

超声提取的麦冬多糖 POJ-U1b 的结构分析及 AFM 观测

王小梅^{1*}, 孙润广², 郝大鹏¹, 王 妙¹

¹西安航空学院理学院, 西安 710077; ²陕西师范大学物理学与信息技术学院, 西安 710062

摘要: 本文利用超声提取麦冬多糖, 经 DEAE-52 纤维素柱层析进行分离纯化, 利用 Sephadex G-150 凝胶柱层析对得到的多糖组分 POJ-U1b 进行纯度鉴定, 结果显示 POJ-U1b 为单一组分。利用气相色谱法、红外光谱法及核磁共振对 POJ-U1b 的结构进行了研究, 利用原子力显微镜对不同浓度的 POJ-U1b 表面形貌进行了观测。结果显示, 麦冬多糖 POJ-U1b 是由葡萄糖组成的葡聚糖, 具有糖类物质的特征吸收峰, 其糖环构型既有吡喃型又有呋喃型, 糖链主要由 $\rightarrow 6$ - α -D-Glcp(1 \rightarrow 连接方式构成。AFM 观测结果表明 POJ-U1b 具有高度分支的化学结构, 糖链间通过糖单元间不同的链接方式衍生出许多环状和分支结构。随着多糖浓度的增大, POJ-U1b 呈现出链状及片状粘连结构, 这种现象可能与糖链间的范德瓦尔斯相互作用及糖链间氢键缔合有关。

关键词: 麦冬多糖; 结构; 原子力显微镜

中图分类号: Q53; TN16; Q5-33

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.8.010

Structural Analysis and Observation of *Ophiopogon japonicus* Polysaccharide POJ-U1b

WANG Xiao-mei^{1*}, SUN Run-guang, HAO Da-peng, WANG Miao

¹Science College, Xi'an Aeronautical University, Xi'an 710077, China; ²Laboratory of Biophysics and Biomedicine Engineering, College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: *Ophiopogon japonicus* polysaccharide was ultrasonically extracted. It was separated and purified by DEAE-52 cellulose column to afford the polysaccharide POJ-U1b. The purity of POJ-U1b was determined by Sephadex G-150 gel column. The result showed that POJ-U1b was homogeneous. The structure of POJ-U1b was determined by gas chromatography, infrared spectrometry and nuclear magnetic resonance, and the surface morphology of POJ-U1b at different concentrations was observed by atomic force microscopy (AFM). The results showed that POJ-U1b was glucan composed by glucose. The infrared spectrum suggested that there were characteristic absorption bands of polysaccharide in POJ-U1b, and its monosaccharide residues existed in the forms of pyran and furan rings. POJ-U1b was mainly composed of $\rightarrow 6$ - α -D-Glcp(1 \rightarrow linkage. AFM revealed that POJ-U1b had a multi-branched chemical structure in linkages of adjacent monosaccharides, ringed and branched structure was derived from link of polysaccharide chains. With the increasing of concentration, POJ-U1b presented chain and flakiness conglutinate structure, which was related to van der Waals interaction and hydrogen bond of polysaccharide chains.

Key words: *Ophiopogon japonicus* polysaccharide; structure; atomic force microscopy

麦冬多糖作为麦冬的主要有效成分之一, 近年来研究表明其具有多种生物活性, 包括: 免疫活性、抗过敏性、降血糖、抗心肌缺血等^[1-3]。已有文献^[4-6]报道超声提取法可明显提高麦冬多糖的提取率, 但目前对于超声提取的麦冬多糖结构的研究相对较少。由于多糖结构复杂, 且很难形成晶体, 对其

二级结构的研究比较困难。原子力显微镜的出现使得多糖表面形貌的研究成为可能^[7,8]。原子力显微镜(AFM)是以物理学原理为基础的一种新型表面分析仪器, 它的出现为人们更直观的了解微观世界提供了一种有效的手段。从 AFM 出现到现在, 经过几十年的技术改进, 由于其纳米量级的精确度和其表面不受导电性的限制, 以及在生理状态下可操作的特点, 被广泛应用于生物学领域。AFM 图像清晰, 稳定性好, 操作简便, 受到人们的普遍关注和认可。目前, AFM 已被广泛应用于蛋白质、DNA、黄原

