

## 制备型高速逆流色谱分离纯化香菇多糖

蒋志国<sup>\*1,2</sup> 杜琪珍<sup>1</sup> 盛利 g<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310012)

<sup>2</sup> (海南大学食品学院, 海口 570228)

**摘 要** 利用高速逆流色谱仪, 研究了双水相系统对香菇多糖的分离。溶剂系统为  $w(\text{PEG1000})$   $w(\text{K}_2\text{HPO}_4)$   $w(\text{KH}_2\text{PO}_4)$   $w(\text{H}_2\text{O}) = 0.5:1.25:1.25:7.0$ , 在转速为 500 r/min, 流速为 1.5 mL/min 的条件下, 成功分离了香菇多糖粗品 (700 mg), 得到 Len (95 mg)、Len (45 mg) 两个组分。用 Sephadex G-100 凝胶色谱柱检测纯度, 结果显示: Len 为单一峰, 凝胶渗透色谱法测定; Len 分子量为 293 kDa; 经酸水解后液相色谱分析表明, 其单糖组成为葡萄糖和甘露糖, 摩尔比为 2:7:1; 红外光谱显示其具有多糖类的特征吸收峰。

**关键词** 香菇多糖, 高速逆流色谱, 双水相系统

### 1 引言

香菇中的营养成分主要是蛋白质和多糖。现代研究结果表明, 香菇多糖具有抑制肿瘤、提高免疫功能、抗病毒和抗氧化等多方面的药理活性, 且毒副作用很小<sup>[1,2]</sup>。因此, 香菇多糖的分离纯化及其药理作用研究已成为一个热点课题。目前香菇多糖制成针剂已在日本生产并外销, 但因工艺复杂, 收率低, 成本高<sup>[3]</sup>。因此, 研究开发一种产率高、成本低、能扩大到工业生产的香菇多糖纯化技术非常必要。

高速逆流色谱 (HSCCC) 技术是一种无固体载体的连续液-液分配色谱技术, 其固定相通过重力场和离心力场作用被保留在分离柱内, 避免了固体载体与样品发生化学反应而变性及不可逆吸附, 样品回收率高, 可从粗制样品中在规模制备高纯度单体化合物, 已广泛用于生物工程、医药、天然产物、食品等领域<sup>[4~11]</sup>。

通常, 逆流色谱分离天然产物时, 基本局限于有机相-水相溶剂体系。有机溶剂通常不能溶解生物大分子或使生物大分子发生不可逆的结构和性质改变。因此, 逆流色谱在多糖、蛋白的分离中的应用不多。近年来, 随着双水相体系的开发, 使得逆流色谱在多糖、蛋白的分离上显露出很大的潜能。Shinomiyama 等<sup>[12]</sup>用 4.0% (w/w) PEG 8000-5.0% (w/w) Dextran T500 的磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 成功分离了溶菌酶和肌血球蛋白; Shibusawa 等<sup>[13]</sup>用 16% (w/w) PEG 1000-12.5% (w/w) 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0) 成功地分离了蛋清中的 3 种糖蛋白; Chao 等<sup>[14]</sup>用 12.5% PEG 1000-8% 磷酸钾缓冲液 (pH 6.8) 成功地分离了 *Achyranthes bidentata* 中的多糖。可以预见, 逆流色谱在多糖的分离上会带来技术上的革新。本研究利用高速逆流色谱的优越性, 采用双水相溶剂系统对香菇多糖粗品进行了分离纯化。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

HSCCC-D1000 制备型高速逆流色谱仪 (浙江工商大学食品与生物工程研究所研制), 包括 Model 510 恒流泵 (美国 Waters 公司) 和 BSZ-100 自动部分收集仪 (上海沪西分析仪器厂); 聚四氟乙烯管缠绕在 5 个水平轴上形成螺旋管 (5 mm I.D. 柱容积 1000 mL), 转速 0~1000 r/min; Thermo IR-380 红外分光光度计、Thermo 1500 酶标仪 (美国 Thermo 公司); Waters 2695/2414 HPLC 色谱仪 (美国 Waters 公司); SEDEX 75 蒸发光检测器 (法国 Sedex 公司); SIGMA 2-15K 离心机 (美国 Sigma 公司); 点样毛细管 (上海欣鹏玻璃仪器有限公司); 硅胶板 GF<sub>254</sub> (20 cm × 20 cm, 德国 Merk 公司)。

