方格星虫多糖的分离纯化及单糖组成

董兰芳，张　琴*，许明珠
（广西壮族自治区海洋研究所，广西海洋生物技术重点实验室，广西 北海　536000）

摘　要：方格星虫多糖经碱法提取、三氯乙酸脱蛋白、DEAE-52纤维素柱层析、Sephadex G-100凝胶柱层析纯化得到精制方格星虫多糖（*Sipunculus nudus* polysaccharide，SNPS）。测定SNPS的理化性质和单糖组成，结果表明：SNPS为白色粉末状单一组分；经理化性质测定和紫外光谱分析，表明SNPS的多糖质量分数为99.35%，糖醛酸质量分数为22.21%，不含蛋白质和核酸，不含硫酸根；气相色谱分析结果表明方格星虫多糖SNPS主要由阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成，其物质的量比为1.16∶9.54∶1。本研究表明SNPS是从方格星虫中得到的均一组分纯多糖。

关键词：方格星虫；多糖；纤维素；凝胶；单糖

Isolation, Purification and Monosaccharide Analysis of Polysaccharide from *Sipunculus nudus*

DONG Lanfang, ZHANG Qin*, XU Mingzhu
(Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai　536000, China)

Abstract: Crude polysaccharide was obtained from *Sipunculus nudus* by alkali extraction and deproteinized by Sevag method. The polysaccharide was sequentially purified by ion exchange chromatography on DEAE-52 cellulose column and Sephadex G-100 Gel column. Then, the purified polysaccharide from *Sipunculus nudus* (SNPS) was characterized for physicochemical properties and monosaccharide composition. The results showed that SNPS with a purity of 99.35% contained 22.21% alduronic acid without protein, nuclein or sulfate ions. Gas chromatography analysis showed that the monosaccharide compositions of SNPS were arabinose, glucose and galactose, with a molar ratio of 1.16:9.54:1. This study demonstrated that SNPS was a homogeneous component obtained from *Sipunculus nudus*.

Key words: *Sipunculus nudus*; polysaccharide; cellulose; gel; monosacharide
中图分类号：R284.2　　文献标志码：A　　文章编号：1002-6630（2015）01-0109-04
doi:10.7506/spkx1002-6630-201501021

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。海洋生物多糖因具有免疫调节、抗凝血、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗病毒、抗菌、抗辐射、抗氧化等多种活性[1-9]，在医疗保健、食品加工、美容化妆等方面具有良好的应用前景，近年来，海洋生物多糖的药用潜力逐渐被发掘出来。

方格星虫（*Sipunculus nudus*）亦称光裸星虫，俗称“沙虫”，是无节、蠕虫状的海产体腔动物，为暖水性世界广布种，我国沿海从南到北均有分布，其中以广西海区资源较为丰富。方格星虫具有丰富的营养物质，是一种具有多种机体调节功能的药食佳品[10-13]。多糖是方格星虫主要营养成分之一，已有研究表明，方格星虫多糖（*Sipunculus nudus* polysaccharide，SNPS）具有抗病毒、抗辐射、抗疲劳、提高记忆力等多种生物学功能[14-17]。目前，国内外研究方格星虫多糖生物活性[14-17]和提取工艺[18-19]的报道较多，而方格星虫多糖的分离纯化方法鲜有报道。本研究对方格星虫多糖进行分离纯化，并对其单糖组成进行了分析，以期为方格星虫多糖产品的利用和开发提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

方格星虫鲜活品，购于广西北海市南珠市场。

DEAE-52纤维素、Sephadex G-100凝胶　北京慧德易科技有限责任公司；标准单糖：*D*（＋）-葡萄糖（glucose，Glu）、木糖（xylose，Xyl）、果糖（fructose，Fru）、*D*-甘露糖（mannose，Man）、*D*-半乳糖（galactose，Gal）、*D*-阿拉伯糖（arabinose，Arb）、*L*-鼠李糖（rhamnose，Rha）、*L*（－）-岩藻糖

