

文章编号: 1008-9926(2009)01-0046-03 中图分类号: R284 文献标识码: A

龙眼肉多糖分离及结构研究

贾 琦, 李雪华

(广西医科大学 药学院 广西 南宁 530021)

摘要:目的 从龙眼肉中提取分离粗多糖 LYRP,测定纯化后的组分分子质量及其单糖成分。方法 采用超声浸提法、酶水解法去蛋白质、DEAE纤维素和 Sephacryl S-300柱层析法得到多糖组分 LYRP2-1。高效凝胶渗透色谱测定分子质量,完全酸水解得到单糖成分,紫外光谱和傅立叶转换红外光谱法对其定性分析。结果 均一 LYRP2-1具有多糖特征性的紫外和红外吸收峰,分子质量为 1.1×10^5 u,由葡萄糖组成。结论 分子质量为 1.1×10^5 u的 LYRP2-1是由葡萄糖组成,两种半缩醛羟基构型并存的吡喃环多糖。

关键词:龙眼肉多糖 LYRP;分子质量测定;单糖组成;红外光谱

The Structural Analysis of the Polysaccharide of *Arillus Longan*

JIA Qi, LI Xue-Hua

(Department of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi China)

ABSTRACT: **Aim** To extract and purify crude polysaccharides LYRP from *Arillus Longan* and the monosaccharide constitution of LYRP2-1 and molecular weight **Methods** LYRP2-1 was isolated by adding EOH from the ultrasonic extract of *Dimocarpus longan* Lour, purified by protease-decomposing method and further purified by DEAE and Sephacryl S-300 gel column chromatographies. The molecular weight and monosaccharide constitution of LYRP2-1 were respectively determined by HPGPC and complete acid hydrolysis. The information on the structure of LYRP2-1 was analysed by FT-IR and UV spectroscopy. **Results** FT-IR and UV spectroscopy of LYRP2-1 revealed typical characteristics of polysaccharides. The monosaccharide constitution of LYRP2-1 whose molecular weight was 1.1×10^5 was determined to be glucose. **Conclusion** The molecular weight of LYRP2-1 is 1.1×10^5 . Pyranose is the major component of LYRP2-1, which is composed of glucose, with two glycoside configurations, -hemiacetal hydroxyl and -hemiacetal hydroxyl coexisting.

KEY WORDS: polysaccharides of *Arillus Longan*; determination of molecular weight; monosaccharide composition; FT-IR spectroscopy

随着科技的发展和水平的提高,人们对医疗保健品的追求逐步趋向回归自然。天然药物的研究开发已被国内外有关专家所重视。天然多糖因其具有抗肿瘤^[1]、抗病毒^[2]、降血糖、降血脂及提高免疫功能^[3,4]等多种药理作用而越来越引起人们的关注。龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)为无患子科的果实,俗名桂圆,为我国著名的亚热带水果,亦是广西特产。据国内外文献报道,龙眼肉主要含有多糖、葡萄糖、栲精、栲素、丹宁、五环三萜类、脑苷脂成分,龙眼三萜 A 和龙眼三萜 B, 38 种挥发性成分及维生素 B₁、B₂、P、C,其具有安神补血、抗焦虑、降脂

护心,益智补肾,调经、壮阳益气、抗衰老等作用^[5]。由于多糖的活性与它的结构有重要关系,本文利用超声浸提和蛋白酶水解法纯化龙眼肉大分子量的多糖并做了初步的结构分析,为进一步的活性研究奠定基础。

1 材料

1.1 试剂 Sephacryl S-300 High Resolution (GE Healthcare lot No: 15223),木糖(Xyl,北京奥博星生物技术责任有限公司,批号:20050518 BR),甘露糖[Man,中国医药(集团)上海试剂公司,批号:

基金项目:应用基础研究专项,Na 桂科基 0448050

作者简介:贾琦(1982-),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士研究生。研究方向:天然产物化学。E-mail: adagi@163.com

