

# 苦豆子多糖的分离纯化及初步结构

陈向荣<sup>1</sup>, 曹楠楠<sup>2</sup>, 吴艳<sup>2\*</sup>, 吴金鸿<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山东省烟台市烟台山医院, 烟台 264001; <sup>2</sup>上海交通大学农业与生物学院 陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240

**摘要:** 本文研究了苦豆子多糖的分离纯化以及初步结构。采用水溶醇沉方法提取粗多糖, 然后通过离子交换层析分离纯化, 采用高效凝胶渗透色谱、气相色谱、紫外吸收以及红外吸收光谱对多糖组分进行分析研究。获得苦豆子多糖相对分子质量均一性组分 SPN 和 SPA, 测得其平均相对分子质量分别为  $1.217 \times 10^6$  Da 和  $4.412 \times 10^5$  Da, 二者均不含蛋白质, 且都具有红外的多糖特征吸收峰, 其单糖组成(质量比)分别为阿拉伯糖: 木糖: 甘露糖: 葡萄糖: 半乳糖 = 7.90: 11.24: 86.24: 18.81: 16.89、鼠李糖: 阿拉伯糖: 木糖: 甘露糖: 葡萄糖: 半乳糖 = 1.50: 5.80: 1.72: 20.10: 1.64: 27.20。本文为苦豆子多糖的进一步研究开发提供理论依据。

**关键词:** 苦豆子; 多糖; 分离纯化; 初步结构

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Separation and Preliminary Structure of Polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. Seeds

CHEN Xiang-rong<sup>1</sup>, CAO Nan-nan<sup>2</sup>, WU Yan<sup>2\*</sup>, WU Jin-hong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Yantai Mountain Hospital, Yantai 264001, China; <sup>2</sup>Bor S. Luh Food Safety Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** Separation and preliminary structure of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds were investigated. Crude polysaccharides extracted from *Sophora alopecuroides* L. seeds by hot water were fractionated by DEAE-Sepharose fast flow column into two fractions named SPN and SPA. The preliminary structure of fraction SPN and SPA was analyzed by high performance gel permeation chromatography (HPGPC), gas chromatograph (GC), UV and IR spectroscopy. SPN and SPA were not further fractionated by gel filtration chromatography on a Sepharose CL-6B column as homogeneous in molecular weight; their molecular weights were  $1.217 \times 10^6$  Da and  $4.412 \times 10^5$  Da, respectively. SPN and SPA by FT-IR analysis had characteristic absorption peaks of polysaccharide. The monosaccharide compositions of SPN and SPA were arabinose: xylose: mannose: glucose: galactose = 7.90: 11.24: 86.24: 18.81: 16.89, and rhamnose: arabinose: xylose: mannose: glucose: galactose = 1.50: 5.80: 1.72: 20.10: 1.64: 27.20. The separation and preliminary structure of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds will provide the theoretical basis for the systematic study of its bioactive components.

**Key words:** *Sophora alopecuroides* L. seeds; polysaccharides; separation; preliminary structure

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.) 又称苦豆根、苦甘草(内蒙、甘肃)、布亚(新疆)、欧苦参等, 是豆科槐属多年生草本植物, 是一种地道的天然中药, 广泛分布于我国西北及中亚的荒漠化草原和荒漠区较湿润的地段, 在中国尤以宁夏、甘肃、新疆及内蒙古为多<sup>[1]</sup>。我国对苦豆子的药用价值记载较多, 《本草纲目》对其有详细记载, 具有“清热解毒、祛风燥

湿、抗菌消炎、利尿去火、止痛镇静以及杀虫”等功效, 民间用其根治疗喉痛、咳嗽、痢疾及湿疹等, 用其种子炒制后治疗湿疹、癣、疮疖、白带过多等<sup>[2,3]</sup>。