香菇多糖粗品 (西安润泽生物技术有限公司); Sephadex G-100 (上海贝基生物科技有限公司); 岩藻糖、木糖、山梨糖、D-葡萄糖、甘露糖 (生物试剂, 上海伯奥生物科技有限公司); 右旋糖酐 Dextran

2008-07-28 收稿; 2008-10-30 接受

\* E-mail: jzg6666@sina.com

(MW 270、150、80、50T, 色谱纯, Sigma公司);其它试剂均为分析纯。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 溶剂系统的选择** 将样品溶解于不同溶剂系统中,剧烈振荡后静置分层,测定其分层时间,用毛细管取近似等量的上下两相溶液于薄层色谱(TLC)板上。通过  $R_f$  (迁移率)值与斑点色度,确定各个组分的分配系数的差异,选择合适的溶剂系统。

**2.2.2 两相溶剂体系及样品溶液的配制** 本实验所用溶剂系统为 PEG1000、 $K_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 和  $H_2O$ ,将 4种溶剂按比例配置于分液漏斗中,充分振荡后静置分层。下相为流动相,上相为固定相,超声脱气后备用。称取 700 mg香菇多糖粗品,用上下相各 50 mL 溶解,超声脱气后备用。

**2.2.3 HSCCC分离** 将固定相注满 HSCCC-D1000螺旋管后开启直流电机,转速调至 500 r/min,并以 1.5 mL/min 的流量从首端泵入流动相,在色谱柱尾端用量筒收集流出的固定相;待色谱柱尾端不再有固定相流出时,表明系统已动态平衡。根据流出的固定相体积,计算在此条件下的固定相保留率;进样 100 mL,每 10 mL 为一管收集流出液,共收集 120 管,并采用 TLC 点样检测分离情况。

**2.2.4 纯度鉴定** 纯化香菇多糖 Len 和 Len 用 sephadex G-100葡聚糖凝胶柱(50 cm ×2 cm)进行柱层析,洗脱液为重蒸水,6 mL/h,每管 6 mL,连续收集 50 管,蒽酮硫酸法<sup>[15]</sup>隔管监测。

**2.2.5 分子量测定** 采用凝胶渗透色谱法测定多糖组分的分子量。用 HPLC 测定 T 系列右旋糖苷标准品各自的保留时间,以  $t_R$  (保留时间)为横坐标,  $\lg M_r$  (分子量对数值)为纵坐标绘制标准曲线。将待测样品的  $t_R$  带入  $\lg M_r - t_R$  曲线中求得其分子量。Ultrahydrogel Linear 色谱柱(300 mm ×7.8 mm, 美国 Waters 公司),流动相重蒸水,流速 0.5 mL/min,柱温 30 °C,检测器温度 30 °C。

**2.2.6 单糖组成及摩尔比** 取 10 mg Len 加入 1 mL 2 mol/L  $CF_3COOH$ ,封管后在 100 °C 下水解 10 h,水解产物在 45 °C 下旋转蒸发至干,以 2 mL  $H_2O$  溶解,过 0.45 μm 滤膜,用 HPLC-ESD 分析检测。比较标准单糖和样品的保留时间,确定组成单糖的种类,并根据各峰面积计算出其摩尔比。色谱条件:高效液相色谱仪,SEDEX75 蒸发光检测器, Sugar-D 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 美国 Waters 公司),流动相  $V(CH_3CN):V(H_2O) = 85:15$ ,流速为 1.0 mL/min,漂移管温度 80 °C,载气压力 0.35 MPa。

**2.2.7 红外光谱分析** 称取过 0.098 mm 孔径筛并经 105 °C 干燥至恒重的 KB r 粉末 300 mg,干燥纯化多糖 Len 2 mg,在玛瑙钵中混合研细,取 100 mg 进行压片,在 400~4000  $cm^{-1}$  红外光谱扫描。

