

桑叶酸性蛋白多糖(APFM)的分离纯化及其结构与部分理化性质的研究

金春雁¹, 吴婷¹, 沈奇¹, 张卫明^{1,2}, 陆长梅¹, 吴国荣^{1,*}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097; 2. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

摘 要: 本实验主要研究湖桑(*Morus alba L. Husang*)的粗老桑叶中酸性蛋白多糖的提取、分离、纯化及结构鉴定。水煎法提取桑叶粗多糖, D-101 大孔树脂柱层析, 脱蛋白, 脱色, 再上 DEAE 纤维素(DE-32)柱及 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱对产物进行分离纯化, 得 HPLC 单一峰的桑叶多糖纯品。通过单糖组成分析、酸性基团含量、IR、UV、HPLC 及氨基酸组分测定等方法解析其结构及理化性质。实验结果显示: 该多糖分子量达 50 万, 多糖主链主要为 α -型吡喃糖连接, 由 D-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-葡萄糖、D-半乳糖组成, 摩尔比为 8.91:2.71:1.00:3.75:6.04; 该多糖糖醛酸含量为 5.33%, 硫酸根含量为 8.03%; 其蛋白质部分占多糖总量的 0.83%; 含 17 种氨基酸, 其中 7 种为人体必需氨基酸。表明该多糖为酸性蛋白多糖(acid proteoglycan from *Folium mori*, APFM)。
关键词: 桑叶多糖; 分离纯化; 结构鉴定

Study on Separation, Purification, and Physico-chemical Characteristics of Acidic Proteoglycan Extracted from *Folium mori*

JIN Chun-yan¹, WU Ting¹, SHEN Qi¹, ZHANG Wei-ming^{1,2}, LU Chang-mei¹, WU Guo-rong^{1,*}

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China)

Abstract: This experiment studied the extraction, separation, purification and physico-chemical characteristics of acid proteoglycan extracted from *Folium mori*(APFM). The polysaccharides were extracted from *F. mori* by water extraction, and then isolated and purified by D101resin, DEAE-cellulose column and SephadexG-100 gel column chromatography successively. Monosaccharides composition analyses, acidic groups contents, and amino acids compositions were assayed with IR, UV, HPLC to for deduce the structural and physical and chemical properties. Results showed that APFM is a pure acidic proteoglycan with

收稿日期 2006-07-19

*通讯作者

基金项目: “十五” 国家科技攻关计划基金项目(2001BA502B03)

作者简介: 金春雁(1980-), 女, 硕士, 主要从事植物化学及天然活性物质研究。。

-
- | | |
|--|---|
| <p>[2] 陈玲, 胡飞, 李晓玺, 等. 机械力化学效应对马铃薯淀粉消化性能和抗酶解性能的影响[J]. 食品科学, 2001, 22(8): 15-18.</p> <p>[3] 胡飞, 陈玲. 微细化马铃薯淀粉颗粒的表观形态及分子链变化的研究[J]. 化学通报, 2003, 6(3): 1-5.</p> <p>[4] 吴俊, 苏喜生, 谢笔钧. 淀粉粒度效应对热塑性微细化淀粉熔体流变学行为影响[J]. 包装工程, 2004, 25(3): 11-13.</p> <p>[5] LSABEL G, ALEJANDRA G A, FULGENCIO S C. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index[J]. Nutrition Research, 1997, 17(3): 427-437.</p> <p>[6] 惠斯特勒 R L, 贝密勒 J N, 帕斯卡尔 E F. 淀粉的化学与工艺学[M]. 北京: 中国食品出版社, 1988.</p> <p>[7] 赵思明, 熊善柏, 姚霓, 等. 稻米淀粉的糊化动力学研究[J]. 粮食与饲料工业, 2002(3): 9-11.</p> | <p>[8] 吴俊. 淀粉粒度效应与微细化淀粉基降解材料研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.</p> <p>[9] HU Pei-song, ZHAO Han-jun, DUAN Zhi-yin, et al. Starch digestibility and the estimate glycemic score of different types of rice differing in amylose contents[J]. Journal of Cereal Science, 2004, 40: 231-237.</p> <p>[10] FERI M, SIDDHURAJU P, BECHER K. Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines[J]. Food Chemistry, 2003, 83: 395-402.</p> <p>[11] HOOVER R, ZHOU Y. In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by α-amylase and resistant starch formation in legumes—a review[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54: 401-417.</p> |
|--|---|

its molecular weight over 500 Da. It was constituted by D-rhamnose, L-arabinose, D-fructose, D-glucose and D-galactose with molar ratio: 8.91: 2.71: 1.00: 3.75: 6.04 respectively; and the contents of uronic acid, sulfate radical and protein 5.33%, 0.83% and 8.03% respectively. Its monomer of backbone is α -pyranose. In addition, APFM contains seventeen kinds of amino acids and seven kinds of which are human essential.

