DOI:10.19789/j.1004-9398.2019.01.009

玉米须多糖的提取纯化及结构研究

王恒禹[1] 罗云凤[2] 姜京华[3] 丁 侃[4] 董艳萍[5*]

(1. 云南省药物研究所,云南 昆明 650111; 2. 云南中医学院,云南 昆明 650500; 3. 赛珂睿德生物医药科技(上海)有限公司,上海 201203; 4. 中国科学院上海药物研究所,上海 201203; 5. 昆药集团股份有限公司药物研究院,云南 昆明 650100)

摘 要

玉米须经蒸馏水提取、离子交换、分子筛层析等手段得玉米须多糖(SMPS),结构分析研究表明SMPS的分子量约7 000 Da,其单糖组成和比例为鼠李糖∶阿拉伯糖∶木糖∶甘露糖∶半乳糖∶葡萄糖=0.18∶0.75∶0.67∶1.22∶1.42∶6.82;SMPS的重复单元可能是由甘露糖、半乳糖、葡萄糖构成,甘露糖主要以1→6连接存在于主链中,葡萄糖的主要的连接方式为1→3、1→4、1→6连接,木糖在主链及支链中均有存在,半乳糖主要存在于主链的末端.

关键词: 玉米须多糖;纯化;结构研究

中图分类号: TS205

0 引 言

糖尿病是一种内分泌代谢疾病,早期可无症状,血糖过高时可出现“三多一少”症状,即多尿、多饮、多食及体重减轻,且出现疲乏、无力及精神不振等衰弱症状.国际糖尿病联盟(IDF)2015年12月发布的统计数据显示,在全球范围内,20~79岁成人中约有8.8%的人患有糖尿病[1],2015年我国有130万人死于糖尿病及其并发症,其中40.8%的人年龄低于60岁,逐渐呈现年轻化趋势.

玉米须是指在玉米成熟收获季节采集的已经变褐并干枯了的禾本科农作物玉米的雌花花柱,在玉米的生长过程中作为传粉受精的通道.美国食品药品监督管理局(FDA)已证实玉米须属于一般公认为安全(GRAS)的可直接加入食品中的物质.玉米须中含有多糖、皂苷、挥发油、生物碱、植物甾醇类化合物,玉米须多糖(SMPS)是玉米须主要的水溶性成分之一.《中药大辞典》记载,民间利用玉米须治疗糖尿病取得了较好的疗效,其发酵制剂对家兔有非常显著的降血糖作用[2];现代药理研究也表明玉米须多糖具有降血糖、免疫调节、抗肿瘤等多种功效活性,且安全无副作用.刘娟等[3]采用四氧嘧啶快速造成小鼠高血糖模型,玉米须多糖对正常小鼠有轻微的降血糖的作用,对模型小鼠有较好的降血糖作用,同时研究发现玉米须多糖对葡萄糖、肾上腺素引起的小鼠血糖升高也有明显的对抗作用,能够调节糖尿病小鼠的糖代谢,促进糖异生.

本研究通过蒸馏水提取法提取了玉米须多糖,并对其进行纯化、初步研究了其单糖组成及糖苷键连接方式.

1 材料与仪器

1.1 试剂及供试材料

多糖标准品(Dextran T-10,T-40,T-70,T-500等)为中国药品生物制品检定所产品,Sephacryl S-100、DEAE-32为Pharmacia产品,单糖标准品为进口生化试剂,其他化学试剂均为国产分析纯化学试剂.玉米须购于北京同仁堂.

1.2 仪器

SpectrumLab 22PC可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;CR22G离心机,HITACHI;CT14RD离心机,上海天美精密科学仪器有限公司;数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;Sartorins BS110S电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;DSB-100A电脑全自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂;高效液相色谱仪Agilent 1100,安捷伦科技有限公司(美

收稿日期: 2018-03-30

* **通信作者:** ping.yandong@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

国); LC-2010CHT 液相色谱,岛津公司(日本); GCMS-QP2010,岛津公司(日本).