通讯作者:李雪华, E-mail: onlythankforyou@163.com

F20050831 BR],葡萄糖(Glu,国药集团化学试剂有限公司,批号:F20060118 AR)、半乳糖(Gal,夏新生物 G-0625 BR),阿拉伯糖(Ara,夏新生物 A-3131 BR)。

1.2 仪器 BSZ-100自动部分收集器(上海青浦沪西仪器厂);TGL-16C高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TU-1800紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);SB3200超声仪(上海必信医疗器械厂);2695 Separations Module (Alliance)、2420ELSDetector(Waters公司);1100HPLC色谱仪、G1362A示差折光检测器、GPC数据分析软件(Agilent公司);傅立叶红外光谱仪(Nexus 5DXC FT-IR, Thermo Nicolet, America)。

1.3 药材 龙眼干(购于广西南宁交易市场,经广西中医药研究所严克俭助理检验员鉴定,为无患子科植物龙眼 *Dioscarpus longan Lour.* 的干燥果实)。

2 实验方法

2.1 龙眼肉水溶性多糖的提取与纯化 (1)龙眼肉多糖提取 称取龙眼干燥果实去皮、核后的果肉200g,经95%乙醇浸泡3d,滤过,阴干,滤渣以料水比1:20超声^[6]处理60min,液渣分离,滤渣重复提取3次。滤液浓缩,醇沉,得龙眼肉粗多糖。多糖粗品水溶,利用木瓜蛋白酶水解法除蛋白质^[7],260~280nm紫外扫描确定无蛋白吸收峰,透析得无蛋白的棕色龙眼肉多糖。再经双氧水除去色素,可得白色或微黄色多糖。(2)龙眼肉多糖分级纯化 将白色多糖配制成5%多糖溶液,取澄清液于DEAE纤维素阴离子交换柱依次用水 $0.125\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ $0.3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 进行洗脱,洗脱速度 $1.5\text{ml}/\text{min}$,经苯酚-硫酸法跟踪检测。合并相同组分,得龙眼肉多糖LYRP1、LYRP2、LYRP3,其中LYRP2得量最多。(3)纯化 将LYRP2的白色多糖配制成5%多糖溶液,在Sephacryl S-300^[8]柱(直径 $1.6\text{cm}\times 100\text{cm}$)上样并用水溶液洗脱,洗脱速度 $10\text{ml}/\text{min}$,苯酚-硫酸法跟踪检测,合并相同组分,得纯化的白色多糖LYRP2-1。

2.2 多糖LYRP2-1的结构分析 (1)总糖含量测定(苯酚-硫酸法)按文献^[9]进行。(2)单糖组成分析 取多糖LYRP2-1样品5mg,加入 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 2mL封管,100℃水解16h。水解液在水浴中用饱和 BaCO_3 溶液中和至 $\text{pH}=7$, $10\,000\text{r}/\text{min}$ 离心,取上清液,浓缩至1.5mL左右。经薄层色谱(TLC)

3种不同的展开系统:A正丁醇-苯-吡啶-乙酸(10:4:4:1);B氯仿-吡啶-乙醇-乙酸(10:3:10:1);C乙酸乙酯-正丁醇-吡啶-乙酸(6:5:1.5:4)将样品与标准品同时点样,以苯胺-二苯胺-磷酸显色,分析LYRP2-1单糖成分及组成。以高效液相色谱法[流动相:乙腈-水(80:20)],流速: $1.2\text{mL}/\text{min}$,内标法分析多糖水解液的单糖成分。(3)多糖LYRP2-1的分子质量测定 色谱条件:TSK4000PW凝胶柱($7.5\text{mm}\times 300\text{mm}$)和TSK-3000SW凝胶柱($7.5\text{mm}\times 300\text{mm}$),保护柱TSK-Guard SW($7.5\text{mm}\times 75\text{mm}$),三柱串联;流动相为超纯水;色谱柱温度 23°C ;流速 $1\text{mL}/\text{min}$;进样量 $20\mu\text{L}$;系列葡聚糖标准品(Polymer Laboratories),分子质量分别为5900,11800,22800,47300,112000,212000,404000u;Agilent GPC数据分析软件。(4)多糖LYRP2-1红外光谱 称取多糖LYRP2-1样品1mg与200mg干燥的KBr混匀,在玛瑙研钵中研磨5~10min,混合压膜,测定波数在 $4\,000\sim 400\text{cm}^{-1}$ 的红外光谱。

