

# 油菜蜂花粉多糖的分离鉴定及免疫活性研究

吴盼盼, 段元锋, 徐德平\*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 油菜蜂花粉粉碎后经体积分数 95% 乙醇脱脂, 过滤, 滤渣用去离子水 60 °C 提取, 再用体积分数 95% 乙醇沉淀提取液, 得到油菜蜂花粉水提醇沉物。利用 DEAE-纤维素柱、HW-55F 色谱柱及 Sephacryl 色谱柱、Sephacryl 色谱柱、Sephacryl 色谱柱对油菜蜂花粉水提醇沉物进行分离, 得到一个主要的多糖类化合物。经 Sephadex G-100 色谱柱及紫外光谱分析对该化合物进行纯度鉴定, 再通过核磁方法对其进行  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  和  $^{135}\text{DEPT-NMR}$  分析, 得该化合物结构为  $\text{HOCH}_2\text{-}[\text{CHOH}]_4\text{-COOH}$ 。给免疫抑制小鼠灌胃花粉多糖, 实验结果表明: 油菜蜂花粉多糖能显著提高免疫抑制小鼠的胸腺指数 ( $P<0.01$ )、脾脏指数 ( $P<0.01$ ) 及血清 IgG 水平 ( $P<0.01$ )。

**关键词:** 油菜蜂花粉水提物; 免疫活性; 分离; 多糖

中图分类号: TM 344.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)10—1040—05

## Isolate, Identify and the Immune Improving Activity of Polysaccharides from Rape Bee Pollen

WU Panpan, DUAN Yuanfeng, XU Deping\*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Rape bee pollen was powered and extracted by 95% ethanol under reflux, then extracting the filter residue by deionized water under 60 °C. Adding 95% ethanol into the extract, rested and layered, then acquired the ethanol sediment of rape bee pollen. Isolating the ethanol sediment with DEAE-cellulose column, HW-55F chromatographic column, Sephacryl chromatographic column and Sepharose chromatographic column, acquired one main polysaccharide compound. Identifying the purity of this compound by Sephadex G-100 chromatographic column and ultraviolet spectral analysis, then using nuclear magnetic method to analyse the  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  and  $^{135}\text{DEPT-NMR}$  of this compound, obtained its structural formula:  $\text{HOCH}_2\text{-}[\text{CHOH}]_4\text{-COOH}$ . Irrigating the immune suppression mice with this component of rape bee pollen, results showed that this component of rape bee pollen could improve the thymus index ( $P<0.01$ ), spleen index ( $P<0.01$ ) and serum IgG level ( $P<0.01$ ) of immune suppression mice significantly.

**Keywords:** rape bee pollen, immune activity, isolation, polysaccharide

收稿日期: 2014-08-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD83B02)。

\* 通信作者: 徐德平(1965—), 男, 安徽宣城人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: xdp1219@sina.com

油菜(*Brassica campestris* L.)是十字花科芸薹属植物,为中国大面积种植的经济作物。油菜蜂花粉是蜜蜂采集油菜的花粉,再经蜜蜂加工而成的花粉团状物,蜜蜂在采集花粉的过程中加入了一些花蜜和分泌物。油菜蜂花粉中含有蛋白质和游离氨基酸、糖类、脂类、维生素、微量元素、酶、激素等多种营养物质<sup>[1]</sup>,营养价值较高。油菜蜂花粉具有增强免疫力、预防衰老、防治心脑血管疾病以及调节肠胃功能等作用<sup>[1-2]</sup>。

根据相关文献报道<sup>[3-9]</sup>,油菜蜂花粉中具有增强免疫力作用的成分存在于蜂花粉水提物中,多数文献认为其中能够提升免疫活性的物质基础为多糖。对于蜂花粉中多糖成分具有增强免疫活性作用的研究也一般以多糖粗品为主,对蜂花粉多糖成分结构的深入研究甚少。对于花粉水提物中其它活性成分是否具有提高免疫力的功效并未见文献报道。作者针对这一问题对油菜蜂花粉水提物中具有免疫活性成分进行了深入研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