## 3 结果与讨论

### 3.1 溶剂系统的选择

多糖的逆流分离中最常用的双水相体系是聚乙二醇-磷酸盐溶液体系。TLC 法的准确度较低,但方便、快速。选择溶剂系统的目的是分离样品,测定分配系数只是为了检查溶剂系统的适用性,对其准确度要求不高,因此 TLC 法对各种样品,尤其是复杂天然产物分离的溶剂系统选择非常适用。实验发现,根据斑点色度可以观察样品中各组分的相对含量及其在两相溶剂中的分配情况,即估计分配系数的大小及差异,由此可以确定溶剂系统的适用性及各组分的流出顺序。不同溶剂系统的测定结果见表 1 及图 1。由图 1(0)中原样品的薄层色谱(TLC)检测情况可知该样品至少有 3 种多糖,即原点  $R_f = 0$ ,  $R_f = 0.7$  和  $R_f = 0.9$ 。双水相上相以聚乙二醇为主,下相以  $K_3PO_4$  水溶液为主。增加盐的浓度,多糖在上相中的溶解度随之增加,下相中的溶解度随之减少;增加 PEG1000 的浓度,则相反。从图 1 可以看出,在系统 1、2、3、4、5 和 6 中,多糖组分主要集中在下相,上相很少或无,分配系数很不合理,不适合作为逆流色谱分离中的溶剂系统。在系统 7 和 8 中,多糖组分在上下相中都有较好的分配,但从斑点色度来看,系统 7 中 3 种多糖组分之间的分配系数差异较为明显,且分层时间较短,为 65 s(表 1)。因此,最后选定系统 7 作为高速逆流色谱分离的双水相体系。

### 3.2 香菇多糖逆流色谱分离

由于多糖在可见-紫外光区无吸收,无法在线检测。因此,本实验只能采用逐管收集、隔管 TLC 检测。优化后的最终 HSCCC 实验条件:样品 700 mg,进样时流动相流速为 0.5 mL/min,进样后流动相流速为 1.5 mL/min,转速 500 r/min,收集 6 min/tube(10 mL 试管),固定相保留率 65%。TLC 检测结果如图 2。

表 1 8种溶剂系统组成及分层时间

| Table 1 Eight solvent systems compositions and separation time |                |                                        |                                        |                         |                             |
|----------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 编号<br>Na                                                       | PEG1000<br>(g) | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(g) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>(g) | H <sub>2</sub> O<br>(g) | 分层时间 (s)<br>Separation time |
| 1                                                              | 0.4            | 1.15                                   | 1.15                                   | 7.0                     | 130                         |
| 2                                                              | 1.0            | 1.2                                    | 1.2                                    | 6.5                     | 65                          |
| 3                                                              | 0.8            | 1.25                                   | 1.25                                   | 6.5                     | 100                         |
| 4                                                              | 2.0            | 0.6                                    | 0.6                                    | 6.5                     | 100                         |
| 5                                                              | 1.2            | 0.85                                   | 0.85                                   | 6.5                     | 110                         |
| 6                                                              | 1.0            | 1.0                                    | 1.0                                    | 6.5                     | 80                          |
| 7                                                              | 0.5            | 1.25                                   | 1.25                                   | 7.0                     | 65                          |
| 8                                                              | 1.3            | 1.15                                   | 1.15                                   | 6.5                     | 90                          |

由图 2 可知,通过逆流色谱分离,香菇多糖两个组分被分开,效果较好。合并 12 ~ 30 管,定为香菇多糖 Len ,合并 50 ~ 68 管,定为香菇多糖 Len 。同一组分,旋蒸浓缩后用截留分子量为 20000 的透析袋透析 4 昼夜,然后再旋蒸浓缩、冷冻干燥得 Len 95 mg 和 Len 45 mg。

3.3 凝胶层析鉴定纯度

香菇多糖 Len 和 Len 二级分别经 Sephadex G-100 柱层析洗脱,在  $\lambda = 620\text{ nm}$  处硫酸-萘酮法隔管检测结果见图 3。由图 3a 可见,Len 为单一峰,表明该香菇多糖级分的纯度已较高,但峰形欠佳,对称性不好,可能存在其它少量杂质组分;在图 3b 中,从出峰时间和流量分析表明 Len 的分子量大于 100000,出峰单一,对称性好,且在 20 管以后无其它杂峰出现,表明洗脱物为均一多糖。

