

两种石耳中多糖的提取与分离纯化及其单糖组成分析

古丽扎尔·阿布都克依木, 努尔比亚·亚力坤, 克热木江·吐尔逊江, 阿不都拉·阿巴斯*
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的:对网脊石耳(*Umbilicaria decussate*(Vill.)Zahlbr.)和淡肤根石耳(*Umbilicaria virginis*Schaer.)多糖中的单糖组成进行研究。方法:两种石耳经水提、醇沉、冷冻干燥得水溶性多糖,经DEAE-52离子交换层析柱和Sephadex G-150凝胶柱进行分离纯化得纯化多糖。气相色谱分析所得多糖的单糖组成。结果:淡肤根石耳精制多糖的单糖组成为甘露糖、葡萄糖、半乳糖,其含量之比为16.00:50.96:6.17、淡肤根石耳纯化多糖的单糖组成为甘露糖、葡萄糖、半乳糖,其含量之比为2.97:17.70:1.52;网脊石耳精制多糖的单糖组成为甘露糖、葡萄糖、半乳糖,其含量之比为3.90:38.086:2.00、网脊石耳纯化多糖只含葡萄糖,含量为5.37%。结论:网脊石耳和淡肤根石耳都含有葡萄糖,含有少量的甘露糖和半乳糖。

关键词:网脊石耳;淡肤根石耳;气相色谱;单糖

Isolation, Purification and Monosaccharide Composition Analysis of Polysaccharides from Two *Umbilicaria* Species

Gulzar ABDUKEYUM, Nurbiya YALKUN, Kerimjan TURSUNJAN, Abdulla ABBAS*
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

Abstract: Objective: To analyze the monosaccharide composition of polysaccharides extracted from two *Umbilicaria* species: *Umbilicaria decussate* (Vill.) Zahlbr and *Umbilicaria virginis* Schaer.. Methods: Water-soluble polysaccharides from both *Umbilicaria* species were obtained by water extraction, ethanol precipitation and freeze-dried and purified into fractions SUv and ZUd, respectively by sequential column chromatography on DEAE-52 and Sephadex G-150. Gas chromatography (GC) was used to analyze their monosaccharide composition. Results: The monosaccharide composition of crude *Umbilicaria virginis* polysaccharides was composed of mannose, glucose and galactose at a ratio of 16.00:50.96:6.17. The monosaccharide composition of SUv was comprised of mannose, glucose and galactose at a ratio of 2.97:17.70:1.52. The monosaccharide composition of crude *Umbilicaria decussate* polysaccharides was made up of mannose, glucose and galactose at a ratio of 3.90:38.086:2.00. ZUd contained only 5.37% glucose. Conclusion: Both *Umbilicaria decussata* and *Umbilicaria virginis* contain glucose and a small amount of mannose and galactose.

Key words: *Umbilicaria decussate* (Vill.) Zahlbr.; *Umbilicaria virginis* Schaer.; gas chromatography; polysaccharides; monosaccharides

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0048-04

地衣作为民间草药治病已有很长历史^[1]。石耳的药用价值也很高,传统医学认为地衣多糖具有很强的抗癌,抗肿瘤活性^[2-3],能增强机体的免疫能力^[4],其药性淡、甘平、无毒,有清热、解毒^[5-6]、健胃、消食、利水、消肿、驱虫等功效^[7],主治消化不良、腹疼、

痢疾、小儿疳积、妇女白带异常等症^[8]。民间常用石耳治喉痛、肠炎、痢疾、鼻出血、吐血、毒蛇咬伤等症^[9-10]。至今石耳在大山中以野生状态沉睡,尚未进行人工培植与系统研究,有待我们去开发利用。淡肤根石耳和网脊石耳属于子囊地衣纲,茶渍目,石耳科,

收稿日期: 2011-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960003; 31040004)

作者简介: 古丽扎尔·阿布都克依木(1985—),女,硕士,主要从事资源植物研究。E-mail: gulzargul@sina.com

*通信作者: 阿不都拉·阿巴斯(1951—),男,教授,本科,主要从事资源植物研究。E-mail: abdulla@xju.edu.cn

石耳属^[11]。本实验选取这两种石耳属地衣为研究对象,进行分离纯化及单糖组成分析,为开发高效低毒副作用的抗癌、抗肿瘤食品,为食用地衣资源开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

