

裙带菜多糖的研究

门晓媛, 王飞*, 朱艳梅, 康琰琰, 朱良

(暨南大学药学院 生物医药研究开发基地, 广东 广州 510632)

摘要:目的 研究从裙带菜中提取的多糖组分。方法 采用乙醇分级沉淀法提取粗多糖, 采用 DEAE-Cellulose 离子交换柱色谱法和凝胶柱色谱法对粗多糖进行分离纯化, 对纯多糖 C11 进行理化性质、结构及单糖组成分析。结果 C11 的产率为 61.97%, 其多糖、硫酸基、葡萄糖醛酸质量分数分别为 43.20%、12.70% 和 9.78%, 多糖 C11 的硫酸根连接在糖的 C2 或 C3 处于平伏键位置, 且 C11 为以 β -糖苷键为主的吡喃糖。其单糖组成及质量分数比为鼠李糖:岩藻糖:木糖:葡萄糖:半乳糖=1.50:570.00:220.00:257.00:8.32。结论 C11 为单一纯净的酸性杂多糖。

关键词:裙带菜;多糖;分离纯化

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)03-0362-04

Polysaccharides from *Undaria pinnatifida*

MEN Xiao-yuan, WANG Yi-fei, ZHU Yan-mei, KANG Yan-yan, ZHU Liang

(Biomedicine Research and Development Center, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **Objective** To study polysaccharides from *Undaria pinnatifida*. **Methods** Crude polysaccharides were extracted with grade-precipitation by alcohol. DEAE-Cellulose and gel-filtration chromatography were used to isolate and purify the polysaccharides, and investigate the physicochemical properties, structures, and composition of the pure polysaccharides C11. **Results** The output rate of C11 was 61.97%, contents of polysaccharides, sulfate, and GlcA were 43.20%, 12.70%, and 9.78%, respectively. The sulfate linked polysaccharides on C2 or C3 equatorially, C11 was pyranose of β -glycosides mainly. C11 consisted of rhamnose, fucose, xylose, glucose, and galactose, the rate is: 1.50:570.00:220.00:257.00:8.32. **Conclusion** C11 is showed to be a homogeneous acidic heterosaccharides.

Key words: *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur.; polysaccharides; isolation and purification

裙带菜是大型经济海藻中的一种,属褐藻门,在我国人工栽培裙带菜相当普及,产量也相当可观,裙带菜中多糖是其重要组成部分,具有很多生物活性,笔者从裙带菜中提取的多糖,已证明其具有良好的抗病毒活性,有广阔的药用前景。本文将报道多糖的分离纯化、理化性质及组成分析结果。

1 材料与仪器、试剂

裙带菜 *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur. 采自大连渤海,经中国科学院南海海洋研究所张洋博士鉴定。

DEAE-Cellulose 52 离子交换树脂(Whatman 公司进口分装),Sephadex G-200 葡聚糖凝胶(Pharmacia 公司),台式冷冻离心机(D-78532 Tuttlingen, universal 32R),冷冻干燥机(CHRIST

ALPHA1-2LD),红外光谱仪(德国 EQUINOX55 型),元素分析仪(德国 Elemental Analyzer CHN-O-RAPID),(德国-瑞士 DRX-400 型 400 MHz 超导核磁共振谱仪,气相色谱-质谱(美国 Thermo Finnigan Trance 型)。

2 方法与结果

2.1 提取与分离:取裙带菜干粉适量,20 倍纯水煎煮 1 h,共煎煮 3 次,合并滤液,离心,滤渣弃掉,滤液减压浓缩,加 95%乙醇至乙醇体积分数为 75%,4 °C 静置过夜,抽滤,沉淀用丙酮、乙醚、无水乙醇洗涤,冷冻干燥得粗多糖(A),纯水复溶,加 95%乙醇至乙醇体积分数为 20%,4 °C 静置过夜,离心,沉淀用丙酮、乙醚、无水乙醇洗涤,冷冻干燥得褐藻胶(B),滤液中继续加 95%乙醇至乙醇体积数为

收稿日期:2005-06-12

基金项目:广东省自然科学基金团队项目(粤科基办[2003]11号);广东省工业攻关计划项目(2005A10904001);广州市科技攻关计划项目(2005Z3-E0411)

作者简介:门晓媛(1977-),女,天津,在读硕士,研究方向:海洋药物。Fax:(020)85220504-309 E-mail:menxiaoyuan@sina.com
*通讯作者 王飞

