitation method. The content of polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid method. The composition of monosaccharides was analyzed by pre-column derivatization HPLC method, and the principal component analysis(PCA) was performed by SIMCA-P software. **Results:** The polysaccharide content of the *Cyclopelta parva* was relatively high, followed by *Megymenum inerme*. The polysaccharides such as *A. chinensis* were mainly composed of mannose, rhamnose, glucose, galactose and other monosaccharides, while the polysaccharides of *C. parva* were mainly composed of Glucose composition; from the principal component analysis, in addition to the *A. chinensis*, other varieties were aggregated into one class. **Conclusion:** There are significant differences in polysaccharide content and monosaccharide composition between *A. chinensis* and its adulterants.

[Keywords] *Aspongopus chinensis*; adulterants; polysaccharide; monosaccharide composition

九香虫 *Aspongopus chinensis* Dallas 为蝽科兜蝽属昆虫^[1], 是重要的药用昆虫和保健食品^[2]。作为中药, 其具有理气止痛、温中助阳的功效^[3]。现代研究表明, 九香虫有抗菌、抗癌、止痛、促血管生成等药理作用, 临床多用于治癌痛、下焦虚寒病症、小儿厌食症、阳痿等^[4]。九香虫作为保健食品, 在

我国食品养生方面有着悠久的历史, 多在四川、贵州和云南等地入锅炒食使用, 民间将九香虫泡酒用作壮阳之品^[3-6]。研究表明, 九香虫富含蛋白质、脂肪、氨基酸、维生素以及多种微量元素等^[7]。

目前市场上对九香虫需求日益增大, 其价格也居高不下, 九香虫误用、混用现象增多, 严重影响

[△] **[基金项目]** 中国博士后科学基金(2016M601237); 湖北省教育厅科学研究计划资助项目(Q20172009); 湖北省自然科学基金(2017CFB397)

* **[通信作者]** 李娟, 副教授, 研究方向: 中药资源及其活性研究; E-mail: 66832643@qq.com

质量问题严重。进一步探索九香虫多糖组成,并且与市场上常见的混淆品小皱蝽、黑兜虫、无刺蝽、荔蝽多糖组成进行比较,本研究采用柱前衍生化HPLC对九香虫及其相似品多糖组分进行分析。

1 材料

1.1 仪器

DZF-6020 真空干燥箱(上海博迅实业有限公司); DZTW 电子调温电热套 [邦西仪器科技(上海)有限公司]; DK-8D 电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司); LC-2030C 3D 高效液相色谱仪 [岛津制作所(日本)]; Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 安捷伦科技公司)。

1.2 试剂

无水乙醇(5 L)购自上海沃凯生物技术有限公司; D-甘露糖(25 g)、D-木糖(25 g)、D-阿拉伯糖(25 g)、L-鼠李糖(25 g)、D-半乳糖醛酸(25 g)、D-半乳糖(25 g)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(100 g)购自上海麦克林生化科技有限公司; D-葡萄糖(500 g)购自天津市风船化学试剂科技有限公司; 岩藻糖(20 mg)购自成都瑞芬思生物科技有限公司, 硫酸(500 mL)、盐酸(500 mL)购自北京化工厂; 氢氧化钠(500 g)、三氯甲烷(500 mL)购自天津市康科德科技有限公司; 乙腈(4 L)购自上海星可高纯溶剂有限公司。

