

白背三七多糖的分离纯化

刘微微, 刘旭, 曹学丽*

(北京工商大学食品学院, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京 100048)

摘要: 采用D315弱碱性阴离子交换树脂和Sephadex G-25凝胶柱层析, 从白背三七叶粗多糖中分离纯化得到中性多糖GDPs-1、GDPs-2及酸性多糖GDPs-3 3个多糖组分。经高效凝胶色谱测定, 重均分子量分别为: 1.06×10^4 、 4.17×10^3 D和 3.74×10^3 D; 纯度分别为94.08%、92.3%和99.8%。红外光谱证明3种多糖均含有多糖类特征吸收峰, 初步推测GDPs-1中 α 和 β 构型并存, GDPs-2和GDPs-3为 α 构型; 核磁共振结果进一步证实3种多糖中均只含有 α 构型。

关键词: 白背三七; 多糖; 分离纯化; 红外光谱; 构型; 核磁共振

Separation and Purification of Polysaccharides from Leaves of *Gynura davaricata* (L.) DC.

LIU Wei-wei, LIU Xu, CAO Xue-li*

(Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Two neutral polysaccharides (GDPs-1 and GDPs-2) and one acidic polysaccharide (GDPs-3) were separated and purified from water-soluble crude polysaccharide from the leaves of *Gynura davaricata* (L.) DC. by D315 resin column and subsequent Sephadex G-25 gel column chromatography. GPC analysis showed that the average molecular weights of GDPs-1, GDPs-2 and GDPs-3 were 1.06×10^4 , 4.17×10^3 D, and 3.74×10^3 D with a purity of 94.08%, 92.3% and 99.8%, respectively. Infrared spectra preliminarily confirmed that the purified fractions were polysaccharides. GDPs-1 was characterized as α - and β -configuration, and GDPs-2 and GDPs-3 as α -configuration. Nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) results further proved that the polysaccharides contained only α -configuration. In conclusion, all these investigations can provide reference data for further studies on structural characterization and bioactivity of *Gynura davaricata* polysaccharides.

Key words: *Gynura davaricata* (L.) DC.; polysaccharide; separation and purification; infrared spectrum; configuration; nuclear magnetic resonance

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0058-06

白背三七(*Gynura davaricata*(L.) DC.), 菊科菊三七属植物, 又名白子菜、富贵菜、鸡菜等。分布于台湾至华南、西南一带, 喜生长于村旁、山坡等地^[1]。其根、茎、叶均可入药, 具有清热解毒、止血、凉血、降血糖等功效^[2]。民间以白背三七地上部分作为食药两用, 广泛用于治疗高血压病、高脂血症及糖尿病等, 故亦有“神仙草”之称。20世纪90年代中后期逐渐从自然野生发展成为人工栽培^[3], 是一种优良的药食两用植物。

多糖是构成生命的四大基本物质之一, 具有储存能量、调节免疫力、抗肿瘤、降血糖等生物学活性, 已

引起越来越多的关注^[4-6]。白背三七多糖(*Gynura davaricata* polysaccharides, GDPs)为该植物中主要活性成分之一, 动物实验研究表明白背三七多糖具有降血糖功效, 并能提高小鼠耐缺氧能力^[7-10], 因此研究白背三七多糖成分, 开发降血糖新药、功能性食品以及办公室等缺氧人群的保健品等具有广阔前景。但目前对白背三七多糖的分离纯化研究报道较少^[7], 还没有对白背三七多糖的组成和结构特征等方面的报道。

植物多糖的分离纯化多采用离子交换和凝胶柱层析相结合的方法。纤维素离子交换树脂是一种常用的柱层析介质^[11-12], 通过改变洗脱剂的离子强度达到分离中性

收稿日期: 2011-07-04

作者简介: 刘微微(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物分离工程。E-mail: liuweimei731@163.com

