

# 桑叶多糖的分离纯化及对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性

罗晶洁, 王 尉, 曹学丽\*

(北京工商大学化学与环境工程学院, 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048)

**摘 要:** 利用 Sephadex-G50 从桑叶多糖中分离纯化得到两种不同多糖组分 MLP1 和 MLP2, 经过高效凝胶色谱 (GPC) 分析表明, MLP1 的纯度为 94.55%, 重均相对分子质量  $M_w$  为 11800, 多分散性系数为 1.25, MLP2 的纯度为 96.64%, 重均相对分子质量  $M_w$  为 7630, 多分散性系数为 1.12。并利用  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性体外筛选模型, 对 MLP1 和 MLP2 进行活性研究, 结果表明两个组分对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶均具有较好的抑制活性。

**关键词:** 桑叶; 多糖; 分离纯化; 高效凝胶色谱;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; 抑制活性

Isolation, Purification and Anti- $\alpha$ -Glucosidase Activity of Polysaccharides from Mulberry Leaves

LUO Jing-jie, WANG Wei, CAO Xue-li\*

(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, College of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** Two kinds of polysaccharides (MLP1 and MLP2) were isolated and purified from mulberry leaves by Sephadex-G50. The gel permeation chromatographic (GPC) analysis revealed that the purity, relative molecular weight and polydispersity of MLP1 was 94.55%, 11800 and 1.25; Meanwhile, the purity, relative molecular weight and polydispersity of MLP2 was 96.64%, 7630 and 1.12, respectively. Moreover, obvious inhibitory effects of MLP1 and MLP2 on  $\alpha$ -glucosidase were observed.

**Key words:** mulberry leaves; polysaccharide; isolation and purification; gel permeation chromatographic (GPC);  $\alpha$ -glucosidase; inhibitory activity

中图分类号: O636.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)03-0112-05

桑叶异名铁扇子, 其为桑科植物桑的干燥叶<sup>[1]</sup>, 始载于《神农本草经》, 本品性寒、味甘苦, 具有疏散风热、清肝明目、清肺润燥等功效, 可用于风热感冒、头晕头痛、肺热燥咳、目赤昏花<sup>[2]</sup>; 桑叶是传统的中药材, 含有多种活性成分, 如多酚类、黄酮类、甾体类、多糖等<sup>[3-4]</sup>。国内外研究表明, 桑叶在调控血糖、防治糖尿病及其并发症方面具有明显的功效<sup>[5]</sup>。有关专家分析指出: 今后一段时期, 研制开发桑叶保健食品具有广阔的市场。日本科研人员认为<sup>[6]</sup>, 桑叶极有可能成为功能性食品原料。目前, 我国科研人员及厂家也在积极合作研制开发桑叶保健品及功能性饮料。目前国内对于桑叶多糖的研究大多停留在桑叶多糖的提取和粗分离阶段<sup>[7-9]</sup>, 但鉴于桑叶种类的多样性和多糖结构功

能的复杂性<sup>[10-11]</sup>, 很少有将其分离纯化得到不同相对分子质量的纯多糖, 并对纯多糖进行  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的研究。

本研究采用微波辅助提取的方法, 经过脱蛋白、醇沉等粗分离手段得到粗多糖, 然后采用凝胶过滤层析对桑叶粗多糖进行进一步的分离纯化, 得到两个不同相对分子质量的桑叶纯多糖, 并且对其进行  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性的研究, 从而为后续的桑叶多糖结构的表征及构效关系提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

桑叶采自北京大兴区植物园。

收稿日期: 2010-06-01

作者简介: 罗晶洁(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物分离工程。E-mail: luojingjie268@163.com

\* 通信作者: 曹学丽(1967—), 女, 教授, 博士, 研究方向为生物分离技术。E-mail: caoxl@th.btbu.edu.cn

硫酸、苯酚、TCA 试剂、无水乙醇 北京化工厂；-葡萄糖苷酶 美国 Sigma 公司；阿卡波糖片(拜唐平) 德国拜耳医药保健有限公司；葡萄糖测定试剂盒(GOD-POD 法) 中生北控生物科技股份有限公司。