收稿日期: 2016-03-31 接受日期: 2016-06-15

基金项目: 西安航空学院校级项目(2016KY1215)

* 通讯作者 Tel: 86-013289277087; E-mail: wxm19830427@163.com

胶等生物大分子链构象的三维分析研究中^[9,10]。本文利用超声提取麦冬多糖,并对其进行分离纯化,获得麦冬多糖组分 POJ-U1b,利用气相色谱法、红外光谱法和核磁共振对其结构进行了研究,利用原子力显微镜对其表面形貌进行了观测,获得了该多糖在水溶液中的分子构象信息。为进一步研究其高级结构及构效关系提供了一定的实验依据。

1 材料、试剂与仪器

麦冬,浙江产,购于西安市万寿路中药市场。DEAE-52(Whatman),Sephadex G-150(Pharmacia),苯酚,浓硫酸,95%乙醇,氯化钠,氢氧化钠均为分析纯。

SPM-9500J3 型原子力显微镜(日本岛津公司)、TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、Trace-2000 气相色谱仪(美国菲尼根公司)、Avatar360E. S. P. F TIR 傅里叶变换红外光谱仪(尼高力仪器)、78HW-1 恒温加热磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司)、RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、FD-1A 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器公司)、AVANCE-III 400M 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。

2 实验方法

2.1 麦冬多糖 POJ-U1b 的提取及分离纯化

麦冬块根烘干,脱脂,利用超声提取麦冬粗多糖,以蒸馏水为溶剂,料液比 1:10,超声功率 80 W,超声时间 10 s,间歇时间 15 s,超声次数 90 次,提取两次。将两次提取液混合浓缩,真空冷冻干燥后得麦冬粗多糖 POJ-U。POJ-U 经 DEAE-cellulose 52 色谱柱^[11],梯度洗脱法洗脱各级分,洗脱液分别为蒸馏水、0.05 M NaCl 溶液、0.3 M NaCl 溶液,全自动部分收集器收集洗脱液,苯酚-硫酸法在 487 nm 波长下比色检测糖含量。以试管数目为横坐标,吸光度值为纵坐标作 DEAE-cellulose52 色谱柱洗脱曲线图。合并各主峰溶液,浓缩,流水透析,冷冻干燥,得 POJ-U1a、POJ-U1b、POJ-U1c。本文对麦冬多糖 POJ-U1b 进行研究。

2.2 多糖 POJ-U1b 的纯度鉴定

利用 Sephadex G-150 凝胶过滤法对麦冬多糖 POJ-U1b 进行纯度鉴定。将之前收集的酸性多糖组分 POJ-U1b 经 Sephadex G-150 柱层析,洗脱液为双蒸水。以试管数目为横坐标,吸光度值为纵坐标作

DEAE-cellulose52 色谱柱洗脱曲线图,若得到单一对称峰,说明麦冬多糖经 DEAE-cellulose52 分离出了比较单一的组分。

2.3 麦冬多糖 POJ-U1b 的单糖组成分析

5 mg POJ-U1b 多糖样品中加入 3 mL 2 mol/L 的三氟乙酸,110 °C 下水解 6 h,加入少量甲醇,50 °C 减压浓缩(重复三次),以除尽多余的三氟乙酸,得水解产物。水解产物中加入无水吡啶 0.5 mL,盐酸羟胺 10 mg,肌醇六乙酯(内标)2 mg,混合后于 90 °C 恒温水浴锅中反应 30 min,取出,冷却至室温。再加入 0.5 mL 无水乙酸酐,90 °C 继续反应 30 min 进行糖腈乙酰化,之后进行气相色谱分析^[12]。气相色谱条件:色谱柱为 OV-17 毛细管柱;检测器为 FID 检测器;升温程序:150 °C(升温速度 7 °C/min)→190 °C(升温速度 15 °C/min)→250 °C;进样口温度:280 °C;检测器温度:260 °C;Air:H₂:N₂=300:30:30,载气流速为 10 mL/min;进样量为 1 μL。

