

枸杞多糖分离纯化及其结构光谱分析与显微学观察

郭琦, 孙润广*, 郭国贇, 焦自明

陕西师范大学物理学与信息技术学院 生物物理与生物医学工程实验室, 陕西 西安 710062

摘要: 目的 提取枸杞多糖并分析其结构性质和显微学形态, 为枸杞的进一步开发利用提供参考。方法 采用水提醇沉法得到枸杞多糖, Sephadex G-150 凝胶色谱柱纯化得 LBP3-I, 应用傅里叶变换光谱、气相色谱对 LBP3-I 进行组成结构分析, 通过环境扫描电镜和原子力显微镜观察该组分的显微学形态。结果 LBP3-I 是一种含有结合蛋白的多糖复合物。其单糖组成为鼠李糖基、阿拉伯糖基、木糖基、甘露糖基、葡萄糖基、半乳糖基, 且摩尔比率为 2.07 : 2.38 : 3.11 : 1.00 : 1.12 : 2.86。红外光谱结果显示 LBP3-I 具有明显的糖类物质特征吸收峰且含有吡喃环; 环境扫描电镜下 LBP3-I 呈现高分支结构, 主要呈链状, 且糖链间多相互缠绕聚集成环状。结论 LBP3-I 是一种含有结合蛋白的多糖复合物, 具有分支结构, 主要成链状。

关键词: 枸杞多糖; 单糖组成; 分支结构; 环境扫描电镜; 原子力显微镜

中图分类号: R284.18 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0645-04

Isolation and purification, its structure spectral analysis, and microscopy observation of *Lycium barbarum* polysaccharide

GUO Qi, SUN Run-guang, GUO Guo-yun, JIAO Zi-ming

Laboratory of Biophysics and Biomedical Technology, College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: Objective To provide the reference for further development and utilization of *Lycium barbarum*, the structure composition and morphology of *L. barbarum* polysaccharides (LBP) were studied. **Methods** LBP was extracted from *L. barbarum* with water, isolated and purified by quaternary ammonium salts precipitation and gel chromatography process. The structural composition of LBP3-I was characterized by FT-IR and gas chromatography (GC). The morphology was observed by environmental scanning electron microscopy (ESEM) and atomic force microscope (AFM). **Results** LBP3-I was a polysaccharide complex which contained protein. LBP3-I contained six kinds of monosaccharides (rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose, and galactose), and their ratios were 2.07 : 2.38 : 3.11 : 1.00 : 1.12 : 2.86. The FT-IR results revealed the typical characteristics of polysaccharides and pyranoid rings. ESEM and AFM results showed LBP3-I had a high branch structure and sugar chains tangled together into rings. **Conclusion** LBP3-I is a polysaccharide complex containing protein which has branch structure with sugar chains.

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP); monosaccharide composition; branch structure; environmental scanning electron microscopy (ESEM); atomic force microscope (AFM)

枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP) 是从宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 中提取的一种水溶性多糖, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老等多种药理作用, 是枸杞子中调节免疫、延缓衰老的主要活性成分^[1-2]。枸杞多糖现已成为医药保健品中的重要功能成分之一。

以往对枸杞多糖的研究多聚焦于其多种生物医学活性和提取工艺优化^[3-4], 然而对于枸杞多糖的化

学组成及分子空间结构研究的报道尚不多见, 以致许多枸杞多糖的物化性质和生理功能无法在结构上得以解释^[5]。

多糖是一种重要的生物大分子, 具有重要的生物学功能。但对于多糖这种生物大分子来说, 对其分子结构和表面形态也鲜有报道。目前很多仪器的分辨率无法达到纳米级别。原子力显微镜的出现为解决这个问题提供了技术支持^[6]。本实验在传统热

收稿日期: 2011-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10874108); 陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目 (SJ08A16)