3 结果与讨论

3.1 粗多糖的物理性状及总糖含量 经超声提取,龙眼肉水溶性粗多糖得率为7.0%。苯酚-硫酸法测得龙眼肉粗多糖总糖含量为64.4%。Molish反应为阳性,证明存在糖类物质;茚三酮反应及双缩脲反应呈阴性,均表明不含蛋白质;溶液黏度大。

超声波提取技术是利用超声波的机械破碎和空化作用,瞬间是细胞壁结构破裂,加速浸提物从原料向溶剂的扩散速率。与运用传统的热热水浸提法得到的龙眼肉粗多糖得率为3.4%相比,具有提取率高、不需高温、耗能低、提取时间大大缩短等优点。而且,热水浸提要严格控制好温度,否则高温极易引起多糖结构的改变。

本文采用蛋白酶水解法去除多糖中的蛋白,对蛋白去除率达83.9%,多糖得率7.5%;而sevag法(10次)蛋白去除率为51.7%,多糖得率为4.9%。蛋白酶水解法脱蛋白效率提高,同时多糖得率也相应提高,且操作简单,可大大节省时间,避免使用大量有毒试剂。

3.2 紫外光谱分析 取龙眼肉多糖LYRP2-1适量,加水溶解,配成浓度5%的多糖水溶液,采用紫外可见分光光度法190~400nm范围内扫描。光谱显示龙眼肉多糖具有多糖特征性的紫外吸收图谱仅在200nm处有一锐细吸收峰,大于250nm无明显的紫外吸收。结果表明,纯化的龙眼肉多糖中不含有

核酸、蛋白质以及其他杂质成分。

3.3 单糖组成分析 龙眼肉多糖完全酸水解后,以样品顺序点样,在3个展开系统中进行薄层分析表明,多糖 LYRP2-1的单糖组成为葡萄糖(Glc)。结果见图1、2。

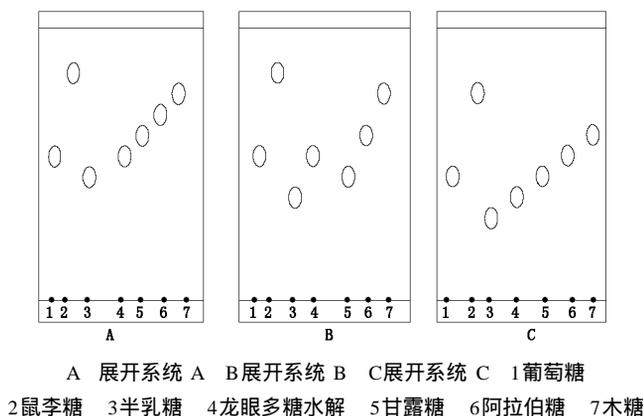


图1 展开系统薄层色谱图

Fig 1 TLC of development system

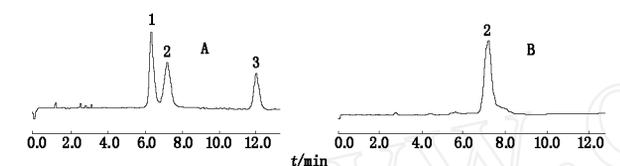


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram

由图2可见龙眼多糖完全酸水解后的样品与葡萄糖的峰一致。

3.4 多糖 LYRP2-1的分子质量测定 分级纯化后,均一多糖 LYRP2-1的重均分子质量为 1.1×10^5 u。并经凝胶渗透色谱及琼脂凝胶柱层析的图谱,均是基本对称的单一峰形,此组分均一多糖,见图3。