油菜蜂花粉:购于青海门源蜂场;昆明小鼠 30 只,雌雄各半,4 周龄,购于上海斯莱克实验动物有限公司;注射用环磷酰胺(Cytoxan,CTX):山西普德药业股份有限公司产品,产品批号 04110606;羊抗小鼠抗血清:上海晶天生物科技有限公司产品;琼脂:国药集团化学试剂有限公司产品;叠氮钠:北京鑫鼎鹏飞科技有限公司产品;ODS 柱填料:Nacalai Tosoh Inc 产品;AB-8 型大孔吸附树脂:天津南开大学化学工厂产品;GF254 硅胶板:山东烟台芝罘化工厂产品;其它试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品。

### 1.2 仪器和设备

DFY-600 摇摆式高速中药粉碎机:温岭市林大机械有限公司产品;CQ-005 型萃取罐:常州市特威电气自动化系统有限公司产品;R-1002 型旋转蒸发仪:上海申顺生物科技有限公司产品;核磁共振仪 Avance 500 MHz:Bruker 公司产品;ZF-90 型暗箱式紫外透射仪:上海顾村电光仪器厂产品;CR3i 高速冷冻离心机:美国 Thermo 公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 油菜蜂花粉水提醇沉物的制备

将 10 kg 油菜蜂花粉粉碎,过 80 目筛,投入 100 L 萃取罐,按料液质量体积比比 1 g:8 mL 加入体积分数 95%的乙醇,60 ℃ 条件下搅拌提取 3 h,抽滤得上清液与滤渣。滤渣回入 100 L 萃取罐中,按料液 1 g:5 mL 比加入去离子水,60 ℃ 条件下提取 3 h,抽滤得上清液和滤渣,滤渣按相同条件再提取一次,抽滤,合并两次的上清液。将上清液浓缩到 10 L,按体积比 1:4 边搅拌边加入体积分数 95%的乙醇,室温下沉淀 12 h。将上清液与沉淀分离,沉淀用体积分数 75%乙醇洗涤两次,真空干燥后即为本提醇沉物。

### 2.2 油菜蜂花粉水提醇沉物的分离

**2.2.1 大孔树脂 AB-8 柱的分离** 水提乙醇沉淀物加适量去离子水超声处理,过 280 目筛,上大孔树脂 AB-8 柱(10 cm×150 cm),流量 20 mL/min,依次用去离子水,体积分数 10%、95%乙醇溶液进行梯度洗脱,用 100 mL 的三角瓶依次进行收集,用苯酚-硫酸法跟踪检测多糖,收集含多糖部分<sup>[10]</sup>。

**2.2.2 DEAE-纤维素凝胶柱的分离** 多糖组分经浓缩后,上 DEAE-纤维素凝胶柱(*D* 3 cm×100 cm),流量 5 mL/min。分别用去离子水、0.1、0.2、0.3 mol/L 的氯化钠溶液进行洗脱,流量 5 mL/min,自动分部收集器 15 mL/每管收集,经苯酚-硫酸法检测,合并收集各含糖的峰。

**2.2.3 HW-55F 色谱柱的分离** 将含多糖的主要峰组分浓缩,过滤后上 HW-55F(*D* 3 cm×100 cm)色谱柱,流量 5 mL/min。用去离子水洗脱,流量 5 mL/min,15 mL/管收集洗脱液,苯酚-硫酸法检测洗脱液。经 HW-55F 色谱柱分离的多糖组分,再经 Sephacryl S-400(3 cm×100 cm)色谱柱多次纯化,分离得到多糖化合物 A。

