

龙牙百合多糖的纯化及其分子量的测定

陈小蒙^{1,2}, 刘成梅^{1,2,*}, 刘伟^{1,2}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.南昌大学中德食品工程中心, 江西 南昌 330047)

摘要:本研究用 DEAE-sepharose Fast Flow 柱从百合水提物中分离纯化得到两种多糖 LLP₁、LLP₂, 经高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)鉴定 LLP₁ 为单一组分、LLP₂ 为糖蛋白, 将这两种多糖进行气相色谱分析。结果如下: LLP₁ 由甘露糖、葡萄糖和阿拉伯糖组成, 分子量为 11756D, LLP₂ 由半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖组成, 分子量 1038773D。

关键词: 龙牙百合多糖; 纯化; 分子量; HPGPC

Purification and Molecular Weight Determination of *Longya lili* Polysaccharide

CHEN Xiao-meng^{1,2}, LIU Cheng-mei^{1,2,*}, LIU Wei^{1,2}

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2.Sino-German Food Engineering Center, Nanchang university, Nanchang 330047, China)

Abstract: Two polysaccharides (LLP₁ and LLP₂) were isolated from *Longya lili* water extract with DEAE-Sepharose Fast Flow column. They are identified as pure polysaccharide and glycoprotein by HPGPC, respectively. The monosaccharide compositions of LLP₁ consist of Man, Glu and Ara, and its molecular weight is 11756 D. The monosaccharide compositions of LLP₂ are Gal, Rha and Ara and its molecular weight is 1038773 D.

Key words: *Longya lili* polysaccharide (LLP); purification; molecular weight; HPGPC

中图分类号: R284.2; O636.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)11-0305-03

百合是卫生部审批通过的首批药食两用品, 作为百合中主要功能成分之一的百合多糖具有降血糖、抗肿瘤、调节免疫力等^[1-3]功能, 国内外对其结构的研究未见详细报道。目前已纯化出 7 种百合多糖, 测得重均相对分子质量分别是 79400、75000、53700、30200、18150、17900、13400, 单糖组成分析表明其中多数为杂多糖, 但进一步的结构信息, 如单糖之间的连接方式等, 仍有待于进一步研究。

本研究从龙牙百合水提液中分离纯化鉴定了两种龙牙百合多糖, 为龙牙百合保健食品的开发研究提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

DEAE-Sepharose Fast Flow Amersham Biosciences 核糖(Rib)、木糖(Xyl)、半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glu)、甘露糖(Man)、阿拉伯糖(Ara)、鼠李糖(Rha)为国产生化试剂; T-2000、T-70、T-40、T-10 Sigma 公司; 兰

色葡聚糖、G-25 Pharmacia 公司; 木瓜蛋白酶(Papain 沃凯); 牛血清蛋白(生化试剂) AMRESCO 公司; 肌醇六乙酸酯、无水吡啶、无水醋酸酐、盐酸羟胺、硫酸、蒽酮、碳酸钡、无水乙醇、丙酮、正丁醇、三氯甲烷、丙醇、Tris 碱等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

AR1140 分析天平 美国 OHAUS 公司; BSZ-100 分部收集器 上海沪西分析仪器厂; TH-500 梯度洗脱仪 上海沪西分析仪器厂; BT-100 恒流泵 上海琪特分析仪器有限公司; 2.5 × 40cm 层析柱、1.5 × 50cm 层析柱 南昌大学; UV-2000 型紫外分光光度计 日本日立公司; 6890N 型气相色谱仪 美国安捷伦公司; 真空冷冻干燥机 美国 LABCONCO 公司; Ultrahydrogel™500 色谱柱(7.8 × 300mm); Waters 高效液相色谱仪(配双泵、柱温箱、2410 示差检测器和 2487 紫外检测器)。

1.3 方法

1.3.1 水溶性百合多糖的提取

采用水提醇沉法。

收稿日期: 2007-11-30

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0540)

作者简介: 陈小蒙(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物提取分离。E-mail: cowchenxiaomeng@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 刘成梅(1963-), 男, 教授, 研究方向为食品加工新技术与功能食品。E-mail: chengmeiliu@yahoo.com.cn

