

仙茅多糖的分离纯化及结构分析

曾婷^{1,2}, 彭梅², 杨娟^{2*}

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵阳 550025;

2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**对仙茅多糖进行分离纯化,并对其结构进行分析,为仙茅多糖的进一步应用提供理论基础。**方法:**仙茅根茎经水提、醇沉、冷冻干燥得仙茅粗多糖(XMP),经 DEAE-纤维素柱和 Sepharose CL-6B 凝胶柱色谱纯化得纯多糖 XMP-1,采用凝胶渗透色谱、紫外光谱、红外光谱、气质联用等技术对 XMP-1 的结构进行分析。**结果:**仙茅多糖由甘露糖、葡萄糖、半乳糖 3 种单糖组成,其摩尔比为 81.2:5.7:1,多糖质量分数为 91.8%,相对分子质量为 3 031 Da,不含核酸、蛋白质和色素。具有吡喃特征吸收峰,在水溶液分子中的分子构象可能为自然卷曲结构。**结论:**仙茅纯多糖是一种分子量较小的中性杂多糖。

[关键词] 仙茅; 多糖; 分离纯化; 结构分析

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0053-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160053

Isolation, Purification and Structural Analysis of Curculiginis Rhizoma Polysaccharide

ZENG Ting^{1,2}, PENG Mei², YANG Juan^{2*}

(1. Guizhou University Wine and Food Engineering College, Guiyang 550025, China;

2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the isolation, purification and structural analysis of the polysaccharides from the Curculiginis Rhizoma. The work will provide the theoretical foundation for the further application of Curculiginis Rhizoma polysaccharides. **Method:** The crude polysaccharide was obtained by hot water extraction, ethanol precipitation and freeze-drying. After further purification by DEAE-cellulose and Sepharose CL-6B column chromatography, pure polysaccharide (XMP-1) was achieved. The structure of XMP-1 was elucidated by GPC, UV, IR and GC-MS. **Result:** XMP-1 was composed of mannose, glucose, galactose with a molar ratio of 81.2:5.7:1. Total carbohydrate content of XMP-1 was 91.8% and the molecular weight was 3 031 Da. XMP-1 has no nucleic acid, protein and pigment. IR chromatography showed that XMP-1 has pyranose characteristic absorption peak. XMP-1 in molecular conformation in aqueous solution can be naturally curly structure. **Conclusion:** XMP-1 is a kind of small molecular weight neutral pure heterosaccharides.

[Key words] Curculiginis Rhizoma; polysaccharide; separation; structural analysis

仙茅具有补肾助阳、益精血、强筋骨和行血消肿的作用,主要用于肾阳不足、虚癆内伤和筋骨疼痛等病症^[1]。仙茅主要化学成分有皂苷类、酚类、苷类和微量元素等^[2]。近年来又不断有一些新的三萜

苷类及酚苷类成分被报道^[3-7]。但是关于仙茅多糖的研究只见国内少量文献报道。且大都是对其药理作用和功能成分的研究,对其分离纯化、结构分析的研究少之甚少,研究也只停留在分子量、单糖组成等

[收稿日期] 20160413 (015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460597)

[第一作者] 曾婷,在读硕士,从事食品生物技术研究,Tel:0851-83804370,E-mail:403254174@qq.com

[通讯作者] *杨娟,博士,研究员,从事天然活性成分研究,Tel:0851-83804370,E-mail:yangxz2002@126.com

初步研究层面^[8],未对其结构进行进一步深入的研究。

在本课题相关仙茅多糖的免疫活性研究中观察到,仙茅多糖可以激活小鼠腹腔巨噬细胞,增强其吞噬能力,并能诱导肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的分泌,但仙茅多糖激活巨噬细胞的机制尚不清楚。仙茅多糖对巨噬细胞的免疫调控作用也未见其他报道。由于多糖是通过其特异性寡聚糖片段与受体相结合而介导免疫反应^[9-13],因此,对仙茅多糖的结构研究可以更好探讨多糖的结构与功能关系,进而探寻仙茅多糖的活性中心,而且也为药物筛选提供了各种结构类型的候选化合物。

本实验选择激活巨噬细胞作用确切,但构效关系及作用机制不明确的仙茅多糖为研究对象,对其进行分离纯化以获得结构稳定、相对分子质量分布均匀的纯多糖,并拟采用气相色谱-质谱联用(GC-MS),红外光谱(IR),紫外光谱(UV),凝胶渗透色谱等技术对其单糖组成、相对分子质量、含量等进行分析,为该多糖的构效关系研究和进一步开发利用提供参考。