2 实验方法

2.1 多糖提取

取药材玉米须 1 kg,加蒸馏水 15 L,加热煮沸提取 3 次,每次提取 2 h,合并提取液浓缩至 1 L,冷却至室温[4]; 向浓缩液中加入等体积 30%(W/V)的三氯乙酸溶液,4 ℃反应 3 h,以 NaOH 溶液中和过剩的三氯乙酸,并以 225 000×*g* 离心 10 min 去除沉淀,上清液用截留分子量为 3 500 Da 的透析袋透析 24 h 除盐[5]; 透析结束后,透析袋内溶液再离心除去沉淀后,浓缩至 1 L,冷却至室温后,缓慢加入 95%乙醇溶液,至乙醇终浓度为 75%,室温静置3 h; 以225 000×*g* 离心 10 min 得沉淀,烘干得玉米须粗多糖.

2.2 多糖纯化[6]

称取玉米须粗多糖 5 g,加 10~20 mL 蒸馏水溶解,225 000×*g* 离心 10 min 除去沉淀后,上清样通过 DEAE(Cl^-型)离子交换柱(5.5 cm×50 cm),蒸馏水洗脱 4 h 后,分部收集; 以硫酸苯酚法测糖含量,收集峰尖部分浓缩至小体积并真空冷冻干燥为半精品多糖.

称取半精品多糖 100 mg,溶于 1~2 mL 蒸馏水后,225 000×*g* 离心 5 min,上清样通过 Sephacryl S 100 分子筛,蒸馏水洗脱,收集主峰部分,浓缩冻干后标记为 SMPS.

2.3 分子量测定

采用高效液相系统对 SMPS 的相对分子量进行测定.分子量测定用右旋糖酐对照品为中国药品生物制品检定所标准品; 按分子量从小到大顺序分别进对照品溶液,分别得到各标准样品的保留时间,记录色谱图.根据标准糖保留时间及分子量绘制的标准曲线,并依据所做的标准曲线计算 SMPS 的分子量.

色谱条件: Agilent 1100 高效液相色谱仪,Shodex SUGAR KS-805 (8 mm×300 mm)色谱柱,示差折光检测器,流动相为去离子水,流速 1 mL/min,柱温 35℃,进样量 20 μL.

2.4 单糖组成测定

称取 SMPS 2 mg,加 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)溶液 4 mL,于 110 ℃下水解 2 h,水解结束后冷却并减压浓缩至干,用甲醇洗涤 4 次(每次 3 mL),并蒸干,以除尽 TFA.

完全水解后的样品溶于 3 mL 蒸馏水,加 30 mg $NaBH_4$,室温还原 3 h,间歇振荡,然后用 25% 醋酸中和 $NaBH_4$ 至溶液不产生气泡.蒸干,用甲醇洗涤 4 次,蒸干,100 ℃ 加热 15 min,除去残留水分,加 3 mL 乙酸酐,密封,100 ℃ 反应 1 h,冷却,减压蒸干,并用甲苯洗 4 次(每次 2 mL),蒸干.

乙酰化产物用 8 mL 氯仿溶解,并用 8 mL 水萃取 4 次,最终的氯仿溶液层用无水硫酸钠干燥过夜,溶液浓缩至 0.1 mL 左右做气相色谱(GC)分析; 与标准单糖比对分析单糖组成及比例.

2.5 多糖糖链连接方式研究[7]

2.5.1 糖苷键构型确定

称取 SMPS 约 20 mg,进行核磁测定,根据^{1}H-NMR 及^{13}C-NMR 图谱中异头质子和异头碳的化学位移结果判断糖链中糖苷键的主要构型.

2.5.2 糖链连接方式分析

(1) 部分酸水解.

称取 SMPS 约 50 mg,加 0.1 mol/L TFA 溶液 2 mL,于 100 ℃ 下水解 1 h,水解结束后冷却并减压浓缩至干,蒸馏水洗涤 3 次并蒸干,以除尽 TFA.水解后的样品溶于 1~2 mL 蒸馏水,以截留分子量为 1 000 Da 的透析袋透析 3 次,每次 3 h,每次加蒸馏水 1 L,3 次透析结束后,透析袋内外溶液分别浓缩得玉米须多糖主链及支链.

