文章编号:1673-1689(2006)04-0063-04

方格星虫多糖分离纯化及性质鉴定

张桂和[1,2], 赵谋明[1*], 王 炜[1]

(1. 华南理工大学 轻工与食品学院,广东 广州 510640; 2. 海南大学 海洋学院,海南 海口 570228)

摘 要: 以方格星虫(*Sipunculus nudus*)体壁和血液为试验材料,经胰蛋白酶水解,Sevage 法去除蛋白质,乙醇沉淀得到粗多糖,透析并冷冻干燥后分别得到方格星虫体壁多糖(SWP)和血液多糖(SBP)。经凝胶渗透色谱分析,SWP 和 SBP 均为单一组分,相对分子质量分别为 284 528 和 198 212。红外光谱分析表明,两种多糖结构相似,不含硫酸基团,均含有葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。SBP 含有乙酰氨基,而 SWP 不含乙酰氨基,它们是以 α-糖苷键或 β-糖苷键连接的呋喃多糖。

关键词: 方格星虫;多糖;分离;纯化;鉴定

中图分类号:TS 201.2 **文献标识码**: A

Isolation, Purification and Property Identification of Polysaccharide Contained in *Sipunculus nudus*

ZHANG Gui-he[1,2], ZHAO Mou-ming[1*], WANG Wei[1]

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 2. College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Two kind of polysaccharides , SWP and SBP, contained in body wall and blood of *Sipunculus nudus* were obtained. They were isolated and purified by chromatography of GPC. The results of chromatography of GPC, UV spectra and IR spectra showed that SWP and SBP were single components with their molecular weight of 284 528 and 198 212, respectively. Glu, Gal, Xyl and Ara were identified as the basic sugars of these two polysaccharides. Both of them do not contain sulfate group SBP, contains acetyl-amino group but SWP does not. All of them are furanopolysaccharides linked with α-glycosidic or β-glycosidic bouds.

Key words: *Sipunculus nudus*; polysaccharide; isolation; purification; property identification

多糖广泛地存在于动物细胞膜、植物和微生物细胞壁中,是构成生命的四大基本物质之一。很早以前,人们就采用一些富含多糖的动植物来治疗各种疾病,近 20 多年来,由于分子生物学的发展,人们逐渐认识到糖及其复合物分子具有极其重要的生物功能[1]。它与免疫功能的调节、细胞与细胞识别、细胞间物质运输、以及癌症的诊断与治疗都有密切的关系,因此,多糖的研究越来越引起人们的关注。我国地大物博,资源十分丰富,在多糖资源开发研究方面已作了不少工作。方格星虫(*Sipun-*

收稿日期:2005-09-08; 修回日期:2005-11-12.

基金项目:广州市科技攻关项目(200421-E0061).

作者简介:张桂和(1964-),男,广西玉林人,副教授,理学博士; * 通讯作者.

万方数据

culus nudus)为星虫动物门星虫科方格星虫属动物[2],俗称沙虫,是我国著名的海珍品之一。除了食用之外,方格星虫还可以入药,具有清肺、滋阴降火和健脾功能,有些地区用其代替冬虫夏草使用,主治骨潮热、阴虚盗汗、胸闷、肺痨咳嗽、痰多、夜尿症及牙肿痛等症[3-7]。目前国内对方格星虫主要研究其繁殖生物学以及人工养殖技术[8-9];国外研究其代谢生理、生态特征等[10-12],对其多糖的研究国内外均未见报道。作者报导了一种提取方格星虫多糖的方法,并对方格星虫多糖进行了初步分析。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料

方格星虫(*Sipunculus nudus*)鲜活品,采自海南省海口市。

1.2 试剂

乙醇、氯仿、正丁醇、硫酸、硫酸铜、苯酚、溴化钾等均为国产分析纯。

1.3 仪器

20PR-52D 高速冷冻离心机,UV-754 型紫外可见分光光度计,Unicam UV540 型紫外扫描仪,Waters 高效色谱系统,凝胶色谱柱为 TSK-GEL G5000PWXL 和 TSK-GEL G3000PWXL,PE FT-2000 红外光谱仪。

2 实验方法

2.1 多糖的提取与纯化

用锋利的剪刀将鲜活的方格星虫纵向剖开,分别收集血液和体壁,体壁用蒸馏水洗涤,经多功能切碎机打碎成糊状。体壁肉酱和血液中分别加入等体积的 0.2 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液,按质量分数 1.5%的比例加入胰蛋白酶,在 45 ℃恒温水浴下搅拌酶解 5 h。用 Sevage 法去蛋白质 2～3 次,浓缩后,加乙醇至终浓度为 70%,4 ℃沉淀多糖。在 4 ℃、10 000 *g* 的条件下离心 10 min,沉淀即为方格星虫粗多糖。以无水乙醇、丙酮洗涤粗多糖多次,置通风处晾干之后,用蒸馏水溶解粗多糖,用截留相对分子质量为10 000以上的透析膜流水透析 48 h。乙醇再沉淀,离心,相继以无水乙醇、丙酮洗涤多次,真空冷冻干燥分别得到方格星虫体壁多糖(SWP)和方格星虫血液多糖(SBP)。