*通信作者: 曹学丽(1967—), 女, 教授, 博士, 研究方向为生物分离技术。E-mail: caoxl@th.btbu.edu.cn

多糖和酸性多糖的目的。但其价格较昂贵,增加了分离的成本。D315树脂是由具有大孔结构的丙烯酸甲酯共聚交联高分子聚合物,通过多乙烯多胺进行胺解得到的多胺基弱碱性离子交换树脂,在水中能离解出 OH^- 而呈弱碱性,树脂的正电基团能与溶液中的阴离子吸附结合,从而产生阴离子交换作用。多糖除含有中性多糖外,还含有一定量的酸性多糖;酸性多糖的糖醛酸部分在弱碱性条件下带负电,被吸附于阴离子交换树脂上,而中性多糖不被吸附,据此将酸性多糖和中性多糖进行分离。王元凤等^[13]曾采用D315树脂对茶多糖中的中性糖和酸性糖进行了分离;D315树脂价格便宜,分离成本低,适用于规模化生产。

本实验着重对白背三七多糖的分离纯化方法进行探究。白背三七鲜叶汁喷雾干燥粉,经热水提取、脱蛋白、脱色、乙醇分级沉淀得到粗多糖;采用D315离子交换树脂和Sephadex G-25凝胶柱层析,分离纯化得到中性多糖GDPs-1、GDPs-2及酸性多糖GDPs-3 3个多糖组分;经高效凝胶色谱(GPC)确定了重均分子量,红外光谱(IR)及核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)证实为多糖类成分并确定了其构型,为进一步研究白背三七多糖的结构特征和生物活性提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白背三七鲜叶汁喷雾干燥粉,由山西普净生物技术有限公司提供。

D315弱碱性阴离子交换树脂 上海华震科技有限公司;Sephadex G-25 美国法玛西亚公司;透析袋(截留分子量1000D) 美国GE公司;三氯乙酸、乙醇、氢氧化钠、盐酸、苯酚、硫酸、甲醇等均为分析纯北京化工厂。

1.2 仪器与设备

RE-52A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器公司;Alpha 2-4 LSC真空冷冻干燥机 德国Christ公司;层析柱(50cm×2.6cm、50cm×1.6cm)、BSZ-100自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂有限公司;Spectra Max 190型酶标仪 美国MDS公司;高效凝胶色谱分析系统(LC-20AD型泵、CTO-20A柱温箱) 日本岛津公司;DAWN HELEOS-II型激光多角度散射检测器、Optilab rex示差检测器 美国Wyatt公司;Shodex SB-803高效凝胶色谱柱 日本Shodex公司;Bruker AV 600核磁共振仪 德国Bruker公司。

1.3 方法

1.3.1 白背三七多糖的提取

称取喷雾干燥粉末200g,以料液比1:10加入2000mL

去离子水,90℃搅拌提取两次,每次2h,合并提取液,真空减压浓缩至一定体积;加入7g/100mL三氯乙酸,放置过夜,抽滤,除去蛋白质;滤液中加入1g/100mL活性炭,80℃搅拌脱色1h,滤液真空减压浓缩至一定体积;加入3倍体积无水乙醇沉淀,4℃放置过夜,抽滤得沉淀;复溶于水,减压浓缩至无乙醇味,冷冻干燥得到白背三七粗多糖。

1.3.2 D315树脂的预处理

取新购的D315树脂,出厂形式为 Cl^- 型,用去离子水反复漂洗至浸洗水无色,泡沫很少时为止;装柱(50cm×2.6cm),用1mol/L NaOH以2mL/min流速冲洗树脂3~5倍床体积,转化为 OH^- 型;去离子水冲洗至中性;之后用1mol/L HCl以2mL/min流速冲洗3~5倍床体积,转化为 Cl^- 型;去离子水冲洗至出水pH值为4左右;继续用1mol/L NaOH冲洗3~5倍床体积,将树脂转化为 OH^- 型;最后用去离子水冲至中性,备用。

1.3.3 白背三七酸性和中性多糖的分离

配制2mg/mL的粗多糖溶液约160mL,以2mL/min速率进样,同时每10mL一管收集柱出口流出液,待上样完毕后,去离子水清洗至无多糖流出,得中性多糖部分;之后更换为0.1mol/L NaCl溶液洗脱至无多糖流出,收集得到酸性多糖部分。洗脱过程中,每管洗脱液取200μL,转入10mL干净试管中,加入9%苯酚100μL和500μL的硫酸,沸水浴20min,490nm波长处测定吸光度^[14],绘制洗脱曲线,并按峰形合并洗脱液。

