

刺糖多糖的分离纯化与结构分析

菅丽君¹, 常军民^{2*}, 李改茹¹ (1. 新疆产品质量监督检验研究院, 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 分离纯化刺糖多糖, 并对刺糖多糖的结构进行分析。方法 采用水提醇沉法提取刺糖多糖, 联合使用大孔吸附树脂、纤维素和葡聚糖凝胶柱色谱对刺糖多糖进行分离纯化, 采用凝胶过滤法测定其纯度和相对分子质量, 气相色谱法分析其单糖组成, 再通过部分酸水解、高碘酸氧化、Smith 降解和核磁共振分析其结构。结果 经分离纯化得到多糖组分 AP1-1; 纯度测定表明其为均一多糖, 相对分子质量约为 99.7×10^3 ; 其单糖组成为甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 物质的量比为 1.10:2.19:4.32; 主链由 $\rightarrow 4$)- β -D-GalpA-(1 \rightarrow , $\rightarrow 4$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 4, 6$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 组成, 支链由 $\rightarrow 6$)- α -D-Glcp 和 2-OCH₃- α -D-Man 组成。结论 多糖 AP1-1 是一个有分枝的杂多糖。

关键词:刺糖; 多糖; 分离; 纯化; 结构分析

doi:10.11669/cpj.2013.07.004 中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2013)07-0505-04

Isolation, Purification and Structural Elucidation of Polysaccharide from *Saccharum Alhagi*

JIAN Li-jun¹, CHANG Jun-min^{2*}, LI Gai-ru¹ (1. Xinjiang Uygur Autonomous Region Product Quality Supervision and Inspection Institute, Urumqi 830002, China; 2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To isolate and purify the polysaccharide from *Saccharum Alhagi*, and to clarify its chemical structure. **METHODS** Water extracting-alcohol precipitating method was applied to extract polysaccharide from *Saccharum Alhagi*. Macroporous adsorption resin chromatography, DEAE cellulose chromatography and Sephadex gel chromatography were applied to fractionalize and purify the polysaccharide. The homogeneity and molecular weight of the polysaccharide were determined by gel filtration. The monosaccharide composition of the polysaccharide was identified by gas chromatography (GC). Partial acid hydrolysis, periodate oxidation, smith degradation and NMR were used to analyze the chemical structure of the polysaccharide. **RESULTS** Polysaccharide fraction AP1-1 was got from *Saccharum Alhagi*. The analysis results show that AP1-1 was a homogeneous polysaccharide and its molecular weight was 99.7×10^3 . AP1-1 was composed of mannose, glucose, galactose with molar ratio of 1.10:2.19:4.32. The main chain of AP1-1 was mainly made up of $\rightarrow 4$)- β -D-GalpA-(1 \rightarrow , $\rightarrow 4$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow and $\rightarrow 4, 6$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow . The side chain was composed of $\rightarrow 6$)- α -D-Glcp and 2-OCH₃- α -D-Man. **CONCLUSION** *Saccharum Alhagi* polysaccharide AP1-1 is a complicated heteropolysaccharide with multi-branches.

KEY WORDS: *Saccharum Alhagi*; polysaccharide; isolation; purification; structural elucidation

刺糖为豆科植物骆驼刺 (*Alhagi pseudalhagi*, Desv) 枝叶的分泌液凝结而成的糖粒, 呈圆球形小颗粒, 色黄白, 味甜, 是维吾尔医常用药材, 至今临床仍在应用, 具有整肠止痛、祛痰止咳、滋补强壮、精液浓缩、益精壮阳之功效。维吾尔医称其“性热而燥”, 可以开塞通窍, 强壮身体, 常将之与其它药材配伍, 用于治疗痢疾、腹泻、血尿等疾病。刺糖的药用历史十分悠久, 《本草纲目》中称刺糖“甘平无毒, 清热解毒, 消肿止痛”, 并把刺糖列为药中上品。有研究表

明, 刺糖的主要化学成分为多糖^[1], 因此本实验对刺糖中的多糖进行研究, 选择合适的分离纯化方法, 得到纯度较好的多糖组分, 并对其进行结构分析, 可为今后进一步开发利用维药刺糖奠定基础。

1 材料、试剂与仪器

刺糖(于2009年10月购于新疆乌鲁木齐市维吾尔药店, 产地为吐鲁番, 经新疆医科大学生药教研室帕丽达教授鉴定为维吾尔药材刺糖, *Alhagi-honey*)。

