

枇杷叶多糖分离纯化及其单糖组成研究

秦春青, 阮家耀, 王瑞宇, 孙培龙, 张安强*

浙江工业大学海洋学院, 浙江 杭州 310014

摘要: 目的 从枇杷 *Eriobotrya japonica* 叶中分离纯化得到枇杷叶多糖, 并对其相对分子质量和单糖组成分析以及结构的初步鉴定。方法 枇杷叶经水提、醇沉、冷冻干燥得到枇杷叶多糖(PEL)组分, 经 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子柱和 Sephacryl S 500 High-Resolution 凝胶柱色谱进行分离纯化得均一组分(PEL60-A)。采用高效液相色谱、气质联用确定其纯度、相对分子质量和单糖组成。结果 枇杷叶多糖 PEL60-A 相对分子质量为 2.69×10^5 ; 单糖组成主要是 L-鼠李糖、L-岩藻糖, 并含有少量 D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖和 D-半乳糖, 其物质的量比为 0.78 : 1.00 : 0.15 : 0.09 : 0.11 : 0.19。结论 研究枇杷叶多糖分离纯化及其单糖组成, 对其结构进行了初步鉴定, 为枇杷叶精细加工提供重要的科学理论依据。

关键词: 枇杷叶多糖; 分离纯化; 理化特征; 气相色谱-质谱法; 单糖组成

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)14-3240-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.008

Isolation and purification of polysaccharides from leaves of *Eriobotrya japonica* and its monosaccharide composition

QIN Chun-qing, RUAN Jia-yao, WANG Rui-yu, SUN Pei-long, ZHANG An-qiang

Ocean College, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: **Objective** To determine the relative molecular weight (M_w), monosaccharide composition, and structures of polysaccharides from the leaves of *Eriobotrya japonica*. **Methods** The polysaccharides (PEL60) were extracted from the leaves of *E. japonica* with hot water, followed by precipitating with ethanol, freezing, and drying. PEL60-A was purified by DEAE-Sepharose Fast Flow ion column and Sephacryl S 500 High-Resolution gel column chromatography from PEL60 of the leaves of *E. japonica*. The purity and molecular weight of PEL60-A was detected by high performance liquid chromatography (HPLC), and the monosaccharide composition and molecular ratio of the PEL60-A was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Results** The PEL60-A, with M_w of 2.69×10^5 . The composition of monosaccharide was mainly L-rhamnose and L-fucose and a small amount of D-xylose, D-mannose, D-glucose, and D-galactose with the molar ratio of 0.78 : 1.00 : 0.15 : 0.09 : 0.11 : 0.19. **Conclusion** The study on isolation, purification, and preliminary identification of monosaccharide composition from leaves of *E. japonica* provided the important scientific theoretical basis for the fine processing of the leaves of *E. japonica*.

Key words: polysaccharide from leaves of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.; isolation and purification; physico-chemical characteristics; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); monosaccharide composition

枇杷叶是蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶, 分布于华南及陕西、甘肃、台湾等地。枇杷树是常绿小乔木, 高约 10 m; 小枝粗壮, 黄褐色, 上有密集棕色或灰棕色绒毛。叶革质, 长 12~30 cm, 宽 3~9 cm, 披针形、倒卵形或椭圆状矩圆形, 前端急尖或渐尖, 基部楔形或渐狭成叶柄, 边缘上部有疏锯齿^[1]。枇杷叶中主要

化学成分为多糖类化合物, 此外还含有挥发油^[2]、三萜酸类^[3-4]、倍半萜类^[5]、黄酮类和多酚类^[6-8]等活性成分。有研究证明^[9-10], 枇杷叶中的枇杷苷、乌苏酸、总三萜酸等均能明显延长因二氧化硫气体导致豚鼠咳嗽的潜伏期, 并且减少咳嗽次数。

枇杷叶多糖是枇杷叶中含量较高也可能是其药理作用的主要有效成分, 不同产地、不同生长期以

收稿日期: 2017-12-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671813); 浙江省自然科学基金资助项目(LY17C200017)

