

文章编号:1673-1689(2006)01-0001-04

当归水溶性多糖的分离、纯化及结构初步分析

孙元琳^{1,2}, 顾小红³, 汤坚^{1,3}, 李德远⁴

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室,江苏 无锡 214036; 2. 运城学院 生命科学系,山西 运城 044000; 3. 江南大学 测试中心,江苏 无锡 214036; 4. 军事经济学院 营养食品研究所,武汉 430045)

摘要:采用 80 ℃热水提取,得到当归水溶性多糖 W-ASP。经阴离子交换柱层析、凝胶过滤柱层析对其进行纯化分级。实验结果表明:W-ASP11 主要由葡萄糖组成,相对分子质量约为 380 000; W-ASP12 主要由半乳糖和阿拉伯糖组成,相对分子质量约为 19 000; W-ASP2 和 W-ASP3 主要含半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖以及少量葡萄糖和甘露糖,并含有较高的糖醛酸,由单糖组成及红外图谱初步分析,可判断是一种果胶类多糖。当归多糖主要组分 W-ASP3 经凝胶色谱(GPC)鉴定为均一组分,其相对分子质量约为 62 000。

关键词:当归;多糖;分级纯化;结构分析

中图分类号:S 567. 239

文献标识码:A

The Preparation, Purification and Structure Analysis of Water-Soluble Polysaccharides from *Angelica sinensis*

SUN Yuan-lin^{1,2}, GU Xiao-hong³, TANG Jian^{1,3}, LI De-yuan⁴

(1. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Department of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China; 3. Testing & Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 4. Nutrition and Food Research Institute, Wuhan Economic College, Wuhan 430035, China)

Abstract: Polysaccharides from *Angelica sinensis* were extracted with hot water at 80 ℃. They were fractionated by anion-exchange chromatography and gel filtration chromatography respectively. The results showed that W-ASP11 was composed of glucose, with a molecular weight of 380 000; W-ASP12 was composed of galactose and arabinose, with a molecular weight of 19 000; W-ASP2 and W-ASP3 were composed of galactose, arabinose, rhamnose and trace of glucose and mannose, as well as high amount of uronic acid. The substances were considered as pectic polysaccharides from monosaccharide composition and IR spectra. The major fraction W-ASP3 was eluted with a single peak, and the molecular weight of it was determined by HPGPC as 62,000.

Key words: *Angelica sinensis*; polysaccharides; purification; structure analysis

收稿日期:2004-12-10; 修回日期:2005-06-02.

基金项目:国家 863 计划项目(2002AA248031).

作者简介:孙元琳(1971-),女,山西运城人,工程师,食品科学与工程博士研究生。

当归为伞形科植物当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels] 的干燥根, 为中医传统常用补血药, 具有补血、活血、调经止痛、润肠通便等功效。当归主要成分为多糖、阿魏酸、挥发油等。多糖广泛存在于中药材中, 现代药理学表明, 多糖是中草药发挥独特疗效的重要物质基础^[1]。近年来研究发现, 当归多糖具有激活补体活性^[3], 可去除自由基, 提高免疫力^[5, 6], 对造血系统有明显作用, 对抗肿瘤^[4]、抗辐射损伤^[7]也显示较好疗效。作者对当归多糖进行了分级纯化, 并对其组成和结构进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂和仪器

当归, 购自无锡山禾药业有限公司, 经鉴定为二级岷归。

DEAE-Sepharose CL-6B、Sepharose CL-6B: Pharmacia 公司产品; 木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸、间羟联苯: Sigma 公司产品; 四硼酸钠、牛血清蛋白、葡萄糖、 H_2SO_4 、苯酚、吡啶、盐酸羟胺、乙酸酐、肌醇等均为分析纯。

气相色谱仪: GC-14A, 日本 Shimadzu 公司产品; 高压液相色谱仪: 美国 Waters 公司产品; 红外光谱仪: 5DXB FT-IR 型, 美国 Nicolet Nexus 公司产品; 自动旋光仪: WZZ-2A, 上海精密科学仪器有限公司产品; 氨基酸自动分析仪: 美国 Agilent 公司产品; 紫外可见分光光度计: UV-240, 日本岛津公司产品; BSZ-100B 自动分部收集器: 上海青浦沪西仪器厂产品; DHL-A 电脑恒流泵: 上海沪西分析仪器厂产品; 722 型可见分光光度计: 上海第三分析仪器厂产品。

