

引种西洋参叶水溶性多糖的研究——中性多糖PN的 分离、纯化与结构分析*

苗春艳 梁忠岩 张翼伸

(东北师范大学生物系, 长春 130024)

摘要 从引种西洋参中提取的水溶性多糖, 经分离纯化得一分子量较小的中性多糖——PN。PN的分子量为7.4kD, 主要成份为葡萄糖。经Sephadex G-50凝胶柱层析和电泳方法分析为均一级份。经纤维素酶解, 部分酸水解, 高碘酸盐氧化和Smith降解, 红外光谱, 甲基化, ^{13}C -NMR分析表明, 其具多分枝结构, 分子主链由 β -(1-4)连接的葡萄糖构成。分枝点率为25%, 分枝点为O-6, 其它残基在侧链上, 分枝率为47.8%。

关键词: 引种西洋参; 中性多糖

人参茎叶水溶多糖的研究比较多^[1,2], 西洋参茎叶水溶性多糖的研究目前国内尚未见报道。本文研究的是从左家特产所提供的引种西洋参叶中提取的多糖。西洋参叶经多次水提得一粗多糖。本文报道的是经多次分级得到的一分子量较小的一级份—PN。

材料与 方法

一、材料

引种西洋参叶由左家特产所提供。

二、仪器与方法

1. PN的提取及分离纯化 过程如下: (表见611页)

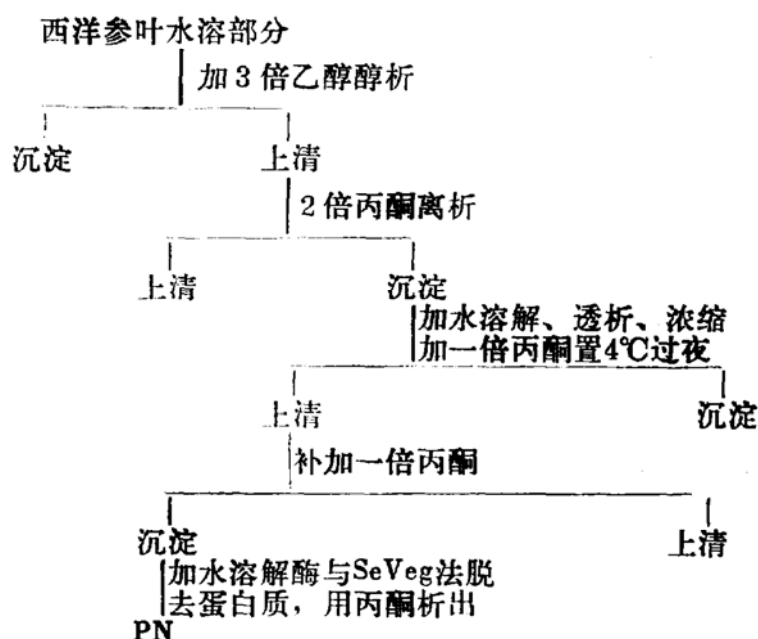
2. 分子量测定 Sephadex G-50 凝胶柱层析, 生理盐水洗脱, 流速3mL/10min, 以已知分子量(4万、2万、1万及0.5万)作标准曲线, 对照得其分子量。

3. 旋光度测定 国产WZZ-T2型投影式旋光仪, 1dm, 糖浓度为0.1%, 室温下测定。

4. 高碘酸氧化和Smith降解 按文献^[1,2]进行。糖样与15mmol NaIO₄溶液室温暗处反应120h, 取部份测甲酸, 余液经NaBH₄还原后, 用1mol/L H₂SO₄室温水解48h, BaCO₃中和, G.C

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1992-12-23, 修回日期: 1993-03-15



分析。

5. 部分酸水解 PN 用 0.05 mol/L 三氯醋酸 95°C 水解 2h, 分出沉淀与上清两部分, 上清部分透析, 分袋内、袋外两部分, 做 G.C 分析。

6. 甲基化 按 Hakomori 法^[6] 进行。G.C-M.S 分析采用 JEOL JGC-20K 色谱仪和 JEOL JMS-D300 质谱仪联用。0.2 mm × 25 m 弹性石英毛细管柱, 3% ov-101 固定液 恒温 170°C, 程序升温 100-205°C, 3°C/分。

7. 红外光谱 仪器型号 FT-IR, KBr 压片, 常规测定。

8. 核磁共振 ¹³C-核磁共振用 AC-80NMR 仪测定, 观察频率 25 MHz, 宽带全频去偶, 数据点 8k, 累加次数 119727, 溶剂 D₂O, 化学位移以 TMS 为标准, 浓度 15 mg/mL, 室温 20°C 测定。