Key words polysaccharides of *F. mori*; separation and purification; characterization

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)06-0043-05

桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的叶。本草纲目记载: 桑叶可除寒热, 出汗; 煎浓汁服, 能除脚气水肿, 利大小便。自古以来就作为治疗消渴症的中药应用于临床^[1]。植物及真菌多糖的研究始于20世纪40年代, 经过几十年的不断积累人们对多糖这类重要生命物质产生新的认识^[2]。研究表明多糖具有提高免疫力^[3]、降血糖^[4]、抗肿瘤^[5]、抗病毒^[6]、抗肥胖^[7]、延缓衰老^[8]、抗辐射、抗感染及增强骨骼造血功能等作用^[9]。目前对桑叶多糖已有初步的研究, 认为桑叶中的多糖组分(polysaccharide from *Folium mori*, PFM)和1-脱氧野尻霉素(deoxynojirimycin, DNJ)是主要降糖成分^[10-12]。笔者从桑叶中提取分离桑叶粗多糖, 进一步分离出其中的酸性蛋白多糖(APFM), 并对其结构和部分理化性质进行了初步的研究, 这部分工作国内外未见报道, 旨在为进一步开发应用桑叶多糖, 更深入地研究APFM生理学活性及构效关系提供有价值的资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

湖桑(*Morus alba* L. *Husang*)的粗老桑叶采集于太仓老闸桑园, 洗净, 晒干, 粉碎, 过筛, 保存于干燥处备用。

DEAE纤维素(DE-32)、Sephadex G-100 Pharmacia公司; 考马斯亮蓝G-250、标准牛血清蛋白(BSA)、D-鼠李糖(D-rhamnose)、L-阿拉伯糖(L-arabinose)、D-木糖(D-xylose)、D-果糖(D-fructose)、D-甘露糖(D-mannose)、D-葡萄糖(D-glucose)、D-半乳糖(D-galactose)标样 Sigma公司; 无水乙醇、氢氧化钠、蒽酮、浓硫酸、硫酸钾、氢氧化钡等均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取、分离、纯化

准确称取桑叶粉末100g, 95%乙醇脱脂。将滤渣晾干, 加1000ml蒸馏水煎煮2h, 纱布过滤, 滤渣重复煎煮一次, 合并滤液, 真空浓缩, 醇沉, 沉淀用丙酮、乙醚洗涤, 干燥得桑叶粗多糖。将粗多糖溶于适量蒸馏水, 过D101大孔树脂柱, 蒸馏水淋洗, 至洗脱液用硫酸-蒽酮法无糖测出, 收集洗脱液, 真空浓缩, 经Sevag法去除游离蛋白质, 活性炭脱色, 透

析, 醇沉所得半纯品多糖(PFM)溶解上DE-32柱(60.0cm × 3.0cm), 先用pH8.6 50mmol/L的磷酸缓冲液充分淋洗, 再用pH8.6 50mmol-2mol/L的NaCl溶液作梯度洗脱, 分部收集, 硫酸-蒽酮法跟踪检测, 收集糖峰, 干燥后所得的是能为DE-32所吸附的带有阴离子基团的组分。再上具分子筛效应的Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱(100.0cm × 2.5cm), 蒸馏水洗脱, 分部收集(每管4ml/15min), 硫酸-蒽酮法跟踪检测, 收集糖峰, 浓缩, 冷冻干燥得桑叶酸性多糖纯品(APFM)。

1.2.2 高效液相色谱法(HPLC)鉴定纯度与测定分子量

Agilent 1100 高效液相色谱仪; TSK-GEL (GMPWXL) 不锈钢色谱柱(300mm × 7.8mm); 流动相为双蒸水; 流速0.6ml/min, 柱温45℃, 相对湿度70%, RID示差检测器。精密称取样品和已知分子量的T系列多糖标准品, 分别用流动相配制成10mg/ml的溶液, 进样量10μl。