## 1.2 仪器与设备

MARS5 微波萃取仪 美国 CEM 公司；BSZ-100 自动部分收集器、玻璃层析柱 上海沪西分析仪器厂；LC-20AD 型泵、CTO-20A 柱温箱 日本岛津公司；DAWN HELEOS- 型激光多角度散射检测器、Optilab rex 示差检测器 美国 Wyatt 公司；冷冻干燥机 德国 Christ 公司；Sephadex G-50 美国法玛西亚公司；Shodex SB-806M 高效凝胶色谱柱、Shodex SB-803 高效凝胶色谱柱 日本 Shodex 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 桑叶多糖的提取

将 10g 风干的桑叶粉碎，过 60 目筛，采用微波辅助水提，料液比 1:18，提取时间 10min，温度 80℃，合并两次提取液，过滤得到桑叶粗提液。再经过 TCA 法脱蛋白，活性炭脱色，4 倍体积醇沉，冷冻干燥得到浅黄色的桑叶粗多糖。

### 1.3.2 桑叶多糖的纯化

将得到的桑叶粗多糖溶于 0.1mol/L 的 NaCl 中，利用高效凝胶色谱(GPC)具体测定各个峰的相对分子质量范围，选取合适的 Sephadex 凝胶层析介质，然后选择不同的流速和上样量，确定最佳的纯化条件。并采用自动部分收集器收集，苯酚硫酸法<sup>[12]</sup>测定其多糖含量，绘制洗脱曲线，合并各个组分。

### 1.3.3 多糖纯度的测定

根据洗脱曲线，将合并得到的各个组分，采用 Optilab rex 示差检测器进行纯度测定，并用 DAWN HELEOS- 型激光多角度散射检测器对相对分子质量进行测定<sup>[13-15]</sup>。色谱条件：色谱柱：Shodex SB-803，流动相：0.1mol/L 的 NaCl，流速 0.5mL/min，柱温：40℃，进样体积 200 μL。

### 1.3.4 桑叶多糖 - 葡萄糖苷酶抑制活性的测定

实验分为空白组、不加抑制剂的阴性组、拜糖平阳性组和待测样品组。在 96 孔板中，依次加入如表 1 所示的各种试剂，于 37℃ 温育 15min，再加入 25 μL 底物溶液(0.5mol/L 的蔗糖溶液或 0.5mol/L 的麦芽糖溶液)，于 37℃ 温育 30min。温育结束后，每孔加入 150 μL 0.1mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 中止反应。取一定量中止后的反应溶液于另一 96 孔板中，加入 200 μL 葡萄糖测定试剂盒溶剂，于 37℃ 温育 15min，在酶标仪 505nm 波长处测定吸光度，根据下列公式计算该抑制剂对 - 葡萄糖苷酶的抑制率。当抑制率为 50% 时，所得抑制剂的浓度，即

为该抑制剂对底物的 IC<sub>50</sub> 值。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}}) - (A_{\text{待测样品组}} - A_{\text{空白组}})}{A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100$$

表 1 实验分组所加试剂

Table 1 Reagents in each experimental group

实验分组	PBS / μL	-葡萄糖苷酶 / μL	-葡萄糖苷酶抑制剂 / μL
空白组	100	25(灭活)	—
阴性组	100	25	—
阳性组	75	25	25
待测样品组	75	25	25

