

蛹虫草多糖的纯化及其分子量的测定

黄奕诚¹, 陈雪香¹, 贺丽苹¹, 陈淑敏¹, 华洋林², 陈奇¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510642)

摘要:以蛹虫草子实体为材料, 对水提醇沉、硫酸锌盐去蛋白后获得蛹虫草粗多糖(CP)进行分离纯化。采用膜分离技术、DEAE-52 柱层析及 Sephadex G-100 柱层析对 CP 进行分离纯化, 并使用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定各组分多糖分子量, 以表征不同路径所得多糖的分子量分布。结果表明: CP 经膜过滤、DEAE-52 柱层析及 Sephadex G-100 进一步柱层析得到多糖组分 CP2-c2-s2, 经 HPGPC 法鉴定, CP2-c2-s2 为均一多糖组分, 其平均分子量为 20200 Da。

关键词: 蛹虫草多糖; 分离纯化; 凝胶渗透色谱

文章编号: 1673-9078(2012)8-1054-1057

Isolation, Purification and Molecular Weight Determination of Polysaccharides from *Cordyceps militaris*

HUANG Yi-cheng¹, CHEN Xue-xiang¹, HE Li-ping¹, CHEN Shu-min¹, HUA Yang-lin², CHEN Qi¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Infintus (China) Company Ltd, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Crude polysaccharides (CP) were extracted from dried fruits of *Cordyceps militaris* (Lex Fr) Link. through sequential steps of hot water extraction, ethanol precipitation and zinc sulfate deproteination. It was fractionated by membrane separation, purified by DEAE-cellulose-52 exchange chromatography and further purification by Sephadex G-100 gel filtration chromatography. Their molecular weights were determined using high performance gel-permeation chromatography (HPGPC) in order to characterize molecular weight distribution. The results showed that CP2-c2-s2 was a homogeneous polysaccharide with average molecular weight of 20200 Da, which could be obtained through aforementioned isolation and purification.

Key words: *Cordyceps militaris* polysaccharides; purification; gel permeation chromatography

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*(L.ex Fr) Link), 又名北冬虫夏草, 与冬虫夏草同属不同种, 二者在药理作用方面具有很多相似之处, 均具有抗炎、抗氧化、降血糖、抗肿瘤、免疫调节等功能^[1-2]。其中, 蛹虫草多糖是含量最高的药理活性物质, 是一种很有价值的潜在新型药用资源^[3]。

研究表明, 虫草等真菌多糖的药理活性与其结构、相对分子量等有密切的相关性, 一般分子量大于 16000Da 的大分子组分才具有较强的生物活性^[4-6]。然而, 多糖传统的提取方法, 如水提醇沉法, 得到的粗多糖的组成较为复杂, 分子量范围广。因此, 对具有生物活性的多糖进行分离纯化, 研究其构效关系并进一步控制产品的质量将具有主要意义。本文通过多种方法联用对蛹虫草粗多糖进行分离纯化, 并采用高效

凝胶渗透色谱法 (HPGPC)^[7]对分离纯化后得到的各个多糖组分进行表征, 获取分子量分布信息, 从分子量的角度评价不同路径对蛹虫草多糖的纯化效果, 同时也对获取高活性蛹虫草多糖提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蛹虫草子实体粉末: 无限极(中国)有限公司; 葡聚糖标准品 Dextran Standard (相对分子质量为 5200、11600、23800、48600、148000、273000、410000、670000、1400000); DEAE-52 纤维素(whatman 公司); Sephadex G-100 (Pharmacia 公司); 浓硫酸、苯酚、浓盐酸、氢氧化钠、氯化钠、无水乙醇、硫酸锌、磷酸二氢钾、超纯水等均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器

AL-104 万分之一天平(梅特勒托-利多); RE-201 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); DL-5-B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂); U-3010 分光光度计

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: 复合活性多糖的提取分离技术及评价研究 (PPD/11/05/005)

作者简介: 黄奕诚(1986-), 男, 在读硕士, 研究方向: 食品科学与工程

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 食品化学与营养

(日本日立高科技公司); DF-101S 数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限公司); 膜过滤器:(包括陶瓷膜:孔径分别为 200nm 和 50nm,膜面积为 0.22m²;有机滤膜:10000 分子量和 5000 分子量,膜面积为 0.3m²); DHG-970 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐心科学仪器有限公司); 层析柱(Φ2.6×40 cm,上海精科实业有限公司); 凝胶渗透色谱(GPC)系统:LC-10 高效液相色谱系统(日本岛津公司); TSK G-5000PWXL 及 TSK G-3000PWXL 色谱柱(Tosoh(东曹)公司)。

