

生漆多糖的分离与结构研究*

杜予民 孔振武 李海萍

(武汉大学资源开发与应用技术研究所, 武昌, 430072)

摘 要

生漆用丙酮提取不溶解物, 除去其水不溶部分, 依次进行 732 阳离子交换树脂和 Sephadex G-100 柱层析, 得到白色粉末漆多糖, 分子量 12.5×10^4 , 其组成为 D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸、L-阿拉伯糖和 L-鼠李糖, 摩尔比为 7.7 : 1.8 : 0.4 : 0.1. 经羧基还原、甲基化反应、高碘酸盐氧化、Smith 降解和 GC-MS、IR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 分析, 结果表明, 漆多糖为多分支结构, 分子主链由 $\beta(1 \rightarrow 3)$ D-半乳糖基构成, 部分半乳糖基 C_6 位有支链, 另有部分半乳糖基以 $(1 \rightarrow 6)$ 键连接, 其中 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 与 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 贰键糖基组成比为 1.83 : 1. 分子的支链由葡萄糖醛酸基、阿拉伯糖基、鼠李糖基组成, 并且葡萄糖醛酸基构成分子的末端基。

关键词 生漆、生漆多糖、化学结构

中国生漆的主要成分漆酚、漆酶已有大量报道^[1-3], 然而含量高达 3% 的生漆多糖 (Lacquer polysaccharide) 却研究得很少. 近年来对其分离鉴定和溶液性质仅有 Oshima 等几篇报道^[4, 5]. 由于多糖具有复杂而多方面的生物活性和功能, 本实验室在前期工作基础上, 为确定其活性所在以及探讨其化学结构与活性之间的关系; 已从不同产地、品种的生漆中, 分离纯化得到具有生物活性的多糖组分. 本文采用化学降解和光谱测定相结合的方法, 研究了生漆多糖的化学结构.

实 验 部 分

1. 试样

湖北省恩施 1990 年出产的生漆.

2. 仪器和试剂

紫外光谱用 Shimadzu UV-300 型仪, 红外光谱用 NICOLET 170 SX 型仪, 气相层析是 Shimadzu GC-9A, 高效液相色谱是 Shimadzu LC-6A, 示差仪为 Shimadzu RID-2AS 型, GC-MS 为 Hewlett-packard 5988A 型联用仪, ^1H 和 ^{13}C -NMR 为 Varian XL-200 型仪.

* 1992 年 2 月 17 日收到

标准多糖为 P 系列 pullulan 多糖 (日本东京化成), Sephadex G-100 (pharmacia, Sweden), CMC 即 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-p-toluenesulfonate (日本东京化成), 试剂除粗提用工业级外, 其他均为分析级, 蒸馏水为二次重蒸水, 减压浓缩温度低于 45℃.

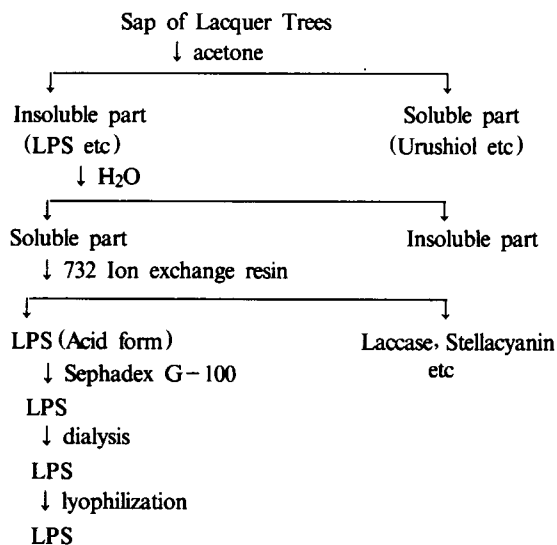


Fig.1 Separation and purification of the LPS

3. 生漆多糖 (LPS) 分离纯化

生漆加丙酮浸泡、搅拌、离心; 不溶物用丙酮洗至灰色或洗出溶液为无色, 凉干后得丙酮不溶物。将此不溶物加水搅拌, 除去水不溶物, 得到含有多糖的蓝色溶液。将此粗多糖溶液, 进行 732 (H^+) 阳离子交换树脂柱层析, 以水洗脱、UV 检测、用 NaOH 稀溶液中和至 pH7, 用蒸馏水透析一天, 再冷冻干燥得 LPS 半精品。该半精品用适量水溶解、进行 Sephadex G-100 柱层析, 0.1mol/l NaCl 洗脱、苯酚-硫酸法检测、透析后, 冷冻干燥, 得到白色粉末 LPS 精品。见图 1。