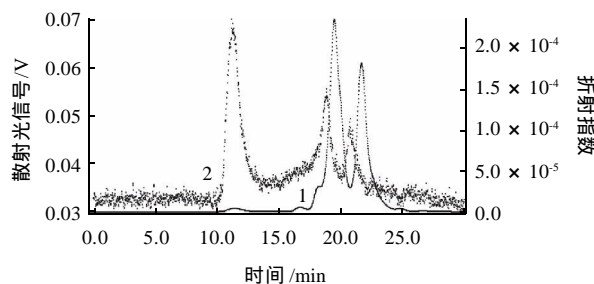
注：— 未加试剂。

## 2 结果与分析

### 2.1 桑叶多糖的分离纯化

#### 2.1.1 凝胶介质的选择

桑叶粗多糖经过 0.1mol/L 的 NaCl 的溶解后，进行 GPC 分析，其色谱图如图 1 所示。



曲线 1 显示的是 Optilab rex 示差检测器的信号，它测定各个组分浓度的变化，曲线 2 显示的 DAWN HELEOS- 型激光多角度散射检测器的信号，它测定的是各个组分相对分子质量的大小。

图 1 桑叶粗多糖 GPC 色谱图

Fig.1 GPC chromatogram of the polysaccharides from mulberry leaves

由图 1 可知，桑叶粗多糖中，主要存在两个不同相对分子质量段的组分，保留时间分别为 19 min 和 22min。通过 DAWN HELEOS- 型激光多角度散射检测器对上述两个组分的相对分子质量进行一个大致范围的确定，其结果显示相对分子质量范围在 1000 ~ 15000 之间。因此，选择 Sephadex G-50 凝胶层析介质进行后续分离纯化。

#### 2.1.2 流速的选择

选取 0.5、0.25、0.1mL/min 的流速，利用苯酚硫酸法在 490nm 波长处测定吸光度，作洗脱曲线如图 2 ~ 4 所示。以上 3 种流速对比，流速 0.1mL/min 和 0.25mL/min，分离效果均比较理想，但考虑到 0.1mL/min，洗脱时间较长，因此选择流速 0.25mL/min。