9. 纤维素酶降解 糖样水溶液加纤维素酶 (“ONOZUKA” R-10 日本), 40°C 保温 24h, 补加一次酶继续保温 24h, 脱去蛋白质。

10. 电泳按前文^[1,2] 所述方法进行。

结果与讨论

一、物理性状

PN 为棕色固体粉末, 易溶于水, 旋光值为 $[\alpha]_D^{20} = +675 (C = 0.1, H_2O)$, 分子量 7.4 kD。

二、凝胶柱层析与电泳

层析结果为单一对称峰 (Fig. 1), 玻璃纤维纸电泳为单一带, 示其为质点, 极性均一物。

三、糖的组成分析

甲醇解 PN 的 T.M.S. 衍生物经 G.C 分析表明含葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖, 比例为

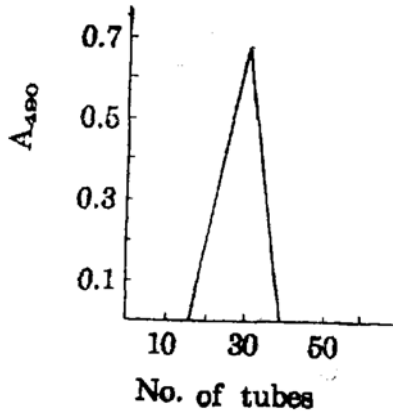


Fig.1 Chromatogram of PN on Sephadex G-50

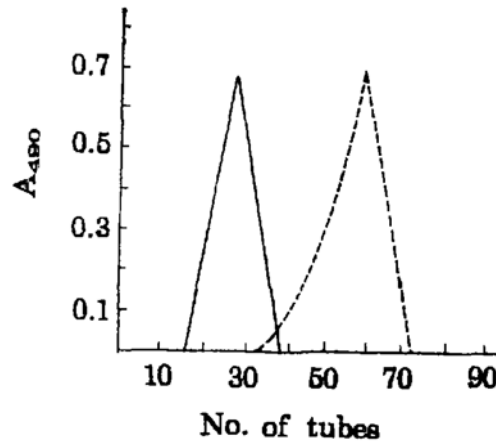


Fig.2 Chromatogram of PN on Sephadex G-50 before and after enzymolysis
— before enzymolysis
---- after enzymolysis

8.25:1:1.5:0.75。

四、纤维素酶解

PN经纤维素酶解后，上Sephadex G-50凝胶分析柱得Fig.2的峰2。分子量明显下降，在Sephadex G-50柱上全部进入，说明PN主链由 $\beta(1-4)$ 葡萄糖构成。

五、红外光谱分析

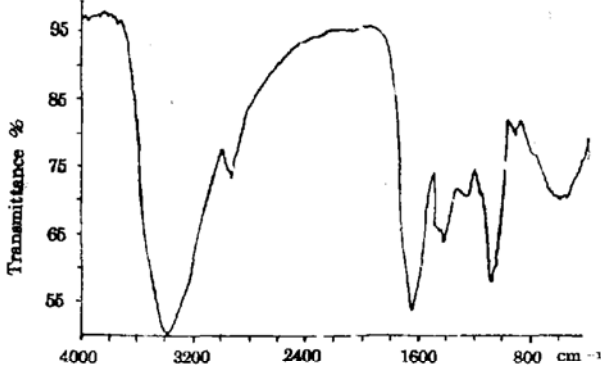


Fig.3 I.r. spectrum of the PN

PN的红外光谱Fig.3。从PN的红外光谱分析表明，PN除有多糖特征吸收峰外，在 1046.32cm^{-1} 处有吡喃型特征吸收峰，在 890cm^{-1} 处也有明显吸收峰，示其为 β -糖苷键多糖。

六、高碘酸盐氧化和Smith降解

PN经高碘酸盐氧化，平均每摩尔己糖残基消耗 IO_4^- 为 1.238mol ，释放甲酸量为 0.282mol ，从甲酸的生成量分析，有1-6或1-2结构外尚有其它可氧化残基。

将高碘酸盐氧化产物进行Smith降解，从降解产物中检出大量甘油和赤藓醇，葡萄糖全部被氧化，(Table 1)。说明PN中存在大量以1-6(或1-2)，1-4糖苷键连接的葡萄糖(或半乳糖)残基，与上述纤维素酶解的结果一致。阿拉伯糖几乎全部被氧化，表明阿拉伯糖或处于分子边缘，或5位被取代，2,3位不被取代。半乳糖和木糖含量下降，表明它们也有以可被高碘酸盐破坏的键型存在，半乳糖以1-6或1-2，1-4糖苷键连接，木糖主要以1-2或1-4糖苷键连接。Smith降解前后各组成含量如Table 1。

七、部分酸水解

PN经部分酸水解后，然后透析，袋内物 \overline{MW} 为5000左右，袋内未检出阿拉伯糖，葡萄糖比例明显增加，说明葡萄糖多数位于分子内部，阿拉伯糖可能位于外缘部分。

Table 1 Comparison of composition before and after Smith degradation

Sample	Composition(molar%)					
	Glc	Gai	Xyl	Ara	Glycero	Erythro
Before	71.7	8.7	13.0	6.6	-	-
After	-	2	1.72	0.17	42.8	52.7

