

归芪多糖 AAP-2A 的结构特征研究

蒲秀瑛*, 马小龙, 刘璐, 任菁, 樊文博, 张伟杰, 李晓玥, 李海兵

兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 分离纯化归芪多糖 AAP-2A, 并对其结构特征进行研究。方法 采用水提醇沉法提取归芪多糖 (AAP), 通过 Sevag 法脱除蛋白, DEAE-52 纤维素柱色谱, 葡聚糖凝胶柱色谱纯化等手段, 得到 1 种新的归芪多糖 AAP-2A。使用苯酚硫酸法测定了 AAP-2A 的含糖量, 色谱技术检测了多糖紫外及红外性质、相对分子质量、绝对分子质量、分子构象及相对分子质量分布、单糖组成及其摩尔比值等特征。采用甲基化法和 NMR 法研究了 AAP-2A 的连接方式、主链和支链结构及分支点特征。结果 AAP-2A 总糖量为 98.98%, 且不含核酸及蛋白质, 红外吸收光谱分析表明 AAP-2A 有明显的多糖特征吸收, AAP-2A 的相对分子质量大于 6.68×10^5 , 绝对分子质量为 2.252×10^6 , 由鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖组成, 其物质的量比依次为 1 : 2.13 : 3.22 : 6.18。主链骨架由 1,3- α -L-鼠李糖, 1,3- β -D-半乳糖, 1,3-, 1,5-, 1,3,5- α -L-阿拉伯糖和 1,4-, 1,4,6- α -D-葡萄糖组成, 侧链分支点位于阿拉伯糖的 3 位和葡萄糖的 4 位, 侧链分支由 1 位连接的 α -D-葡萄糖组成。结论 AAP-2A 为一种新的中性归芪杂多糖, 其构象呈高度支化状。

关键词: 当归; 黄芪; 归芪多糖; 中性多糖; 结构特征

中图分类号: R284.18 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2689-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.005

Structural characterization of Guiqi polysaccharides AAP-2A

PU Xiu-ying, MA Xiao-long, LIU Lu, REN Jing, FAN Wen-bo, ZHANG Wei-jie, LI Xiao-yue, LI Hai-bing

College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To isolate the Guiqi (*Angelicae Sinensis Radix* and *Astragali Radix*) polysaccharides (AAP) and study the structural characterization of AAP-2A. **Methods** Hot water extracting and ethanol precipitating method was employed to isolate the AAP. A new fraction (AAP-2A) of AAP was obtained after AAP was purified by deproteinization, gel chromatography on DEAE-52 cellulose, gel chromatography on Sephadex G-100, and other means. Sugar content of AAP-2A was determined using phenol sulfuric acid method. Chromatography techniques were used to determine the ultraviolet properties, infrared properties, relative molecular weight, absolute molecular weight, molecular conformation and molecular weight distribution, and monosaccharide composition with the molar ratio of AAP-2A. The connection, main chain and branched-chain structures, and the condition of branching point were studied by methylation and NMR methods. **Results** The total sugar content of AAP-2A, which was absent of proteins and nucleic acids, was 98.98%. Infrared spectroscopy showed that AAP-2A had the typical signals of polysaccharides. The relative and absolute molecular weights of AAP-2A were above 6.68×10^5 and 2.252×10^6 ; AAP-2A was a neutral sugar and composed of rhamnose (Rha), galactose (Gal), arabinose (Ara), and glucose (Glc) with a molar ratio of 1 : 2.13 : 3.22 : 6.18. AAP-2A proved to be a heteropolysaccharide, with 1, 3- α -L-Rha, 1,3- β -D-Gal, 1,3-, 1,5-, and 1,3,5- α -L-Ara, 1,4- and 1,4,6- α -D-Glc residues in backbone and 1- α -D-Glcp residues in branches. **Conclusion** AAP-2A is a new neutral heteropolysaccharide from Guiqi polysaccharides with a highly branched conformation.