1.3.4 白背三七中性多糖的分离纯化

采用Sephadex G-25层析柱(50cm×1.6cm),根据分子质量不同,对白背三七中性多糖进一步分离纯化。考察不同洗脱流速和上样量对分离效果的影响,确定最佳的分离条件。苯酚-硫酸法测定各管多糖含量,绘制洗脱曲线。

1.3.5 纯度检测及分子量测定

采用优化后的上样浓度和洗脱流速分离纯化中性糖部分,苯酚-硫酸法绘制洗脱曲线,按照峰形合并相应收集液,冷冻干燥得到多糖组分。采用高效凝胶色谱示差检测器检测纯度,激光多角度散射检测器测定多糖的重均分子量。

检测条件:色谱柱:Shodex SB-803,流动相:0.1mol/L NaCl溶液,流速0.5mL/min,柱温箱40℃,进样体积200μL,检测器:激光多角度散射检测器及示差检测器。

1.3.6 分离多糖的红外光谱分析

称取分离纯化得到的多糖样品GDPs-1、GDPs-2、

GDPs-3 各 1mg 与 200mg 干燥的 KBr 混匀, 在玛瑙研钵中研磨 5~10min。混合压膜, 测定波数在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 的红外光谱。

1.3.7 ^1H -NMR 分析多糖糖苷键构型

将一定量的多糖纯品 GDPs-1、GDPs-2、GDPs-3 溶于 D_2O , 在 293K 温度下进行 600Hz 核磁共振仪分析。

2 结果与分析

2.1 白背三七中性和酸性多糖的分离

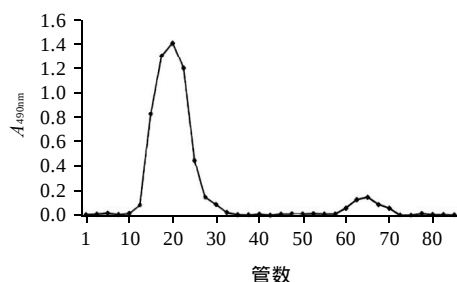


图1 中性多糖()和酸性多糖()在 D315 树脂上的洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of water-soluble crude polysaccharide on D315 resin

白背三七粗多糖水溶液经过 D315 树脂后, 得到了中性多糖()和酸性多糖()两部分(图 1), 中性多糖直接冷冻干燥; 酸性多糖搅拌透析 48h 后, 冷冻干燥。将所得多糖用 0.1mol/L NaCl 溶解后进行 GPC 纯度检测, 如图 2 所示。曲线 1 显示的为 Optilab rex 示差检测器的信号, 测定各个组分质量浓度; 曲线 2 显示的为 DAWN HELEOS- 型激光多角度散射检测器的信号, 测定的是各个组分相对分子质量的大小。