2.4 傅里叶红外光谱分析

将 1 mg 多糖样品与适量红外灯干燥后的 KBr 粉末混合,充分研磨,压片后利用傅里叶变换红外光谱仪在 4000 ~ 400 cm⁻¹ 波长范围内进行扫描^[13,14]。

2.5 核磁共振分析

取干燥多糖样品 5 mg,溶于 0.5 mL 重水(D₂O)中,用 AVANCE-III 400M 核磁共振仪对其进行¹H NMR 分析,测定温度 40 °C(313 K)。取干燥多糖样品溶于重水(D₂O)中,使其达到饱和状态,用 AVANCE-III 400 M 核磁共振仪对其进行¹³C NMR 分析,测定温度 40 °C(313 K)。

2.6 AFM 制样及观测

将已经制备好的麦冬多糖 POJ-U1b 溶液用双蒸水配制成 100 μg/mL 的储备液,磁力搅拌器搅拌 2 h。稀释成浓度分别为 5 μg/mL 和 2.5 μg/mL 的多糖溶液,分别取确定浓度的溶液 5 μg,滴在新剥

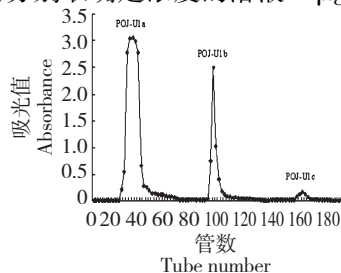


图1 麦冬多糖 DEAE-52 纤维素柱层析图

Fig. 1 Chromatographic isolation of *O. japonicus* polysaccharide on DEAE-52 cellulose column

离的云母表面上,在室温条件下自然风干。置于日本岛津公司 SPM-9500J3 型原子力显微镜下观测,图像均在 Contact 模式下进行,探针为 Si_3N_4 ,微悬臂长 200 μm ,微悬臂的弹性常数为 0.28 N/m。

3 结果与分析

3.1 DEAE-cellulose52 色谱柱层析结果

如图 1 所示,80 W 超声提取的麦冬多糖 POJ-U 经 DEAE-cellulose 52 色谱柱层析洗脱得蒸馏水洗组分 POJ-U1a,0.05 M NaCl 洗脱组分 POJ-U1b,0.3 M NaCl 洗脱组分 POJ-U1c。

3.2 POJ-U1b 纯度鉴定结果

经 Sephadex G-150 凝胶层析柱对麦冬多糖 POJ-U1b 的均一性进行鉴定,POJ-U1b 多糖显示出单一对称峰,结果见图 2,这说明麦冬多糖 POJ-U1b 为组分均一的多糖。

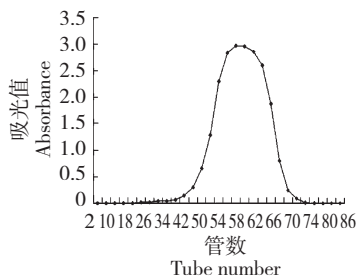


图 2 POJ-U1b 的 Sephadex G-150 凝胶层析柱色谱图

Fig. 2 Sephadex G-150 column chromatography of POJ-U1b

3.3 POJ-U1b 的理化性质研究

麦冬多糖 POJ-U1b 是一种白色粉末状固体,溶于水,不溶于乙醇、丙酮、氯仿等有机溶剂。图 3B 麦冬多糖 POJ-U1b 水解后所得各种糖精乙酰化衍

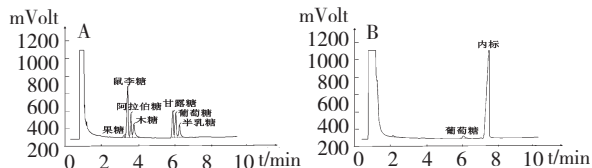


图 3 混合标准单糖 (A) 及 POJ-U1b 水解物 (B) 的气相色谱图

Fig. 3 Gas chromatogram of mixed monosaccharide standards (A) and POJ-U1b (B)

注:A:混合标准单糖气相图谱出峰时间:D-果糖(3.125 min);D-鼠李糖(3.325 min);D-阿拉伯糖(3.525 min);D-木糖(3.700 min);D-甘露糖(5.974 min);D-葡萄糖(6.125 min);D-半乳糖(6.349 min);B:POJ-U1b 气相色谱图谱出峰时间:葡萄糖(6.165 min);内标(7.516 min)