网脊石耳和淡肤根石耳于2009年10月采自于新疆天山一号冰川,海拔3520m,并经新疆大学“中国西北地区地衣研究中心”阿不都拉·阿巴斯教授鉴定为石耳科(Umbilicariaceae),石耳属(*Umbilicaria* Hoffm.),网脊石耳(*Umbilicaria decussate*(Vill.)Zahlbr.)和淡肤根石耳(*Umbilicaria virginis* Schaer.)。

无水乙醇、石油醚、乙醚、正丁醇、氯仿、丙酮、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、蒽酮、浓硫酸、碳酸钡、盐酸羟胺、肌醇、醋酸酐、吡啶均为分析纯;单糖标准品:葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖由新疆润新公司提供。

1.2 仪器与设备

DF310A 型粉碎机 江苏省南通友邦机械有限公司;SHZ-D 循环水式真空泵、HH-S 型水浴锅 巩义市英峪予华仪器厂;AL104 型电子分析天平 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;RE-52A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;LAMBDA17 型紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司;DHG-9141A 型电热恒温干燥箱 上海精宏试验设备有限公司;Heraeus D-37520 台式离心机 德国 Kendro 公司;HT6890 气相色谱仪 美国 Aglient 公司。

1.3 多糖提取

石耳干粉置于索氏提取器中用氯仿提取无色为止(除去脂溶性杂质和一些干扰色素)^[12]。然后置于温度80的水浴锅中,水体积和石耳干粉质量比20:1,蒸馏水回流提取180min,加乙醇沉淀。沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗两次,冷冻干燥得石耳粗多糖,Sevag 试剂脱蛋白,透析,冷冻干燥^[13-15]得精制多糖。

1.4 两种石耳多糖定性测定

取少量的两种石耳精制多糖,分别放入冷水、热水、稀酸、稀碱、乙醇、丙酮、乙醚、石油醚、氯仿、正丁醇中,观察其溶解状况。进行蒽酮-硫酸法显色反应、碘-碘化钾反应、Molish 反应、茚三酮实验、紫外光谱扫描。

1.5 两种石耳多糖的分级纯化

将两种石耳精制多糖溶于水中得2mL 高浓度的精制多糖溶液,分别过 DEAE-52 离子交换层析柱和 Sephadex G-150 柱进行分级纯化,在波长615nm 处用蒽酮硫酸法跟踪检测多糖含量,得到分子质量不同的纯化多糖^[16]。

1.6 冻融纯度分析

取透析后的SephadexG-150组分多糖溶液置于-80冰箱冷冻过夜,之后60℃水浴融化,10000r/min 离心20min 后观察是否有沉淀生成。

1.7 多糖的水解

20mg 两种石耳精制多糖及纯化多糖于安瓿瓶中,加入2mol/L 硫酸5mL,封口,在110℃水解6h,加入过量BaCO₃静置过夜,至中性除去BaCO₃沉淀,真空冷冻干燥得到各样品单糖混合物,备用^[16]。

1.8 糖腈乙酰酯衍生物的制备

精确称取水解后的两种精制多糖及纯化多糖的单糖混合物10mg,盐酸羟胺10mg,内标(肌醇六乙酸酯)7mg,加入吡啶0.5mL,放入90℃水浴中加热反应30min 并搅拌振荡。取出冷却至室温,加入0.5mL 醋酸酐,在90℃水浴中继续反应30min 进行乙酰化,反应产物1000r/min 离心5min,取上清液进行气相色谱分析。各标准品单糖的糖腈乙酰酯衍生物采用按上述方法制备。

1.9 气相色谱分析条件

气相色谱仪配备石英毛细管柱(HP-5);FID 检测器;程序升温:柱初温190℃,保留2min,以5℃/min 升温至230℃,保留5min;气化室温度:230℃;进样量:1μL;分流比30:1;载气:N₂ 1mL/min, H₂ 30mL/min, 空气300mL/min。

1.10 单糖组分定性定量分析

淡肤根石耳和网脊石耳精制多糖及纯化多糖与标准品单糖的色谱峰保留值进行对照,以确定样品中单糖的种类,采用内标法根据内标物和试样的质量以及内标物和被测组分的峰面积求出样品中单糖的含量^[17-18]。单糖含量按以下公式计算。

$$\text{某单糖含量} \% = \frac{A_i}{A_{ii}} \times \frac{A_s}{A_{is}} \times \frac{m_s}{m_{is}} \times \frac{m_{ii}}{m} \times 100$$

