

野菊花多糖的分离纯化及化学组成研究

陆颖¹, 任爱农^{2*}, 李厚兵³, 卢悟广²

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028;
3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的: 从野菊花中分离纯化多糖, 并对其进行相对分子质量测定及单糖组成分析。方法: 经热水提取、乙醇沉淀、大孔吸附树脂 LSA-21 脱色与 Sevag 法除蛋白, 再经 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G75 凝胶色谱分离纯化得到野菊花多糖。采用高效凝胶过滤色谱法 (HPGPC) 分析其相对分子质量, 并借助衍生化气相色谱法 (GC) 对其单糖组成进行解析。结果: 从野菊花中得到 3 个均一多糖 CIP-1', CIP-2' 和 CIP-3'。结论: CIP-1' 的相对分子质量为 8 242 Da, 由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖 6 种单糖组成, 摩尔比为 0.75:1.48:1.96:0.72:1.80:3.00; CIP-2' 的相对分子质量为 8 383 Da, 由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖 6 种单糖组成, 摩尔比为 1.17:1.19:0.23:0.56:1.70:2.20; CIP-3' 的相对分子质量为 19 201 Da, 由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖 5 种单糖组成, 摩尔比为 2.40:1.43:3.84:7.45:5.10。红外光谱表明, 三者均为吡喃糖。

[关键词] 野菊花; 多糖; 高效凝胶过滤色谱; 衍生化气相色谱; 红外光谱; 化学组成

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0139-05

Purification and Chemical Composition of Polysaccharides from *Chrysanthemum indicum*

LU Ying¹, REN Ai-nong^{2*}, LI Hou-bing³, LU Wu-guang²

(1. College of Pharmaceutical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;
3. College of Pharmaceutical Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the purification and chemical composition of polysaccharides from *Chrysanthemum indicum*. **Method:** Polysaccharides were extracted from *C. indicum* with hot water, followed by precipitating with ethanol, decolorizing with LSA-21 and removing of free protein by the method of Sevag, and finally separated into three fractions CIP-1', CIP-2' and CIP-3' by DEAE-52 cellulose anion exchange and Sephadex G75 gel column chromatograph. **Result:** The relative molecular weight (Mw) of CIP-1' was estimated to be about 8, 242 Da by using high-performance gel permeation chromatography (HPGPC), while that of CIP-2' was 8, 383 Da and of CIP-3' was 1.9201×10^5 Da. According to GC analysis, CIP-1' was composed of six kinds of monosaccharides, namely rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose in the molar ratio of 5.44:16.40:20.35:3.53:15.43:21.46, following that CIP-2' was composed of the same kinds of monosaccharides in the molar ratio of 8.47:13.17:2.43:2.75:14.51:15.76. However, CIP-3' was composed of rhamnose, arabinose, mannose, glucose and galactose in a molar ratio of 17.46:15.88:18.90:63.76:36.44. The FT-IR spectrum of the three also indicated typical characteristics of polysaccharides. **Conclusion:** This study provided experimental basis for the development of polysaccharide resources from *C. indicum*.

[Key words] *Chrysanthemum indicum*; polysaccharide; HPGPC; GC; IR; chemical composition

[收稿日期] 20120629(015)

[第一作者] 陆颖, Tel:025-85639647, E-mail:lysmile2010@yahoo.cn

[通讯作者] * 任爱农, Tel:025-85639640, E-mail:lyyy-0@126.com

野菊花为菊科植物野菊的干燥头状花序,具有清热解毒、凉肝明目、降血压之功效,用于疔疮肿痛、目赤肿痛、头痛眩晕^[1]。目前,对野菊花的研究多集中于其小分子物质及药效作用^[2-3]。国内对其中大分子物质野菊花多糖的研究,主要在提取工艺、含量测定、脱色工艺和活性研究等方面^[4-7],对于其结构的研究,仅见金红英等^[8]提取纯化得到 1 个野菊花中性多糖 CIP-C。本研究通过对野菊花多糖的提取纯化,得到 3 个多糖组分,并对这些组分进行相对分子质量测定及单糖组成分析,为进一步研究野菊花多糖提供参考。