3.4 Len 分子量测定

不同分子量的右旋糖苷标准品进行 HPLC 分析后所得的  $\lg M_r - t_R$  标准曲线在 2.5 ~ 27 kDa 之间具有良好线性关系 ( $\lg M_r = -0.4493 t_R + 9.0542, r = 0.9954$ )。将 Len 的  $t_R$  带入  $\lg M_r - t_R$  标准方程得分子量为 293 kDa。

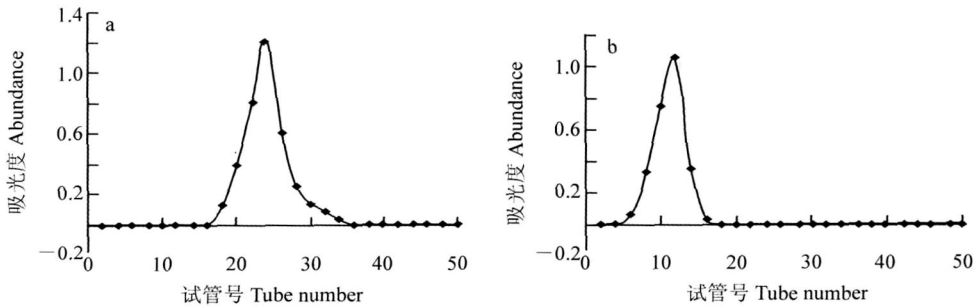


图 3 Len (a)和 Len (b) Sephadex G-100 层析图谱

Fig 3 Chromatograms of Len (a) and Len (b) on Sephadex G-100

3.5 Len 单糖组成及摩尔比

各种标准单糖及香菇多糖 Len 水解液的液相色谱图见图 4。根据液相色谱的保留时间进行定性分析,即通过比较标准单糖和样品中单糖的保留时间得出样品中的单糖组成。结果表明,Len 是由葡

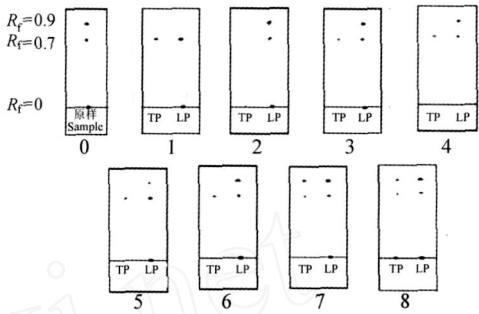


图 1 香菇多糖在 8 种溶剂系统中上下相的薄层色谱图

Fig 1 Thin-layer chromatogram of lentinan (Len) in eight solvent systems

TP:上相 (top phase); LP:下相 (Low phase); 1 ~ 8 同表 1 (1 - 8 are the same as in Table 1); 展开剂 (developer): 甲醇-水 (methanol-water) 5 : 2, V/V; 显色剂 (colorizing agent): 10% 硫酸乙醇溶液 (sulfuric acid ethyl alcohol solution)。

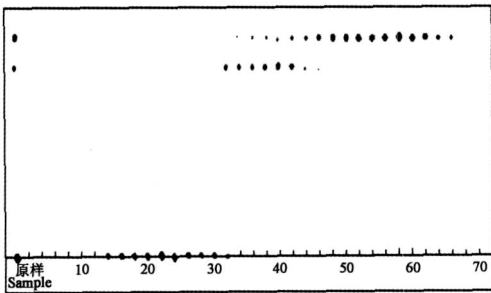


图 2 HSCCC-D1000 分离香菇多糖的薄层色谱图

Fig 2 Thin-layer chromatogram of lentinan fractions by high speed counter-current chromatography (HSCC) D1000

展开剂 (developer): 甲醇-水 (methanol-water) 5 : 2, V/V; 显色剂 (colorizing agent): 10% 硫酸乙醇溶液 (10% sulfuric acid ethyl alcohol solution)。

葡萄糖和甘露糖组成的多聚糖。

不同浓度梯度葡萄糖和甘露糖混标进行 HPLC 分析,以峰面积对数为纵坐标、葡萄糖和甘露糖的含量对数为横坐标分别绘制标准曲线。葡萄糖的标准曲线为  $y = 1.5549x + 6.724$ ,  $r = 0.9939$ , 甘露糖的标准曲线为  $y = 1.5835x + 6.6527$ ,  $r = 0.9850$ 。将 Len