作者简介: 秦春青(1993—), 女, 在读硕士, 主要从事食品功能因子开发研究。E-mail: 1289653753@qq.com

*通信作者 张安强(1974—), 男, 硕士生导师, 副教授, 主要从事食品功能因子开发研究。E-mail: zhanganqiang@zjut.edu.cn

及不同部位多糖含量有差异。近现代实验研究证明其具有提高耐缺氧能力、抗衰老、抗氧化、降血糖、抗肿瘤^[11]和提高免疫力^[12-15]等作用。关于枇杷叶的研究多数集中于三萜酸等成分,而对于枇杷叶多糖的研究主要集中在对其提取工艺的优化及某些成分的活性研究上,对于枇杷叶多糖的分离纯化及单糖组成分析的研究较少。

本实验较为系统地对枇杷叶多糖进行分离纯化及单糖组成分析,得到较高相对分子质量的均一多糖,采用红外光谱(IR)、紫外光谱(UV)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)等方法,对其理化性质和单糖组成进行了分析,确定了枇杷叶多糖的单糖组成和物质的量比以及部分糖残基的构型,为枇杷叶结构鉴定以及精细深加工提供重要的科学理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

枇杷叶为六公分枇杷树 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的落叶,由浙江省林业科学院洪利兴研究员提供并鉴定。

DEAE-Sephacryl S 系列填料购于美国 GE 公司;葡聚糖标准品、单糖标准品、硼氢化钠、二甲基亚砜、碘甲烷购于德国 Sigma 公司;三氟乙酸购于德国 Merck 公司;氯仿、醋酐、甲苯、甲醇、冰醋酸等试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

V-1800PC 型可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;TSKgel G5000PW_{XL} 高效液相色谱柱,日本 TOSOH 公司;Waters1525 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;UV-2450PC 紫外分光光度计,日本岛津公司;Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Nicolet 公司;Finnigan Trace Ultra-DSQ II 气-质联用色谱仪,美国 Thermo 公司。

2 方法

2.1 枇杷叶多糖 PEL60-A 的分离制备

称取 500 g 预处理后干燥的枇杷叶样品,洗净粉碎,按料液比 1:20 加入蒸馏水,反复加热浸提,合并多次提取液,离心,上清液浓缩至适当体积。浓缩液在搅拌下缓缓加入 95%乙醇至乙醇体积分数达 30%,静置过夜,离心;上清液继续加入 95%乙醇至乙醇体积分数达 60%,静置过夜,离心,冷冻干燥,得到粗多糖组分命名为 PEL60^[16]。经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子柱色谱,用蒸馏水和不同

浓度的 NaCl 溶液洗脱,苯酚-硫酸法检测,根据多糖洗脱曲线,收集第一组分,再经 Sephacryl S500 High-Resolution 凝胶柱色谱分离纯化,获得均一组分 PEL60-A。

2.2 PEL60-A 的纯度和相对分子质量测定

取不同相对分子质量(5.0×10^4 、 8.0×10^4 、 1.5×10^5 、 2.7×10^5 、 6.7×10^5 、 1.4×10^6 、 2.0×10^6)的葡聚糖标准品,配成 2 mg/mL 水溶液,过微孔滤膜(直径 50 mm,孔径 0.45 μm)后,进行 HPLC 检测。取纯化后的样品 2 mg,配制成 1 mg/mL 的水溶液,经微孔滤膜(直径 50 mm,孔径 0.45 μm),滤过,按照上述进样条件,测定样品保留时间,通过标准曲线计算样品的相对分子质量。

色谱条件:色谱柱为 TSKgel G5000PW_{XL} 凝胶柱,Waters1525 高效液相色谱仪,Waters2414 示差检测器,进样量 10 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相为蒸馏水,体积流量 1 mL/min。