九香虫及其相似品经湖北中医药大学陈科力教授鉴定, 具体信息见表1。

表1 九香虫及其相似品样本信息

序号	种类	拉丁名	产地	采集时间	购买方式	样本编号
1	九香虫	<i>Aspongopus chinensis</i> Dallas	贵州	2016年9月	安国购	JXC-P1-1
2			贵州	2016年1月	安国购	JXC-P3-2
3			河南	2017年10月	亳州购	JXC-P20-3
4			贵州	2017年10月	亳州购	JXC-P23-4
5			贵州	2017年10月	亳州购	JXC-P24-5
6			四川巴中	2018年1月15日	四川成都购	JXC-P29-6
7			贵州	2018年5月6日	淘宝购	JXC-P33-7
8			贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县	2018年5月4日	淘宝购	JXC-P36-8
9			四川	2018年5月9日	淘宝购	JXC-P37-9
10			四川	2018年5月7日	淘宝购	JXC-P48-10
11			贵州	2018年5月8日	淘宝购	JXC-P52-11
12	小皱蝽	<i>Cyclopelta parva</i> Distant	河南	2016年9月	安国购	XZC-P4-12
13			贵州毕节	2017年5月20日	中药材天地网购	XZC-P7-13
14			河南南阳	2017年5月1日	中药材天地网购	XZC-P8-14
15			湖南	2017年8月17日	中药材天地网购	XZC-P13-15
16			四川德阳	2017年8月17日	中药材天地网购	XZC-P15-16
17			河南	2017年10月	亳州购	XZC-P21-17
18			四川巴中	2018年1月15日	四川成都购	XZC-P30-18
19			贵州	2018年5月10日	淘宝购	XZC-P41-19
20			江西九江	2018年5月12日	淘宝购	XZC-P57-20
21	荔蝽	<i>Tessarotoma papillosa</i> Drury	云南	2017年8月11日	淘宝购	LC-P9-21
22			广东广州	2018年5月8日	淘宝购	LC-P34-22
23	黑兜虫	<i>Aspongopus nigriventris</i> westwood	吉林	2017年8月12日	中药材天地网购	HDC-P14-23
24			云南富临	2018年1月15日	四川成都购	HDC-P31-24
25			贵州	2018年5月2日	淘宝购	HDC-P35-25
26			云南蒙自市	2018年5月15日	淘宝购	HDC-P59-26
27	无刺蝽	<i>Megymenum inerme</i> H. S	云南富临	2018年1月15日	四川成都购	WCC-P32-27
28			广西玉林	2018年5月2日	淘宝购	WCC-P38-28
29			安徽池州	2018年4月24日	淘宝购	WCC-P46-39
30			云南	2018年5月11日	淘宝购	WCC-P55-30
31			广西	2018年5月15日	淘宝购	WCC-P58-31

2 方法

2.1 多糖的提取

称取 10.00 g 样品, 按料液比 1:30 加入 300 mL 水, 加热回流提取 1 h, 提取两次, 合并上清液, 减压浓缩至 25 mL, 加入 4 倍体积的乙醇(终浓度为 80%)醇沉, 4 ℃ 静置过夜, 离心取沉淀, 置于真空干燥箱内烘干, 得粗多糖。

2.2 多糖含量测定

按苯酚-硫酸法测定多糖的含量^[9]。

2.3 糖的衍生化

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取 *D*-甘露糖、*D*-木糖、*D*-阿拉伯糖、*L*-鼠李糖、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-半乳糖对照品适量, 置于 5 mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解, 配置成质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 混合对照品溶液。吸取混合对照品 100 μL, 按照样品衍生化步骤进行衍生化。

2.3.2 供试液制备 1) 酸水解组: 分别称取上述干燥后的多糖适量, 配置成质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的水溶液。吸取上述配置后的溶液各 100 μL 于试管中, 加入 70 μL 2.5 mol·L⁻¹ 硫酸, 110 ℃ 烘箱中水解 2 h, 取出冷却后, 用 70 μL 5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液中和, 得水解液。2) 未酸水解组: 样本直接溶解后衍生化。

2.3.3 样品衍生化 向上述水解液或未酸水解的溶液中加入 200 μL PMP 甲醇溶液 0.5 mol·L⁻¹ 和 100 μL NaOH 溶液 (0.3 mol·L⁻¹), 并旋涡混合, 70 ℃ 水浴反应 60 min, 冷却, 再用 100 μL 0.3 mol·L⁻¹ HCl 中和。再向其中加入 1 mL 水, 2 mL 三氯甲烷萃取 3 次, 取水相, 过膜。

2.4 单糖组成分析

色谱柱: Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 进样量: 5 μL; 检测波长: 250 nm; 流动相: 乙腈(A), 水 900 mL、乙腈 100 mL、0.45 g KH₂PO₄、0.5 mL TEA pH 7.5(B); 梯度洗脱(0~4 min, 6% A; 4~5 min, 6%~12% A; 5~40 min, 12% A; 40~40.01 min, 12%~6% A; 40.01~48 min, 6% A)。