(2) 单糖组成测定.

参考 2.4 方法分别测定 SMPS 部分酸水解主链、支链部分的单糖组成.

(3) 甲基化分析[8].

取 SMPS 及部分酸降解主链多糖各约 10 mg,分别加二甲基亚砜(DMSO) 2 mL,低温超声 20 min 至样品溶解,加粉末状 NaOH 50 mg,氮气保护,封口,超声振荡 30 min,室温放置 20 min,冰浴 10 min,使反应液凝固,滴加碘甲烷 1 mL,低温超声振荡 60 min,室温放置 30 min,减压抽去碘甲烷,反应液转至分液漏斗,以 20 mL 蒸馏水洗涤残留物并转移至分液漏斗,以 15 mL 氯仿萃取 3 次,合并,再以 3 mL 蒸馏水萃取 3 次,收集氯仿层,减压浓缩至干.再加入 DMSO 2 mL,重复上述反应 2~3 次.

甲基化产物溶于 3 mL 甲酸溶液,密封,100 ℃ 水解 6 h,减压蒸干,加甲醇多次除去甲酸; 解聚的样品溶于 3 mL 2 mol/L TFA 中,密封,110 ℃ 水解 3 h,冷却,减压蒸干,加甲醇多次除 TFA,以 2 mL 去离子水溶解.

向上述溶液中加入 20~30 mg $NaBH_4$,60 ℃ 水

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

浴反应 1 h,乙酸中和至无气泡生成,减压蒸干,并以 0.1%(V/V)盐酸甲醇溶液洗涤 4 次,蒸干,105 ℃ 烘干 15 min,加 3 mL 醋酐,密封,100 ℃ 反应 1 h,冷却,去离子水洗涤 3 次(每次 2~3 mL),减压蒸干.乙酰化产物以 1 mL 氯仿溶解,经等体积去离子水萃取,上层水相再萃取 2 次,氯仿层合并,蒸干,并以 0.5 mL 氯仿溶解,此溶液进行气相色谱质谱联用(GCMS)分析.

3 结果与分析

3.1 提取、分离纯化结果分析

蒸馏水提取的玉米须粗多糖经除蛋白、透析、醇沉、离子交换、分子筛层析等多步纯化获得纯度较高的 SMPS,冻干样品为白色絮状固体,经 HPLC 检测其纯度高于 90%,其 HPLC 色谱图如图 1 所示.色谱图中,多糖的主峰峰形均匀对称,无肩峰、前沿及拖尾情况,表明该多糖分子量分布均匀,纯度相对较高.

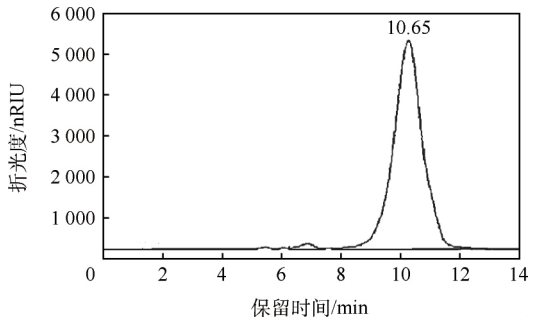


图 1 玉米须多糖高效液相色谱图

3.2 分子量测定结果

根据标准糖保留时间及分子量绘制的标准曲线,代入 SMPS 的保留时间计算得其相对分子量约为 7 000 Da.

3.3 单糖组成分析

SMPS 水解产物的 GC 图谱如图 2 所示,与标准单糖比对并通过峰面积计算知: SMPS-2 的单糖组成及摩尔比为鼠李糖(Rham):阿拉伯糖(Ara):木糖(Xyl):甘露糖(Man):半乳糖(Gal):葡萄糖(Glc) = 0.18:0.75:0.67:1.22:1.42:6.82.

3.4 糖链连接方式分析[9]

3.4.1 糖苷键构型分析

SMPS 的 ^{1}H-NMR 及 ^{13}C-NMR 结果分别如图 3 和 4 所示,^{1}H-NMR 异头质子信号分布在 δ 5.25~5.3 ppm,大于 5.0 ppm; ^{13}C-NMR 异头碳的化学位移分布于 δ 96~101 ppm,说明糖链中主要的糖苷键构型为 α 型.