2.2 多糖纯度鉴定

2.2.1 双缩脲法检测 分别称取方格星虫多糖 SWP 和 SBP,配制成质量浓度为 100 μg/mL 的水溶液,加入 0.2 g/dL 的碱性硫酸铜试剂进行显色反应,并在 560 nm 波长下测定吸光值[13]。

2.2.2 紫外光谱分析 配制质量浓度为 100 μg/mL 的多糖溶液,用 Unicam UV540 型紫外扫描仪在 200～400 nm 波长范围内进行扫描分析,检测蛋白质吸收峰。

2.3 多糖的相对分子质量测定

串联使用 TSK-GEL G5000PWXL 和 TSK-GEL G3000PWXL 两种凝胶柱,进样质量浓度为 1 μg/mL,用 0.02 mol/L KH_2PO_4 作洗脱液,在 40 ℃体积流量 0.6 mL/min 的条件下进行凝胶渗透色谱分析。

2.4 多糖的红外光谱分析

分别称取 5 mg 纯化的方格星虫多糖 SWP 和 SBP,用 KBr 研磨并压片,用 PE FT-2000 型红外光谱仪进行分析。

3 结果与讨论

3.1 方格星虫多糖的分离和纯化

用乙醇沉淀法从方格星虫体壁和血液中分别得到粗多糖,经截留相对分子质量为10 000以上的透析膜流水透析 48 h 后,分离得到纯化的多糖 SWP 和 SBP,收率分别为 0.22%和 0.25%。

SWP 和 SBP 两种纯化多糖在常温下均易溶于水,经凝胶渗透色谱层析,得单一对称峰,(见图 1,2),可见这两种纯化多糖均为均一组分。

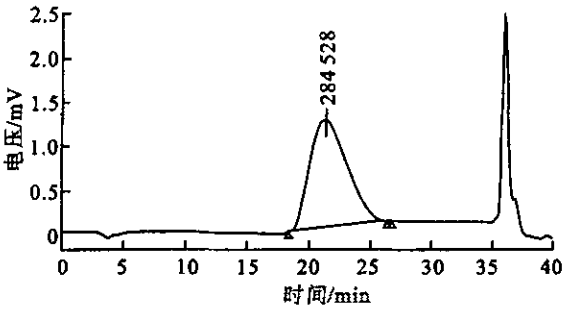

图 1 SWP 凝胶渗透色谱图

Fig. 1 GPC Chromatogram of SWP

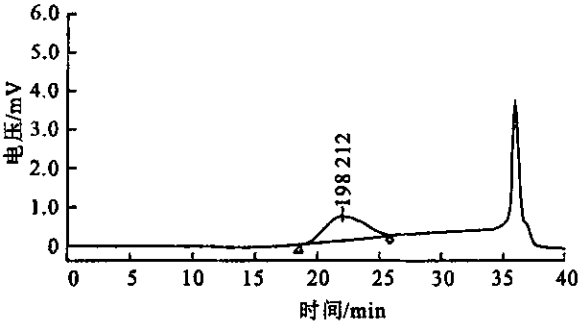

图 2 SBP 凝胶渗透色谱图

Fig. 2 GPC Chromatogram of SBP

万方数据

3.2　两种方格星虫多糖的纯度和性质鉴定

用方格星虫多糖 SWP 和 SBP 溶液进行双缩脲反应,没有检测到蛋白质的特异紫红色反应,在 560 nm 波长下,检测不到吸光值,说明纯化的方格星虫多糖中不存在蛋白质。用硫酸-苯酚试剂进行反应时显示有多糖的存在。与 Feling 试剂不呈阳性反应,即不含游离的葡萄糖。

用 Unicam UV540 型紫外扫描仪在 200～400 nm 波长范围内对两种多糖溶液进行扫描分析(图 3,4)。结果显示,在 280 nm 和 260 nm 处检测不到吸收峰的存在,说明被检测的样品中不含蛋白质,也没有核酸的存在,提取得到的方格星虫多糖 SWP 和 SBP 为纯多糖。