随着现代药理药效学研究的不断深入, 苦豆子的药用价值被医药界所公认。苦豆子的主要有效成分为生物碱、多糖、黄酮、蛋白质和有机酸等, 目前对苦豆子药用成分的研究主要集中在生物碱上<sup>[4]</sup>, 但是对于苦豆子多糖的研究较少, 现已有报道关于粗多糖的提取工艺<sup>[3,5,6]</sup>, 而多糖的分离纯化及结构研究鲜见报道。故本文采用水溶醇沉法提取苦豆子粗多糖, 利用离子交换层析和凝胶过滤层析对粗多糖

进行分离纯化,通过气相色谱(GC)、紫外光谱(UV)以及红外光谱(IR)等方法对其化学组成和结构进行研究,旨在为苦豆子多糖的深度开发及应用提供充分的理论依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 原料与试剂

野生苦豆子种子,购于内蒙古巴彦淖尔市杭锦旗后旗;岩藻糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和葡聚糖标准品均采购于Sigma公司;无水乙醇、浓硫酸、苯酚、盐酸羟胺、乙酸酐、肌醇等均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Sepharose CL-6B 均购自于瑞典 pharmacia 公司。

### 1.2 仪器

DHL-A 电脑恒流泵,上海青浦沪西仪器厂;DBS-100 电脑全自动部分收集器和 TH-500 梯度混合器,上海沪西分析仪器厂有限公司;MWCO 12000-14000 Da 透析袋,华美生物工程公司;UV-2100 紫外-可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;旋转蒸发器,上海申生科技有限公司;冷冻干燥机,美国 LABCONCO;AB204-S 电子分析天平,METTLER TOLEDO;85L 型离心机,上海市实验仪器总厂;HD-3 紫外检测仪,上海青浦沪西仪器厂;2410 HPLC 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;GC-14A 气相色谱仪,日本岛津公司;EQUINOX 55 傅立叶变换红外-拉曼光谱仪,德国 BRUKER 公司。

## 2 实验方法

### 2.1 苦豆子多糖的提取、分离和纯化

将苦豆子粉碎成粒径约 40 目的粉末,在 60 °C 下真空干燥至恒重;利用索氏抽提法对苦豆子粉做脱脂处理,然后将粉末晾干,用 80% 乙醇浸提二次除去料粉中的单糖、多酚、低聚糖和甙类等小分子杂质,将料粉晾干待用。

准确称取苦豆子预处理粉,用水作溶剂,根据前期的实验结果<sup>[3]</sup>,在提取温度 75 °C、提取时间 3 h 和水料比 25:1 的条件下提取苦豆子粗多糖,然后在相同条件下再重复提取 1 次,合并提取液,用旋转蒸发器真空浓缩,加 4 倍体积的 95% 乙醇析出多糖,用无水乙醇和丙酮洗涤多次,再将多糖溶于水,冷冻干燥即得苦豆子粗多糖。

采用 Sevag 法初步纯化除去粗多糖中大量游离

的蛋白质,用流动自来水透析 48 h,蒸馏水透析 24h,透析液真空浓缩醇沉,冷冻干燥。利用离子交换柱 DEAE-Sepharose Fast Flow(D 2.6 × 30 cm)分离纯化,先用 0.02 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液洗脱,再用 0 ~ 1.2 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液线性梯度洗脱。采用苯酚-硫酸显色反应检测多糖的含量,用紫外检测仪在线检测蛋白质的含量,收集各吸收峰的洗脱液,透析并减压浓缩,冷冻干燥得苦豆子多糖组分为中性多糖 SPN 和酸性多糖 SPA。

### 2.2 苦豆子多糖组分的纯度鉴定及相对分子质量分布的测定

#### 2.2.1 凝胶色谱

用 Sepharose CL-6B 凝胶装柱(1.6 × 100 cm),用 0.1 mol/L NaCl 磷酸盐缓冲液平衡,柱子流速 18 mL/h,每管收集 3 mL,用苯酚-硫酸显色反应检测多糖的含量,用紫外检测仪在线检测蛋白质的含量,并观察多糖分离峰的形状。