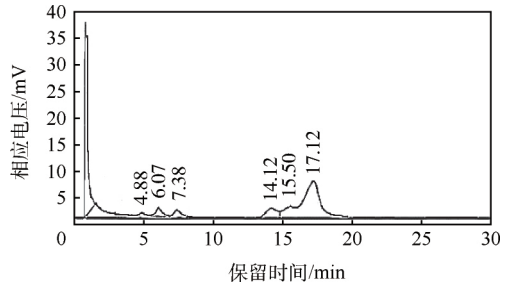


图 2 玉米须多糖水解产物气相色谱图

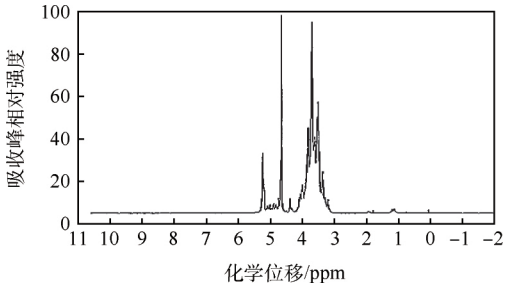


图 3 玉米须多糖 ^{1}H-NMR 图谱

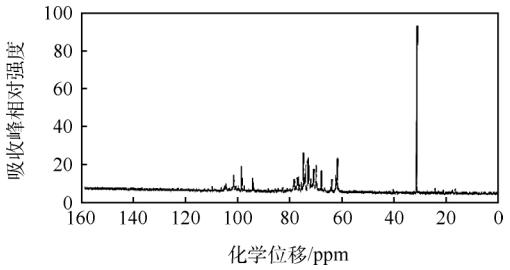


图 4 玉米须多糖 ^{13}C-NMR 图谱

3.4.2 主链及支链单糖组成

SMPS 部分酸水解主链、支链部分的单糖组成及摩尔比,结果分别是,主链 Rham:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 0.18:0.15:0.26:1.01:1.03:5.8; 支链 Rham:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 0.15:1.14:0.6:0.88:0.96:4.96.

3.3.3 多糖甲基化结果

SMPS 及其主链的甲基化产物的 GC 图谱如图 5 和 6 所示.两图分别显示的是 SMPS 及其主链完全水解后经甲基化处理所得的不同大小的片段情况,不同保留时间对应片段的大小、糖苷键构型不同,峰面积则代表该片段的分布比例.

GC 图谱中各组分对应的 MS 图谱与标准图谱比对分析得出可能的糖苷键连接方式如表 1 所示.从表 1 可知,玉米须多糖的糖链主要以 1→3、1→4 连接的葡萄糖组成(分别占 15.97%和 43.52%),糖链末端主要为半乳糖,糖链分支多存在于半乳糖和甘露糖连接处.多糖主链主要以 1→4 和 1→3、1→6 连接的葡萄糖组成,糖链末端主要为半乳糖.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