2.5 主成分分析

使用 SIMCA-P 软件对单糖组成进行主成分分析(PCA)。采用主成分分析法, 通过观察各样品的聚

集情况, 直观地表达九香虫及其相似品的多糖组成差异。

3 结果

3.1 多糖含量

按 2.1 项下方法对九香虫及其相似品(小皱蜻、荔蜻、黑兜虫、无刺蜻)进行多糖提取, 提取率平均值分别为: (7.92 ± 3.31)%、(8.60 ± 2.72)%、(7.44 ± 1.84)%、(7.97 ± 1.18)%、(8.36 ± 1.67)%。数据显示, 九香虫及其相似品的多糖提取率相差不大, 得率接近 8%, 其中小皱蜻相对最多, 荔蜻相对最少。采用苯酚-硫酸法测得多糖质量分数平均值: 九香虫为 (5.23 ± 3.68)%、小皱蜻为 (17.64 ± 5.73)%、荔蜻为 (6.02 ± 0.45)%、黑兜虫为 (7.05 ± 3.50)%、无刺蜻为 (10.56 ± 3.26)%。数据显示, 九香虫及其相似品的多糖含量差异较大, 其中小皱蜻的多糖含量明显较多。

3.2 单糖组成比较

按照 2.3.2 项下方法对九香虫及其相似品进行酸水解, 再对水解产物、非水解产物和单糖对照品分别进行柱前衍生化, 再按照 2.4 项下方法利用 HPLC 对 PMP 衍生化的单糖对照品和多糖水解物和未水解物进行色谱分析。混合标准单糖 PMP 衍生物的 HPLC 分析结果见图 1, 九香虫及其相似品未水解组 PMP 衍生物的 HPLC 见图 2, 多糖的水解单糖 PMP 衍生物的 HPLC 分析结果见图 3, 使用 SIMCA-P 软件对单糖组成进行 PCA 结果见图 4。九香虫及其相似品的单糖组成及其单糖含量(峰面积)结果见表 2。

由图 2 可知, 所有类型的样本未酸水解图一致, 15 min 后没有杂峰, 表明水提醇沉已去除游离单糖。由图 3 可知, 九香虫及其相似品的样本中, 以甘露糖、葡萄糖、半乳糖为主, 且普遍葡萄糖含量高。

