

文章编号:1001-6880(2017)10-1648-07

忽地笑多糖分子量及单糖组成研究

刘小攀¹,田春莲^{1*},肖卓炳¹,覃翀²¹吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室,张家界 427000; ²中南大学 化学化工学院,长沙 410083

摘要:研究忽地笑多糖PBL1、PBL2和PBL3的分子量和单糖组成。分别采用凝胶排阻色谱-多角度激光光散射-示差检测法(GPC-MALLS-RI)和高效液相法(HPLC)测定忽地笑多糖的分子量及单糖组成。PBL1的重均分子量(M_w)为 3.642×10^3 g/mol;PBL2的 M_w 为 1.206×10^4 g/mol;PBL3的 M_w 为 3.992×10^5 g/mol。多糖PBL1由D-Man、D-Glu和D-Gal组成,摩尔比为1:0.34:0.036;多糖PBL2由D-Man、Rha、D-Gal UA、D-Glu、D-Gal和Ara组成,摩尔比为1:0.29:0.78:21.89:2.69:0.63;多糖PBL3由D-Man、Rha、D-Glu UA、D-Gal UA、D-Glu、D-Gal和Ara组成,摩尔比为1:2.63:0.47:1.63:0.83:6.92:1.34。忽地笑多糖PBL1、PBL2和PBL3均主要由D-Man、D-Glu和D-Gal组成,它们的分子量大小差异明显。

关键词:忽地笑;多糖;分子量;单糖组成**中图分类号:**TQ041+.7**文献标识码:**A**DOI:**10.16333/j.1001-6880.2017.10.003

Molecular Weight and Monosaccharide Composition of Polysaccharide from *Lycoris aurea*

LIU Xiao-pan¹, TIAN Chun-lian^{1*}, XIAO Zhuo-bing¹, QIN Chong²¹Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University,Zhangjiajie 427000, China; ²Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China

Abstract: To Study the molecular weight and monosaccharide composition in polysaccharide from PBL1, PBL2 and PBL3. The molecular weight and monosaccharide composition in polysaccharide were determined by GPC-MALS-RI and HPLC. The results showed that the average molecular weight (M_w) of PBL1, PBL2 and PBL3 were 3.642×10^3 , 1.206×10^4 and 3.992×10^5 g/mol, respectively. PBL1 consisted of D-Man, D-Glu and D-Gal with the mole ratio of 1:0.34:0.036. PBL2 was composed of D-Man, Rha, D-Gal UA, D-Glu, D-Gal and Ara with the mole ratio of 1:0.29:0.78:21.89:2.69:0.63. PBL3 was composed of D-Man, Rha, D-Glu UA, D-Gal UA, D-Glu, D-Gal and Ara with the mole ratio of 1:2.63:0.47:1.63:0.83:6.92:1.34. The polysaccharide of PBL1, PBL2 and PBL3 from *Lycoris aurea* consisted of D-Man, D-Glu and D-Gal, which had considerable differences in molecular weight.

Key words: *Lycoris aurea*; polysaccharide; molecular weight; monosaccharide composition

目前,我国70%~80%的人群处于亚健康状态。大多数肿瘤、心脑血管疾病及糖尿病患者等除部分源于遗传因素外,多数由亚健康人群发展而来^[1]。多糖具有抗癌、免疫、抗HIV、抗炎、抗病毒、抗肝炎等^[2-5]功效,尤其因对生命体毒副作用小而广泛应用于保健食品行业。石蒜属植物富含多糖、生物碱和黄酮类等^[6,7]成分。但国内外学者以石蒜生物碱为研究热点,其石蒜多糖仅探讨粗多糖的提取与体外抗氧化性^[8],其结构和构效关系未见报道,

而多糖分子量大小及分布、多糖结构与其药理作用密切相关,从而限制了石蒜多糖的合理利用。多糖分子量测定多采用高效凝胶色谱法(HPGPC),此方法需采用对照品做标线计算多糖分子量,研究结果因对照品而异,仅能显示分子量的相对值^[9]。凝胶排阻色谱-多角度激光光散射-示差检测法(GPC-MALLS-RI),不需提供对照品的情况下,可快速、准确地测定多糖的绝对分子质量、分子旋转半径和分布宽度指数,并可判断多糖的构象^[10,11]。多糖的单糖组成是多糖质量标准控制与多糖信息采集的关键环节,HPLC是多糖单糖组成分析的常用方法^[12,13]。因此,本实验采用GPC-MALLS-RI方法和HPLC法对石蒜属植物多糖分子量及单糖组成,从而为石蒜