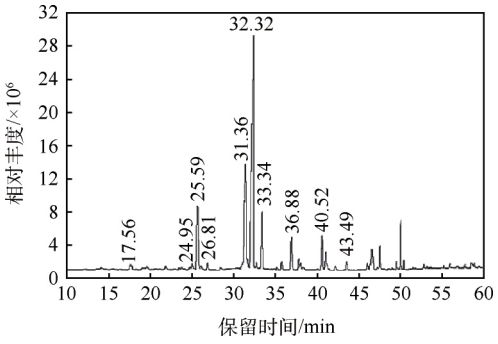


图 5 玉米须多糖甲基化产物气相色谱图

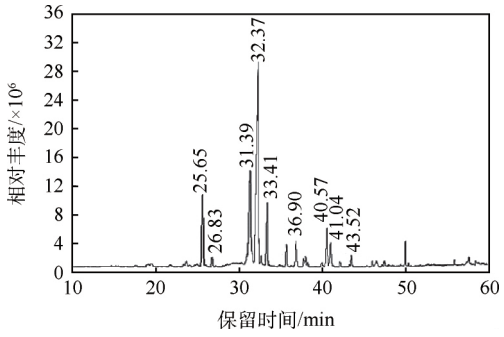


图 6 玉米须多糖主链甲基化产物气相色谱图

表 1 玉米须多糖及其主链糖链连接方式

玉米须多糖			玉米须多糖主链		
保留时间/min	糖苷键构型	百分比/%	保留时间/min	糖苷键构型	百分比/%
17.56	Araf-(1→	1.02			
21.75	→2)-Arap-(1→	0.59			
24.95	Xylp-(1→	0.64			
25.59	Galp-(1→	9.75	25.65	Galp-(1→	11.04
26.81	Manp-(1→	0.84	26.83	Manp-(1→	1.27
31.36	→3)-Glcp-(1→	15.97	31.39	→3)-Glcp-(1→	18.71
32.32	→4)-Glcp-(1→	43.52	32.37	→4)-Glcp-(1→	41.14
33.34	→6)-Glcp-(1→	6.53	33.41	→6)-Glcp-(1→	8.35
35.69	→6)-Manp-(1→	0.87	35.72	→6)-Manp-(1→	2.31
36.88	→3,4)-Galp-(1→	3.78	36.90	→3,4)-Galp-(1→	2.84
37.76	→2,3)-Manp-(1→	1.14	37.79	→2,3)-Manp-(1→	0.87
37.97	→2,4)-Manp-(1→	0.69	38.01	→2,4)-Manp-(1→	0.81
40.52	→4,6)-Manp-(1→	3.82	40.57	→4,6)-Manp-(1→	4.65
41.00	→3,6)-Manp-(1→	2.10	41.04	→3,6)-Manp-(1→	3.18
42.14	→3,6)-Manp-(1→	0.45	42.12	→3,6)-Manp-(1→	0.60
43.49	→3,6)-Galp-(1→	0.79	43.52	→3,6)-Galp-(1→	1.13
46.01	→3,4,6)-Glcp-(1→	0.67			

4 讨 论

玉米须多糖的传统提取方法有蒸馏水提取法、酸提法、碱提法、酶提法、超声波提取法及微波提取法等,其中水提法最为常用.近年来,超临界流体萃取技术[10]、超高压提取技术[11]、离子液体-微波辅助提取技术[12]、反胶束萃取技术[13]等诸多提取技术的发展,使得中药天然活性成分的提取更加快速和高效.考虑到玉米须在降血糖的临床应用及传统食用方式,采用水提法提取其水溶性多糖,并对其分子结构进行了初步研究.

对玉米须多糖进行解析,SMPS 的单糖组成和比例为 Rham∶Ara∶Xyl∶Man∶Gal∶Glc = 0.18∶0.75∶0.67∶1.22∶1.42∶6.82,分子量约 7 000 Da.结合全糖、主链、支链的单糖组成,可以推测玉米须多糖的重复单元可能是由甘露糖、半乳糖、葡萄糖构成(摩尔比为 1∶1∶5);根据 GC-MS 的结果可推测出阿拉伯糖主要或全部存在于支链中,约每 3 个重复单元存在一个阿拉伯糖;木糖在主链及支链中均有存在,80%存在于支链中,约每 3 个重复单元对应有 2 个木糖基团;甘露糖主要以 1→6 连接存在于主链中,少量存在于末端,摩尔比约为 8.5∶1;半乳糖主要存在于主链的末端,少量以 1→3 键连接,并以1→3,4 形成支链,摩尔比约为 1∶3.8;葡萄糖约占主链

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单糖组成的 75%,主要的连接方式为 1→3、1→4、1→6 连接,摩尔比约为 2 :5 :1,且主要的糖苷键构型为 α 型.

该多糖结构较为复杂,根据以上研究所得结果可推测 SMPS 的主链由以下结构的糖单元构成,如图 7 所示.