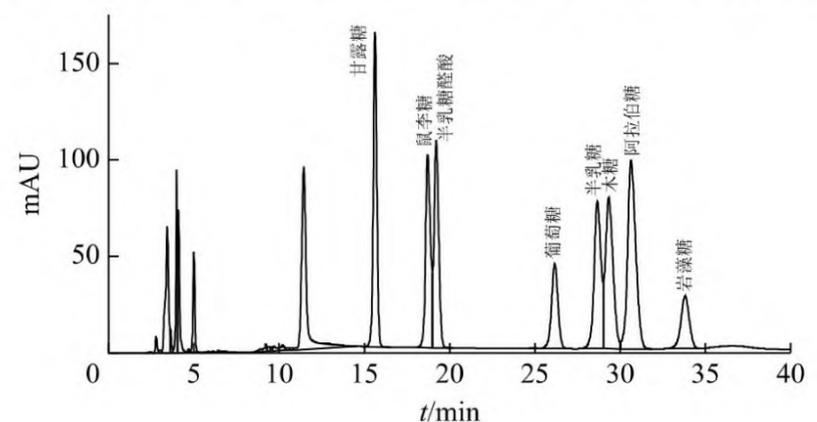
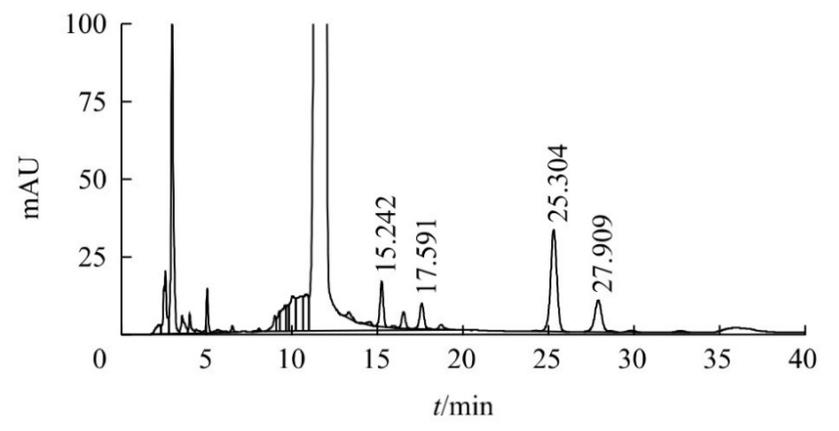
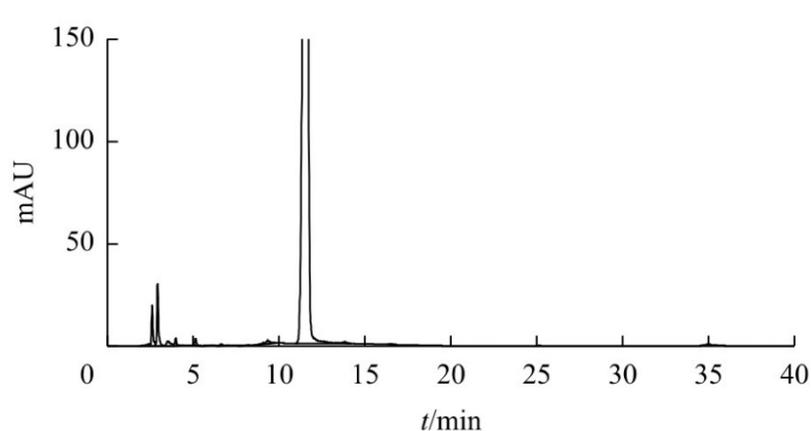
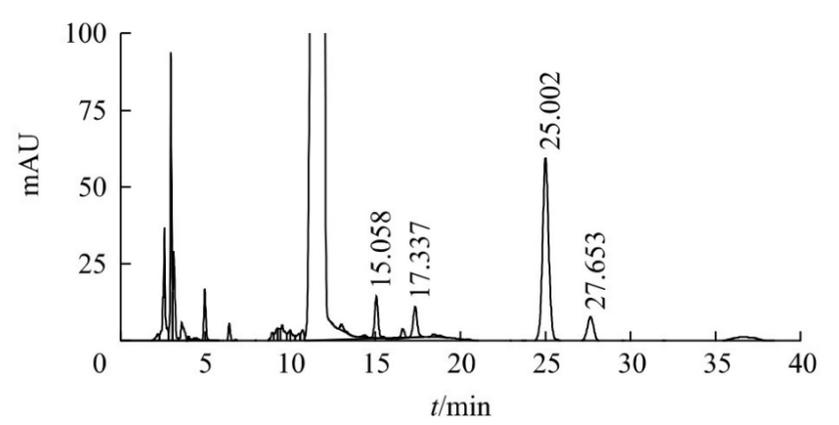
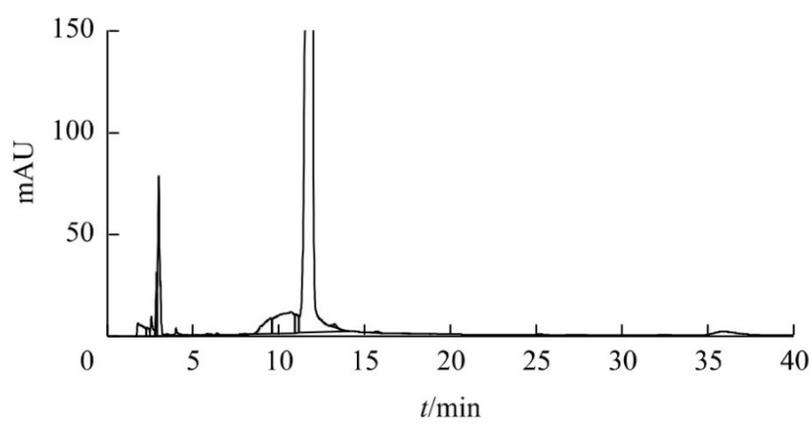
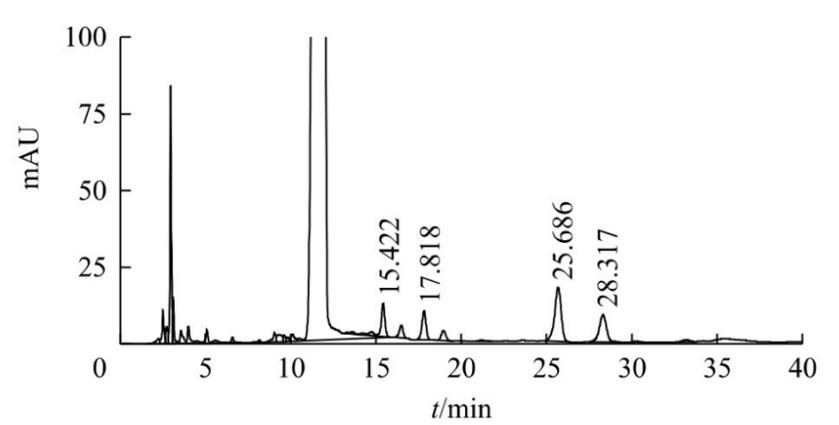