4. 纯度与分子量测定

先用琼脂糖测定纯度, 参照 Dietrich 法^[6], 使用 0.5% 琼脂糖溶液制板 (5.5×9.0 cm), 挖孔法加样 (0.5μl 含 3μg)。采用二种缓冲系统: 乙二胺缓冲液 (0.05mol/l, pH8.5); 己二胺缓冲液 (0.05mol/l, pH8.5), 固定电压 160V, 电泳 2 小时, 以甲苯胺蓝溶液染色。LPS 向阳极泳动, 得单一清晰斑点。

再用 Sephadex G-100 柱层析测定纯度, 取 LPS 精品 15mg, 溶于最小体积 NaCl 溶液中, 上 Sephadex G-100 层析柱 (25×3cm), 用 0.1mol/l NaCl 溶液洗脱、流速 0.2 ml/min, 分部收集, 检测方法同前。

用 HPGPC 测定分子量, 柱子为 Shimadzu shim-pack DIOL-300, 淋洗剂分别用 0.2mol/l 磷酸盐缓冲液 (pH6.0) 和 0.1mol/l Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0)。进样量 25μl, 流速 1ml/min, 示差折射检测。标准多糖 pullulan P-800, P-400, P-200, P-100, P-50, P-20, P-10, P-5。由标准品的特性粘数和分子量乘积的对数对洗脱体积作图, 得到普适校正曲线, 然后再通过 LPS 的 Mark-Houwink 方程转换成 LPS 的 GPC 标定线, 从而求得 LPS 分子量。

5. 完全酸水解

还原前后的 LPS 各 15mg, 分别经 2mol/l TFA 5ml 封管 100℃ 水解 12 小时, 蒸馏去尽未反应的 TFA, 相继进行纸层析和还原后乙酰化的气相层析。纸层析纸为 Whatman No.1 滤纸 (40×4cm), 溶剂系统正丁醇:醋酸:水 (4:1:5), 苯胺-邻苯二甲酸试剂显色。气相层析条件: 柱子为 OV-1 石英弹性毛细管 (28m×0.22mm);

柱温 200 ℃; 汽化室、检测室温度 250 ℃; 氮气流量 40ml/min; 尾吹 30ml/min; 分流比为 50 : 1; 进样量 1 μ l (氯仿溶液)。

6. LPS 中的羧基还原反应

LPS 按文献^[7]进行羧基还原, LPS 20mg 溶于 6ml 水中, 加入 CMC 200mg, 用 0.05mol/l HCl 自动滴定控制 pH4.75、于室温搅拌 2 小时, 逐步加入 2mol/l NaBH₄ 2.5ml, 以 4mol/l HCl 自动滴定维持 pH7.0, 室温搅拌 4 小时, 反应液透析, 再经 Sephadex G-100 柱层析、水淋洗、示差折射检测、冷冻干燥, 得白色还原后漆多糖、IR 检测证明还原完全。

7. 甲基化反应

取羧基还原后的 LPS 10mg, 按改良的 Hakomori 法^[8]分别对还原前和还原后的 LPS 进行甲基化反应, IR 检测甲基化完全后, 用 90% 甲酸 5ml, 于 100 ℃封管水解 6 小时, 再经 2mol/l TFA 100 ℃水解 6 小时, 用 NaBH₄ 还原, 以醋酐-吡啶乙酰化, 作气相层析和 GC-MS 联用分析。质谱分析条件: 电离方式 EI, 电子能量 70eV, 电离电流 300 μ A, 离子源温度 180 ℃。

8. 高碘酸盐氧化和 Smith 降解反应

还原后的 LPS 15mg 溶解于 15ml 0.01mol/l NaIO₄ 溶液中, 调节 pH4.5, 避光置于 5 ℃ 处, 定时取样用分光光度法^[9], 于 220nm 处测定 NaIO₄ 的消耗量。