收稿日期：2014-02-25
基金项目：广西科学研究与技术开发计划项目（桂科攻11107011-6）；广西科学院基本科研业务费资助项目（12YJ25HYS20）
作者简介：董兰芳（1987—），女，助理研究员，本科，主要从事水产动物天然产物开发的研究。E-mail：0xiao0dong0@163.com
*通信作者：张琴（1982—），女，副研究员，博士，主要从事水产动物天然产物开发研究。E-mail：celery996@yahoo.com.cn

（fucose，Fuc）、肌醇（inositol）和标准糖醛酸：*D*-半乳糖醛酸，均购自上海金穗生物科技有限公司；三氟乙酸（trifluoroacetic acid，TFA）、无水乙醇、三氯乙酸、氯化钠、氢氧化钠均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

GC-2010Plus气相色谱仪 日本岛津公司；EZ-2溶剂蒸发工作站 英国Genevac公司；Thermo KR25i高速冷冻离心机 美国Jouan公司；HH-2数显恒温水浴锅 江苏常州赛普实验仪器厂；BSZ-100自动部分收集器 上海青浦沪西仪器厂；Milli-Q Biocel超纯水机 美国Millipore公司；UV6300紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 方格星虫多糖的提取

用剪刀将鲜活的方格星虫剖开，去除体腔液和内脏，体壁用蒸馏水洗净，经高速组织匀浆机匀浆打碎成糊状。体壁肉酱加入6 倍体积6% NaOH，50 ℃提取4 h，调pH值至7.0，9 000 r/min离心30 min，弃去沉淀，得上清液，用三氯乙酸法[20]去蛋白2～3 次，于工作站浓缩至终体积为原来的1/4左右，加乙醇至终体积分数为75%，4 ℃沉淀过夜。4 ℃、9 000 r/min离心10 min，沉淀以无水乙醇、丙酮洗涤多次，置于通风处晾干后用超纯水溶解，用截留相对分子质量为10 000以上的玻璃纸流水透析48 h，乙醇再沉淀，离心，冷冻干燥得到方格星虫粗多糖。

1.3.2 DEAE-52 纤维素柱层析

DEAE-52纤维素层析柱先用超纯水平衡，方格星虫粗多糖0.5 g用少量超纯水溶解，9 000 r/min离心，取上清液上柱，0.5 mol/L NaCl洗脱，用恒流泵控制流速为1 mL/min，自动收集器收集，每管5 mL，以苯酚-硫酸法跟踪检测，以管号为横坐标，吸光度$A_{490\ nm}$为纵坐标绘制洗脱曲线。根据测定结果合并吸收峰的洗脱液，浓缩后用超纯水透析至无Cl^-，乙醇沉淀，离心，冻干。

1.3.3 Sephadex G-100凝胶柱层析

Sephadex G-100凝胶柱（2.6 cm×45 cm，40～120 μm）层析用超纯水平衡过夜。经DEAE-52纤维素柱分离的方格星虫多糖冻干品0.05 g用超纯水溶解，0.45 μm滤膜过滤后上柱，用超纯水以流速 0.2 mL/min洗脱，自动收集器收集，每管5 mL，以苯酚-硫酸法跟踪检测，以管号为横坐标，吸光度$A_{490\ nm}$为纵坐标绘制洗脱曲线。合并吸收峰洗脱液，于工作站减压浓缩，冷冻干燥，得方格星虫精制多糖。