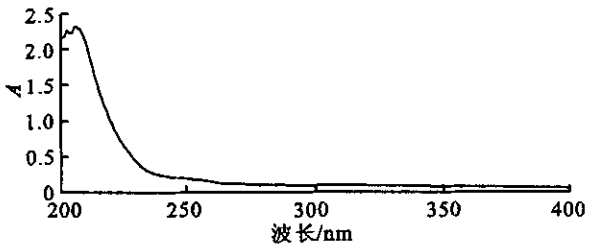

图 3　SWP 紫外光谱图

Fig. 3　UV spectrogram of SWP

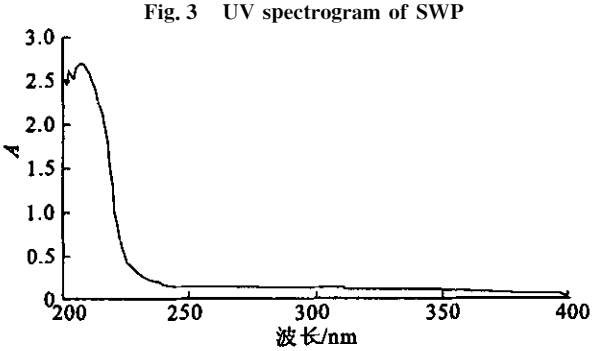

图 4　SBP 紫外光谱图

Fig. 4　UV spectrogram of SBP

纯化的方格星虫多糖 SWP 和 SBP 均呈白色粉末状,水溶液呈胶体状,显弱酸性,pH 5.5～6.5 之间,属于酸性粘多糖类,其炭化温度为 220 ℃。

3.3　多糖的相对分子质量测定

将两种凝胶柱 TSK-GEL G5000PWXL 和 TSK-GEL G3000PWXL 串联使用,在保护柱的保护下进行凝胶渗透色谱分析,用 Waters2414 示差检测仪检测,Sigma 多糖相对分子质量标准物作标准曲线(见图 5),根据出峰时间和峰高峰宽积分,分析多糖的相对分子质量分别是284 528(SWP)和 198 212(SBP)(图 1,2)。

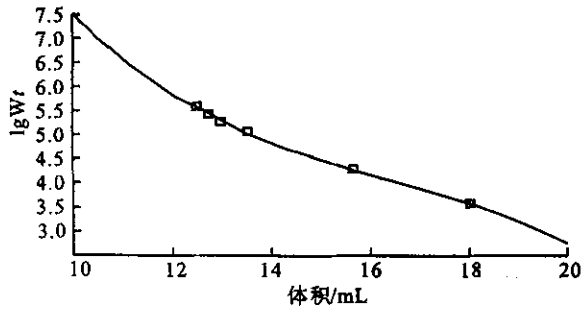

图 5　凝胶渗透色谱标准曲线

Fig. 5　Standard curve of GPC

3.4　多糖的红外光谱分析

方格星虫多糖 SWP 和 SBP 的红外光谱图(图 6,7)很相似,说明两种多糖虽然相对分子质量不同,但它们的单糖组成基本一致。在3 100～3 300 cm^{-1} 处出现的一种宽峰是 O—H 的伸缩振动;3 000～2 800 cm^{-1} 之间的宽峰以及1 660～1 635 cm^{-1} 的吸收峰是糖的水化合物的特征吸收峰;SWP 在1 648 cm^{-1} 附近没有吸收峰,表明 SWP 没有乙酰氨基的存在,而 SBP 在1 648 cm^{-1} 附近有吸收峰,表明 SBP 多糖中存在乙酰氨基。两种多糖在1 316～1 378 cm^{-1} 之间出现的不太尖的吸收峰是 C—H 的变角振动;1 240 cm^{-1} 没有吸收峰,说明多糖中没有硫酸基团的存在;1 200～1 100 cm^{-1} 是多糖分子中 C—O—C 环醚键的吸收峰;880 cm^{-1} 和 800 cm^{-1} 处的吸收峰表明方格星虫多糖为呋喃多糖;750 cm^{-1} 附近有一个弱的吸收峰,表明多糖中存在木糖;880 cm^{-1} 和 850 cm^{-1} 的吸收峰可以确定两种多糖中均存在葡萄糖、半乳糖及阿拉伯糖,并且多糖分子的单糖之间是以 α-糖苷键和 β-糖苷键连接的。