收稿日期:2017-02-20 接受日期:2017-06-12

基金项目:湖南省研究生科研创新项目(CX2015B546);张家界市科技计划(2016FJ2167)

*通信作者 E-mail:tianchunlian1970@163.com

多糖的结构分析、质量控制提供理论依据,为研究石蒜多糖的药理作用机制奠定基础,为探究石蒜属植物的深度开发开拓新的途径。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂与仪器

忽地笑(*Lycoris aurea* Herb.)于2014年4月采自吉首大学张家界校区后山石蒜栽培基地,经吉首大学廖博儒研究员鉴定。D-无水葡萄糖(质量分数>99%)、D-葡萄糖醛酸、D-甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、D-半乳糖醛酸均购于中国食品药品检定研究院;D-半乳糖,北京索莱宝科技有限公司。三氟乙酸、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮,上海化学试剂厂;732(001×7)型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂,郑州勤实科技有限公司;乙腈(色谱纯),美国Tedia公司;蒽酮、硫酸等均为分析纯;实验用水为去离子水。

Agilent1260型高效液相色谱仪,美国Agilent公司;SB-3200D型超声波清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司;AEL-40SM十万分之一分析天平,日本岛津公司;AEL-40SM型万分之一天平,日本岛津公司;FD5-3T台式冷冻干燥机,美国SIM公司;RE-5205旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;凝胶排阻色谱-多角度激光光散射-示差检测器联用系统(GPC-MALLS-RI),美国怀雅特公司。

1.2 忽地笑多糖的提取及分离纯化

1.2.1 忽地笑粗多糖的制备

将忽地笑鳞茎洗净,干燥,粉碎,过40目筛,称取样品加石油醚浸泡24 h,然后用95%乙醇浸泡24 h,除去脂溶性物质及部分色素,残渣45℃烘干,按刘小攀等^[14]的最优工艺提取,滤液减压浓缩,醇沉、冷冻干燥、水溶解后用732(001×7)型阳离子交换树脂除色、Sevage法除蛋白、真空浓缩、冷冻干燥得忽地笑粗多糖(PBL)。

1.2.2 忽地笑多糖的分离纯化

取PBL 150 mg用少量去离子水溶解,离心,取上清液过DEAE-52,分别用去离子水、0.1、0.3 mol/L NaCl进行洗脱,控制流速为0.5 mL/min,6mL每管,用蒽酮-硫酸法跟踪检测,合并相同组分,透析,冷冻干燥,得忽地笑多糖PBL1、PBL2、PBL3。

1.3 忽地笑多糖的含量测定

1.3.1 标准曲线的制备

参照文献^[14]的方法,称取105℃真空干燥至恒重葡萄糖50.00 mg,用去离子水定容至100 mL,得

0.50 mg/mL葡萄糖标准储备液。分别取葡萄糖标准储备液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL用去离子水配成0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL的标准溶液。取上述溶液各2 mL于50 mL锥形瓶中,冰水中加入0.2%的蒽酮-硫酸试剂(80%的浓硫酸)8 mL,摇匀,沸水浴10 min,冷却至室温,625 nm处测吸光度。

1.3.2 供试品多糖含量的测定

分别取浓度为0.05 mg/mL的PBL1、PBL2、PBL3多糖溶液2 mL加入0.2%的蒽酮硫酸8 mL,沸水10 min,冷却,625 nm处测定。

1.4 忽地笑多糖的分子量、分子旋光半径测定

1.4.1 色谱条件

采用凝胶排阻色谱-多角度激光光散射-示差检测器联用系统(GPC-MALLS-RI)检测1.2.2的PBL1、PBL2、PBL3的重均分子量(M_w)、数均分子量(M_n)和分散系数(M_w/M_n)。色谱条件:检测器:DAWN HELEOS II十八角激光光散射检测和OPTI-LAB T-rEX示差检测器,色谱柱:Ohpak SB-804HQ(300×8 mm),流动相:0.1 mol/L NaNO₃,流速:0.8 mL/min,柱温:45℃,样量:100 μL。检测波长:663.1 nm。

