

新疆雪莲水溶性多糖的分离纯化及组成分析

刘春兰^{1*}, 邓义红¹, 杜宁¹, 徐桂云²

¹中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081; ²中国科学院化学研究所, 北京 100080

摘要:为合理利用雪莲提供一定依据,对新疆天然雪莲进行多糖提取分离纯化。新疆天然雪莲经热水浸提,乙醇沉淀得粗多糖。粗多糖经 Sevage法和酶法联合脱蛋白,酸性乙醇分级,得初步纯化的多糖 XL₁, XL₂, XL₃。其中 XL₃经 DEAE-Sephadex A25 分离纯化得纯化多糖 XL₃₁。XL₃₁经检测为纯多糖。气相色谱分析表明新疆天然雪莲多糖 XL₁, XL₂, XL₃ 和 XL₃₁ 均为 Ara, Rha, Xyl, Gal, Glc, GaA 六种单糖组成的酸性杂多糖,但单糖的摩尔比不同。

关键词:雪莲;多糖;分离纯化;组成

中图分类号: Q539; R284.2

文献标识码: A

Isolation, Purification and Composition Analysis of Water-soluble Polysaccharide from Xinjiang *Saussurea involucrata*

L U Chun-lan^{1*}, DENG Yi-hong¹, DU Ning¹, XU Gui-yun²

¹College of Life and Environmental Science, Central University For Nationalities, Beijing 100081, China; ²Institute of Chemistry Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

Abstract: To provide scientific cue for the use of *Saussurea involucrata*, the crude polysaccharide was extracted from *Saussurea involucrata* with hot water, and precipitated by ethanol. The crude polysaccharide has been eliminated protein and fractionated by acidic ethanol. Three fractions XL₁, XL₂, and XL₃ were gotten respectively. By using DEAE-Sephadex A-25 gel filtration, XL₃₁ was gotten. GC analysis indicated that XL₁, XL₂, XL₃ and XL₃₁ were composed of Ara, Rha, Xy, Gal, Glc and GaA. But their molar ratios are different.

Key words: *Saussurea involucrata*; polysaccharide; isolation purification; composition

雪莲 (*Saussurea involucrata* Kar et Kir) 系菊科凤毛菊属的高山草本植物,是我国民族药中有代表性的珍稀名贵药材。雪莲生长在海拔 4800~5800 m 的高山流石坡以及雪线附近的碎石间,难以采集,系国家 3 级濒危物种。雪莲的化学成分主要有:黄酮类化合物,糖类,萜类及其衍生物,甾体成分,木脂素^[1]。目前对野生和离体培养雪莲中主要活性物质黄酮类化合物的检测研究较多,对其他药效上有独特作用的活性成分如多糖等研究较少,仅有少量报道^[2-5]。本文对产于新疆和静县的新疆雪莲进行水溶性多糖提取,纯化,并进行多糖的组成分析。为进一步探讨雪莲多糖的药理活性,进一步完善雪莲多糖的质量评价体系 and 合理利用新疆雪莲提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

新疆天然雪莲 (*Saussurea involucrata* Kar et Kir) 地上部分,由中央民族大学生命与环境科学学院杨林老师鉴定,购自新疆和静县。

标准单糖样品:葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、半乳糖醛酸(生化试剂,西格玛化学公司)。

GC-2010 型毛细管气相色谱仪(日本岛津); 722 型光栅分光光度计(上海分析仪器总厂); UV-Jasco53 型紫外分光光度计(日本岛津); FC-95A 馏分自助收集器(上海青浦沪西仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 雪莲粗多糖的提取

准确称取干燥的雪莲,加入 95% 的乙醇回流脱脂后,85℃ 水浴加热水提乙醇沉淀,95% 乙醇、无水乙醇洗沉淀去除单糖,离心,真空干燥后得去除单糖的新疆天然雪莲多糖粗品 (XJXL)。