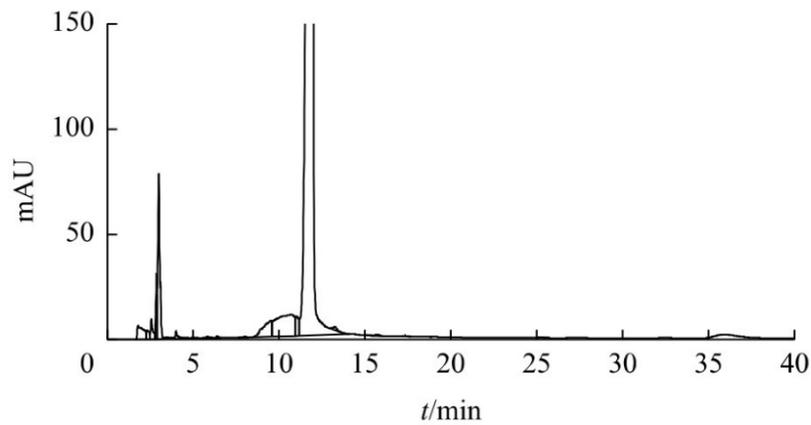
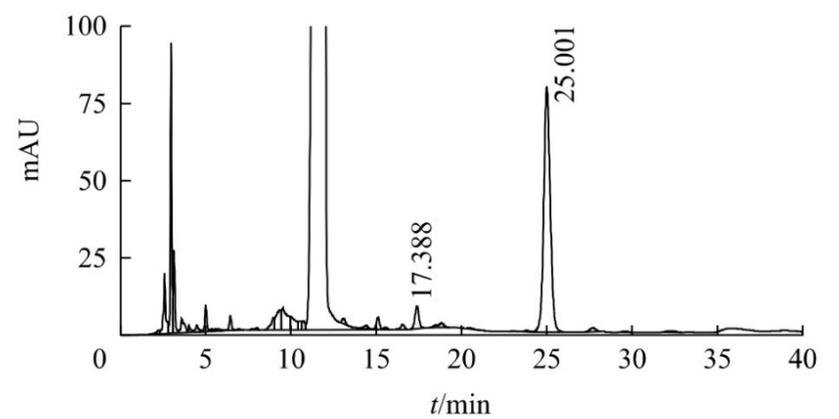
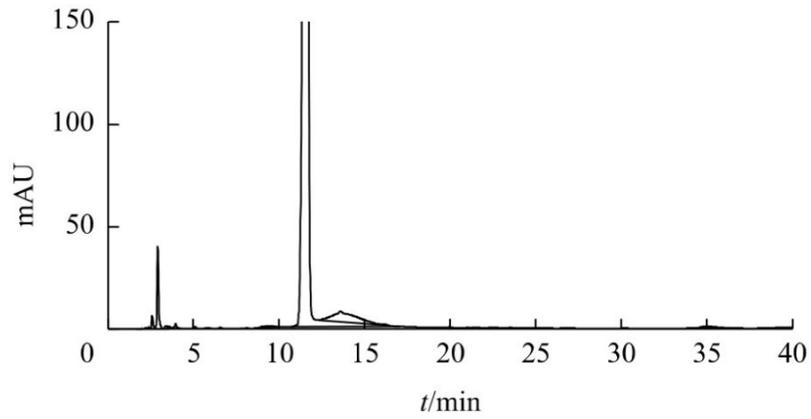
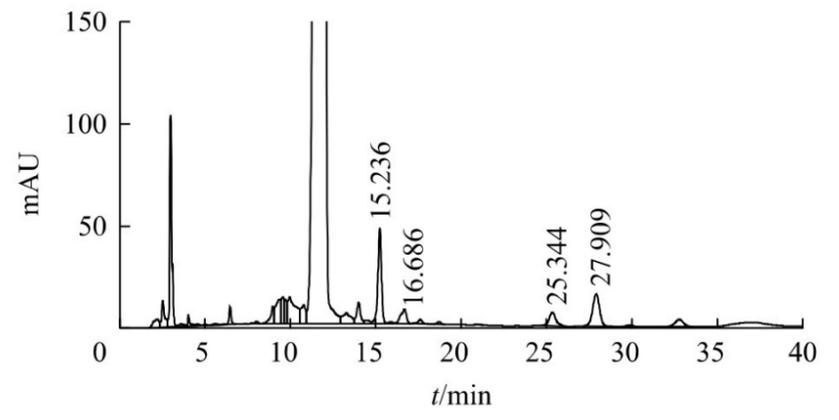
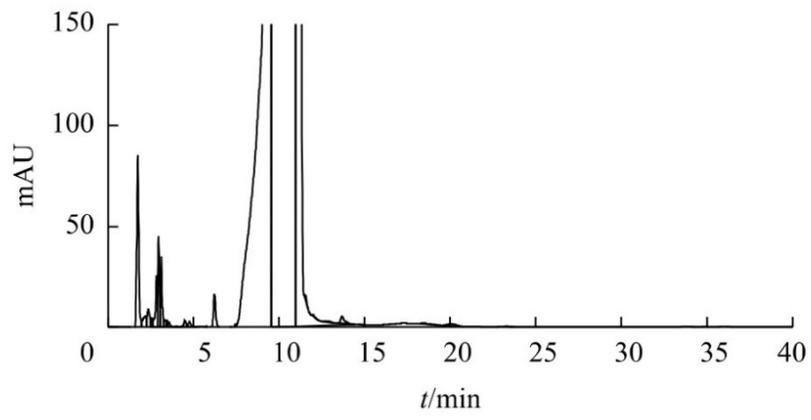