60%，4℃静置过夜，离心，沉淀用丙酮、乙醚、无水乙醇洗涤，冷冻干燥得褐藻糖胶(C)。乙醇分级沉淀法制得 3 个多糖样品 A、B、C，产率分别为 19.1%、1.0%、9.2%。A 和 B 为黄褐色，C 为灰白色。通过考马斯亮蓝—G250 法测得 A、B、C 的蛋白质质量分数分别为 1.19%、0.70%、0.25%。说明 3 个多糖样品的蛋白质质量分数很低，鉴于现有的除蛋白方法如 Sevage 法除蛋白的同时多糖损失率高，而本多糖样品的蛋白质质量分数低，故在多糖提取过程中不做除蛋白处理。

2.2 对多糖样品 C 的纯化：采用 DEAE—Cellulose 离子交换柱色谱法纯化多糖样品 C。取样品 C 203.8 mg 溶于 40 mL 纯水中，上样，依次用蒸馏水和 0.1、0.3、0.5、1.0 mol/L NaCl 洗脱，控制流量约 1 mL/min，自动样品收集器收集洗脱液，每管 10 mL 左右，蒸馏水洗脱样收集 15 管，其余各浓度梯度各收集 40 管。苯酚—硫酸法显色，洗脱曲线见图 1。蒸馏水洗脱部分无明显显色，0.1 mol/L NaCl 洗脱部分为 1~40 管，无明显显色，0.3 mol/L NaCl 洗脱部分为 41~80 管。由图 1 可以看出，出现较强吸收峰，合并 47~70 管，经减压浓缩，透析，滤过，再浓缩，冷冻干燥，得初步纯化多糖 C1：151.6 mg，得率为 74.39%；0.5 mol/L NaCl 洗脱部分为 81~120 管。由图 1 可以看出，出现较弱吸收峰，合并 85~93 管，经减压浓缩，透析，冷冻干燥得 C2：4.7 mg，得率为 2.31%。由于 C2 得率很低，接下来只对 C1 做进一步的纯化。采用 SephadexG-200 凝胶柱色谱法对 C1 进一步纯化。取 30 mg 样品 C1 溶于 1.5 mL 水中，上样，用 0.05 mol/L NaCl 洗脱，用恒流泵控制流量约 0.1 mL/min，用自动收集器收集洗脱液，每管收集 2 mL 左右，共收集 60 管，苯酚—硫酸法检测，洗脱曲线见图 2，合并 17~42 管，经浓缩，透析，冷冻干燥，得进一步纯化的多糖样品 C11 25 mg，相对于 C1 的产率为 83.3%。

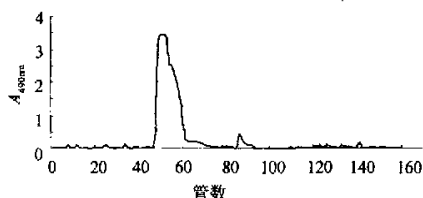


图 1 多糖样品 C 经 DEAE-Cellulose 离子交换柱洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of sample C by DEAE-Cellulose

2.3 多糖样品 C11 纯度检验

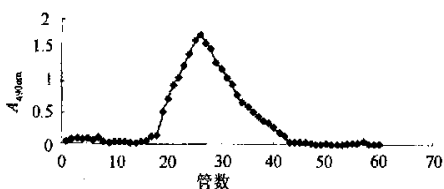


图 2 多糖样品 C1 经 Sephadex G-200 凝胶柱色谱洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of sample C1 by Sephadex G-200

2.3.1 纸色谱法^[1]：展开剂为醋酸乙酯—冰醋酸—水 (4:1:1)，显色剂为苯胺—邻苯二甲酸，样品 C11 为单一圆形斑点，直径约 2 mm，R_f 为 0.37。

2.3.2 SephadexG-200 凝胶柱色谱法：取 2 mg 样品 C11 溶于 0.5 mL 水中，用 0.05 mol/L NaCl 洗脱，用恒流泵控制流量约 0.1 mL/min，用自动收集器收集洗脱液，每管收集 1 mL 左右，共收集 60 管，苯酚—硫酸法跟踪显色，其洗脱曲线未出现分裂和拖尾现象，峰形单一对称，可认为 C11 相对分子质量分布较为集中，为纯多糖。