收稿日期: 2007-07-24 接受日期: 2008-01-08

基金项目: 国家“985”工程——中央民族大学“985”工程重点科研项目 (cun985-3-3)

* 通讯作者 86-10-68156198; E-mail: liuchunlan888@yaho.com.cn

1.2.2 雪莲粗多糖的确认及性质

硫酸 呋唑反应^[6]:糖醛酸与呋唑反应,生成紫红色化合物。

费林试剂反应^[7]:还原糖中的还原性醛基可以将费林试剂中的 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ ,从而生成红色的沉淀。

取粗多糖水溶液 10 mL,加入过量的斐林试剂煮沸 2 min,将产生的红色沉淀趁热除去,滤液加入硫酸酸化,加热煮沸 10 min后用 10%氢氧化钠中和,再加入一定量斐林试剂,加热煮沸,观察是否有砖红色沉淀。

碘 碘化钾反应:取粗多糖水溶液 10 mL,加入碘化钾 碘试剂。

苯酚 硫酸反应^[8]:五碳糖类以及它们的双糖类均能被硫酸分解成糠醛,六碳糖类以及它们的双糖类同样地被分解成羟甲基糠醛。这些糠醛类化合物与苯酚作用产生橘红色缩合物。

1.2.3 雪莲粗多糖的分离纯化

1.2.3.1 脱蛋白^[9] (酶法和 Sevage法联合脱蛋白)

称取一定量的粗多糖,溶解于蒸馏水中配成 2%溶液,加入链酶蛋白酶(日本进口生化试剂;蛋白酶 = 50 1),在溶液的上层加几滴甲苯(防腐),37 保温 3 h。加入 1/3 体积氯仿与正丁醇混合液(氯仿 正丁醇 = 4 1),摇晃振荡 20 min,3500 r/min 离心分离 10 min,取水相,重复上述步骤几次,直到无游离蛋白,常规干燥,得多糖,由紫外光谱法鉴定结合蛋白的有无。

1.2.3.2 酸性乙醇分级^[10]

将新疆天然雪莲脱蛋白后的多糖配成 2%溶液, pH = 2.5 的酸性乙醇分级,具体步骤如下:

2%新疆天然雪莲脱蛋白后多糖的水溶液中加入 pH = 2.5 的 95%乙醇至醇浓度达 30%,离心沉淀常规干燥,得多糖 XL_1 。上清液中继续加入如上乙醇至醇浓度达 50%,离心沉淀常规干燥,得多糖 XL_2 。上清液中继续加入如上乙醇至醇浓度达 75%,离心沉淀常规干燥,得多糖 XL_3 。上清液用 2 mol/L 的 NaOH 调节至 pH = 6~7,离心,无沉淀生成。

1.2.3.3 纯化多糖制备

加乙醇至醇浓度 70%以上所得干燥后沉淀采用 DEAE-SephadexA-25 分离纯化,用 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,流速 0.75 mL/min,分部收集。

1.2.4 纯化多糖的纯度鉴定

1.2.4.1 纸层析^[11]

滤纸:新华 1 号中速滤纸 (15 cm × 40 cm),展开剂:正丁醇 浓氨水 水 = 60 40 5 (v v v),展开时间:7 h,染色剂:0.5%甲苯胺蓝乙醇溶液、95%乙醇漂洗脱色。

1.2.4.2 醋酸纤维薄膜电泳^[8]

试剂:0.025 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH = 12.5, 染色剂:0.5%甲苯胺蓝乙醇溶液,电压 250 V,电泳时间 30 min。

1.2.4.3 SepharoseCL-4B (1.5 cm × 90 cm) 柱层析^[8]

取 5 mg 多糖配成 10 mg/mL 0.5 mL 上样, 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱,流速 0.45 mL/min,每管 2 mL 收集,苯酚 硫酸法检测。

1.2.5 雪莲水溶性多糖 XL_3 的分子量测定^[12]