1.4.2 供试品溶液分子质量测定

取10 mg多糖样品溶于5 mL 0.1 mol/L NaNO₃溶液中,60℃溶解30 min,离心,上清液过0.45 μm微孔滤膜, GPC-MALLS-RI测定多糖的分子量、分子旋转半径。

1.5 多糖的单糖组成分析

1.5.1 单糖标准品衍生化

分别精密移取浓度为1 mmol/L的D-无水葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、D-甘露糖、鼠李糖、D-半乳糖醛酸、阿拉伯糖、D-半乳糖及0.5 mmol/L混合标准品溶液100 μL,分别加入0.3 mol/L的NaOH溶液100 μL和0.5 mol/L的PMP甲醇溶液100 μL,混匀,70℃水浴30 min,冷却,加入100 μL 0.3 mol/L的HCl溶液,摇匀,加500 μL氯仿震荡5 min,离心,弃氯仿相,重复3~4次,加去离子水定容到2 mL,过0.45 μm微孔滤膜,HPLC检测。

1.5.2 供试品溶液单糖测定

分别称取PBL1、PBL2、PBL3 5 mg加入2 mol/L的三氟乙酸2 mL,100℃水解8 h,冷却至室温,加入适量甲醇,减压浓缩至干,重复4~5次以完全去除TFA,残渣溶解,水定容至2 mL,按1.5.1衍生化处

理, HPLC 分析。色谱条件: 色谱柱 Kromasil C₁₈ 柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH6.8)-乙腈 (V/V = 83:17), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 250 nm, 进样量: 20 μL, 柱温: 30 °C。

2 结果与讨论

2.1 多糖含量测定

按照“1.3.1”、“1.3.2”方法得到葡萄糖标准曲线是以葡萄糖浓度为横坐标(x), 吸光度为纵坐标(y), 进行线性回归, 线性回归方程为 $y = 0.633x + 0.0013$, $r = 0.9997$; PBL1、PBL2、PBL3 的多糖含量分别为 95.42%、66.98%、44.86%。

2.2 多糖的分子量、分子旋转半径分析

PBL1、PBL2、PBL3 的激光光散射信号 (LS) 和示差检测信号 (dRI) 分布曲线如图 1。由图 1 可知, PBL1 有两个不同组分, 激光光散射信号 (LS) 对应

两个峰; PBL2 有三个不同组分, LS 对应三个峰; PBL3 的 LS 对应一个峰, 显示该多糖只有一个组分。

PBL1、PBL2、PBL3 的 GPC-RI-MALLS 如表 1。从表 1 可知, PBL1 中 Peak2 峰面积占 99.911%, 说明 PBL1 主要由 Peak2 组分多糖组成, 重均分子量 M_w 为 3.642×10^3 g/mol, 重均旋转半径为 29.5 nm, 分散系数 α (M_w/M_n) 为 1.757, PBL1 多糖分子量分布相对集中; PBL2 中 Peak3 峰面积占 96.500%, 表明 PBL2 主要是由 Peak3 组分多糖组成, 重均分子量 M_w 为 1.206×10^4 g/mol, 重均旋转半径为 61.9 nm, α 为 1.478, PBL2 多糖分子量分布相对比较集中; PBL3 的重均分子量 M_w 为 3.992×10^5 g/mol, 重均旋转半径为 39.9 nm。 α 为 2.845, 表明 PBL3 多糖分子量分布相对较宽, 是因为经 DEAE-52 纤维素柱层析纯化的多糖量较少, 未进一步纯化, 致 PBL3 组分多糖分子量分布宽。