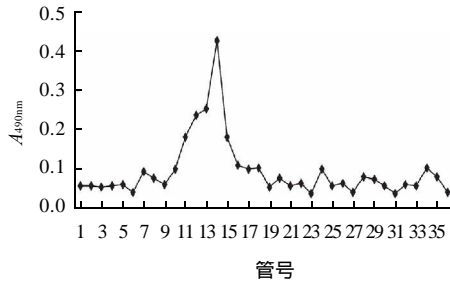


图2 流速为 0.5mL/min 时的洗脱曲线

Fig.2 Elution curve at the flow rate of 0.5 mL/min

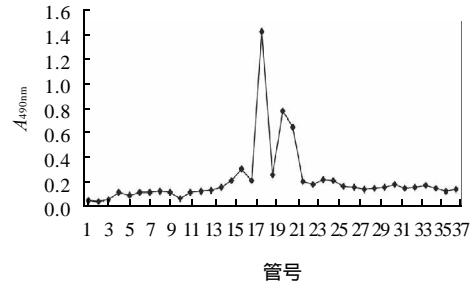


图6 质量浓度 50mg/mL 时的洗脱曲线

Fig.6 Elution curve at the concentration of 50 mg/mL

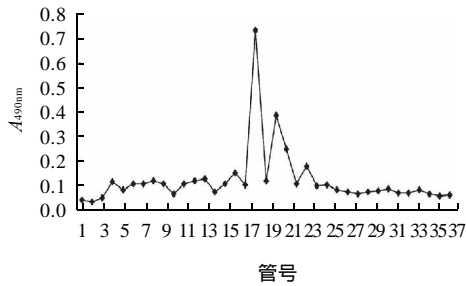


图3 流速为 0.25mL/min 时的洗脱曲线

Fig.3 Elution curve at the flow rate of 0.25 mL/min

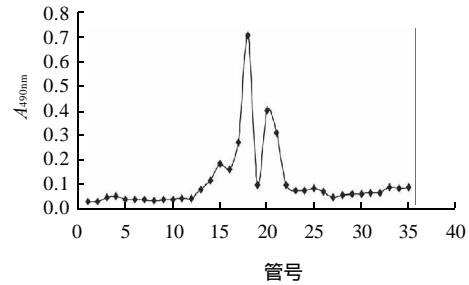


图7 质量浓度 25mg/mL 时的洗脱曲线

Fig.7 Elution curve at the concentration of 25 mg/mL

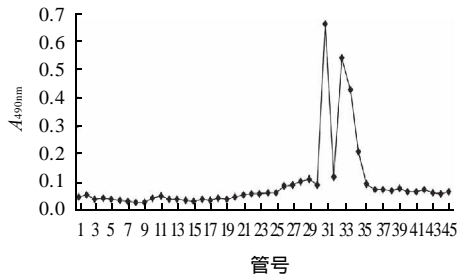


图4 流速为 0.1mL/min 时的洗脱曲线

Fig.4 Elution curve at the flow rate of 0.1 mL/min

### 2.1.3 上样量的选择

在确定流速 0.25mL/min 的条件下, 选取 100、50、25mg 3 种上样量, 分别溶于 1mL 0.1mol/L 的 NaCl 溶液中, 490nm 波长处测定吸光度, 作洗脱曲线如图 5~7 所示。以上 3 种质量浓度的分离效果对比, 50mg/mL 和 25mg/mL 分离效果较为理想, 故选择 50mg 上样量, 上样体积为 1mL。

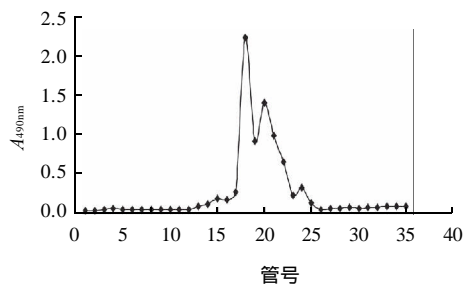


图5 质量浓度 100mg/mL 时的洗脱曲线

Fig.5 Elution curve at the concentration of 100 mg/mL

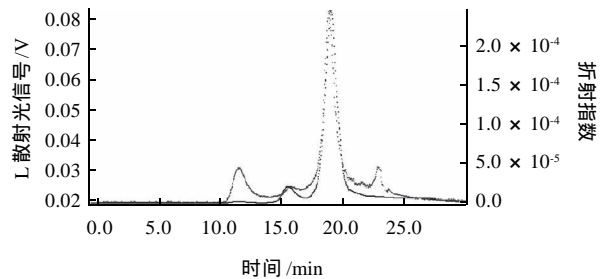


图8 MLP1 GPC 色谱图

Fig.8 GPC chromatogram of MLP1

综上所述, 桑叶多糖分离纯化的色谱条件为: Sephadex-G50 介质, 0.1mol/L 的 NaCl 溶液溶解, 洗脱流速 0.25mL/min, 上样量 50mg, 上样体积 1mL。

### 2.2 桑叶多糖纯度及相对分子质量

取合并后的各个组分上高效凝胶色谱。利用激光多角度散射检测器所得不同角度光强度和相对分子质量之间的关系, 以及示差检测器测得的浓度, 进行加权计算可得重均相对分子质量。其结果如图 8、9 所示。结果表明: 桑叶多糖 1 号组分 MLP1 重均相对分子质量( $M_w$ )为 11800, 纯度为 94.55%, 多分散性系数为 1.25, 桑叶多糖 2 号组分 MLP2 重均相对分子质量( $M_w$ )为 7630, 纯度为 96.64%, 多分散性系数为 1.12。

