

首乌藤多糖的分离纯化及初步结构解析

张华锋,张杰,刘炯,杨云*,董晶晶
(河南中医学院,郑州 450046)

[摘要] **目的:**精制首乌藤中多糖并对其化学结构进行初步解析。**方法:**经脱脂、水提、分级醇沉、脱色、透析等工艺制备首乌藤粗多糖,通过纤维树脂柱和凝胶柱进行分离和纯化。采用化学分析方法对得到的多糖进行理化性质分析,并通过高效凝胶渗透色谱(HPGPC),气相色谱(GC),紫外光谱(UV)及红外光谱(IR)等对样品进行纯度鉴定、相对分子质量测定、单糖组成及结构分析。**结果:**分离纯化得到 6 种均一多糖(SWTPA-1,SWTPB-1,SWTPB-2,SWTPB-3,SWTPC-1,SWTPC-2),相对分子质量分别为 9 162,56 314,44 502,37 278,40 558,61 000。均不含大分子蛋白质、多肽、核酸、淀粉类物质、酚类化合物,均含有糖类物质的 IR 特征吸收峰。SWTPA-1,SWTPC-1 和 SWTPC-2 为中性多糖,SWTPB-1,SWTPB-2 和 SWTPB-3 可能为酸性多糖,SWTPA-1,SWTPB-1,SWTPB-3,SWTPC-1 和 SWTPC-2 为吡喃糖且含有 β 型糖苷键,SWTPB-2 为吡喃糖且含有 β 型和 α 型 2 种糖苷键,SWTPB-2,SWTPB-3,SWTPC-1 和 SWTPC-2 还含有呋喃糖环。**结论:**首次从首乌藤中分离纯化出了 6 种均一多糖,聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶 S-300 可用于多糖的分离与纯化,糖醇乙酸酯衍生化法可较好地实现首乌藤多糖水解产物的衍生化。

[关键词] 首乌藤;多糖;纯化;结构解析;高效凝胶渗透色谱

[中图分类号] R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0005-04

[doi] 10.11653/syfy2013180005

Seperation, Purification and Structure Analysis of Polysaccharides from Caulis Polygoni Multiflori

ZHANG Hua-feng, ZHANG Jie, LIU Jiong, YANG Yun*, DONG Jing-jing
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To refine and preliminarily analysis chemical structure of polysaccharides from Caulis Polygoni Multiflori. **Method:** Through degreasing, water extraction, classification alcohol precipitation, bleaching, dialysis, crude polysaccharides was prepared, then separated and purified by DEAE 52-cellulose anion exchange column chromatography and Sephacryl S-300 gel permeation chromatography. Physical and chemical properties of polysaccharides were analyzed by chemical methods, purity, relative molecular mass, monosaccharide composition and preliminary chemical structure of polysaccharides were analyzed by high performance gel permeation chromatography (HPGPC), gas chromatography (GC), ultraviolet spectrometry (UV), infared spectroscopy (IR), et al. **Result:** Six homogeneous polysaccharides (SWTPA-1, SWTPB-1, SWTPB-2, SWTPB-3, SWTPC-1, SWTPC-2) were obtained, their relative molecular mass were 9 162, 56 314, 44 502, 37 278, 40 558, 61 000, respectively. All these polysaccharides did not contain macromolecular proteins, peptides, nucleic acids, starches, phenols, but contained IR characteristic absorption peaks of carbohydrates. SWTPA-1, SWTPC-1 and SWTPC-2 were neutral polysaccharide; SWTPB-1, SWTPB-2 and SWTPB-3 may be acidic polysaccharides; SWTPA-1, SWTPB-1, SWTPB-3, SWTPC-1 and SWTPC-2 were pyranose and contained β glycosidic bond; SWTPB-2 was pyranose and contained α and β glycosidic bonds;

[收稿日期] 20130503(026)

[基金项目] 河南省郑州市金水区科技攻关项目(20093543)

[第一作者] 张华锋,硕士,从事中药制剂中活性成分的研究与开发,Tel:13598069935,E-mail:709319243@qq.com

[通讯作者] *杨云,教授,从事中药及中药制剂的活性成分研究,Tel:0371-65680605,E-mail:yyun@china.com.cn

SWTPB-2, SWTPB-3, SWTPC-1 and SWTPC-2 also contained furanose ring. **Conclusion:** Six homogeneous polysaccharides were first separated and purified from Caulis Polygoni Multiflori and their structures were preliminary analyzed, Sephacryl S-300 gel permeation chromatography could be adopted to separate and purify of polysaccharides, sugar alcohol acetate derivatization method could better achieve polysaccharides from Caulis Polygoni Multiflori hydrolyzate derivatization.