### 2.3 纯度鉴定

**2.3.1 Sephadex G-100 色谱柱鉴定** 将多糖化合物 A 上 Sephadex G-100 色谱柱鉴定其纯度,流速为 2 mL/min,去离子水洗脱。苯酚-硫酸法检验。

**2.3.2 紫外光谱分析** 配制 0.5 mg/mL 多糖 A 溶液,利用分光光度计进行扫描,波长范围为 200~400 nm,观察 260 nm 和 280 nm 处的吸收峰。

## 2.4 多糖化合物 A 免疫活性测定

采用清洁级昆明小鼠(雌雄各半)40只,分为正常组(10只)、环磷酰胺(CTX)模型组(10只)、环磷酰胺(CTX)-水提醇沉组(10只)、磷酰胺(CTX)-多糖 A 组(10只)。CTX-水提醇沉物组每天灌胃油菜花粉水提醇沉物 250 mg/Kg, 正常组与模型组每天灌胃等量的生理盐水。第 10 天时,给模型组和实验组小鼠腹腔注射环磷酰胺 150 mg/kg, 正常组小鼠腹腔注射等量的生理盐水。注射环磷酰胺后第 4 天最后一次灌胃,禁食 12 h 后小鼠称重,眼球采血,断颈处死,制备血清,采用单向琼脂扩散法比较小鼠血清中的 IgG 含量。取出小鼠的胸腺、脾脏称重,计算其胸腺脾脏指数并用 spss16.0 软件对数据进行显著性分析,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示<sup>[3,11-14]</sup>。

## 2.5 结构鉴定

所得的化合物以氘代吡啶为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标物,在核磁共振仪上进行 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 和 <sup>135</sup>DEPT-NMR 分析。

# 3 结果与讨论

## 3.1 水提醇沉物成分分离

**3.1.1 DEAE-纤维素凝胶柱的分离结果** 水提醇沉物过大孔树脂 AB-8 柱,水洗部分用 DEAE-纤维素凝胶柱分离,经去离子水和氯化钠溶液梯度洗脱,得如图 1 所示的洗脱曲线。从图中可以看到各梯度盐溶液的洗脱峰,由洗脱液的吸光度值可知,多糖组分主要集中在水洗部分。由于氯化钠洗脱部分的多糖含量较少,因此将水洗部分多糖作为进一步研究对象。

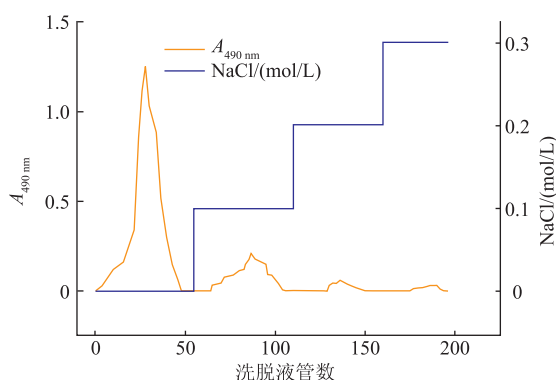


图 1 DEAE-纤维素凝胶柱洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of DEAE-cellulose gel column

## 3.1.2 HW-55F 柱分离结果

将 DEAE-纤维素凝胶柱分离出的水洗部分,过 HW-55F 柱,用苯酚-硫酸法检测得如图 2 所示的洗脱结果。由图可知,洗脱液主要有一个多糖峰,取此峰段合并。

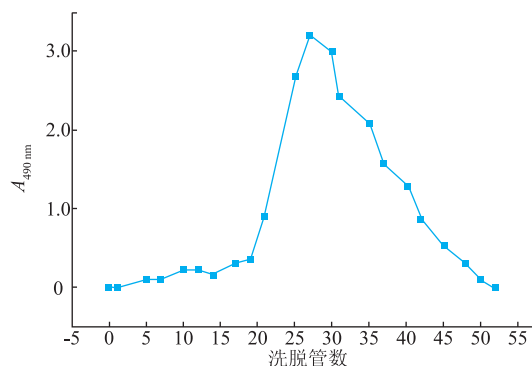


图 2 HW-55F 柱洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of HW-55F column

**3.1.3 Sephacryl S-400 的分离结果** 将 HW-55F 柱分离得到的多糖,经 Sephacryl S-400 柱反复纯化,最终得到油菜花粉多糖 A,经苯酚-硫酸法检测所得洗脱曲线如图 3 所示。从图中可知,多糖 A 具有单一对称峰,表明多糖 A 已分纯。