式中: A_i 表示样品中某单糖峰面积; A_{ii} 表示样品中加入的内标物峰面积; A_{is} 表示标准样品中加入的内标物的峰面积; A_s 表示某单糖标准样品峰面积; m_s 表示某单糖标准样品的质量/mg; m_{is} 表示标准样品中加入的内标物的质量/mg; m_{ii} 表示样品中加入的内标物的质量/mg; m 表示称取糖样品的质量/mg。

2 结果与分析

2.1 多糖的定性实验结果

通过定性实验可知,两种石耳精制多糖为灰白色絮状固体。可溶于冷水、尤其溶于热水中,网脊石耳多糖比淡肤根石耳多糖易溶于水中,不溶于乙醇、丙酮、乙醚、氯仿、正丁醇等有机溶剂,蒽酮-硫酸和Molish 反应呈阳性,说明具有一般多糖的性质。茚三酮实验呈阴性,说明无大量的蛋白质和氨基酸等杂质。碘-碘

化钾反应呈阴性,说明不含淀粉。两种石耳精制多糖经紫外光谱扫描,在波长 260nm 和 280nm 处没有特征吸收峰,说明两种石耳精制多糖样品中没有大量的蛋白质和核酸杂质存在。

2.2 DEAE-52 离子交换柱层析结果

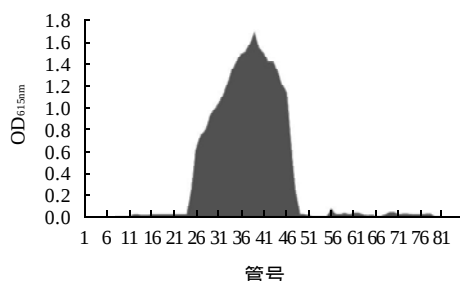


图1 淡肤根石耳精制多糖 DEAE-52 离子交换柱层析

Fig.1 Elution profile of *U. virginis* polysaccharides from DEAE-52 column (615 nm)

从图 1 可见,当用 0.1mol/L NaCl 洗脱,蒽酮-硫酸法隔管跟踪检测多糖流出部位时得到了一个大峰的洗脱曲线,然后没有明显洗脱峰出现,同一洗脱峰的多糖液合并,当接着用 2mol/L NaCl 洗脱时得到特别小的洗脱峰,组分含量较低,难以进行后一步研究,然后再没有多糖检测出来。所以只用 0.1mol/L NaCl 洗脱,得到组分命名为 SUv。

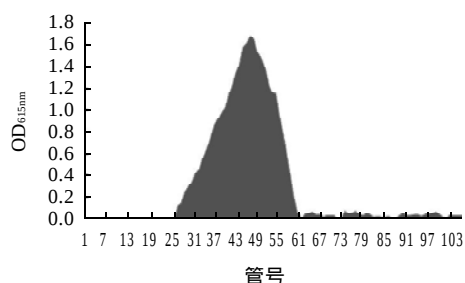


图2 网脊石耳精制多糖 DEAE-52 离子交换柱层析

Fig.2 Elution profile of *U. decussata* polysaccharides from DEAE-52 column (615 nm)

从图 2 可见,用 0.1mol/L NaCl 洗脱时出现了大峰,2mol/L NaCl 洗脱时得到特别小而且不规则的洗脱峰,考虑到组分含量较低,只用 0.1mol/L NaCl 洗脱,得到组分命名为 ZUd。

2.3 Sephadex G-150 凝胶柱层析纯度鉴定

从图 3 可知,通过对淡肤根石耳多糖 0.1mol/L NaCl 洗脱组分 SUv 进行凝胶柱层析,得到了单一洗脱峰,说明 SUv 为单纯的多糖组分。

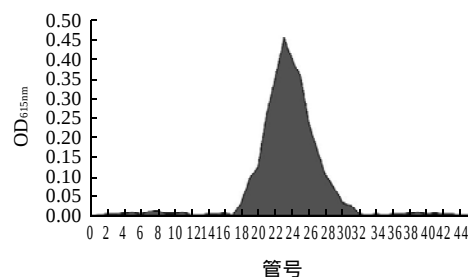


图3 淡肤根石耳 SUv 多糖 Sephadex G-150 凝胶柱层析

Fig.3 Elution profile of *U. virginis* polysaccharides from Phadex G-150 gel column (615 nm)