2.4 C11 理化性质研究：采用苯酚—硫酸法^[2]进行总糖的测定，采用明胶—氯化钡法^[2]进行硫酸基测定，采用硫酸—吡啶法^[3]进行葡萄糖醛酸的测定，并对样品进行 C、H、N 元素分析。C11 的理化性质见表 1。

表 1 纯多糖 C11 理化性质

Table 1 Physicochemical properties of C11

总糖/ %	硫酸 基/%	颜色	水溶 性	酸溶 性	糖醛 酸/%	C/%	H/%	N/%
43.20	12.70	白色	好	较差	9.78	29.35	5.06	未检出

2.5 结构分析

2.5.1 红外光谱分析：KBr 压片法。由多糖 C11 的红外光谱图(图 3)可知：在 3 600~3 200 cm⁻¹ 出现的宽峰为 O-H 的伸缩振动引起，2 925 cm⁻¹ 左右出现 1 个比较弱的吸收峰，为 C-H 伸缩振动引起，1 410 cm⁻¹ 附近处出现的吸收峰为 C-H 变角振动引起，此 3 组吸收峰是糖类物质的特征峰。1 600~1 630 cm⁻¹ 出现的吸收峰是由 C=O 非对称伸缩振动引起，说明多糖中含有羰基，1 250 cm⁻¹ 附近出现的吸收峰是由 S=O 伸缩振动引起，810~850 cm⁻¹ 处的吸收峰由 C-O-S 伸缩振动引起，它的位置与硫酸根在糖上的位置有关。连接在 C₄ 位处于直立键位置的硫酸根在 850 cm⁻¹ 处有吸收，连接在 C₂ 或 C₃ 位处于平伏键位置的硫酸根在 820 cm⁻¹ 处有吸收，多糖样品的 C-O-S 伸缩振动峰出现在 820 cm⁻¹ 左右，表明它们的硫酸根连接在糖的 C₂ 或 C₃ 位上。

950~1 250 cm^{-1} 的一组强峰,是吡喃糖环的醚键(C-O-C)和羟基的吸收峰, β -糖苷键在 895 cm^{-1} 左右有特征吸收峰, α -糖苷键在 835 cm^{-1} 左右有特征吸收峰,多糖样品在 890 cm^{-1} 左右有吸收峰,说明为 β -糖苷键。

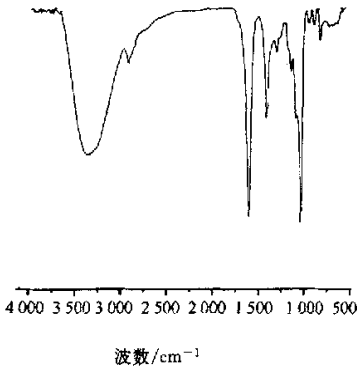


图 3 多糖 C11 的红外光谱图
Fig. 3 IR Spectrum of C11

2.5.2 $^1\text{H-NMR}$ 分析: D_2O 为溶剂,DSS 为外标,室温测定。 $^1\text{H-NMR}$ 主要解决多糖结构中糖苷键的构型问题。一般说 α 型吡喃糖苷 C1 上质子的 δ 值超过 5.0,而 β 型则小于 5.0。 $^1\text{H-NMR}$ 图谱多糖 C11 的 C1 上质子的 δ 值为 4.93,小于 5.0,推断为 β -糖苷键,此结论与红外光谱的分析结果相符。

2.6 单糖组成分析:

2.6.1 薄层色谱法^[4]:以 2 mol/L 硫酸 1 mL 溶解 10.2 mg 样品 C11,封管,100 $^\circ\text{C}$ 水解 8 h,冷却后加碳酸钡中和至中性,离心,除去硫酸钡沉淀,上清液经浓缩,即获得多糖水解物。展开剂为正丁醇-醋酸乙酯-异丙醇-醋酸-水 (7 : 20 : 12 : 7 : 6),显色剂为苯胺-邻苯二甲酸。10 种单糖对照品的薄层色谱 Rf 值分别为半乳糖 0.33、葡萄糖 0.35、鼠李糖 0.60、山梨糖 0.40、甘露糖 0.38、木糖 0.32、果糖 0.18、核糖 0.33、岩藻糖 0.39、葡醛酸 0.06。多糖样品 C11 水解后,薄层色谱得 3 个斑点,Rf 值分别为 0.06、0.32 和 0.38。与单糖对照品的 Rf 值比较:C11 中含葡醛酸,由于半乳糖、葡萄糖、木糖和核糖的 Rf 值均为 0.32 左右,所以,样品 Rf 值 0.32 处的斑点只能说明样品 C11 中含有半乳糖、葡萄糖、木糖和核糖中的一种或几种。同样,山梨糖、甘露糖和岩藻糖的 Rf 值均为 0.38 左右,样品 Rf 值 0.38 处的斑点只能说明样品 C11 中含有山梨糖、甘露糖和岩藻糖中的一种或几种。

