

文章编号:1673-1689(2010)01-0023-04

沙棘多糖 HRP a 纯化及鉴定

田晓艳¹, 刘延吉^{*2}, 祝寰宇², 张弘¹, 刘沛含¹

(1. 辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院,辽宁 抚顺 113001;2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院,辽宁 沈阳 110161)

摘要: 作者研究了沙棘多糖 (*Hippophae rhamnoides* L. polysaccharide, HRP) 的组成。采用 DEAE-SephadexA-50 凝胶柱对粗提多糖进行分离,酶法对 HRP 脱蛋白后,Sephadex-G150 层析对 HRP 多糖进一步提纯,HPLC 层析确定 HRP a 组成及组分比例,利用红外光谱鉴定多糖 HRP a 糖苷键。采用 DEAE-SephadexA-50 凝胶柱分离多糖,得到 2 种组分分别为 HRP a、HRP b。HPLC 检测 HRP a 水解物由木糖、甘露糖、葡萄糖组成,并且它们之间的摩尔比值为 1 : 1.06 : 1.13。红外光谱确定多糖 HRP a 构型同时含有 α -和 β -型糖苷。

关键词: 沙棘;多糖;纯化;鉴定

中图分类号:Q 539

文献标识码:A

Purification, Identification of Polysaccharide HRP a of *Hippophae rhamnoides* L.

TIAN Xiao-yan¹, LIU Yan-Ji^{*2}, ZHU Huan-Yu², ZHANG Hong¹, LIU Pei-han¹

(1. College of Environmental Technology and Biotechnology, Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Fushun 113001, China; 2. College of Biotechnology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The polysaccharide composition from *Hippophae rhamnoides* L. polysaccharide (HRP) was study in this manuscript. Two different compositions, HRP a, HRP b were found in the isolated crude polysaccharide by DEAE-Sephadex-50 column the compositions of HRP a contained xylose, mannose, glucose in 1 : 1.06 : 1.13 molar ratio. Furthermore, HRP a configuration is composed of α - and β -glycoside.

Key words: *Hippophae rhamnoides* L., polysaccharide, purification, identification

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L) 为胡颓子科植物,沙棘果实中的活性成分已达到 190 多种,油中的活性成分有 106 种,其中脂溶性维生素有 6 种,脂肪酸 22 种,脂类 42 种,黄酮和酚类 36 种。沙棘黄酮具有抗氧化、抗衰老、抗辐射、抗菌、抗病毒及

增强免疫等广泛的功效。沙棘多糖 (HRP) 有较强的抗氧化作用,还对引起病毒性心肌炎的病毒具有明显的抑制作用。黄晓青等采用沙棘果榨汁提油后的果渣及籽渣提取的两种沙棘多糖为材料,通过沙棘多糖对小鼠实验性高脂血症的影响,观察其降

收稿日期:2009-01-09

基金项目:国家 863 计划项目(2004AA247010)。

作者简介:田晓艳(1971-),女,辽宁沈阳人,讲师,农学硕士,主要从事次生物质代谢研究。Email:maggiatian2002@163.com

*通讯作者:刘延吉(1959-),男,辽宁大连人,副教授,农学博士,主要从事细胞信号转导研究。

Email:yanjiliu@yahoo.com.cn

血脂作用。证明沙棘多糖具有降低血清 LDL-C,降低肝脏 TC 和高脂饮食引起的血糖升高,降低 SGOT 活性,保持肝脏功能。

目前对多糖生物学功效的研究愈来愈引起人们重视,成为当代生物学的热门领域。但目前尚对沙棘多糖提取纯化的报道,作者对沙棘多糖 HRP_a 进行纯化和鉴定,为沙棘多糖开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

沙棘多糖由沈阳农业大学生物科学技术学院提供。

1.2 方法

1.2.1 沙棘多糖 HRP 的醇沉及部分理化性质测定 分别选取体积分数 0~50%、50%~70%、70%~90%乙醇沉淀沙棘多糖,并对各沙棘多糖部分理化性质进行测定。

1.2.2 沙棘多糖 HRP 脱蛋白及透析 用木瓜蛋白酶法脱蛋白,并将脱蛋白质多糖装入活化好的透析袋中,流水透析 48 h,蒸馏水透析 72 h,不断换水,然后进行浓缩、醇沉、洗涤、真空干燥,得到半纯品多糖 HRP。