2.3 多糖样品紫外光谱检测

取纯化后的样品 3 mg,配制成 1 mg/mL 多糖的溶液,置于石英比色皿中,在 200~300 nm 下进行紫外全扫描。

2.4 PEL60-A 红外光谱分析

称取 PEL60-A 样品 2 mg,放入真空干燥器中干燥过夜,用溴化钾压片,在 4 000~400 cm^{-1} 进行红外扫描。

2.5 PEL60-A 的单糖组成分析

精确称取 2 mmol/L *D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-木糖、*L*-岩藻糖、*L*-阿拉伯糖、*L*-鼠李糖和 *D*-甘露糖标准品,分别溶于 3 mL 蒸馏水中,加入 20~30 mg 硼氢化钠(NaBH_4),室温下还原 3 h,用冰乙酸中和过量的 NaBH_4 ,加入 3 mL 甲醇,减压浓缩蒸干,重复 4~5 次,真空干燥过夜。次日加入 4 mL 醋酐,100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h,冷却,加入 3 mL 甲苯,减压浓缩蒸干。将乙酰化的产物用氯仿溶解转移至分液漏斗,加入少量蒸馏水充分震荡,除去上层水溶液,重复 4~5 次。氯仿层加入适量的无水硫酸钠干燥,定容至 10 mL 待 GC-MS 分析。

取 2 mg PEL60-A 样品,放入带盖的梨形旋转蒸发瓶中,加入 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA) 6 mL,110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 2 h。冷却后将水解液在低于 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下减压蒸干,然后加入 3 mL 甲醇蒸干,重复此步骤 4~5 次,以完全除去 TFA^[16-17]。然后按照单糖标准样品乙酰化的方法进行还原、乙酰化,用氯仿

定容至 5 mL, 待 GC-MS 分析。

GC-MS 条件: 色谱柱为 Agilent 7890A 气相色谱仪配备 HP-5 石英毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm); 检测器: 氢火焰离子化检测器(FID); 载气: 高纯氮气。程序升温: 初始柱温 120 °C, 以 15 °C/min 升温至 240 °C, 恒温 6 min, 进样口和检测器温度均为 250 °C; 进样量 2 μL; 分流比 1:50, 空气体积流量 350 mL/min, 氢气体积流量 35 mL/min, 尾吹气体积流量 30 mL/min, 柱内体积流量为 1 mL/min。

利用单糖标准品乙酰化的方法, 分别对各个单糖标准品进行处理, 通过 GC-MS 测定确定每个单糖的保留时间, 然后对各单糖的混合标准品以相同的方法乙酰化处理, 再经 GC-MS 测定, 重复进样 6 次, 计算 RSD₁。同样的方法平行处理 6 组单糖标准品样品, GC-MS 测定, 计算 RSD₂。根据平行处理的混合标准品 GC 色谱图中各单糖组分的峰面积, 利用面积归一法计算各组分的峰面积平均百分含量, 建立了每个单糖组分相对于仪器的响应因子, 再利用等摩尔标准样品的百分比就可以计算出样品中各单糖组分的摩尔比。

3 结果与分析

3.1 PEL60-A 的分离制备

PEL60 经离子柱 DEAE Sepharose Fast Flow 色谱, 分别用蒸馏水和不同浓度梯度 NaCl 溶液依次洗脱, 苯酚-硫酸法检测。根据图 1 的 2 个洗脱峰, 0.2 mol/mL NaCl 溶液的洗脱峰位峰形较好, 收集得到粗品, 并命名为 PEL60-0.2, 将洗脱液浓缩冻干进行凝胶柱色谱纯化。