1 材料

野菊花购自南京药业股份有限公司,经江苏省中医药研究院任爱农教授鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* Ramat 的干燥头状花序;大孔吸附树脂 LSA-21 购自西安蓝晓科技有限公司,DEAE-52 纤维素购自 Whatman 公司,Sephadex G75 购自 Pharmacia 公司,右旋糖酐对照品 D 2, D 3, D 4, D 5, D 6, D 7, D 8, D 2000 购自中国药品生物制品检定所(相对分子质量分别为 4 600, 7 100, 10 000, 21 400, 41 100, 84 400, 13 380, 2 000 000 Da, 供相对分子质量测定用);D-葡萄糖, L-鼠李糖, L-阿拉伯糖, D-木糖, D-甘露糖 D-半乳糖, D-果糖(供含量测定用)购自 Sigma 公司;透析袋(截留相对分子质量为 7 000)购自上海绿鸟科技发展有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂), R-200 型旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司), HHS-1 型电热恒温水浴锅(上海浦东荣丰科技仪器有限公司), DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司), MILLI-Q 型纯水器(美国 MILLI-Q 公司), VirTis Benchtop SLC 型冻干机(美国 VirTis 公司), Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Waters 2414 型示差折光检测器(美国 Waters 公司), TSK-GEL3000 SW 型凝胶色谱柱(7.8 mm × 300 mm, 10 μm)(日本 TOSOH 公司), HP 6890 气相色谱仪(美国 Agilent 公司), Lambda 25 型紫外-可见分光光度计(PerkinElmer 公司, 美国), MPA 型多功能傅立叶变换近红外光谱仪(布鲁克光谱仪器公司, 德国)。

2 方法与结果

2.1 野菊花多糖的提取及分离纯化^[9] 取干燥的野菊花药材 500 g, 加入 32 倍量的蒸馏水, 于 90 °C 水浴中不断搅拌提取 1 h, 然后过滤, 重复提取 3 次。

合并 3 次滤液, 浓缩, 加乙醇沉淀(乙醇体积分数为 80%), 经大孔树脂脱色、Sevag 法除游离蛋白、透析及真空冷冻干燥, 得到野菊花无蛋白粗多糖粉末 CIP。

将得到的粉末用蒸馏水溶解后, 经 DEAE-52 阴离子交换树脂柱, 依次用 0.05 mol·L⁻¹ NaCl, 0.10 mol·L⁻¹ NaCl, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱, 得到 CIP-1, CIP-2, CIP-3。CIP-1 经 Sephadex G75 凝胶柱色谱, 以 0.05 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱, 每管自动部分收集 3.0 mL, 硫酸-蒽酮法跟踪检测, 合并单一峰, 透析, 真空冷冻干燥得纯化的多糖 CIP-1'。CIP-2 和 CIP-3 的处理过程同上, 分别得到 CIP-2' 和 CIP-3'。结果见图 1。