水解产物葡萄糖和甘露糖的峰面积分别代入标准曲线求得葡萄糖和甘露糖的摩尔比为 2.7:1。

### 3.6 Len 光谱分析

紫外光谱分析表明纯化多糖水溶液在 260 和 280 nm 处无核酸和蛋白质的特征性吸收峰。

图 5 为纯化多糖 Len 的红外光谱仪扫描测定结果,  $3426\text{ cm}^{-1}$  吸收峰是由  $\text{—OH}$  的伸缩振动引起的;  $2932\text{ cm}^{-1}$  吸收峰是由糖类  $\text{C—H}$  的伸缩振动引起的,  $1591\text{ cm}^{-1}$  附近的峰是糖的水合物吸收峰;  $1407\text{ cm}^{-1}$  系  $\text{C—H}$  的变角振动,与典型的多糖的红外光谱特征一致。  $1250 \sim 950\text{ cm}^{-1}$  之间的两组峰是两种  $\text{C—O}$  的伸缩振动引起的,一种是吡喃糖环的醚键  $\text{C—O—C}$ ,  $1049$  及  $1104\text{ cm}^{-1}$  两个吸收峰表明存在  $\beta$  吡喃糖基。

## 4 结 论

(1) 利用高速逆流色谱仪,以  $w(\text{PEG1000}) : w(\text{K}_2\text{HPO}_4) : w(\text{KH}_2\text{PO}_4) : w(\text{H}_2\text{O}) = 0.5 : 1.25 : 1.25 : 7.0$  为双水相溶剂系统,在转速为  $500\text{ r/min}$ 、流速为  $1.5\text{ mL/min}$  的条件下,经一步洗脱成功分离了香菇多糖粗品 ( $700\text{ mg}$ ),得到 Len ( $95\text{ mg}$ )、Len ( $45\text{ mg}$ ) 两个组分。Sephadex G-100 凝胶色谱柱检测纯度,结果显示 Len 为单一对称峰,凝胶渗透色谱法测定 Len 分子量为  $293\text{ kDa}$ ,红外光谱显示其具有多糖类的特征吸收峰;(2) 高速逆流色谱作为新型的分离技术,对天然产物有效成分的分离具有很大的优势,它具有处理量大、适应性强、产品损失小,能一次制备性地分离复杂的样品等优点。将高速逆流色谱在多糖领域进行推广应用,必将进一步促进多糖活性成分的开发和研究。

## References

- 1 Kaneko Y, Chihara G, Taguchi T. *International Journal of Immunotherapy*, **1989**, 5(4): 203 ~ 213
- 2 Jong S C, Bimingham J M. *Advances in Applied Microbiology*, **1993**, 39: 153 ~ 84
- 3 Wang Wei-Guo (王卫国), Zhao Yong-Liang (赵永亮). *Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药)*, **2000**, 31(8): 584 ~ 585
- 4 Du Q Z, Jerz G, Waibel R, Winterhalter P. *J. Chromatogr A*, **2003**, 1008(2): 173 ~ 180
- 5 Liu Jian-Hua (刘建华), Zhao Shan-Chang (赵善仓), Wang Xiao (王 晓), Geng Yan-Ling (耿岩玲), Li Fu-Wei (李福伟). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2008**, 36(7): 964 ~ 966
- 6 Du Q Z, Jerz G, Winterhalter P. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2004**, 27(20): 3257 ~ 3264
- 7 Du Q Z, Jerz G, Winterhalter P. *J. Chromatogr A*, **2004**, 1045(1/2): 59 ~ 63
- 8 Peng Jin-Yong (彭金咏), Xu Li-Na (许丽娜), Han Xu (韩 旭), Xu You-Wei (许有威), Qi Yan (齐 艳), Xu Qi-Wei (徐奇玮). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2007**, 35(10): 1444 ~ 1448
- 9 Du Qi-Zhen, Yuan Jie. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2005**, 28(11): 1717 ~ 1724