作者简介: 郭琦 (1987—), 女, 宁夏回族自治区, 硕士研究生, 主要从事分子生物物理方面的研究。E-mail: qqguoqi@sina.com

*通讯作者 孙润广 E-mail: sunrun Guang@snnu.edu.cn

水提取枸杞多糖的基础上,通过气相色谱(GC),傅里叶红外光谱(FTIR)等测定了枸杞多糖的化学组成,并利用环境扫描电镜(ESEM)和原子力显微镜(AFM)研究其微观结构,从而为进一步研究枸杞多糖的多种生物活性以及分子结构提供理论和实验依据。

1 材料与设备

1.1 材料与试剂

宁夏枸杞子干果,购于西安万寿药材市场经陕西师范大学生命科学学院杨建雄教授鉴定为 *Lycium barbarum* L.。

95%乙醇、三氯甲烷、正丁醇、苯酚、浓硫酸、葡萄糖、硼酸、NaOH、乙酸、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、NaCl、三氟乙酸、乙酸酐、吡啶、盐酸羟胺、肌醇六乙酯、甲醇、KBr,均为国产分析纯,实验室用水为双蒸水。

1.2 设备

HPX9162MBE 数显电热培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);CF16RX 高速离心机(日本日立公司);TU1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Alpha4 真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司);气相色谱仪(美国菲尼根公司);EQUINX55 傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司);SPM—9500J3 原子力显微镜(日本岛津);Quanta 200 环境扫描电镜(FEI 公司)。

2 方法

2.1 枸杞多糖的提取

将枸杞子烘干,粉碎,60℃下用95%乙醇脱脂2h,重复3次,收集滤渣并干燥。称取150g干燥滤渣加入3000mL蒸馏水,90℃热水提取2h,重复2次,合并离心,收集上清液,浓缩至1/4体积,然后加入4倍体积的95%乙醇,静置过夜。离心,收集沉淀并重复醇沉1次。

2.2 Sevage 法脱蛋白

将两次所得沉淀用蒸馏水溶解,加入糖液1/5体积 Sevage 试剂(三氯甲烷-正丁醇4:1),震荡20min后离心,收集上清液,重复操作至中间无变性蛋白层出现。将上清液对流水透析3d,真空冷冻干燥得脱蛋白枸杞多糖(LBP),并对LBP进行紫外光谱分析。

2.3 枸杞多糖的分离

2.3.1 酸性亚组分的分离 取LBP 4.0g溶于75mL蒸馏水中,加入50mL CTAB 过夜沉淀12h,

4000 r/min、4℃离心20min,收集沉淀。沉淀用10% NaCl 溶解后,加入3倍体积95%乙醇,产生沉淀,4000 r/min、4℃离心20min收集沉淀,蒸馏水溶解并透析3d,冻干得LBP1。

2.3.2 中性亚组分的分离 CTAB 处理后的上清液用1% H₃BO₃调节pH值为6.0,用2 mol/L NaOH调节pH值为11.0产生沉淀,4000 r/min、4℃离心20min收集沉淀。用10% NaCl 溶解沉淀,用2%乙酸调节pH值为7.0,加入3倍体积95%乙醇沉淀,沉淀用蒸馏水溶解并透析3d,冻干得LBP2。

2.3.3 碱性亚组分的分离 分离LBP2后的上清液,用乙酸调至pH值为4.4,加入3倍体积的95%乙醇,静置24h,4000 r/min、4℃离心20min收集沉淀,沉淀用蒸馏水溶解透析3d,冻干得LBP3。

2.4 枸杞多糖的纯化

选取量相对较多的LBP3亚组分40mg溶于5mL蒸馏水中,上Sephadex G-150色谱柱,用蒸馏水洗脱,自动收集每管3mL。苯酚-硫酸法检测多糖,合并出峰管,浓缩,冻干,得纯化多糖LBP3-I,并计算收率为42.5%。

