

马兰多糖的分离纯化及初步结构分析

田 徽^{1,2*}, 李 涛¹, 郭 江¹, 阮期平¹, 欧 平³, 秦文蓉¹

1. 绵阳师范学院 分子生物学与生物制药重点实验室, 四川 绵阳 621000

2. 成都中医药大学学院 中药教研室, 四川 成都 611137

3. 绵阳羌山源中药科技有限公司, 四川 绵阳 621000

摘 要: 目的 马兰多糖类组分为其抗实验性胃溃疡作用的物质基础之一, 为了探讨马兰多糖结构与功能之间的关系, 对马兰多糖进行了分离纯化和结构分析。方法 以马兰为原料, 采用热水提取, 酶法结合 Sevag 法除蛋白, 经 DEAE-52 纤维素柱精制得纯品马兰多糖 (KIP-1)。采用凝胶色谱、红外光谱 (FTIR)、GC、GC-MS 甲基化分析等方法对其化学结构进行初步分析, 并通过原子力显微镜 (AFM) 观察其微观结构。结果 KIP-1 是一重均分子质量 (M_w) 为 11 592, 由甘露糖 (Man)、葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal) 以物质的量比 2.523 : 1.162 : 1 组成的多糖。主链为 1, 3→连接的 Glc 和 1, 2→连接的 Gal, Man 构成糖链的末端, 该糖链的分支点残基为 1, 3, 6→Man, 分支点应在 O-3 上。KIP-1 结构为颗粒状, 不规则圆形及椭圆形, 平均粒径大小 1~2 nm, 空间中同样呈现不规则形状, 高度起伏约 1 nm。结论 KIP-1 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成, 具有分支结构, 为首次从马兰中分离得到。

关键词: 马兰; 多糖; 原子力显微镜; 甘露糖; 葡萄糖; 半乳糖

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)16-2213-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.004

Separation, purification, and preliminary structure analysis of polysaccharides from *Kalimeris indica*

TIAN Hui^{1,2}, LI Tao¹, GUO Jiang¹, RUAN Qi-ping¹, OU Ping³, QIN Wen-rong¹

1. Key Laboratory for Molecular Biology and Biopharmaceutic, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China

2. Department of Chinese Materia Medica, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Mianyang Qiangshanyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Mianyang 621000, China

Abstract: Objective The polysaccharide from *Kalimeris indica* (KIP) has been proved to be one of effective parts with anti-gastric ulcer action. In order to accurately define the structure and structure-activity relationship of KIP, the purification and structural analysis of KIP were carried out. **Methods** A water-soluble polysaccharide (KIP-1) was obtained from *K. indica* by hot water extraction, deproteinization with enzymolysis and Sevag methods, and fractionation through DEAE cellulose (DE-52) column. The molecular weight of KIP-1 was determined by gel chromatography (Sephadex G-200). The structure was characterized with FTIR, GC, and GC-MS methylation analysis. The microstructure of KIP-1 was observed by atomic force microscope (AFM). **Results** The results indicated that KIP-1 had a molecular weight of 11 592 and was mainly composed of mannose, glucose, and galactose with the ratio of 2.523 : 1.162 : 1. Methylation analysis showed that KIP-1 had a backbone of 1, 3-linked glucose and 1, 2-linked galactose, of which the branch point was at O-3 composed of a 1, 3, 6-linked mannose residue and terminated with mannose residue. The microstructure study showed that KIP-1 with an average particle size of 1—2 nm was granular, irregular-rounded, and ellipsoidal. Irregularly shaped structure was found together in cubic image of KIP-1 with the height about 1 nm. **Conclusion** KIP-1 with branch structure is mainly composed of mannose, glucose, and galactose. It is the first time to get the polysaccharide from *K. indica*.