用 0.5 mL 水溶解 5 mg 标准葡聚糖上样,以 SepharoseCL-4B (90 cm × 1.5 cm) 层析, 0.1 mol/L NaCl 洗脱,流速为 0.22 mL/min,分部收集,苯酚 硫酸法测多糖分布,用已知相对分子质量的标准葡聚糖 (M 2000, 1000, 500, 70, 40 kD) 以洗脱体积为横坐标,相对分子质量对数值为纵坐标,绘制 $\lg M - V_e$ 标准曲线。

同样条件下测定 XL_3 的洗脱体积,与标准曲线对照,求出相对分子质量。

1.2.6 雪莲多糖的组成分析——GC 方法

甲醇解及硅烷化处理^[13]:彻底干燥的糖样 10 mg,加入 1 mol/L 盐酸 无水甲醇 2 mL,充 N_2 封管,80 甲醇解 20 h,冷至室温后,用 KOH 甲醇中和至 pH = 6,然后 40 减压旋转蒸干,真空干燥过夜。向彻底干燥的甲醇解产物中加入 0.2 mL 无水吡啶(内含饱和甘露醇做内标),75 溶解 30 min,然后加入 0.3 mL 硅烷化试剂(六甲基二硅胺烷:三甲基氯硅烷 = 2 1)摇匀,静止几分钟,即可取上清进行分析。与标准糖对照定性,归一法定量^[8]。

GC 条件^[14]:OV-210 毛细管柱 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm);柱温 100 250,程序升温 5 /min;载气:氢气;流速:1.5 mL/s;检测器:FD。

2 结果与分析

2.1 雪莲粗多糖的提取及理化性质

在提取条件下,新疆天然雪莲粗多糖 (XJXL) 的提取为 15.9%。

XJXL是一种灰褐色粉末状固体,无味,溶于水,不溶于乙醇,乙醚,丙酮,氯仿等有机溶剂。碘-碘化钾实验无蓝色现象,说明XJXL不含有淀粉。苯酚-硫酸反应产生橘红色缩合物,费林试剂反应说明XJXL含有还原糖。硫酸-吡啶反应生成紫红色化合物,可以鉴别XJXL含有糖醛酸,说明XJXL为酸性多糖。

2.2 新疆天然雪莲粗多糖的纯化

2.2.1 脱蛋白

按酶法和Sevage法对新疆天然雪莲水溶性粗多糖联合脱蛋白,得脱蛋白后多糖,其回收率为63.44%。

脱蛋白前后XJXL经紫外可见分光光度计扫描,结果见图1、2。XJXL脱蛋白后在280 nm处无特征吸收峰,说明此多糖是不含蛋白的多糖。

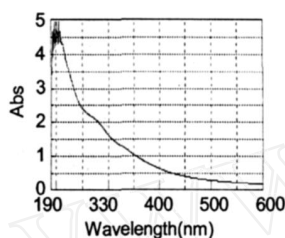


图1 多糖XJXL经脱蛋白前的紫外可见光谱图

Fig. 1 UV spectrum of XJXL

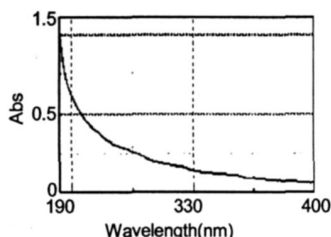


图2 新疆天然雪莲粗多糖经脱蛋白后的紫外光谱图

Fig. 2 UV spectrum of XJXL after eliminating protein

2.2.2 酸性乙醇分级

多糖XJXL脱蛋白后经酸性乙醇分级得到三个级分,在pH=3~4的30%乙醇浓度下沉淀得多糖XL₁。在pH=4~6的50%乙醇浓度下沉淀得多糖XL₂,在pH=6~7沉淀得多糖XL₃。分别占粗多糖的80.73%,2.74%,16.52%。