1.2.3 多糖的硫酸基测定

明胶比浊法^[13]。

1.2.4 多糖的糖醛酸测定

硫酸-咔唑法^[14]。

1.2.5 多糖的紫外光谱

将样品用蒸馏水稀释成0.2mg/ml的溶液, 在190~500nm波长范围内进行扫描。

1.2.6 多糖的红外光谱

称取样品2mg, 在红外灯下用KBr压片, 用170SX红外光谱仪在4000~500cm⁻¹波数范围内进行红外扫描。

1.2.7 多糖的单糖组成分析

1.2.7.1 多糖的水解

准确称取样品15mg于安培瓶中, 加入2ml 2mol/L硫酸, 吹入N₂去除氧, 用酒精喷灯封管, 在105℃恒温烘箱中水解24h, 取出, 在50℃水浴中加碳酸钡缓慢中和, 离心(5000r/min, 15min, 20℃), 取上清, 用旋转蒸发仪浓缩至1ml, 4℃冰箱保存备用。

1.2.7.2 单糖组成分析

Agilent1100 高效液相色谱仪zorbax NH₂柱(250mm × 4.6mm i.d, 5μm); 流动相为乙腈:双蒸水=85:15; 流速1.0ml/min, 柱温35℃, 相对湿度70%, RID示差检

测器。将各种单糖标准品用双蒸水配制成10mg/ml的溶液,与样品水解液一起用高效液相色谱仪测定,进样量为10 μ l。

1.2.8 多糖的氨基酸组成的测定

精确称取样品5mg,加入6mol/L HCl,封管,在(110 \pm 1) $^{\circ}$ C水解18h。切开水解管用重蒸水定容于50ml容量瓶中,过滤后取滤液1ml置于5ml烧杯中,旋转蒸发干燥,加入1ml pH2.2的HCl溶液溶解后,吸300 μ l左右于样品管中,测定氨基酸的组成和含量。

2 结果与分析

2.1 桑叶酸性多糖的纯化

脱蛋白、脱色后的桑叶粗多糖,经DE-32柱层析,先用pH8.6 50mmol/L的磷酸缓冲液充分淋洗,把不被DE-32吸附的中性多糖洗脱下来。再用pH8.6 50mmol/L的NaCl溶液梯度作洗脱,在800~1000mmol/L NaCl浓度时出现洗脱峰。如图1所示,表明该桑叶多糖带有能被DE-32吸附的阴性基团。收集洗脱峰,透析,用乙醇沉淀。再将其上Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析,蒸馏水洗脱,硫酸-蒽酮法跟踪检测,如图2所示,得到两个洗脱峰,峰值分别在31管和71管,表明得到分子量大小不同的两个组分,并显示前者的分子量较后者大得多。分别收集两个糖峰,冷冻干燥,

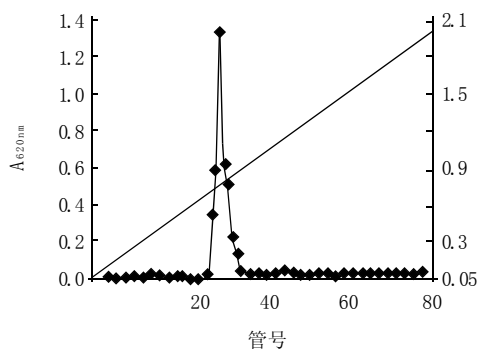


图1 PFM的DEAE-32柱层析图

Fig.1 Separation of PFM on DEAE-32 column

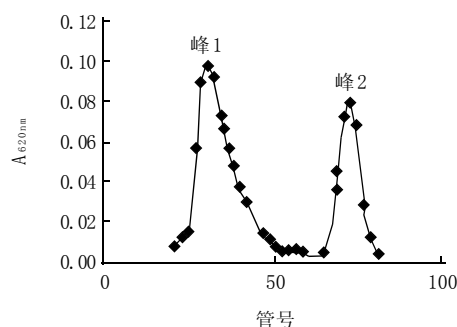


图2 PFM的Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析图

Fig.2 Sephadex G-100 gel filtration analysis of PFM

得精品桑叶多糖。对这两个峰进行扫描,两峰面积之比为1.87:1.00,表明被DE-32所吸附的多糖中以分子量大组分为主。红外图谱显示前者的多糖特征峰比后者更明显,因而,我们在本文中选定前者作为研究对象。经冷冻干燥得白色纤维状物质,其溶于水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。