Key words: *Kalimeris indica* (L.) Sch. -Bip; polysaccharide; atomic force microscope; mannose; glucose; galactose

马兰为菊科马兰属植物马兰 *Kalimeris indica* (L.) Sch. -Bip. 的全草, 又名路边菊、泥鳅串、马兰头等。在我国分布广泛, 其性凉, 味苦、辛, 归肺、肝、胃经, 具有清热解毒、消散痈肿、疏风

收稿日期: 2013-04-24

基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2010SZ0245, 2011SZZ030, 2012ZZ0007); 四川省教育厅自然科学研究项目 (10ZC030)

*通信作者 田 徽 (1980—), 男, 四川绵竹人, 副教授, 博士, 主要从事中药理论与应用方向研究。E-mail: tianhui1009@126.com

平肝之功效,临床可用于治疗感冒发烧、咳嗽、急性咽炎、扁桃体炎、流行性腮腺炎、传染性肝炎、胃及十二指肠溃疡等病症^[1]。在四川民间常用其煎服,治疗胃脘疼痛以及慢性胃炎,具有较好疗效^[2-3]。课题组前期研究也证明了马兰具有显著的抗实验性胃溃疡的作用,而且通过进一步研究发现马兰多糖类组分为其抗实验性胃溃疡作用的物质基础之一^[4-5]。目前,国内外对于马兰中多糖类物质的研究,尚未见关于单糖组成及其结构的报道。本实验以马兰为原料,采用生物酶结合离子交换色谱法得到一种多糖(KIP-1),通过凝胶色谱、红外光谱(FTIR)、GC、GC-MS 甲基化分析及原子力显微镜(AFM)等方法对其化学结构进行分析,推测马兰多糖(KIP-1)是1种重均分子量(M_w)为11 592,由甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)以物质的量比2.523:1.162:1组成的多糖。现将其报道如下,以期为马兰多糖的研究和开发提供实验依据。

1 仪器与材料

UltroSpec 3300 pro 紫外可见分光光度计(美国 Amersham 公司);Buchi461 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);AvantiJ-E 冷冻高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司);CleanVac 8 冻干机(韩国 BioTron 公司);Trace DSQ II 型 GC-MS 联用仪(美国 Thermo Fisher 公司);Spectrum One 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司);SPM—9600 型原子力显微镜(日本岛津公司)。

马兰购自成都市荷花池中药材市场,经绵阳师范学院生命科学与技术学院罗明华教授鉴定为 *Kalimeris indica* (L.) Sch. -Bip. 的全草;系列标准葡聚糖 Dextran、Sephadex G-200、蓝色葡聚糖-2000 (Pharmacia 产品);DEAE-52 纤维素(Whatman 公司);标准单糖(阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、木糖、甘露糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、肌醇)、三氟乙酸、盐酸羟胺、肌醇、吡啶、无水醋酸酐、二甲基亚砜(DMSO)、氢氧化钠为 Sigma 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 提取与分离纯化

精密称取干燥的马兰药材粉末 100 g,按料液比 1:10 加入蒸馏水,100 °C 抽提 2 h。滤过,收集清液,滤渣按上述方法重复浸提 1 次并滤过,弃渣,合并 2 次清液,浓缩至提取液的 1/5。缓慢地加入 3 倍体积 5 °C 预冷的 95%乙醇,放入 5 °C 冰箱中静

置 12 h 后 3 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,将沉淀物依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤。沉淀复溶于蒸馏水中,调节 pH 值到 7,加入一定量的胰蛋白酶,在 65 °C 水中保温 1.5 h 后加入一定量 Sevag 试剂,振荡 30 min,以 3 000 r/min 离心 15 min 除去沉淀,反复操作 5 次,弃去有机层后将上清液用 3 倍体积 5 °C 预冷 95%乙醇沉淀,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,干燥后即得马兰粗多糖(KIP)。取适量 KIP 溶于水,以 DEAE-52 纤维素柱(30 cm×2.6 cm)色谱,依次用含有 0、0.05%、0.1%、0.5%、1% NaCl 的 PBS 缓冲溶液(pH 7.4)分段梯度洗脱,体积流量 1 mL/min,8 min 收集 1 管,自动部分收集洗脱液,以优化的苯酚-硫酸法跟踪检测,合并第 1 个高峰部分,透析后减压浓缩,冷冻干燥,得马兰多糖纯品(KIP-1)^[6-8]。