1.2.3 粗多糖的分级纯化 将粗提得到的多糖 HRP 过 DEAE-SephadexA-50 凝胶柱,用去离子水及 0.01~0.1 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱。

1.2.4 Sephadex-G150 层析检验 HRP_a 多糖纯度 HRP_a 高效液相色谱(HPLC)分析及 HRP_a 红外光谱检测。

2 结果与分析

2.1 沙棘多糖 HRP 的醇沉及其部分理化性质

体积分数 0~50%乙醇沉淀得高相对分子质量多糖(HRP_I, 88.5%);体积分数 50%~70%乙醇沉淀得中等相对分子质量多糖(HRP_{II}, 5.5%);

体积分数 70%~90%乙醇沉淀得相对分子质量较小的多糖及低聚糖(HRP_{III}, 6.0%)。选取含量较高的 HRP_I 作为后续研究对象。由于 HRP_I 具有考马斯亮蓝 G250 反应,说明 HRP_I 中含有蛋白质组分,故要对其脱蛋白质。

表 1 HRP I、HRP II、HRP III 部分理化性质

Tab. 1 Part of physicochemical property of HRP I, HRP II, HRP III

理化性质	HRP I	HRP II	HRP III
固体性状	深红棕色粉末	黄棕色粉末	深棕色粉末
水溶性	可溶	可溶	可溶
碘-碘化钾反应	—	—	—
苯酚-硫酸反应	+	+	+
3,5-二硝基水杨酸反应	+	+	+
硫酸-吡啶反应	-	+	+
考马斯亮蓝 G250 反应	+	-	-

2.2 HRP 脱蛋白

经过 L₉(3⁴) 正交实验,并用级差分析法来分析数据,得木瓜蛋白酶法脱蛋白质最佳条件:酶量 5 mg/mL,酶解温度 60 °C, pH = 6,且此条件下的蛋白质清除率为 73.58%。

2.3 HRP 分离——DEAE-SephadexA-50 柱层析

沙棘多糖的 DEAE-SephadexA-50 凝胶柱层析洗脱曲线如图 1。流速为 0.5 mL/min,得两个单一对称洗脱峰,分别是 1~20 的水洗部分及 0.05 mol/L NaCl 洗脱部分;在 0.01 mol/L NaCl 及 0.1 mol/L NaCl 洗脱部分未见有多糖被检出。因此将以上水洗部分及 0.05 mol/L NaCl 洗脱部分分别收集,透析,冷冻干燥后得到乳白色絮状晶体及淡黄色絮状晶体,分别命名为亚组分 HRP_a、HRP_b。通过苯酚-硫酸法检测,HRP_{Ia}、HRP_{Ib} 的多糖得率分别为 35.7%、8.5%,因此选择多糖得率较高的亚组分 HRP_{Ib} 做纯度检测及进一步研究。

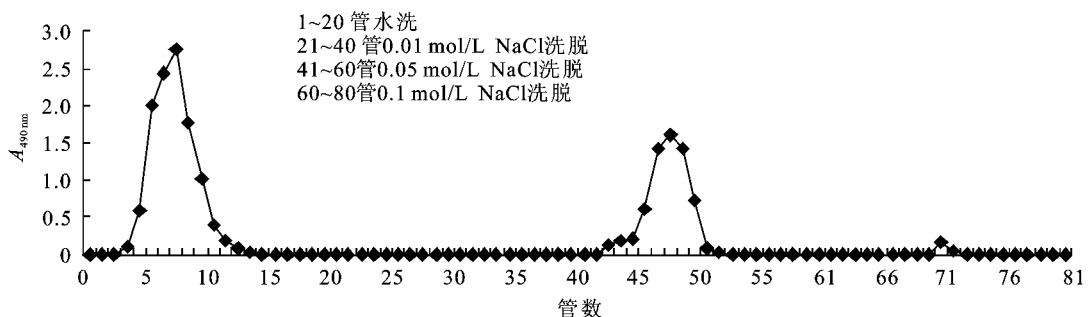


图 1 沙棘半精品多糖(HRP_I) DEAE-SephadexA-50 凝胶柱层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of HRP_I on DEAE-SephadexA-50 column