1.3 实验方法

蛹虫草粗多糖的制备:称取蛹虫草子实体粉末,用水体醇沉法^[8-9]提取其中的水溶性多糖,提取温度 70℃,料液比(g/mL):1:30,提取时间 4 h。蒸发浓缩提取液至固形物浓度为 14%,加入无水乙醇,使醇浓度为 80%,冰箱中醇沉过夜,离心,所得沉淀经硫酸锌盐去蛋白得到蛹虫草粗多糖 CP。

1.3.1 膜技术^[10-11]对蛹虫草粗多糖分离

将经醇沉除蛋白的蛹虫草粗多糖配置成浓度为 0.6 mg/mL 的 20 L 溶液进行陶瓷膜膜分离和有机滤膜分离,其中陶瓷膜分离操作条件为:温度为 35℃,操作进膜压力为 0.3 MPa,膜通量为 454.55 L/m²h;超滤膜(10000)分离操作条件为:温度为 35℃,操作进膜压力为 0.5 MPa,膜通量为 63.64 L/m²h;超滤膜(5000)分离操作条件为:温度为 35℃,操作进膜压力为 0.3 MPa,膜通量为 92.26 L/m²h。将不同膜截留液进行真空干燥,分别得到陶瓷膜截留多糖组分 CP1、超滤膜(10000)截留多糖组分 CP2、超滤膜(5000)截留多糖组分 CP3 和透过超滤膜(5000)多糖组分 CP4;并将每个组分称重。

1.3.2 蛹虫草多糖的柱层析^[12-13]分离纯化

蛹虫草多糖柱层析分离纯化路径:DEAE-52 装柱(2.6 cm×30 cm),超纯水平衡;上样:200 mg 超纯水溶解的多糖 5 mL,上样前将样品过 0.45 μm 微孔滤膜,然后依次用超纯水、0.1 mol/L NaCl、0.3 mol/L NaCl 洗脱,流速 2 mL/min,每 10 mL 收集一管;用苯酚-硫酸法^[14]在 490 nm 波长下跟踪检测,根据出峰情况分别收集各组分,浓缩,透析,干燥。将收集多糖含量最多的组分用 Sephadex G-100 装柱(2.6 cm×30 cm)进一步分离纯化,上样 1 mL(20 mg/mL),超纯水洗脱,流速 0.3 mL/min,每 4 mL 收集一管,苯酚-硫酸法在 490 nm 波长下检测,根据出峰情况分别收集各组分,浓缩,透析,干燥。

1.3.3 GPC 表征蛹虫草多糖分离纯化效果

1.3.3.1 色谱条件

色谱柱:TSKgel G5000pwxl、TSKgel G5000pwxl

串联;流动相:0.02 mol/L KH₂PO₄ 溶液;流速:0.6 mL/min;柱温:35℃;进样量:20 μL。

1.3.3.2 蛹虫草多糖分子量分析

将膜分级和柱层析后分部收集的各多糖组分组用纯水配成一定浓度的样液,取 1 mL 上清液,过 0.45 μm 水相滤头,按照 2.3.1 所述的色谱条件,进行色谱分析。

葡聚糖标准曲线的绘制:将葡聚糖标准品分别用超纯水配置成 2.0 mg/mL 的溶液,使用注射器抽取 1 mL 过 0.45 μm 滤头,每个样品进样 20 μL,检测时间为 45 min,记录色谱图,对葡聚糖相对分子质量的对数 logM 对洗脱体积进行处理,得到葡聚糖相对分子质量对数 logM 与洗脱体积的曲线,并对曲线进行二次回归拟合,得出与曲线相关度较好的葡聚糖 GPC 校正曲线,用于确定被测样品中多糖分子量分布范围。

2 结果与分析

2.1 GPC 校正曲线及蛹虫草粗多糖膜过滤分离效果

2.1.1 凝胶渗透色谱(GPC)校正曲线

葡聚糖相对分子质量对数 logM 与洗脱体积的曲线经校正得到葡聚糖 GPC 校正曲线方程:

$$y=0.493x^2-7.504x+38.89 (R^2=0.9958)。$$

注:x:葡聚糖相对分子质量对数 logM, y=洗脱体积。

2.1.2 蛹虫草粗多糖(CP)与膜分级多糖组分(CP1、CP2、CP3、CP4)