1.2 实验方法

1.2.1 当归多糖的分离纯化

1) 提取 当归粉碎, 过 60 目筛, 用体积分数为 80% 的乙醇溶液 70 °C 处理 2 次, 减压干燥得预处理当归粉。预处理当归粉于 80 °C 热水提取 2 次, 每次 2 h。合并上清液, 用乙酸调 pH=4.5, 离心, 上清液浓缩后加乙醇至体积分数为 75%, 过滤, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮和乙醚洗涤, 得到水溶性当归多糖粗品。

2) 纯化 将当归粗多糖溶于水, Sevag 法去游离蛋白后, 流水透析 2 d, 去离子水透析 2 d, 离心, 减压浓缩后, 冷冻干燥得初步纯化多糖 W-ASP。

W-ASP 经 DEAE-Sepharose CL-6B 柱 (D 2.6 cm $\times$ 30 cm) 层析, 依次用起始缓冲液、0~1 mol/L

NaCl 溶液梯度洗脱, 洗脱速度为 1.5 mL/min, 每管 4 mL 分部收集, 逐管检测多糖含量 (苯酚-硫酸法 $A_{490\text{ nm}}$) 和蛋白质含量 (紫外 $A_{280\text{ nm}}$)。

分别收集单一峰组分, 透析脱盐浓缩后, 冷冻干燥。W-ASP1 和 W-ASP3 组分再分别经 Sepharose CL-6B (D 1.6 cm $\times$ 100 cm) 柱层析, 用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 体积流量为 15 mL/h, 每管 4 mL 分部收集, 逐管检测多糖含量 (苯酚-硫酸法 $A_{490\text{ nm}}$) 和蛋白质含量 (紫外 $A_{280\text{ nm}}$)。

1.2.2 当归多糖的 HPLC 纯度鉴定及相对分子质量测定 将相对分子质量分别为 6 100、16 500、26 290、40 000、84 000、158 000 的标准 Dextran 相继进样, 记录保留时间 T_R , 以 T_R 为横坐标, LgM 为纵坐标绘制标准曲线, 求得回归方程。待测样品 W-ASP1、W-ASP12、W-ASP3 各进样 20 μ L, 根据所得的 T_R , 通过回归方程计算多糖相对分子质量。采用色谱柱 Waters Ultrahydrogel™ Linear (D 7.8 mm $\times$ 300 mm) 两柱串连, 检测器为 Waters 2410 示差折光检测器, 以 0.1 mol/L $NaNO_3$ 溶液为流动相, 体积流量 0.9 mL/min, 柱温 45 °C。

1.2.3 紫外光谱 (UV) 分析 将样品配成 0.1 mg/mL 的水溶液, 在 190~330 nm 进行紫外扫描。

1.2.4 红外光谱 (IR) 分析 取样品微量, 采用 KBr 研磨压片后, 在 4000~400 cm^{-1} 红外波数范围内进行扫描。

1.2.5 化学组成分析 样品的单糖组成分析: 取多糖样品 10 mg 于具塞管中, 加入 2 mol/L 的 TFA 溶液 2 mL, 水解, 除尽过量的 TFA 后, 真空干燥。采用糖腈乙酸酯衍生化法, 反应产物直接进样作气相色谱 (GC) 分析, 根据出峰时间判断单糖种类, 根据峰面积的比值确定各单糖间的比例关系。采用弹性石英毛细管色谱柱 D 0.32 mm $\times$ 30 m, OV1701 柱, 载气为 N_2 , 1.5 mL/min 流速, FID 氢焰检测器, 气化室温度 260 °C, 检测器温度 250 °C, 程序升温 150~190 °C (10 °C/min)→240 °C (3 °C/min)。