[**Key words**] Caulis Polygoni Multiflori; polysaccharides; purification; structure analysis; high performance gel permeation

首乌藤味甘、微苦、性平,归心、肝经,具有养血安神、祛风通络的功能,治疗失眠多梦、血虚身痛、风湿痹痛,外治皮肤瘙痒^[1]。首乌藤多糖具有良好的免疫和抗氧化作用^[2-4]。为探讨首乌藤多糖的生物活性与其化学结构的关系,本实验运用现代波谱和色谱等分析手段对首乌藤多糖类成分进行研究,为首乌藤的加工利用和首乌藤多糖的工业化生产提供实验依据。

1 材料

REVCOL ULT 1386-3-V39 型超低温冰箱(美国 Thermo 公司),BS224S 型 1/万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司),AE240 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司),N-1100-WD 型真空旋转蒸发仪(日本 EYELA 公司),20PR-52D 型高速离心机(日本 Hitachi 公司),UV-1800PC 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),UV-2201 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),ALPHA 1-4 LSC 型冷冻干燥机(德国 Martin Christ 公司),Freeze dryer 18 型冷冻干燥器(美国 Labconco),1200 型高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司),Shimadzu-14B 型气相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),PE spectrum 100 型红外分光光度计(美国 PerkinElmer 公司)。

首乌藤(河南省郑州市张仲景大药房,经河南中医学院生药学教研室董诚明教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥藤茎),葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖对照品(美国 Fluka 公司,批号分别为 410950050, 9317512, 8667799, 7720972, 7686054, 5181540),已知相对分子量的葡聚糖对照品(Dextran-T-800, T-400, T-210, T-110, T-50, T-21, T-11, T-6, 瑞典 Pharmacia 公司,批号分别为 I0112, I0115, I0114, I0113, I0110, I0108, I0107, I0103),透析袋 MD45(美国联合碳化,截留相对分子质量 8 000 ~ 14 000),二乙氨基乙基纤维素(DEAE 52-纤维素,英国 Whatman 公司),聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶 S-300