图 1 混合标准单糖 PMP 衍生物的 HPLC 图



注：1. 九香虫；2. 小皱蝽；3. 荔蝽；4. 无刺蝽；5. 黑兜虫。

图2 九香虫及其相似品未水解组 PMP 衍生物的 HPLC 图

注：1. 九香虫；2. 小皱蝽；3. 荔蝽；4. 无刺蝽；5. 黑兜虫。

图3 九香虫及其相似品多糖水解物 PMP 衍生物的 HPLC 图

表2 九香虫及其相似品的单糖组成及其单糖含量(峰面积)

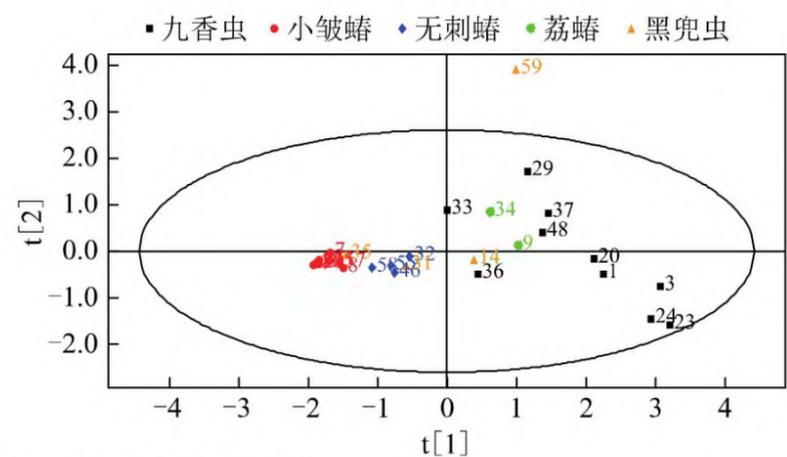
样品编号	样品名称	甘露糖峰面积 S1	葡萄糖峰面积 S2	半乳糖峰面积 S3	S1:S2:S3
JXC-P1-1	九香虫	469 916	251 935	157 161	1:0.54:0.33
JXC-P3-2		674 259	185 306	442 529	1:0.27:0.66
JXC-P20-3		143 285	152 808	178 191	1:1.07:1.24
JXC-P23-4		568 608	186 444	611 444	1:0.33:1.08
JXC-P24-5		514 876	253 221	618 283	1:0.49:1.20
JXC-P29-6		47 295	105 669	39 622	1:2.23:0.84
JXC-P33-7		83 130	402 559	56 688	1:4.84:0.68
JXC-P36-8		565 237	1 161 728	217 182	1:2.06:0.38
JXC-P37-9		34 215	47 542	29 719	1:1.39:0.87
JXC-P48-10		147 923	302 565	190 980	1:2.05:1.29
JXC-P52-11		42 238	181 992	35 244	1:4.31:0.83
WCC-P32-27	无刺蝽	181 068	1 533 935	245 499	1:8.47:1.36
WCC-P38-28		317 030	488 405	301 917	1:1.54:0.95
WCC-P46-39		90 469	1 111 025	190 225	1:12.28:2.1
WCC-P55-30		212 959	2 107 656	266 942	1:9.9:1.25
WCC-P58-31		196 744	2 587 941	250 848	1:13.15:1.27
LC-P9-21	荔蝽	158 794	469 618	258 568	1:2.96:1.63
LC-P34-22		169 535	590 966	182 201	1:3.49:1.07
HDC-P14-23	黑兜虫	198 609	837 405	296 638	1:4.22:1.5
HDC-P31-24		114 031	1 348 312	262 035	1:11.82:2.3
HDC-P35-25		60 977	1 456 911	55 762	1:23.89:0.91
HDC-P59-26		—	52 184	—	—