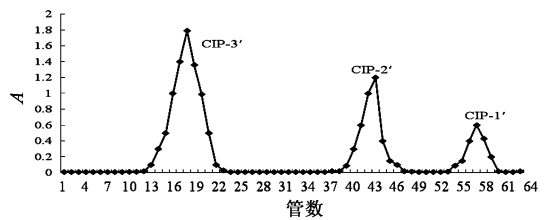


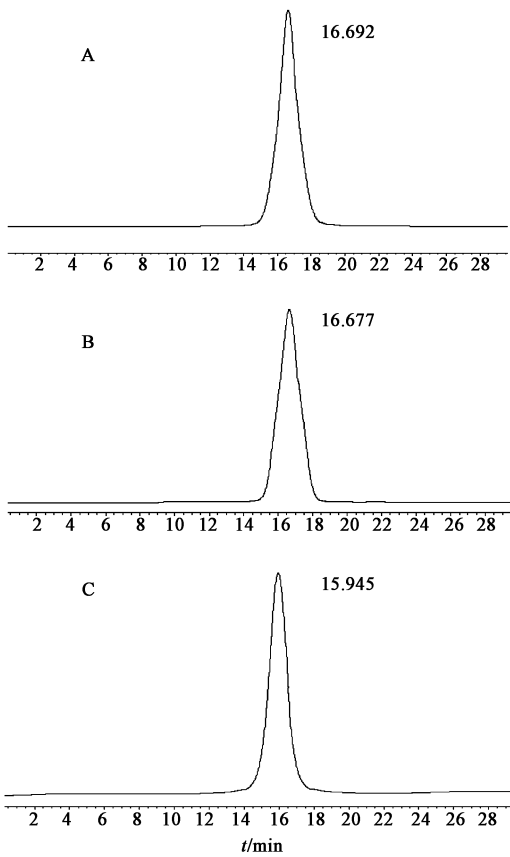
图 1 野菊花多糖粗品经 Sephadex G75 凝胶柱色谱的洗脱曲线

由图 1 可见, 野菊花粗多糖经 Sephadex G75 凝胶柱分离后, 得到 CIP-1', CIP-2', CIP-3' 3 个相对独立的多糖组分。结果显示三者均为单峰, 且峰形基本对称。因此, 可认为分离得到的 CIP-1', CIP-2', CIP-3' 均为单一纯品多糖。

2.2 多糖的均一性和相对分子质量 采用高效凝胶渗透液相色谱法(HPGPC)。色谱条件^[10]: TSK-GEL3000 SW 型凝胶过滤色谱柱(7.8 mm × 300 mm, 10 μm), 流动相为 0.71% 硫酸钠溶液, 柱温 35 °C, Waters 2414 型示差折光检测器(检测器温度 35 °C), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 进样体积 10 μL。见图 2。

分别取 CIP-1, CIP-2, CIP-3 各 5 mg, 溶解于 5 mL 0.71% 硫酸钠, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, HPGPC 进行分析。在相对分子质量测定中, 以右旋糖酐对照品 D 2 ~ D 2000 和 D-葡萄糖相对分子质量的对数值(LogM)为纵坐标, 相应色谱峰的保留时间(t_R)为横坐标, 建立校正曲线。经测定, 校正曲线为 LogM = -0.491 7t_R + 12.123 5(R² = 0.999 3)。

图 2 中, 由 HPGPC 测定的结果可见, 经过 G75 凝胶柱洗脱, CIP-1', CIP-2', CIP-3' 均成单一对称峰, 证明是均一多糖。根据右旋糖酐对照品及葡萄糖制定的标准曲线, 经计算, CIP-1' 的相对分子质量