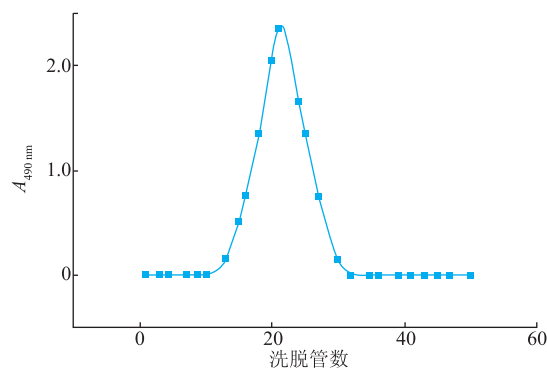


图 3 多糖经 Sephacryl S-400 柱洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of polysaccharide A by Sephacryl S-400 column

## 3.2 紫外光谱分析结果

将多糖 A 溶液在波长 200~400 nm 范围内进行紫外扫描,得如图 4 所示结果。图中显示,260 nm、280 nm 波长处均无吸收峰,说明多糖 A 不含蛋白质和核酸。

## 3.3 多糖 A 免疫活性测定

油菜花粉多糖 A 对免疫抑制小鼠胸腺、脾脏指数及血清 IgG 水平的影响结果见表 1,由表 1 可知多糖 A 组小鼠胸腺指数、脾脏指数及小鼠血清 IgG 水平均显著高于模型组 ( $P < 0.01$ ),且与正常组

小鼠的各项指数没有显著性差异( $P>0.05$ )。水提醇沉物组小鼠胸腺指数及血清 IgG 水平均显著高于模型组 ( $P<0.01$ ), 脾脏指数显著高于模型组小鼠 ( $P<0.05$ ), 各项指标与正常组小鼠没有显著性差异 ( $P>0.05$ )。表明多糖 A 及水提醇沉物均可将小鼠的胸腺、脾脏重量及血清 IgG 水平 ( $P<0.05$ ) 恢复到正常水平。且多糖组小鼠的血清 IgG 水平显著高于水提醇沉物组 ( $P<0.05$ ), 说明油菜蜂花粉多糖在纯化后免疫活性更显著。

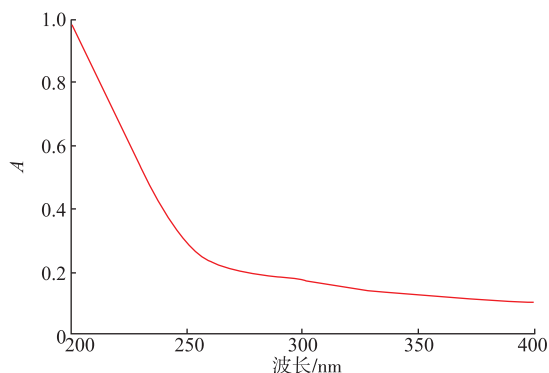


图 4 多糖 A 紫外吸收图谱

Fig. 4 UV absorption spectrum of polysaccharide A

表 1 小鼠胸腺、脾脏指数及血清 IgG 水平 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Level of serum IgG and thymus index and spleen index of mice ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	胸腺/ (mg/g)	脾脏/ (mg/g)	血清 IgG 水平(用沉淀环的直径表示)/mm
正常组	4.10±0.39 <sup>a</sup>	3.19±1.19 <sup>a</sup>	7.60±0.81 <sup>a</sup>
模型组	2.66±0.37	2.23±0.19	5.45±0.69
多糖组	4.02±0.67 <sup>a</sup>	3.47±0.70 <sup>a</sup>	8.00±0.88 <sup>*</sup>
CTX-水提醇沉物	3.61±0.76 <sup>a</sup>	3.13±0.67 <sup>b</sup>	7.25±0.86 <sup>a</sup>

注:a 代表差异为  $P<0.01$ , b 代表差异为  $P<0.05$ , 均与模型组比较。\* 代表差异为  $P<0.05$ , 与水提醇沉物组比较。

