

山茱萸酸性多糖 FCP5-A 的分离纯化与结构表征

杨丽艳¹, 黄琳娟¹, 王仲孚¹, 曹春阳², 孙文基¹

(1. 西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069; 2. 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 从山茱萸中提取出水溶性粗多糖, 经柱色谱分离纯化得到一种酸性多糖组分 FCP5-A。采用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定其为均一性多糖, 平均分子量为 8.7×10^4 。经 IR、GC、部分酸水解、¹³C NMR 及甲基化分析等方法对该多糖的化学结构进行了表征。结果表明, 该多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖及半乳糖醛酸组成, 其摩尔比为 1:5.7:0.6:1.2。FCP5-A 为多分支结构, 由-2)Rha(1-及-4)GalA(1-构成主链, 在鼠李糖的 4 位存在分支; 支链主要由高度分支的阿拉伯糖构成, 此外还存在-3)Gal(1-; 末端残基为 Ara(1-及 Gal(1-。结果提示, FCP5-A 为一种新的山茱萸酸性分支多糖。

关键词 山茱萸; 多糖; 分离纯化; 结构表征

中图分类号 O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)05-0936-05

多糖广泛存在于植物体中。在过去的 10 年中, 人们已发现植物多糖不仅是机体的能量来源和骨架成分, 而且还具有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、免疫调节及降血糖等多种生物活性^[1]。植物多糖的结构及药理学作用机理已被广泛研究, 越来越多的具有不同活性的多糖已被鉴定和修饰, 并用于疾病的治疗^[2,3]。山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 的干燥成熟果肉。其药用最早记载于秦汉时期的《神农本草经》, 具有补益肝肾, 涩精固脱的功效。山茱萸多糖作为山茱萸的主要活性成分, 具有抗氧化及免疫调节等生理活性^[4,5], 近年来已引起了人们的广泛关注。有关山茱萸多糖的分离纯化及结构研究时有文献报道^[6,7], 但已见报道的均为中性多糖。本文从山茱萸中分离纯化出一种酸性多糖 FCP5-A, 并对其理化性质及结构进行了研究。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

山茱萸购于西安市中药材市场, 经鉴定为山茱萸科植物山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 的果实。鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖为上海国药集团产品; 葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、鸡蛋白蛋白和二甲基亚砷 (DMSO) 为 Sigma 产品; 碘甲烷为北京化学试剂公司产品; 1-环己基-3-(2-吗啉代乙基) 碳化二亚胺-甲基-*p*-甲苯磺酸盐 (CMC) 和氘代硼氢化钠 (NaBD₄) 为 Alfa Aesar 产品; DEAE-纤维素 (DE-52) 为 Whatman 产品; Bio-Gel P-60 为 Bio-Rad 产品。Waters 2695 型高效液相色谱仪, 配置 2414 示差折光检测器; Shimadzu GC2010 型气相色谱仪, 采用 FID 检测器; Shimadzu GC-MS-QP2010 型气质联用仪, 采用电子轰击 (EI) 离子源; Lambda 25 UV/VIS 型 (Perkin Elmer 生产) 紫外分光光度计; EQUINOX 55 型 (Bruker 生产) 傅里叶红外光谱仪; Varian 600 MHz 核磁共振仪。

1.2 FCP5-A 的分离与纯化

将山茱萸烘干 (50 °C), 粉碎, 用 30 °C 水提取 2 次, 各 16 h, 提取过程中不时加入 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 5。将提取液离心 (3000 r/min, 15 min), 残渣用 80 °C 水提取 5 h。合并 3 次的提取液, 浓缩, 用乙醇醇沉, 加 Sevage 试剂除去游离蛋白质。透析, 冷冻干燥, 得到紫红色山茱萸粗多糖 FCP。

将 FCP 过 DEAE-Cellulose 柱 (HCO₃⁻ 型), 依次用蒸馏水和 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mol/L NaHCO₃

收稿日期: 2007-08-20。

基金项目: 国家“八六三”计划 (批准号: 2006AA02Z146) 和陕西省科技研究发展计划 [批准号: 2007K16-06(3)] 资助。

联系人简介: 王仲孚, 男, 博士, 副教授, 从事糖生物学与糖工程学研究。E-mail: wangzhf@nwu.edu.cn

洗脱, 隔管检测 A_{485} (苯酚-硫酸法) 和 A_{280} . 合并单一峰位, 得到 FCP1, FCP2, FCP3, FCP4, FCP5 等 5 个多糖组分. FCP5 经 2 次 Bio-Gel P-60 凝胶柱色谱, 以 0.1 mol/L NaCl 洗脱, 透析, 得到纯化的白色絮状山茱萸多糖 FCP5-A.