Smith 降解: 按上述条件, 120 小时氧化反应完全后, 加乙二醇 1ml, 搅拌, 除去过剩 NaIO₄。透析后浓缩、再用 NaBH₄ 15mg 还原, 用醋酸中和至 pH5.5、透析后、冷冻干燥得多糖醇。加 2mol/l TFA 5ml, 在 100 ℃封管内水解 12 小时, 经中和后、减压蒸干, 将降解产物乙酰化后再作气相层析实验、条件同前法、用已知标准物对照检定试样。

9. IR 和 NMR 检测

IR 取 LPS 精品 2mg, KBr 压片, 4000—200cm⁻¹ 扫描。

NMR 采用 D₂O 作溶剂、室温下扫描得 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 的 LPS 波谱图。

结 果 与 讨 论

1. LPS 的分离纯化及均一性

从生漆的丙酮不溶物中, 取其水溶性部分提取分离 LPS、通常用经典的 (NH₄)₂SO₄ 多级沉淀法。由于其溶液中含有糖蛋白 (漆酶与铜蓝蛋白等) 和酯类物, (NH₄)₂SO₄ 不易使糖蛋白沉淀完全, 又因反复操作多糖损失较大, 后改用 732 (H⁺) 阳离子交换树脂柱层析、经控制适当的淋洗速度 10—12ml/h, 可使以金属阳离子 (Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺) 羧酸盐形式的 LPS 脱盐、转化为酸性多糖, 从而有效地将 LPS 与糖蛋白分离 (8g 粗品可得半精品 6.25g)、收率为 78.1%。将此半精品用 Sephadex G-100 柱层析分离精制、3g 半精品可得 1.67g 精品, 收率为 55.6%。经 UV 检测, 260nm 和 280nm 处无吸收, 又应用考马斯亮蓝染料法检测亦未发现糖蛋白。以上均表明纯化精制后的 LPS 无核酸及蛋白质存在、纯化效果好。实验过程中亦曾试用 DEAE-Cellulose 柱层析法, 以 0.1mol/l NaCl 溶液淋洗、洗脱峰形单一且对称性好, 但其收率低于 10%。这

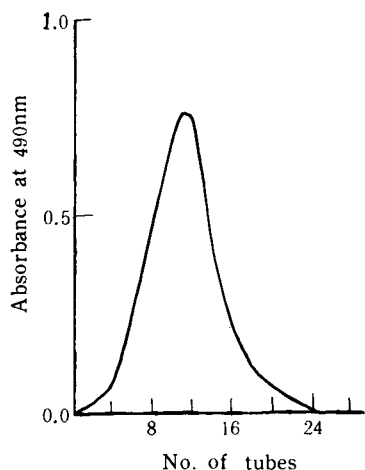


Fig.2 Chromatogram on Sephadex G-100 of the LPS

可能是由于 LPS 在该柱上产生较强的吸附作用所致。

LPS 的 Sephadex G-100 凝胶柱层析的洗脱曲线如图 2。图中表明只出现一个峰且峰形较为对称集中。琼脂糖电泳显色后为单一色斑。结果证明 LPS 是均一纯品，为白色粉末。它溶于水，尤易溶于热水。不溶于醇、酮、酯等有机溶剂。其水溶液呈透明粘稠状。其硫酸蒽酮、硫酸呋唑反应均为阳性。

2. 分子量

应用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定 LPS 的分子量。具有快速、高分辨和重现性好的优点。分别以磷酸盐和 Tris-HCl 缓冲液为两种不同流动相；用 shin-pack DIOL-300 柱测定。前者

$\overline{M}_w 12.5 \times 10^4$ ，后者 $\overline{M}_w 12.1 \times 10^4$ ，其平均偏差在 4% 以内。

3. 化学组成

LPS 的 IR 特征吸收为 3440、2920、1620、1425、1055、894 和 780cm^{-1} ，其表明是一种酸性多糖。硫酸-呋唑反应为正结果，亦确认 LPS 中含有己糖醛酸。