基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2009S49); 新疆医科大学科研创新基金(2007214)

作者简介:菅丽君, 女, 硕士, 助理工程师 研究方向: 食品质量监督 * 通讯作者: 常军民, 男, 博士, 教授 研究方向: 天然药物的研究与开发 Tel: (0991)4366620 E-mail: cjmjcn2471@ yahoo. com. cn

葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖(分析纯);葡聚糖 T5, 葡聚糖 T10, 葡聚糖 T40, 葡聚糖 T70, 葡聚糖 T500, 蓝色葡聚糖(上海源叶生物科技有限公司);体积分数 95% 乙醇(分析纯), DEAE-52 纤维素填料(美国 Whatman 公司), Sephadex G-150 填料(Pharmacia 公司), 透析袋(北京经科宏达公司, 截留相对分子质量为 500 和 3 000), 其他试剂均为分析纯。

冷冻干燥仪(FDU 2000, 上海爱朗仪器有限公司), 紫外-可见分光光度仪(Lab-tech 9100 D, 北京莱伯泰科公司), 气相色谱仪(SHIMADZU GC-2010, 日本岛津公司), 核磁共振光谱分析仪(Varian Vnmrs 600, 美国瓦利安公司)。

2 实验方法

2.1 刺糖多糖的提取、分离和纯化

将刺糖药材置于圆底烧瓶中, 按药材-石油醚 = 1:3(体积比), 60 °C 回流提取 2 h, 进行脱脂; 过滤, 按滤渣-乙醇 = 1:3, 80 °C 回流提取 2 h, 以除去小分子醇溶物; 过滤, 滤渣挥干溶剂, 按滤渣-水 = 1:9, 70 °C 回流提取 1.5 h, 提取 2 次, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 加入体积分数 95% 乙醇至最终醇浓度为 80%, 5 °C 静置 24 h, 抽滤, 收集沉淀, 以 Sevag 法进行除蛋白, 重复操作 10 次, 浓缩, 冻干。

除蛋白后的多糖样品以蒸馏水溶解, 质量浓度为 50 mg · mL⁻¹, 上 AB-8 大孔吸附树脂柱, 以除去色素及蛋白质, 蒸馏水洗脱, 收集、合并洗脱液, 浓缩, 上 DEAE-52 纤维素柱, 分别以蒸馏水、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol · L⁻¹ 的 NaCl 溶液梯度洗脱, 得到各洗脱组分, 将 NaCl 溶液洗脱部分对蒸馏水透析除盐。再将各洗脱组分分别上 Sephadex G-150 葡聚糖凝胶柱, 以蒸馏水洗脱, 得到各精制多糖组分, 其中含量最高的为多糖 AP1-1。

2.2 纯度鉴定^[2]

取多糖 AP1-1 样品 5 mg, 溶解于 1 mL 的蒸馏水中, 上 Sephadex G-150 凝胶柱色谱(1.0 cm × 50 cm), 以蒸馏水洗脱, 硫酸-萘酚法跟踪检测, 绘制洗脱曲线, 观察洗脱曲线峰形判断多糖 AP1-1 纯度是否均一。再将多糖 AP1-1 配制成质量浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的水溶液, 在 190 ~ 800 nm 内进行紫外-可见吸收光谱的扫描, 检测杂质含有情况。

2.3 相对分子质量测定

样品和不同相对分子质量的葡聚糖标准品分别经 Sephadex G-150 凝胶柱色谱, 由标准品的相对分

子质量对数和保留时间得到标准曲线, 再根据样品的保留时间求得样品的相对分子质量。

2.4 单糖组成测定

参照文献[3]中的实验步骤, 采用气相色谱法对多糖 AP1-1 进行单糖组成测定。气相色谱条件为: Rtx-5 毛细管柱(30 m × 0.25 μm); 氢火焰离子化检测器(FID); 高纯氮气为载气; 1 μL 进样量; 30:1 的分流比; 进样口温度为 250 °C; 检测器温度为 280 °C; 柱箱温为起始温度 150 °C, 保持 4 min, 程序升温 5 °C · min⁻¹, 终止温度 160 °C, 保持 10 min, 再程序升温 20 °C · min⁻¹, 终止温度为 200 °C, 保持 26 min。

2.5 部分酸水解^[4]