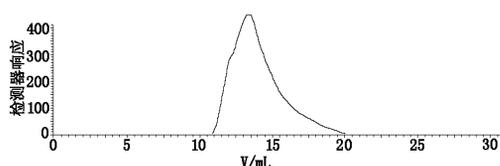


图3 HPGPC测定龙眼肉多糖 LYRP分子质量

Fig 3 Detemination of LYRP2-1 molecular weight by HPGPC

3.5 多糖 LYRP2-1 红外谱图 龙眼肉多糖 LYRP2-1在 3388cm^{-1} 处出现一个宽峰,是多糖的O-H的伸缩振动,表明多糖存在分子内的氢键; 2927cm^{-1} 为C-H不对称伸缩振动峰,此处吸收峰明显,提示其分子结构中甲基和亚甲基含量较大,体

现为分子链较长,分子质量较高; 1612cm^{-1} 是C=O非对称伸缩振动峰; 1413cm^{-1} 糖类C-H弯曲振动峰; 1045cm^{-1} 附近处的强吸收峰证明单糖以吡喃糖苷的形式存在。 $1200 \sim 1000\text{cm}^{-1}$ 有一个特殊的吸收区域,这是环的振动与C-OH的伸缩振动以及吡喃环的C-O-C、C-O伸缩振动叠加的结果; 915cm^{-1} 是D-吡喃葡萄糖环的吸收峰; 873cm^{-1} 构型吡喃糖吸收峰; 771cm^{-1} 吡喃环对称伸缩振动峰。以上均为多糖的典型结构,说明龙眼肉多糖是α型和β型端基差向异构共存的吡喃环多糖,见图4。

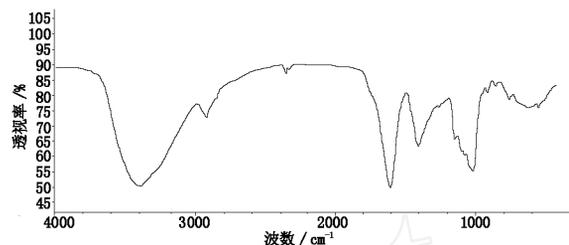


图4 龙眼肉多糖 LYRP2-1红外光谱图

Fig 4 FT-IR spectroscopy of LYRP2-1

参考文献:

- [1] Xiaoping Y, Dayong G, Moucheng W, et al. Characterization and antitumor activity of pollen polysaccharide [J]. *International Immunopharmacology*, 2007, 7(4): 427
- [2] Khan MT, Ather A, Thompson KD, et al. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses [J]. *Antiviral Research*, 2005, 67(2): 107
- [3] Tiehong Y, Mei J, Qibing M, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 39(4-5): 179
- [4] Schepetkin A, Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential [J]. *International Immunopharmacology*, 2006, 6(3): 317
- [5] Okuyama E, Ebihara H, Takeuchi H, et al. Adenosine, the anxiolytic-like principle of the *Aristolochia longana* [J]. *Planta Medica*, 1999, 65(2): 115
- [6] 薛芳, 颜瑞, 王承明. 超声辅助碱提取花生多糖的研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(08): 158
- [7] 余华. 海带多糖中蛋白质去除方法的对比研究 [J]. *成都大学学报(自然科学版)*, 2005, 24(4): 265
- [8] 刘洋. 金钱草多糖分离纯化与结构研究 [D]. 沈阳药科大学硕士学位论文, 2007. 22
- [9] 焦连庆, 于敏, 刘辉, 等. 树舌多糖中中性糖及糖醛酸的含量测定 [J]. *中国药理学*, 2005, 23(9): 1583

(收稿日期: 2008-09-11; 修回日期: 2008-11-21)

(责任编辑 梁爱君)