#### 2.2.2 高效凝胶渗透色谱(HPGPC)

采用色谱柱 Waters Ultrahydrogel™ Linear(Φ7.8 mm × 300 mm),检测器为 Waters 2410 示差折光检测器,以 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub> 为流动相,流速为 0.9 mL/min,柱温 45 °C。将相对分子质量  $M_w$  分别为 6100、26290、84000、158000、291000 和 606200 的葡聚糖标准品进样,记录保留时间 T,以 T 为横坐标,lg $M_w$  为纵坐标绘制标准曲线,求得回归方程。根据待测样品的保留时间 T,通过回归方程计算多糖样品的相对分子质量。

### 2.3 苦豆子多糖含量的测定

采用改良的苯酚-硫酸比色法测定多糖的含量<sup>[7]</sup>。以葡萄糖为标准品制作标准曲线,得回归方程为葡萄糖浓度  $c(\mu\text{g}/\text{mL}) = 199.82A_{490} + 10.81$ ,相关系数为  $R^2 = 0.9975$ 。

### 2.4 单糖组成分析

将多糖先水解成单糖,取多糖样品 5 mg 于水解管中,加入 2 mol/L 的三氟乙酸 TFA 溶液于 121 °C 水解 2 h,用氮气除去 TFA 后干燥。采用糖腈乙酸酯衍生化法,加盐酸羟胺、适量肌醇(内标)和吡啶,90 °C 加热 30 min 后取出冷却,加入醋酸酐,90 °C 下继续反应 30 min 进行乙酰化。反应产物直接进样气相色谱(GC),根据出峰时间判断单糖种类,根据峰面积的比值确定各单糖间的比例关系<sup>[8]</sup>。

气相色谱工作参数:

采用 OV1701 石英毛细管色谱柱(Φ 0.32 mm

×30 m),载气为 N<sub>2</sub>,流速 1.5 mL/min, FID 氢火焰检测器,气化室温度 260 °C,检测器温度 250 °C,采用程序升温,起始温度 150 °C,停留 1 min 然后以 10 °C/min 升温至 190 °C,停留 1 min 再以 3 °C/min 升温至 240 °C,停留 20 min。

## 2.5 紫外和红外光谱分析

将多糖配成 0.5 mg/mL 溶液,置于紫外-可见分光光度计中在波长 190 ~ 400 nm 进行紫外光谱扫描。

称取多糖干燥样品 2.0 mg,与 KBr 研磨后压片,在波数 500 ~ 4000 cm<sup>-1</sup> 区域内进行红外光谱扫描。

## 3 结果与讨论

### 3.1 苦豆子多糖的提取、分离及纯化

苦豆子粗多糖为浅褐色的棉絮状固体,经 sevag 法初步纯化除去游离蛋白质后,经过 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱分离纯化(见图 1),获得两个洗脱组分分别为组分 SPN 和 SPA,均为白色纤维状固体且不含蛋白质。组分 SPN 是由磷酸盐缓冲液直接洗脱获得,即为中性多糖,其得率为粗多糖的 61.5%;而组分 SPA 是由 0 ~ 1.2 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液线性梯度洗脱获得,即为酸性多糖,其得率为粗多糖的 18.7%。由此可得,苦豆子粗多糖经 sevag 法除蛋白质和 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱分离纯化后总的得率为 80.2%。

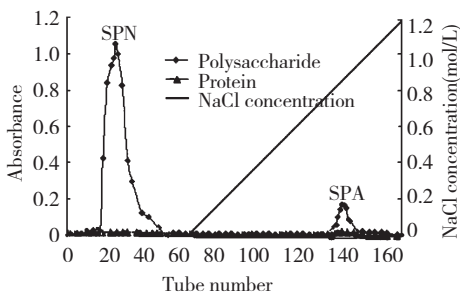


图 1 苦豆子粗多糖通过 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of crude polysaccharides from *sophora alopecuroides* L. seeds on DEAE-Sephrose fast flow column