2.6.2 GC-MS 法^[5]:称取多糖样品 C11 2.5 mg,溶于 1.5 mL 4 mol/L 三氟乙酸,充氮气封口,90 $^\circ\text{C}$

水解 1 h,60 $^\circ\text{C}$ 减压蒸干,用 1.0 mL 甲醇洗 3 遍,用氮气吹干。加 1 mL 蒸馏水,24 h 后,冷冻干燥得多糖水解物。在蒸干的多糖水解样中加入 10 mg 盐酸羟胺、0.5 mL 吡啶,90 $^\circ\text{C}$ 水解 30 min,振荡,取出后冷却至室温,加入 0.5 mL 醋酸酐,盖塞,90 $^\circ\text{C}$ 下继续水解 30 min,使转变成糖脲乙酸酯衍生物,反应产物直接取样进行 GC-MS 分析。单糖对照品的衍生物制备同上。色谱条件:气相色谱仪用 DB-5 柱 (35 m \times 0.2 mm,液膜厚 0.25 μm),采用高纯氮气为载气,采用程序升温,初始温度为 60 $^\circ\text{C}$,保持 2 min 后以 30 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 120 $^\circ\text{C}$,保持 1 min,再以 2.5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^\circ\text{C}$,保持 10 min,进样口温度 280 $^\circ\text{C}$,采用不分流模式进样,柱流量为 2 mL/min。质谱条件:采用电子轰击(EI)离子源,离子能量 70 eV。测定单糖组成的衍生物的制备方法有多种,三甲基硅醚化是最简单方法之一,操作简单,衍生物易于气化,但由于单糖三甲基硅衍生物的异构体的存在,使每种糖会出现多峰现象,同样乙酰化衍生化法也易出现上述问题。因此采用糖脲乙酸酯衍生物,并且采用平衡稳定异构体的处理方法,避免了多峰现象,使各种单糖达到了较好的分离效果。通过与单糖对照品的保留时间和质谱碎片的质子离子峰的质核比相比较,确定多糖样品 C11 的单糖组成及质量分数比为鼠李糖:岩藻糖:木糖:葡萄糖:半乳糖 = 1.50 : 570.00 : 220.00 : 257.00 : 8.32。说明岩藻糖、木糖、葡萄糖质量分数较大,鼠李糖和半乳糖质量分数甚微。所以在薄层色谱中未见鼠李糖斑点,结合 GC-MS 结果分析,样品 Rf 值在 0.32 处的斑点应为葡萄糖和木糖的斑点,因为半乳糖的质量分数太小,不会在薄层中显斑;Rf 值在 0.38 处的斑点应为岩藻糖的斑点。GC-MS 法未做葡萄糖醛酸对照品,但从薄层色谱的结果可以判断样品含有葡醛酸,通过硫酸-咔唑法进一步确定样品多糖中葡醛酸的质量分数为 9.78%。各种单糖对照品及样品气相色谱峰的保留时间分别为:鼠李糖 16.39、阿拉伯糖 16.67、岩藻糖 16.79、木糖 17.00、甘露糖 19.60、葡萄糖 19.72、半乳糖 20.04 min,多糖样品 C11 分别为 16.39、16.79、16.88、19.77、20.02 min。

3 结论

3.1 经 DEAE-Cellulose 离子交换柱色谱法和 Sephadex G-200 凝胶柱色谱法可得到较纯多糖,产率可达 61.97%。

3.2 纯多糖 C11 的多糖、硫酸基、葡萄糖醛酸质量分数分别为 43.20%、12.70% 和 9.78%,元素分析

未检测出 N 元素的存在。

3.3 红外光谱显示 C11 有糖的特征峰,硫酸基特征峰且硫酸根连接在糖的 C2 或 C3 处于平键位置,C11 为以 β -糖苷键为主的吡喃糖。此结论与 $^1\text{H-NMR}$ 分析结果相符。

3.4 通过薄层色谱法和 GC-MS 法综合分析,多糖样品 C11 的单糖组成及质量分数比为鼠李糖:岩藻糖:木糖:葡萄糖:半乳糖=1.50:570.00:220.00:257.00:8.32。

References:

[1] Ruan Q P, Gao C J, Li H L. Isolation, purification, and physicochemical properties of the polysaccharide FI from

Aconitum carmichaeli Debx [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12 (5): 46-49.