总糖含量测定: 苯酚-硫酸法^[8], 以葡萄糖为标准。

蛋白质含量测定: Lowry 法^[10], 以牛血清蛋白为标准。

糖醛酸含量测定: 间羟联苯法^[9], 以半乳糖醛酸为标准。

2 结果与讨论

2.1 当归多糖 W-ASP 的分级纯化

当归多糖 W-ASP 经 DEAE-Sepharose CL-6B

柱层析分级,得到 3 个级分 W-ASP1、W-ASP2 和 W-ASP3(图 1)。W-ASP1 经 Sepharose CL-6B 柱层析分级,得到 W-ASP11 和 W-ASP12 两个组分(图 2)。W-ASP3 经 Sepharose CL-6B 柱层析分级,得到单一对称峰(图 3)。由于 W-ASP2 组分收率很低,故除化学组成、单糖组成及红外分析外,不再对其跟踪检测。

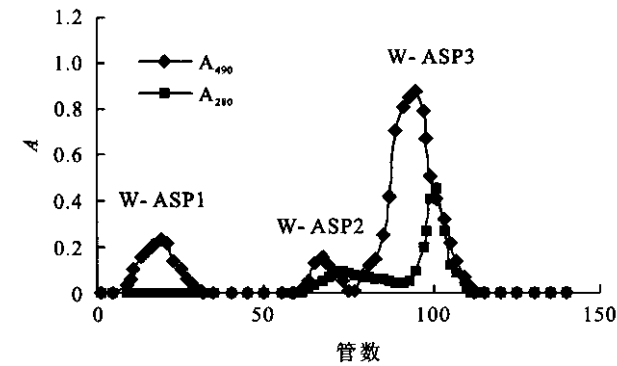


图 1 W-ASP 的 DEAE-Sepharose CL-6B(D 2.6 cm $\times$ 30 cm)线性梯度洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of W-ASP on DEAE-Sepharose CL-6B column D 2.6 cm $\times$ H 30 cm

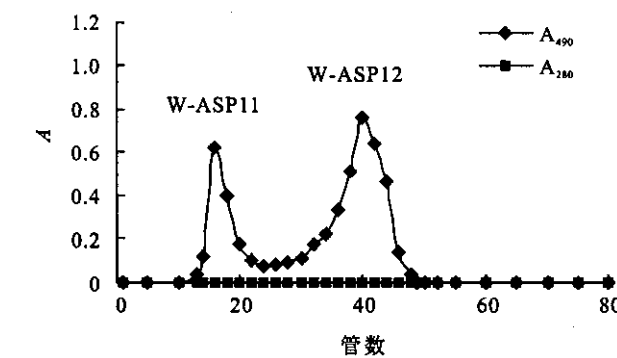


图 2 W-ASP1 的 Sepharose CL-6B 凝胶色谱柱洗脱曲线(D 1.6 cm $\times$ 100 cm)

Fig. 2 Elution profile of W-ASP1 on Sepharose CL-6B column D 1.6 cm $\times$ H 100 cm

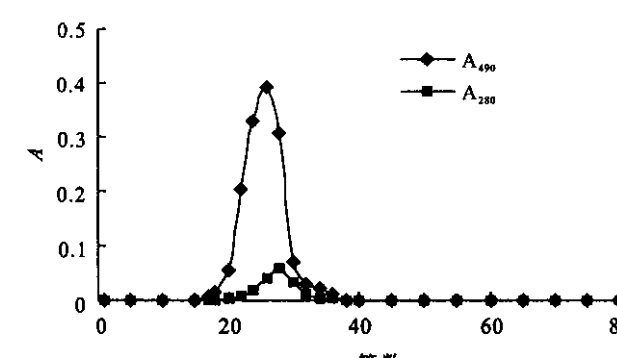


图 3 W-ASP3 的 Sepharose CL-6B 凝胶色谱柱洗脱曲线(D 1.6 cm $\times$ 100 cm)

Fig. 3 Elution profile of W-ASP3 on Sepharose CL-6B column D 1.6 cm $\times$ H 100 cm