PEL60-0.2 先经 SephacrylG-25 色谱脱盐, 再经 Sephacryl S 500 凝胶柱色谱分离纯化, 苯酚-硫酸法

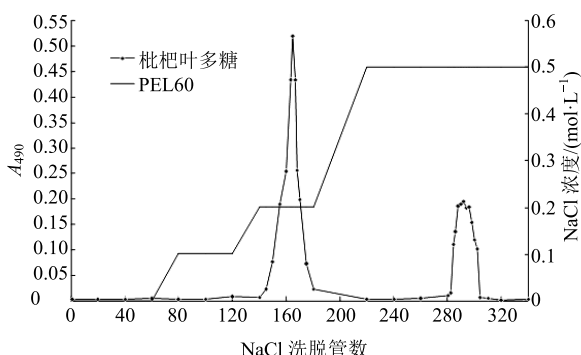


图 1 PEL60 的离子柱色谱

Fig. 1 Elution of PEL60 by DEAE-sepharose fast flow ion column chromatography

检测, 根据图 2 洗脱曲线收集相应组分, 浓缩冻干得 PEL60-A 纯品组分。

3.2 多糖的纯度和相对分子质量测定

依据已知相对分子质量的葡聚糖标准品绘制 TSKgel G5000PW_{XL} 色谱柱的标准曲线, 以保留时间为横坐标(X), 相对分子质量对数为纵坐标(Y), 回归方程为 $Y = -0.391X + 8.144$, $R^2 = 0.994$ 。

由 PEL60-A 的 HPLC 色谱图(图 3)可知, PEL60-A 峰形基本对称, 其经过 S-500 凝胶柱色谱纯化后为均一多糖组分。通过上述回归方程根据组分的保留时间, 计算纯品 PEL60-A 的平均相对分子质量为 2.69×10^5 。

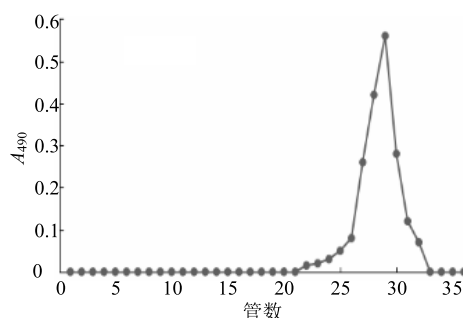


图 2 PEL60-A Sephacryl S-500 色谱洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of PEL60-A by Sephacryl S-500 column chromatography

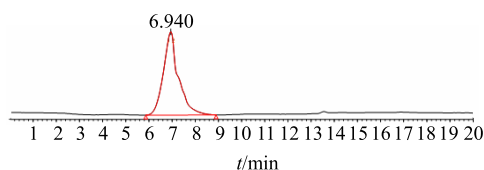


图 3 PEL60-A 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of PEL60-A

3.3 PEL60-A 紫外光谱分析

PEL60-A 紫外全扫描结果(图 4)表明, PEL60-A 在 280 和 260 nm 处均无吸收峰, 在 205 nm 左右具有强的吸收峰, 说明 PEL60-A 不含蛋白质和核酸等杂质。

3.4 PEL60-A 红外光谱分析

由 PEL60-A 组分的红外光谱(图 5)可知, 3 600~3 200 cm^{-1} 有强的-OH 伸缩振动峰; 2 925 cm^{-1} 是 CH_3 、 CH_2 的伸缩振动吸收峰; 在 1 572 cm^{-1} 处为 C=O 的非对称的伸缩振动峰; 在 1 413 cm^{-1} 处为 C-H 变角振动, 1 745~1 700 cm^{-1} 附近无吸收峰, 说明其不含羰基和糖醛酸; 1 045、897、651、621 cm^{-1} 处有吸收峰为吡喃型糖环特征。896 cm^{-1} 处有吸收