1.3 FCP5-A 的均一性及分子量测定

采用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 对 FCP5-A 进行均一性及分子量的测定. 色谱条件: TSK-Gel G3000SW 色谱柱 (7.5 mm × 300 mm), 流动相为磷酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH = 6), 样品质量体积分数为 0.2%, 进样量 20 μ L, 流速 0.5 mL/min, 柱箱温度和检测器温度均为 30 $^{\circ}$ C.

先将 Dextran 标准品按分子量由小到大的顺序 5200, 11600, 25000, 48600, 80000 依次进样, 然后对样品进样, 测定保留时间. 以 $\lg M_w$ 对 t_R 绘制标准曲线, 根据回归方程计算样品的相对分子量.

1.4 糖与蛋白质含量的测定及糖组成分析

总糖含量、糖醛酸含量及蛋白质含量分别采用苯酚-硫酸法、咔唑-硫酸法及 Bradford 法^[8]测定, 分别以葡萄糖、半乳糖醛酸和鸡蛋白作为标准, 绘制标准曲线, 计算样品的含量.

取 2 mg 样品, 加入 2 mL 2 mol/L TFA, 密闭, 于 121 $^{\circ}$ C 水解 2 h, 减压抽干. 按照 Jacob Lehrfeld^[9]的方法通过气相色谱同时检测中性糖和糖醛酸. 色谱柱为 rtx-50 柱 (30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μ m). 程序升温条件: 180 $^{\circ}$ C (2 min), 6 $^{\circ}$ C/min; 210 $^{\circ}$ C, 0.3 $^{\circ}$ C/min; 215 $^{\circ}$ C, 6 $^{\circ}$ C/min; 240 $^{\circ}$ C (30 min).

1.5 部分酸水解

取 30 mg FCP5-A 样品, 加入 10 mL 0.1 mol/L TFA, 在 100 $^{\circ}$ C 水解 1 h, 减压抽干, 透析 3 d. 将透析袋内的水溶液浓缩, 用乙醇沉淀, 用甲醇洗涤沉淀, 将沉淀复溶于水, 冷冻干燥; 将透析袋外的水溶液减压抽干. 分别测定透析袋外与透析袋内样品的单糖组成.

1.6 糖醛酸还原及甲基化分析

糖醛酸还原采用 Taylor 和 Conrad^[10]的方法, 重复 3 次, 所得产物命名为 FCP5-A-R. 按照上述糖组成分析方法分析 FCP5-A-R 的单糖组成.

甲基化采用 Needs 等^[11]的方法. 甲基化样品经水解, 还原, 乙酰化, 制备部分甲基化的糖醇乙酯衍生物, 进行 GC 与 GC-MS 分析. GC-MS 色谱柱为 rtx-5ms 柱 (30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μ m), 程序升温条件: 140 $^{\circ}$ C (2 min), 0.2 $^{\circ}$ C/min; 150 $^{\circ}$ C, 12 $^{\circ}$ C/min; 240 $^{\circ}$ C (10 min).

1.7 核磁共振谱测定

样品用重水交换 3 次, 每次交换后冷冻干燥抽干, 于 30 $^{\circ}$ C 用 Unity Inova 600 MHz NMR 仪测定.

2 结果与讨论

2.1 分离纯化

山茱萸经水提取、醇析、Sevage 脱蛋白及透析得山茱萸粗多糖 FCP, 得率为 0.89%, 粗多糖呈紫红色疏松片状. 提取液的酸性很强 (pH 为 1 ~ 2), 为避免多糖成分被破坏, 实验中加入 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 5. FCP 经 DEAE-纤维素柱分离得到 5 个组分 (图 1), 其中 FCP5 为主要组分, 占全部洗脱量的 84%. FCP5 经 Bio-Gel P-60 柱进一步纯化得到两个组分 FCP5A 和 FCP5B (图 2). FCP5A 为主要组分, 再次过 Bio-Gel P-60 柱得到纯化的山茱萸多糖 FCP5-A, 得率为山茱萸生药的 0.19%.