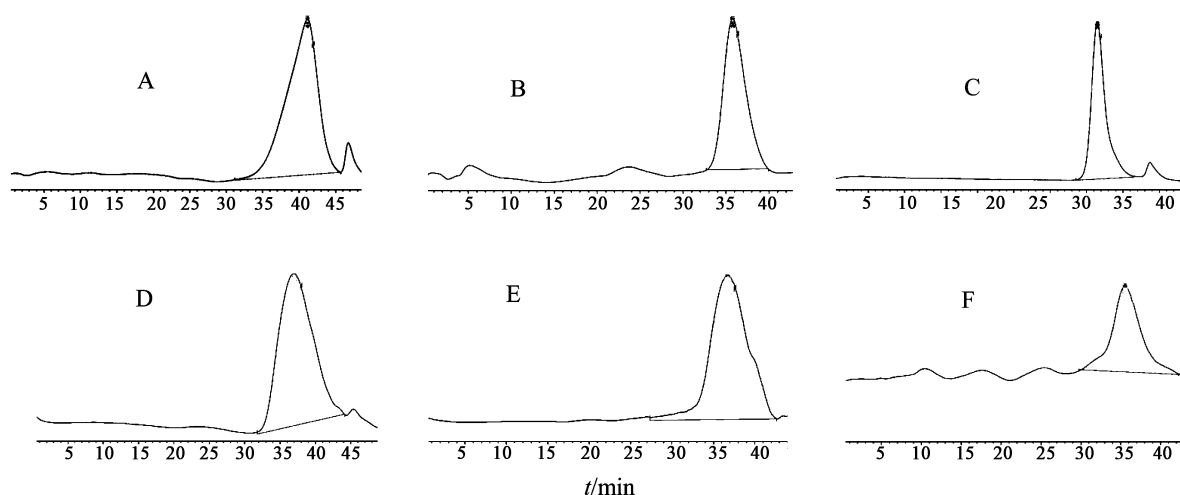
(Sephacryl S-300, 美国 Pharmacia 公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 首乌藤多糖的制备^[5] 取首乌藤药材 1.85 kg,打粉过 20 目筛,加 10 倍量 95% 乙醇于 90 °C 回流提取 3 h,过滤,滤渣加 8 倍量 95% 乙醇回流脱脂 3 h,过滤,药渣自然晾干,加 10 倍量水于 100 °C 水浴回流提取 3 次,每次 2 h,合并滤液,浓缩至料液比 1:1.2 ~ 1:1.5(原料质量-溶液体积),加 95% 乙醇醇沉至含醇量 80%,搅拌均匀,密封,于 4 °C 下静置过夜,离心(10 000 r·min⁻¹, 10 min,下同),依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤沉淀,真空干燥,即得首乌藤粗多糖 133.43 g,多糖得率 7.21%。首乌藤粗多糖复溶成 5% 多糖溶液,经 30%, 50%, 80% 分级醇沉,三氯乙酸脱蛋白,透析处理得首乌藤多糖 9.40 g,多糖得率 5.08%。

2.2 首乌藤多糖的分离纯化 采用 HPGPC 测定多糖纯度^[6-7]。色谱条件为采用两根多糖专用凝胶色谱柱 Ultrahy-drogelTM2000 和 UltrahydrogelTM500 串联(7.8 mm × 300 mm,排阻范围分别为 5 ~ 100 万和 1 000 ~ 10 万),流动相 0.1 mol·L⁻¹ NaNO₃ 溶液,柱温 40 °C,流速 0.5 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测器为示差折光检测器。将首乌藤多糖溶于水中,用 DEAE-52 纤维素柱色谱分离,依次用水和 0.1, 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,以管数为横坐标,苯酚硫酸法测定的吸光度(A)为纵坐标,作洗脱曲线,收集各洗脱峰部位,分别命名为 SWTPA, SWTPB, SWTPC,将洗脱部位上 Sephacryl S-300 凝胶柱,用 0.2 mol·L⁻¹ NaCl 反复洗脱,合并相同峰位的流分,得到 6 个对称的单一峰,见图 1,分别命名为 SWTPA-1, SWTPB-1, SWTPB-2, SWTPB-3, SWTPC-1, SWTPC-2。

2.3 相对分子质量的测定 采用 HPGPC 测定^[8-10]。精密称取 8 个已知相对分子质量的葡聚糖对照品各 2.00 mg,重均相对分子质量分别为 6 000, 11 300, 21 700, 48 800, 113 000, 210 000, 393 000,



A. SWTPA-1; B. SWTPB-1; C. SWTPB-2; D. SWTPB-3; E. SWTPC-1; F. SWTPC-2

图1 首乌藤多糖 HPGPC

805 000, 分别用流动相溶解, 各配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 离心, 取上清液, 每次进样 $20 \mu\text{L}$ 进行 HPGPC 分析, 以标准葡聚糖相对分子质量的对数值对保留时间进行回归处理, 采用 GPC 数据处理专用软件处理, 得线性方程 $Y = -0.147 1X + 10.014$ ($R^2 = 0.995 3$), 多糖样品采用同样方法分析, 计算 6 个多糖样品的相对分子质量分别为 9 162, 56 314, 44 502, 37 278, 40 558, 61 000。