Key words: *Angelicae Sinensis Radix*; *Astragali Radix*; Guiqi polysaccharides; neutral heteropolysaccharide; structural characterization

当归 *Angelicae Sinensis Radix* 为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 是临床常用药, 一般认为其味辛, 而性微温, 归心、肝、

脾三经, 其主要药理成分为当归多糖, 现代药理学研究证明当归多糖具有补血、抗菌、抗肿瘤、抗辐射、免疫调节、抗氧化等作用^[1]。黄芪 *Astragali Radix*

收稿日期: 2015-03-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260070)

*通信作者 蒲秀瑛 Tel: 13919262876 E-mail: puh102@163.com

是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或荚膜黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,其主要活性成分黄芪多糖具有提高免疫力、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化和延缓衰老之功能^[2]。

“当归补血汤”是中国古老的方剂之一,作为补血的经典方剂而被使用了几个世纪。该方剂是以当归和黄芪用量 1:5 混合水煎而成,其具有广泛的药理作用,如抗氧化、免疫刺激、保护肝脏损害等^[3]。归芪多糖是按照当归补血汤,将当归、黄芪以特定比例(1:5)混合水煎提取出的多糖,目前对于归芪多糖的研究,均以药理活性为主,本实验室前期研究证明归芪多糖的抗氧化活性优于当归多糖和黄芪多糖^[4],但对其分离纯化,以及纯化后多糖的结构特征和药理活性等相关研究还很不足。为了更加深入了解和合理开发归芪多糖,本实验从归芪多糖中分离纯化得到一种多糖成分 AAP-2A,并利用红外光谱、紫外光谱、高效凝胶渗透色谱、凝胶渗透色谱-多角度激光散射联用、气相色谱、甲基化、核磁共振等方法,对其理化性质及结构特征进行了探讨。

1 材料与仪器

BP211D 型与 BS224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);UV-1700 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);KQ-3200DE 超声波仪器(江苏昆山公司);BT100N 数显恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);CR22GII 离心机(日本日立);Freezone 6PWS 型真空冷冻干燥仪(美国 LABCONCO);Dawn HeleosII 型十八角度激光散射仪(美国怀雅特技术公司);Waters 600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);UltrasphereTM 1000、500 色谱柱(美国 Waters 公司);GC 2014 型气相色谱仪(日本岛津公司);QP2010 GC-MS 仪(日本岛津公司);OV-101 毛细管色谱柱(兰州中科安泰分析科技有限责任公司);600 MHz Inova 600 NB 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)。

标准单糖:鼠李糖(Rha,批号 111683-200401)、阿拉伯糖(Ala,批号 111506-200001)、木糖(Xyl,批号 111508-200404)、甘露糖(Man,批号 140651-200602)、葡萄糖(Glc,批号 110833-200904)、半乳糖(Gal,批号 100226-201105)、葡萄糖醛酸(GluA,批号 140648-200602)、半乳糖醛酸(GalA,批号

111646-200301)均购于中国食品药品检定研究院;右旋糖酐(dextran)对照品(相对分子质量分别为 668 000、410 000、273 000、148 000、48 600、23 800、11 600、5 200),批号 SDKC-600-200903,购于美国 PSS 公司。其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 归芪多糖的提取与分离纯化

将当归与黄芪的混合物(1:5)以 10 倍量(体积质量比)80%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h;滤过得药渣。药渣中加入一定量的蒸馏水,加热回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,减压浓缩后加适量 95%乙醇,使乙醇终体积分数为 80%,静置过夜,抽滤,得归芪多糖浸膏。浸膏用 Sevag 法除蛋白^[5],H₂O₂ 除色素后再醇沉,沉淀物依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,真空干燥得归芪粗多糖 AAP。

AAP 经 DEAE-52 柱色谱,以纯水及 0.1、0.3 mol/L 的 NaCl 梯度洗脱得到 3 个均一组分 AAP-1、AAP-2、AAP-3。AAP-2 经 Sephadex G-100 柱色谱,NaAc-HAc 缓冲液洗脱,得到 2 个均一组分 AAP-2A 和 AAP-2B。AAP-2A 经浓缩,醇沉,真空干燥得白色粉末,此粉末易溶于水,不溶于 DMSO、乙醇等有机溶剂。