注：—表示未检测到此处有相对应的峰及峰面积。

其中九香虫多糖中均含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖等单糖，但单糖组成比例差异较大，部分样品甘露糖含量大于葡萄糖含量，而其余九香虫多糖主要是由葡萄糖构成。小皱蝽多糖主要是由葡萄糖构成，并且其含量较大。无刺蝽多糖主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖构成，此外还有少量的鼠李糖，除个别样本中葡萄糖含量较低外，其余无刺蝽多糖中甘露糖、葡萄糖和半乳糖的组成比例相似。荔蝽和黑兜虫多糖主要也是由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖等单糖组成，且单糖组成比例差异不大。

由表2可知，在甘露糖、葡萄糖、半乳糖的比例上，九香虫及其相似品同品种各样品之间较为接近，但个别样本稍有差异，主要由于药材炮制、加工和贮藏等因素的影响。按其比例知，九香虫、荔蝽的甘露糖、葡萄糖、半乳糖的含量差异不大，而小皱蝽、黑兜虫的葡萄糖部分明显高于其他两种单糖含量，无刺蝽葡萄糖含量也高于其他两种单糖含量。

从主成分分析结果看出，九香虫、小皱蝽、无刺蝽、荔蝽、黑兜虫，除个别离群值，各品种样本基本分布在不同区域，说明九香虫及其相似品的多糖组成存在明显差异。其中小皱蝽、无刺蝽、荔蝽



注：图中数字代表批次号。

图4 九香虫及其相似品不同批次样品单糖组成主成分分析图

几个品种不同批次的样本分布比较集中，说明这几个品种多糖组成组内均一性比较好，即多糖组成接近；而九香虫和黑兜虫不同批次的样本分布比较离散，说明这两个品种的多糖组成组内差异较大。

4 讨论

多糖以及聚合糖是有机体不可缺少的主要成分，如研究最多、最广泛的甲壳素，是构成昆虫以及其他动物外壳的主要物质。逯春玲等^[8]对土鳖虫、九香虫、僵蚕3种昆虫类药材总多糖含量比较，认为多糖

可以作为质量控制指标;冯颖等^[10]对云南常见的5种食用蟋象的营养成分分析结果表明,平均总糖质量分数为2.61%。九香虫及类似品的多糖含量存在一定差异,整体规律是:油脂含量高的样品多糖含量相对较低;小皱蟋的多糖含量相对偏高,其次为无刺蟋。小皱蟋的多糖主要由葡萄糖组成,与其他品种的多糖组成差异较大;除小皱蟋外,其他品种多糖组成相似,主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖等单糖组成;虽然不同药材多糖中的单糖组成比例存在一定的差距,但是除个别样品外,均为葡萄糖含量最高。