[2] Zhang W J. *Research Technique of Compound Polysaccharide* (复合多糖生化研究技术) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technique Publishers, 1987.

[3] Guo X, Gao X D, Yang X B. Determination of content glucuronic acid and neutral sugar of acidic polysaccharide [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2004, 25 (2): 100-101.

[4] Wu J, Zhang C W, Liu Y F. Physicochemical properties and anti-tumor activities of polysaccharides IP I A, IP I B from *Spirulina maxima* [M]. *Chin J Biochem Molec Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 1998, 14 (6): 751-755.

[5] Li P L, Wu C X, Zhang Y X. Analysis GC of sugar and sugar-alcohol [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1992, 10 (5): 272-276.

膜法分级纯化姬松茸子实体多糖的研究

韩永萍, 刘扬平

(北京联合大学生物化工学院, 北京 100023)

摘要:目的 通过微滤和超滤对姬松茸子实体粗多糖分级纯化, 获得最佳试验操作条件, 考察各级相对分子质量范围内的多糖分布情况及所得制品的纯度。方法 使用微滤和不同截留相对分子质量的超滤串联工艺。结果 试验按相对分子质量将其分成 $>3 \times 10^5$, $3 \times 10^5 \sim 8 \times 10^4$, $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ 以及 $<1 \times 10^4$ 4 个级别, 所得多糖质量分布比例约为 5:1:3:1。试验确定操作条件为室温, 操作压力 0.08~0.1 MPa, 微滤和各级超滤分别将各级多糖最高浓缩至 45、35 和 25 g/L。在低温下干燥制备的姬松茸多糖制品, 质量分数高于 70%, 多糖总回收率高达 83.7%。结论 该工艺简单可行, 姬松茸子实体多糖相对分子质量主要分布于 $>3 \times 10^5$ 和 $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ 。

关键词:姬松茸多糖; 微滤; 超滤

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)03-0365-04

Application of membrane technique to separating and purifying polysaccharides from fruit bodies of *Agaricus blazei*

HAN Yong-ping, LIU Yang-ping

(School of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Key words: *Agaricus blazei* Murrill polysaccharide; microfiltration (MF); ultrafiltration (UF)

姬松茸 *Agaricus blazei* Murrill 又名巴西蘑菇, 是一种珍稀的药食兼用真菌, 不但味道鲜美, 而且含有丰富的多糖、蛋白质、不饱和脂肪酸、甾醇类以及锌、硒、锗等重要的微量元素, 在预防和抑制肿瘤、降低血脂、血糖以及修复受损肝细胞、促进造血干细胞增殖等方面显示出奇特的功效^[1]。在日本有“神奇的蘑菇”和“地球上最后的食物”的美誉。多糖的药效活性与其分子结构和相对分子质量水平密切相关。免疫应答对单糖的化学结构是非特异性的, 而是由分子大小决定。国内外大量研究表明, 对肿瘤抑制率超

过 90% 的姬松茸多糖为相对分子量分布在 2×10^6 左右的 β -半乳糖葡糖、 α -葡聚糖和 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 处蛋白质葡聚糖、木糖葡聚糖; 另外, 相对分子质量在 2×10^5 左右的 β -葡聚糖对肿瘤抑制效果也在 70% 以上^[1]。因此, 将姬松茸多糖分级纯化, 并了解各级相对分子质量的质量分布, 对其大规模开发生产有着非常大的参考价值。

近年来, 关于姬松茸子实体多糖提取方法的研究已有一些文献报道, 主要为热水浸提法、酸提法、酶提法等。膜法作为一种新型的分离技术, 不但具有

收稿日期: 2005-05-08

作者简介: 韩永萍(1971-), 女, 黑龙江省双鸭山人, 讲师, 工学硕士, 主要从事膜处理技术、饮用水消毒技术方面的教学与研究。

E-mail: yue-yun-tao@sohu.com