### 3.2 苦豆子多糖组分的纯度鉴定及相对分子质量分布

苦豆子多糖组分 SPN 和 SPA 经 Sepharose CL-

6B 凝胶柱层析后,其洗脱曲线见图 2 所示,组分 SPN 和 SPA 都呈现单一对称峰,表明二者都为相对分子质量均一性多糖。

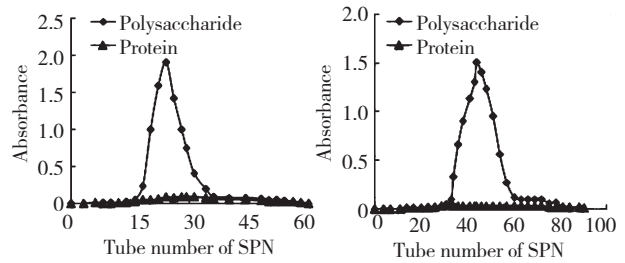


图 2 苦豆子多糖组分 SPN 和 SPA 通过 Sepharose CL-6B 柱的洗脱曲线

Fig. 2 Elution profiles of SPN and SPA fractions on Sepharose CL-6B column

采用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 对多糖组分 SPN 和 SPA 的相对分子质量分布测定发现(见图 3 和图 4),组分 SPN 和 SPA 的洗脱曲线都是对称性良好的单一峰,这与相应的 Sepharose CL-6B 凝胶柱层析洗脱结果一致。根据标准曲线  $\lg M_w = -3.68 \times 10^{-2}T + 117$  ( $R^2 = 0.9979$ ) 计算出组分 SPN 和 SPA 的平均相对分子质量分别为  $1.217 \times 10^6$  Da 和  $4.412 \times 10^5$  Da。

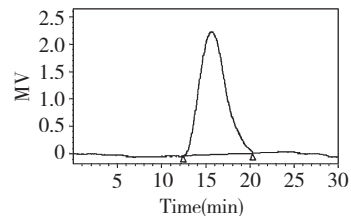


图 3 苦豆子多糖组分 SPN 的高效凝胶渗透色谱图

Fig. 3 Elution profile of SPN fraction on HPGPC column

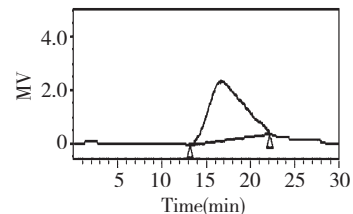


图 4 苦豆子多糖组分 SPA 的高效凝胶渗透色谱图

Fig. 4 Elution profile of SPA fraction on HPGPC column

### 3.3 苦豆子多糖组分的单糖组成

根据各标准单糖与待测样品的保留时间确定其单糖的种类(图略),根据各峰面积计算其质量比(见表 1)。

表 1 苦豆子多糖组分 SPN 和 SPA 的单糖组成

Table 1 Monosaccharide compositions of SPN and SPA fractions

多糖组分 Polysaccharide fraction	鼠李糖 Rhamnose (Rha)	阿拉伯糖 Arabinose (Ara)	木糖 Xylose (Xyl)	甘露糖 Mannose (Man)	葡萄糖 Glucose (Glu)	半乳糖 Galactose (Gal)
组分 SPN Fraction SPN	-	7.90	11.24	86.24	18.81	16.89
组分 SPA Fraction SPA	1.50	5.80	1.72	40.10	1.64	27.20

注:“-”表示未检测到。

Note:“-” Not detected.