从主成分分析来看,九香虫的聚合度不高,这与笔者检测的九香虫DNA条形码的结果相似,不能聚合为一类,原因可能为九香虫中存在隐存生物多样性。课题组前期对九香虫类药材进行了系统的性状和显微鉴定^[11],发现黑兜虫与九香虫极相似,本实验中九香虫和黑兜虫不同批次的样本分布比较离散,组内差异较大,单糖组成不能作为区别九香虫和黑兜虫的依据。而小皱蟋与无刺蟋与九香虫区别明显,可作为品种鉴别的依据。本实验通过检测九香虫类药材多糖中单糖组成,为九香虫类药材的品种鉴定和品质评价提供一定的依据。

参考文献

- [1] 萧采瑜. 中国蟋类昆虫鉴定手册(半翅目异翅亚目):第一册[M]. 北京:科学出版社,1977:69-70.
- [2] 刘伦沛,郁建平. 九香虫的营养成分分析与评价[J]. 食品科学,2008,29(2):406-410.
- [3] 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,2015:11.
- [4] 张颖,陈建伟,高原. 九香虫资源鉴定、化学、药理与药食应用研究[J]. 亚太传统医药,2009,5(9):44-47.
- [5] 侯晓晖,孙廷,李晓飞,等. 九香虫防御性物质水溶液成分分析及其对L02细胞活性的影响[J]. 现代食品科技,2013,29(10):2363-2367.
- [6] 张笠,郭建军. 九香虫资源及其利用研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2011,36(5):151-155.
- [7] 李俐,李晓飞. 贵州九香虫营养成分分析[J]. 昆虫知识,2010,47(4):748-751.
- [8] 逯春玲,乔歌,王殿波. 三种昆虫类药材总多糖含量比较分析[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(3):574-576.
- [9] 郑文静,孙静,张英. 毛细管气相色谱法测定山茱萸多糖的单糖组成[J]. 现代盐化工,2018,45(1):15-16.
- [10] 冯颖,陈晓鸣,王绍云. 半翅目常见食用昆虫与营养价值[J]. 林业科学研究,2000,13(6):608-612.
- [11] 李莎,程灿,马晓晶,等. 九香虫及相似品的对比鉴别研究[J]. 中药材,2019,42(3):536-541.

(收稿日期:2019-03-11 编辑:王笑辉)

(上接第1272页)

- [18] 宿桂红,常春水,孙鹏程. 基于特色产业视角的吉林省养鹿业发展现状及前景分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016,4(8):48-50.
- [19] 肖小河,陈士林,黄璐琦,等. 中国道地药材研究20年概论[J]. 中国中药杂志,2009,34(5):519-523.
- [20] BAI M. Determine the environment and the efficacy of genuine traditional Chinese medicine[C]//International conference on industrial technology and management science, 2015.
- [21] 郑潇潇,王潇霖,尹显梅,等. 基于道地药材的指纹图谱构建对中药质量评价的探讨[J]. 中药与临床,2017,8(1):4-6,10.
- [22] BUGGLE B, GLASER B, ZOLLER L, et al. Geochemical characterization and origin of South eastern and Eastern European loesses (Serbia, Romania, Ukraine) [J]. Quaternary SCI Rev, 2008, 27(9/10):1058-1075.
- [23] 李平惠,钱丽丽,杨义杰,等. 基于矿物元素指纹图谱技术的芸豆产地溯源研究[J]. 中国粮油学报,2016,31(6):134-139.
- [24] LERAKY A W, RAMBECK W. Study on performance enhancing effect of rare earth elements as alternatives to antibiotic feed additives for Japanese Quails[J]. AM J SCI, 2011, 7(12):211-215.
- [25] FRONTELA C, GARCÍA-ALONSO F J, ROS G, et al. Phytic acid and inositol phosphates in raw flours and infant cereals: The effect of processing [J]. J FOOD COMPOS ANAL, 2008, 21(4):343-350.
- [26] 孙伟丽,赵海平,张国坤,等. 不同加工方式对梅花鹿三叉茸不同区段矿物质元素含量的影响研究[J]. 中草药, 2018, 49(16):3821-3828.
- [27] 中国医药保健品进出口商会. 药用植物及制剂外经贸绿色行业标准:WM/T2-2004[S]. 北京:中国标准出版社,2005.

(收稿日期:2019-04-12 编辑:王笑辉)