A. CIP-1'; B. CIP-2'; C. CIP-3'

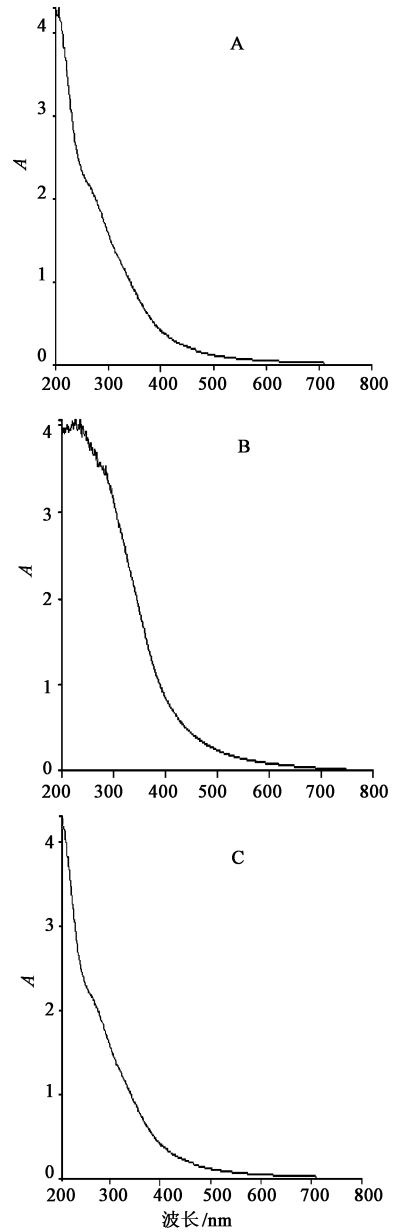
图2 野菊花纯多糖 HPGPC

为 8 242 Da, CIP-2' 的相对分子质量为 8 383 Da, CIP-3' 的相对分子质量为 19 201 Da。

2.3 光谱分析 分别将 CIP-1', CIP-2', CIP-3' 配制成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 采用紫外-可见分光光度仪在 200 ~ 800 nm 进行扫描。取干燥的 CIP-1', CIP-2', CIP-3' 各 2 mg 与 KBr 研磨后压片, 用 MPA 多功能傅立叶变换近红外光谱仪在 $4\ 000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 内扫描。

图 3 中, CIP-1', CIP-2', CIP-3' 的紫外扫描图谱相似, 结果显示在 280, 260 nm 处无明显吸收, 表明三者均不含蛋白质及核酸。

图 4 中, $3\ 600 \sim 3\ 200 \text{ cm}^{-1}$ 的宽峰是由多糖分子内或分子间氢键 O-H 伸缩振动引起的, $3\ 000 \sim 2\ 800 \text{ cm}^{-1}$ 出现的峰是次甲基 (-CH₂) 中 C-H 的伸缩振动结果, $1\ 333 \text{ cm}^{-1}$ 左右不太尖的吸收峰是 C-H 的变角振动, 它和 C-H 的伸缩振动一起构成了多糖的特征吸收; $1\ 630 \sim 1\ 510 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是羰基的 C=O 非对称伸缩振动或形成了结晶水, $1\ 420 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是羰基的 C=O 非对称伸缩振动, 这两组峰的存在说明有 -COO 基团; $1\ 250 \sim 950$

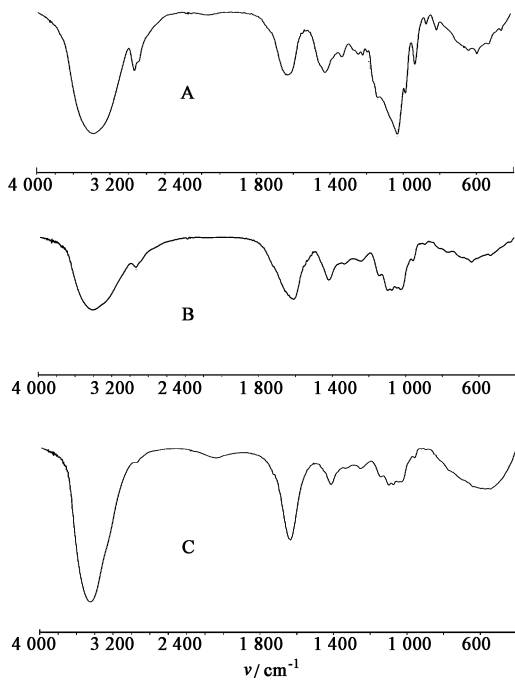


A. CIP-1'; B. CIP-2'; C. CIP-3'

图3 野菊花纯多糖紫外-可见吸收光谱

cm^{-1} 的吸收峰是吡喃糖环醚键 (C-O-C) 和羟基的特征吸收峰; $(891 \pm 7) \text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰是由 β -端基差向异构的 C-H 变角振动引起。在图 4A 中, 936.4 cm^{-1} 处的吸收峰由吡喃环非对称伸缩振动引起, 而 $874.9, 818.5 \text{ cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰可能是甘露糖残基吸收峰; 在图 4B 中, 767.8 cm^{-1} 吸收峰归因于吡喃环的对称伸缩振动。综上所述, CIP-1' 为吡喃糖, CIP-2' 和 CIP-3' 为 β -吡喃糖。