1 材料

HP6890/5975C 型 GC-MS 联用仪(美国安捷伦公司),Vector22 型傅里叶红外光谱仪(FT-IR Bruker 公司),Millipore-0026 型超纯水机(美国 Millipore 公司),AG285 型电子分析天平(Mettler Toledo 公司),Buchi R114 型旋转蒸发仪(Switzerland 公司),DZF-6021 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),HP-8453 型紫外-可见分光光度计(美国 HP 公司)。

仙茅药材购自贵阳市万东桥药材市场,经贵阳中医学院孙庆文副教授鉴定为仙茅属植物仙茅 *Curculigo orchoides* 的干燥根茎。DEAE-纤维素(上海恒信化学试剂有限公司),Sephacryl CL-6B 型凝胶(Pharmacia Sweden 公司),鼠李糖(北京化学试剂公司),阿拉伯糖(阿拉丁试剂有限公司),木糖(中国医药集团上海化学试剂公司),甘露糖(上海试剂二厂),葡萄糖(沈阳市试剂三厂),半乳糖(上海恒信化学试剂有限公司),半乳糖醛酸(Sigma 公司),水为蒸馏水,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 粗多糖的提取 采用热水浸提法提取仙茅粗多糖:将新鲜仙茅根块切碎晒干,粉碎后用 80% 乙醇回流提取 6 次,除去脂溶性成分及单糖、低聚糖,残渣经风干后得脱脂的仙茅根干粉,保存备用。称取适量脱脂处理的仙茅干粉,加入 35 倍量蒸馏水沸

水浴提取 2.5 h。将所得提取液进行抽滤,收集滤液,剩余残渣按上述方法重复提取 2 次。滤液合并,减压浓缩至一定体积后,加入 95% 乙醇冷藏放置过夜后进行抽滤,沉淀物分别用 95% 乙醇和丙酮洗涤,65 °C 真空干燥除尽水分后磨碎成粉即为仙茅粗多糖^[14]。

2.2 粗多糖的分离纯化 取粗多糖 10 g 溶于 50 mL 蒸馏水后过 DEAE-纤维素柱色谱(12.5 cm × 60 cm)进一步纯化,依次用蒸馏水,0.1, 0.2, 0.5 mol · L⁻¹ NaCl 溶液梯度洗脱,洗脱液分部收集,用苯酚-硫酸法检测,合并出糖高峰部分,浓缩至小体积后进一步经 Sepharose CL-6B 凝胶柱色谱(2.6 cm × 100 cm)纯化,用 0.2 mol · L⁻¹ NaCl 溶液洗脱,流速 1.0 mL · min⁻¹,每管 8 min,自动收集器收集。通过苯酚-硫酸法检测,以吸光度为纵坐标,收集管数为横坐标作图,合并检测曲线为单一对称峰的对应管,透析,浓缩后,加 6 倍量 95% 乙醇醇沉,抽滤后,沉淀真空干燥得纯化后多糖样品(XMP-1),研磨成粉末,放入干燥器备用^[15]。

2.3 多糖相对分子质量测定 采用凝胶渗透色谱法。PL aquagel-OH MIXED 色谱柱(7.5 mm × 300 mm, 8 μ m),流动相 0.05 mol · L⁻¹ Na₂SO₄ 溶液,流速 1.0 mL · min⁻¹,温度 35 °C,进样量 80 μ L,检测器为示差折光检测器。取 XMP-1 样品(质量浓度 1 g · L⁻¹)及标准多糖分别经高效凝胶渗透色谱分析,以对照品的相对分子质量对数与对应的洗脱体积作标准曲线,再根据样品洗脱体积求得其相对分子质量。XMP-1 经过凝胶渗透色谱分析,色谱峰为单一对称峰,可判断为相对分子质量分布均一多糖,见图 1。据标准曲线计算,其相对分子质量为 3 031 Da。