2.2 纯度及相对分子量测定

采用凝胶色谱法测定 KIP-1 的纯度及相对分子量。称取标准葡聚糖 Dextran T3、Dextran T10、Dextran T20、Dextran T100、Dextran T200 各 4 mg,溶于 2 mL 蒸馏水中,各取 1 mL 分别上 Sephadex G-200 色谱柱,以 0.25 mL/min 的体积流量洗脱,用自动分步收集器收集洗脱液,6 min 收集 1 管,以优化的苯酚-硫酸法跟踪检测,计算不同相对分子质量的多糖经过凝胶柱的体积(V_e)。用蓝色葡聚糖-2000 上柱求得柱的外水体积(V_o)。以 V_e/V_o 为纵坐标,lg M_w 为横坐标,计算曲线方程。另取 4 mg KIP-1,按 Dextran 系列标准葡聚糖色谱操作,求得相应的洗脱体积,以吸光度为纵坐标, V_e 为横坐标,绘制 KIP-1 的洗脱曲线并计算 V_e/V_o 值。根据样品的峰形判断其纯度,由 V_e/V_o 值通过标准曲线求得重均分子量^[9]。

2.3 FTIR 分析

取 KIP-1 样品 1 mg 与 100 mg 干燥的 KBr 混匀,压片,在红外光谱仪上测定 4 000~400 cm^{-1} 的红外光谱^[10]。

2.4 单糖组成分析

取 KIP-1 样品 5.0 mg 溶解于 4 mL 浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸中,封管后 120 °C 条件下水解 2 h。待水解产物冷却至室温,加入少许甲醇,50 °C 真空旋转浓缩至干,重复 3 次,尽量除尽三氟乙酸,得多糖水解产物,备用。水解产物中分别加入 10 mg 盐酸羟胺、5 mg 肌醇(内标)、0.6 mL 吡啶,混匀,90 °C 水浴加热 30 min,取出,冷却至室温,加入 1

mL 无水醋酸酐, 90 °C 水浴加热 30 min, 制得多糖样品糖腈乙酰酯化产物, 待 GC 分析。标准单糖 (阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、木糖、甘露糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、肌醇) 采用同样方法处理进行糖腈乙酰酯化, 制作标准图谱^[11-13]。GC 分析条件: TR-5 毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 mm), 火焰离子 (FID) 检测器, 氢气体积流量 16 mL/min, 空气体积流量 150 mL/min, 氮气体积流量 20 mL/min, 进口温度 230 °C, 检测器温度 240 °C, 色谱柱采用程序升温, 起始温度 130 °C, 以 5 °C/min 升至 180 °C, 保持 2 min, 再以 5 °C/min 升至 220 °C, 保持 3 min。比较多糖样品与单糖标准品的 GC 图谱, 分析多糖样品的单糖组成。

2.5 甲基化分析

取 10 mg KIP-1 样品溶于 2 mL DMSO, 氮气保护, 室温条件下, 间隙搅拌添加 50 mg 干燥的氢氧化钠粉末。反应 1 h 后, 氮气保护, 室温条件下, 间隙搅拌添加 1.0 mL 碘甲烷进行反应。反应 1 h 后, 添加 0.5 mL 纯水终止反应。反应混合物经自来水透析 48 h, 纯水透析 24 h, 透析袋内液体冷冻干燥。重复以上操作 3 次, 直至所得产物经红外光谱分析, 于 3 700~3 100 cm⁻¹ 处无明显吸收, 制得完全甲基化产物。取完全甲基化产物按照“2.4”项所述方法进行糖腈乙酰酯化处理^[11-14]。GC-MS 分析条件: GC 条件同“2.4”项。MS 条件: 电子轰击源 (EI) 能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 传输杆温度 280 °C, 极杆温度 150 °C。

