

SEC – RI – MALLS 技术在香菇多糖分子量与分子量分布分析方面的应用研究*

吴扬兰^{1 2}, 王远亮^{1 2}, 杨力¹

(1. 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400030; 2. 重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心, 重庆 400030)

摘要 目的: 建立香菇多糖分子量、分子量分布测试及构型判断的方法。方法: 采用 SEC – RI – MALLS 联用技术以磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.8 ~ 8.0) 为流动相, SHODEX OHPAK 803HQ, SHODEX OHPAK 804HQ, SHODEX OHPAK 805HQ 为色谱分离柱, 在流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 柱温 30°C 的条件下对香菇多糖在纯水和氢氧化钠溶液中的分子量和分子量分布进行了测试研究。结果: 在超纯水中香菇多糖样品的重均分子量 M_w 为 7.264×10^5 (5%), 在氢氧化钠溶液中香菇多糖样品的 M_w 为 7.486×10^5 (5%), 分子量分布指数 M_w/M_n 分别为 1.541 和 1.561; 通过半径 r_g 对 M_w 作图, 得知香菇多糖在超纯水和氢氧化钠溶液中都得到 U 型曲线, 表明香菇多糖为典型的高支化度结构, 这一结论与香菇多糖真实结构一致。结论: 实验数据显示不同的溶剂对香菇多糖分子量和分子量分布有一定影响; 通过 r_g 对 M_w 作图, 可以对高分子的构型进行判断。

关键词: 激光光散射法; 体积色谱 – 示差检测 – 多角度激光光散射; 香菇多糖; 分子量; 分子量分布; 高分子构型; 测定
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2011)12 – 2256 – 04

Application of SEC – RI – MALLS Technique on the study of lentinan molecular weight and distribution analysis of molecular weight*

WU Yang – lan^{1 2}, WANG Yuan – liang^{1 2}, YANG Li¹

(1. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Research Center of Bioinspired Material Science and Engineering, Chongqing 400030, China)

Abstract Objective: To develop a quantitative method for the lentinan molecular weight and molecular weight distribution by SEC – RI – MALLS Technique. **Methods:** The lentinan relative molecular mass and molecular weight distribution has been measured using SHODEX OHPAK 803HQ, SHODEX OHPAK 804HQ, SHODEX OHPAK 805HQ as the chromatographic separation column, with phosphate buffer solution (pH value of 7.8 – 8.0) as mobile phase at a flow rate of $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and a column temperature of 30°C by SEC – RI – MALLS system. The lentinan's configuration is discussed in pure water and NaOH solution respectively. **Results:** The results showed that the lentinan M_w is 7.264×10^5 (5%) in ultrapure water, and 7.486×10^5 (5%) in NaOH alkaline solution respectively. The molecular weight distribution index M_w/M_n were 1.541 and 1.561 respectively. The r_g on M_w plot indicated that the lentinan in ultrapure water and NaOH alkali solution produced a U – curve. This proves that the lentinan has a typical high degree branching structure. This conclusion consistent with the true structure of lentinan. **Conclusion:** The experimental data showed that different solvents have influential on the molecular weight and molecular weight distribution of lentinan. The configuration of the polymer can be judged with the r_g on M_w plot.

Key words: laser light scattering method; SEC – RI – MALLS; lentinan (LNT); molecular weight; molecular weight distribution; determination

香菇多糖 (lentinan, LNT) 乃天然产物香菇子实体中分离纯化获得的 1 种多糖肽, 具有广泛的生物药物活性。其结构可划分为四级。一级结构以 β – D – (1 – 3) – 葡聚糖为主链结构, 葡萄糖残基为侧链的葡聚糖, 分枝点位于 O – 6 上, 重复结构单元一般含有 7 个葡萄糖残基, 2 个残基在侧链上, 即每 5 个单糖残

基含有 2 个分枝^[1~3]。X – 衍射分析表明它的立体结构为右旋三股螺旋, 晶格为六角形, 晶格常数 $a = b = 1.5 \text{ nm}$, $c = 0.6 \text{ nm}$ ^[4]。香菇菌多糖结构式见图 1。