1.3.4 多糖质量分数测定

将方格星虫多糖配成1 mg/mL水溶液，以葡萄糖为标准品，按苯酚-硫酸法测定总糖质量分数。

1.3.5 糖醛酸质量分数测定

将方格星虫精制多糖配制成5 mg/mL水溶液，取适量，以葡萄糖醛酸为标准品，按硫酸-咔唑法[21]测定糖醛酸质量分数。

1.3.6 硫酸根质量分数测定

取方格星虫精制多糖5 mg，用1 mol/mL盐酸完全水解后，以无水硫酸钾为标准品，采用明胶-比浊法[22]测定硫酸根的质量分数。

1.3.7 蛋白质量分数测定

方格星虫精制多糖以超纯水配成1 mg/mL溶液，取适量，以牛血清白蛋白为标准品，采用Folin-酚法[23]测定蛋白质量分数。

1.3.8 紫外光谱分析

将纯化后的方格星虫多糖用超纯水配成1 mg/mL溶液，以蒸馏水为空白对照，紫外分光光度计在190～400 nm波长范围扫描检测，看是否有无特征吸收。

1.3.9 单糖组成分析

多糖的水解：精密称取5.0 mg方格星虫精制多糖于厌氧水解管中，加入1.0 mL 2 mol/mL的TFA，充氮气后盖好软塞，旋紧密封盖，105 ℃水解6 h，水解液旋转蒸发至干，加甲醇继续旋蒸至干，重复3 次，以除去TFA。

单糖衍生物的制备：采用糖腈乙酸酯衍生法对单糖标准品和多糖水解得到的单糖样品衍生后进行气相色谱分析。单糖标准品和多糖水解样品各5.0 mg，分别加入10.0 mg盐酸羟胺，再加入0.5 mL吡啶，90 ℃水浴中加热反应30 min，间歇振荡。取出反应液冷却至室温，加入0.5 mL乙酸酐，90 ℃水浴中继续反应30 min进行乙酰化，得糖腈乙酸酯衍生物。离心，上清液直接作气相色谱分析。

色谱条件：色谱柱为RTx-1石英毛细柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；氢火焰离子化检测器（hydrogen flame ionization detector，FID）；升温程序：初始温度140 ℃，以6 ℃/min 升温至240 ℃，保持5 min；进样口温度250 ℃；检测器温度250 ℃；载气N_2；进样量1 μL。

2 结果与分析

2.1 方格星虫多糖的分离纯化

2.1.1 DEAE-52 纤维素柱层析

方格星虫体壁经碱液提取、三氯乙酸脱蛋白、透析、醇沉、冻干处理后得黄褐色多糖粉末，易溶于水不溶于乙醇，得率为1.47%，多糖质量分数64.15%。由图1可知，经过DEAE-52 纤维素阴离子交换层析，0.5 mol/L NaCl洗脱后只有一个洗脱峰，说明方格星虫多糖为酸

性多糖[24]，收集洗脱峰各管，透析脱盐，浓缩后冷冻干燥得到一种DEAE-52纤维素纯化乳白色粉末状多糖级分SNPS’，经测定SNPS’多糖质量分数为88.37%。

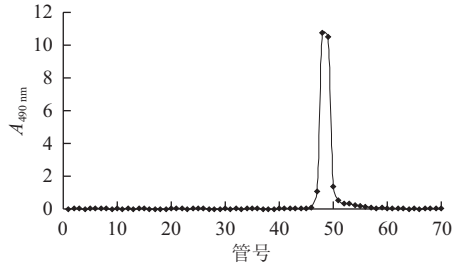


图 1 DEAE-52纤维素柱纯化方格星虫多糖的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of *Sipunculus nudus* polysaccharide on DEAE-52 celluose column

2.1.2 Sephadex G-100凝胶柱层析

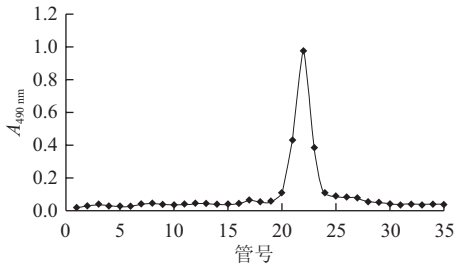


图 2 Sephadex G-100 凝胶柱纯化方格星虫多糖的洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of *Sipunculus nudus* polysaccharide on Sephadex G-100 column

由图2可知，SNPS’过Sephadex G-100凝胶柱后，在19～25 管即洗脱体积为95～125 mL得到一个单一对称性很好的洗脱峰，说明该组分为单一的多糖组分，透析、浓缩后冻干后，得到方格星虫白色粉末状精制多糖SNPS。