2.6 原子力显微镜观察

用超纯水精确配制质量浓度为 10 µg/mL 的 KIP-1 溶液, 0.45 µm 滤膜滤过, 微量进样器取 5 µL 多糖溶液滴于新鲜剥离的云母片表面, 干燥器中室温干燥过夜, 取准备好的云母片进行原子力显微镜 (AFM) 观察^[14-15]。AFM 条件: 室温进行扫描观察; 轻敲模式观察; 扫描力度 3~4 nN; 扫描频率 1 Hz; 扫描范围 1 µm×1 µm; 扫描高度 0~2.0 nm。

3 结果与分析

3.1 KIP-1 纯度及相对分子质量

KIP-1 为白色疏松固体。经紫外分光光度法检测, 无核酸 (260 nm)、蛋白质 (280 nm) 及色素 (600 nm) 等杂质峰。Molish 反应为阳性, 经过 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶柱色谱后, 洗脱峰为一均匀对称的单峰, 洗脱曲线见图 1。说明经过一系列处理后多糖已经被纯化, 且组分均一。以 V_e/V_o

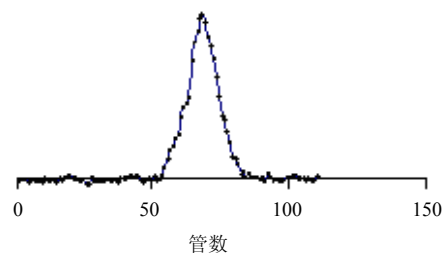


图1 Sephadex G-200 下 KIP-1 的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of KIP-1 on Sephadex G-200 column

为纵坐标, $\lg M_w$ 为横坐标, 得到 Dextran 系列标准曲线回归方程: $V_e/V_o = -0.835 \times \lg M_w + 5.4923$, $R^2 = 0.9983$ 。将 KIP-1 相应的洗脱体积代入公式, 查标准曲线得其重均分子质量 (M_w) 为 11 592。

3.2 KIP-1 的 FTIR 分析

由图 2 可见, 3 407 cm⁻¹ 出现的峰是 O-H 的伸缩振动峰, 由 KIP-1 样品中分子内及分子间氢键引起; 2 928 cm⁻¹ 出现的吸收峰由 C-H 伸缩振动引起; 1 743 cm⁻¹ 出现的吸收峰由 C=O 伸缩振动引起; 1 619 cm⁻¹ 出现的吸收峰由 -CHO 中的 C=O 伸缩振动峰引起; 1 423 cm⁻¹ 出现的吸收峰由 C-H 的变角振动引起; 1 100、1 077、1 023 cm⁻¹ 的吸收峰由吡喃糖环中醚键的 C-O-C 和 -OH 变角振动引起。

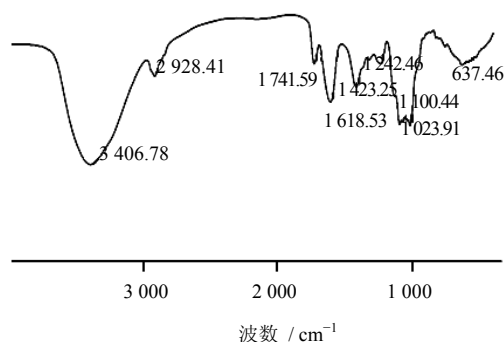


图2 KIP-1 的 FTIR 图

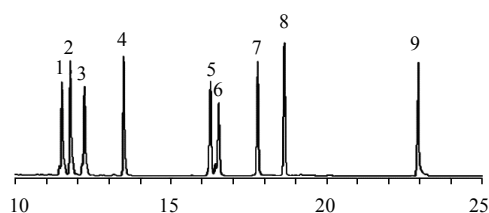
Fig. 2 FTIR spectrum of KIP-1

3.3 KIP-1 的单糖组成

单糖标准品的 GC 图与 KIP-1 的 GC 图 (图 3) 比较可知, KIP-1 主要由甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal) 和葡萄糖 (Glc) 组成。采用归一化积分法对峰面积计算可知, 多糖样品中 Man、Glc 和 Gal 的物质的量之比为 2.523 : 1.162 : 1, 这与 FTIR 分析结果一致。