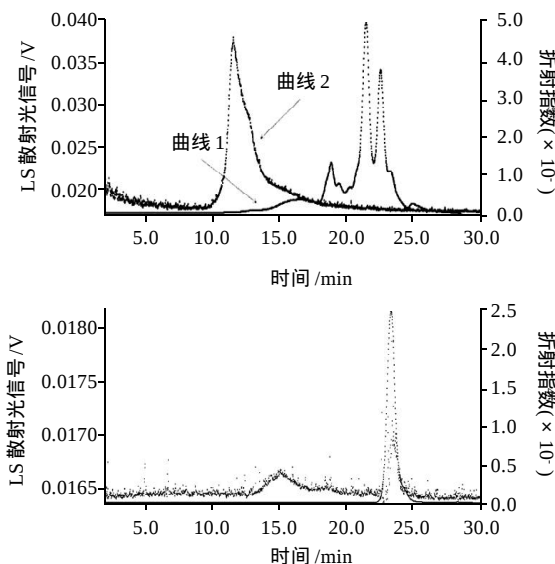


图2 中性多糖()和酸性多糖()的 GPC 图谱

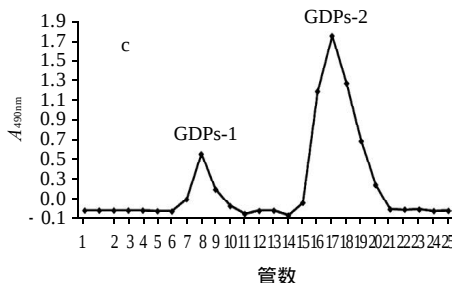
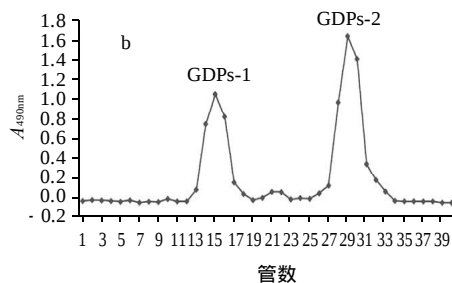
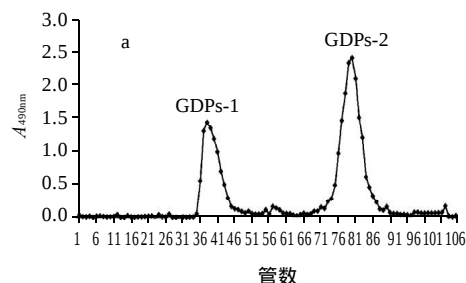
Fig.2 GPC chromatograms of neutral() and acidic() polysaccharide fractions obtained by D315 resin column chromatography

由图 2 示差信号可知, 中性多糖()中包含 3 个主要组分, 保留时间分别为 19、21.5min 和 23.0min, 但 19min 处的组分含量较少; 由激光信号可知, 14min 左右处还存在分子质量较大的组分, 但示差信号显示其含量太低; 故将 21.5min 和 23.0min 的两个组分作为目标进行进一步分离纯化。而酸性多糖(), 其示差和激光信号均显示其为均一多糖, 其纯度为 99.8%, 分子质量为 $3.74 \times 10^3 \text{ D}$, 多分散系数为 1.27, 将其命名为 GDPs-3, 无需进一步纯化。

2.2 白背三七中性多糖的分离纯化

以葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 为凝胶介质, 超纯水为流动相, 上样体积 1mL, 在恒定条件下, 考察不同流速和上样量对两峰分离度的影响, 选择最佳的分离条件。

2.2.1 流速的选择



a. 0.10mL/min; b. 0.25mL/min; c. 0.50mL/min。

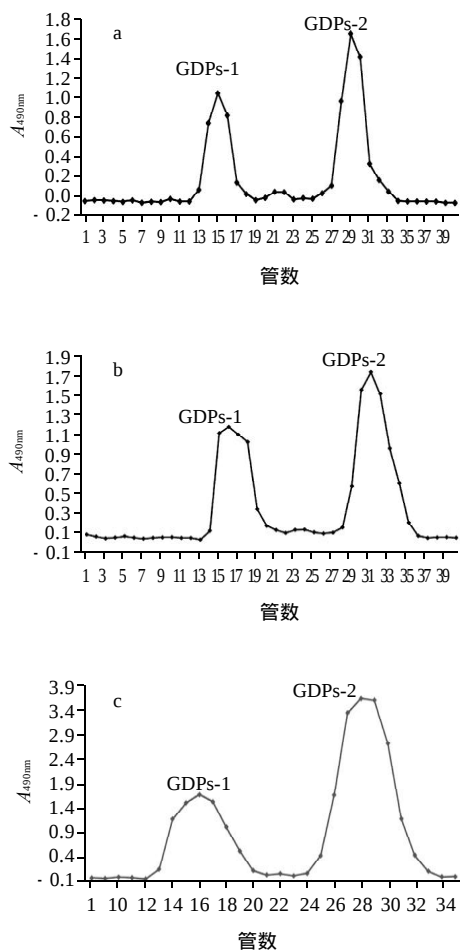
图3 不同流速下的洗脱曲线

Fig.3 Elution curves of GDPs-1 and GDPs-2 at different flow rates

上样量 30mg, 考察不同流速对分离度的影响。由图 3 可知, 在 0.10、0.25mL/min 和 0.50mL/min 3 种流速

条件下, 均能将两个组分明显分离。但在 0.1mL/min 的流速下, 分离时间较长, 需要 15h 左右; 0.25mL/min 将时间缩短到 7h, 且 GDPs-1 与 GDPs-2 分离度较好; 0.50mL/min 流速下, 时间较短 3h 左右即可完成分离, 但两峰间间隔较小, 且高流速使得 GDPs-1 的拖尾较为严重。因此选择 0.25mL/min 进行后续分离。