2.2 总糖量的测定

以葡萄糖为标准对照,采用苯酚硫酸法测定 AAP-2A 的总糖量^[6]。

2.3 紫外、红外光谱分析

紫外光谱:以 1 mg/mL 的 AAP-2A 溶液在 200~400 nm 内扫描。红外光谱:取 2~3 mg AAP-2A 样品,以 KBr 压片,测其红外光谱吸收^[7]。

2.4 相对分子质量、绝对分子质量、分子构象及分子质量分布测定

采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC),取 AAP-2A 样品溶于蒸馏水中,配成 3 mg/mL 的溶液进样,流动相为蒸馏水,色谱柱为凝胶渗透色谱柱 UltrasphereTM 1000、500 串联,体积流量 0.8 mL/min,柱温为 30 °C。相对分子质量测定时将相对分子质量分别为 5 200、11 600、23 800、48 600、148 000、273 000、410 000、668 000 的右旋糖酐标准品用流动相配成质量浓度为 0.5 mg/mL 的水溶液,按相对分子质量由小到大顺序依次分别进样,测定保留时间(*t*)。以 *t* 对相对分子质量对数(lg*M_w*)绘制标准曲线,计算 AAP-2A 的相对分子质量。

采用凝胶渗透色谱与光散射仪(GPC-MALLS)

联用法, 流动相为 0.1 mol/L NaNO_3 与质量分数为 0.02% NaN_3 的混合溶液, 示差折光检测器温度为 35 $^{\circ}\text{C}$, 测定 AAP-2A 的绝对分子质量和分子构象及相对分子质量分布。

2.5 单糖组成分析^[8]

取 10 mg AAP-2A, 加 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 2.0 mL 置于特弗伦管中, 封管后 120 $^{\circ}\text{C}$ 水解 3 h, 冷却后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋蒸除去 TFA, 加入 1.5 mL 甲醇溶解, 减压蒸干, 重复 3 次, 除尽 TFA。向已水解的样品中加入 10 mg 盐酸羟胺、7 mg 内标肌醇六乙酯、0.5 mL 吡啶, 置烘箱中 90 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 30 min。取出后冷至室温, 加入 0.5 mL 醋酸酐, 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下继续反应 30 min (乙酰化)。反应产物减压蒸干, 溶于 1.0 mL 氯仿中, 进行 GC 分析。取各单糖对照品适量, 按上述步骤乙酰化后进行 GC 分析。

2.6 甲基化分析

AAP-2A 5 mg 充分干燥, 溶于 DMSO, 用改良的 Hakomori 法甲基化^[9], 经 IR 分析无羟基后, 水解, 还原, 乙酰化后进行 GC-MS 分析。

2.7 NMR 分析

精密称取充分干燥的 AAP-2A 15 mg, 溶于 0.5 mL 重水中, 冷冻干燥, 如此重复用重水交换 3 次, 再溶于 0.5 mL 重水后, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过后在 Bruker DRX-600 核磁共振光谱仪上进行 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 分析。 ^1H - ^1H COSY、HMQC 和 HMBC 相关谱在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下进行测定^[10]。

3 结果与讨论

3.1 AAP-2A 的分离纯化

归芪粗多糖 AAP 经 DEAE-52 纤维素柱色谱分离, AAP-2 经 Sephadex G-100 排阻色谱分离, 得白色絮状归芪多糖 AAP-2A; 得率为 1.85%, 含糖量为 98.8%。经过 HPGPC 检测, AAP-2A 呈单一对称峰。说明 AAP-2A 为含糖量较高的均一多糖。

