

亮菌多糖的分离纯化

罗霞^{1,3}, 许晓燕¹, 余梦瑶^{1,3}, 江南¹, 曾瑾¹, 杨志荣³, 郑林用^{2,3*}

(1. 四川省中医药科学院 中药细胞与分子生物学实验室, 四川 成都 610041; 2. 四川省农业科学院, 四川 成都 610066; 3. 四川大学, 四川 成都 610064;)

摘要:目的 通过醇沉、色谱等分离提取技术对发酵得到的亮菌胞内多糖进行分离纯化, 并对纯化的多糖进行结构及部分性质研究。方法 采用水提、醇沉、除蛋白等方法得到亮菌胞内粗多糖, 然后通过离子交换色谱、分子筛色谱对粗多糖进行进一步的分离纯化, 得到单一多糖。同时采用红外光谱法、紫外光谱法、核磁共振法对该单一多糖进行结构研究, 确定其单糖组成及糖链的连接方式。结果 通过去蛋白、醇沉、离子交换色谱和凝胶滤过色谱的方法得到亮菌胞内多糖 IPS-B2, 该多糖为直链 α -D-(1 $\rightarrow$ 6)-吡喃型葡聚糖, 不含蛋白质、多肽和氨基酸。结论 通过纯化得到了直链 α -(1 $\rightarrow$ 6)-葡聚糖 (IPS-B2), 该多糖在体内具有较好的抑瘤效果。

关键词: 亮菌多糖; 分离纯化; 结构

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0231-04

亮菌 *Armillariella tabescens* (Scop. ex Fr.) Sing. 是层菌纲口蘑科假蜜环菌属真菌, 在我国最初是从发光柳树朽木中分离而得, 在民间作为治疗急性慢性肝炎及胆道疾患的传统药物^[1,2]。现代研究表明此菌的菌丝体及菌索含蜜环菌香豆素、麦角甾醇和有机酸等。多糖是亮菌生理生化活性的主要成分之一, 在对亮菌生理活性的研究中有研究者提出亮菌多糖具有提高免疫力的作用。本实验室通过前期的实验证实, 亮菌粗多糖能够有效的抑制小鼠 S_{180} 肉瘤在小鼠体内的生长^[2]。因此, 本实验以小鼠抑瘤实验为筛选平台, 通过各种色谱技术对亮菌多糖进行分离纯化, 拟得到具有抑瘤作用的亮菌单一多糖。并对该单一多糖进行结构鉴定及功能研究, 为阐明其生理生化功能的机制奠定基础。

1 实验材料

Beckman J-25 高速冷冻离心机, TU-1800 紫外分光光度计 (北京谱析通用仪器有限责任公司), Milli-Q 纯水机 (Millipore), BS-100A 自动收集器 (上海沪西仪器厂), 中压天然产物分离系统 (Buchi, Pump Manager C-615, Pump Module C-605, RI DETECTOR, UV Photometer C-635), Smart Spec Plus Spectrophotometer Bio-Rad), 冻干机 (UniEquip MC), Nicolet AVATR 3600 红外光谱仪, Bruker AC E200, Varian INOVA-400 核磁共振仪。

DEAE-Cellulose 52 (Whatman), Sephadex G

200, Sephacryl S-300 HR (Pharmacia), 其他试剂均为国产分析纯。亮菌购至中国普通微生物菌种保藏管理中心, 菌种号 5.92。

昆明种标准小鼠, 体质量 18~22 g, 雌雄各半, 由四川省中药研究所提供, 动物号: 川实质第 2002-33 号。

种子培养基: 马铃薯 (去皮) 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%, pH 值自然。优化培养基: 葡萄糖 0.3%, 蔗糖 0.7%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.3%, K_2HPO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4$ 0.05%, pH 值自然。

2 方法与结果

2.1 菌体的培养: 将 2 块黄豆大小的亮菌菌丝块接种到种子培养基中 (100 mL 培养基/250 mL 三角瓶), 于 27 °C、160 r/min 旋转摇床培养 3 d, 再按 8.0% 的接种量接入装有 35 L 优化培养基的 50 L 发酵罐中, 于 27 °C、160 r/min 培养 5 d。发酵液 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 然后用生理盐水洗涤菌球两次, 得到亮菌菌体 11 kg。