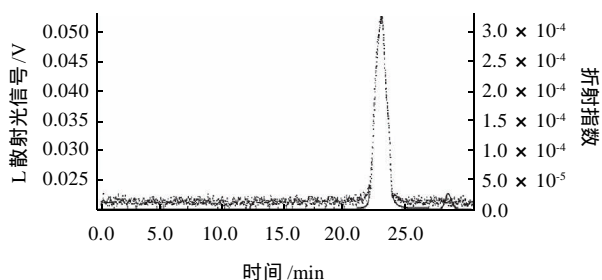


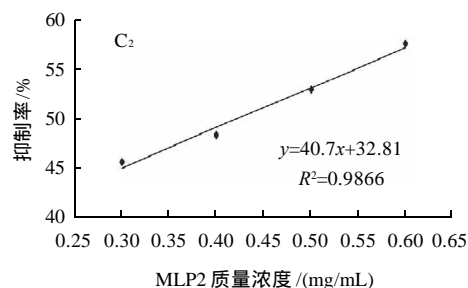
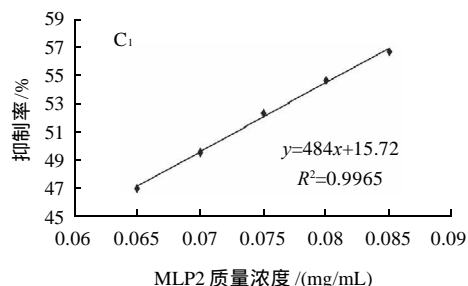
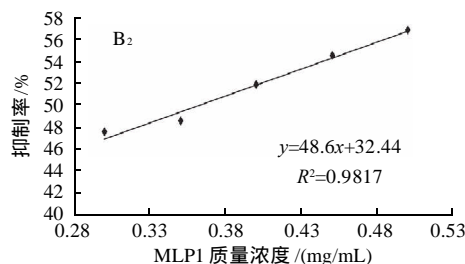
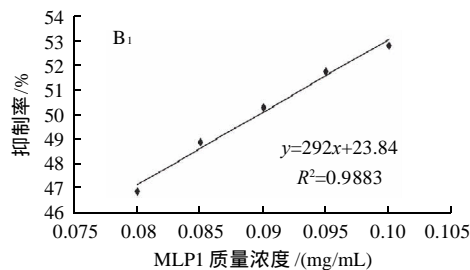
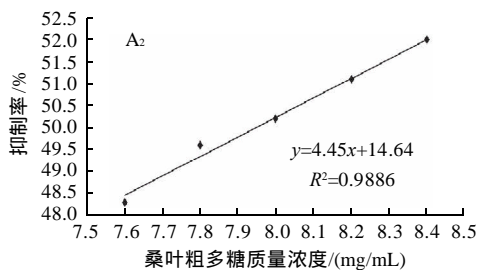
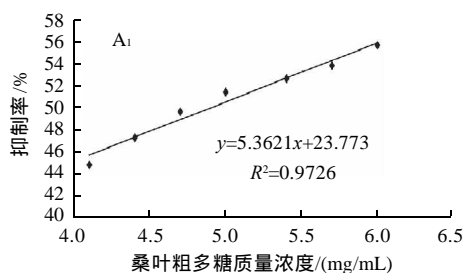
图9 MLP2 GPC 色谱图  
Fig.9 GPC chromatogram of MLP2

### 2.3 桑叶多糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性

#### 2.3.1 阳性组拜唐平的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性

将拜唐平分别稀释为500、100、50、10、1  $\mu\text{g/mL}$ ，以抑制剂质量浓度为横轴，对应的抑制率为纵轴，绘制抑制  $\text{IC}_{50}$  抑制曲线。可得对蔗糖底物拜唐平的  $\text{IC}_{50}=50.32 \mu\text{g/mL}$ ，对麦芽糖底物拜唐平的  $\text{IC}_{50}=8.28 \mu\text{g/mL}$ 。

#### 2.3.2 桑叶多糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定



A<sub>1</sub>.桑叶粗多糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性曲线(蔗糖底物); A<sub>2</sub>.桑叶粗多糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性曲线(麦芽糖底物); B<sub>1</sub>.MLP1 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性曲线(蔗糖底物); B<sub>2</sub>.MLP1 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性曲线(麦芽糖底物); C<sub>1</sub>.MLP2 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性曲线(蔗糖底物); C<sub>2</sub>.MLP2 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性曲线(麦芽糖底物)。