2.2 高效液相色谱法鉴定多糖纯度与测定分子量

Sephadex G-100柱层析后第一个峰的收集物,经高效液相色谱鉴定纯度及测定分子量,其示差图谱(图3)为单一的对称峰,说明样品纯度已成单一峰状态,分子量分布均一。根据样品的保留时间在以标准多糖的分子量保留时间所作出得标准曲线上测得样品的分子量达50万。

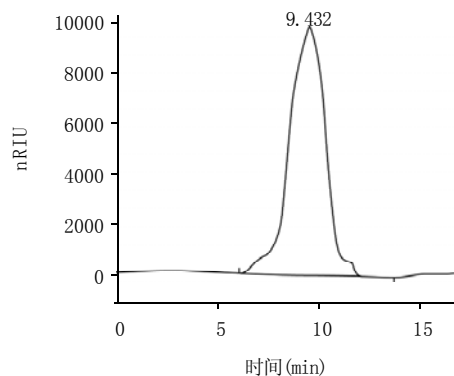


图3 PFM高相液相色谱图

Fig.3 Chromatogram of APFM by HPLC

2.3 多糖的硫酸基测定

测定时随Ba(OH)₂溶液的加入,有白色沉淀产生,说明该样品中含有硫酸基。以硫酸钾为标准品,做标准曲线,得回归方程 $y=0.0026x+0.0873$, $R^2=0.9969$ (n=5)。测得APFM中的硫酸根含量为8.03%。

2.4 多糖的糖醛酸测定

硫酸咔唑法反应呈阳性,表明该样品中含有己糖醛酸。以半乳糖醛酸为标准品,得回归方程 $y=0.0079x+0.0362$, $R^2=0.9944$ (n=5)。测得APFM中糖醛酸含量为5.33%。

2.5 多糖的紫外光谱

如图4所示,样品在280nm处有吸收峰显示,260nm无明显的吸收峰,表明该样品含蛋白质,不含核酸。蛋白质分子中含有共轭双键的酪氨酸和色氨酸。提示,该多糖应为酸性蛋白多糖(APFM)。

2.6 多糖的红外光谱

红外图谱(图5)表明样品在波数3422.02cm⁻¹(O-H的伸缩振动), 2926.63cm⁻¹(C-H的伸缩振动), 1424.67cm⁻¹和1069.53cm⁻¹(C-O的伸缩振动), 1157.89cm⁻¹和1045.23cm⁻¹(O-H的变角振动)处均有多糖类物质的特征吸收峰,波

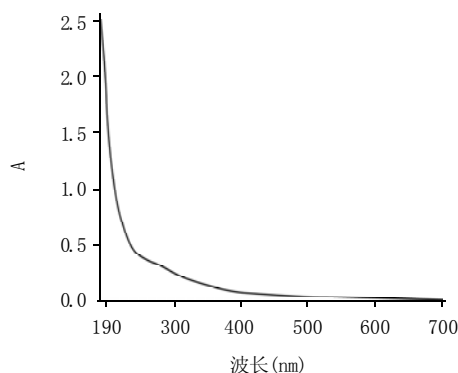


图4 APFM的紫外吸收光谱
Fig.4 Ultraviolet spectrum of APFM

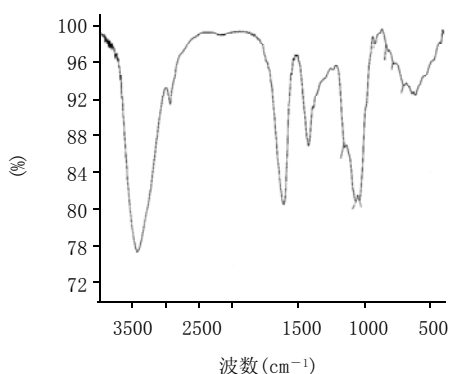


图5 APFM的红外光谱
Fig.5 Infrared spectrum of APFM

数 917.21cm^{-1} 和 784.07cm^{-1} 处的吸收峰是D-葡萄糖吡喃糖的C-O-C骨架非对称和对称的伸缩振动、 835.28cm^{-1} 处的吸收峰更表明APFM以 α -型吡喃糖苷为主^[15]。 1611.89cm^{-1} (蛋白肽链羰基的伸缩振动), 则印证了多糖中含有多肽链的成分。