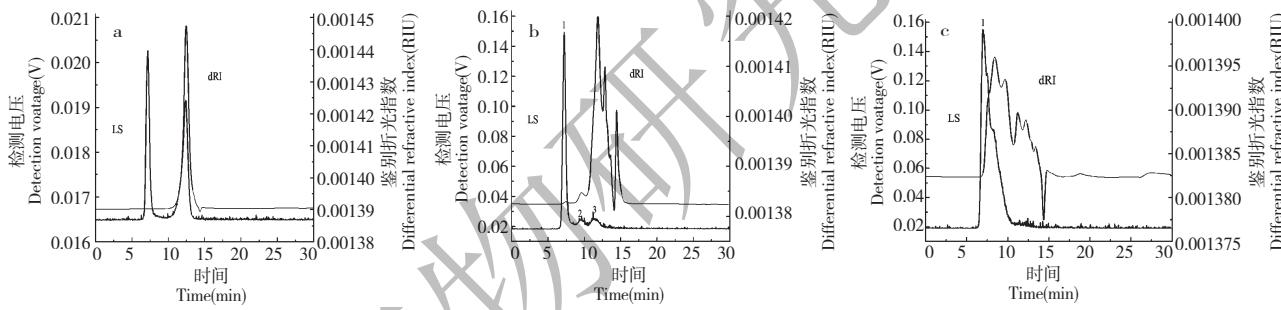


图 1 PBL1 (a)、PBL2 (b) 和 PBL3 (c) 分子量分布图
Fig. 1 Molecular weight distribution of PBL1 (a), PBL2 (b) and PBL3 (c)

表 1 PBL1、PBL2 和 PBL3 的 GPC-RI-MALLS 实验结果
Table 1 Results from GPC-RI-MALLS for PBL1, PBL2 and PBL3

组分 Component	PBL1			PBL2		PBL3
	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	Peak3	Peak1
峰位置 Peak limits (min)	6.660 -7.820	10.590 -13.881	6.541 -8.057	8.956 -10.140	10.543 -13.834	6.849 -11.087
重均分子量 M _w (g/mol)	5.247×10^6	3.642×10^3	2.082×10^7	2.165×10^5	1.206×10^4	3.992×10^5
数均分子量 M _n (g/mol)	3.368×10^6	2.670×10^3	1.020×10^7	2.015×10^5	8.155×10^3	1.403×10^5
峰位分子量 M _p (g/mol)	5.969×10^6	3.289×10^3	1.611×10^7	1.930×10^5	9.857×10^3	3.064×10^5
Z 均分子量 M _z (g/mol)	6.329×10^6	4.691×10^3	3.353×10^7	2.409×10^5	2.038×10^4	7.409×10^6
重均/数均分布 M _w /M _n	1.879	1.757	2.040	1.075	1.478	2.845
重均旋转半径 R _w (nm)	64.0	29.5	62.4	42.8	61.9	39.9
数均旋转半径 R _n (nm)	61.1	33.3	63.1	42.8	70.5	51.4
Z 均旋转半径 R _z (nm)	65.9	28.3	65.5	43.3	51.9	42.5
峰面积 Peak area (%)	0.089	99.911	0.444	3.057	96.500	100