1.3.2 多糖和蛋白含量的测定

分别采用蒽酮-硫酸法和考马斯亮蓝 G-250 法测定。

1.3.3 水溶性百合多糖的纯化

采用 DEAE-sepharose Fast Flow(2.5 × 36cm)柱分离法^[41]。

准确吸取 4ml 20mg/ml 精制多糖溶液上样, 5min 后待多糖渗入柱子之后, 以 pH6.0 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 流速为 2ml/min, 流份于自动部分收集器上按 5ml/管接收, 隔管用蒽酮-硫酸法检测, 直至无洗脱峰为止。再用 250ml 1mol/L NaCl 和 250ml pH 6.0 Tris-HCl 缓冲液(混合瓶), 进行梯度洗脱, 流速不变, 按 5ml/管接收, 隔管用蒽酮-硫酸法检测, 直至无洗脱峰出现为止, 合并洗脱单峰, 透析, 浓缩后冻干, 得百合多糖纯品 LLP₁、LLP₂。同时在 280nm 下测定蛋白含量, 绘出蛋白曲线。

1.3.4 百合多糖的纯度检验与分子量测定

1.3.4.1 高效凝胶渗透色谱法鉴定 LLP₁、LLP₂ 纯度^[5-6]

高效凝胶渗透色谱法分析, 采用 Waters 高效液相色谱仪, Ultrahydrogel™500 色谱柱(7.8 × 300mm)凝胶柱, RI2410 检测器, DAD2996 检测器, 流动相为超纯水, 洗脱流速为 0.6ml/min, 柱温与示差检测器温度: 35℃, 进样量为 20μl。样品溶液和洗脱液用 0.45μm 滤膜过滤。

1.3.4.2 HPGPC 法测定 LLP₁、LLP₂ 分子量^[7-8]

色谱条件同 1.3.4.1。以葡萄糖和葡聚糖系列(T-2000, T-70, T-40 和 T-10)为标准, 配成等浓度溶液, 依次上样后, 以保留时间为横坐标, 以分子量的常用对数为纵坐标绘制标准曲线, 然后根据 LLP₁、LLP₂ 的保留时间求得计算分子量。

1.3.5 糖醛酸含量测定

采用硫酸味唑法。

1.3.6 气相色谱法分析单糖组成^[9]

将单糖衍生生成糖醇乙酸酯后进行气相色谱测定。

气相色谱分析条件: 色谱柱 DB-1701 弹性石英毛细管色谱柱(30cm × Φ 0.32mm), 固定相 OV-225; 采用氢火焰离子化检测器(FID); 载气 N₂ 流速为 2.1ml/min, 空气流速为 450ml/min, H₂ 流速为 40ml/min; 进样口温度 280℃; 柱温 220℃; 检测器温度 260℃。初始柱温 160℃(2min), 程序升温 10℃/min 至 240℃(15min)。

2 结果与分析

2.1 百合多糖的纯化

图 1 为水溶性百合多糖的 DEAE-sepharose Fast Flow 柱洗脱曲线, 由图 1 可知, 第一个组分峰 LLP₁ 比较尖锐且对称, 没有蛋白吸收, 第二个组分峰 LLP₂ 宽广, 与一个蛋白质峰部分重叠。在进一步纯化过程中, 可进

一步将游离蛋白质去除, 然而仍然有少量的蛋白质与糖相结合, 因此可以初步认定为 LLP₂ 中含有糖蛋白。

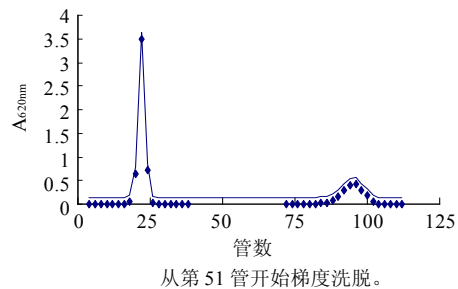


图 1 百合多糖的 DEAE-Sepharose Fast Flow 洗脱曲线 (2ml/min)
Fig.1 Elution curve of LLP from DEAE-Sepharose Fast Flow (2 ml/min)