2.2.3 DEAE-Sephadex A25纯化

将三个级分经Sephrose CL-4B柱层析,苯酚-硫酸法检测多糖分布,结果表明多糖XL₁,XL₂分子量分布范围较宽,多糖XL₃分子量分布范围较窄,在粗多糖中所占比例相对较大,所以本实验选择多糖

XL₃作为进一步纯化的对象。

多糖XL₃经DEAE-Sephadex A-25柱层析纯化,0.5 mol/L NaCl洗脱峰形相对较窄,且糖含量高。故实验采用0.5 mol/L NaCl为洗脱液。

在0.5 mol/L NaCl为洗脱液条件下,根据硫酸-苯酚法检测的结果合并相同峰位的组分,减压浓缩至适当体积,常规干燥制备得多糖XL₃₁。

2.3 雪莲水溶性多糖XL₃₁的纯度鉴定及分子量确定

XL₃₁经Sephrose CL-4B (1.5 cm × 90 cm)柱层析,苯酚-硫酸法检测得一单一对称峰,醋酸纤维薄膜电泳呈单一谱带,纸层析呈单一斑点。说明它是均一的纯多糖。用凝胶洗脱法与标准葡聚糖对照测XL₃₁的分子量约为170万。

2.4 雪莲多糖的组成分析

雪莲多糖XL₁,XL₂,XL₃和XL₃₁甲醇解及硅烷化处理,经GC分析,与标准单糖谱图(图3~5和表1~3)比较,结果见图6~9和表4~7。

表1 标准单糖 Ara, Xyl, Gal, Glc对应的峰高位置

Table 1 Monosaccharides of sugar standers of Ara, Xyl, Gal and Glc

单糖 Sugar	峰位 Peaks No
Ara	1, 2, 3, 4
Xyl	5, 6, 7, 8
Gal	9, 10, 11
Glc	12, 13, 14, 15

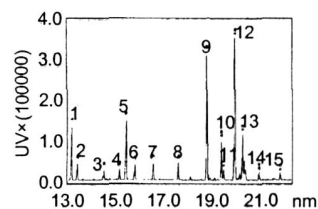


图3 单糖 Ara, Xyl, Gal, Glc标样的 GC谱图

Fig. 3 Gas chromatogram of sugar standers of Ara, Xyl, Gal and Glc

表2 标准单糖 Rha和 Man对应的峰高位置

Table 2 Monosaccharides of sugar standers of Rha and Man

单糖 Sugar	峰位 Peaks No
Rha	1, 2, 3, 4, 5
Man	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

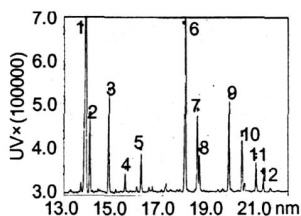


图 4 单糖 Rha, Man 标样的 GC 谱图

Fig. 4 Gas of chromatogram of sugar standers of Rha and Man

表 3 单糖 Rha 和 Man 组成对应的峰高位

Table 3 Monosaccharides of sugar standers of Rha and Man

单糖 Sugar	峰位 Peaks No
Gal-A	1, 2, 3, 4, 5, 6

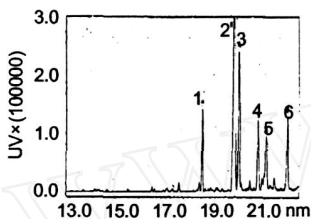


图 5 单糖 Gal-A 标样的 GC 谱图

Fig. 5 Gas of chromatogram of sugar standers of Gal-A

表 4 XL₁ 中各单糖组成对应的峰高位

Table 4 Monosaccharides of XL₁

单糖 Sugar	峰位 Peaks No
Ara	1, 2, 5, 7
Rha	3, 4, 6, 10
Xyl	8, 9
Gal	13, 14
Glc	17, 18, 20
Gal-A	11, 12, 15, 19, 21