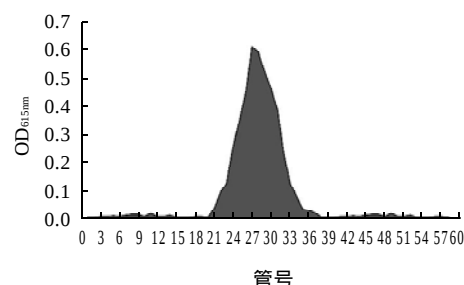


图4 网脊石耳 ZUd 多糖 Sephadex G-150 凝胶柱层析

Fig.4 Elution profile of *U. decussata* polysaccharides from Phadex G-150 gel column (615 nm)

从图 4 可见,通过对网脊石耳多糖 0.1mol/L NaCl 洗脱组分 ZUd 进行凝胶柱层析,也得到了一个单一洗脱峰,说明 ZUd 为单纯的多糖组分。

2.4 冻融实验分析

冻融实验结果表明,无沉淀形成,说明 ZUd 网脊石耳多糖和 SUv 淡肤根石耳多糖都是分子质量均一的组分,可以对其进行结构、性质研究。

2.5 单糖组成分析

表 1 标准单糖糖腈乙酰化衍生物的气相色谱分析结果

Table 1 GC analysis of standard monosaccharides

单糖标准品	保留时间/min	标准单糖峰面积(pA·s)	内标物峰面积(pA·s)
甘露糖	14.536	495.53644	250.19392
木糖	12.096	305.86130	134.76381
阿拉伯糖	11.926	266.86996	134.78598
鼠李糖	11.723	350.65091	161.17389
半乳糖	14.926	411.05597	153.79062
葡萄糖	14.659	393.63132	179.79280

表 2 淡肤根石耳精制多糖的气相色谱分析结果

Table 2 Monosaccharide composition of crude *U. virginis* polysaccharides determined by GC

单糖组分	保留时间/min	峰面积(pA·s)	含量/%
甘露糖	14.514	66.63790	16.00
葡萄糖	14.641	234.66000	50.96
半乳糖	14.926	34.67942	6.17
内标物	4.080	210.33746	

表3 淡肤根石耳纯化多糖的气相色谱分析结果

Table 3 Monosaccharide composition of SUv determined by GC

单糖组分	保留时间/min	峰面积(pA·s)	含量/%
甘露糖	14.516	17.99317	2.97
葡萄糖	14.627	118.52328	17.70
半乳糖	14.896	12.42990	1.52
内标物	4.085	305.8884	

表4 网脊石耳精制多糖的气相色谱分析结果

Table 4 Monosaccharide composition of crude *U. decussata* polysaccharides determined by GC

单糖组分	保留时间/min	峰面积(pA·s)	含量/%
甘露糖	14.499	17.94938	3.90
葡萄糖	14.626	193.56729	38.08
半乳糖	14.881	12.42990	2.00
内标物	4.060	232.16504	

表5 网脊石耳纯化多糖的气相色谱分析结果

Table 5 Monosaccharide composition of ZUd determined by GC

单糖组分	保留时间/min	峰面积(pA·s)	含量/%
葡萄糖	14.620	35.34955	5.37
内标物	4.075	300.59036	

淡肤根石耳和网脊石耳精制多糖及纯化多糖以及标准单糖样品的糖脎乙酰化衍生物的气相色谱图谱略。各样品的气相色谱图解析见表1~5。将样品的气相色谱图与标准单糖气相色谱图进行对照,通过保留时间定性样品。

通过标准单糖,多糖样品淡肤根石耳精制多糖和网脊石耳精制多糖及淡肤根石耳纯化多糖和网脊石耳纯化多糖的GC分析表可知,淡肤根石耳精制多糖、网脊石耳精制多糖、淡肤根石耳纯化多糖含有葡萄糖、甘露糖、半乳糖等3种单糖,网脊石耳纯化多糖只含葡萄糖,计算它们单糖的含量之比,淡肤根石耳精制多糖的甘露糖、葡萄糖、半乳糖含量之比为16.00:50.96:6.17;淡肤根石耳纯化多糖的甘露糖、葡萄糖、半乳糖含量之比为2.97:17.70:1.52;网脊石耳精制多糖的甘露糖、葡萄糖、半乳糖含量之比为3.90:38.086:2.00;网脊石耳纯化多糖只含葡萄糖,含量为5.37%。

3 讨论

3.1 本实验用常规的水提法从网脊石耳和淡肤根石耳中提取了粗多糖,并用Savag法连续多次对两种石耳粗多糖进行脱蛋白。紫外光谱分析表明,两种精制多中已没有大量的蛋白质与核酸杂质存在,说明Savag法对网脊石耳多糖和淡肤根石耳多糖来说是相当有效的除去蛋白质的方法。但是本实验中除去蛋白质时用Savag法处理多次才得到彻底的脱蛋白效果。为了简化提取流程,可以考虑利用蛋白酶加Savag法进行脱蛋白。