2.2 粗多糖的制备: 采用沸水提取法对亮菌胞内多糖进行 3 次提取, 每次按固液比 1:10 加蒸馏水, 提取 2 h。提取液 8 000 r/min 离心 15 min, 合并上清液, 减压浓缩至 3 L。然后采用 Sevag 法除蛋白, 反复多次, 至蛋白完全除尽。收集上层水层 (多糖层), 用蒸馏水充分透析, 除去其中的小分子杂质, 于 12 000 r/min 离心 20 min, 合并上清液。

* 收稿日期: 2008-06-29

作者简介: 罗霞 (1974-), 女, 四川省内江人, 副研究员, 博士, 长期从事中药药理学研究, 已发表文章 20 余篇。

Tel: (028) 85250783 Fax: (028) 85250783 E-mail: xuxiaoyan629@gmail.com

* 通讯作者 郑林用

按透析液 3 倍体积加入 95 %乙醇,静置 16 h 后 8 000 r/min 离心,收集沉淀,用红外灯烘干后碾磨,得到浅棕色粉末状的亮菌粗多糖 4.9 g。

2.3 硫酸-苯酚法测定多糖^[3]

2.3.1 标准曲线的绘制:分别吸取葡萄糖对照品溶液 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mL,各以蒸馏水补充至 0.4 mL,然后加 6.0 %苯酚溶液入 0.2 mL,再迅速滴加 1 mL 浓硫酸(每个浓度做 3 个平行)。另取 2 个试管各加 1.0 mL 蒸馏水同上操作,为空白。于 40 °C 水浴中恒温 0.5 h,取出,冷却 15 min 后,于 490 nm 处测其吸光度值,得标准曲线,拟合回归方程 $Y = 142.08 X - 0.0596$, $R^2 = 0.9923$ 。

2.3.2 多糖的测定:取产品的溶液,按照以上方法处理,测定吸光度值,代入回归方程,进行计算,即得。

2.4 DEAE-Cellulose 52 离子交换色谱纯化:用适量的 0.02 mol/L PB 缓冲液(pH 7.0)溶解亮菌粗多糖,以 0.5 mL/min 上样,再用同样的缓冲液以 0.5 mL/min 洗去未与树脂结合的中性多糖和碱性多糖。然后以含 0.5 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L PB 缓冲液(pH 7.0)进行直线梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,以 5.0 mL/管分步收集。采用硫酸-苯酚法检测每管洗脱液的糖,分别吸取每管洗脱液 0.2 mL,以蒸馏水补充至 0.4 mL,然后加入 6.0 %苯酚溶液 0.2 mL,再迅速滴加 1 mL 浓硫酸,于 40 °C 水浴中恒温 0.5 h,取出,冷却 15 min 后,于 490 nm 处测定吸光度值。根据吸光度绘制多糖洗脱峰,结果见图 1。

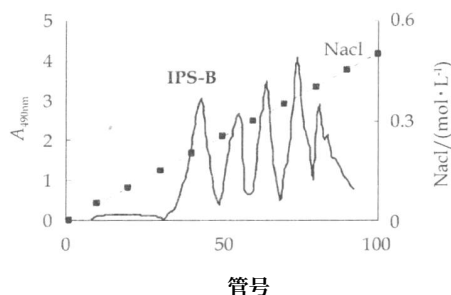


图 1 DEAE-Cellulose 色谱图

Fig. 1 DEAE-Cellulose chromatogram

在 pH 7.0 时,酸性多糖可以吸附于 DEAE-Cellulose 交换树脂上,中性和碱性多糖不能吸附。从结果可知,通过 DEAE-Cellulose 52 离子交换柱色谱,酸性多糖可以分为 6 部分。分别收集 DEAE-Cellulose 交换树脂洗脱的 6 部分多糖,进行小鼠体内抑瘤实验,计算肿瘤生长抑制率[肿瘤生长抑制率 = (1 - 给药组平均瘤质量/空白组平均瘤质量) ×

100 %],结果见表 1。可以看出,第二部分多糖(即 33 管到 48 管,记为 IPS-B2,474 mg,得率 9.67 %)对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用最强,抑制率达到 48.25 %。