CP 经过膜分级得到多糖组分 CP1、CP2、CP3、CP4,各组分再经干燥及 GPC 分析检测后结果见表 1,其中 CP 与 CP2 的 GPC 图谱分别见图 1 和图 2(图中保留时间 t_R 32~45min 出现的色谱峰为样品中的杂质离子或者溶剂引起的杂峰)。

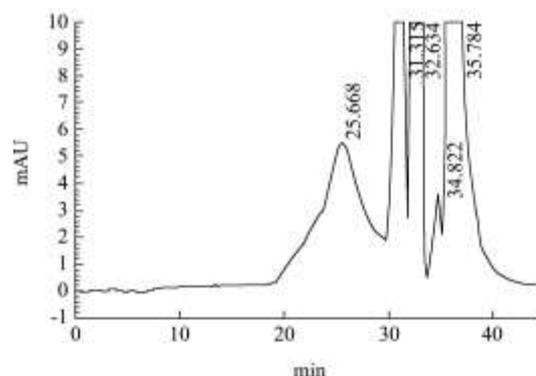


图 1 CP 的 GPC 图谱

Fig.1 GPC chromatogram of CP

由表 1 和膜过滤各多糖组分 GPC 图谱可知,蛹虫草多糖经过膜过滤后所得的多糖组分的含量和分子量范围有很大的差别。其中 CP1 的 GPC 图谱与粗多糖的基本一致,分子量范围非常宽;CP3、CP4 虽然分子量范围变窄了,但是分子量均在 10000 Da 以下,表

明这些多糖分子量较小,且在含量上较前两种多糖组分少;而 CP2 不仅分子量范围缩小,即 5000~40000 Da,表明其多糖的纯度有了一定的提高,且含量也是最多,根据大量文献报道,真菌多糖分子量大于 16000Da 的多糖片段才具有生物活性,因此选择 CP2 进行 DEAE-52 柱层析。

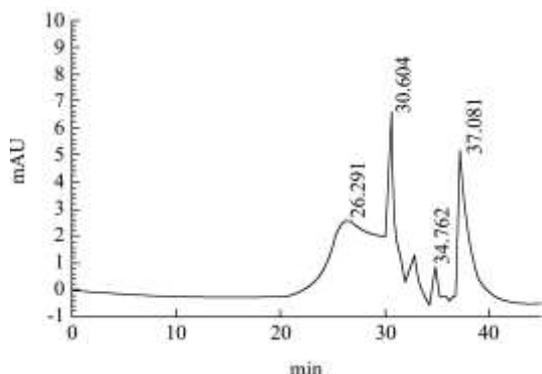


图 2 CP2 的 GPC 图谱

Fig.2 GPC chromatogram of CP2

表 1 多糖各组分含量、所占比例及分子量范围

Table 1 Contents, ratio and molar weight of the purified polysaccharides

多糖组分	多糖含量/g	所占比例/%	分子量范围/Da
CP1	3.012	25.1	5000-670000
CP2	4.289	35.74	5000-40000
CP3	1.422	11.85	5000-10000
CP4	2.277	18.98	<5000

2.2 DEAE-52 纤维素离子交换柱层析分离纯化结果

2.2.1 CP2 过 DEAE-52 纤维素离子交换柱层析洗脱曲线

CP2 过 DEAE-52 柱层析所得洗脱曲线见图 3。

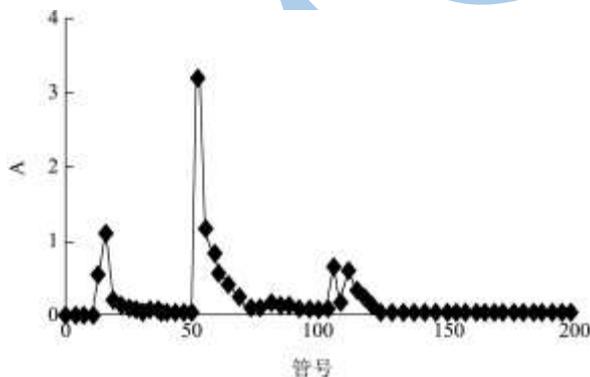


图 3 CP2 过 DEAE-52 柱层析洗脱曲线

Fig.3 Elution curve of CP2 by DEAE-52 column

由图 3 可以看出,CP2 经过 DD 水洗脱(1~36 管)后,得到多糖组分 CP2-c1;经过 0.1 mol/L NaCl 洗脱(37~95 管)后,得到多糖组分 CP2-c2;经过 0.3 mol/L NaCl 洗脱(96~142 管)后,得到多糖组分 CP2-c3 和