3.2 在定性实验中网脊石耳精制多糖和淡肤根石耳精制

多糖呈现了典型的多糖类物质的性质。茚三酮反应和碘-碘化钾反应表明无大量的蛋白质和氨基酸等杂质,两种多糖都不含淀粉。

3.3 通过对网脊石耳精制多糖和淡肤根石耳精制多糖进行DEAE-52离子交换柱层析分别得到了洗脱组分ZUd和SUv。通过对得到的洗脱组分ZUd和SUv进行Sephadex G-150凝胶柱层析纯度鉴定,得到了单一的洗脱峰,表明ZUd和SUv是单纯的多糖组分。

3.4 两种粗多糖颜色主要为白色,偏黄,DEAE 52-纤维素和Sephadex G-100柱纯化可以脱去大部分色素,在提取过程考虑到脱色有可能引入新的杂质,因此没有采用另外的脱色步骤。通过对网脊石耳精制多糖和淡肤根石耳精制多糖DEAE 52-纤维素和Sephadex G-100柱层析的分离纯化得到了分子质量均一的多糖组分。

3.5 通过比较淡肤根石耳精制多糖及网脊石耳精制多糖和淡肤根石耳纯化多糖及网脊石耳纯化多糖的气相色谱分析结果可知,纯化时有些单糖损失或者含量特别低没能检测出来,网脊石耳精制多糖纯化后甘露糖和半乳糖没能检测出来。

参考文献:

- [1] 崔桂友,段海.中国食用地衣种类的研究[J].江苏农业研究,2000,21(3):59-62.
- [2] 蔡荣豪,王守奎.庐山石耳[J].现代园艺,2007(1):10.
- [3] WATANABE M, IWAIK, SHIBATA S, et al. Purification and characterization of mouse acid glycoprotein and its possible role in the antitumor activity of some lichen polysaccharides[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(6): 2532-2534.
- [4] NISHIKAWA Y, TANAKA M. Polysaccharides of lichens and fungi. IV. antitumor active O-acetylated pustulan-type glucans from the lichens of *Umbilicaria* species[J]. Chem Pharm Bull, 1970, 18(7): 1431-1434.
- [5] KUNIOT, TADAHIRO T, SHOJI S. Antitumor active polysaccharides of lichens of Stictaceae[J]. Chem Pharm Bull, 1974, 22(2): 404-408.
- [6] 陈健斌.地衣特殊性、多样性及其重要性[J].生物多样性,1995,3(2):113-117.
- [7] 刘瑜琦,陈晔.庐山石耳利用价值及其保护探讨[J].九江学院学报:自然科学版,2005(3):42-43.
- [8] 朱来志.“稀特山珍:石耳”[J].蔬菜,2003(3):37.
- [9] 魏江春.地衣、真菌和菌物的研究进展[J].生物学通报,1998,33(12):2-5.
- [10] 王桂芝,李延忠,王本祥,等.白边岛衣多糖抗肿瘤作用的研究[J].中国中药杂志,1991,16(4):242-244.
- [11] 裴维蕃,余永年,卯晓岚.菌物学大全(地衣部分)[M].北京:科学出版社,1998:449-548.
- [12] 吐尔干乃义·吐尔逊,热衣木·马木提,阿不都拉·阿巴斯.中国树花中地衣多糖的抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2009,35(11):119-121.
- [13] 王丽,阿不都拉·阿巴斯.长松萝及亚花松萝中地衣多糖与松萝酸的提取及抑菌作用[D].乌鲁木齐:新疆大学,2006:1-15.
- [14] 靳菊倩,丁东宁,王晓美,等.头发七多糖的化学研究[J].西北植物学报,2000,20(5):868-872.
- [15] 韩阳花,高莉,刘丽艳,等.酸浆果实中多糖的提取及含量测定[J].食品科学,2006,27(2):154-156.
- [16] 聂凌涛,宁正祥.广州野木瓜水溶多糖的分离纯化及体外抗氧化活性的研究[J].食品科学,2003,24(11):129-133.
- [17] 谭仁祥.植物成分分析[M].北京:科学出版社,2004:136.
- [18] 彭冬兵.香菇中一种抗氧化活性成分的分离及组成分析[D].无锡:江南大学,2008:22.