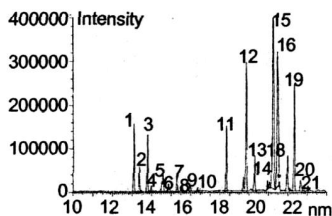


图 6 XL₁ 的气相谱图

Fig. 6 GC of chromatogram of XL₁

表 5 XL₂ 中各单糖组成对应的峰高位

Table 5 Monosaccharides of XL₂

单糖 Sugar	峰位 Peaks No
Ara	1, 2, 5, 7
Rha	3, 4, 6, 10
Xyl	8, 9
Gal	13, 14
Glc	17, 18, 20
Gal-A	11, 12, 15, 16, 19, 21

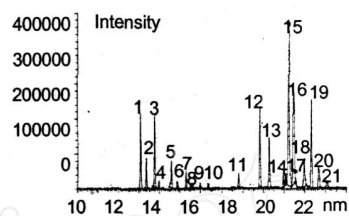


图 7 XL₂ 的气相谱图

Fig. 7 GC of chromatogram of XL₂

表 6 XL₃ 中各单糖组成对应的峰高位

Table 6 Monosaccharides of XL₃

单糖 Sugar	峰位 Peaks No
Ara	1, 2, 5, 7
Rha	3, 4, 6, 10
Xyl	8, 9
Gal	13, 14, 19
Glc	17, 18, 21
Gal-A	11, 12, 15, 16, 20, 22

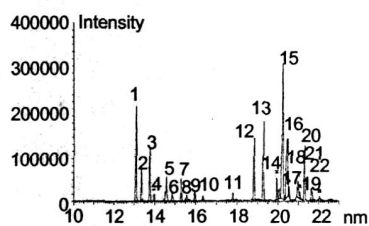


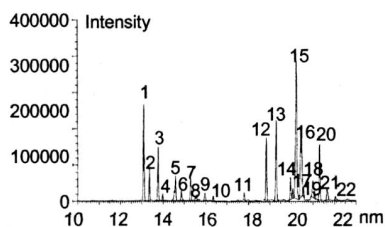
图 8 XL₃ 的气相谱图

Fig. 8 GC of chromatogram of XL₃

表 7 XL₃₁ 中各单糖组成对应的峰高位

Table 7 Monosaccharides of XL₃₁

单糖 Sugar	峰位 Peaks No
Ara	1, 2, 5, 7
Rha	3, 4, 6
Xyl	8, 9
Gal	12, 14, 15, 16, 17, 22, 23
Glc	11, 20, 21, 25, 26
Gal-A	10, 13, 18, 19, 24,

图 9 多糖 XL₃₁ 的 GC 谱图Fig. 9 Gas of chromatogram of XL₃₁

XL₁, XL₂, XL₃ 三个级分单糖组成相同,均由半乳糖醛酸(GaA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)六种单糖残基组成的酸性杂多糖。但各单糖摩尔比不同,半乳糖醛酸(GaA)占的比例最大,其次是阿拉伯糖(Ara)。结果见表 8。

表 8 多糖 XL₁, XL₂ 和 XL₃ 的单糖组成摩尔比Table 8 Monosaccharides and proportion of single sugar from XL₁, XL₂ and XL₃

多糖种类 Type	Xyl (mol)	Ara (mol)	Rha (mol)	Gal (mol)	Glc (mol)	GaA (mol)
XL ₁	1.0	6.6	2.4	1.8	2.4	61.4
XL ₂	1.0	10.0	4.5	4.5	4.0	65.0
XL ₃	1.0	8.4	2.3	4.7	1.7	29.8

多糖 XL₃₁ 经甲醇解硅烷化处理后进行 GC 和酸水解 PC 分析。结果表明,多糖 XL₃₁ 单糖组成为 Xyl Ara Rha Gal Glc GaA, 摩尔比为 1 11 4 18 3 9。XL₃₁ 是由六种单糖残基组成的酸性杂多糖,半乳糖(Gal)占的比例最大,其次是阿拉伯糖(Ara)。