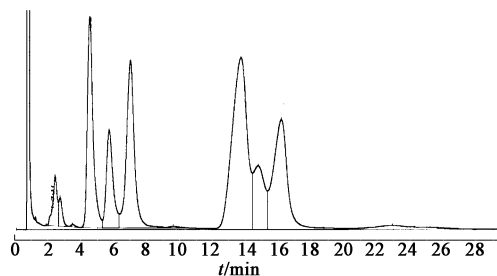
2.4 理化性质分析 三氯化铁反应中 6 个多糖样品溶液均无蓝色变化, 证明样品中不含有酚类化合物; 呋唑硫酸反应时 SWTPA-1, SWTPC-1 和 SWTPC-2 为蓝绿色, 无紫红色变化, 证明样品中无糖醛酸类化合物, 其他样品均有紫红色变化, 证明样品中含有糖醛酸类化合物; 碘-碘化钾反应和双缩脲反应均无颜色变化, 表明样品中不含多肽、蛋白质和淀粉类物质。

2.5 单糖组成分析^[11-13]

2.5.1 单糖样品的制备 精密称取首乌藤多糖 2.00 mg 于鸡心瓶中, 加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 4 mL , 密塞, 置于 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中加热水解 3 h , 水解完毕, 冷却至室温, 溶液于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓缩至干, 分别加甲醇 5 mL 使溶解, 蒸干, 重复操作 $4 \sim 5$ 次, 以完全除去剩余的 TFA, 得单糖样品, 置于真空干燥箱中备用。

2.5.2 色谱条件 Shimadzu-14B 型气相色谱仪, 色谱柱 $5\% \text{ OV-225/AW-DMCS-Chromosorb W}$ 玻璃填充柱 ($3 \text{ mm} \times 2.5 \text{ m}$), 载气氮气, 恒流模式, 流量 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $210 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样室温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测器温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$, 氢火焰离子化检测器 (FID)。

2.5.3 单糖对照品的衍生化 精密称取单糖对照品 (葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、木糖及阿拉伯糖) 各 2.00 mg 于 50 mL 鸡心瓶中, 加水溶解, 加入 $20 \sim 30 \text{ mg}$ 硼氢化钠 (NaBH_4), 间歇振荡, 于室温下进行还原反应 4 h , 用 25% 冰醋酸中和, 加甲醇多次, 减压蒸干以除去副产物硼酸根和水分, 置于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中加热 15 min 以充分除去残留水分, 加入乙酸酐 $3 \sim 5 \text{ mL}$, 密塞, 于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h , 冷却至室温, 加甲苯多次, 每次 3 mL , 反复减压蒸干以除去多余的乙酸酐, 直至完全干燥。将乙酰化后的产物用三氯甲烷 10 mL 萃取, 取三氯甲烷层经等体积水洗涤 4 次, 三氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 避光放置 1 h , 浓缩后 (约 0.2 mL) 进行 GC 分析, 见图 2。



4. 562 min: 鼠李糖; 5. 737 min: 阿拉伯糖; 7. 027 min: 木糖; 13. 732 min: 甘露糖; 14. 765 min: 半乳糖; 16. 174 min: 葡萄糖

图2 混合单糖对照品的 GC

2.5.4 单糖样品的衍生化 将 2.5.1 项下单糖样品按 2.5.3 项下方法进行衍生化反应, 反应产物进行 GC 分析, 将样品与单糖对照品的色谱峰保留时间进行对照, 确定样品中单糖的组成, 采用色谱峰面积归一化法测定样品中单糖的摩尔比, 结果见表 1。

2.6 紫外光谱分析 将 6 个多糖样品溶液利用紫

表 1 多糖样品水解产物的摩尔比测定

样品	摩尔比					
	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	半乳糖	葡萄糖
SWTPA-1	1.0	8.51	1.58	1.80	13.69	2.77
SWTPB-1	3.91	29.84	1.0	1.58	23.62	-
SWTPB-2	2.95	24.85	1.0	2.35	23.36	-
SWTPB-3	2.63	13.47	1.26	1.0	12.86	-
SWTPC-1	1.0	4.38	1.11	-	3.29	-
SWTPC-2	1.0	7.28	1.01	-	4.94	-