2.7 单糖组成分析

APFM完全水解产物经HPLC分析(图6), 可见有5个单糖峰, 即有5种组分, 比较各组分与标准单糖的保留时间, 推断APFM由D-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-葡萄糖、D-半乳糖组成, 其摩尔比为8.91:

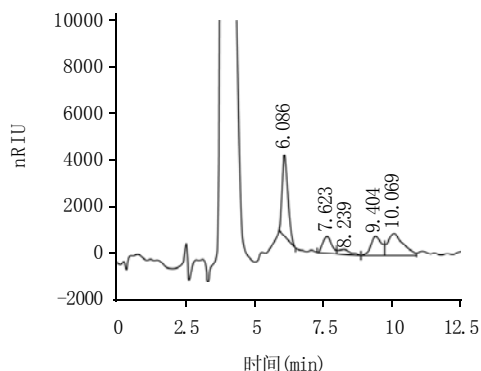


图6 APFM的高相液相色谱图
Fig.6 HPLC of APFM sample

2.71:1.00:3.75:6.04。表明APFM为杂多糖。

2.8 多糖的氨基酸组成分析

蛋白质测定结果表明APFM中蛋白质含量为0.83%。其氨基酸成分分析(图7)结果显示: 样品中含有17种氨基酸, 其含量如表1所示。其中苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸为人体必需氨基酸, 半胱氨酸和蛋氨酸为含硫氨基酸, 有淬灭自由基的作用。

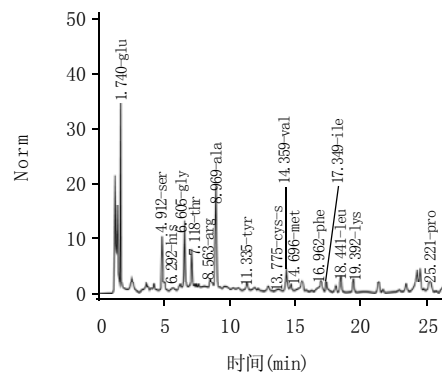


图7 APFM的氨基酸组成分析
Fig.7 Amino acids composition of APFM

表1 多糖的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of PFM

氨基酸种类	含量 (mg/g)	氨基酸种类	含量 (mg/g)	氨基酸种类	含量 (mg/g)
天门冬氨酸	0.95	精氨酸	0.26	苯丙氨酸	0.42
谷氨酸	1.55	丙氨酸	0.98	异亮氨酸	0.20
丝氨酸	0.56	酪氨酸	0.23	亮氨酸	0.24
组氨酸	0.15	半胱氨酸	0.59	赖氨酸	0.13
甘氨酸	0.57	缬氨酸	0.33	脯氨酸	0.38
苏氨酸	0.61	蛋氨酸	0.14		

3 讨论

从桑叶中提取多糖, 为许多研究者所关注。用不同的分离方法, 得到的多糖成分不同, 其活性也有差别^[16]。目前常用的是以水为主体的溶液提取法, 即用热水、温水、冷水或以热的或冷的稀酸、稀碱提取, 近年来也有采用超声和微波辅助的提取方法。一般认为, 酸对多糖有降解作用; 而稀碱提取时杂蛋白含量高于其他方法; 超声、微波辅助提取虽能提高多糖的得率, 但可能会破坏多糖链的结构。就目前的报道看, 大多还没有提升至经粗多糖提取后进一步分离其中多个组分的阶段。考虑到桑叶为一种常用的植物药, 用传统的水煎法从桑叶中提取多糖, 更符合传统中医药煎煮、熬制的方法。为分离出其中的酸性多糖, 用在偏碱条件下能吸附具酸性基团组分的DEAE-纤维素处理, 经NaCl梯度洗脱和具分子筛效应的Sephadex G-100柱进一步分离纯化, 在此过程中得两组分(图2)表明桑叶酸性多糖会