2.2 当归多糖不同分级组分的 HPLC 纯度鉴定及相对分子质量测定

由图 4 和图 5 可以看出,W-ASP1 由两个不同重均相对分子质量的多糖组分组成,分别约为 384 000 和 19 000;而 W-ASP3 的重均相对分子质量分布比较均一,为单一对称峰,相对分子质量为 62 000。这与其相应的 Sepharose CL-6B 凝胶层析柱洗脱结果一致。不同级分的化学组成见表 1。

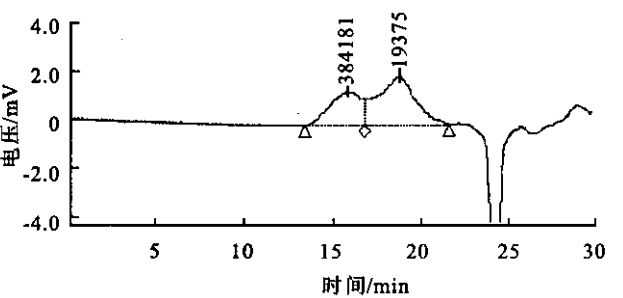


图 4 W-ASP1 的 HPLC 凝胶柱图谱

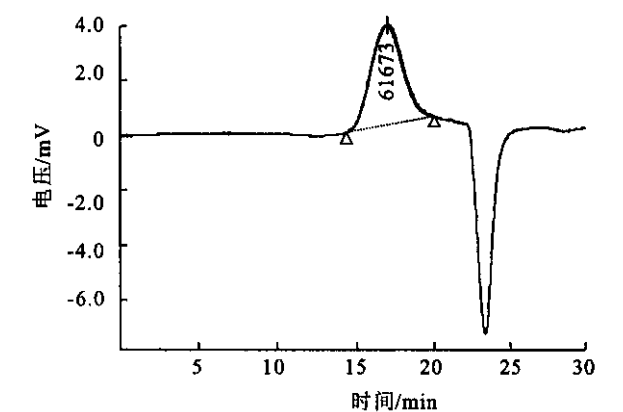


图 5 W-ASP3 的 HPLC 凝胶柱图谱

表 1 当归多糖及其纯化分级组分的化学组成

组分	质量分数/%		
	总糖	糖醛酸	蛋白质
W-ASP	54.36	24.81	8.34
W-ASP1	81.12	5.35	0.69
W-ASP11	92.33	0.87	0.31
W-ASP12	87.42	8.43	0.50
W-ASP2	76.55	35.38	3.62
W-ASP3	43.75	58.27	2.53

从表 2 可以看出,当归多糖各分级组分的单糖组成种类较多,是由不同单糖残基构成的杂多糖。W-ASP11 主要由葡萄糖组成,推测为葡聚糖;W-ASP12 主要由阿拉伯糖和半乳糖组成,推测为阿拉伯半乳糖;W-ASP2 和 W-ASP3 主要含半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖以及少量的葡萄糖和甘露糖,并含有较高的糖醛酸,可初步判断 W-ASP3 为果胶类

多糖。确切的结构特征还有待进一步研究。

表 2 当归多糖各分级组分的单糖组成

Tab. 2 Sugar composition fractions of W-ASP

组 分	单糖质量分数/%				
	Rha	Ara	Man	Glc	Gal
W-ASP	1.0	3.6	0.4	1.5	6.3
W-ASP1	—	1.0	0.1	7.1	0.4
W-ASP11	—	0.5	—	26.0	0.6
W-ASP12	—	21.1	1.6	16.3	1.3
W-ASP2	1.0	14.7	0.8	24.3	14.2
W-ASP3	1.0	5.6	0.2	0.5	13.3