大量的研究结果表明^[5~14], 香菇多糖有提高免疫、抗肿瘤、抗感染、保护肝损伤、抗衰老、降血糖、抑制血小板聚集等作用, 对化学致癌及病毒致癌也有

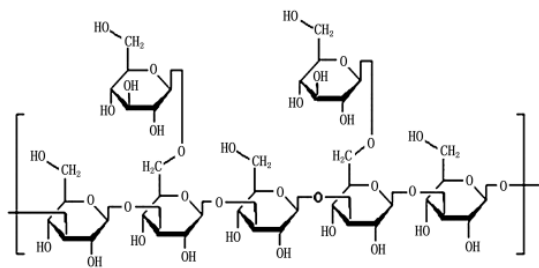


图1 香菇多糖的结构图

Fig 1 The structure of lentinan

抑制作用,此外它还具有多种药理活性,如抗溃疡、防辐射及防治青光眼等作用,因此香菇多糖可广泛地应用于临床,具有很好的药用价值。然而申报新药需要按申报要求进行系统试验,香菇多糖作为高分子化合物,其临床疗效及过敏反应的发生与其分子量高低及分子量分布密切相关,其中 M_w 的大小及其分布状况及该分子在不同溶液中的性质是评价其药用价值、控制生产和改进产品质量的主要根据和重要指标。高聚物分子量的检测方法有很多,目前较常用的有乌氏粘度法、色谱法和激光光散射法。乌氏粘度法是将高聚物溶于一定的溶剂中,用乌氏粘度计测量其特性粘度值,再根据特性粘度与分子量之间的关系公式计算出其粘均分子量,但该方法不能直接求出绝对平均分子量,而是间接地通过经验公式计算,所以会带来较大的误差;色谱法既可以提供分子量值,还可得到分子量的分布情况,但该方法所给出的是分子量相对值,一般需采用标准样品校准。激光光散射法的特点是当光通过高分子溶液时,由于密度起伏和溶液浓度不均一而引起光散射现象,光散射仪可从不同角度对散射光进行检测,收集散射光的强度,散射光角度的变化与分子的尺寸有关,任何方向的散射光强度与高聚物的分子量和溶液浓度成正比,用激光测定每个级分的相对聚合度和均方半径,然后将数据进行处理并作图,该方法需要对样品进行分级处理,其分级处理时间长而十分烦琐。由传统的光散射技术发展起来的体积色谱(SEC) - 示差检测(RI) - 多角度激光光散射(MALLS)联用技术,兼具了色谱法和光散射法的特点,光散射仪可从多个不同角度对散射光进行检测,同时摒弃了烦琐的操作和运算,在不需要标准样品的情况下,也不必对分子的形状进行假设,能快速、准确地测定出高分子的绝对 M_w 、 M_n 、粘分子量、分子量分布、分子的形状、分支、聚集态等,而且准确性和重现性很好。在我们以前的工作中,应用不同的联用系统对不同的 大分子物质进行了相关测试研究

工作^[15,16] 获得了十分满意的结果。受单位委托,根据样品的特性本论文采用 SEC - RI - MALLS 联用系统测定了新提取的香菇多糖在不同溶液中的 M_w 及分子量分布,并对香菇多糖在纯水和氢氧化钠溶液中的溶液性质进行了比较研究,得到如下结论:在超纯水中香菇多糖样品的 M_w 为 7.264×10^5 (5%),在氢氧化钠溶液中香菇多糖样品的 M_w 为 7.486×10^5 (5%),分子量分布指数 M_w/M_n 分别为 1.541 和 1.561;通过 r_g 对 M_w 作图,得知香菇多糖在超纯水和氢氧化钠溶液中都得到 U 型曲线,表明香菇多糖为典型的高支化度结构,这一结论与香菇多糖真实结构一致,实验数据显示不同的溶剂对香菇多糖分子量和分子量分布有一定影响。该论文所使用的实验方法和得到的数据及结论,将为该类药物的质量控制,制定质量标准,完成新药申报项目资料的准备,提供必要的实验方法和数据,同时可以通过 r_g 对 M_w 作图,对高分子的构型进行判断。