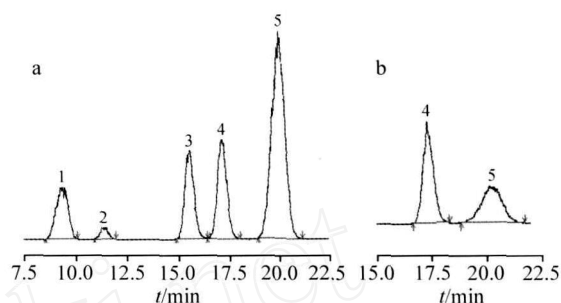


图 4 标准品 (a) 和供试样品 (b) 的色谱图

Fig 4 Chromatograms of standards (a) and Lentinan hydrolyzates (b)

1. 岩藻糖 (fucose); 2. 木糖 (xylose); 3. 山梨糖 (sorbose);
4. 甘露糖 (mannose); 5. 葡萄糖 (glucose)。

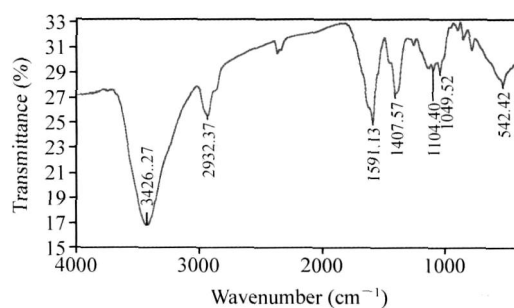


图 5 香菇多糖 Len 的红外检测图谱

Fig 5 Infrared spectrogram of Len

- 10 Huangfu Zhe-Kun(皇甫泽坤), Ni Shi-Feng(倪士峰), Sun Wen-Ji(孙文基). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(6): 883 ~ 886
- 11 Du Qi-Zhen, Li Lei, Jerz G. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1077(1): 98 ~ 101
- 12 Shinomiya K, Hirozane S, Kabasawa Y, Ito Y. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2000**, 23(7): 1119 ~ 1129
- 13 Shibusawa Y, Iino S, Shindo H, Ito Y. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2001**, 24(13): 2007 ~ 2016
- 14 Chao Zhi-Mao, Shibusawa Y, Shindo H, Ito Y. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2003**, 26(12): 1895 ~ 1903
- 15 Fu Zhi-Hong(付志红), Xie Ming-Yong(高明勇), Nie Shao-Ping(聂少平), Chen Jun-Hui(陈军辉), Peng Ri-Huang(彭日煌). *Journal of Nanchang University (Natural Science)* (南昌大学学报(理科版)), **2003**, 27(4): 349 ~ 352

## Separation and Purification of Lentinan by Preparative High Speed Counter Current Chromatography

JANG Zhi-Guo<sup>\*1,2</sup>, DU Qi-Zhen<sup>1</sup>, SHENG Li-Yi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (College of Food Science and Biotechnology Engineering,

Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012)

<sup>2</sup> (College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228)

**Abstract** High speed counter current chromatography(HSCCC) had been applied for the separation of lentinan. The HSCCC run was carried out with a two-phase solvent system composed of polyethylene glycol 1000 (PEG1000)-dipotassium hydrogen phosphate-monopotassium phosphate-water(0.5:1.25:1.25:7.0, *m/m*) by eluting the lower aqueous phase at 1.5 mL/min at 500 r/min. Under the optimized conditions, One-step HSCCC procedure yielded 95 mg of Len<sub>1</sub> and 45 mg of Len<sub>2</sub>. By Sephadex G-100 column chromatography, Len<sub>1</sub> was identified to be homogenous, and the molecular weight was 293 kDa according to the method of gel-filtration. The IR spectrum of Len<sub>1</sub> showed polysaccharide a character.

**Keywords** Lentinan, high speed counter current chromatography, aqueous two-phase system

(Received 28 July 2008; accepted 30 October 2008)

---

## 《超声提取分离》

该书是化学工业出版社的《现代分离科学与技术丛书》之一。利用超声提取分离物质中化学成分已经在在中药材有效成分提取等许多领域得到了广泛的应用。超声提取的特点是提取时间短、提取效率高、方便快捷。该书详述了超声提取分离的基本原理和设备装置;列举了超声波在中草药单味药、复方药、油脂、食品、环保、化工等领域工业提取的应用实例;还从植物细胞入手深入地探讨了超声提取分离的规律性和辅助溶剂提取的基本原理。该书可供从事药品和食品生产技术和检测人员及高等院校相关专业师生参考。

该书由郭孝武、冯岳松等编著,化学工业出版社出版,定价 48.00 元。