2.2.2 上样量的选择



a. 30mg/mL; b. 60mg/mL; c. 100mg/mL。

图4 不同上样量下的洗脱曲线

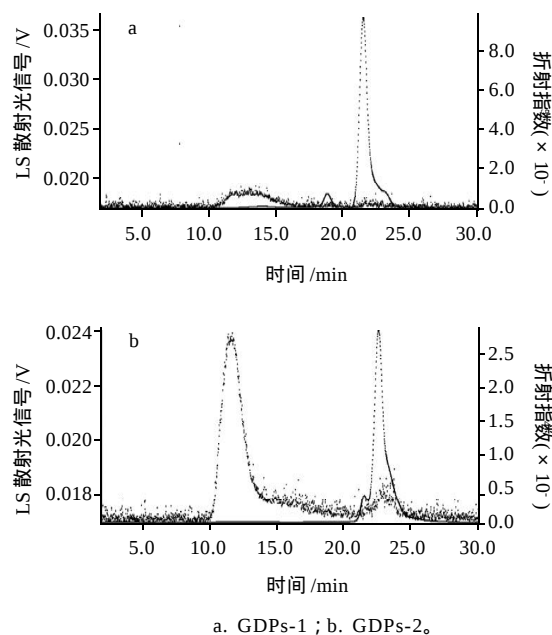
Fig.4 Elution curves of GDPs-1 and GDPs-2 at different sample loading amounts

相同的洗脱速率下, 考察不同上样质量浓度对分离度的影响。由图4可知, 在3种上样质量浓度下, 两个目标组分之间均能实现完全分离。但随着上样量的增加, 两峰之间的间隔逐渐缩小, 当质量浓度增加到 100mg/mL 时, 两峰之间只有 2~3 管级分的间隔, 考虑到重现性以及为保证分离效果, 选择 60mg/mL 上样量进行后续工作。在以葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 为凝胶介质, 超纯水为流动相, 上样体积 1mL 的条件下, 最终确定白背三七中性糖最佳分离条件: 纯水洗脱, 上样量

60mg, 上样体积 1mL, 流速 0.25mL/min, 得到中性多糖 GDPs-1 和 GDPs-2。

2.2.3 两中性多糖 GDPs-1 和 GDPs-2 的纯度及分子质量测定

采用与酸性多糖 GDPs-3 相同的分析条件, 对两中性多糖 GDPs-1 和 GDPs-2 的纯度及分子质量进行了测定, 见图5。经分析可得, GDPs-1 的纯度为 94.08%, M_w 为 $1.06 \times 10^4 D$, 多分散性系数 1.43; GDPs-2 的纯度为 92.3%, M_w 为 $4.17 \times 10^3 D$, 多分散性系数 1.65。