2.3 单糖组分分析

2.3.1 单糖对照品图谱分析

按“1.5”项下操作,各单糖对照品及衍生混合

单糖对照品 HPLC 色谱如图 2,出峰顺序、保留时间及峰面积见表 2。

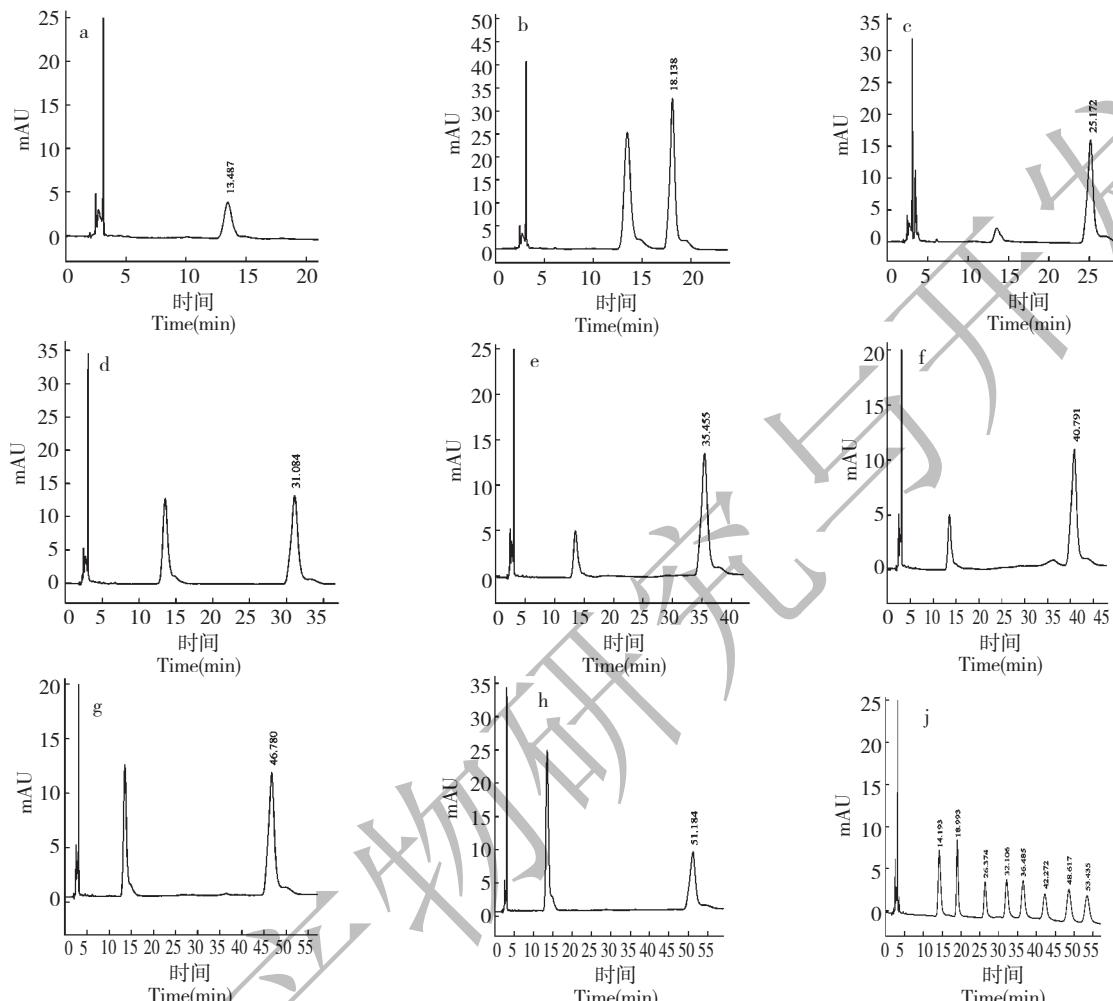


图 2 空白对照(a)、D-甘露糖(b)、鼠李糖(c)、D-葡萄糖醛酸(d)、半乳糖醛酸(e)、D-无水葡萄糖(f)、D-半乳糖(g)、阿拉伯糖(h)及混合单糖对照品(i)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank control (a), D-mannose (b), rhamnose (c), D-glucuronic acid (d), D-galacturonic acid (e), D-glucose (f), D-galactose (g), arabinose (h) and mixed monosaccharide standard (i)

表 2 混合单糖对照品的保留时间及峰面积

Table 2 Retention time and peak area of each standard monosaccharide

单糖 Monosaccharides	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Peak area
D-甘露糖 D-Mannose	18.993	302
鼠李糖 Rhamnose	26.374	185.2
D-葡萄糖醛酸 D-Glucuronic acid	32.106	238.9
D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	36.485	262.2
D-无水葡萄糖 D-Glucose	42.272	196.4
D-半乳糖 D-Galactose	48.617	287.7
阿拉伯糖 Arabinose	53.435	166.3