2.4 HRP a 纯化——sephadex G150 柱层析

HRP Ia 过 Sephadex G150 柱,经苯酚硫酸法跟踪检测洗脱曲线为单一对称峰(见图 2),由此说明 HRP Ia 是相对分子质量分布均一的沙棘多糖亚组分。

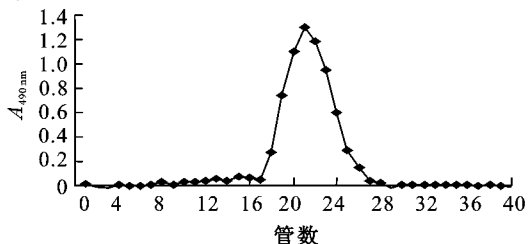


图 2 HRP Ia 的 Sephadex G150 凝胶柱层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of HRP Ia on Sephadex G150 column

图 3 和图 4 分别为标准单糖和 HRP a 水解物的 HPLC 图谱。水解液出峰的保留时间与标准样中的木糖、甘露糖、葡萄糖相对应,说明 AKSP2 中含有这 3 种单糖,其摩尔量比值为 1 : 1.06 : 1.13。

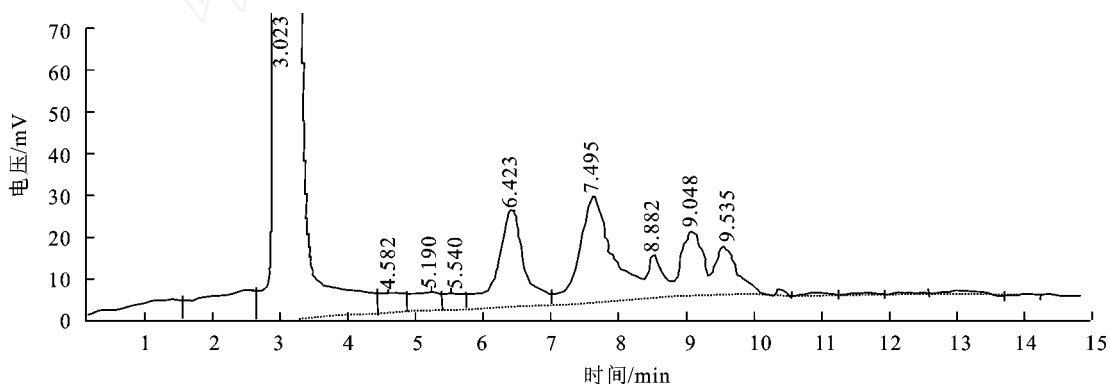


图 3 标准单糖高效液相图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of standard monosaccharides