表 1 亮菌粗多糖 DEAE-Cellulose 色谱

Table 1 DEAE-Cellulose chromatography of polysaccharide

洗脱	多糖/mg	得率/%	肿瘤生长抑制率/%
第一部分	53	1.08	6.02
第二部分(IPS-B)	474	9.67	48.25
第三部分	315	6.43	12.38
第四部分	396	8.08	7.05
第五部分	438	8.94	6.29
第六部分	507	10.35	10.88
IPS-B1	159	3.25	8.26
IPS-B2	177	3.61	47.66
IPS-B3	127	2.59	3.69

2.5 Sephadex G-200 凝胶滤过色谱纯化:将 IPS-B 浓缩至 6 mL,以 0.5 mL/min 上 Sephadex G-200 凝胶滤过色谱柱。上样结束后,用 0.02 mol/L PB 缓冲液(pH 7.0,10 mmol/L NaCl)进行洗脱,流速 0.5 mL/min,以 5.0 mL/管分步收集。采用硫酸-苯酚法检测每管洗脱液的糖,分别吸取每管洗脱液 0.2 mL,以蒸馏水补充至 0.4 mL,然后加入 6.0 %苯酚溶液 0.2 mL,再迅速滴加 1 mL 浓硫酸,于 40 °C 水浴中恒温 0.5 h,取出,冷却 15 min 后,于 490 nm 处测其吸光度值。根据吸光度绘制多糖洗脱峰,结果见图 2。可以看出,IPS-B 多糖组分经 Sephadex G-200 凝胶滤过色谱柱分离得到 3 个组分。通过小鼠体内抑瘤实验,发现 IPS-B2(177 mg,得率 3.61 %)的小鼠体内肿瘤生长抑制率达到 47.66 %(表 1)。

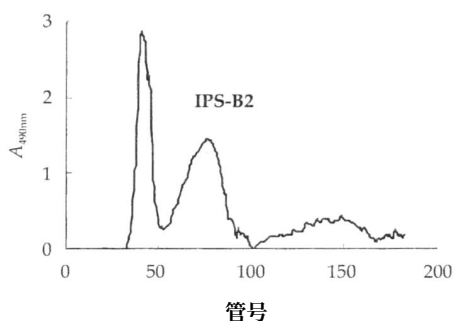


图 2 Sephadex G-200 凝胶滤过色谱图

Fig. 2 Sephadex G-200 chromatogram

2.6 琼脂糖电泳纯化:琼脂糖制板(5.0 cm × 7.5 cm),约 0.1 cm 厚。离琼脂糖板下端 1.0 cm 处挖点样槽(0.1 cm × 0.5 cm),点样量 5.0~10.0 μL

(约含 10~15 μg 多糖),用微量进样器点样。电压 150 V,电泳 1 h 后,取出琼脂糖板染色 1 h,然后脱色。电泳图见图 3。可以看出,IPS-B2 电泳后经甲苯胺蓝染色显示为单一染色条带,说明得到的 IPS-B2 为单一多糖。

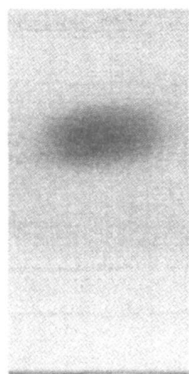


图3 IPS-B2 的琼脂糖电泳

Fig. 3 Agrose electrophoretogram of IPS-B2

2.7 多糖相对分子质量的测定:采用 Sephacryl S-300 HR 凝胶滤过色谱法测定多糖 IPS-B2 的相对分子质量。柱体积为 100 cm $\times$ 2.6 cm。上样量为 0.6 mL (含多糖 1.5 mg),用含 0.01 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L, pH 7.0 的 PB 缓冲液洗脱,流速 1.0 mL/min。分部收集,用硫酸-苯酚法检测多糖峰。

制备 Dextran T-100 (100 000 g/mol)、T-70 (70 000 g/mol)、T-40 (40 000 g/mol)、T-10 (10 000 g/mol) 多糖对照品溶液。以出峰体积对相对分子质量对数作图,得到回归方程 $Y = -0.0152X + 6.4879$, $R^2 = 0.9962$ 。计算得多糖 IPS-B2 的表现相对分子质量为 50 000 g/mol。