2.3.2 单糖标准曲线

配制含 7 种单糖均为 10 mmol/L 的混合对照品溶液, 分别取 0.25、0.5、1、2、2.5 mL 定容到 5 mL,

HPLC 分析。根据测定的峰面积对相应单糖的进样浓度进行线性回归, 结果如表 3。

表 3 单糖标准曲线

Table 3 Standard curve of monosaccharides

单糖 Monosaccharides	标准曲线 Standard curve	r	线性范围 Linearity range (mmol/L)
D-甘露糖 D-Mannose	$y = 1139x + 72.47$	0.9994	0.5~5
鼠李糖 Rhamnose	$y = 778.9x - 44$	0.9993	0.5~5
D-葡萄糖醛酸 D-Glucuronic acid	$y = 1040x - 103.8$	0.9992	0.5~5
D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	$y = 1112x - 141.4$	0.9994	0.5~5
D-无水葡萄糖 D-Glucose	$y = 728.4x + 29.79$	0.9995	0.5~5
D-半乳糖 D-Galactose	$y = 1184x - 34.46$	0.9990	0.5~5
阿拉伯糖 Arabinose	$y = 1213.1x - 99.09$	0.9997	0.5~5

2.3.3 单糖组成分析

PBL1、PBL2、PBL3 按“1.5”项衍生化, HPLC 相图如图 3 (a~c), 检测结果如表 4。从表 4 可知 PBL1 由 D-Man、D-Glu 和 D-Gal 组成, 摩尔比为 D-Man: D-Glu: D-Gal = 1: 0.34: 0.036; PBL2 由 D-Man、Rha、D-Gal UA、D-Glu、D-Gal 和 Ara 组成, 摩尔比为 D-Man: Rha: D-Glu UA: D-Gal UA: D-Glu: D-Gal: Ara = 1: 2.63: 0.47: 1.63: 0.83: 6.92: 1.34。

Man: Rha: D-Gal UA: D-Glu: D-Gal: Ara = 1: 0.29: 0.78: 21.89: 2.69: 0.63; PBL3 由 D-Man、Rha、D-Glu UA、D-Gal UA、D-Glu、D-Gal 和 Ara 组成, 摩尔比为 D-Man: Rha: D-Glu UA: D-Gal UA: D-Glu: D-Gal: Ara = 1: 2.63: 0.47: 1.63: 0.83: 6.92: 1.34。

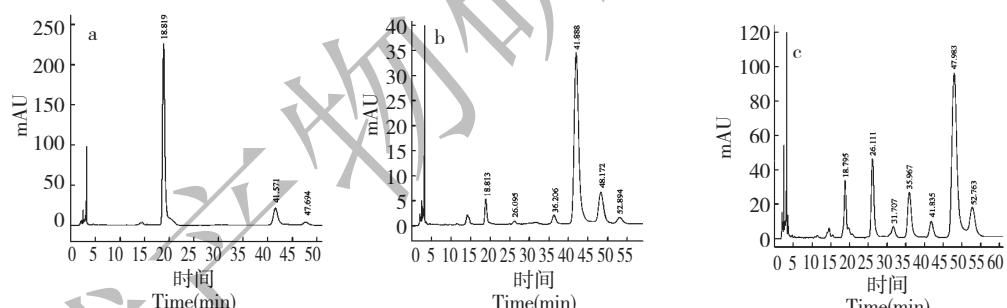


图 3 PBL1 (a)、PBL2 (b) 和 PBL3 (c) 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of PBL1 (a), PBL2 (b) and PBL3 (c)

表 4 PBL1、PBL2 和 PBL3 的保留时间及峰面积

Table 4 The retention time and peak area of PBL1, PBL2 and PBL3

单糖 Monosaccharides	PBL1		PBL2		PBL3			
	保留时 间 (min)	峰面 Peakarea	单糖 Monosaccharides	保留时间 (min)	峰面积 Peakarea	单糖 Monosaccharides	保留时间 (min)	峰面 Peakarea
D-甘露糖 D-Mannose	18.819	8069.7	D-甘露糖 D-Mannose	18.813	190.7	D-甘露糖 D-Mannose	18.795	1357
D-无水葡萄糖 D-Glucose	41.571	1328.9	鼠李糖 Rhamnose	26.095	31.2	鼠李糖 Rhamnose	26.111	2321.4
D-半乳糖 D-Galactose	47.694	270.2	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	36.206	128.7	D-葡萄糖醛酸 D-Glucuronic acid	31.707	425.6

续表4(Continued Tab. 4)

