

古尼虫草多糖提取分离及初步分析

刘安军, 钟玥如, 朱振元, 祝长美, 马琳, 马志民

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文用 30%乙醇溶液作提取剂, 从古尼虫草菌丝体中提取多糖, 提取液经去脂、去蛋白、醇析后得两种粗多糖 CPS-50, CPS-70。利用 DEAE-Sephadex A-25 柱色谱对两种粗多糖进行分离纯化, 得纯多糖 CPS-1, CPS-2。苯酚-硫酸法测定糖含量, 紫外光谱分析证明其纯度, 红外光谱显示其具有多糖类的特征吸收峰。多糖降解后经薄层分析表明, 降解的虫草多糖由葡萄糖或(和)甘露糖组成。

关键词: 古尼虫草; 多糖; 提取; 纯化

中图分类号: TS201.2; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)01-0028-04

Extraction, Isolation and Analysis of the Polysaccharides from

Cordyceps Gunnii (Berk.) Berk.

LIU An-jun, ZHONG Yue-ru, ZHU Zhen-yuan, ZHU Chang-mei, MA Lin, MA Zhi-min

(College of Food Science and Biotechnology, TianJin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Two crude polysaccharides, CPS-50 and CPS-70, were extracted from the mycelium of *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk. using 30% ethanol. After remove of lipids (by ethyl acetate) and proteins (using sewage method), and precipitation (with 50% and 70% alcohol), the crude polysaccharides were further purified by DEAE-Sephadex A-25 column. The contents and purities of the obtained polysaccharides, named as CPS-1 and CPS-2, were determined using phenol-sulfuric acid method and UV spectrophotometric method, respectively. Their structures were analyzed by infrared spectrum (IR). In addition, thin layer chromatography analysis showed that the hydrolysis of the pure polysaccharides yielded two kinds of monosaccharides, glucose and/or mannose.

Key words: *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk.; Polysaccharide; extraction; purification

古尼虫草和冬虫夏草同属于虫草属真菌, 古尼虫草在湖南、贵州等省分布非常广泛, 其寄主为栖居于茶园等土壤中的蝙蝠蛾科 (Hepialidae) 幼虫。1983年梁宗琦首次报道古尼虫草, 并对其菌种分离、无性型确定、营养成分、药理实验等方面作了大量研究, 表明古尼虫草在提高机体免疫力、促进睡眠和增强记忆力、镇痛、心血管疾病、神经衰退和衰老、降血压等方面有着重要的作用^[1-4]。另外, 利用古尼虫草生产出的药品、保健食品已陆续上市, 它以全面提高人体免疫力, 抗癌、抗衰老、抗氧化等生理功能而备受消费者青睐^[5-7]。但是国内外对于古尼虫草的分离纯化以及结构等研究还比较少。本文就古尼虫草的提取分离纯化进行了深入的研究, 并且对其结构进行了初步分析。

收稿日期: 2007-9-4

基金项目: 天津科技大学启动基金 (No. 0200060); 人事部中国博士后科学基金 (No. 20060400709) 资助项目

作者简介: 刘安军, 博士, 教授, 从事食品生物技术教学与科研工作

1 材料与方法

1.1 供试菌株

古尼虫草 (*Cordyceps Gunnii*) 菌丝粉, 取自天津科技大学功能性食品实验室。

1.2 仪器和药品试剂

旋转蒸发器、紫外可见分光光度计、高速冷冻离心机、TH-300 梯度混合器、DBS-100 电脑全自动部分收集器、真空冷冻干燥机、红外光谱仪 (KBr 压片)。

DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-75, 均为鼎国生物公司产品, 乙醇、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇、甲醇、氯化钠、浓硫酸、苯酚, 均为分析纯。

1.3 古尼虫草菌丝粉粗多糖的提取

1.3.1 浸提

称取古尼虫草菌丝粉 100 g, 加入到 1 L 30%乙醇中浸泡过夜。80 °C 恒温水浴搅拌虫草菌粉浸泡液 2 h。布氏漏斗抽滤, 取滤液, 滤渣重复浸提步骤 2 次。

1.3.2 去脂

合并3次浸提液, 60℃旋蒸至体积约200 mL。加入200 mL乙酸乙酯, 搅拌均匀, 置于分液漏斗中静置分层, 以分离脂溶相和水溶相, 留水溶相作进一步分析。

1.3.3 seavage法除蛋白^[8]

1.3.4 醇析^[9]

在去蛋白后的液体中加无水乙醇使乙醇的体积分数达50%, 搅拌5 min, 4000 r/min离心5 min。将沉淀冷冻干燥, 得粗多糖CPS-50; 与离心后的上清液中继续加无水乙醇, 使之体积分数达70%, 同样搅拌离心, 得沉淀冷冻干燥后为粗多糖CPS-70。