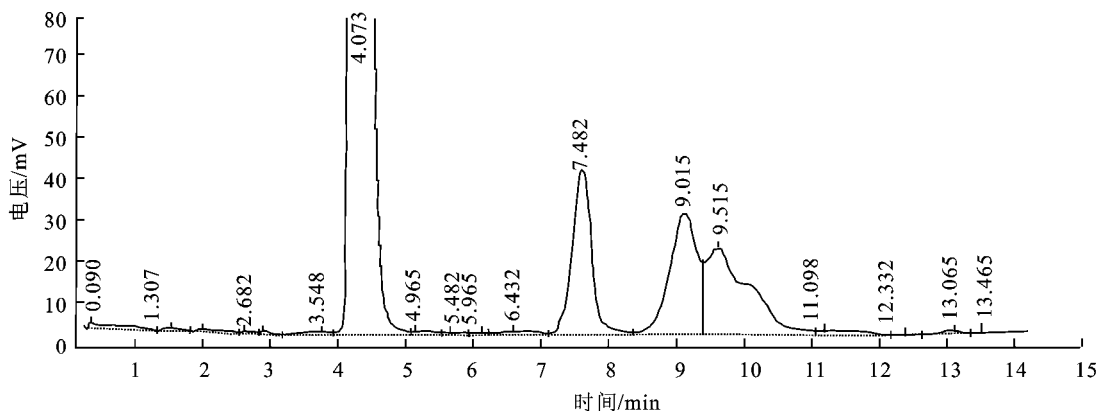


图 4 HRP a 水解物的高效液相图谱

Fig. 4 HPLC chromatograms of hydrolysates of HRP a

2.5 HRP a 红外光谱检测结果

多糖 HRP a 在 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 范围内的红外光谱,主要强吸收峰为 $2933.8, 1383.9 \text{ cm}^{-1}$ 处的两组峰。分别是糖类的伸缩振动及 C—H 变角振动,这两组峰是糖类物质重要的特征吸收峰。在 1746.1 cm^{-1} 处及 1622.1 cm^{-1} 处的吸收峰,系 C=O 伸缩振动引起的,说明 HRP Ia 可能含有一 COOH, —CHO 等基团,且 —CHO 等基团具有还原性,这可能与多糖的抗氧化性有关。在 1327.4 cm^{-1} 处的吸收峰,系 C=O 对称伸缩振动引起的,说明 HRP Ia 中含有一 COO 结构; $1250 \sim 950 \text{ cm}^{-1}$ 之间的几组峰,是吡喃糖环的醚键(C—O—C)和羟基的吸收峰;在 916.3 cm^{-1} 处的吸收峰说明其含有 -D-半乳吡喃糖;在 760 cm^{-1} 附近的吸收峰说明其含有 -D-木吡喃糖;在 $843 \sim 818 \text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰说明其含有 -D-甘露吡喃糖、-D-甘露吡喃糖,以上几组峰说明 HRP Ia 既有 糖苷键又有 糖苷键。

3 结 语

采用 DEAE-SephadexA-50 凝胶柱对多糖分离,得到 2 种组分,即 HRP a、HRP b。HPLC 层

析表明 HRP a 由木糖、甘露糖、葡萄糖组成,且其摩尔比值为 1 : 1.06 : 1.13。对多糖 HRP a 在 400 ~ 4 000 cm^{-1} 范围内的红外光谱分析表明,键型为 α -和 β -型糖苷键。

参考文献(References) :

- [1] 刘延吉,田晓艳,李峰等. 草本刺嫩芽根多糖 AKSP2 纯化、鉴定及体内抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报,2008, 27(3) : 35 - 39.
LIU Yan-ji, TIAN Xiao-yan, LI Feng, et al. Purification, Identification and anti-oxidation activity of polysaccharide AKSP2 of roof of aralia continentalis kitag[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(3) : 35 - 39(in Chinese)
- [2] 韩春然,马永强,唐娟. 黑木耳多糖的提取及降血糖作用[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5) : 111 - 114.
HAN Chun-ran, MA Yong-qiang, TANG Juan. Extraction of polysaccharide from auricularia auricular and its hypoglycemia activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(5) : 111 - 114(in Chinese)
- [3] 张桂和,赵谋明,王炜. 方格星虫多糖分离纯化及性质鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4) : 63 - 66.
ZHANG Gui-he, ZHAO Mour-ming, WANG Wei. Isolation, Purification and property identification of polysaccharide contained in sipunculus nudus[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(4) : 63 - 66. (in Chinese)
- [4] 林勤宝,高大维,于淑娟,等. 大枣多糖的单糖组成的高效液相色谱法研究[J]. 郑州粮食学院学报,1998,3(4) :57 - 59.
LIN Qin-bao, GAO Da-wei, YU Shu-juan, et al. Study on monosaccharide composition of polysacchrides from Chinese red dates by HPLC[J]. **Journal of Zheng - Zhou Grain College**, 1998,3(4) :57 - 59. (in Chinese)
- [5] Sol 'ya N, Yuriy A ,Alexander S,et al. Structure of the O-polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. Carotovora GDPB436 [J]. **Carbohydrate Research**, 2003, 338 :2025 - 2027.
- [6] Nikolay Paramonov,David Bailey,Minnie Rangarajan,et al. Structure analysis of the polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Porphyrromonas gingivalis* strain W50[J]. **Eur J Biochem**, 2001, 268 :4698 - 4707.
- [7] Clas landersjo ,Andrej Weintraub ,Goran Widrnalm . Structural analysis of the O-antigen polysaccharide from the shiga toxin-producing *Escherichia coli* O172[J]. **Eur J Biochem**, 2001,268:2239 - 2245.
- [8] Come J ,Qiuwei Xu ,Mary Retzlaff ,et al. Structural analysis and chemical depolymerization of the capsular polyaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 1[J]. **Carbohydrate Research**, 2001,337:335 - 344.
- [9] Elisabeth J ,Daan J ,Johannis P,et al. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* 85 containing an open chain nonionic acid[J]. **Eur J Biochem**, 2002, 269 :5590 - 5598.

(责任编辑:朱明)