3 结论

本实验通过对新疆天然雪莲经热水浸提,乙醇沉淀得粗多糖。粗多糖经 Sevage 法和酶法联合脱蛋白,得到的多糖进行酸性乙醇分级,得多糖的三个级分 XL₁, XL₂, XL₃。其中 XL₃ 经 DEAE-Sephadex A25 进一步纯化得纯化多糖 XL₃₁。气相色谱分析表明天然雪莲多糖 XL₁, XL₂, XL₃ 和 XL₃₁ 均为 Ara Rha Xyl Gal Glc GaA 六种单糖残基组成的酸性杂多糖,但单糖的摩尔比不同。

新疆天然雪莲多糖 XL₃₁ 为首次从新疆天然雪莲中分离得到的均一多糖,为结构的测定和生物活性的研究提供了依据。

参考文献

1 Zhao GH (赵国华). Advance in bioactive polysaccharides

Food Fement Indus(食品与发酵工业), 2001, 27 (7): 45-48

2 Research group on reproductive physiology, department of physiology(基础部生理教研组长生理研究组). Experimental observation on the termination of pregnancy by the andrographis herb (*Andrographis paniculate* N.). *Peking Med Coll*(北京医学院学报), 1996. 4.

3 Research group on phamacology, department of foundation (基础部药理研究室), research on phamacology of Xuelian *Peking Med Coll*(北京医学院学报), 1997. 1.

4 Fang X (方溪), Wen ZY (温志永), Ye WS (叶伟胜), et al Xuelian extract anti-fertility effect of experimental observation *J Tianjin Med Coll*(天津医学院学报), 1983, 1: 41-45.

5 Zheng RL (郑荣梁), Liu GS (刘光顺), Xing GX (邢光新), et al Bracteaata snow lotus polysaccharide free radical scavenging capacity and anti-fatigue effects *Acta Pham Sinica*(中国药理学报), 1993, 14 (suppl): 47-49.

6 Dalian Institute of Light Industry (大连轻工业学院). Food analysis (食品分析). China Light Industry Publishing House, 1994. 65-68.

7 Chen YZ (陈耀祖). Organic Analysis (有机分析). Beijing: Higher Education Press, 1981. 55-58.

8 Zhang WJ (张惟杰主编). Polysaccharide complex biochemical technology, Zhejiang (糖复合物生化研究技术). Zhejiang University Press, 1994. 11-12, 209-212, 110, 65-68, 6.

9 Liu CM (刘成梅), Wan Y (万茵), Tu ZC (涂宗财), et al Study on method to remove protein from lily-polysaccharides *Food Sci*(食品科学), 2002, 23: 89-90.

10 Fu MH (傅明辉). Study on isolation, purification, analysis of the components and anti-oxidation activity of the polysaccharides of the fruits of *Hippophae rhamnoides* *Food Sci*(食品科学), 2002, 23(3): 73.

11 Ruan QP (阮期平), Gao CJ (高长健), Li HL (李华隆), et al Isolation, purification and physicochemical properties of the polysaccharide fi from *Aconitum camichaeli* Debx *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(5): 46.

12 Fang JN (方积年). The extraction, purification and identification of the purity and molecular weight detemination *Chin Pham J* (中国药学杂志), 1984, 19(10): 46-48.

13 Shi DC (石德成), Zhang YS (张翼伸). Pre-treatment of the carbohydrate analysis by gas chromatography-methyl glucoside fomation *Anal Chem* (分析化学), 1983, 11: 193-196.

14 Luo QY (罗秦英), Wang XM (王晓美), Jin JQ (靳菊情), et al The chemical study of polysaccharide of *Alectoria jubarta* *Northwest Pham J* (西北药学杂志), 1998, 13: 105-107.