2.5 多糖的GC分析

采用三氟乙酸对LBP3-I样品进行酸水解得到单糖,甲醇中和,产物先后用无水吡啶、盐酸羟胺、肌醇六乙酯(内标)和无水乙酸酐进行衍生化处理后直接用于GC分析。GC分析条件:日本岛津OV-1701石英毛细管柱(30m×0.32mm);载气为氮气;氢火焰离子化检测器检测;检测器和气室室温度均为260℃;柱温采用程序升温,从150~190℃过程中的升温速率为7℃/min,190~260℃过程中的升温速率为15℃/min,进样量为1μL。

2.6 多糖的红外光谱分析

将干燥的LBP3-I 5mg加入到750mg KBr中在研钵中研磨均匀^[7],压片,置于红外光谱仪中分析。

2.7 环境扫描电镜观察

取少量干燥LBP3-I样品平铺置于金属片的导电胶上,用吸耳球吹去表面浮样,置真空喷镀仪内喷金后在环境扫描电镜下观察。

2.8 原子力显微镜观察

将LBP3-I用蒸馏水溶解至10μg/mL,用微量移液枪移取5μL样液滴在新剥离的云母片上,30min后在SPM—9500J3原子力显微镜Tapping模式下观察。测试条件:常温常压,湿度50%~60%,探针为Si₃N₄,微悬臂长度200μm,力弹性常数为0.12 N/m^[8]。

3 结果与分析

3.1 紫外光谱分析

利用紫外-可见分光光度计对枸杞多糖进行光谱扫描。结果显示在 204 nm 波长处有多糖的单一吸收峰,且在 350~550 nm 波长内,没有发现类胡萝卜素的特征吸收峰^[9]。但在 260~280 nm 处出现较明显的吸收峰,说明 LBP 为一种成分均一的糖蛋白复合体^[10]。

3.2 LBP3 Sephadex G-150 凝胶色谱柱纯化结果

由图 1 可见,经 SephadexG-150 凝胶色谱柱纯化的多糖流出曲线呈单一对称峰,说明 LBP3-I 是相对分子质量分布均一的多糖组分,在波长 260~280 nm 处测得的吸收曲线上有明显的单一蛋白吸收峰,且两峰首尾重合,峰形对称,说明其为多糖的结合蛋白。

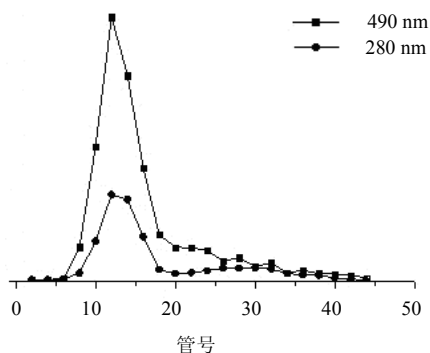
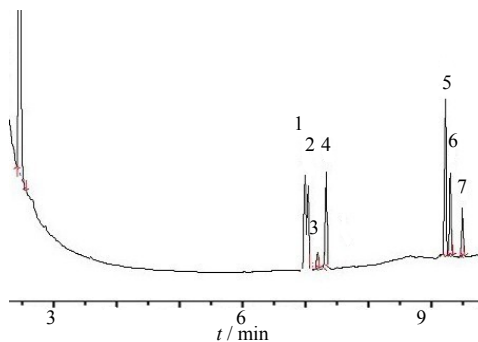


图 1 LBP3 在 Sephadex G-150 凝胶色谱柱上的洗脱曲线
Fig. 1 Elution curves of LBP3 on Sephadex G-150 gel column

3.3 LBP3-I 的单糖组分分析

3.3.1 标准单糖的 GC 分析 对几种标准单糖的混合样品进行 GC 分析,可得出几种标准单糖出峰时的保留时间,并对其定性,结果见图 2。

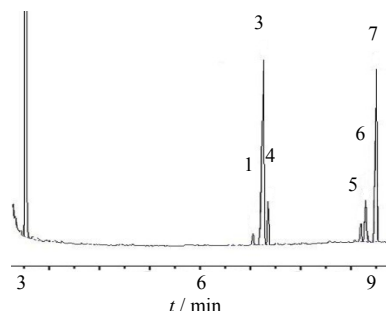


1-鼠李糖 2-核糖 3-阿拉伯糖 4-木糖 5-甘露糖 6-葡萄糖 7-半乳糖
1-rhamnose 2-ribose 3-arabinose 4-xylose 5-mannose 6-glucose 7-galactose