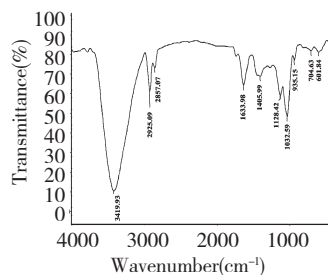


图 4 麦冬多糖 POJ-U1b 的傅立叶变换红外光谱

Fig. 4 IR spectrum of *O. japonicus* polysaccharide POJ-U1b

生后的气相色谱分析图,对照图 3A 中混合标准单糖的气相色谱图,可以看出 POJ-U1b 的单糖组成只有葡萄糖,该多糖是由葡萄糖组成的葡聚糖。

麦冬多糖 POJ-U1b 的红外光谱见图 4,从图中可以看出,麦冬多糖 POJ-U1b 具有明显的多糖的特征吸收峰:3419 cm^{-1} 出现的宽峰是多糖的 O-H 伸缩振动峰,表明该多糖存在分子间和分子内氢键;2925 cm^{-1} 和 2857 cm^{-1} 处为多糖- CH_2 -的 C-H 伸缩振动引起的;1633 cm^{-1} 处为多糖中结晶水或氨基 N-H 变角振动引起的;1000 cm^{-1} -1200 cm^{-1} 之间的两个吸收峰 1032.59 cm^{-1} 与 1128.42 cm^{-1} 说明该多糖存在吡喃构型^[11];935 cm^{-1} 处为呋喃环的对称伸缩振动引起的^[15],该结果与后面核磁共振异头碳的化学位移 δ 103.59 ppm 结果一致;601 cm^{-1} 处为吡喃糖的骨架对称伸缩振动吸收峰。由此可知,麦冬多糖 POJ-U1b 中既有吡喃环又有呋喃环。

3.4 POJ-U1b 的核磁共振分析

麦冬多糖 POJ-U1b 的 ^1H NMR 如图 5A 所示,在异头质子区域 δ 4.5 ~ 5.5 之间只有一个质子信号,说明 POJ-U1b 只有一种单糖种类,与气相分析结果一致。一般情况下 α 型吡喃糖 H-1 质子的化学位移大于 4.95 ppm, β 型吡喃糖 H-1 质子的化学位移小于 4.95 ppm,异头质子 H-1 在 δ 5.26 有一个峰,说明该多糖残基主要为 α 型吡喃糖^[16]。

麦冬多糖 POJ-U1b 的 ^{13}C NMR 如图 5B 所示, ^{13}C NMR 图中显著的化学位移说明 POJ-U1b 是相当纯净的。对麦冬多糖 POJ-U1b 的异头碳信号进行归属, δ 103.59 ppm 为 \rightarrow 3,6)- α -D-Glcf (1 异头碳信号); δ 103.10 ppm 为 \rightarrow 6)- α -D-Glcp (1 \rightarrow 异头碳信号); δ 92.09 ppm 为 \rightarrow 3)- α -D-Glcp (1 \rightarrow 的异头碳信号^[17],各信号峰积分面积比为 1.00:1.59:0.08,因此,麦冬多糖 POJ-U1b 中 \rightarrow 6)- α -D-Glcp (1 \rightarrow 糖残基的含量最高。