2.8 多糖 IPS-B2 的结构分析

2.8.1 单糖组成分析:采用纸色谱方法测定亮菌胞内多糖 IPS-B2 的单糖组成^[4]。结果显示,IPS-B2 是由葡萄糖通过糖苷键连接而成的葡聚糖。

2.8.2 紫外光谱:称取适量多糖 IPS-B2,用 0.9% NaCl 溶液溶解,配制成 1.0 mg/mL 溶液,在 200 nm~800 nm 扫描。发现 IPS-B2 在 260、280 nm 处无吸收峰,说明 IPS-B2 中不含核酸、多肽和蛋白质。

2.8.3 红外光谱:称取纯化后的亮菌胞内多糖 IPS-B2 10 mg,用溴化钾压片,红外光 4 000~400 cm^{-1} 扫描。红外光谱结果显示,IPS-B2 具有多糖类物质的一般特征,在 849 cm^{-1} 处有吸收峰,说明其具有 α -D-型糖苷键;1 100~1 010 cm^{-1} 处有 3 个强吸收峰说明 IPS-B2 单糖为吡喃型;2 927 cm^{-1}

附近的吸收峰是 $-\text{CH}_2$ 或 CH_3 或 C-H 键伸缩振动峰;3 423 cm^{-1} 的强吸收峰为糖类分子中羟基的伸缩振动吸收峰。

2.8.4 核磁共振波谱:称取适量纯化后的亮菌胞内多糖 IPS-B2 30 mg,溶于 0.5 mL D_2O 中,60 $^{\circ}\text{C}$ 在 Bruker AC-E200 和 Varian INOVA-400 的核磁共振仪上分别进行 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 的测定。在核磁共振研究中,IPS-B2 的 ^1H -NMR δ 0.007 表明其为 α -D-(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖^[5]; ^{13}C -NMR δ 90~110 只有一个信号峰,说明 IPS-B2 只含有一种单糖,且 δ 100.216 表示 α -D-(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖苷的 C-1, δ 72.045、72.701、73.901、75.911、68.070 分别代表 α -D-(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖苷的 C-2 到 C-6^[6]。

结合 IPS-B2 的核磁共振波谱 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR,以及红外光谱图及纸色谱,显示 IPS-B2 为 α -D-(1 $\rightarrow$ 6)-吡喃型葡聚糖。

3 讨论

在前期研究中发现亮菌多糖具有良好的抗肿瘤作用,而通常认为多糖的生物学功效与其结构密切相关。因此,本实验对亮菌粗多糖进行分离纯化,得到小鼠体内抑瘤率 47.66% 的单一多糖 IPS-B2,并对该多糖进行了结构研究。

研究结果表明,IPS-B2 为 α -D-(1 $\rightarrow$ 6)-吡喃型葡聚糖。在目前的研究中,普遍认为抗肿瘤多糖多具有 β -D-(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖苷,该结构能够使多糖与机体免疫系统中某些受体结合,启动机体免疫,从而达到抑瘤的效果。但是,也有人认为 β -葡萄糖苷与抗肿瘤间没有必然联系。近几年,也发现一些 α -糖苷的多糖具有强烈的抑瘤效果,如从 *Tinospora cordifolia*^[7], *Ramalina celastri*^[8], *Aconitum carmichaeli*^[9] 和 *Ipomoea batatas*^[6] 中分离得到的 α -葡聚糖都被证实具有较高的抗肿瘤及增强免疫的作用。本实验的结果也表明亮菌产生的 α -D-(1 $\rightarrow$ 6)-吡喃型葡聚糖同样具有较好的抑瘤能力。

参考文献:

- [1] 方积年,叶淳渠,吴淑云,等.亮菌多糖的研究[J].生物化学与生物物理学报,1984,16(3):222-227.
- [2] 赵弋清,罗霞,陈东辉,等.亮菌多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠免疫功能的研究[J].免疫学杂志,2006,10:15-18.
- [3] Dubois M, Gilles K, Hamilton A, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 29:350-356.
- [4] 陈永,李强,谭晓晶,等.红毛五加多糖的基本性质研究[J].天然产物研究与开发,2004,16(6):507-510.
- [5] Liu C H, Lin Q X, Gao Y, et al. Characterization and anti-

- tumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs [J]. *Carbohydr Polym*, 2007, 67(3):313-318.
- [6] 高婷,白家峰,罗霞,等.亮菌多糖对小鼠免疫功能的影响[J].*四川大学学报:自然科学版*,2005,42:395-399.
- [7] Nair P K P, Rodriguez S, Ramachandran R, et al. Immune stimulating properties of a novel polysaccharide from the medicinal plant *Tinospora cordifolia* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4:1645-1659.
- [8] Cameiro L A M A, Freitas B D, Iacomini M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri* [J]. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1997, 29: 503-509.
- [9] Zhao C, Li M, Luo Y F, et al. Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharides from *fuzi*, *Aconitum carmichaeli* [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341: 485-491.

HPLC-ELSD 法测定酸枣仁滴丸中酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸

张彦青^{1,2},解军波^{1,2},张明春^{1,2},赖长江生^{2*}

(1.天津市食品生物技术重点实验室,天津 300134; 2.天津商业大学 制药工程系,天津 300134)

摘要:目的 建立酸枣仁滴丸中酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸的测定方法。方法 应用超声提取和高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)检测。Hypersil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(0.1%醋酸),梯度洗脱;体积流量:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:20 μL;ELSD 参数:雾化温度:45℃;气体流量:2.0 L/min。结果 制剂中酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸达到基线分离且线性关系良好,线性范围分别为 15.4~154 μg/mL,22.8~228 μg/mL,28.0~280 μg/mL,平均加样回收率分别为 98.17%、99.21%、97.89%。结论 该方法快速简便、精密度好、灵敏度高,可用于酸枣仁滴丸剂中酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸的同时测定。

关键词:酸枣仁滴丸剂;酸枣仁皂苷 A;酸枣仁皂苷 B;白桦脂酸;高效液相色谱-蒸发光散射检测器

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)02-0234-02

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chow 的干燥种子,宁心安神、益阴敛汗,为镇静安神的传统药物之一^[1]。目前酸枣仁的临床应用仅限于汤剂、口服液和复合胶囊剂。汤剂有临时煎煮、味苦难服、携带不便、易霉败变质,口服液口感较差,胶囊剂吞服不易等缺点。中药滴丸剂是在中药丸剂的基础上发展起来的,避免了传统中药生物利用度低、服用不方便、起效慢的缺点,同时发扬了传统中药安全性好、不良反应小的优点。为了克服酸枣仁现有剂型的缺点,笔者利用 PEG 6000 和泊罗沙姆 188 作为主要辅料制备了酸枣仁滴丸剂。酸枣仁中所含的酸枣仁皂苷 A、B 与白桦脂酸为三萜皂苷类成分,紫外吸收差,不宜采用 UV 法检测,而 ELSD 检测器为质量型通用检测器,可检测挥发性低于流动相的化合物。目前关于酸枣仁及其相关制剂仅见酸枣仁皂苷 A、B 的测定报道^[2~4]。本实验建立了 HPLC-ELSD 法用于测定酸枣仁滴丸中主要有效成分酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸,为酸枣仁滴丸质量标准的制定提供参考。

1 仪器与试剂

安捷伦 1100 型高效液相色谱仪,Agilent 1100 色谱工作站,ELSD 检测器,Sartorius BP211D 电子天平,KQ-218 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

酸枣仁滴丸(自制,35 mg/丸),酸枣仁皂苷 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110734-200408),酸枣仁皂苷 B、白桦脂酸对照品(上海顺勃生物工程技术中心,质量分数大于 98%),甲醇、乙腈、冰醋酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2~4]:Hypersil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(0.1%醋酸),梯度洗脱;体积流量:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:20 μL;ELSD 参数:雾化温度:45℃,气体流量:2.0 L/min。

2.2 对照品溶液的配制:分别精密称取酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸对照品 1.54、2.28、2.80 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀后即得混合对照品溶液。

* 收稿日期:2008-07-14
基金项目:天津市科技支撑计划项目(07ZCKFNC00300)