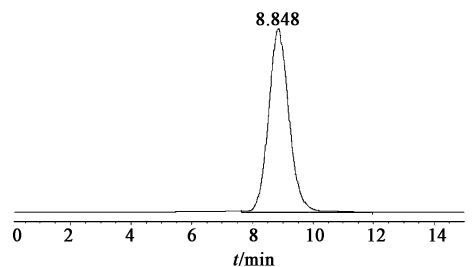


图 1 XMP-1 的凝胶渗透色谱

Fig. 1 HPGFC spectrum of XMP-1

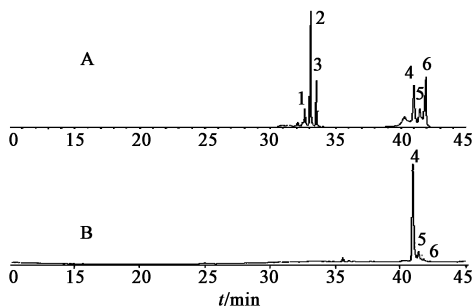
2.4 单糖组成分析^[16]

2.4.1 GC 条件 Zebrom ZB-5MSI 57 型石英毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 cm, 0.25 μ m)。柱初始温度为 50 °C,保持 2 min,以 8 °C · min⁻¹升温,最终温

度为 300 ℃。保持氦气作为载体,进样口温度 250 ℃,分流比 20:1,流速 1 mL · min⁻¹。

2.4.2 衍生物的制备 称取 XMP-1 样品 10 mg,加 2 mol · L⁻¹三氟乙酸 2 mL,100 ℃水解 6 h,除尽三氟乙酸,硼氢化钠还原,吡啶-乙酐酰化。各单糖对照品按照 XMP-1 糖醇衍生物制备的操作步骤制备标准单糖衍生物。

2.4.3 单糖组成测定 将 XMP-1 和混合单糖对照品分别制成糖醇乙酸酯衍生物进行 GC-MS 分析,通过与标准单糖糖醇乙酸酯衍生物出峰顺序、保留时间以及各单糖糖醇乙酸酯衍生物的特征离子碎片比对见图 2,可知 XMP-1 主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,它们的摩尔比为 81.2:5.7:1。



1. 鼠李糖 2. 阿拉伯糖 3. 木糖 4. 甘露糖 5. 葡萄糖 6. 半乳糖
图 2 单糖对照品 (A) 和 XMP-1 水解物 (B) 的糖醇乙酸酯衍生物的 GC-MS 总离子流

Fig. 2 GC-MS total ion chromatogram of glycosyl-alditol cetate derivatives (A) of standard mono-saccharide and XMP-1 (B)

2.5 多糖含量测定^[17] 以甘露糖为对照品,硫酸-苯酚法测定多糖含量。以甘露糖质量为横坐标,吸光度为纵坐标作图,绘制标准曲线,并建立回归方程。通过标准曲线 ($Y = 0.0042X - 0.0275$, $r = 0.9992$) 计算得出仙茅多糖的质量分数为 91.8%。

2.6 糖醛酸性鉴别 采用间羟基联苯法判断 XMP-1 是否含有糖醛酸^[18]。结果表明 XMP-1 不含糖醛酸,XMP-1 为中性杂多糖。

2.7 多糖紫外光谱分析 配制质量浓度为 0.1 g · L⁻¹的 XMP-1 样品,以蒸馏水作空白,进行紫外光谱分析。通过对多糖紫外光谱分析可以确定多糖是否含有核酸、蛋白质和色素等杂质,三者吸收分别位于 260,280,620 nm 处^[19]。采用紫外-可见分光光度计在 200 ~ 700 nm 下对 XMP-1 进行紫外-可见光谱扫描,结果显示 XMP-1 在 3 个杂质峰处基本无吸收,见图 3,说明 XMP-1 不含核酸、蛋白质和色素杂质。

2.8 多糖红外光谱分析 称取 XMP-1 干燥样品约

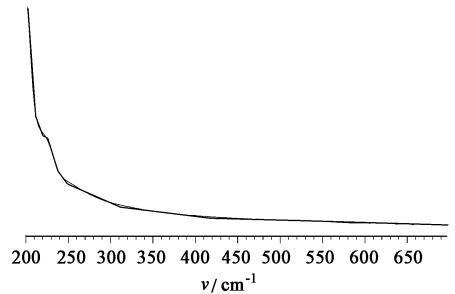


图 3 XMP-1 的紫外光谱
Fig. 3 UV spectrum of XMP-1

1 mg 和 KBr 约 100 mg,红外干燥灯下充分干燥并研磨成粉,压片,用傅里叶红外光谱扫描,扫描范围为 3 500 ~ 500 cm⁻¹,仪器分辨率 2 cm⁻¹。多糖样品的红外分析结果见图 4,3 421 cm⁻¹为多糖分子中羟基的 O-H 键的伸缩振动吸收峰,2 924 cm⁻¹是多糖分子中 CH₃,CH₂,CH 等的 C-H 键伸缩振动吸收峰,1 638 cm⁻¹是多糖分子中结合水的特征吸收峰,1 200 ~ 1 400 cm⁻¹以及 1 100 ~ 1 200 cm⁻¹也具有糖分子 C-H 键和 C-O 键的变角振动的典型吸收峰。此外 872,813 cm⁻¹处具有吡喃环特征吸收峰^[20],表明该多糖分子中具有吡喃结构。