1 实验仪器及实验条件

SEC - RI - DAWN EOS 十八角度激光散射联用系统(图 2 所示) 美国怀雅特公司购买。

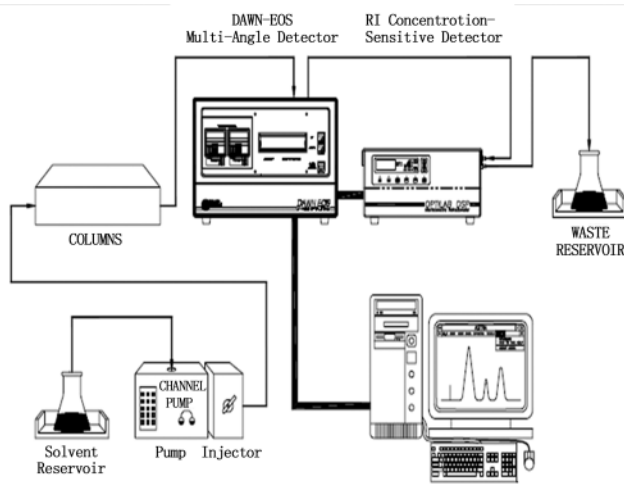


图2 SEC - RI - MALLS 联用系统仪器结构图

Fig 2 Structure chart of the SEC - RI - MALLS system

组件名称: Agilent 1100 单元泵, SHODEX OHPAK SB - G(6.0 mm × 50 mm), SHODEX OHPAK 803HQ(8.0 mm × 300 mm), 804HQ(8.0 mm × 300 mm), 805HQ(8.0 mm × 300 mm), Astra V 激光光散射数据采集及处理软件, SK1200H 超声波清洗仪器;重蒸馏水;其他试剂为分析纯,微孔过滤膜 0.2 μm;香菇多糖样品(自制):为白色纤维状疏松固体。

2 实验过程

2.1 实验条件和流动相配制 实验用香菇多糖样

品(协作单位制备) ,以 pH 为 7.8 ~ 8.0 的磷酸盐缓冲溶液作为流动相 ,流动相经 0.2 μm 水系过滤膜低真空度过滤 ,测试柱温 30 ℃;示差折光检测器温度 30 ℃ 检测波长 690 nm;流速:0.4 mL · min⁻¹;进样体积:500 μL;样品溶液浓度:1 ~ 2 mg · mL⁻¹。选择 pH 为 7.8 ~ 8.0 的磷酸盐缓冲溶液作为该实验的流动相。其配制方法是:取磷酸氢二钾 5.59 g 与磷酸二氢钾 0.41 g 加水使溶解并定容至 1000 mL。

2.2 样品溶液配制

2.2.1 样品溶液 A 称取香菇多糖样品 5 mg ,置于 5 mL 量瓶中 ,加超纯水(电阻率 25 ℃ 时为 18.2 MQ) 溶胀 ,定容过夜。

2.2.2 样品溶液 B 称取 5 mg 香菇多糖样品 ,置于 5 mL 量瓶中 ,加 0.5 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.5 mL 溶胀 ,用 0.5 mol · L⁻¹ 的盐酸和精密 pH 试纸调 pH 到 7.8 ~ 8.0 于 5 mL 量瓶中 ,定容过夜。

2.3 样品测定条件 香菇多糖分子量和分子量分布的测定是在 SEC - RI - MALLS 联用系统(图 2) 上于 690 nm 下测定的 ,十八角激光光散射仪测定的角度从 16.9°到 155.4°。11 角为 90°散射角 ,此时的激光强度最稳定 ,受杂散光干扰最小^[15,16]。分子量和分子量分布测量时将样品溶液稀释后经 0.2 μm 的水系过滤头 ,经凝胶渗透色谱、示差检测和光散射检测联用法测量。凝胶渗透色谱柱和示差检测器的温度均为 30 ℃。

2.4 香菇多糖分子量和分子量分布测定的具体步骤 打开 SEC - RI - EOS 联机软件模板并设好有关的参数 ,准备采集实验数据。打开示差检测器的 PURGE 阀 ,用配备好的流动相将整个联用系统冲洗干净后 ,关闭示差检测器 PURGE 阀 ,清零。用手动进样器将样品溶液通过针头过滤器进样 ,开始收集数据。用 Astra V 数据处理软件处理所收集的实验数据。主要数据处理步骤是:定激光基线和示差基线→定激光峰和示差峰→运行软件。结果见表 1。

表 1 香菇多糖分子量和分子量分布的结果

Tab 1 Lentinan results of molecular weight and molecular weight distribution

	溶剂(solvent)	
	水 (water)	氢氧化钠溶液 (NaOH solution)
$M_w/g \cdot mol^{-1}$	7.264×10^5 (5%)	7.486×10^5 (5%)
$M_n/g \cdot mol^{-1}$	4.713×10^5 (6%)	4.791×10^5 (5%)
M_w/M_n	1.541 (8%)	1.563 (7%)
10% 分子量(molecular weight)	2.735×10^5	2.838×10^5
90% 分子量(molecular weight)	4.353×10^6	4.11×10^6