3.4 KIP-1 的甲基化分析

由图 4、表 1 可知, KIP-1 样品是由 3 种单糖: Man、Glc 和 Gal 组成, 这与 GC 分析结果一致。其



1-*D*-阿拉伯糖 2-*L*-鼠李糖 3-*D*-核糖 4-*D*-木糖 5-*D*-甘露糖
6-*D*-果糖 7-*D*-半乳糖 8-*D*-葡萄糖 9-肌醇
1-*D*-arabinose 2-*L*-rhamnose 3-*D*-ribose 4-*D*-xylose 5-*D*-mannose
6-*D*-fructose 7-*D*-galactose 8-*D*-glucose 9-inositol

图3 单糖对照品和 KIP-1 水解后单糖 GC 图

Fig. 3 GC of monosaccharide reference substance and monosaccharide of hydrolyzed KIP-1

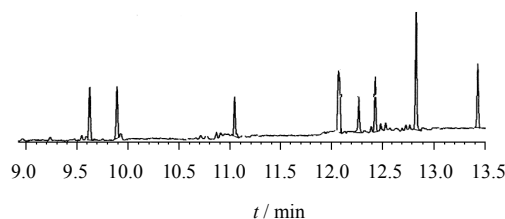


图4 KIP-1 甲基化后的 GC 图

Fig. 4 GC of methylated KIP-1

中 Man 占总糖比例约 58.5%，共有 6 种键型，分别为 1,2→、1→、1,6→、1,3→、1,4→、1,3,6→连接。根据以上结果可以推测，构成 KIP-1 的主链为 1,3→连接的 Glc 和 1,2→连接的 Gal，Man 构成糖链的末端；该糖链的分枝点残基为 1,3,6→Man，分枝点应在 O-3 上，比例为 12.05%；分枝端糖和末端糖质量分数大致一致，表明甲基化完全。

3.5 KIP-1 的 AFM 观察结果

由 KIP-1 的 AFM 平面图（图 5）可知，KIP-1 在水溶液中分布均匀，分散性良好，未出现团聚现象，观察条件下呈颗粒状，为不规则圆形及椭圆形，平均粒径大小 1~2 nm。由 KIP-1 的 AFM 立体图（图 6）

表 1 KIP-1 的甲基化分析

Table 1 Methylation analysis of KIP-1

甲基化单糖	物质的量比	主要离子碎片 (m/z)	连接方式
3, 4, 6-Man	1	43, 45, 87, 99, 102, 128, 162, 189	1, 2→
2, 3, 4, 6-Man	0.97	44, 45, 71, 86, 100, 115, 129, 145, 160, 204	1→
2, 3, 4-Man	0.75	42, 87, 98, 100, 117, 129, 161, 189	1, 6→
2, 4, 6-Glc	1.731	43, 45, 87, 101, 117, 129, 161	1, 3→
2, 4, 6-Man	0.611	43, 45, 87, 100, 117, 129, 161, 234	1, 3→
2, 3, 6-Man	0.881	43, 45, 87, 99, 101, 113, 117, 233	1, 4→
3, 4, 6-Gal	2.025	43, 101, 161, 189, 234	1, 2→
2, 4-Man	1.079	43, 70, 117, 129, 189	1, 3, 6→