3.2 紫外、红外光谱分析

在紫外光谱图 (图 1) 中, 260 和 280 nm 处无蛋白、核酸吸收峰, 表明多糖中无蛋白、多肽及核酸的存在。

红外光谱图 (图 2) 显示出了明显的多糖特征吸收峰。在 3 403.16、2 919.60、1 633.62、1 423.72、1 076.28、614.23 cm^{-1} 等处均有多糖的特征吸收, 3 403.16 cm^{-1} 处吸收峰主要是由多糖的配糖体羟基 (缔合) 伸缩振动引起的; 2 919.60 cm^{-1} 处的吸收峰与碳氢键的伸缩振动相对应; 1 633.62 cm^{-1}

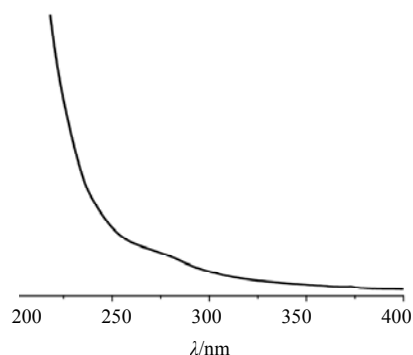


图 1 AAP-2A 紫外光谱图

Fig. 1 UV spectrum of AAP-2A

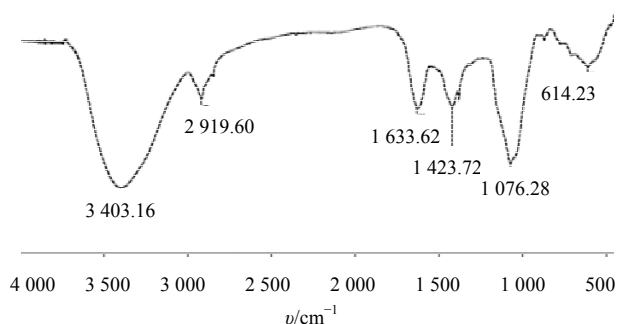


图 2 AAP-2A 红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectrum of AAP-2A

处的吸收峰为葡萄糖的特征吸收, 1 076.28 cm^{-1} 处的吸收峰为碳氧碳键的特征吸收, 614.23 cm^{-1} 处吸收峰为吡喃糖的特征吸收, 提示多糖中可能有吡喃糖存在。

3.3 AAP-2A 相对分子质量、绝对分子质量、分子构象及分子质量分布

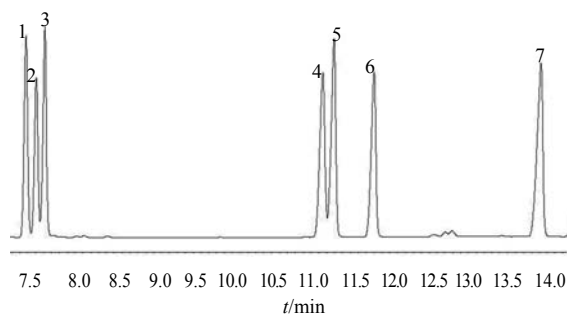
以右旋糖酐系列标准葡聚糖的保留时间 (t) 为横坐标和相对分子质量的对数 ($\lg M_w$) 为纵坐标计算得回归方程为 $\lg M_w = 25.8 - 4.79 t + 0.401 t^2 - 0.011 t^3$ ($r^2 = 0.9838$), 求得 AAP-2A 相对分子质量大于 6.68×10^5 。

采用激光检测器记录供试品质量浓度和供试品在不同角度的光散射强度, 通过多角度激光散射仪自带 ASTRAY 软件计算得到 AAP-2A 的绝对分子质量为 2.252×10^6 ; 以旋转均方根半径对摩尔质量作图, 图像呈马蹄形, 说明 AAP-2A 的分子构象呈高度支化; 通过激光检测器和多角度激光散射仪自带的软件计算 AAP-2A 的数均分子量 (M_n), 最终得出分布指数 $d = M_w/M_n = 1.038$, 接近 1.00, 证明 AAP-2A 分子质量分布呈单分散性, 即表明摩尔质