2.3 红外光谱(IR)分析

红外光谱显示,各分级组分在 500~4 000 cm⁻¹ 范围具有糖类的特征吸收峰。3 600~2 500 cm⁻¹ 出现的宽峰是 O—H 伸缩振动的结果;2 923 cm⁻¹、2 853 cm⁻¹ 的吸收峰是 C—H(CH, CH₂ 和 CH₃) 伸缩振动引起的;1 370 cm⁻¹ 和 1 417 cm⁻¹ 附近的吸收峰属 C—H 的弯曲振动,它和 C—H 的伸缩振动构成了糖类的特征峰。1 730 cm⁻¹ 处的吸收峰为糖醛酸羧基形成的酯键(—COOR)C=O 的伸缩振动;1 630 cm⁻¹ 处的强吸收峰为游离的羧酸或羧酸盐(—COO)C=O 的不对称伸缩振动,同时也是糖的水化物样品的吸收峰。1 300~1 000 cm⁻¹ 间的吸收峰是由 C—O 伸缩振动所引起的,其中一种归属于糖环上的 C—O—H 和糖苷键 C—O—C,另一种则归属于糖醛酸 C₆ 的 C—O—H 以及 C—O—R。由于 833 cm⁻¹ 有一强吸收峰,923 cm⁻¹ 附近有微弱吸收峰,说明多糖分子以 α-糖苷键为主,并含有一定量的 β-糖苷键。

参考文献:

[1] 梁忠岩. 中草药多糖的应用研究[J]. 长春师范学院学报,2001,20(1):38—40.
[2] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1997.
[3] Yongwen Zhang, Yamada. Complement activation galactan chains in a pectic arabinogalactan(AG II b-1) from the roots of Angelica acutiloba Kitagawa[J]. Carbohydrate Polymer,1996,(31):149—156.
[4] Haruki Yamada. Structure characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from the roots of Angelica acutiloba[J]. Planta Medica,1990,(56):182—186.
[5] Kumazawa Y, Mizunoe K, Otsuka Y. Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of Angelica acutiloba. Kitagawa (Yamato tohki)[J]. Chem Pharm Bull, 1985,33(12):5351—5354.
[6] Kumazawa Y, Nakatsuru Y, Fujisawa H. Lymphocyte activation by a polysaccharide fraction separated from hot water extracts of Angelica acutiloba Kitagawa [J]. Immunology, 1982,47(1):75—83.
[7] Lee SE,Yang TA. Radiation protective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions si-wu-tang and si-jun-zi-tang[J]. Am J Chin Med,1999,27:387—396.
[8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社,1998.
[9] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acid[J]. Anal Biochem, 1973, 54:484—489.
[10] 王肇慈. 粮油食品品质分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.
[11] Manuel A. Coimbraa. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 1998, 37:241—248.

由红外光谱图比较可以看出,W-ASP2 和 W-ASP3 在 1 730cm⁻¹ 及 1 260cm⁻¹ 有特异吸收,说明其含有酸性糖。同时发现 W-ASP2 和 W-ASP3 在 1 150、1 100 及 1 020cm⁻¹ 有强吸收,这是果胶类多糖中的半乳糖醛酸在指纹区的特征吸收峰^[11]。由此进一步证实了 W-ASP2 和 W-ASP3 为果胶类多糖的推断。而 W-ASP1 及其凝胶柱分级组分 W-ASP11、W-ASP12 没有以上特征,为中性多糖。

2.4 紫外光谱(UV)分析

紫外光谱显示,W-ASP1 在 280、260 nm 处无明显吸收,说明无核酸及蛋白质,由表 1 也可看出蛋白质含量极低;W-ASP11 和 W-ASP12 由于是 W-ASP1 的分级组分,其紫外谱图与 W-ASP1 相似(图略);而 W-ASP3 在 280 nm 有弱吸收,表示含有少量蛋白质,结合柱层析洗脱曲线判断可能为糖蛋白。

3 结 论

当归多糖经离子交换柱层析和凝胶过滤柱层析分别得到不同重均相对分子质量及不同种类的多糖,W-ASP11 主要由葡萄糖组成,相对分子质量约为 380 000;W-ASP12 主要由阿拉伯糖和半乳糖组成,相对分子质量约为 19 000;W-ASP2 和 W-ASP3 主要含半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖以及少量的葡萄糖和甘露糖,并含有较高的糖醛酸,由单糖组成及红外图谱初步判断是一种果胶类多糖。当归多糖主要组分 W-ASP3 经 HPLC 凝胶色谱鉴定为均一组分,测得其相对分子质量为 62 000。

(责任编辑:朱 明)