八、甲基化分析

PN经甲基化, 然后进行GC-MS分析。根据CTr值及GC-MS中质谱碎片对甲基化糖定性。各种糖连接方式和摩尔比如Table 2, 与其它结果一致。

Table 2 GC and GC-MS of alditol acetates derived from methylated PN

Methylated sugar	Main mass fragment(m/e)	Molar ratio	Mode of linkage
2,3,4,6-Me ₄ -GlcP	43,45,71,87,101,117,129,145,161,205	3	1-
2,3,4-Me ₃ -GlcP	43,87,99,101,117,129,161,189	6	1-6
2,3,6-Me ₃ -GlcP	43,45,87,99,101,113,117,233	18	1-4
2,3,-Me ₂ -GlcP	43,71,117,161,217,233	6	1- ⁴ / ₆
2,4,6-Me ₃ -GalP	43,45,87,101,117,129,161	1	1-3
2,3,4-Me ₃ -GalP	43,87,99,101,117,129,161,189	2	1-6
2,3,4,6-Me ₄ -GalP	43,45,71,87,101,117,129,145,161,205	1	1-
2,4-Me ₂ -xyLP	43,71,117,189,233	1	1-3
2,3-Me ₂ -xyLP	43,87,101,117,129,189	4	1-4
2,3,4-Me ₃ -xyLP	43,101,117,161	1	1-
2,3,5-Me ₃ -Araf	43,45,71,87,101,117,129,161	1	1-
2,3-Me ₂ -Araf	43,87,101,117,129,189	2	1-5

九、核磁共振分析

在103.9和80.2PPM处为主要峰, 见Fig.4, 说明PN主要为β1-4糖苷键^[6,7], 其中c-1 103.9(异头碳), c-4 80.2(连接碳), c-6 66.1(连接碳)), c-2 73.2, c-3 76.2, c-5 77.9均为糖基内部碳^[6,7]。

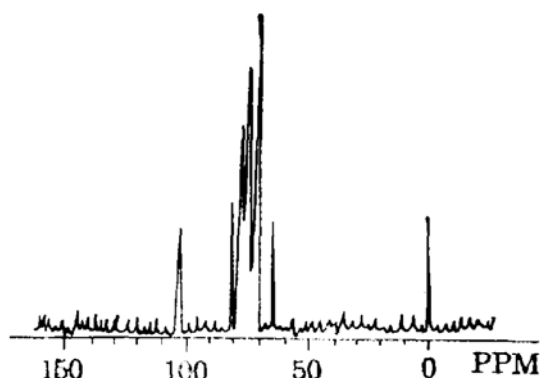


Fig.4. ¹³C-NMR spectrum of PN

综合以上结果, 1-4 连接的葡萄糖构成PN的主干, 约有 24个残基, 平均每 4 个残基在 6 位上有一个分枝点。阿拉伯糖主要位于侧链, 其两种连接方式都可与高碘酸盐作用。半乳糖和木糖也位于侧链。6 个侧链有 3 个以Glc基为末端, 1个Gal基, 1个Ara基, 1 个 xyl 基亦均为末端, 6 个1-6Glc, 1个1-3Gal, 2个1-6Gal, 1个1-3xyl, 4 个1-4xyl, 2 个1-6Ara, 在侧链。主干中分支点率为25%, 分子中分枝率为47.8%。

参 考 文 献

- 1 台桂花, 张翼仲. 生物化学与生物物理学报, 1988, 3, 119
- 2 刘莉菲, 张翼仲, 李润秋. 生物化学杂志, 1988, 4, 153-160
- 3 Aspinal G O, et al. *Chem Ind (London)*, 1957, 7, 1219.
- 4 Tomeda M, et al. *Chem Pharm Bull*, 1972, 29(4): 778
- 5 Hakomori S. *J Biochem(Tokyo)*, 1964, 55,205
- 6 张维杰. 复合多糖生化研究技术, 上海科学技术出版社, 1987
- 7 Philip A J Gorin. *Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1981, 38,37-52

Studies on the Polysaccharides Isolated from the Leaves of *Panax Quinquefolium Linn*

—Isolation, Purification and Structural Analysis of PN

Miao, Chun-yan Liang, Zhong-yan Zhang, Yi-shen

(Biology Department, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract The water soluble polysaccharides PN were obtained from the leaves of panax quinquefolium linn. Its molecular weight was found to be 7400. It mainly contains Glc. Its homogeneity was proved by sephadex G-50 and electrophoresis. By means of cellulase enzymolysis, partial hydrolysis with acid, I.R., methylation analysis, ¹³C-NMR etc, the main chains of PN are composed of β (1-4) linked Glc 25% residues of main chains have side chains in 0-6, other residues link in the side chains, the branching rate in molecule is 47.8%.

Key words: Panax quinquefolium; Neutral polysaccharide