2.2 均一性与分子量测定

采用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定 FCP5-A 的均一性及分子量, 色谱柱为 TSK-Gel G3000SW 柱. 将系列葡聚糖标准品 (5200, 11600, 25000, 48600, 80000) 分别用磷酸缓冲液 (0.02 mol/L,

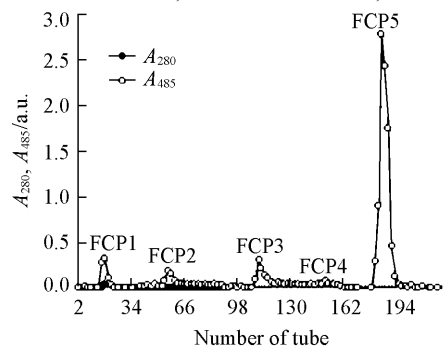


Fig. 1 Elution pattern of FCP on DEAE-cellulose column (5 cm × 25 cm)

FCP1—FCP5 were obtained by eluting with H₂O, 0.05, 0.1, 0.1, 0.25 mol/L NaHCO₃ solution, respectively. A₄₈₅ was determined by sulfate-phenol method.

pH = 6) 配成质量体积分数为 0.2% 的溶液, 测定保留时间, 并结合分子量对数得到线性回归方程: $\lg M_w = 6.21659 - 0.09709t_R$, $r = 0.997$. FCP5-A 在 HPLC 上得到一个单一对称峰, 表明其具有均一性. 测定 FCP5-A 在 TSK-Gel G3000SW 柱上的保留时间, 代入回归方程求得平均分子量为 8.7×10^4 .

2.3 单糖组成和部分理化性质及酸水解

气相色谱分析结果表明, FCP5-A 由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖及半乳糖醛酸组成, 摩尔比为 1: 5.7: 0.6: 1.2, 其中阿拉伯糖占总糖含量的 67.1% (见表 1). 比色法测得 FCP5-A 的总糖含量为 90.5%, 糖醛酸含量为 26.0%, 蛋白质总量为 0.2%. 紫外光谱中在 200 nm 左右有强吸收, 而在 280 nm 处无吸收, 表明其不含蛋白质, 这与比色法测定结果一致. 红外光谱中, $3600 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 O—H 伸缩振动; 1737 , 1417 和 1245 cm^{-1} 处的吸收峰表明有羧基存在; 890 cm^{-1} 处的吸收峰表明吡喃糖主要以 β 型糖苷键存在. 表明 FCP5-A 为一种富含阿拉伯糖的酸性多糖. FCP5-A 中的糖醛酸经还原后, 其产物 FCP5-A-R 由鼠李糖、阿拉伯糖及半乳糖组成, 摩尔比为 1: 5.3: 1.7. FCP5-A-R 不含糖醛酸, 且其半乳糖含量等于 FCP5-A 中半乳糖与半乳糖醛酸含量之和(表 1), 说明糖醛酸已被还原完全.

Table 1 Monosaccharide analysis of FCP5-A and FCP5-A-R

FCP5	Yield (%)	Total carbohydrate content	Polysaccharide mass fraction (%)				
			Uronic acid content	Rhamnose	Arabinose	Galactose	Galacturonic acid
FCP5-A	0.19	90.5	26.0	11.8	67.1	7.0	14.1
FCP5-A-R				12.5	66.3	21.2	—

FCP5-A 经部分酸水解后, 分别对透析袋内外的样品进行气相色谱分析. 结果显示: 透析袋内样品醇沉后单糖组成为鼠李糖、半乳糖及半乳糖醛酸, 摩尔比为 1: 0.3: 0.8, 表明鼠李糖、半乳糖及半乳糖醛酸构成主链或其边缘. 透析袋外样品由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸构成, 摩尔比为 1: 52.1: 1.6: 0.5. 阿拉伯糖全部存在于透析袋外, 并占透析袋外样品的 94%, 说明阿拉伯糖构成支链.

2.4 FCP5-A 和 FCP5-A-R 的甲基化分析

将 FCP5-A 与 FCP5-A-R 分别甲基化 3 次, 得到完全甲基化的多糖. 经水解、还原及乙酰化, 生成部分甲基化的糖醇乙酯衍生物, 对其进行 GC 与 GC-MS 分析, 气相色谱如图 3 所示. FCP5-A 在 GC 中有 8 个峰, 而 FCP5-A-R 有 10 个峰. 根据它们的保留时间及其在 GC-MS 中特征碎片离子峰, 经与标准图谱对照, 可以推断部分甲基化糖基的类型. 根据部分甲基化糖基在 GC 中的峰面积与相应的响应因子^[12], 计算其摩尔分数, 结果如表 2 所示.