图 2 标准单糖混合样品 GC 图

Fig. 2 Gas chromatography of standard monosaccharides mixed samples

3.3.2 LBP3-I 的单糖组分分析 根据图 2 中各个单糖的保留时间,对枸杞多糖亚组分 LBP3-I 的 GC (图 3) 分析可知 LBP3-I 由 6 种单糖组成,分析计算得 6 种单糖鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖摩尔比为 2.07:2.38:3.11:1.00:1.12:2.86。



1-鼠李糖 3-阿拉伯糖 4-木糖 5-甘露糖 6-葡萄糖 7-半乳糖
1-rhamnose 3-arabinose 4-xylose 5-mannose 6-glucose 7-galactose

图 3 LBP3-I 的气相色谱图

Fig. 3 Gas chromatogram of LBP3-I

3.4 IR 分析

枸杞多糖 LBP3-I 的 IR 分析结果显示,3 431.64 cm^{-1} 的宽峰是 O-H 的伸缩振动,2 934.45 cm^{-1} 的吸收峰表明含有 C-H 的伸缩振动,两者是糖类的特征吸收峰,同时说明 LBP3-I 中含有大量 H 键,1 650.42 cm^{-1} 的吸收峰是乙酰氨基的 C=O 伸缩振动,1 454.26 cm^{-1} 的吸收峰是 C-H 变角振动,1 078 cm^{-1} 的吸收峰是吡喃糖 C-O-C 环内醚中的 C-O 伸缩振动^[11],854.42 cm^{-1} 吸收峰则是代表 α -D-葡萄糖吡喃糖^[12]。

3.5 环境扫描电镜分析

图 4-a 和 4-b 是枸杞多糖样品 LBP3-I 分别放大 2 500 倍和 5 000 倍下的扫描电镜图像。图 4-a 表明枸杞多糖呈链状多分支结构,并且彼此相互交错聚集形成环状。图 4-b 中可清楚观察到糖链的聚集,且直径约为 1.5 μm ,远大于单链直径的理论值 0.1~1.0 nm,说明多糖分子间存在较强的相互作用,在固体状态下多以大的聚集缠绕态存在。

3.6 原子力显微镜观察

枸杞多糖的原子力显微镜图像见图 5。多糖分子的密度与样品质量浓度和沉积到云母表面的量有关,质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时可以得到较为分散的单分子图像。在图 5-a 中,可以看到枸杞多糖呈链状并且具有分枝结构,主链长几百纳米到几微米不等,支链长度在 100~300 nm 内。图 5-b 是糖单链的放大图像,经过测量,得单链的高度约为 1.52 nm,结果接近于多糖单链分子的理论大小,宽度约为 65 nm。