LPS 经完全酸水解、纸层析发现有半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ara)、鼠李糖 (Rham)。根据纸层析结果，将 LPS 进行两种试验：一是部分水解、还原、乙酰化和气相层析，得到各单糖组分的摩尔比为 Gal : Ara : Rham = 7.7 : 0.4 : 0.1；二是用 CMC 即 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-p-toluene-sulforate 和 NaBH_4 进行羧基还原，再经全水解、还原、乙酰化和气相层析。由此可进一步表明 LPS 是由 D-Gal, D-Glc A, L-Ara 和 L-Rham 组成，其摩尔比为 7.7 : 1.8 : 0.4 : 0.1。

4. 相邻单糖基连接方式

LPS 和还原后的 LPS 分别按改良的 Hakomori 法甲基化，全甲基化多糖 (IR 检查 3440cm^{-1} 处无羟基吸收峰)，经甲酸和三氟醋酸相继水解，水解物还原、乙酰化转化为相应的 Alditol acetate 作气相层析和 GC/MS 分析，结果见表 1 所示。

Tab.1 GC-MS Analysis of alditol acetates from the methylated LPS

Methylated sugars	Molar ratio	MS (m/z)	mode of linkages
2,3,4,6-Glc	0.33	43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	1 →
2,3,6-Gal	0.45	43, 45, 87, 101, 117, 129, 161	1 → 3
2,3,4-Gal	0.48	43, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189	1 → 6
2,4-Gal	1.00	43, 87, 117, 129, 189	1 → 3, 6

还原的 LPS 用 0.1mol/l 高碘酸钠进行氧化，反应完全后用 UV 法，于 220nm 处监测高碘酸消耗量，120 小时后，高碘酸消耗达一稳定值，平均每摩尔糖基（以半乳糖基计）消耗 0.81mol/l 高碘酸，表明 LPS 可能为多分枝结构。随后将氧化完全的 LPS

进行 Smith 降解反应, 反应过程中采用 pH 计测定 pH 值变化 ($4.27 \rightarrow 3.26$) 和碘化钾测定、用来判断甲酸的生成. 降解产物经乙酰化后用气相层析分析, 结果检出甘油和半乳糖.

从甲基化、高碘酸钠氧化和 Smith 降解结果, 可知 LPS 其主链主要为 $1 \rightarrow 3$ Gal, 其中亦有少量 $1 \rightarrow 6$ 连接方式. 部分糖基 C_6 位带有分枝结构, 侧链之末端为 Glc A.

5. 端基碳的甙键构型分析

LPS 在 IR 光谱中有 894cm^{-1} 特征吸收, 无 840cm^{-1} 吸收峰; 应用 $^1\text{H-NMR}$ 实验、发现端基碳的 δ 值小于 5.0ppm 、两者均证明为 β -型.

6. 不同甙键糖基组成比分析

LPS 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图表明^[10]: 半乳糖中各个碳的化学位移 (ppm) 为 δ_{C-1} (106.6), δ_{C-2} (71.9), δ_{C-3} (84.6), δ_{C-5} (75.3), δ_{C-6} (62.8). 另外 δ 178.5 ppm 为 Glc A 中 C_6 的化学位移. 其中 δ 106.6 ppm 及 δ 84.6 ppm 和 δ 62.8 ppm 分别为 β -($1 \rightarrow 3$)-Gal 和 β -($1 \rightarrow 6$)-Gal 中连接 C_1 及 C_3 和 C_1 及 C_6 的化学位移. 同时还测定了 β -($1 \rightarrow 3$) C_1 与 β -($1 \rightarrow 6$) C_1 的相对峰高度、得到 β -($1 \rightarrow 3$)与 β -($1 \rightarrow 6$)甙键糖基组成比约为 1.83 : 1.

综上所述, LPS 化学结构表征为: 其主体结构由 β -($1 \rightarrow 3$)-D-Gal 构成, 分枝点在 C_6 位. 另有部分 Gal 以 β -($1 \rightarrow 6$) 甙键连接, 分子侧链由 Ara、Rham 和 GlcA 组成, 其中 Glc A 构成分子的末端基. 因此, LPS 是一种具有多层分枝、结构复杂的酸性杂多糖, 见示意图 3.