为区分样品中原有的中性糖与糖醛酸还原后生成的相应的中性糖, 实验中用 NaBD_4 代替 NaBH_4 作为还原剂进行糖醛酸还原, 其羧基

被还原为带有重氢标记的羟甲基. 由图 3 可见, b 峰为糖醛酸还原后新增的部分甲基化糖基峰, 其质谱图如图 4 所示. 其一级特征碎片离子峰为 m/z 235, 161, 117, 二级特征碎片离子峰为 m/z 175, 133, 115, 101. 其质谱图与 2,3,6-tri-O-methyl-Gal 非常相似, 但 2,3,6-Me₃-Gal 的特征碎片离子峰由 m/z 233, 173, 131, 113 变成了 m/z 235, 175, 133, 115, 比原

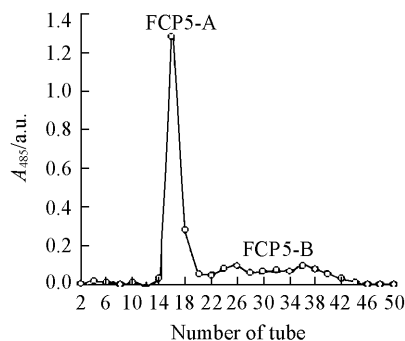


Fig. 2 Elution curve of FCP5 on Bio-Gel P-60 column eluted with 0.1 mol/L NaCl solution

Table 2 Results of methylation analysis of FCP5-A and FCP5-A-R

Peak *	Partical methylated suger	Deduced linkage	Relative molar fraction (%)	
			FCP5-A	FCP5-A-R
1	2,3,5-Me ₃ -Ara	Ara(1-	30.0	26.3
2	2,5-Me ₂ -Ara	-3) Ara ₇ (1-	19.4	17.6
3	2,3-Me ₂ -Ara	-5) Ara(1-	18.2	13.8
a	3,4-Me ₂ -Rha	-2) Rha(1-	—	2.9
4	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal(1-	Trace	3.0
5	2,4-Me ₂ -Ara	-3) Ara _p (1-	6.0	4.7
6	3-Me-Rha	-2,4) Rha(1-	6.0	5.2
b	2,3,6-(6,6-D ₂)-Me ₃ -Gal	-4) GalA(1-	—	8.1
7	2,4,6-Me ₃ -Gal	-3) Gal(1-	8.1	6.8
8	Ara	-2,3,5) Ara(1-	12.3	11.6

* Number of the peaks are the same as in Fig. 3.

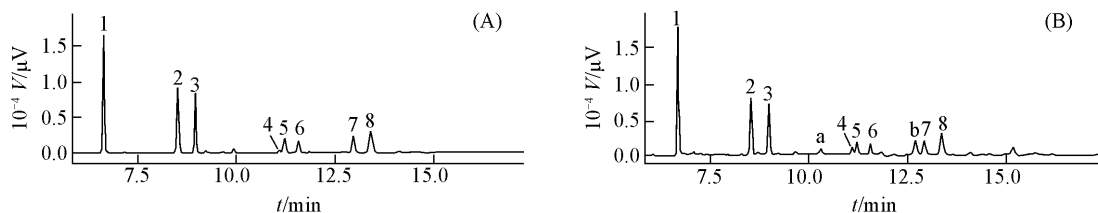


Fig. 3 Gas chromatogram of partially methylated alditol acetates of FCP5-A (A) and FCP5-A-R (B)

Peak 1. 2,3,5-Me₃-Ara; peak 2. 2,5-Me₂-Ara; peak 3. 2,3-Me₂-Ara; peak 4. 2,3,4,6-Me₄-Gal; peak 5. 2,4-Me₂-Ara; peak 6. 3-Me-Rha; peak 7. 2,4,6-Me₃-Gal; peak 8. Ara; peak a. 3,4-Me₂-Rha; peak b. 2,3,6-(6,6-D₂)-Me₃-Gal.

来大 2 个质量单位, 由此推断它是 2,3,6-(6,6-D₂)-Me₃-Gal, 来自羧基被还原的半乳糖醛酸, 其羧基位于 C6 位. 糖醛酸经还原后, 4 号峰的比例有所增加, 但经质谱分析, 其特征碎片离子峰并没有重氢标记, 表明它为 2,3,4,6-Me₄-Gal.