PBL1		PBL2		PBL3	
单糖 Monosaccharides	保留时 Retention time (min)	峰面 Peakarea	单糖 Monosaccharides	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Peakarea
D-无水葡萄糖 D-Glucose	41.888	3080	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	35.967	1828.8
D-半乳糖 D-Galactose	48.172	576	D-无水葡萄糖 D-Glucose	41.835	689.3
阿拉伯糖 Arabinose	52.894	121.3	D-半乳糖 D-Galactose	47.983	9219
			阿拉伯糖 Arabinose	52.763	1855.1

3 结论

忽地笑多糖经 DEAE-52 纤维素柱分离得到 PBL1、PBL2、PBL3 三个组分，并对三组分的纯度、分子量和单糖组成进行分析。结果表明：PBL1、PBL2、PBL3 的多糖含量分别是 95.42%、66.98%、44.86%；PBL1 是重均分子质量 (M_w) 为 3.642×10^3 g/mol，由 D-Man、D-Glu、D-Gal 以物质的量比 1:0.34:0.036 组成的多糖。PBL2 是重均分子质量 (M_w) 为 3.642×10^3 g/mol，由 D-Man、Rha、D-Gal UA、D-Glu、D-Gal、Ara = 以物质的量比 1:0.29:0.78:21.89:2.69:0.63 组成的多糖。PBL3 是重均分子质量 (M_w) 为 3.992×10^5 g/mol，由 D-Man、Rha、D-Glu UA、D-Gal UA、D-Glu、D-Gal 和 Ara 以物质的量比 1:2.63:0.47:1.63:0.83:6.92:1.34 组成的多糖。

首次研究忽地笑均一多糖 PBL1、PBL2、PBL3 的化学结构，分离纯化及目标产物分析过程的监控非常关键。本实验选用蒽酮-硫酸法、凝胶排阻色谱-多角度激光光散射-示差检测法 (GPC-MALLS-RI) 和高效液相法 (HPLC) 等多种方法联合监测，避免了单一检测方法的缺陷，提高系统分离的效率和目标产物的均一性。该分离纯化方法及单糖组成和分子量高效监测手段也可运用于其他复杂中药多糖的制备。

石蒜多糖在石蒜属植物鳞茎中含量高达 49.21%^[14]，多糖组成分析少有文献报道，吴彦等^[15,16]采用 DEAE-52 分离换锦花多糖，用水和 NaCl 洗脱后得中性多糖多于酸性多糖；安徽石蒜由葡萄糖组成，其余四种为杂多糖；忽地笑中性多糖由木糖、葡萄糖、半乳糖组成，其摩尔比为 0.996:1:0.47，与本实验水洗多糖中单糖由 D-甘露糖、D-无

水葡萄糖、D-半乳糖组成，摩尔比为 1:0.34:0.036 有较大差异。因此，进一步分析石蒜属植物多糖的结构，为免疫活性机制研究及从多糖领域开发石蒜资源提供依据。

参考文献

- Yan YX, Dong J. Association of suboptimal health status and cardiovascular risk factors in urban Chinese workers. *J Urban Health*, 2012, 89:329.
- Xin X, Dong HL, Liu H. Optimization of the ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* by response surface method. *Medicinal Plant*, 2012, 3(8):78-80.
- Nie SP, Xie MY. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25:144-149.
- Zeid AHA, Aboutabl EA, Sleem AA, et al. Water soluble polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities. *Carbohydr Polym*, 2014, 113:62-66.
- Sun XM, Wang HH, Han XF, et al. Fingerprint analysis of polysaccharides from different Ganoderma by HPLC combined with chemometrics methods. *Carbohydr Polym*, 2014, 114:432-439.
- Gui LZ(桂柳姿), Cui PW(崔培梧), Pan QP(潘清平), et al. Cloning and sequence analysis of LaCOMT in the biosynthesis pathway of galanthamine in *Lycoris aurea*. *J Hunan Univ Med*(湖南中医药大学学报), 2013, 33(3):35-40.
- Ji YB(季宇彬), Xin GS(辛国松), Qu ZY(曲中原), et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of alkaloids from plants of *Lycoris Herb*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47:157-164.

(下转第 1682 页)