量分布范围较集中, 分子大小较均一。

3.4 单糖组成分析

AAP-2A 经 GC 分析后, 用面积归一化法得 AAP-2A 的单糖组成及其比例为 Rha-Gal-Ara-Glc (1 : 2.13 : 3.22 : 6.18)。色谱图见图 3 和 4。



1-鼠李糖 2-阿拉伯糖 3-木糖 4-甘露糖 5-葡萄糖 6-半乳糖
7-内标, 下图同
1-Rha 2-Ara 3-Xyl 4-Man 5-Glc 6-Gal 7-internal standard,
same as below

图3 混合单糖对照品的气相色谱图

Fig. 3 GC of mixed monose reference substances

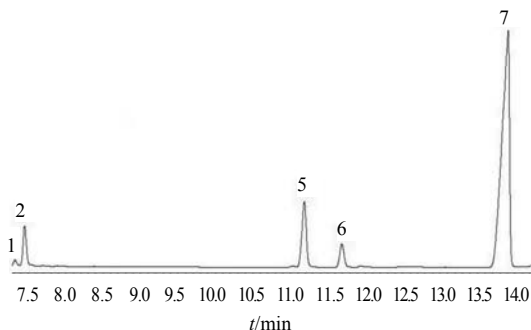


图4 AAP-2A 的气相色谱图

Fig. 4 GC of AAP-2A

3.5 甲基化分析

根据 Hakomori 法甲基化 3 次后, 进行红外光谱检测, 在 $3\ 600\sim 3\ 300\text{ cm}^{-1}$ 处没有 -OH 的特征吸收峰, 说明样品甲基化完全。对乙酰化产物进行 GC-MS 分析, 结果见表 1。表 1 中鼠李糖连接方式、半乳糖连接方式、阿拉伯糖连接方式、葡萄糖连接方式的摩尔比总和为 1.01 : 2.06 : 3.21 : 6.07, 与气相色谱结论 (1 : 2.13 : 3.22 : 6.18) 基本一致, 说明 AAP-2A 结构中最多的单糖残基为葡萄糖。

3.6 核磁数据分析

多糖 AAP-2A 经过 D_2O 氘化后进行 1D 和 2D 的核磁共振波谱分析。

表 1 AAP-2A 甲基化结果

Table 1 Methylation results of AAP-2A

部分甲基化的糖基	摩尔比	糖基连接方式
2,4-di-O-Me-Rha	1.01	→3) Rhap (1→
2,4,6-tri-O-Me-Gal	2.06	→3) Galp (1→
2,5-di-O-Me-Ara	1.07	→3) Araf (1→
2,3-di-O-Me-Ara	1.08	→5) Araf (1→
2-O-Me-Ara	1.06	→3,5) Araf (1→
2,3,4,6-tetra-O-Me-Glc	3.07	Glc p (1→
2,3,6-tri-O-Me-Glc	1.02	→4) Glcp (1→
2,3-di-O-Me-Glc	1.98	→4,6) Glcp (1→

α -L-鼠李糖的确定: 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中, H-1/H-2 有较小的耦合常数 ($J_{\text{H-1},2}$), H-3/H-4 ($J_{\text{H-3},4} = 7.5\text{ Hz}$) 和 H-4/H-5 ($J_{\text{H-4},5} = 10.0\text{ Hz}$) 有较大的耦合常数, 表明残基是甘露糖构型^[11-12]。在 NOESY 中 H-1/H-2 有交叉峰, 这两者都表明残基是 α 构型^[13]。H-6 的化学位移 $\delta\ 1.25$ 是鼠李糖 C-6 位甲基质子信号^[14]。由以上结果推断此残基为 →3)- α -L-Rhap (1→。

β -D-半乳糖的确定: 异头氢的化学位移在 $\delta\ 4.6$, 并且耦合常数较大 ($J_{\text{H-1},2} = 8.4\text{ Hz}$), H-1 有裂分, 表明残基是 β 构型^[15]。在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中, $J_{\text{H-3},4}$ 小于 3.0 Hz , 说明残基是半乳糖^[16]。综上分析, 此残基为 →3)- β -D-Galp (1→。