3 结果与讨论

3.1 流动相浓度的选择 由于 SHODEX OHPAK 系列凝胶过滤色谱柱可采用超纯水或磷酸盐缓冲溶液、醋酸盐缓冲溶液做分离流动相 ,根据样品的组成、化学结构、溶解度等物理性质 ,选择 pH 为 7.8 ~ 8.0 的磷酸盐缓冲溶液作为该实验的流动相。

3.2 pH 的选择 色谱柱条件适宜的 pH 范围(3.0 ~ 8.0) ,对于不同的缓冲溶液采用不同的 pH ,选择磷酸盐 pH 为 7.8 进行试验。

3.3 样品分子量及分布的测定与不同溶剂对分子量及分布的影响 该实验分别使香菇多糖在超纯水(电阻率 25 ℃ 时为 18.2 MQ) 溶胀过夜和 pH 为 7.8 ~ 8.0 的氢氧化钠溶液中于 5 mL 量瓶中溶胀过夜后测试。香菇多糖样品分子量的测定结果见表 1 ,在超纯水中香菇多糖样品的 M_w 为 7.264×10^5 (5%) ,在氢氧化钠溶液中香菇多糖样品的重均分子量为 7.486×10^5 (5%) ,分子量分布指数 M_w/M_n 分别为 1.541 和 1.561 ,数据显示不同的溶剂对香菇多糖分子量和分子量分布是有影响的。下一步工作应该集中在对香菇多糖溶液行为的研究上。

3.4 2 种溶液中香菇多糖构型判断 已有文献报道^[17] ,从 M_w 与 r_g 图中能够得到一些关于溶液中分子链构型的信息。通过 r_g 对 M_w 作图(图 3、图 4)。香菇多糖超纯水和氢氧化钠溶液中都得到 U 型曲线 ,表明香菇多糖为典型的高支化度结构 ,这一结论与香菇多糖真实结构一致。