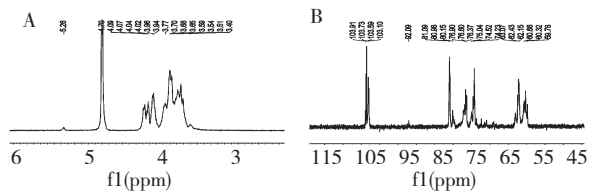


图5 POJ-U1b 的¹H NMR (A) 及¹³C NMR 谱图

Fig. 5 ¹H and ¹³C NMR spectra of POJ-U1b

3.5 POJ-U1b 的 AFM 观察

图6为麦冬多糖 POJ-U1b 在 5 μg/mL 的原子力显微镜图,图7为麦冬多糖 POJ-U1b 在 2.5 μg/mL 的原子力显微镜图。从图中可以看出,当浓度为 5 μg/mL 的麦冬多糖 POJ-U1b 呈现出如图6A所示的聚集状,每个聚集物在高分辨率下(图6B)可以看出其分子链状及片状粘连结构,实验测得其分子链高度约 1.3 nm,宽度在几十到几百纳米不等。当浓度为 2.5 μg/mL 时(图7),麦冬多糖 POJ-U1b 由长链折叠缠绕形成,链间通过糖单元间不同的链接方式衍生出许多环状或带有分支的侧链结构,聚合物链分子相互缠绕。实验测得其链的平均厚度为 0.5 nm,链的宽度在 0.1 ~ 0.8 μm,一般多糖的分子链直径在 0.1 ~ 1.0 nm,POJ-U1b 的图像的高度接近于单分子链尺寸,而宽度远大于单分子链的估计值,这一方面可能是由于针尖在扫描样品时与分子间相互作用导致增宽效应,另一方面可能是由于糖链间的相互作用及与云母表面的相互作用,使得糖链平铺在云母表面。在对 DNA 及其他多糖的 AFM 研究中,此类效应已经被报道。从图6和图7的比较可以看出,麦冬多糖 POJ-U1b 分子间交联度和相互作用随浓度的增加而增加。当 POJ-U1b 的浓度较小时,分子比较分散(图7);当 POJ-U1b 的浓度增大到 5 μg/mL 时,多糖分子链间的相互作用力增强,增加了单链之间的链接,形成如图6所示的分子

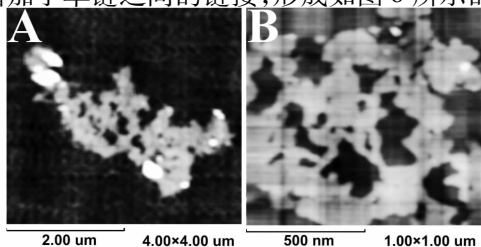


图6 5 μg/mL POJ-U1b 的 AFM 低分辨率(A)及高分辨率(B)平面图

Fig. 5 Low resolution (A) and high resolution (B) AFM images of 5 μg/mL POJ-U1b

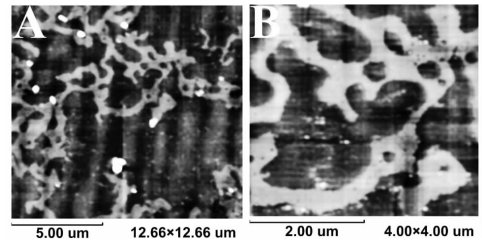


图7 2.5 μg/mL POJ-U1b 的 AFM 低分辨率(A)及高分辨率(B)平面图

Fig. 7 Low resolution (A) and high resolution (B) AFM images of 2.5 μg/mL POJ-U1b

链状及片状粘连结构。

4 结论

利用气相色谱法、傅里叶变换红外光谱法、核磁共振对超声提取的麦冬多糖 POJ-U1b 的结构进行研究,结果显示,麦冬多糖 POJ-U1b 为均一多糖,具有多糖类物质的特征吸收峰,是由葡萄糖组成的葡聚糖,既存在吡喃环,又存在呋喃环,主要由 $\rightarrow 6$)- α -D-Glcp(1 \rightarrow 糖残基构成。AFM 结果表明,麦冬多糖具有高度分支的化学结构,随着多糖浓度的增大,其糖链间的相互作用力增强,形成片状粘连结构。

多糖的立体结构决定着多糖的生物活性,对多糖链构象及其与缀合物之间的空间关系的研究具有重要意义。据报道,多糖的高级结构比多糖的一级结构对多糖功能的影响更大。但由于多糖结构复杂,又难以结晶,对其高级结构的研究还没有一种有效的方法。AFM 的出现使多糖高级结构的研究成为可能,它能获得多糖高级结构稳定、清晰的图像,为多糖结构的深入研究提供了有利的工具,具有广泛的应用前景。

参考文献

- 1 Sun GL, Lin X, Shen L, *et al.* Mono-PEGylated radix ophiopogonis polysaccharide for the treatment of myocardial ischemia. *Eu J Pharm Sci*, 2013, 49: 629-636.
- 2 Xiong SL, Li AL, Huang N, *et al.* Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus*. *Carbohydr Polym*, 2011, 86: 1273-1280.
- 3 Xu J, Wang Y, Xu DS, *et al.* Hypoglycemic effects of MDG-1, a polysaccharide derived from *Ophiopogon japonicas*, in the ob/ob mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49: 657-662.