2.2 百合多糖的纯度检验

将纯化所得 LLP₁、LLP₂ 配成 10mg/ml 水溶液, 按 1.3.4.1 步所述 HPGPC 方法, 得纯品的高效液相凝胶渗透色谱的示差和 280nm 处的紫外谱图(图 2), 一定浓度的葡萄糖溶液在同样条件下进行样分析。

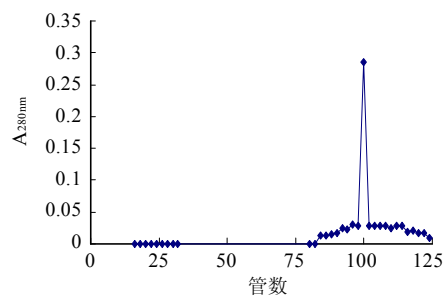


图 2 蛋白吸收曲线
Fig.2 Absorption curve of protein

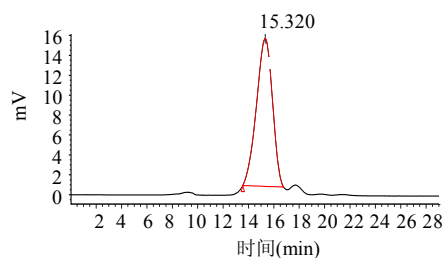


图 3 百合多糖 LLP₁ 的高效液相凝胶渗透色谱示差谱图
Fig. 3 HPGPC chromatogram of LLP₁ determined by RI detector

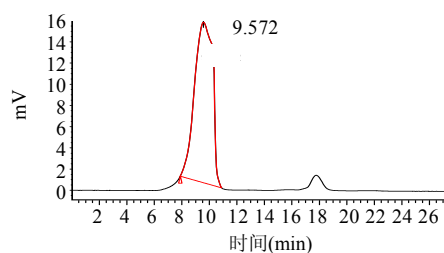


图 4 百合多糖 LLP₂ 的高效液相凝胶渗透色谱示差谱图
Fig. 4 HPGPC chromatogram of LLP₂ determined by RI detector

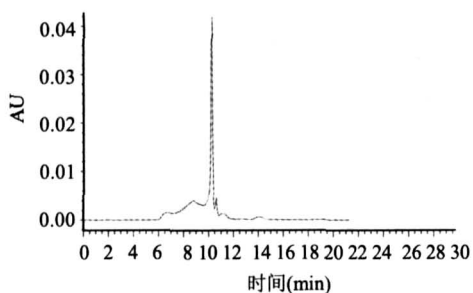


图5 百合多糖 LLP₂ 的高效液相凝胶渗透色谱紫外谱图(280 nm)
Fig.5 HPGPC chromatogram of LLP₂ determined by UV detector (280 nm)

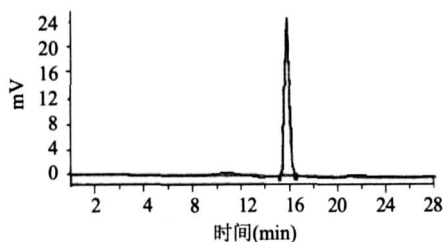


图6 葡萄糖的高效液相凝胶渗透色谱示差谱图
Fig.6 HPGPC chromatogram of glucose determined by RI detector

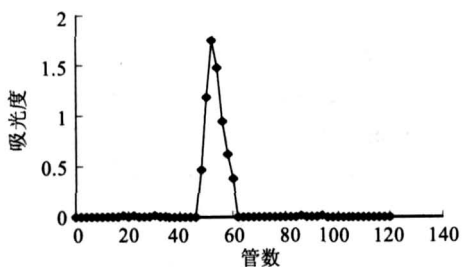


图7 百合多糖 LLP₂ 的 Sephadex G-25 层析图
Fig.7 Sephadex G-25 chromatogram of LLP₂

从图3中可看出, LLP₁ 在 15.320min 得一狭窄对称峰, 由此可认为纯化所得 LLP₁ 为均一多糖。从图4中可看出, LLP₂ 在 9.572min 得一较狭窄峰, 17.747min 有一对称峰。图6葡萄糖的保留时间 17.191min, LLP₂ 在 17.747min 洗脱出的峰所对应的物质是分子量比葡萄糖还小的物质。