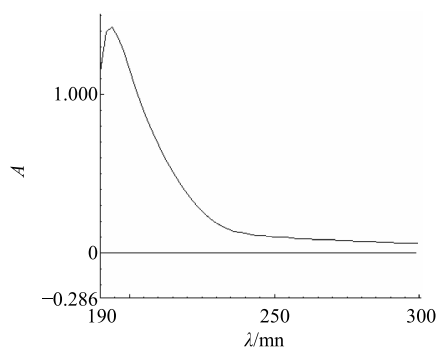


图 4 PEL 60-A 紫外全扫描光谱图
Fig. 4 UV scanning spectrogram of PEL60-A

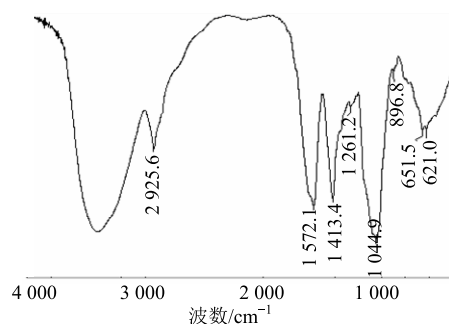


图 5 PEL60-A 的红外光谱图
Fig. 5 IR spectrum of PEL60-A

峰表明该多糖组分残基含有 β -构型多糖。

3.5 PEL60-A GC-MS 分析

由单糖混合标准品的 GC-MS 谱图(图 6)可知,混合标准品中 7 种单糖出峰顺序依次为 *L*-鼠李糖、*L*-阿拉伯糖、*L*-岩藻糖、*D*-木糖、*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖和 *D*-半乳糖,出峰时间及其峰面积平均百分含量和 RSD 见表 1。样品单糖组成的 GC-MS 见图 7。由表 1 可知混合标准品样品重复进样 6 次,其相对标准偏差 RSD_1 和平行处理 7 个单标样品的相对标准偏差 RSD_2 都小于 5%,表明该乙酰化方法是可行的。根据平行处理的 6 种混合标准品的峰面积平均

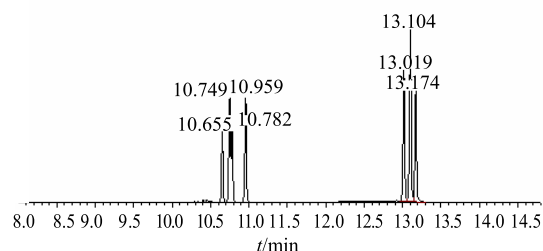


图 6 单糖混合标准品中单糖的总离子流图谱
Fig. 6 Total ion chromatogram of monosaccharides in standard samples

表 1 单糖标准品的 GC-MS 结果与分析

Table 1 Results and analysis of monosaccharides in standard samples

标准单糖	t_R/min	$RSD_1/\%$	$RSD_2/\%$	峰面积百分含量/%	响应因子
<i>L</i> -鼠李糖	10.655	0.74	0.99	8.26	0.54
<i>L</i> -阿拉伯糖	10.749	1.00	1.05	13.09	0.86
<i>L</i> -岩藻糖	10.782	1.06	1.77	9.14	0.60
<i>D</i> -木糖	10.959	1.26	2.22	13.09	0.86
<i>D</i> -甘露糖	13.019	1.25	1.07	16.31	1.07
<i>D</i> -葡萄糖	13.104	1.33	2.11	23.39	1.54
<i>D</i> -半乳糖	13.174	1.35	0.53	15.15	1.00

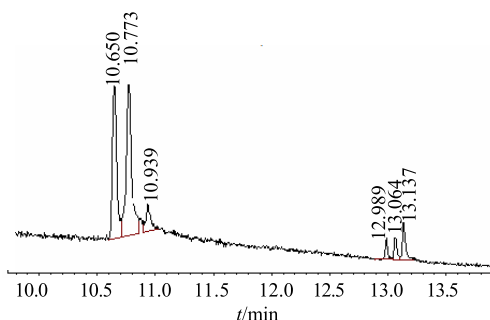


图 7 PEL60-A 的总离子流图谱
Fig. 7 Total ion chromatogram of PEL60-A

百分含量,建立了每个单糖组分相对于仪器的响应因子,比例见表 1。

根据图 7 所示,得出 PEL60-A 组分的各单糖组成和物质的量比见表 2。由表 2 可见,根据样品出峰的保留时间以及各峰的碎片离子峰得到枇杷叶多糖 PEL60-A 主要由 *L*-鼠李糖和 *L*-岩藻糖组成,并含有少量 *D*-木糖、*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖和 *D*-半乳糖,根据出峰时间和峰面积平均百分含量得出其物质的量比为 0.78 : 1.00 : 0.15 : 0.09 : 0.11 : 0.19。