- 4 Hromádková Z, Ebringerová A, Valachovic P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian, *Valeriana officinalis* L. *Ultrasonic Sonochem*, 2002, 9:37-44.
- 5 Chen YY, Luo HY, Gao AP, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seed by response surface methodology and their structural characteristics. *Innov Food Sci Emerging Technol*, 2011, 12: 305-309.
- 6 Ying Z, Han XX, Li JR. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chem*, 2011, 127: 1273-1279.
- 7 Wu J, Deng X, Zhang Y. Application of atomic force microscopy in the study of polysaccharide. *Agric Sci China*, 2009, 8:1458-1465.
- 8 Williams MAK, Marshall A, Haverkamp RG, *et al.* Stretching single polysaccharide molecules using AFM: A potential method for the investigation of the intermolecular uronate distribution of alginate? *Food Hydrocolloids*, 2008, 22:18-23.
- 9 Adamczyk Z, Kujda M, Nattich-Rak M, *et al.* Revealing properties of the KfrA plasmid protein via combined DLS, AFM and electrokinetic measurements. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 103:635-641.
- 10 Iijima M, Shinozaki M, Hatakeyama T. AFM studies on gelation mechanism of xanthan gum hydrogels. *Carbohydr Polym*, 2007, 68:701-707.
- 11 Huang SQ, Li JW, Li YQ, *et al.* Purification and structural characterization of a new water-soluble neutral polysaccharide GLP-F1-1 from *Ganoderma lucidum*. *Int J Biol Macromol*, 2011, 48:165-169.
- 12 Guadalupe Z, Martínez-Pinillab O, Garridoa I, *et al.* Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chem*, 2012, 131:367-374.
- 13 Volpi N. Milligram-scale preparation and purification of oligosaccharides of defined length possessing the structure of chondroitin from defructosylated capsula polysaccharide K4. *Glycobiology*, 2003, 13:635-640.
- 14 Sun YX, Liu JC, Yang XD, *et al.* Purification, structural analysis and hydroxyl radical-scavenging capacity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Russula virescens*. *Proc Biochem*, 2010, 45:874-879.
- 15 Zhang WJ (张惟杰). Biochemical Research Techniques of Glycoconjugates (糖复合物生化研究技术). Zhejiang: Zhejiang University Publishing House, 1999. 193-198.
- 16 Hou CM (侯成敏), Chen WN (陈文宁), Chen YF (陈玉放), *et al.* Characteristics of spectral analysis for carbohydrates structures. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:556-561.
- 17 Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 1992, 31:3307-3330.

(上接第 1227 页)

- 7 Kurimoto H, Nishijo H, Uwano T, *et al.* Effects of nonsaponin fraction of red ginseng on learning deficits in aged rats. *Physiol Behav*, 2004, 82:345-355.
- 8 Wang SM (王盛民), Zhang Y (张瑛), Meng JG (孟建国), *et al.* Effects of expanded processing of ginseng on the learning and memory ability in mice. *Shaanxi J Tradit Chin Med* (陕西中医), 2006, 27:732-734.
- 9 Wang Y, Jiang RZ, Li GR, *et al.* Structural and enhanced memory activity studies of extracts from *Panax ginseng* root. *Food Chem*, 2010, 119:969-973.
- 10 Sloley BD, Pang PK, Huang BH, *et al.* American ginseng extract reduces scopolamine induced amnesia in a spatial learning task. *J Psychiatr Neurosci*, 1999, 24:442-452.
- 11 Whishaw IQ. Formation of a place learning-set by the rat: A new paradigm for neurobehavioral studies. *Physiol Behav*, 1985, 35:139-143.