1.4 粗多糖的纯化

凝胶: DEAE-Sephadex A-25; 色谱柱: 1.2 μm×60 cm; 供试液: 粗多糖150 mg, 溶于100 mL水中; 洗脱液: 0.5 mol/L NaCl溶液梯度洗脱, 流速为0.5 mL/min, 接收器设定20 min/管, 接收70管, 苯酚-硫酸法检测。收集出峰部分洗脱液冷冻干燥。得两种纯多糖: CPS-1 (由50%粗多糖所得), CPS-2 (70%粗多糖所得)。

1.5 多糖含量的测定

1.5.1 葡萄糖标准曲线的制作 (苯酚-硫酸法)

精密量取0.1 mg/mL的葡萄糖标准品溶液0、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL加入试管中, 不足1 mL管用蒸馏水补足至1 mL, 各管再加入6%苯酚溶液1.0 mL, 混匀, 迅速加入5 mL浓硫酸摇匀, 静置10 min后在30℃水浴中加热20 min, 取出冷却至室温。在490 nm处测定吸光度, 以葡萄糖的量(C, μg/mL)为横坐标, 以吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 经回归处理得线性回归方程。

1.5.2 样品液的制备

分别精密称取savage法去蛋白后的虫草提取物, 两种粗多糖CPS-50、CPS-70及两种纯多糖CPS-1、CPS-2各10 mg, 分别定容至50 mL, 即质量浓度为0.2 mg/mL。

1.5.3 样品糖含量测定

同样用苯酚硫酸法测定5种样品在490 nm处的吸光度值。

$$\text{多糖含量} = X/W \times 100\%$$

其中: X为多糖质量(μg), W为供试品的质量(μg)。

1.6 多糖的定性分析

1.6.1 旋光度法

分别称取CPS-1、CPS-2各30 mg, 溶于15 mL蒸馏水中, 测定其比旋光度值。

$$[\alpha]_D = a/CL$$

其中: a-所测旋光度, C-溶液的质量浓度(g/mL), L-试管长度(dm)

1.6.2 紫外光谱分析

将CPS-1、CPS-2配成1.0 mg/mL的水溶液, 于200~1000 nm进行全波长扫描。

1.6.3 多糖组成分析

分别取25 mg样品CPS-1加入1 mL浓度为2 mol/L的三氟乙酸(TFA), 封管, 100℃水解, 10 h; 冷却后用氮气将其吹干, 加少量甲醇, 用氮气吹干, 反复3次。然后进行薄层层析:

展开剂: 正丁醇:乙酸:水=4:2.4:2.4 (v/v)。

显色剂: 二苯胺5 g, 苯胺10 mL, 50 mL 85%磷酸混合溶解, 加丙酮至500 mL。

标品: 葡萄糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、氨基葡萄糖。

分别取样品及标品各5 mg, 每种样品加入0.2 mL、标品加入0.5 mL展开剂溶解, 点于硅胶薄层板展开; 取出吹干, 浸入显色剂, 在100℃烘至斑点显色清晰。

1.6.4 红外光谱分析

分别将1.0~1.5 mg干燥的纯多糖CPS-1、CPS-2于KBr混合压片于4000~400 cm⁻¹红外光谱仪扫描。

2 结果与分析

2.1 多糖的提取

表1 多糖的提取率

样品	浸提后粗多糖	去脂后多糖	去蛋白后多糖	纯析多糖 G50	纯析多糖 G70	纯多糖 CPS-1	纯多糖 CPS-2
提取率/%	46.16	33.91	15.01	3.36	9.54	1.31	3.46