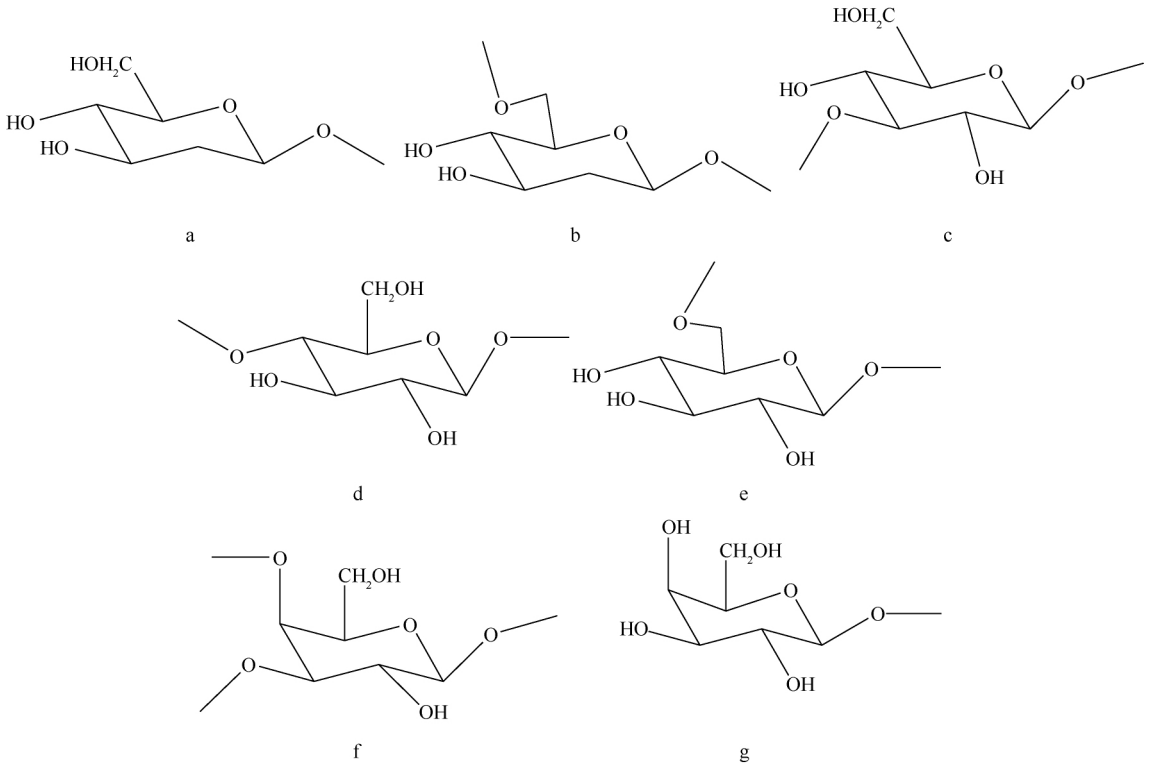


图 7 SMPS 主链中可能存在的糖单元结构

汤鲁宏等[14] 曾对玉米须多糖进行了分离纯化并对其单糖组成进行了分析,该研究团队共纯化出 4 种多糖,单糖组成包括 Man、Glc、Gal、Xyl、Ara、Rham 等,其中两种多糖中的 Man 含量较高,另两种多糖中的 Glc 和 Gal 含量较高,由于当时研究技术及研究条件的限制,未对多糖结构进行更细致的分析.该文章所研究玉米须多糖其单糖组成与该研究成果基本一致,并进行了更深入的研究,对多糖中各种单糖在糖链中可能存在的连接方式及可能的重复单元进行了分析.由于组成该多糖的单糖种类较多,连接方式较为复杂,针对该多糖精细结构尚需要更为细致深入的研究.

多糖是生物体中一类非常重要的天然大分子物质,对多糖结构的研究有利于深入研究其生物活性功能,笔者对玉米须多糖的组成及结构的研究对于深入揭示玉米须降血糖活性的作用机制具有重要意义,同时,明确了分子构型还可以对其进行定位修饰,使其具备更丰富的生物学靶向功能.