2.4 CIP-1', CIP-2', CIP-3' 的单糖组成分析 按照文献[11]糖腈乙酸酯衍生化的方法, 分析多糖的单糖组成。



A. CIP-1'; B. CIP-2'; C. CIP-3'

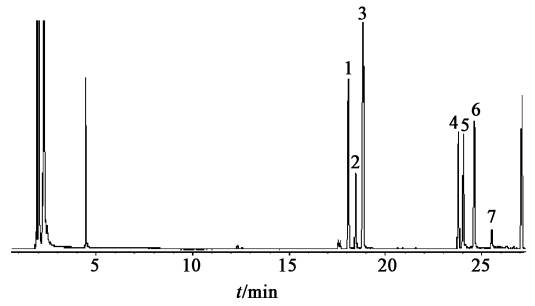
图 4 野菊花纯多糖红外吸收光谱

2.4.1 多糖的水解 分别称取 15.19 mg CIP-1', 14.22 mg CIP-2' 和 14.99 mg CIP-3' 于安瓿瓶中, 加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 (TFA) 3.0 mL, 充氮气封管后置于 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥箱中水解 6 h。取出冷却, 离心后取上清液, 减压蒸干, 反复用甲醇溶解蒸干以除去残留的 TFA, 真空浓缩至干, 分别得单糖样品 11.88, 10.98, 11.68 mg, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

2.4.2 糖腈乙酸酯衍生化 精密称取葡萄糖 10.14 mg、木糖 10.14 mg、半乳糖 10.15 mg、阿拉伯糖 10.09 mg、鼠李糖 10.16 mg、果糖 10.18 mg、甘露糖 10.11 mg 及 CIP-1' 单糖 11.88 mg、CIP-2' 单糖 10.98 mg 和 CIP-3' 单糖 11.68 mg, 分别放入具塞试管中, 加入 10 mg 盐酸羟胺、内标肌醇六乙酸酯 2.5 mg 和 0.5 mL 无水吡啶, 充分振荡溶解, 于 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴反应 30 min 并振荡, 取出冷却到室温, 加入 0.5 mL 无水醋酸酐, 在 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中乙酰化反应 30 min。乙酰化产物减压蒸干后加入 1.0 mL 氯仿溶解, 经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜过滤除去不溶物, 滤液进行 GC 分析。

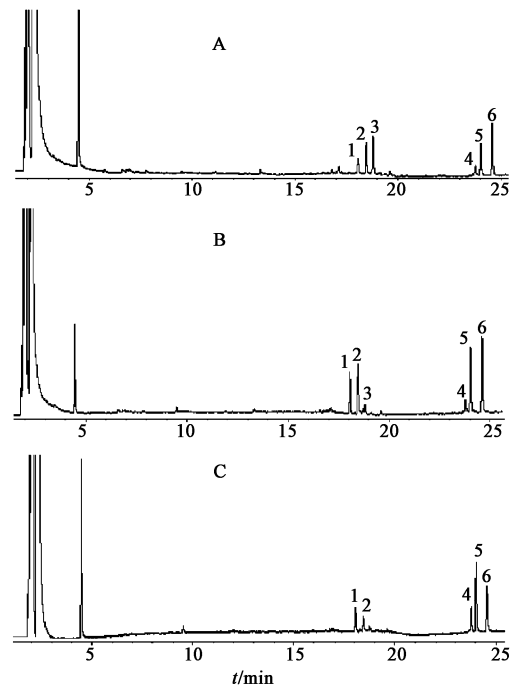
2.4.3 GC 分析条件^[12] HP-5 毛细管色谱柱 ($0.32 \text{ nm} \times 30 \text{ mm}, 0.25 \text{ } \mu\text{m}$); 载气为高纯氮气, 氮气体积流量 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 氢气体积流量 $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 空气体积流量 $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 程序升温 $100 \text{ }^\circ\text{C} (5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}) \sim 190 \text{ }^\circ\text{C} (4 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}) \sim 240 \text{ }^\circ\text{C} (5 \text{ min})$, 进样口温度 $200 \text{ }^\circ\text{C}$, 分流比 150:1, FID 检测

器, 气化室温度 $260 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $2 \text{ } \mu\text{L}$ 。分析结果见图 5~6。



1. 鼠李糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 木糖; 4. 甘露糖;
5. 葡萄糖; 6. 半乳糖; 7. 果糖(图 6 同)。