外分光光度计进行紫外全波长扫描,结果证明 6 种多糖样品在 260,280 nm 处均未见吸收峰,表明样品中不含大分子蛋白质、多肽和核酸。

2.7 红外光谱分析 将 6 个多糖样品溶液进行红外光谱分析,结果表明均含有糖类物质的特征吸收峰。其中 SWTPA-1, SWTPC-1, SWTPC-2 在 $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ 左右无糖醛酸吸收峰,表明三者为中性多糖; SWTPB-1, SWTPB-2, SWTPB-3 在 $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ 附近有较弱的糖醛酸吸收峰,表明三者可能为酸性多糖; SWTPA-1, SWTPB-1, SWTPB-3, SWTPC-1 和 SWTPC-2 在 $898\sim 867\ \text{cm}^{-1}$ 有吸收峰,表明五者为吡喃糖且含有 β 型糖苷键; SWTPB-2 在 $898\sim 867\ \text{cm}^{-1}$ 及 $852\sim 836\ \text{cm}^{-1}$ 间均有吸收峰,表明其为吡喃糖且含有 β 型, α 型 2 种糖苷键; SWTPB-2, SWTPB-3, SWTPC-1 和 SWTPC-2 在 $796\sim 762\ \text{cm}^{-1}$ 间有吸收峰,表明四者还含有呋喃糖环。

3 讨论

多糖分离纯化最常用的葡聚糖凝胶包括聚丙烯酰胺葡聚糖 (Sephacryl) 和交联葡聚糖 (Sephadex)。Sephacryl 是葡聚糖和甲叉双丙烯酰胺交联而成,是一种较新型的凝胶葡聚糖,具有分离范围面较大、排阻极限远大于 Sephadex 的分离范围、化学稳定性较高、机械性能较好、分辨率较高等优点。

由于多糖自身无足够的挥发性,在进行 GC 分析时,必须对多糖样品进行衍生化处理,而糖醇乙酸酯衍生化法可较好地实现首乌藤多糖样品水解产物的衍生化,衍生物经干燥及三氯甲烷溶解后未出现色谱峰的拖尾现象,且该衍生物制备较为简便,具有试剂易得到、反应时间短、定性简单、定量准确等优

点,适于单糖衍生物 GC 分析的前处理。

[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,2010:248.
- [2] 葛朝亮,刘颖. 何首乌多糖对免疫功能低下小鼠的免疫保护作用[J]. 中国新药杂志,2007,16(24):2040.
- [3] 李晓坤,张华锋,董晶晶,等. 首乌藤多糖对小鼠免疫功能的影响[C]. 杭州:中国药学会,2012-06-21.
- [4] 张寒娟,李晓坤,杨云,等. 首乌藤多糖体内及体外抗氧化活性研究[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(8):668.
- [5] 杨云,张寒娟,许小华,等. 首乌藤多糖的提取工艺研究[J]. 中药材,2009,32(11):761.
- [6] 魏远安,方积年. 高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度及分子量[J]. 药学学报,1989,24(7):523.
- [7] Alsop R M, Vlavoogiannis G J. Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel chromatography on TSK PW tape column [J]. J Chromatogr Sci,1982,24(6):227.
- [8] LIU C P, BAO X F, FANG J N. Retention behaviors of uronic acid-containing polysaccharides and neutral polysaccharides in HPGPC [J]. Chinese Chem Lett, 2001,12(10):909.
- [9] 邹一可,张明月,王彩云,等. 白茅根多糖 IC1 的分离及其相对分子质量和单糖组成的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):80.
- [10] 何立巍,李祥,王洪兰,等. 板蓝根多糖的结构特征及活性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(16):2179.
- [11] Blakeney A B, Harris P J. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis[J]. Carbohydr Res,1983,113(2):291.
- [12] Neeser J R, Schweizer T F. A quantitative determination by capillary gas-liquid chromatography of neutral and amino sugar (as O-methylxime acetates), and a study on hydrolytic condition for glycoproteins and polysaccharides in order to increase sugar recoveries [J]. Anal Biochem,1984,142(1):58.
- [13] 李钟,刘敏,何镇星,等. 玉竹中酸性多糖的分离纯化及单糖组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):69.

[责任编辑 仝燕]