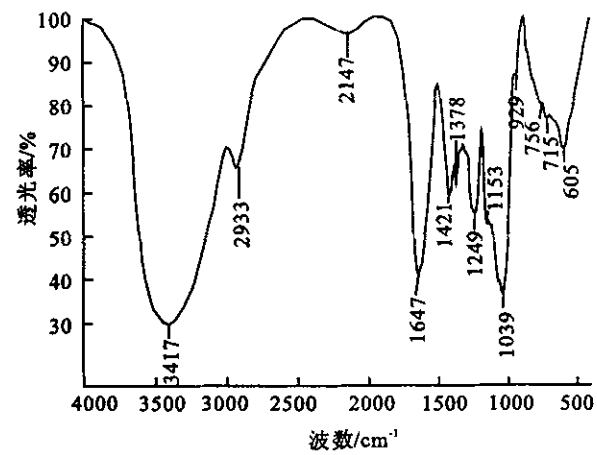

图 6　SWP 红外光谱图

Fig. 6　IR spectrogram of SWP

万方数据

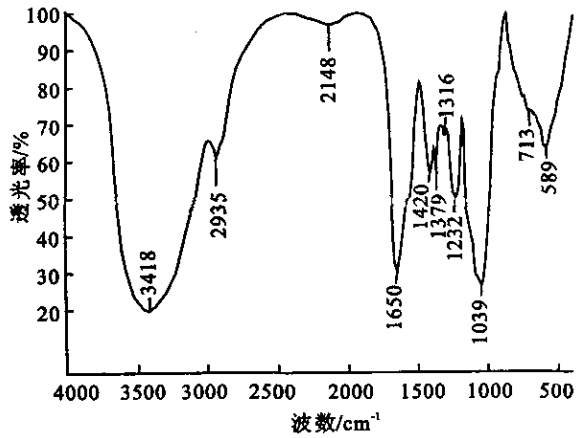

图7 SBP红外光谱图

Fig. 7 IR spectrogram of SBP

4 结 论

1)作者分离并纯化得到了方格星虫体壁多糖SWP和血液多糖SBP,相对分子质量分别是284 528(SWP)和198 212(SBP),它们由呋喃型的木糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖等单糖组成,SBP中含有乙酰氨基而SWP中不含乙酰氨基,都是典型的动物酸性粘多糖。

2) SBP和SWP中的单糖之间是以α-糖苷键和β-糖苷键连接的。

3) 与目前已分离到的海参多糖和贝类多糖组成和性质相似。

参考文献:

[1] 方一苇. 具有药理活性多糖的研究现况[J]. 分析化学,1994,22(9):955-960.
[2] 李凤鲁,孔庆兰,史贵田,等. 中国沿海方格星虫属(星虫动物门)的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1990,20(1):93-99.
[3] 中国人民解放军海军后勤部,卫生部. 中国药用海洋生物[M]. 上海:上海人民出版社,1977. 37.
[4] 章超桦,铃木健,吉江由美子. 沙虫干呈味及功能成分研究[J]. 湛江海洋大学学报,1999,20(2):24-27.
[5] 谢宗墉. 海洋水产品营养与保健[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1991. 57-58.
[6] 郑建仙. 功能性食品(第二卷)[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999. 191-192.
[7] 沈先荣,蒋定文,贾福星,等. 方格星虫延缓衰老作用研究[J]. 中国海洋药物,2004,(1):30-32.
[8] 兰国宝,阎冰. 方格星虫繁殖生物学研究[J]. 水产学报,2002,26(6):503-509.
[9] 兰国宝,阎冰,廖思明. 方格星虫胚胎与幼体发育的研究[J]. 热带海洋学报,2003,22(6):70-75.
[10] Cutler E B,Dean H K,Saiz-Salinas J I. *Sipuncula* from antarctic waters[J]. **Proceeding of the Biological Society of Washington**,2001,114(4):861-880.
[11] Huang D Y,Chen J Y,Vannier J,et al. Cambrian sipunculan worms from southwest China[J]. **Proceeding of the Royal Sociaty of Lodon Series B-Biological Sciences**, 2004,271(1549):1671-1676.
[12] Lunetta D G,Farina E,Manione R. *Sipuculus nudus*:particulate components of the coelomic fluid and its relationship with brown bodies[J]. **IATL J ZOOL**, 2004,71(3):191-199.
[13] 大连轻工业学院编. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994. 224-226.

(责任编辑:李春丽)

《江南大学学报(自然科学版)》
征稿、征订启事

《江南大学学报(自然科学版)》(双月刊)是由教育部主管、江南大学(国家"211工程"重点建设高校)主办的自然科学类学术期刊。本刊主要刊载通信与控制工程、信息工程、机械工程、产品系统设计理论、纺织工程、应用化学、材料工程、土木工程、数理科学等学科的学术论文、研究报告,反映学科前沿研究动态的高质量综述。

本刊优先刊登国家自然科学基金和省部级及其以上科研项目析出论文,同时发表与企业及生产实际密切相关的应用性研究成果。热忱欢迎广大高校教学、科研人员及相关领域的学者,在读硕士、博士研究生赐稿。

本刊为A4开本,128页,每册订价8.00元;全年共6期,48.00元;本刊邮发代号:28-189,全国各地邮局均可订阅;亦可向本刊编辑部直接订购。本刊可破季订阅。热忱欢迎广大读者订阅本刊。

地址:江苏省无锡市蠡湖大道1800号 邮编:214122
电子邮箱:xbzrkx@sytu.edu.cn 电话:0510-85913519

万方数据