CP2-c4。

2.2.2 DEAE-52 柱层析多糖组分 (CP2-c1、CP2-c2、CP2-c3、CP2-c4)

CP2 经过 DEAE-52 过柱分离得到的四个多糖组分,经 GPC 分析检测得出其分子量范围分别为:DD 水洗脱得到的 CP2-c1 分子量范围是 5000~10000 Da;0.1 mol/L NaCl 洗脱得到的 CP2-c2 分子量范围主要是 5000~30000 Da;0.3 mol/L NaCl 洗脱得到的 CP2-c3 和 CP2-c4 分子量范围分别是 5000~25000 Da 与 5000~20000 Da。经多糖含量检测,多糖组分 CP2-c2 含量最多,是 CP2 的主要部分,所以用 Sephadex G-100 对 CP2-c2 进行进一步分离纯化。其中 CP2-c2 的 GPC 图谱见图 4(图中保留时间 t_R 32~45min 出现的色谱峰为样品中的杂质离子或者溶剂引起的杂峰)。

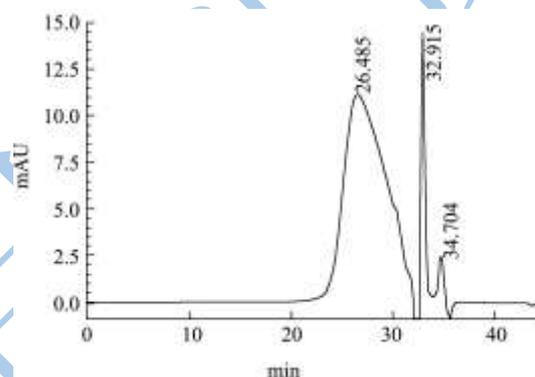


图 4 CP2-c2 的 GPC 图谱

Fig.4 GPC chromatogram of CP2-c2

2.3 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析分离纯化结果

2.3.1 CP2-c2 过 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析洗脱曲线

CP2-c2 过 Sephadex G-100 柱层析所得洗脱曲线见图 5

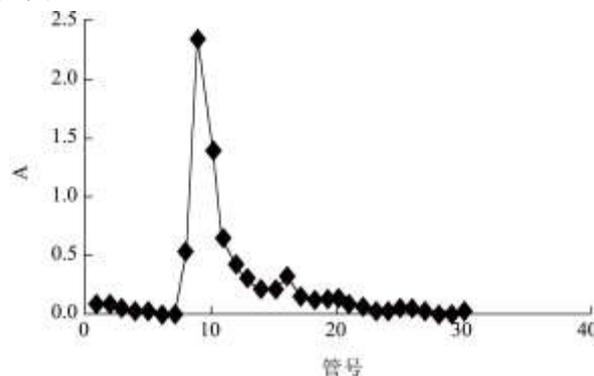


图 5 CP2-c2 过 Sephadex G-100 柱层析洗脱曲线

Fig.5 Elution curve of CP2-c2 by Sephadex G-100 column

由图 5 可知,CP2-c2 经过超纯水洗脱后,大致分成四个区段,第一区段组分 CP2-c2-s1(1~6 管)先被洗脱,接着是主要区段即第二区段组分 CP2-c2-s2

(8~12管),从图上可以看出,第二区段组分峰型尖、窄且对称,最后为第三区段组分 CP2-c2-s3(13~18管)和第四区段组分 CP2-c2-s4(19~22)。

2.3.2 Sephadex G-100 柱层析多糖组分 CP2-c2-s2

多糖组分 CP2-c2 再经过 Sephadex G-100 柱层析得到 CP2-c2-s2 的 GPC 图谱见图 6 (图中保留时间 t_R 32~45min 出现的色谱峰为样品中的杂质离子或者溶剂引起的杂峰)。