由表1可以看出经过分离纯化后, 纯多糖CPS-1的提取率为1.31%, CPS-2的提取率为3.46%。

2.2 粗多糖的分离纯化

两种粗多糖CPS-50、CPS-70经DEAE-Sephadex A-25柱层析后, 各得到一个主峰, 即纯多糖CPS-1、CPS-2。如图1、2。

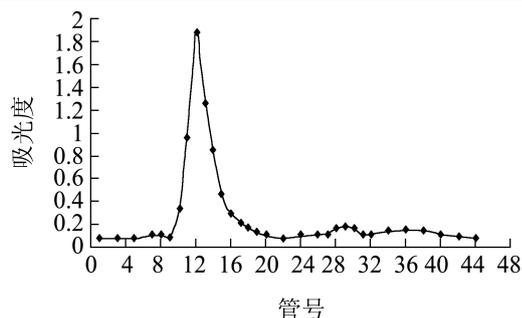


图1 CPS-50的DEAE-Sephadex A-25柱层析洗脱曲线

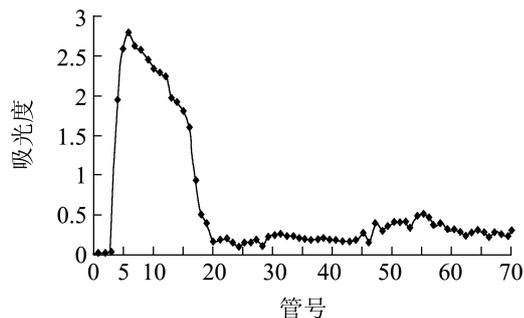


图2 CPS-70的DEAE-Sephadex A-25柱层析洗脱曲线

2.3 多糖含量的测定

2.3.1 标准曲线的制备

吸光度测定如表 2 所示，葡萄糖标准曲线如图 3 所示。

表 2 葡萄糖各质量浓度的吸光度值

管号	1	2	3	4	5
x(葡萄糖, μg/mL)	20	40	60	80	100
y(吸光度OD ₄₉₀)	0.245	0.526	0.795	1.033	1.252

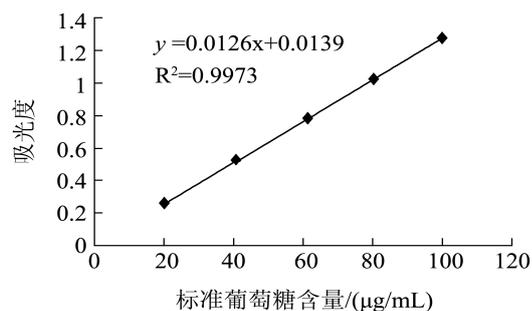


图3 葡萄糖标准曲线

实验表明，标准葡萄糖在 20~100 μg/mL 之间呈良好的线性关系，实验数据处理后得回归方程： $y=0.0126x+0.0139$ ， $R^2=0.9973$ 。

2.3.2 多糖含量测定

依据公式计算，结果见表 3。根据数值说明经过醇析，柱层析之后样品多糖含量明显升高。

表 3 5 种样品的多糖含量

样品	虫草提取物	CPS-50	CPS-70	CPS-1	CPS-2
样品溶液/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
水/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
苯酚/mL	1	1	1	1	1
浓硫酸/mL	5	5	5	5	5
y(平均 OD ₄₉₀)	0.2140	0.4501	0.3498	0.573	0.4840
x/(μg/mL)	15.8810	34.6190	26.6587	44.3730	37.3095
多糖质量分数/%	7.94	17.31	13.33	22.19	18.65

2.4 多糖的定性分析

2.4.1 旋光度 $[a]_D$ 测定

根据公式计算得出比旋光度值如表 4 所示。

表 4 比旋光度的测定

样品	1	2	3	平均	$[a]_D$
CPS-1	0.125	0.120	0.120	0.1225	61.25
CPS-2	0.055	0.055	0.055	0.055	27.5

2.4.2 紫外光谱分析

扫描结果在 250~280 nm 间无吸收峰，表明其中无蛋白质，氨基酸及核酸。

2.4.3 多糖降解及初步组成分析

CPS-1 与 CPS-2 降解后，其单糖分别命名为 PS1 和 PS2，然后与标准品进行对照，进行薄层分析。结果如图 4 所示。

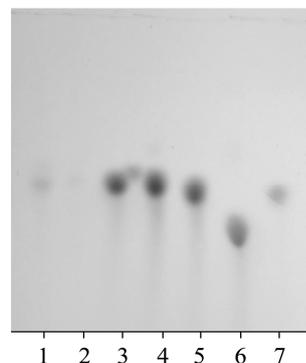


图4 薄层层析图

注：1、PS1；2、PS2；3、葡萄糖；4、甘露糖；5、半乳糖；6、葡萄糖醛酸；7、氨基葡萄糖

由薄层分析结果表明：多糖 CPS-1 与 CPS-2 的降解产物均呈现葡萄糖或甘露糖的斑点，因此可以判断两者均含有葡萄糖或（和）甘露糖，表明多糖 CPS-1、CPS-2 是不同分子量的葡萄糖或（和）甘露糖的聚合物。