4 讨论

枇杷叶粗多糖经离子柱 DEAE Sepharose Fast

表 2 PEL60-A 的 GC-MS 分析

Table 2 Results and analysis of PEL60-A by GC-MS

标准单糖样品	t_R/min	平均百分含量/%	物质的量比
L-鼠李糖	10.650	18.928	0.78
L-岩藻糖	10.773	26.933	1.00
D-木糖	10.939	5.572	0.15
D-甘露糖	12.989	4.322	0.09
D-葡萄糖	13.064	7.225	0.11
D-半乳糖	13.137	8.350	0.19

Flow 洗脱和 Sephacryl S 500 凝胶柱分离纯化得 PEL60-A 纯品组分, 对纯品 PEL60-A 多糖组分进行化学结构研究, 通过 HPLC 看出 PEL60-A 为单一对称峰形即为均一多糖, 其相对分子质量为 2.69×10^5 ; 紫外检测出不含蛋白质和核酸等杂质, 为单纯多糖组分, 红外谱图得出 PEL60-A 组分不含羰基和糖醛酸, 为中性多糖; 乙酰化结果得出 PEL60-A 的单糖组成主要由 L-鼠李糖和 L-岩藻糖组成, 并含有少量 D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖和 D-半乳糖, 通过峰面积归一法算出面积百分比, 然后根据响应因子计算得出其物质的量比为 0.78 : 1.00 : 0.15 : 0.09 : 0.11 : 0.19。有关该组分的详细结构分析还有待进一步深入开展。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草·精选本 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 台琪瑞, 徐 熹, 郭伟琳. 枇杷叶挥发油的气相色谱-质谱联用分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(3): 206-208.
- [3] 蔡雪萍, 李松林, 华俊磊, 等. HPLC-ELSD 同时测定枇杷叶中 6 种三萜酸成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 84-87.
- [4] 葛金芳, 李 俊, 金 涌, 等. 枇杷叶三萜酸的镇咳祛痰平喘作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2006, 41(4): 413-416.
- [5] 陈 剑, 李维林, 吴菊兰, 等. 枇杷叶的化学成分 [J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(4): 67-68.
- [6] De T N, De S F, Cirino G, *et al.* Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica* [J]. *Planta Med*, 1991, 57(5): 414-416.
- [7] Ito H, Kobayashi E, Li S H, *et al.* Megastigmane glycosides and an acylated triterpenoid from *Eriobotrya japonica* [J]. *J Nat Prods*, 2001, 64(6): 737-740.
- [8] 杨桂福. 枇杷叶黄酮对油脂的抗氧化性能研究 [J]. 黑龙江医药, 2009, 22(2): 150-152.
- [9] Ito H, Kobayashi E, Takamatsu Y, *et al.* Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(5): 687-693.
- [10] Uto T, Sakamoto A, Tung N H, *et al.* Anti-proliferative activities and apoptosis induction by triterpenes derived from *Eriobotrya japonica* in human leukemia cell lines [J]. *Inter J Molecular Sci*, 2013, 14(2): 4106-4120.
- [11] 远 一. 枇杷叶中含有抗癌成分 [J]. 世界农业, 2002, 12: 52.
- [12] Li J, Ji L, Sun L, *et al.* Analysis of *Herba Asari* polysaccharides and their immunological activity [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 551-556.
- [13] Zhang Y, Li S, Wang X, *et al.* Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2): 196-206.
- [14] Yang L Q, Zhang L M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 40(33): 349-361.
- [15] Chen Y J, Cheng P C, Lin C N, *et al.* Polysaccharides from *Antrodia camphorata* mycelia extracts possess immunomodulatory activity and inhibits infection of *Schistosoma mansoni* [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2008, 8(3): 458-467.
- [16] 张安强. 猴头菌子实体多糖的分离纯化、结构鉴定、结构修饰和生物活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [17] 葛 青, 张安强, 孙培龙. 桑黄子实体多糖的分离纯化及单糖组成研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(9): 291-294.