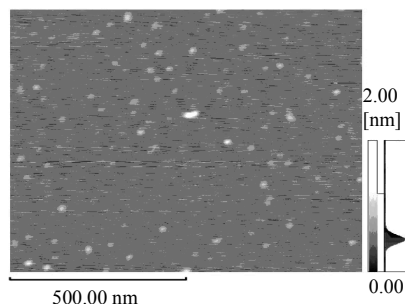


图5 KIP-1 的 AFM 平面图

Fig. 5 AFM planar image of KIP-1

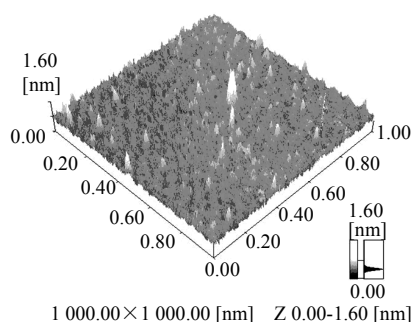


图6 KIP-1 的 AFM 立体图

Fig. 6 AFM cubic image of KIP-1

可知,多糖颗粒在空间中同样呈现不规则形状,高度起伏约1 nm。

4 讨论

本实验对马兰粗多糖分离、纯化的工艺条件均经过系统筛选,为最佳工艺。实验中,由DEAE-52纤维素柱分离得到5个组分(KIP-1、KIP-2、KIP-3、KIP-4、KIP-5),其中以KIP-1量最多,故本实验对其进行了分析。对于其他4个组分将在后续工作中进行研究。

综合分析表明,KIP-1是一种重均分子质量(M_w)为11 592,由Man、Glc、Gal以物质的量比2.523:1.162:1组成的多糖。构成多糖样品的主链为1,3→连接的Glc和1,2→连接的Gal,Man构成糖链的末端;该糖链的分枝点残基为1,3,6→Man,分枝点应在O-3上。KIP-1结构为颗粒状,不规则圆形及椭圆形,平均粒径大小为1~2 nm,空间中同样呈现不规则形状,高度起伏约1 nm。本实验是国内外首次对马兰中提取纯化的多糖(KIP-1)的化学结构进行较深入的研究。实验结果为马兰多糖高级结构的解析和抗胃溃疡作用等作用机制的构效关系研究奠定基础。

参考文献

- [1] 雷载权,张廷模. 中华临床中药学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [2] 郭甫臣. 马兰草的临床应用 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2002(2): 119-120.
- [3] 陈明清. 中草西医结合治疗浅表性胃炎胃溃疡十二指肠球部溃疡108例临床观察 [J]. 中华实用中西医杂志, 2001(14): 119-120.
- [4] 涂朝勇,田 徽,王 建,等. 路边菊水煎液抗实验性胃溃疡的研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2595.
- [5] 田 徽,阮期平,李崇进,等. 马兰抗实验性胃溃疡作用有效部位的筛选 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 324-325.
- [6] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 第4版. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [7] 罗娅君,肖新峰,王照丽. 大叶金花草多糖的提取、分离纯化及结构分析 [J]. 林产化学与工业, 2009, 29(1): 68-72.
- [8] Navarini L, Gilli R, Gombac V, et al. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization [J]. *Carbohydr Polym*, 1999(40): 71-81.
- [9] 吴梧桐. 生物制药工艺学[M]. 第2版. 北京:中国医药科技出版社,2006.
- [10] 谢晶曦,常俊标,王绪明. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用 [M]. 北京:科学出版社,2001.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术第 [M]. 第2版. 杭州:浙江大学出版社,1999.
- [12] 何传波,李 琳,汤凤霞,等. 巴戟天中一种多糖的分离与结构表征 [J]. 高等学校化学学报, 2009, 10(12): 2391-2395.
- [13] Pan Y, Dong S W, Hao Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction process of crude polysaccharides from Yunzhi mushroom and its effect on hydroxyproline and glycosaminoglycan levels [J]. *Carbohydr Polym*, 2010(81): 93-96.
- [14] Ding X, Su F, Cao M, et al. Structure characterization of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Tricholoma matsutake* [J]. *Carbohydr Polym*, 2010(81): 942-947.
- [15] 孙润广,张 静. 甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研究 [J]. 化学学报, 2006, 64(24): 2467-2472.