→1,3)- α -L-阿拉伯糖的确定: 异头氢的化学位移在 $\delta\ 5.2$, 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中, $J_{\text{H-1},2}$ 小于 2.0 Hz , C-5 化学位移为 $\delta\ 65.8$, 在 $\delta\ 63\sim 67$, 证明残基为阿拉伯糖。与文献值^[17]比较, C-3 化学位移向低场偏移。说明残基为 →3)- α -L-Araf (1→。

→1,5)- α -L-阿拉伯糖的确定: 异头氢的化学位移为 $\delta\ 5.1$, 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中, $J_{\text{H-1},2}$ 小于 2.0 Hz , 在 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 谱与 NOESY 谱中没有与 H-6 相关的信号, 说明残基为阿拉伯糖。参照文献报道^[18-19], C-5 的化学位移向低场偏移。通过以上信息可判断残基为 →5)- α -L-Araf (1→。

→1,3,5)- α -L-阿拉伯糖的确定: 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中, $J_{\text{H-1},2}$ 小于 2.0 Hz , C-5 化学位移为 $\delta\ 69.5$, 证明残基为阿拉伯呋喃糖, 大于 $\delta\ 67$, 说明在 C-5 位有取代。与文献值^[18-19]比较 C-3 化学位移向低场偏移, 可知此残基为 →3,5)- α -L-Araf (1→。

端基 α -D-葡萄糖的确定: 异头氢的化学位移在

δ 5.30、 $J_{H-1,2}$ 小于 3.0 Hz, $J_{C-1,H-1} = 171$ Hz, 以及在 NOESY 中有 H-1/H-2 的交叉峰, 表明残基是 α 构型。H-2/3 和 H-3/4 均有较大的耦合常数 (9.0~10.0 Hz), 可以确定残基是葡萄糖。在 NOESY 和 HMBC 谱中, 没有与除 H-1 外其他氢有相交的键间连接点, 表明残基是端基 α -D-Glcp^[11,20]。

→1,4)- α -D-葡萄糖的确定: 残基异头氢的化学位移在 5.0, $J_{H-1,2}$ 的耦合常数非常小, 且 $J_{H-1,C-1} = 170$ Hz, 表明残基为 α 构型。H-2/H-3 和 H-3/H-4 均有较大的耦合常数 ($J = 10.0$ Hz), 说明残基是葡萄糖。与参考文献相比^[21-22], 残基上的 C-4 向低场发生了偏移。说明此残基为 →4)- α -D-Glcp (1→)。

→1,4,6)- α -D-葡萄糖的确定: 在 ¹H-NMR 谱中, H-1 化学位移为 δ 5.0, 为单峰 ($J_{H-1,2}$ 小于 3.0 Hz), 在 NOESY 谱中 H-1/H-2 有交叉峰, 说明残基是 α 构型。 $J_{H-2,3}$ (8.5 Hz) 和 $J_{H-3,4}$ (10.0 Hz) 有较大的耦合常数, 确定残基为葡萄糖。与参考文献相比^[21-22], H-4

与 H-6 化学位移向低场偏移。综合分析, 此残基为 →4,6)- α -D-Glcp (1→)。

根据分析结果, 将 8 种糖残基的 ¹H 与 ¹³C-NMR 谱的信号进行全归属, 见表 2。各单糖残基的连接方式可以从 NOESY 谱 (表 3) 中得出。

由甲基化分析结果, 可以推出糖残基 A、B、C、D、E、F、G 和 H 的摩尔比大约是 1:2:1:1:1:3:1:1。综合以上分析结果, 推出 AAP-2A 一级结构的重复单元见图 5。

4 讨论

由于相对分子质量和绝对分子质量测定时溶剂使用的是葡聚糖的对照品, 而 AAP-2A 是由 8 种单糖组成的杂多糖, 两者结构差异较大, 系统不同, 多糖伸展和皱缩的程度不同。多糖在水中呈伸展状态, 在盐溶液中呈皱缩状态, 后者的分子半径变小, 在通过凝胶色谱柱时后出峰, 从而导致相对分子质量测定结果不一致。另外, 测定相对分子质量时使