2.4.4 红外光谱分析

将分离纯化得到的虫草多糖CPS-1和CPS-2进行红外光谱分析，图5、6分别为CPS-1、CPS-2的红外吸收

光谱图。

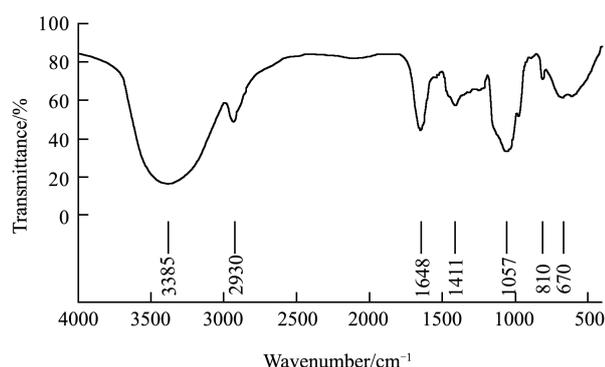


图5 CPS-1的红外光谱图

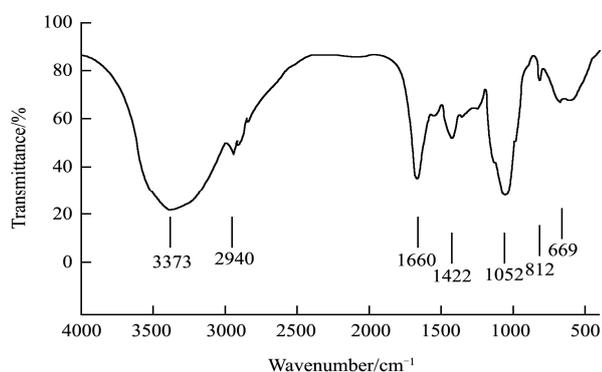


图6 CPS-2的红外光谱图

从图中可见,在 $3500\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ 和 $1675\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰表明 CPS1, CPS2 都为糖类化合物,其中 $3500\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 处的峰是糖分子中羟O-H的伸缩振动吸收, $2895\sim 2940\text{ cm}^{-1}$ 的一组峰是糖分子中C—H键的伸缩振动吸收, 1600 cm^{-1} 左右出现的峰为-CHO的C=O键的伸缩振动峰, $1200\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰则为C-H变角振动所形成的峰,它和C-H的伸缩振动构成了糖类的特征吸收峰, $1000\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰是C-O所伸展振动峰。

3 结论

虫草多糖具有重要的临床应用价值及广阔的应用前景,本文对古尼虫草菌丝体中的多糖进行了初步的

提取分析,通过DEAE-Sephadex A-25柱色谱对粗多糖进行分离纯化,得到两种多糖CSP-1及CSP-2,多糖含量分别为22.19%、18.65%。虫草多糖降解后得到的单糖PS1和PS2由葡萄糖或(和)甘露糖组成,表明多糖CSP-1、CSP-2是不同分子量的葡萄糖或(和)甘露糖的聚合物。此外,对分离所得组分CSP-1及CSP-2进行了红外光谱测定及分析,结果显示其具有多糖类的特征吸收峰。

参考文献

- [1] 梁宗琦,刘爱英,董熙昌,等.古尼虫草的应用价值评估[A].中国植物学会真菌学会虫生真菌专业组.中国虫生真菌研究与应用,第2卷[C].北京:中国农业科技出版社,1991,74-79
- [2] 李淑芳,鲍淑娟.古尼拟青霉药理学作用研究:古尼拟青霉对记忆的促进作用[J].贵阳医学院学报,1991,16(1):45-46
- [3] 朱振元,梁宗琦.小分子多肽的镇痛作用及其生物来源[J].山地农业生物学报,1999,18(3):195-199
- [4] Jin W. B., Leonard L., Jeff C., et al. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*[J]. Phytochemistry, 1999, 51: 891-898
- [5] 陈畅,罗珊珊,孙迎节,等.3种虫草抗氧化活性的研究[J].中国生化药物杂志,2004,25(4):212-214
- [6] 陈畅,罗珊珊,李彦,等.三种虫草抗氧化活性的化学发光法研究[J].上海中医药杂志,2004,38(7):53-55
- [7] Zunsheng Wang, Zhuojing He, Suxia Li, Qinsheng Yuan. Purification and partial characterization of Cu, Zn containing superoxide dismutase from entomogenous fungal species *Cordyceps militaris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36: 862-869
- [8] 张惟杰.糖复合物生化研究技术(第二版)[M].浙江:浙江大学出版社,1999,196,245
- [9] 季晖,涂洪湖,李耐三.人工虫草菌丝多糖的分离提纯及其降血糖作用研究[J].中国药科大学学报,1993,24(1):39-42

小麦粉国际标准正在修订

日前,我国正对小麦粉强制性国家标准进行修订,目前已形成报批稿。新标准有望规定小麦粉中禁添增白剂。据了解,原有的小麦粉国家标准于1987年实施,至今已20年。

新标准拟建议取消“过氧化苯甲酰”和“过氧化钙”两种面粉添加剂,这两种添加剂在原有标准中被严格限量添加。记者了解到,“过氧化苯甲酰”俗称“面粉增白剂”,适量添加不仅可对面粉起到增白作用,还能杀菌防霉。但过量添加会破坏面粉中维生素A、E等营养成分。尤其有害的是,“过氧化苯甲酰”含有微量金属元素,过量摄入对人体健康不利。

据本市相关部门介绍,增白剂超标是近年来面粉抽查中不合格的主要因素,个别面粉小企业为了造出“雪白天粉”,往往超标使用增白剂。

(新闻来源:中国食品科技网)