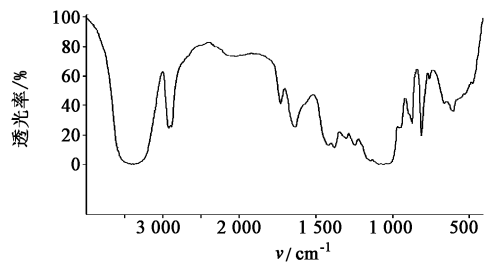


图 4 XMP-1 的红外光谱
Fig. 4 IR spectrum of XMP-1

2.9 多糖的分子构象 称取多糖样品 5 mg 溶于蒸馏水 10 mL 中,配制不同浓度氢氧化钠的多糖-刚果红溶液,依次向试管中加入 50 μmol · L⁻¹的刚果红溶液 0.5 mL,再依次加入 2 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液 0.5,100,150,200,250,300,350,400,450 μL,蒸馏水补充溶液体积至 2 mL,溶液混匀后静置 30 min,测定最大吸收波长 λ_{max},观察多糖-刚果红溶液的最大吸收波长 λ_{max} 的变化情况^[21]。通常认为多糖在水溶液中以一定的分子构象存在,自由卷曲结构,单股螺旋结构以及三股螺旋结构。单股螺旋结构的多糖能与刚果红形成具有特征吸收峰的复合物,而且该复合物的最大吸收波长会随着单股螺旋的增多而变大,即发生红移,自然卷曲结构则没有此特点。碱可使多糖螺旋结构解聚,随着碱浓度的增

大使三股螺旋变为单股螺旋,继而变成无规则自由卷曲,如果多糖具有螺旋结构,多糖与刚果红复合物的最大吸收波长会随着碱浓度的变化而有规律的变化。根据多糖-刚果红溶液最大吸收波长的变化情

况即可推测多糖在水溶液中的分子构象^[22]。由表 1 可知 XMP-1-刚果红复合物的最大吸收波长没有红移现象,其在水溶液分子中的分子构象可能为自然卷曲结构。

表 1 不同浓度 NaOH 下 XMP-1 与刚果红形成复合物最大吸收波长的变化

Table 1 Change of λ_{max} of Cogon red-XMP-1 complex at various concentrations of sodium hydroxide

样品	NaOH/mol · L ⁻¹									
	0	0.5	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45
刚果红对照	485	488	490	485	487	488	488	485	487	485
XMP-1-刚果红复合物	486	487	488	486	488	491	487	485	488	490

3 讨论

本实验的目的是采用有效的提取、分离纯化手段从仙茅中获取结构稳定、相对分子质量分布均一的多糖。所以最终选取了提取条件温和,不易破坏多糖结构的传统水提法。且本实验中采用的多糖提取条件是经正交实验确定的最佳提取条件^[14]。对粗多糖的分离纯化选取了 DEAE-纤维素色谱和凝胶柱色谱,其所得多糖一般纯度较高,可获得不同相对分子质量范围的均一多糖^[23],XMP-1 经纯度鉴定证明纯度较好,说明采取的分纯化方法切实可行。

多糖具有的多种生物活性与其结构、构象等有着密切的关系。关于活性多糖的构效关系研究已成为生命科学的热点领域之一。目前对多糖构效关系的研究主要包括物理性质、一级结构和空间结构与多糖活性的关系^[24]。多糖的物理性质是指多糖的溶解性、黏度、稳定性等特征;多糖的一级结构包括单糖组成、糖苷键连接方式及种类、糖残基顺序等;空间结构包括主链的构象、侧链的空间排布、分子的螺旋情况等复杂结构^[25]。

研究表明,仙茅多糖具有较好的免疫调控功能,在提高免疫力和抗肿瘤方面有较好的开发前景和重要意义^[14, 26-27],而多糖的免疫调节作用首先是通过活性片段与细胞表面的受体相结合而介导免疫反应,其抗肿瘤活性的发挥也与多糖的结构有密切的关系^[28-30],因此仙茅多糖结构分析对探讨多糖功能效应及作用机制起到关键作用。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:94.