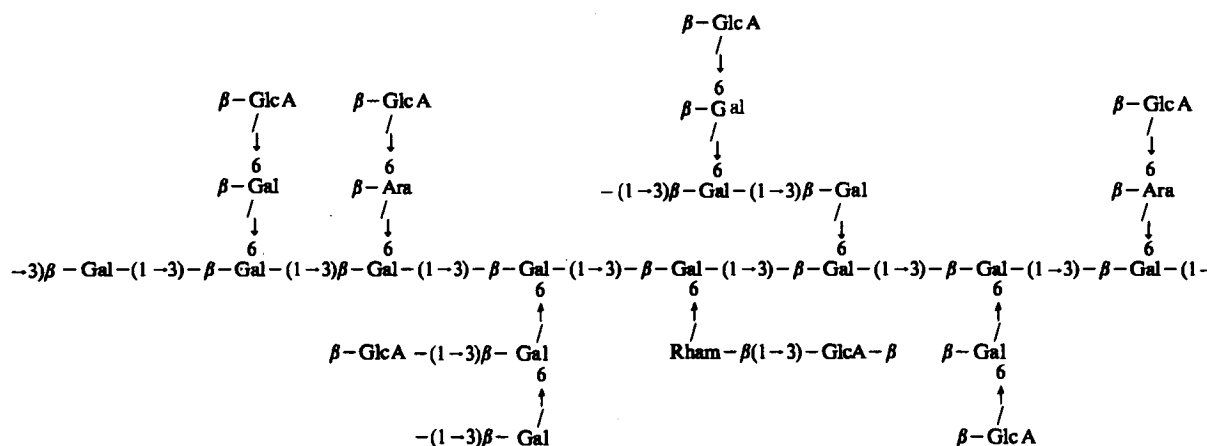


Fig.3 Structural feature of the LPS

参 考 文 献

- [1] 杜予民, 化学通报, 1986, (1), 1
- [2] 杜予民, 高等学校化学学报, 1990, 11 (6), 605
- [3] Klemens, A. S., Ph. D. Purdue University, Major Professor McMillin, D. R., Studies of Rhus Vernicifera Laccase Using Chemical and Physical Methods, 1989, 401pp
- [4] Oshima R., Kumanotani J., Carbohydr. Res., 1984, 127, 43

- [5] Zhang Lina, Du Yumin, Kumanotani Ju, *Chinese J. Polym. Sci.*, **1989**, 7 (3), 252
- [6] Dietrich C. P., McMuffie N. M., Sampaio L. O., *J. Chromatogr.*, **1977**, 130, 299
- [7] Taylor R. N., Conrad H. E., *Biochem. J.*, **1972**, 11 (8), 1383
- [8] 方积年, 多糖的甲基化方法, 国外医学, 药学分册, **1986**, 4, 222
- [9] Aspinall G. O., Ferrier R. J., *Chem. Ind. (London)*, **1957**, 7, 1216
- [10] Breitmaier E., Voelter W., *¹³C-NMR Spectroscopy*, **1978**, 247

STUDIES ON SAPARATION AND STRUCTURE OF LACQUER POLYSACCHARIDE

DU Yumin, KONG Zhenwu, LI Haiping

(*Institute of Resource Development and Applied Science, Wuhan University, Wuhan, 430072*)

ABSTRACT

The lacquer polysaccharide (LPS) was isolation from Sap of lacquer tree (*Rhus Vernicifera*), and purified by 732 cation-exchange resin and Sephadex G-100 column Chromatography. Its monosaccharide components were identified by paper and gas chromatography as following: D-galactose, D-glucuronic acid, L-Arabinose and L-Rhamnose (7.7 : 1.8 : 0.4 : 0.1 by mol). The molecular wieght (Mw) was obtained to be 1.25×10^5 by HPGPC.

The LPS was subjected to reduction of carboxyl groups, mathylation, periodate oxidation and Smith degradation, and then was analyzed by GC-MS, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR. The results showed that LPS consists of a $\beta(1 \rightarrow 3)$ D-galactose main chain with a number of side chains, which consist of glucuronic acid Arabinose and Rhamnose. The side chains place on some of the galactose residues at C₆ position with content ratio of $\beta(1 \rightarrow 3)$ to $\beta(1 \rightarrow 6)$ (1.83 : 1).

Key words Urushi, Lacquer polysaccharide, Chemical structure