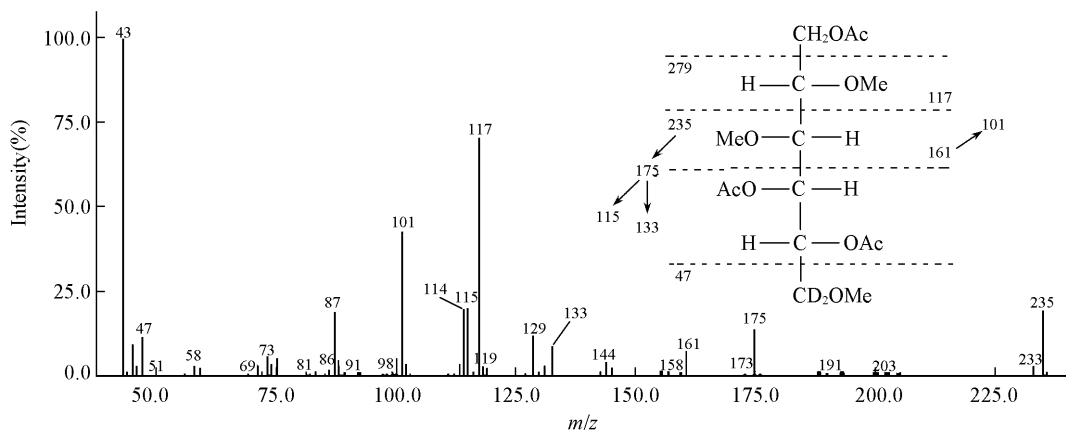


Fig. 4 Mass spectrum of 2,3,6-(6,6-D₂)-Me₃-Gal

由表 2 可见, 甲基化的 FCP5-A 中的阿拉伯糖含量很高, 占总糖的 74%, 含呋喃和吡喃两种形式. Ara 有 5 种连接方式, 即末端-Ara, β -Ara_f(1-, β -Ara(1-, β -Ara_p(1-和-2,3,5) Ara(1-, 其摩尔比为 5:4:3:1:2. 糖链非还原末端由 Ara 和 Gal 构成, 占总糖的 29%, 其中 Ara 为主要末端(占末端糖的 90%). 糖链上存在较多分支: -2,3,5) Ara(1-含 2 个分支, 占总糖的 12%; -2,4) Rha(1-在 2 位或 4 位存在分支, 占总糖的 5%. 末端糖含量与分支糖含量大致相等, 表明甲基化反应完全.

糖醛酸还原后, 甲基化鼠李糖的含量有所增加, 出现了新的甲基化糖基, 即 3,4-Me₂-Rha. 这可能是由于半乳糖醛酸的存在抑制其附近的糖的完全甲基化及水解, 半乳糖醛酸被还原为半乳糖后, 这些糖能完全反应而使其含量增加^[13]. 半乳糖以末端-Gal 及 β -Gal(1-两种连接方式存在, 其摩尔比为 1:2. 末端-Gal 的存在表明半乳糖很可能位于支链上. 2,3,6-(6,6-D₂)-Me₃-Gal 含量等于 3,4-Me₂-Rha 与 3-Me-Rha 含量之和, 表明半乳糖醛酸与鼠李糖以 1:1 的摩尔比存在于主链上.

2.5 FCP5-A 的 ¹³C NMR

FCP5-A 的 ¹³C NMR 图谱中, δ 90 ~ 112 为异头碳区域, δ 101.0 和 100.0 处的峰分别为 α -Rha_p 和 α -GalA_p 的特征信号. δ 110.0, 109.5, 109.3, 108.9 及 108.7 为 α -Ara_f 的信号. δ 104.0 为 β -Gal(1-的信号, 表明半乳糖以 β -糖苷键连接^[14], 这与红外吸收光谱的结果相一致. 高场区中 δ 19.0 为鼠李糖 C6 位甲基的信号. 低场区中 δ 176.8 和 175.9 为半乳糖醛酸 C6 位羧基的信号, 由于 β -GalA(1-分别与 β -Rha(1-和-2,4) Rha(1-连接而产生 2 个信号^[15].

红外吸收光谱、甲基化和 ¹³C NMR 所得的结果一致. 由此可以推断 FCP5-A 结构呈分支状, 由 β -Rha(1-和 β -GalA(1-以 1:1 的比例交替构成主链, 在鼠李糖的 4 位存在分支. 分支由多分支的阿拉伯糖及 β -Gal(1-构成, 分支的末端为阿拉伯糖和半乳糖.