从表 1 可以看出,苦豆子多糖组分 SPN 主要是由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和木糖组成,另外还含有少量的阿拉伯糖,而组分 SPA 主要是由甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖组成,另外还含少量的葡萄糖、木糖和鼠李糖,二种多糖组分的各种单糖组成比例不同。

### 3.4 苦豆子多糖组分的紫外光谱吸收

从苦豆子多糖组分 SPN 和 SPA 的紫外吸收光谱可看出(见图 5),二者仅在 192 nm 处分别有一个较强的吸收峰,而在波长 260 nm 和 280 nm 处均没有吸收峰,表明多糖组分 SPN 和 SPA 均不含有核酸和蛋白质。

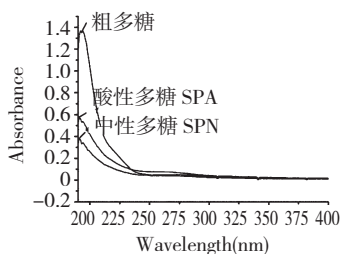


图 5 苦豆子多糖组分 SPN 和 SPA 的紫外吸收光谱图

Fig. 5 UV spectra of SPN and SPA fractions

### 3.5 苦豆子多糖组分的红外光谱吸收

从苦豆子多糖组分 SPN 和 SPA 的红外吸收光谱可看出(见图 6),二者均具有多糖的特征吸收峰:在 3600 ~ 3200  $\text{cm}^{-1}$  区域有一个强的宽峰,这是多糖分子内和分子间氢键上 O-H 伸缩振动的结果;2920  $\text{cm}^{-1}$  和 2850  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰由 C-H 伸缩振动引起的;1400  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰是糖类的 C-H 变角振动产生的。在 1150 ~ 1050  $\text{cm}^{-1}$  区域的吸收峰由多糖中的 C-O 变角振动引起的<sup>[9]</sup>,说明分子中存在 C-O-H 和糖环 C-O-C 结构。在 890  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰是  $\beta$ -端基差向异构的 C-H 变角振动,说明多糖中含有  $\beta$ -糖苷键结构;在 840  $\text{cm}^{-1}$  处多糖吸收峰说明多糖中含有  $\alpha$ -糖苷键结构<sup>[10]</sup>。

## 4 结论

实验研究了苦豆子多糖的离子交换层析分级纯

化及其初步结构性质。结果表明,苦豆子多糖经 DEAE-Sephacrose Fast Flow 柱分离纯化获得组分 SPN 和 SPA,二者都是相对分子质量均一性多糖,其分子量分别为  $1.217 \times 10^6$  Da 和  $4.412 \times 10^5$  Da,且均不含有蛋白质,这与紫外和红外所得结论相一致。气相色谱测定结果表明,组分 SPN 和 SPA 主要含有甘露糖和半乳糖,此外还有葡萄糖、阿拉伯糖、木糖,组分 SPA 还含有少量的鼠李糖,但具体单糖质量组成比例二者有较大的差异。以上研究结果为苦豆子多糖的进一步研究以及多糖的开发提供理论依据。

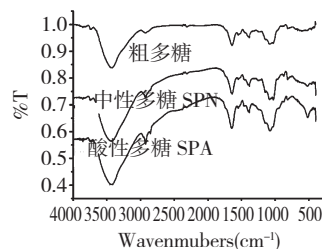


图 6 苦豆子多糖组分 SPN 和 SPA 的红外吸收光谱图

Fig. 6 Fourier transform infrared spectra of SPN and SPA fractions

### 参考文献

- Liao CY(廖春燕), Liang J(梁健), Yang Y(杨燕), et al. Summary of the pharmacology and application of *Sophora alopecuroides* L. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*(中国民族民间医药), 2009, 5: 6-8.
- Li KJ(李珂璟), Wang XL(王小龙). *Sophora alopecuroides* L. and its application. *Gansu Agr Sci Techn*(甘肃农业科技), 2010, 2: 46-47.
- Ai LZ(艾连中). Optimization of extraction process of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds by response surface analysis. *Food Sci*(食品科学), 2010, 31: 141-143.
- Gao H, Li G, Wang J. Studies on the dynamic accumulations of *Sophora alopecuroides* L. alkaloids in different harvest times and the appropriate harvest time. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 1121-1125.