### 3.4 多糖 A 结构鉴定

多糖 A 为白色粉末, 无挥发性, 无甜味, 易溶于水, 难溶于丙酮、乙醇、乙醚。

多糖 A 的  $^1\text{H-NMR}$  见图 6, 由图 6 可见  $\delta$  3.5~4.3 有 6 个质子信号, 这些信号为糖上质子信号,  $\delta$  4.5~5.5 未见质子信号, 说明该物质无端基质子, 进一步得出多糖 A 为酮糖糖醇类。其  $^{13}\text{C-NMR}$  见图 7, 其数据见表 2, 由碳信号数据可见, 多糖 A 共 6 个碳信号, 180.84 处为一羧基信号, 76.47、74.90、73.72、73.38、65.16 为连氧碳信号, 表明多糖 A 为糖醛酸。其  $^{135}\text{DEPT}$  见图 8, 65.2 处为  $\text{CH}_2$  信号, 这些

信号表明多糖 A 不是普通的环状呋喃或吡喃糖, 由于未见端基碳信号, 应该为直链型。可以推断其片段结构为:  $\text{HOCH}_2\text{-}[\text{CHOH}]_4\text{-COOH}$ 。

多糖连接方式的分析: 从洗脱过程中可见, 在 DEAE 色谱柱中是用水洗脱的, 表明该多糖为中性多糖, 可推测  $\text{-COOH}$  参与成键因而不表现酸性多糖性质, 故得出如图 5 所示的重复结构。

表 2 多糖 A 在  $^{13}\text{C-NMR}$  中的碳信号

Table 2 Signals of carbon in the  $^{13}\text{C-NMR}$  of A

C	化学位移 $\delta/\times 10^{-6}$	C	化学位移 $\delta/\times 10^{-6}$
1	180.84	4	73.72
2	76.47	5	73.38
3	74.90	6	65.16

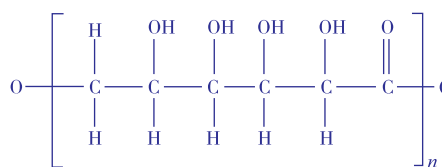


图 5 多糖 A 的结构式

Fig. 5 Structure of polysaccharide A

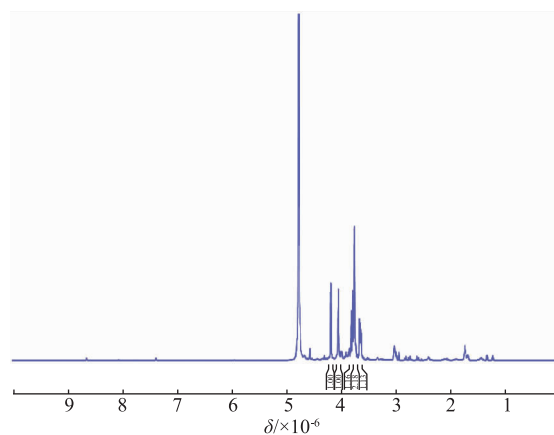


图 6 多糖 A 的  $^1\text{H-NMR}$  谱图

Fig. 6  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound polysaccharide A

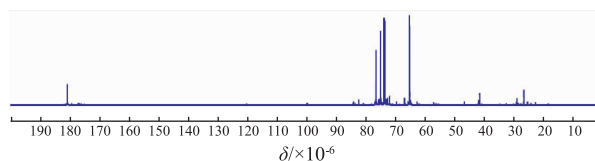
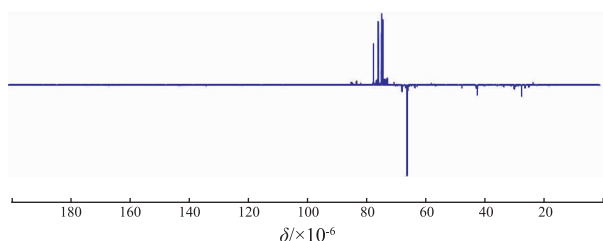


图 7 多糖 A 的  $^{13}\text{C-NMR}$  谱图

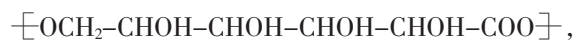
Fig. 7  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of polysaccharide A