[2] 黄有霖. 仙茅的研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(3): 225-228.

[3] Wang Z H, Huang J, Ma X C, et al. Phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* [J]. Fitoterapia, 2013, 86(7): 64-69.

[4] Zuo A X, Shen Y, Jiang Z Y, et al. Two new triterpenoid glycosides from *Curculigo orchioides* [J]. Asian Nat Prod Res, 2012, 14(5): 407-412.

[5] Zuo A X, Shen Y, Jiang Z Y, et al. Three new phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* [J]. Fitoterapia, 2010, 81(7): 910-913.

[6] Zuo A X, Shen Y, Zhang X M, et al. Four new trace phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* [J]. Asian Nat Prod Res, 2010, 12(1): 43-50.

[7] Dall'Acqua S, Shrestha B B, Comai S, et al. Two phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* [J]. Fitoterapia, 2009, 80(5): 279-282.

[8] 季春. 仙茅多糖 COPb-1 和 COPf-1 的分离纯化及结构研究[J]. 贵州化工, 2005, 30(1): 17-19.

[9] Brown G D, Gordon S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans [J]. Nature, 2001, 413(6851): 36-37.

[10] Brown G D, Herre J, Williams D L, et al. Dectin-1 mediates the biological effects of betaglucans [J]. Exp Med, 2003, 197(9): 1119-1124.

[11] Gantner B N, Simmons R M, Canavera S J, et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2 [J]. Exp Med, 2003, 197(9): 1107.

[12] 韩艳萍,赵鲁杭,吴海明. 壳寡糖激活巨噬细胞的机制[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2006, 35(3): 265-268.

[13] 邵力成,尹登科,高向东. 天然多糖免疫细胞受体的研究进展[J]. 药物生物技术, 2006, 13(5): 389-392.

[14] 彭梅,唐建波,肖雄,等. 提取方法对仙茅多糖提取率及抗肿瘤活性的影响[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1985-1988.

[15] 石磊. 几种多糖的分离纯化、结构研究和生物活性研究[D]. 济南:山东大学, 2007.

- [16] 颜军,易勇,邹晓勇,等. 黄芪多糖的相对分子量测定及单糖组成分析[J]. 食品科技, 2012, 37(12): 278-283.
- [17] 孙晓燕,蔡昌利,徐丽莉,等. 多糖含量测定方法的比较[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(3):58-62.
- [18] 陈巧巧,万琴,王振中,等. 人参多糖中糖醛酸含量测定方法的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 121-124.
- [19] 陈帅,许程剑,李应彪,等. 阿魏菇多糖的结构分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(3):29-37.
- [20] 马小双,李程程. 不同种类铁皮石斛及其多糖的红外光谱测定分析[J]. 黑龙江农业科学, 2015(9): 116-118.
- [21] 石磊,韩龙,刘超. 多糖的构象研究方法综述[J]. 曲阜师范大学学报:自然科学版, 2012, 38(3):78-84.
- [22] 徐航,朱锐,刘玮,等. 多糖高级结构解析方法的研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(5):364-369.
- [23] 邹胜,徐溢,张庆. 天然植物多糖分离技术研究现状和进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(8): 1051-1059.
- [24] 黄菊清. 竹茹多糖的化学结构和免疫活性研究[D]. 杭州:浙江大学, 2015.
- [25] 陈海霞. 活性多糖的结构与效应关系[J]. 科学观察, 2013, 8(6):53-55.
- [26] 周勇,张丽,赵离原,等. 仙茅多糖对小鼠免疫功能调节作用实验研究[J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(6): 336-338.
- [27] 余晓红. 仙茅多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(3): 33-35.
- [28] Zhao T, Feng Y, Li J, et al. Schisandra polysaccharide evokes immunomodulatory activity through TLR 4-mediated activation of macrophages [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 65(5): 33-40.
- [29] 芦静波,陈靠山,曹剑峰,等. 多糖抗肿瘤活性及其机制研究[J]. 医学理论与实践, 2015, 28(22): 3048-3050.
- [30] 刘洁,李文香,王文亮,等. 多糖空间结构与生物活性相关性研究进展[J]. 农业机械, 2011(17): 153-155.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为 CSCD 来源期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊,16 开本,234 页,标准刊号 ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号 2-417;国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行,代号 SM4655,欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购,地址:北京市东城区东直门内南小街 16 号,收件人:《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编 100700,Tel:(010)84076882,E-mail:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。