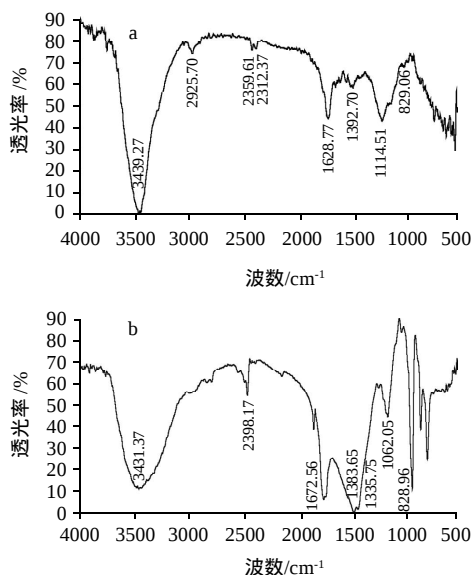


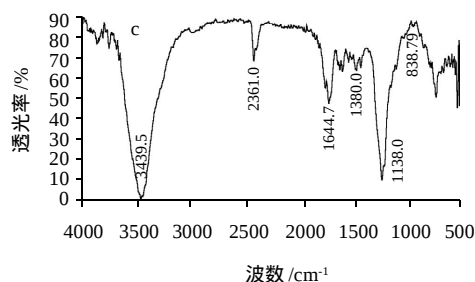
a. GDPs-1; b. GDPs-2。

图5 两种中性多糖 GDPs-1 和 GDPs-2 的 GPC 分析图谱

Fig.5 GPC chromatograms of GDPs-1 and GDPs-2

2.3 3种多糖的红外光谱分析





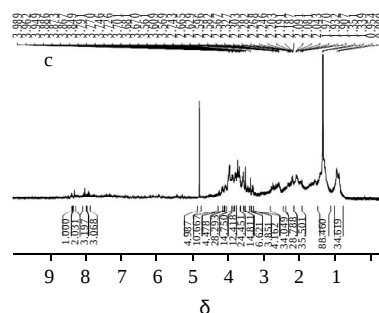
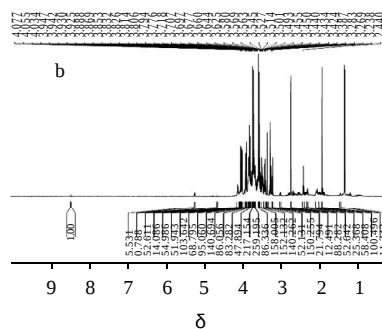
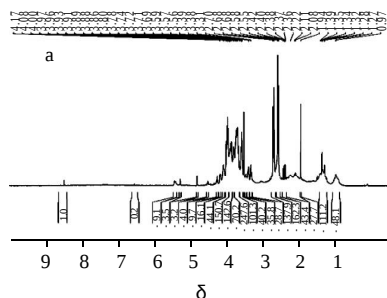
a. GDPs-1; b. GDPs-2; c. GDPs-3。

图6 3种多糖 GDPs-1、GDPs-2 和 GDPs-3 的红外谱图

Fig.6 IR spectra of GDPs-1, GDPs-2 and GDPs-3

由图6可知, 3400 cm^{-1} 左右出现的极强而宽的峰为糖类物质O-H的伸缩振动(ν_{OH}); 1100 cm^{-1} 处的强峰是C-O的伸缩振动峰($\nu_{\text{C-O}}$), 亦是 ν_{OH} 的旁证; 2900 cm^{-1} 的中强峰是烷基的C-H的伸缩振动峰(ν_{CH_2} 和 ν_{CH}), 以1380 cm^{-1} 出的C-H弯曲振动峰(δ_{CH})为旁证, 它们是糖类的特征吸收峰; 1640 cm^{-1} 附近的强吸收峰是羧基的C=O键的伸缩振动峰($\nu_{\text{C=O}}$); 1050 cm^{-1} 附近为醇羟基的变角振动吸收峰; GDPs-1在2925 cm^{-1} 处的吸收峰强度较分子质量两个多糖组分的明显, 提示其分子结构中甲基和亚甲基含量比较大, 体现为分子链较长, 相对分子质量较高, GPC测得的重均分子质量的大小证明了上述相对分子质量较高的推断^[18]。GDPs-1中829.06 cm^{-1} 处的弱吸收峰为 α -异构体的C-H的弯曲振动峰($\delta_{\text{C-H}}$), 898.52 cm^{-1} 处得弱吸收峰为 β -异构体的C-H的弯曲振动峰($\delta_{\text{C-H}}$), 吸收峰均较弱, 提示可能GDPs-1中 α 与 β 型糖苷键并存; GDPs-2中828.96 cm^{-1} 处强烈的吸收峰表明GDPs-2为 α 构型; GDPs-3中838.79 cm^{-1} 左右处的弱吸收峰为 α 型糖苷键的吸收峰, 亦表明GDPs-3为 α 构型^[16-17]。GDPs-2中828.96 cm^{-1} 处的吸收峰最为强烈, 提示其 α 构型可信度较高, 分子质量两种多糖的构型还需通过核磁共振等手段进一步验证。

2.4 $^1\text{H-NMR}$ 分析



a. GDPs-1; b. GDPs-2; c. GDPs-3。

图7 3种多糖 GDPs-1、GDPs-2 和 GDPs-3 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱(600Hz, 293K)Fig.7 $^1\text{H-NMR}$ spectra of GDPs-1, GDPs-2 and GDPs-3 (600 Hz, 293 K)