表 2 AAP-2A 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 化学位移
Table 2 ¹H-NMR and ¹³C-NMR chemical shifts of AAP-2A

糖残基	δ					
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
→3)- α -L-Rhap (1→ (A)	5.01/103.2	4.33/70.9	4.00/81.0	3.54/72.0	3.83/69.5	1.25/-
→3)- β -D-Galp (1→ (B)	4.41/102.8	3.77/69.3	3.94/83.8	4.03/68.4	3.57/76.0	3.67/60.8
→3)- α -L-Araf (1→ (C)	5.16/106.2	4.20/81.2	3.91/76.7	3.95/83.9	3.85/3.76/65.8	-/-
→5)- α -L-Araf (1→ (D)	5.06/106.7	4.24/83.5	3.91/76.7	4.39/82.1	3.79/3.70/66.5	-/-
→3,5)- α -L-Araf (1→ (E)	5.15/109.2	4.21/81.2	4.03/83.5	3.95/84.0	3.94/3.86/69.5	-/-
α -D-Glcp (1→ (F)	5.30/99.6	3.55/72.3	3.84/73.4	3.60/76.7	3.64/70.1	3.72/3.64/61.4
→4)- α -D-Glcp (1→ (G)	5.00/98.8	3.46/72.7	3.62/73.1	3.44/70.7	3.83/69.6	3.85/3.70/65.5
→4,6)- α -D-Glcp (1→ (H)	5.02/98.8	3.55/69.8	3.57/72.4	3.60/76.0	3.93/69.3	3.84/3.57/69.6

表 3 NOESY 谱中各残基的连接方式
Table 3 Connection mode of each residue observed in NOESY spectrum

糖残基	NOESY		
	H	与其他残基 H 内部效应	与其他残基 H 外部效应
→3)- α -L-Rhap (1→ (A)	H-1	A: H-2, H-3	G: H-4
→3)- β -D-Galp (1→ (B)	H-1	B: H-3, H-4	E: H-5, H-6a/b
→3)- α -L-Araf (1→ (C)	H-1	C: H-2, H-4	B: H-3
→5)- α -L-Araf (1→ (D)	H-1	D: H-2, H-4	B: H-3
→3,5)- α -L-Araf (1→ (E)	H-1	E: H-2, H-3	A: H-3
α -D-Glcp (1→ (F)	H-1	F: H-2, H-4	E: H-3, H-4
→4)- α -D-Glcp (1→ (G)	H-1	G: H-2, H-3	C: H-3
→4,6)- α -D-Glcp (1→ (H)	H-1	H: H-2, H-3	D: H-5, H-6a/b

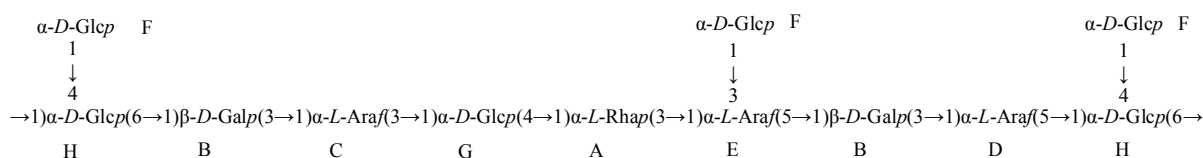


图5 AAP-2A 一级结构的重复单元

Fig. 5 Structure of repetitive unit of AAP-2A primary structure

用的是葡聚糖的对照品,而 AAP-2A 是由 8 种单糖组成的杂多糖,两者结构差异较大,推测 AAP-2A 的分支较多,分子半径较大,所以出峰时间较靠前,导致测定的相对分子质量与绝对分子质量相差较大,此推论在甲基化与核磁的结果中得到印证。