有两个不同分子量的组分, 其中分子量较大者占65%, 且其红外图谱中多糖的特征明显较后者更明显, 故本文取前者为研究对象。

实验证实分离得到的桑叶酸性蛋白多糖(APFM)所含糖醛酸基团和硫酸根的含量分别为5.33%和8.03%, 可确认是酸性多糖, 与DEAE-纤维素在pH8.6的条件下的吸附是一致的。其中还含有多肽组分, 应为酸性蛋白多糖。多糖的立体部分组成单体为 α -型吡喃糖, 由D-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-果糖组成。其蛋白质部分含有17种氨基酸, 其中半胱氨酸和蛋氨酸为含硫氨基酸, 具淬灭自由基的作用。提示该多糖可能具有屏蔽病毒侵入细胞时的结合位点、抗氧化、延缓衰老、螯合重金属、减轻重金属毒害等生物学效应^[2-3, 5-6, 8]。高效液相色谱分析的结果显示, 我们分离纯化的桑叶蛋白多糖纯度高, 已达HPLC单一对称峰的水平, 为作者进一步探讨其构效关系和生物学活性建立了可靠的基础。

参考文献:

- [1] 陈贵廷. 本草纲目通释[M]. 北京: 学苑出版社, 1995: 1699-1701.
- [2] 方福地. 分子生物学前沿技术[M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医学院联合出版社, 1998: 75-369.
- [3] 赵国华, 陈宗道, 李志孝, 等. 活性多糖研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 45-48.
- [4] 顾维雄. 保健食品[M]. 上海: 上海人民出版社, 2001: 19-20.
- [5] 牛建伟, 谢军. 灵芝的糖锗的抗肿瘤及免疫增强作用研究[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 24(4): 189-190.
- [6] 张高红. 多糖化合物抗HIV活性及应用[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 6-10.
- [7] 张民, 朱彩平, 施春雷, 等. 枸杞多糖-4的提取、分离及其对雌性下丘脑损伤性肥胖小鼠的减肥作用[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 114-117.
- [8] 左绍远. 螺旋藻多糖对D-半乳糖所致衰老小鼠的作用[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(1): 15-18.
- [9] 陈云龙. 细茎石斛多糖的降血糖活性作用[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2003, 30(6): 693-696.
- [10] 吴胜芳, 王树英, 汤坚. 桑叶的生物功能特性及其应用[J]. 营养研究, 2003(10): 95-98.
- [11] 陈福君, 卢军, 张永煜. 桑的药理研究(1)-桑叶降血糖有效组份对糖尿病动物糖代谢的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(1): 24-27.
- [12] 方晓. 桑叶浸出液对糖尿病模型大鼠降血糖作用初步观察[J]. 浙江医学, 1999, 21(4): 218; 230.
- [13] 魏远安, 方积年. 高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度和分子量[J]. 药学报, 1989, 24(7): 532-536.
- [14] 董群, 郑丽伊, 万积华. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-553.
- [15] 霍光华, 李来生, 高荫榆. 波谱在多糖结构分析上的应用[J]. 生命化学, 2002, 22(2): 194-196.
- [16] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987: 196-202.

信息

人类抗体可成功免疫H5N1禽流感病毒

瑞士生物医学研究所的一个研究小组日前表示, 他们利用从人类幸存者身上提取的抗体成功使小鼠对H5N1禽流感病毒免疫, 并大大提高了已感染病毒小鼠的存活率。

该研究所“免疫规则实验室”主任安东尼奥·兰扎维奇亚表示, 研究成果为人类预防禽流感病毒找到一种方法。

他表示, 抗体在小鼠身上“出现了立刻的、短期的免疫性”, “我们非常有信心这样的成果能够在人类身上复制”。

自90年代后期出现以来, H5N1禽流感病毒在全球造成了数百万家禽和野生禽类的死亡, 并出现了306例已知的人类感染病例, 造成185人死亡。专家担心, 病毒可能出现变种从而能够容易进行人际传播, 造成与1918年全球流感大流行类似的后果。

实验中的抗体来自感染禽流感病毒的越南幸存者的血液, 这些抗体在实验室中进行了大量复制, 随后被注入小鼠体内。被注射抗体的小鼠随后被人为的感染上H5N1病毒。研究结果显示, 抗体对小鼠产生了完全的保护。这一研究结果5月29日发表在《公共科学图书馆·医学》(PLoS Medicine)上。

兰扎维奇亚表示, 最重要的一点是抗体对已感染病毒72h的小鼠产生作用, 使病毒大量减少, 达到未注射抗体前的1/10至1/100。抗体还能几乎完全阻止病毒侵入脑和脾脏。作为对照组, 未注射抗体的小鼠无一存活。

对H5N1禽流感病毒疫苗的研究工作目前是该领域科学家的工作重点, 大部分权威学者将参加在巴黎举行的第二届“人类禽流感国际大会”。