$^1\text{H-NMR}$ 主要解决多糖结构中糖苷键构型的问题, 由于多糖分子的不同糖残基中非异头质子的化学位移相近, 使多糖在 $^1\text{H-NMR}$ 上的信号, 除C1上质子信号较易解析外, 其他大部分质子信号都出现在 δ 3.5 ~ 4.0 的狭小范围内, 谱图重叠严重。但不在拥挤区的 $^1\text{H-NMR}$ 信号被称为“结构信息共振信号”, 是图谱解析突破口, 其中异头质子信号对多糖结构的解析有着重要意义。一般来说, α 构型糖苷的异头质子的共振比 β 构型糖苷向低场位移 δ 0.3 ~ 0.5, 前者出现在 δ 4.8 ~ 5.3, 后者一般出现在 δ 4.4 ~ 4.8。由图7所示, 经过 D_2O 交换后, 3种多糖的 $^1\text{H-NMR}$ 信号多集中在 δ 3 ~ 5.5 的范围内; GDPs-1氢谱中, δ 4.8 ~ 5.3 为GDPs-1的己碳糖的异头质子共振区, 表明GDPs-1中只含有 α 构型; GDPs-2氢谱中, δ 5.3 为GDPs-2的异头质子信号, 表明GDPs-2中只含有 α 构型; GDPs-3氢谱中, δ 4.8 为GDPs-3的异头质子信号, 表明GDPs-3中只含有 α 构型。GDPs-2和GDPs-3的 $^1\text{H-NMR}$ 测定构型结果与红外光谱测定结果相一致; GDPs-1的红外光谱显示含有 α 和 β 构型, 但强度均较弱, 不易确认其构型, $^1\text{H-NMR}$ 证实其中只含有 α 构型。

3 结 论

采用国产的D315弱碱性阴离子交换树脂, 成功从白

背三七粗多糖中分离出一个均一的酸性多糖成分 GDPs-3 ; 所得中性多糖部分 , 经 Sephadex G-25 进一步分离 , 得到两个纯度较高的均一中性多糖成分 GDPs-1 和 GDPs-2 ; 经高效凝胶色谱分析 , GDPs-1、GDPs-2 及 GDPs-3 的分子质量分别为 1.06×10^4 、 4.17×10^3 D 和 3.74×10^3 D , 纯度分别为 94.08%、92.3% 和 99.8% ; 经红外光谱和核磁共振氢测定 , 3 种组分均显示为多糖类物质特征 , 均只含有 α 构型。

参考文献 :

- [1] 广东植物研究所. 海南植物志[M]. 北京: 科技出版社, 1974: 416.
- [2] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 749-756.
- [3] 梁萍. 时尚野菜: 富贵菜高产栽培技术[J]. 广西农学报, 2006, 23(3): 43.
- [4] LOWE J B, MARTH J D. A genetic approach to mammalian glycan function[J]. Annual Review of Biochemistry, 2003, 72(1): 643-691.
- [5] 王蓉, 吴剑波. 多糖生物活性的研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2001, 22(3): 97-100.
- [6] 张惟杰. 糖类研究漫谈[J]. 生命的化学, 2005, 25(5): 432-433.
- [7] 姜曼花, 邱细敏, 刘胜姿, 等. 白背三七多糖的提取纯化及含量测定[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2147-2149.
- [8] 姜曼花, 胡剑卓, 邱文高, 等. 白背三七多糖和黄酮降血糖及耐缺氧作用[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(13): 1074-1076.
- [9] 胡勇, 李维林, 林厚文, 等. 白背三七地上部分降血糖作用研究[J]. 西南林学院学报, 2007, 27(1): 54-58.
- [10] 陈磊, 宋增艳, 王津江. 白背三七地上部分化学成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(3): 373-376.
- [11] ZHAO Liyan, DONG Yanhong, CHEN Guitang, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 783-789.
- [12] QIAO Deliang, HUA Bing, GAN Dan, et al. Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 422-429.
- [13] 王元凤, 金征宇. D315 树脂分离茶多糖工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(10): 147-150.
- [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 20-23.
- [15] 罗晶洁, 曹学丽. 桑叶多糖的组成及结构表征[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 136-140.
- [16] 郭振楚. 糖类化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 106-108.
- [17] 夏朝红, 戴奇, 房韦, 等. 几种多糖的红外光谱研究[J]. 武汉理工大学学报, 2007, 29(1): 46-47.
- [18] 张剑韵, 包立军, 梁进, 等. 桑叶多糖的分离及红外光谱和气相色谱分析[J]. 蚕业科学, 2007, 33(4): 549-552.