综上所述, AAP-2A 主链骨架由 1,3- α -L-鼠李糖, 1,3- β -D-半乳糖, 1,3、1,5、1,3,5- α -L-阿拉伯糖和 1,4、1,4,6- α -D-葡萄糖组成,侧链分支点位于阿拉伯糖的 3 位和葡萄糖的 4 位,侧链分支由 1 位连接的 α -D-葡萄糖组成。AAP-2A 为一种新的中性杂多糖,其构象呈高度支化状,并且具有单分散性,即表明摩尔质量分布范围较集中,分子大小较均一。体外抗氧化活性研究表明, AAP-2A 的抗氧化活性强于归芪粗多糖 AAP,其作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 孙红国, 张 蔓, 纪 鹏, 等. 当归多糖的分离、纯化及单糖成分分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(4): 480-485.
- [2] 姚 丹, 王宏军. 黄芪多糖单糖组分的气相色谱分析 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5128-5129.
- [3] 阴赓宏, 李兰芳, 金亚宏, 等. 当归补血汤的实验研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(6): 58-60.
- [4] 蒲秀瑛, 李 言, 王 鹏, 等. 归芪多糖体外抗氧化活性的研究 [J]. 中国食品工业, 2011, 25(1): 64-66.
- [5] Sun Y X, Liu J C. Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2008, 43(3): 279-282.
- [6] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [7] Zhao L Y, Dong Y H, Chen G T, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 80(3): 783-789.
- [8] 黄 凯, 李志孝, 邓永康, 等. 药用真菌马勃多糖的

离纯化及结构分析 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(5): 516-518.

- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 第 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [10] Cui W W, Eskin M N A, Biliaderis C G, et al. NMR characterization of a 4-O-methyl- β -D-glucuronic acid-containing rhamnogalacturonan from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) mucilage [J]. *Carbohydr Res*, 1996, 292: 173-183.
- [11] Mondal S, Chakraborty I, Rout D. Isolation and structural elucidation of a water-soluble polysaccharide (PS-I) of a wild edible mushroom, *Termitomyces striatus* [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(7): 878-886.
- [12] Rout D, Mondal S, Chakraborty I. The structure of a polysaccharide from fraction-II of an edible mushroom, *Pleurotus florida* [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(8): 995-1002.
- [13] Pramanik M, Mondal S, Chakraborty I. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju* [J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340(4): 629-636.
- [14] Leone S, Molinaro A, Dubery I, et al. The O-specific polysaccharide structure from the lipopolysaccharide of the gram-negative bacterium *Raoultella terrigena* [J]. *Carbohydr Res*, 2007, 342(11): 1514-1518.
- [15] Agrawal P K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(10): 3307-3330.
- [16] Prabhakar G R, Unaiza H, Xu Q W. Structure determination of the capsular polysaccharide from *Vibrio vulnificus* strain 6353 [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 255(1): 279-288.
- [17] Sun Y L, Steve W, Cui B, et al. Structural features of pectic polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 80(2): 544-550.
- [18] Cordeiro L M C, Reinhardt V F, Baggio C H, et al. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium biquinoa*) seeds: Structure and

- gastroprotective activity [J]. *Food Chem*, 2012, 130(4): 937-944.
- [19] Kang J, Cui S W, Phillips G O, *et al.* New studies on gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) Part III: Structure characterization of a globular polysaccharide fraction by 1D, 2D, NMR spectroscopy and ethylation analysis [J]. *Food Hydrocolloid*, 2011, 25(8):1999-2007.
- [20] Dominaika D, Philip V T, Nikolay P A. Structure of the O-specific polysaccharide of *Proteus penneri* 103 containing ribitol and 2-aminoethanol phosphates. *Carbohydr Res*, 2002, 337(17): 1535-1540.
- [21] Ye L B, Zhang J S, Yang Y, *et al.* Structural characterization of a heteropolysaccharide by NMR spectra [J]. *Food Chem*, 2009, 112(4): 962-966.
- [22] Zhang A Q, Sun P L, Zhang J S, *et al.* Structural investigation of a novel fucoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Hericium erinaceus* [J]. *Food Chem*, 2007, 104(2): 451-456.