2.2 SNPS基本理化性质

结果表明，SNPS不含蛋白质，多糖质量分数为99.35%，纯度较高，不含硫酸根，糖醛酸质量分数为22.21%。

2.3 SNPS紫外光谱分析

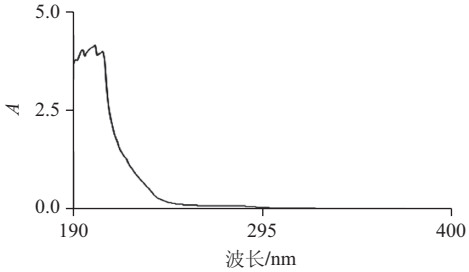
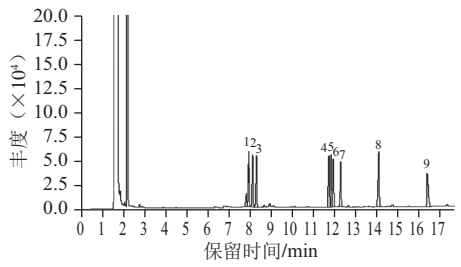


图 3 方格星虫多糖紫外光谱

Fig.3 UV absorption spectrum of SNPS

由图3可知，在195 nm波长处出现糖的较强吸收峰，在260 nm和280 nm波长处无明显的蛋白、核酸吸收峰，这与蛋白质量分数测定结果相符，表明被测物为多糖，且不含核酸及蛋白质。因此，分离纯化得到的SNPS为纯多糖。

2.4 方格星虫多糖SNPS单糖组成



1. Rha；2. Arb；3. Xyl；4. Fuc；5. Glu；6. Man；7. Gal；8. Inositol；9. Fru。

图 4 混合标准单糖气相色谱图

Fig.4 GC chromatogram of monosaccharide standards

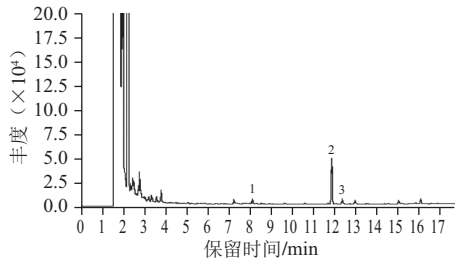


图 5 SNPS气相色谱图

Fig.5 GC chromatogram of SNPS

实验以Glu、Xyl、Fru、Man、Gal、Arb、Rha和Fuc为标准单糖样品，混合标准单糖衍生物的保留时间与每个标准单糖衍生物的保留时间进行对照比较，确定各单糖衍生物的出峰时间。由图4各单糖衍生物的保留时间依次为Rha 7.934 min，Arb 8.127 min，Xyl 8.303 min，Fuc 11.724 min，Glu 11.845 min，Man 11.978 min，Gal 12.287 min，Inositol 14.083 min，Fru 16.355 min。对方格星虫多糖单糖组成气相色谱图（图5）分析可知，SNPS中1～3 号峰的保留时间与标准单糖气相色谱图中峰2、5、7保留时间基本一致，表明峰1为阿拉伯糖，峰2为葡萄糖，峰3为半乳糖，从而证明SNPS由葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖3 种单糖组成，物质的量比为1.16∶9.54∶1。另外，多糖气相谱图中存在不少杂峰，这是由于多糖水解衍生过程复杂，使用试剂较多，试剂可能有残留或试剂不纯。刘玉明等[25]测定了方格星虫的单糖组成为阿拉伯糖和葡萄糖，质量分数分别为7.91%和79.32%；张桂和等[26]通过红外光谱分析确定方格星虫体壁多糖中存在木糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖。这与本实验测定结果有一些差异，这可能是提取纯化处理方法、单糖测定方法、材料来源等的不同造成的。