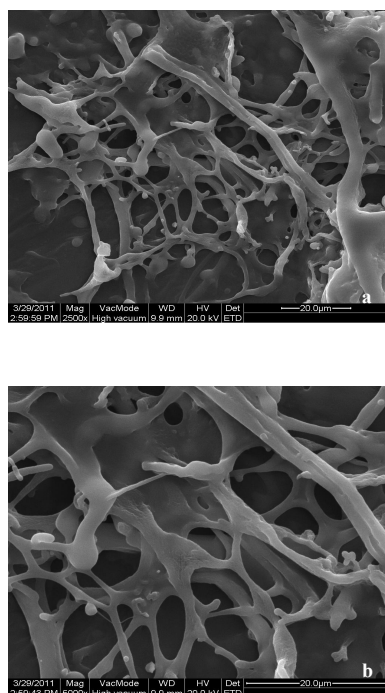


图 4 LBP3-I 的环境扫描电镜照片

Fig. 4 ESEM images of LBP3-I

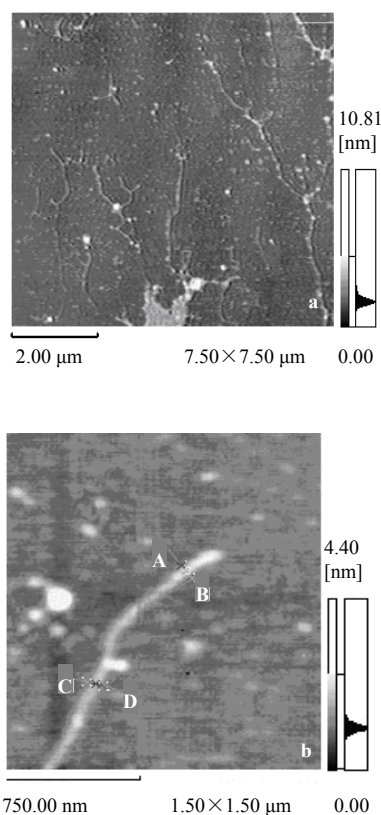


图 5 LBP3-I 的 AFM 图像

Fig. 5 AFM images of LBP3-I

4 讨论

本实验采用传统热水提取法不会对枸杞多糖的天然结构产生影响,如分子链的断裂和基团的异位等。采用 Sevage 脱蛋白法虽然对糖的损耗量较大,且不能一次脱净,但试剂较温和,保证了枸杞多糖在提取过程中能最大程度地保持其结构的完整性。

已脱过游离蛋白的 LBP3-I 在 280 nm 处的紫外吸收曲线出现单一对称峰且与 490 nm 处的吸收峰首尾重和,说明多糖中糖和蛋白以相互结合的方式存在。红外光谱在 $1\,650.42\text{ cm}^{-1}$ 处出现乙酰氨基的 C=O 的伸缩振动进一步证实了 LBP3-I 为一种糖蛋白复合物。

通过 GC 对枸杞多糖单糖组分的测定,结果发现单糖种类与以往研究结果基本相同,但是单糖间比例却存在一定差异,这可能与不同多糖亚组分的理化性质以及不同的提取和纯化工艺有关。

AFM 观察发现, LBP3-I 单链的厚度为 1.39~1.65 nm,长度从几百纳米到几个微米不等,宽度为 60~71 nm,远大于单链分子的估算值,这可能是由于扫描过程中的“加宽效应”引起的。

参考文献

- [1] van Vliet T, Visser J E, Luyten H. On the mechanism by which oil uptake decreases crispy/crunchy behaviour of fried products [J]. *Food Res Int*, 2007, 40(9): 1122-1128.
- [2] 李英杰, 齐春会, 张永祥. 枸杞多糖免疫调节作用机制研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(10): 882-886.
- [3] 甘璐, 张声华. 枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响 [J]. *营养学报*, 2003, 25(2): 200-202.
- [4] 王建华, 王汉中, 张民, 等. 枸杞多糖延缓衰老的作用 [J]. *营养学报*, 2002, 24(2): 189-191.
- [5] Wang Y B, Zhang Y C, Zhu Z Y, *et al.* Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 2528-2532.
- [6] 石磊, 王勇, 石勇, 等. 虎眼万年青多糖的原子力显微镜观察 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2003, 29 (1): 32.
- [7] 马虎飞, 王思敏, 杨章民. 陕北野生枸杞多糖的体外抗氧化活性 [J]. *食品科学*, 2011, 32(3): 61.
- [8] 张润广, 张静. 甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研究 [J]. *化学学报*, 2006, 24(64): 2467-2472.
- [9] 孙汉文, 刘占峰. 枸杞多糖的超声波辅助水提取与分级纯化 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30(3): 232.
- [10] 何晋浙, 胡飞华, 孙培龙, 等. 枸杞多糖结构及其单糖组分的分析研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(5): 49.
- [11] 何晋浙, 邵平, 倪慧东, 等. 灵芝多糖结构及其组成研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(1): 124.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.