图 5 标准单糖混合物的气相色谱



A. CIP-1'; B. CIP-2'; C. CIP-3'

图 6 野菊花纯多糖气相色谱

2.4.4 标准单糖的相对校正因子 标准单糖相对校正因子的计算公式如下:

$$f = \frac{W_i/W_s}{A_i/A_s}$$

W_i 为标准单糖质量; W_s 为内标物质量; A_i 为标准单糖峰面积; A_s 为内标物峰面积。

2.4.5 多糖中各单糖物质的量之比的计算 由以下公式求得各单糖物质的量, 进而求出它们物质的量之比。

$$N = \frac{A_s}{A_i} \cdot \frac{f}{M_i}$$

N 为单糖物质的量; A_x 为单糖峰面积; A_s 为内标物峰面积; f 为该单糖的校正因子; M_r 为该单糖的相对分子质量。

2.4.6 结果 CIP-1'由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖 6 种单糖组成,摩尔比为 0.75:1.48:1.96:0.72:1.80:3.00; CIP-2'由 6 种单糖组成,分别为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖,摩尔比为 1.17:1.19:0.23:0.56:1.70:2.20; CIP-3'由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖 5 种单糖组成,摩尔比为 2.40:1.43:3.84:7.45:5.10。

3 讨论

红外光谱法在研究糖类物质结构中,主要用来确定常规官能团、识别呋喃糖和吡喃糖、确定糖苷键的构型,还可用于不同糖的组成鉴别。3 种纯化多糖的红外光谱在 3 600~3 200, 3 000~2 800, 1 400~1 200 cm^{-1} 区域中均出现了糖类的特征吸收峰,也证明了三者的组成单糖以吡喃环的形式存在,且存在-COO 基团。其中, CIP-2' 和 CIP-3' 具有明显的 β -吡喃糖特征吸收。

从单糖组成来看, CIP-1' 主要由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖组成,仅含少量的鼠李糖和甘露糖,其中半乳糖含量最高; CIP-2' 主要含鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖,半乳糖也占主导地位;而在 CIP-3' 中,主要含葡萄糖、半乳糖和甘露糖,其中葡萄糖含量最高。

本文确定了野菊花多糖的相对分子质量、单糖组成及相应的环形式,关于糖链结构及生物活性还需进一步深入的研究。

[参考文献]

[1] 吴明侠,杨晶凡. 野菊花的研究现状与前景[C]. 西

宁:药用植物化学与中药资源可持续发展学术研讨会,2009.

- [2] 吴钉红,杨立伟,苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材,2009,27(2): 142.
- [3] 吴婷妮,李俊,余长柱. 菊花和野菊花中 9 种黄酮类化合物的含量[C]. 广州:中国药理学会第十一次全国学术会,2011.
- [4] 黄家利,张红梅,徐秀泉. 正交设计法优化野菊花多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):30.
- [5] 房海灵,郭巧生,申海进. 响应面法优化野菊花多糖含量测定的前处理条件[J]. 中国中药杂志,2009,34(7):1665.
- [6] 李厚兵,任爱农,邹义芳. 大孔吸附树脂纯化野菊花多糖工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):49.
- [7] 李贵荣. 野菊花多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 中国公共卫生,2002,18(3):269.
- [8] 金红英,施松善,王顺春,等. 野菊花中性多糖 CIP-C 的分离纯化及结构解析[J]. 高等学校化学学报,2012,33(4): 755.
- [9] 张艳萍,俞远志,张虹. 气相色谱分析生地黄多糖的单糖组成及其含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(4):419.
- [10] Ling C W, Kun Z, Liu Qing D, et al. Isolation and structural elucidation of novel homogenous polysaccharide from *Mactra veneriformis*[J]. Carbohydr Polym, 2011,86:982.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州:浙江大学出版社,2001:38.
- [12] Y Junyi, L Huixia, L Jing, et al. Structural characterization of a highly branched polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. [J]. Carbohydr Polym,2012,87:2416.

[责任编辑 邹晓翠]