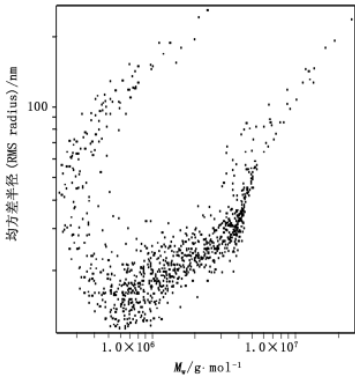


图 3 香菇多糖在超纯水中的支化构型图

Fig 3 Lentinan branched configuration plot in ultrapure water

3.5 谱图分析

从图 5 与图 6 可知在所选定的色谱条件下 ,香菇多糖在分离效果良好 ,可用于说明该方法可作为常规测定试验室提取的香菇多糖分子量及其分布分析方法。

通过对该实验的数据处理发现 ,基线的确定和

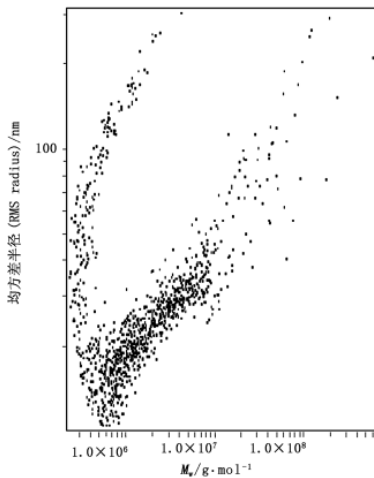


图4 香菇多糖在氢氧化钠溶液中的支化构型图

Fig 4 Lentinan branched configuration plot in NaOH

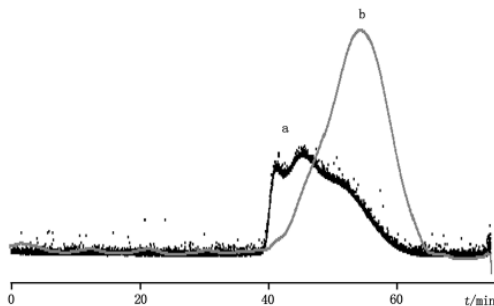


图5 香菇多糖在超纯水水中的 11 角激光峰 (a) 和示差 (b) 谱图

Fig 5 The plot of the 11th detector (a) and RI (b) in ultra-pure water

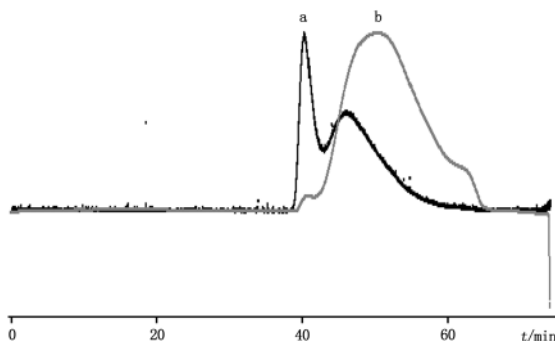


图6 香菇多糖在氢氧化钠溶液中的 11 角激光峰 (a) 和示差 (b) 谱图

Fig 6 The plot of the 11th detector (a) and RI (b) in NaOH

峰面积的选取,对实验结果有一定的影响,必须通过大量的实验进行摸索。

参考文献

- Unursaikhan S, Zhang LN, Xu XJ *et al.* Structure molecular weight and bioactivities of (1→3)- β -D-glucans and its sulfated derivatives from four kinds of *Lentinus edodes*. *Chin J Polym Sci*, 2005 23(3): 327

- PANG Xiao-lin(庞小琳), LIU Feng-yan(刘凤艳), ZHANG Er-yong(张二勇) *et al.* Separation and detection of lentina(香菇多糖的分离与检测). *Liaoning Chem Ind* (辽宁化工) 2007, 36(4): 237
- Xu XJ, Xu J, Zhang YY, *et al.* Rheology of triple helical Lentinan in solution: Steady shear viscosity and dynamic oscillatory behavior. *Food Hydrocol* 2007 21(Suppl): 1
- Mshiha KN. Immunotherapeutic Prospects of Infections Diseases. Berlin: Springer Verlag, 1990. 470
- Markova N, Kussovski V, Drandarsk I, *et al.* Protective activity of lentinan in experimental tuberculosis. *Int Immunopharmacol* 2003, 3(10-11): 1557
- Funebo T, Ohlsson T. Microwave-assisted air dehydration of apple and mushroom. *J Food Eng*, 1998 38(3): 353
- Nadya M, Vesselin K, Tatyana R *et al.* Effects of intraperitoneal and intranasal application of Lentinan on cellular response in rats. *Int Immunopharmacol* 2002 2(12): 1641
- Wu D, Pae M, Ren Z *et al.* Dietary supplementation with white button mushroom enhances natural killer cell activity in C57BL/6 mice. *J Nutr* 2007, 137(6): 1472
- ZHENG Hong(郑虹), YE Qiu-yan(叶秋焰). Lentinan pharmacology and clinical applications(香菇多糖的药理及临床应用研究进展). *Strait Pharm J*(海峡药理学) 2006, 18(4): 150
- Kupfahl C, Geginat G, Hof H. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. *Int Immunopharmacol*, 2006 6(4): 686
- Nimura H, Mitsumori N, Takahashi N *et al.* S-1 combined with lentinan in patients with unresectable or recurrent gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006 33(1): 106
- Oba K, Morita S, Matsui T *et al.* An individual patient data meta-analysis of the immunotherapy using lentinan in patients with advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 2007 25(18S): 15
- FANG Ji-nian(方积年), WANG Shun-chun(王顺春). Research progress of lentinan(香菇多糖的研究进展). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志) 1997 32(6): 332
- ZHENG Min(郑敏), WANG Ya-ping(王亚平). Chinese herbs antitumor pharmacology research progress (中药多糖抗肿瘤的药理学研究进展). *Foreign Med Sci Tradit Chin Med*(国外医学中医中药分册) 2000 22(5): 259
- WU Yang-lan(吴扬兰), WANG Yuan-liang(王远亮), YANG Ya-lian(杨亚联) *et al.* The determination of molecular weight and its distribution of polylactid with GPC eighteen angles laser light scattering method(GPC-十八角激光光散射联用法测定聚乳酸的分子量和分子量分布). *Mod Sci Instrum* (现代科学仪器) 2007(2): 78
- WU Yang-lan(吴扬兰), WANG Yuan-liang(王远亮), XU Shi-rong(徐世荣) *et al.* Determination of molecular weight and distribution of hydroxyethyl starch (HES) by means of GPC-RI-MALLS TECHNIQUE(GPC-RI-MALLS 技术测定羟乙基淀粉的分子量及分子量分布). *J Chongqing Univ*(Nat Sci Ed) (重庆大学学报 自然科学版) 2007 30(7): 121
- Lee JH, Han JA, Lim ST. Effect of pH on aqueous structure of maize starches analyzed by HPSEC-MALLS-RI system. *Food Hydrocol*, 2009 23: 1935