

不同安络小皮伞提取物理化性质及组成糖研究

张洪贺, 肖旭朗, 高阳*

(长春中医药大学, 长春 130117)

真菌多糖是从真菌子实体、菌丝体及其发酵液中分离出的活性物质, 具有安全毒副作用低、天然资源丰富等特点。常见的有猴头菇多糖、银耳多糖、香菇多糖、灵芝多糖等。真菌多糖的药理作用包括: 降血糖、降血脂、降血压, 免疫调节, 抗肿瘤, 抗细菌, 抗病毒, 抗衰老, 抗疲劳等^[1-3], 近年已成为生物学、食品科学、医药科学等领域研究的热点。

安络小皮伞(*Marasmius androsaceus*), 别名鬼毛针、茶褐小皮伞等, 属于担子菌纲伞菌目白蘑科小皮伞属^[4], 药食两用, 具有增强免疫力、抗氧化^[5-6]、镇痛^[7-8]等多种生物活性。本文对不同来源的安络小皮伞菌丝体发酵产物粗多糖理化性质进行测定, 并对其单糖组成进行比较分析, 为安络小皮伞真菌多糖的质量控制、开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

安络小皮伞(固体发酵): 湖北欣凯药业公司; 安络小皮伞(液体发酵): 山西康欣药业公司; 半乳糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖 8 种单糖标准品、牛血清白蛋白、间羟基联苯标准品: 美国 Sigma 公司; 无水乙醇、硫酸、苯酚、四硼酸钠等: 分析纯, 北京化工厂。

Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm): 美国安捷伦公司; 754 型紫外-可见分光光度计: 上海佑科仪器仪表有限公司; FD-1C 冷冻干燥机: 北京德天佑科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 粗多糖的提取 称取固体发酵及液体发酵安络小皮伞菌丝体适量, 加入 5 倍量水提取 2h, 提取液离心, 沉淀加入 5 倍量水继续提取 2h, 离心, 合并上清液, 浓缩至适当体积, 醇沉至 80%, 静止过夜, 将沉淀加适量水溶解, 冷冻干燥即得固体发酵及液体发酵安络小皮伞粗多糖。

1.2.2 总糖含量的测定

1.2.2.1 标准溶液的制备 精密称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 10.0mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀得到浓度为 100.0 μ g/mL 的葡萄糖标准溶液。

1.2.2.2 标准曲线的绘制 精密吸取标准品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于试管中, 分别加水至 1.0 mL, 再各加入 5% 苯酚水溶液 1.0mL, 摇匀, 快速加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 放至室温。以标准品溶液 0 mL 管为空白, 在 490nm 波长处测定吸光度, 以葡萄糖为横坐标 x, 以对应的吸收度 A 为纵坐标 y 绘制标准曲线, 计算回归方程及回归系数。

1.2.2.3 样品的测定 精密称取安络小皮伞粗多糖的干燥粉末各 50.0mg, 置 50mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 1.0mg/mL 的供试品溶液。分别精密吸取 0.1mL, 置于试管中, 其吸光度在标准曲线的范围内, 加水至 1mL, 照 1.2.2.2 标准曲线的制作项下自“再加入 5% 苯酚溶液 1.0mL”起, 依法进行以下操作, 在 490nm 处测定其吸光度, 根据标准曲线计算各样品中总糖的含量。

1.2.3 酸性糖含量的测定

1.2.3.1 标准溶液的制备 精密称取干燥至恒

重的葡萄糖醛酸标准品 25.0mg,置 500mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 50 μ g/mL 的葡萄糖醛酸标准溶液。

1.2.3.2 标准曲线的绘制 精密吸取标准品溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4mL,加水补充至 0.4 mL,混匀,在冰水浴中加入 2.4mL 0.0125 mol/L 四硼酸钠-硫酸溶液,混匀,沸水浴中加热 5 min,取出迅速冷却至室温,加 0.15% 间羟基联苯 40 μ L,立即混匀。以标准品 0 mL 管为空白,在 525nm 波长处 20min 内测定吸收度,以葡萄糖醛酸为横坐标 x,以其对应的吸光度(A)为纵坐标 y 绘制标准曲线,计算回归方程及回归系数。

1.2.3.3 样品的测定 精密称取安络小皮伞粗多糖粉末各 100mg,加蒸馏水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,摇匀即得 1 mg/mL 供试品溶液。精密吸取供试品溶液 0.4mL,照 1.2.3.2 标准曲线的制作项下自“在冰水浴中加入 2.4mL 0.0125mol/L 四硼酸钠-硫酸溶液”起,依法进行以下操作,在 525nm 波长处测定吸光度,根据标准曲线计算样品溶液中的酸性糖含量。

1.2.4 蛋白含量测定

1.2.4.1 标准曲线的制作 精密称取干燥至恒重的牛血清白蛋白对照品 25.0mg,加蒸馏水溶解并定容至 100mL 量瓶中,摇匀即得 0.25mg/mL 牛血清白蛋白溶液。精密吸取标准品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,加水至 1mL,加 5mL 福林-酚试剂甲,混匀后在室温放 10min,再加入 0.5mL 试剂乙,立即混匀,室温放置 30min,以试剂管为空白,然后在 660nm 处测定吸光度,以牛血清白蛋白毫克数为横坐标,对应吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,并计算回归方程及回归系数。

1.2.4.2 样品的测定 精密称取真菌粗多糖样品 100mg,加蒸馏水溶解并定容至 100mL 量瓶中,摇匀即得 1mg/mL 供试品溶液。精密吸

取供试品溶液 0.5mL,加水至 1mL,照 1.2.4.1 标准曲线的制作项下自“加 5mL 福林-酚试剂甲”起,依法进行以下操作,在 660nm 波长处测定吸收度,计算样品溶液中的蛋白质含量。