本实验又将 LLP₂ 经 SephadexG-25 凝胶柱分离, 通过变化条件分出单一组分。LLP₂ 经 NaCl 溶液在凝胶柱上淋洗, 蒽酮硫酸法检测, 得到一对称的单一尖峰, 如图7, 没有第二个峰出现, 可以初步判断该小分子物质不是小分子的糖。结合图5, LLP₂ 示差单峰和紫外 280nm 单峰的最大值基本重叠, 可以认为其是均一糖蛋白。

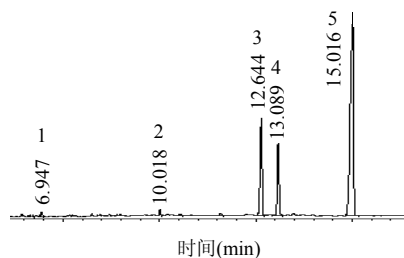
2.3 HPGPC 法测定百合多糖的分子量

以保留时间为横坐标, 以分子量的常用对数为纵坐标绘制标准曲线, 得 $\log Mw = -0.3386tR + 9.2576 (R = 0.9977)$ 。LLP₁、LLP₂ 的保留时间分别为 15.320、9.572min, 从该方程上可求得 LLP₁、LLP₂ 的计算分子量分别为 11756、1038773D。

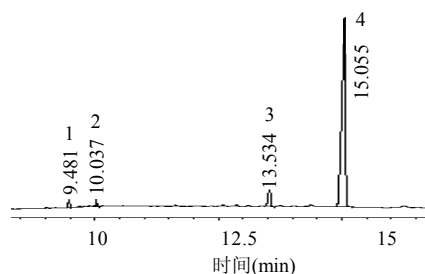
2.4 糖醛酸含量

通过硫酸咔唑比色法, 测定 LLP₁、LLP₂ 中糖醛酸的含量分别为 4.02% 和 77.13%。

2.5 气相色谱法分析单糖组成



1、4. 葡萄糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 甘露糖; 5. 内标。
图8 LLP₁ 水解产物气相色谱图
Fig.8 Gas chromatogram of LLP₁ hydrolysates



1. 鼠李糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 半乳糖; 4. 内标。
图9 LLP₂ 水解产物气相色谱图
Fig.9 Gas chromatogram of LLP₂ hydrolysates

图8、9 分别是 LLP₁、LLP₂ 水解后各种单糖糖腈乙酸酯衍生化后的气相色谱分析结果。根据 LLP₁、LLP₂ 的 GC 图和各种单糖标准品核糖、木糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖的 GC 图比较, 可以确定 LLP₁ 中主要含有甘露糖、葡萄糖和阿拉伯糖, LLP₂ 主要含半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖。

参考文献:

- [1] 赵国华, 李志孝, 陈宗道. 百合多糖的化学结构及抗肿瘤活性[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 62-66.
- [2] 刘成梅, 付桂明, 涂宗财, 等. 百合多糖降血糖功能研究[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 113-114.
- [3] 李卫民. 百合的药理作用研究[J]. 中药材, 1990, 13(6): 31-34.
- [4] 张唯杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 366-370.
- [5] CHEN Y, XIE M Y, NIE S P. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of Ganoderma atrum[J]. Food Chemistry, 2008, 107: 231-234.
- [6] 魏远安, 方积年. 高校凝胶渗透色谱法测定多糖纯度及分子量[J]. 药学报, 1989, 24(7): 532-536.
- [7] 万茵. 车前子多糖、黄铜和苯乙醇苷类的纯化、结构解析及其活性功能研究[D]. 南昌大学学报, 2007: 48-58.
- [8] 李昌, 谢明勇, 聂少平, 等. 库克 Noni 果汁多糖含量及分子量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 143-147; 179.
- [9] 康学军, 曲见松, 顾忠泽. 白芷多糖的分析[J]. 分析化学, 2006, 34(4): 533-535.