图10 桑叶多糖的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性曲线

Fig.10 Inhibitory activity curve of the polysaccharides from mulberry leaves on  $\alpha$ -glucosidase

由图10可知，对蔗糖底物桑叶粗多糖的  $\text{IC}_{50}=4.89\text{mg/mL}$ ，1号组分MLP1的  $\text{IC}_{50}=89.1 \mu\text{g/mL}$ ，2号组分MLP2的  $\text{IC}_{50}=70.8 \mu\text{g/mL}$ 。经过纯化以后，对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性大幅提升，提高倍数分别为55倍和69倍。对麦芽糖底物的桑叶粗多糖的  $\text{IC}_{50}=7.95\text{mg/mL}$ ，1号组分MLP1的  $\text{IC}_{50}=362 \mu\text{g/mL}$ ，2号组分MLP2的  $\text{IC}_{50}=422 \mu\text{g/mL}$ ，可见活性也有大幅的提升，提高倍数分别为22倍和19倍。

### 3 结论

采用Sephadex-G50介质，0.1mol/L的NaCl溶液洗脱，流速0.25mL/min，上样量50mg，上样体积1mL，分离纯化得到两个相对分子质量段的桑叶纯多糖。MLP1的重均相对分子质量为11800，纯度为94.55%，多分散性系数为1.25，MLP2的重均相对分子质量为7630，纯度为96.64%，多分散性系数为1.12。再通过体外抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的实验，测定其对蔗糖底物的  $\text{IC}_{50}$ 值分别为  $89.1 \mu\text{g/mL}$ 和  $70.8 \mu\text{g/mL}$ ，对麦芽糖底物的  $\text{IC}_{50}$ 值分别为  $362 \mu\text{g/mL}$ 和  $422 \mu\text{g/mL}$ ，均具有较好的抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性。

#### 参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.

- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1963.
- [3] ASANO N, OSEKI K, TOMIOKA E. N-Containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities[J]. Carbohydrate Research, 1994, 259(2): 243-255.
- [4] KIM S. Antionxiative flavonoids from the leaves of *Morus alba*[J]. Arch PharmRes, 1999, 208(1): 108-109.
- [5] 王小伙, 郭金, 王军文. 桑茶的营养和药理初探[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2000, 15(3): 32-34
- [6] 野田信三. 桑叶功能性研究[J]. 食品科学, 1998, 19(2): 102-108.
- [7] 薛长勇, 腾俊英, 邱继红. 桑叶多糖肽复合物的降血糖作用[J]. 营养学报, 2005, 27(2): 167-168.
- [8] 王芳, 郑海雪. 桑叶多糖的提取工艺研究[J]. 浙江师范大学学报, 2008, 31(1): 77-79.
- [9] 夏玮, 张文清. 桑叶多糖 SJB 的结构分析和蛋白酪氨酸磷酸酯酶 PTP1B 抑制活性[J]. 高等学校化学学报, 2008(11): 2205-2208.
- [10] 赵明, 常钰, 王佩香. 桑叶多糖 PMP12 的分离纯化及结构的初步分析[J]. 江苏大学学报: 医药版, 2010, 20(2): 153-155.
- [11] 陈福君, 卢军, 张兵焜. 桑叶降糖有效组分对糖尿病动物代谢的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(1): 24-27.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 20-23.
- [13] HE X L, GARCIA K C. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75[J]. Science, 2004, 304(2): 870-875.
- [14] SUNDARAM M, QI Y, SHRIVER Z. Rational design of low-molecular weight heparins with improved *in vivo* activity[J]. PNAS, 2003, 100(2): 651-656.
- [15] BOULANGER M J, CHOW D, BREVNOVA E E, et al. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp 130 complex[J]. Science, 2003, 300(1): 2101-2104.