图 8 多糖 A 的  $^{135}\text{DEPT-NMR}$  谱图Fig. 8  $^{135}\text{DEPT-NMR}$  spectrum of polysaccharide A

## 4 讨论

油菜蜂花粉水提醇沉物可以显著提高免疫活

性。从水提醇沉物中得到一个主要化合物多糖,经结构鉴定为一种糖醇酸类聚合物,其一级结构为



这在油菜蜂花粉成分的研究中为首次报道,但具体空间结构还有待深入研究。多糖类物质提高免疫活性的作用在文献中多有报道,常见的文献中对油菜蜂花粉中多糖的结构却少有报道。随着对多糖的利用日益增多,为深入了解油菜蜂花粉中多糖生物活性的构效关系,对油菜蜂花粉中多糖的种类及结构都应该进行进一步的深入研究。

## 参考文献:

- [ 1 ] 王开发. 花粉营养价值与食疗[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [ 2 ] 王宪增. 解读花粉[M]. 北京: 北京大学出版社, 2005.
- [ 3 ] ZHAO Xue, LIANG Manfei, YANG Pingping, et al. Taishan Pinus massoniana pollen polysaccharides promote immune responses of recombinant Bordetella avium ompA in BALB/c mice [J]. **International Immunopharmacology**, 2013, 17: 793-798.
- [ 4 ] LI Fei, YUAN Qipeng, Farzana Rashid. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from Crataegus pinnatifida Bge[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2009, 78: 80-88.
- [ 5 ] 汪磊, 朱波, 王国泽, 等. 油菜花粉保健功能研究进展[J]. 粮食与油脂, 2012, 11: 5-7.  
WANG Lei, ZHU Bo, WANG Guoze, et al. Research progress on health protecting functions of rape pollen [J]. **Grain and Oil**, 2012, 11: 5-7. (in Chinese)
- [ 6 ] 杨晓萍, 吴谋成. 油菜花粉多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 营养学报, 2006, 28(2): 160-166.  
YANG Xiaoping, WU Moucheng. Study on the antitumor effect of rape bee-pollen polysaccharide in tumor bearing Mice[J]. **Journal of Nutrition**, 2006, 28(2): 160-166. (in Chinese)
- [ 7 ] 杨晓萍, 罗祖友, 吴谋成. 油菜花粉多糖的制备及其对荷瘤小鼠的影响[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 202-204.  
YANG Xiaoping, LUO Zuyou, WU Moucheng. Study on preparation of rape pollen polysaccharide and its effect on tumor-bearing mice[J]. **Food and Science**, 2005, 26(12): 202-204. (in Chinese)
- [ 8 ] 刘嘉, 李锐, 李鑫熙, 等. 蜂花粉多糖的研究进展[J]. 广东农业科学, 2012(11): 125-127.  
LIU Jia, LI Rui, LI Luanxi, et al. Study progress on functional polysaccharide of bee pollen [J]. **Guangdong Agricultural Science**, 2012(11): 125-127. (in Chinese)
- [ 9 ] 冯慧, 焦士蓉, 唐远谋, 等. 油菜花粉研究进展[J]. 食品工业, 2011(9): 108-110.  
FENG Hui, JIAO Shirong, TANG Yuanmou, et al. Advance studying of rape pollen [J]. **Food Industry**, 2011 (9): 108-110. (in Chinese)
- [ 10 ] 李靖宇, 杨颖, 贾琳斐, 等. 板栗多糖的分离纯化、结构分析及抗疲劳作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 767-771.  
LI Qingyu, YANG Ying, JIA Linfei, et al. Purification, structural analysis and antifatigue assay of polysaccharide from castanea mollissima blume[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(7): 767-771. (in Chinese)
- [ 11 ] 钱之玉. 药理学实验与指导[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003, 8(1): 139.
- [ 12 ] 郑建仙. 功能性食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 9: 105.
- [ 13 ] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011, 12: 738-739.
- [ 14 ] YANG Xiaoping, GUO Dayong, ZHANG Jinming, et al. Characterization and antitumor activity of pollen polysaccharide [J]. **International Immunopharmacology**, 2007, 7: 427-434.