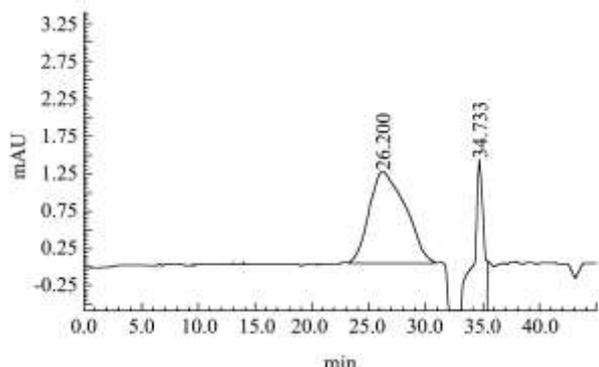


图 6 CP2-c2-s2 的 GPC 图谱

Fig.6 GPC chromatogram of CP2-c2-s2

从图 6 中我们可以看到, CP2-c2 经过 Sephadex G-100 柱层析得到的 CP2-c2-s2 多糖组分是一个均一、对称的峰,说明 CP2-c2-s2 为单一的多糖组分,按照葡聚糖系列标准品回归曲线计算得出该多糖的相对分子质量为 20200 Da。

3 结论

3.1 蛹虫草粗多糖经过膜过滤被分为 4 个组分 CP1、CP2、CP3、CP4,其中 CP2 含量最高,分子量范围为 5000~40000 Da; CP2 在 DEAE-52 层析柱上被分为 4 个组分 CP2-c1、CP2-c2、CP2-c3、CP2-c4,其中 0.1 mol/L NaCl 洗脱峰 CP2-c2 含量较高,初步判断为酸性多糖组分,而 CP2-c1、CP2-c3、CP2-c4 含量相对较低; CP2-c2 经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析进一步分离纯化,得到高纯度的 CP2-c2-s2。经过高效凝胶色谱分析 CP2-c2-s2 为单一对称峰,平均分子量 20200 Da。

3.2 大量文献表明多糖的生物活性与多糖的分子量密切的关系。但水提醇沉法是传统的提取水溶性多糖的方法,提取的多糖组成复杂,分子量分布广。要想获取高纯度、高活性的大分子多糖不仅需要对其粗多

糖进行分离纯化,而且还需要对其分子量进行追踪检测。本实验研究结果表明,高效凝胶渗透色谱法稳定性好,准确度高,精密性高,采用该方法对分离纯化得到的各组分多糖的分子量表征效果很好,可以优化分离、纯化工艺,为获取高纯度、高活性的蛹虫草多糖片段提供指导。

参考文献

- [1] Shonkor Kumar Das, Mina Masuda, Akihiko Sakurai, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8): 961-968
- [2] S P Li, G H Zhang, T T X Dong, et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia* [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13: 428-433
- [3] 汪玲玲,钟士清,方祥,等.虫草多糖研究综述[J].微生物学杂志,2003,23(1):43-45
- [4] 许周善,周晓燕.冬虫夏草多糖的研究进展[J].工业微生物,2000,30(1):56-57
- [5] 刘春泉,宋江峰,李大婧,等.北冬虫夏草多糖组分的分离纯化及结构研究进展[J].食品科学,2007,28(1):370-372
- [6] 郝瑞芳,景浩.真菌多糖的研究进展[J].中国食物与营养,2008,4:19-21
- [7] 艾则孜,马晓康,法鲁克,等.HPGPC 测定雪莲口服液中多糖的分子量[J].中国民族医药杂志,2007,5:46-47
- [8] 刘红锦,蒋宁,李建军,等.蛹虫草多糖提取及纯化工艺研究[J].江西农业学报,2007,19(12):80-82
- [9] 朱彩平,张声华.枸杞多糖的提取及组成的气相色谱分析[J].现代食品科技,2009,25(11):1327-1328
- [10] 叶晓,易剑平,俞军,等.微滤、超滤和纳滤联用对多糖进行分子量分级[J].食品科技,2006,8:107-110
- [11] 何江川,韩永萍.超滤膜分离法在多糖分离提取中的应用[J].EDIBLE FUNGI,2005,1:5-7
- [12] 刘国凌,宁正祥,郭红辉.苦瓜果实中多糖的分离纯化及性质分析[J].食品科学,2010,31(3):30-34
- [13] 闫景坤,李琳,吴建勇.人工培养冬虫夏草胞外多糖的分离纯化研究[J].现代食品科技,2010,26(4):366-369
- [14] 闫文娟,李泰辉,唐芳勇,等.广东虫草多糖的提取及含量测定[J].华南农业大学学报,2009,30(4):53-55