但限于目前的技术手段,由多糖单糖组成的复杂多糖的糖链连接方式及空间构型的研究还有很多困难,随着科学的发展,未来,各种高科技产品和技术手段将应用到天然药物的研究领域,实现天然药物研究的技术突破.

参 考 文 献

[1] 赖喆娆. 可促进社区 2 型糖尿病患者提高自我管理能力的方法[J]. 养生保健指南,2017,16(7):228,273.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1980:555.

[3] 刘娟,韩晓强,姜博. 玉米须多糖治疗糖尿病作用研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(8):1441-1442.

[4] 周鸿立,张艳,金海甲,等. 玉米须多糖药理作用及提取纯化研究进展[J]. 吉林化工学院学报,2009,26(1):23-26.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[5] 周鸿立，张英珍，郭志红. 三氯乙酸-酶法脱玉米须多糖中蛋白质工艺的优化 [J]. 食品研究与开发，2015，36(3)：63-66.
[6] 张逸，王旺，蔡寅，等. 苦瓜多糖的纯化、结构解析及其免疫调节和抗肿瘤活性研究 [J]. 南京中医药大学学报，2017，33(1)：33-39.
[7] 李雅双，刘杰，包瑛，等. 芜菁水溶性多糖的结构分析 [J]. 食品与发酵工业，2015，41(8)：175-180.
[8] 曹荣安，徐秀丽，苗家尉，等. 龙胆多糖的结构表征及其体外免疫活性 [J]. 食品科学，2017，38(11)：168-173.
[9] NIU Y，WANG H，XIE Z，et al. Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of Astragalus membranaceus (Fisch) Bge. var. mongolicus (Bge.) Hsiao [J]. Food Chem，2011，128(3)：620-626.
[10] 龙旭，孟庆华，张拴，等. 超临界流体萃取技术在中药提取中的应用 [J]. 科技展望，2016，26(32)：110.
[11] 郭赛，张雨婷，张莉，等. 超高压技术中药领域研究进展 [J]. 广东化工，2017，44(1)：53-54.
[12] 粟敏，陈琳，龙昱，等. 离子液体-微波辅助提取多花黄精多糖工艺研究 [J]. 中药材，2016，39(9)：2075-2077.
[13] LI S，CAO X. Extraction of tea polysaccharides(TPS) using anionic reverse micellar system [J]. Sep Purif Technol，2014，122(122)：306-314.
[14] 汤鲁宏，丁霄霖，尤丽芬，等. 玉米须生物活性成分的初步研究：玉米须多糖及其免疫增强作用 [J]. 无锡轻工大学学报，1995，14(4)：319-324.

Extraction，Purification and Structural Characterization Analysis of Stigma Maydis Polysaccharide

WANG Hengyu[1] LUO Yunfeng[2] JIANG Jinghua[3] DING Kan[4] DONG Yanping[5]

(1. Yunnan Institute of Materia Medic，Kunming Yunnan 650111；2. Yunnan University of TCM，Kunming Yunnan 650500；3. Shanghai Saccharidia Bio-medical Technologies Co. Ltd.，Shanghai 201203；4. Shanghai Institute of Materia Medica，Chinese Academy of Sciences，Shanghai 201203；5. Drug Research Institute，Kunming Pharmaceutical Corporation Limited，Kunming Yunnan 650111)

Abstract

One kind of stigma maydis polysaccharide (SMPS) was extracted from stigma maydis by distilled water，then purified by ion exchange chromatography and molecular sieve chromatography. The results of structural studies showed that SMPS was composed of rhamnose，arabinose，xylose，mannose，galactose and glucose (0.18∶0.75∶0.67∶1.22∶1.42∶6.82) with apparent molecular weight of 7×10^3 Da. SMPS has a repeating unit composed of mannose，galactose and glucose. Mannose mainly exists as →6)-Man-(1→ in the main chain. Glucose mainly exists as →3)-Glc-(1→，→4)-Glc-(1→ and →6)-Glc-(1→ in the pdysaccharide. Xylose exists in both backbone and branch chain. Galactose mainly exists at the end of the main chain.

Keywords: stigma maydis polysaccharide；purification；structural analysis

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net