3 结 论

方格星虫粗多糖经DEAE-52纤维素柱和Sephadex G-100凝胶柱纯化后得到白色粉末状单一组分SNPS。理化性质测定及紫外光谱分析结果：SNPS多糖质量分数为99.35%，不含蛋白质和核酸，不含硫酸根，糖醛酸质量分数为22.21%。上述结果表明采用DEAE-52纤维素柱层析和Sephadex G-100凝胶柱层析的常规方法对于纯化方格星虫多糖具有良好的效果。气相色谱分析结果表明SNPS由阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖3 种单糖组成，物质的量比为1.16∶9.54∶1。

参考文献：

[1] ZVYAGINTSEVA T N, SHEVCHENKO N M, NAZAROVA I V, et al. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some fareastern brown seaweeds[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2000, 126(3): 209-215.

[2] 刘志峰, 宫晓黎, 魏淑贞. 五种海藻多糖体外抗血小板聚集作用的观察[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(2): 36-38.

[3] 董浦江, 姚棒祥. 昆布多糖硫酸酯对化疗药物治疗肝癌细胞的增敏作用[J]. 现代医学卫生, 2003, 19(3): 255-256.

[4] 李福川, 唐志红, 崔博文, 等. 三种海带多糖的降糖作用[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(5): 12-15.

[5] 侯建明, 蓝进. 海洋生物多糖(AC-1)防治高脂血症的实验报告[J]. 海军医学杂志, 2001, 22(3): 197-199.

[6] 耿美玉, 李泽琳. 海洋硫酸多糖类药物911抗艾滋病毒作用及其机理研究[J]. 中国药理学会通讯, 2001, 18(4): 13-14.

[7] 于红, 张学成. 螺旋藻多糖抗HSV-1作用的体外实验研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12(9): 65-69.

[8] 顾宁琰, 刘宇峰. 紫球藻胞外多糖抗辐射的生物活性研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(12): 53-56.

[9] XUE Changhu, FANG Yu, LIN Hong, et al. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*[J]. Journal Applied Phycology, 2001, 13(1): 67-70.

[10] 陈细香, 林秀雁, 卢昌义, 等. 方格星虫属动物的研究进展[J]. 海洋科学, 2008, 32(6): 66-70.

[11] 蒋定文, 沈先荣, 贾福星, 等. 海洋星虫提取物的营养分析及免疫调节作用的初步观察[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(2): 96-97.

[12] 张桂和, 李理, 赵谋明, 等. 方格星虫营养成分分析及抗疲劳作用研究[J]. 营养学报, 2008, 30(3): 318-320.

[13] 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, 23(1): 30-32.

[14] 夏乾峰, 谭河林, 覃西, 等. 方格星虫多糖抗乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 山东医药学, 2010, 50(7): 44-45.

[15] 李珂娴, 沈先荣, 蒋定文, 等. 方格星虫多糖对小鼠抗辐射能力的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2011, 18(3): 33-36.

[16] 刘玉明, 钱甜甜, 莫琳芳, 等. 方格星虫多糖对运动小鼠抗疲劳作用实验研究[J]. 中国海洋药物, 2012, 31(3): 41-44.

[17] 何颖, 沈先荣, 蒋定文, 等. 方格星虫多糖对记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国海洋药物, 2012, 31(1): 38-41.

[18] 刘玉明, 钱甜甜, 何颖, 等. 方格星虫多糖不同提取工艺的比较有研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1454-1455.

[19] 许明珠, 张琴, 童潼. 方格星虫多糖水法提取的条件及优化[J]. 广西科学, 2013, 20(4): 285-288.

[20] 许静. 超声波提取缢蛏多糖及脱蛋白工艺[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(8): 91-94.

[21] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 20.

[22] TERHO T T, HARTIALA K. Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 4l(2): 471-476.

[23] OLIVERH B, LOWRY, NIRA J, et a1. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, l951, 193(1): 265-270.

[24] 夏玮, 吕庆, 张文清, 等. 桑叶多糖 SDS-1和 SDT-1的系统分离纯化[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 678-682.

[25] 刘玉明, 钱甜甜, 李珂娴, 等. 气相色谱法分析方格星虫多糖的单糖组成[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1362-1365.

[26] 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.