综上所述, FCP5-A 为新发现的一种山茱萸酸性多糖, 分子量为 8.7×10^4 . 它由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖及半乳糖醛酸构成, 其中阿拉伯糖含量很高. FCP5-A 为多分支结构, 其糖链结构可能为由

-2)Rha(1-和-4)GalA(1-构成主链,在鼠李糖的4位存在分支,分支由多分支的阿拉伯糖及-3)Gal(1-构成.对于其生物活性的研究正在进行中.

参 考 文 献

- [1] Wang Q. , Fang Y. . J. Chromatogr. B[J], 2004, **812**: 309—324
- [2] Ishii T. . Plant Sci. [J], 1997, **127**: 111—112
- [3] Shi B. , Nie X. , Chen L. , *et al.* . Carbohydr. Polym. [J], 2007, **68**: 687—692
- [4] MIAO Ming-San(苗明三), FANG Xiao-Yan(方晓燕), YANG Yun(杨云). Henan Traditional Chinese Medicine(河南中医)[J], 2002, **22**(2): 12—13
- [5] MIAO Ming-San(苗明三), YANG Yun(杨云). Henan Traditional Chinese Medicine(河南中医)[J], 2002, **22**(1): 66—67
- [6] CHEN Ru-Xian(陈汝贤), XU Gui-Yun(徐桂云), ZHANG Rui(张瑞), *et al.* . Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)[J], 2002, **21**(1): 68—69
- [7] YANG Yun(杨云), LIU Cui-Ping(刘翠平), WANG Yu-Ming(王浴铭), *et al.* . China Academic Journal(中国中药杂志)[J], 1999, **24**(10): 614—616
- [8] Bradford M. M. . Anal. Biochem. [J], 1976, **72**: 248—254
- [9] Lehrfeld J. . Anal. Chem. [J], 1985, **57**: 346—347
- [10] Taylor R. L. , Conrad H. E. . Biochem. [J], 1972, **11**: 1383—1388
- [11] Needs P. W. , Swlvendran R. R. . Carbohydr. Res. [J], 1993, **245**: 1—10
- [12] Sweet D. P. , Shapiro R. H. , Albersheim P. . Carbohydr. Res. [J], 1975, **40**: 217—225
- [13] Somboonpanyakul P. , Wang Q. , Cui W. , *et al.* . Carbohydr. Polym. [J], 2006, **64**: 247—253
- [14] ZHANG Wei-Jie(张维杰). Techniques of Glycoconjugates in Biochemistry(糖复合物生化研究技术)[M], Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994: 324—340
- [15] Habibi Y. , Heyraud A. , Mahrouz M. , *et al.* . Carbohydr. Res. [J], 2004, **339**: 1119—1127

Isolation and Purification and Structural Characterization of Acidic Polysaccharide FCP5-A from Fruit of *Cornus officinalis*

YANG Li-Yan¹, HUANG Lin-Juan¹, WANG Zhong-Fu^{1*}, CAO Chun-Yang², SUN Wen-Ji¹

- (1. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Life Science College, Northwest University, Xi'an 710069, China;
2. Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract Fruit of *Cornus officinalis* has been used in Chinese traditional medicine for over two thousand of years. Polysaccharides, as important components of *Cornus officinalis*, have attracted much attention. An acidic polysaccharide FCP5-A was isolated from fruit of *Cornus officinalis* with water extraction and column chromatography. HPGPC shows that it was homogeneous polysaccharide with an average molecular weigh of 8.7×10^4 . Monosaccharide analysis by GC shows that it was composed of rhamnose, arabinose, galactose and galacturonic acid with a molar ratio of 1: 5.7: 0.6: 1.2. By means of IR, GC, partial hydrolysis with acid, uronic acid reduction, methylation, GC-MS and ¹³C NMR analysis, the results indicate that FCP5-A was a branched polysaccharide rich in arabinose. The backbone was composed of 1,2-linked Rha and 1,4-linked GalA, with side chains attached to O-4 of the rhamnosyl residues. The side chains contained highly branched arabinan and short linear 1,3-linked galactan. It was concluded that FCP5-A was a new acidic branched polysaccharide of *Cornus officinalis*.

Keywords *Cornus officinalis*; Polysaccharide; Isolation and purification; Structure characterization

(Ed. : H, J, Z)