多糖 AP1-1 样品经 0.05 mol · L⁻¹ 的三氟醋酸水解后进行透析, 袋内和袋外部分经糖脲乙酰化反应后进行 GC 分析。

2.6 高碘酸氧化和 Smith 降解

参照文献[3]对多糖 AP1-1 进行高碘酸氧化和 Smith 降解, 产物经糖脲乙酰化反应后进行 GC 分析。

2.7 NMR 分析

取 40 mg 多糖 AP1-1, 充分溶解于 0.6 mL 重水中, 进行核磁共振分析, 分析温度为 301.1 K, 测定样品的¹H-NMR、¹³C-NMR、H-H COSY、HSQC 和 HMBC 图谱。

3 结果与讨论

3.1 刺糖多糖的分离纯化

刺糖经水提醇沉法得到粗多糖, 提取率为 10.2%; Sevag 法除蛋白, 收率为 85.78%; 后经 DEAE-52 柱色谱和 Sephadex G-150 柱色谱分离纯化得到精制多糖组分 AP1-1, 为刺糖总多糖中含量最高的多糖组分, 约占总多糖的 51%。

3.2 刺糖多糖的理化性质

刺糖多糖 AP1-1 为白色粉末状固体, 质轻, 无味, 易溶于水、DMSO, 不易溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂, 比旋光度为 +35.54 (*c* = 1.0, H₂O); Molish 反应为阳性, 说明为糖类物质; Felling 反应为阴性, 说明不含有游离的小分子还原性糖; 茚三酮反应为阴性, 说明不含有蛋白质。

3.3 纯度鉴定和相对分子质量测定

多糖 AP1-1 的凝胶过滤色谱法洗脱曲线形态对称, 峰形锐利, 说明纯度较好, 相对分子质量分布较为均一。其紫外-可见吸收光谱在 200 nm 处有一较

强吸收峰,为多糖特征吸收峰;在 260 和 280 nm 处(核酸和蛋白质的特征吸收区)无明显紫外吸收峰,因此可推断多糖样品中基本不含有核酸和蛋白质等杂质。凝胶过滤色谱法测定多糖 AP1-1 相对分子质量约为 99.7×10^3 。

3.4 单糖组成测定

在规定色谱条件下,得到混合标准单糖的气相色谱图(图 1A)和多糖 AP1-1 水解产物的气相色谱图(图 1B),多糖 AP1-1 的单糖组成为甘露糖、葡萄糖和半乳糖,以标准曲线法计算其物质的量比为 1.10:2.19:4.32。

3.5 部分酸水解

AP1-1 部分酸水解袋内部分含有葡萄糖和半乳糖,袋外部分含有甘露糖、葡萄糖和半乳糖,说明多糖 AP1-1 的主链单糖残基可能为葡萄糖和半乳糖,末端和分支单糖残基可能为甘露糖、葡萄糖和半乳糖。

3.6 高碘酸氧化和 Smith 降解^[5-6]

多糖 AP1-1 经高碘酸氧化反应后生成甲酸,说明其结构中可能含有 1→6 或 1→糖苷键;但消耗高碘酸钠的量与生成甲酸的量之比明显大于 2:1,说明还可能大量消耗高碘酸钠但不生成甲酸的 1→2 糖苷键、1→2,6 糖苷键、1→4 糖苷键、1→4,6 糖苷键或呋喃型 1→糖苷键;多糖中所含单糖的量与消耗的高碘酸钠的量之比为 R ,多糖 AP1-1 的 R 值约等于 1,说明可能只存在少量或不存在不消耗高碘酸钠的 1→3 糖苷键。

多糖 AP1-1 的 Smith 降解产物通过 GC 分析检测到乙二醇、丙三醇和丁四醇(赤藓醇),说明其结构中可能含有 1→糖苷键,1→6 糖苷键,1→2 糖苷键,1→2,6 糖苷键,1→4 糖苷键和 1→4,6 糖苷键。

3.7 核磁共振分析

多糖 AP1-1 的 ^{13}C -NMR 谱(图 2)显示,在 $\delta 90 \sim 110$ 的异头碳信号区出现了 $\delta 103.63, 103.61, 100.23, 92.12, 91.68$ 5 个成苷碳信号峰,推测可能

含有 5 种单糖残基;在 $\delta 170 \sim 180$ 区域出现的信号为糖醛酸的羰基信号峰^[7]。

多糖 AP1-1 的 ^1H -NMR 谱(图 3)显示,大部分质子信号出现在 $\delta 3.0 \sim 4.5$,是典型的多糖信号;在 $\delta 4.5 \sim 5.5$ 的成苷碳原子上质子的信号区只出现了 $\delta 5.03, 5.25, 5.29$ 3 个质子信号,说明可能含有 3 种单糖残基,这与碳谱得出的信息不符,推测可能是 $\delta 4.6$ 处出现的水峰遮盖了部分成苷碳原子上质子的信号或是部分糖残基的成苷碳原子上的质子被取代了,须通过二维核磁共振谱对多糖 AP1-1 的氢谱进行进一步归属。