1.2.5 组成糖分析

1.2.5.1 单糖标准品衍生物的制备 精密称取葡萄糖、葡萄糖醛酸、甘露糖、半乳糖、半乳糖醛酸、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、岩藻糖对照品各 2mg,置于大试管中,各加入 2 mL 水溶解。向其加入 0.3mol/L NaOH 溶液 1mL,再向其中加入 1.2 mL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液,混匀,至 70 °C 水浴反应 30min,取出,冷却至室温。分别向其加入 1mL 0.3 mol/L HCl 溶液进行中和,加入 5mL 氯仿进行萃取,重复 3 次,取上层水相。吸取 8 种单糖衍生物各 100 μ L,混匀,过 0.45 μ m 滤膜,备用。

1.2.5.2 供试品衍生物的制备 精密称取供试品 5mg 于具塞试管中,加入 2mol/L 三氟乙酸溶液,密封,至 100 °C 烘箱中进行水解,水解 8h。取出后,吹干,加入 1mL 甲醇溶液以吹尽多余的三氟乙酸。水解产物加 2mL 水溶解,按 1.2.5.1 项下自“向其加入 0.3mol/L NaOH 溶液 1mL”起,依法操作,得到供试品 PMP 衍生物,过 0.45 μ m 滤膜,备用。

1.2.5.3 色谱条件 岛津 LC-20AT; Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 250mm \times 4.6mm); 柱温: 40 °C; 检测波长: 250nm; 流速: 0.8mL/min; 流动相 A 为 0.025mol/L 磷酸盐缓冲溶液(KH₂PO₄-NaOH, pH6.8)-乙腈(85:15), 流动相 B 为 0.025mol/L 磷酸盐缓冲溶液(KH₂PO₄-Na OH, pH6.8)-乙腈(60:40), 梯度洗脱比例见表 1。

表 1 梯度洗脱比例

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|---------------------|----------------------|--------------------|
| 0 \rightarrow 10 | 100 \rightarrow 92 | 0 \rightarrow 8 |
| 0 \rightarrow 30 | 92 \rightarrow 70 | 8 \rightarrow 30 |
| 30 \rightarrow 40 | 70 | 30 |

2 结果与分析

2.1 理化性质分析

2 种安络小皮伞真菌总糖含量、酸性糖含量及蛋白质含量(%)的结果见表 2。

表 2 安络小皮伞多糖的理化性质

| 安络小皮伞 | 含量/% | | |
|-------|-------|------|-------|
| | 总糖 | 酸性糖 | 蛋白质 |
| 固体发酵 | 46.78 | 1.88 | 30.84 |
| 液体发酵 | 26.08 | 2.31 | 46.23 |

由表 2 可知, 固体发酵安络小皮伞菌丝体总糖含量最高, 为 46.78%; 液体发酵安络小皮伞菌丝体中蛋白含最高, 为 46.23%; 二者酸性糖含量差异不大。

2.2 组成糖分析

表 3 安络小皮伞多糖的组成糖及摩尔比分析

| 样品 | 摩尔比 | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Man | Rha | Glc | Gal | Xyl | Ara |
| 固体发酵 | 0.051 | 0.012 | 1.000 | 0.070 | 0.364 | 0.228 |
| 液体发酵 | 0.108 | 0.067 | 1.000 | 0.221 | 0.012 | 0.029 |

由表 3 可知, 安络小皮伞固体及液体发酵菌丝体多糖中均由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖 6 种单糖组成。其中葡萄糖所占比例最高。

3 讨论

实验结果表明, 安络小皮伞菌丝体中主要成分为糖肽类物质, 二者之和在 70%以上, 不同发酵生产方式对其理化性质影响较大。二者均由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖 6 种单糖组成, 固体发酵安络小皮伞摩尔比为 0.051:0.012:1.000:0.070:0.364:0.223, 液体发酵安络小皮伞摩尔比为 0.108:0.067:1.000:0.221:0.012:0.029。

真菌多糖具有广泛的生物活性和安全性,

现已被开发成药品、保健品及功能性食品^[9]。通过对不同来源安络小皮伞菌丝体发酵产物总糖、蛋白质含量和组成糖的比较, 旨在为安络小皮伞多糖食品及药物的开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 郭天力, 严晓娟, 胡先望, 等. 真菌多糖研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 18(13):3575-3583
- [2] 秦俊哲, 陈明, 陈合, 等. 食药两用真菌多糖的研究现状与展望[J]. 中国食用菌, 2004, 23(2):6-9
- [3] 黄群, 孙术国, 曹颖. 真菌多糖及其生理功能[J]. 农业工程技术:农产品加工业, 2008, (5):36-40
- [4] 邵力平, 等. 真菌分类学[M]. 北京:北京科技出版社, 1984: 258-261
- [5] 董媛, 高翔, 李婷婷, 等. 安络小皮伞胞外及胞内多糖体外抗氧化性的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29 (4):45-48
- [6] 梁启明, 徐杨, 王艳珍, 等. 安络小皮伞菌丝体多糖的提取及其抗脂质过氧化作用的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(9):127-129
- [7] 高阳, 杨献玲, 徐多多. 安络小皮伞菌糖肽理化性质与镇痛作用[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(5): 777-778
- [8] 叶文博, 杨晓彤, 陈莹, 等. 安络小皮伞对大鼠的长效镇痛作用[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(4):19-21
- [9] 周永国, 杨越冬, 王树元, 等. 天然活性多糖在生物医药领域中的研究进展[J]. 高分子通报, 2006, (9):16-2