结合 AP1-1 的 ^1H - ^1H COSY 谱(图 4A)、HSQC 谱(图 4B)和文献信息^[3,8-10]对多糖 AP1-1 的核磁信号进行归属见表 1。

在 AP1-1 的 HMBC 谱(图 4C)中, β -D-GalpA 的 C-1 ($\delta 103.63$) 与另一 β -D-GalpA 的 H-4 ($\delta 3.80$) 远

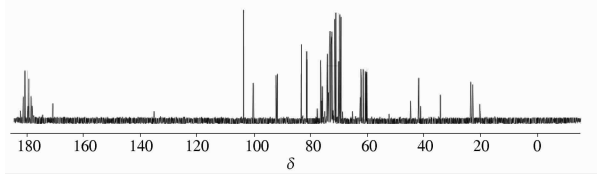


图 2 AP1-1 的 ^{13}C -NMR 谱

Fig. 2 ^{13}C -NMR Spectrum of AP1-1

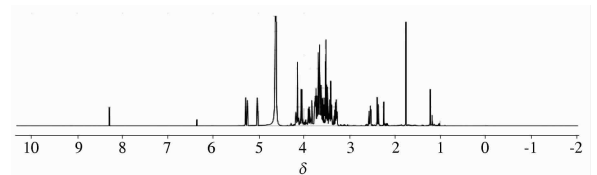


图 3 多糖 AP1-1 的 ^1H -NMR 谱

Fig. 3 ^1H -NMR Spectrum of AP1-1

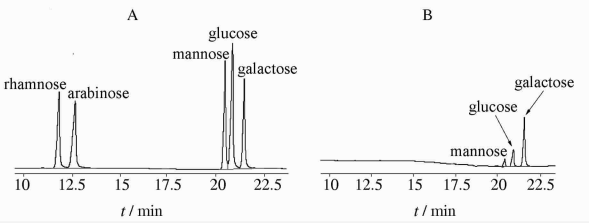


图 1 混合标准单糖(A)和 AP1-1 水解产物(B)的气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograms of mixed standard monosaccharides (A) and hydrolyzed AP1-1 (B)

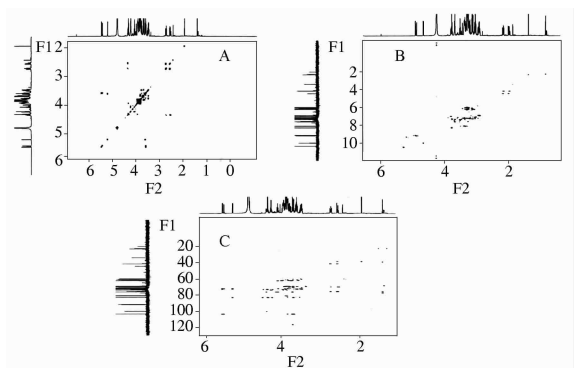


图 4 AP1-1 的 ^1H - ^1H COSY 谱(A), HSQC 谱(B)、HMBC 谱(C)

Fig. 4 ^1H - ^1H COSY (A), HSQC (B) and HMBC (C) spectrum of AP1-1

程相关,说明 β -D-GalpA 之间以 1 \rightarrow 4 糖苷键相连,还与 β -D-Galp 的 H-4 (δ 3.74) 远程相关,说明 β -D-GalpA 与 β -D-Galp 之间以 1 \rightarrow 4 糖苷键相连; β -D-Galp 的 C-1 (δ 103.61) 与另一 β -D-Galp 的 H-4 (δ 3.74) 远程相关,说明 β -D-Galp 之间以 1 \rightarrow 4 糖苷键相连,还与 α -D-Glcp 的 H-6(δ 3.33) 远程相关,说明 β -D-Galp 与 α -D-Glcp 之间以 1 \rightarrow 6 糖苷键相连; α -D-Glcp 的 C-1 (δ 100.23) 与另一 α -D-Glcp 的 H-4 (δ 4.18) 远程相关,说明 α -D-Glcp 之间以 1 \rightarrow 4 糖苷键相连接,还与 2-OCH₃- α -D-Man 的 H-4(δ 3.36)

远程相关,说明 α -D-Glcp 与 2-OCH₃- α -D-Man 之间以 1 \rightarrow 4 糖苷键相连。

4 结论

结合单糖组成分析、部分酸水解、高碘酸氧化、Smith 降解和 NMR 分析得到的信息,推测出多糖 API-1 的主链由 \rightarrow 4)- β -D-GalpA-(1 \rightarrow , \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 和 \rightarrow 4,6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 组成,支链由 \rightarrow 6)- α -D-Glcp 和 2-OCH₃- α -D-Man 组成;可能的化学结构式见图 5(多糖结构式中 a-b-c \approx 2:2:1)。

表 1 API-1 的 NMR 数据

Tab. 1 NMR Data of API-1

Sugar residues		1	2	3	4	5	6
\rightarrow 4)- β -D-GalpA-(1 \rightarrow	C	103.63	71.45	72.15	81.12	75.75	179.50
	H	-	3.43	3.81	3.80	3.91	
\rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	C	103.61	74.92	76.36	81.29	75.74	61.96
	H	5.29	3.55	4.07	3.74	3.92	3.65
\rightarrow 4,6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow	C	100.23	72.34	72.00	83.18	70.93	68.59
	H	4.67	-	3.77	4.18	3.41	3.33
\rightarrow 6)- α -D-Glcp	C	92.12	71.39	72.74	69.62	70.00	69.44
	H	5.25	3.45	3.63	4.19	4.21	4.20
2-OCH ₃ - α -D-Man	C	91.68	81.19	71.00	69.16	73.21	62.15
	H	5.03	3.79	3.44	3.36	4.18	3.70

注: - 不能确切归属的信息

Note: - - not definite

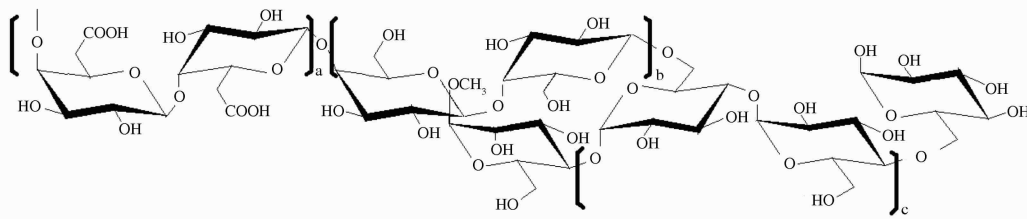


图 5 API-1 的化学结构式

Fig. 5 The chemical structure of API-1

REFERENCES

[1] JIAN L J, LI G R, CHANG J M. Determination of monosaccharide composition in polysaccharide of alhagihoney by pre-column derivatization-high performance capillary electrophoresis [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2012, 21(5): 79-81.

[2] YAN J C, CUI C Y, ZHANG Y, et al. Separation, purification and structural analysis of polysaccharides from aloe [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2003, 24(7): 1189-1192.

[3] ZHANG W J. *Biochemistry Research Technology of Complex Carbohydrate* (糖复合物生化研究技术) [M]. Vol 2. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2003: 38-40; 140-141; 245-252.

[4] MO Z C, WU L F, YANG J. Studies on separation, purification and structure characteristics of a polysaccharide LTC-II from *Pyrola corbieri* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(12): 1633-1636.

[5] CHEN X M, WANG C L, WANG A R, et al. Study on polysaccharides in dendrobium officinale protocorm [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2011, 46(20): 1552-1556.

[6] TENG H Y, ZHANG X, WANG B, et al. Structural analysis of polysaccharide isolated from *Coriolus unicolor* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2007, 42(14): 1059-1062.

[7] ZHANG J S, HAN W W, PAN Y J, et al. Studies on chemical structure of polysaccharide from fruit body of *Coriolus Versicolor* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(9): 664-667.

[8] YU D Q, YANG J S. *Handbook of Analytical Chemistry / Seventh Fascicule* (分析化学手册) [M]. Vol 7. Beijing: Chemical Industry Press, 1999: 901-904.

[9] HUO X, LIANG Z Y, ZHANG Y Y, et al. Structure investigation of water soluble polysaccharide CTP isolated from the *Carthamus tinctorius* L [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2005, 26(9): 1656-1658.

[10] WANG S C, SHI S S, CUI J, et al. Isolation and structure analysis of a hetero-polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv) Diels [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2007, 42(16): 1255-1257.

(收稿日期: 2012-06-17)