

# 分子活化分析研究铁芒萁叶中 稀土结合多糖\*

王玉琦 许 雷\*\* 孙景信 郭繁清 陈红民 曹国印\*\*

(中国科学院高能物理研究所, 中国科学院核分析技术开放实验室, 北京 100080)

**摘要** 利用分子活化分析技术初步研究了铁芒萁叶中稀土结合多糖的状态. 铁芒萁叶经过提取和生化分离后, 得到冷水溶性多糖, 热水溶性多糖, 酸溶性多糖和碱性多糖. 将所得到的多糖脱蛋白后通过凝胶柱, 比色法测定多糖的吸收曲线, 并用中子活化法(NAA)测定多糖中的 8 个稀土元素(La, Ce, Nd, Sm, Eu, Tb, Yb 和 Lu)的含量. 研究表明, 铁芒萁体内稀土元素与多糖有紧密结合. 经分子量测定, 与稀土元素(REE)结合的多糖为小分子量多糖 $(1\sim2)\times 10^4$  u.

**关键词** REE 多糖 铁芒萁 分子活化分析 中子活化分析

近十几年来, 随着稀土在农业上的广泛应用以及稀土卫生毒理学的发展, 稀土元素对生物体生理功能的作用及其机理, 以及它们对生物体的长期生物效应等, 已引起人们极大的关注. 特别是, 稀土元素通过食物链进入生物体之后, 究竟与体内生物大分子发生怎样的作用以及对人体健康的影响等, 已成为目前生命科学领域中研究的热点. 然而, 由于生物体内稀土元素含量很低( $10^{-10}\sim 10^{-8}$  g/g), 一般的分析方法难以达到所要求的灵敏度及准确度, 使得该项研究难以深入开展. 为了测定生物体中细胞和亚细胞组分中的稀土元素, 需要一种灵敏度高、准确度好的分析方法. 近几年, 分子活化分析(Molecular Activation Analysis, MAA)得到迅速发展, 并被一些实验室用于研究生物体内微量元素的赋存状态<sup>[1-4]</sup>. 该方法是将某些特效的元素形态分离技术, 如化学分离或生化分离等, 与具有高灵敏度的 NAA, PIXE 等核分析技术相结合, 从分子水平或细胞水平研究微量元素与生物大分子的相互作用, 从而可为环境科学和生命科学等研究领域提供更深层次的信息.

目前, 有关稀土元素在生物体内的赋存状态研究甚少. 为了探讨稀土元素与生物大分子相互作用, 我国刘元方等人<sup>[5]</sup>报道了从稀土培养液生长的原生动物梨形四膜虫中成功地分离出含稀土的膜蛋白. 钟淑琳等人<sup>[6]</sup>从茶叶中分离出含有稀土的脂多糖. 近年来, 本实验室利用所建立的稀土元素的分子活化分析方法<sup>[7]</sup>, 研究了铁芒萁叶子中的稀土结合蛋白, 证明了在植物体内稀土元素与蛋白质的结合是紧密的.

1997-01-24 收稿, 1997-05-04 收修改稿

\* 国家自然科学基金资助项目

\*\* 中国农业科学院研究生院

本文的目的,在于应用 MAA 研究植物体中稀土元素与多糖的结合状态. 采自稀土矿区的铁芒其叶子经过生化分离,得到几种含稀土元素的多糖:冷水溶性多糖,热水溶性多糖,酸性多糖和碱性多糖. 这几种多糖经脱蛋白后,用分光光度法测定多糖和用中子活化分析方法(NAA)测定稀土元素,结果表明,在植物体内稀土元素与多糖是有结合的.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

铁芒其(*Dicranopteris dichotoma*)采自江西赣南地区某稀土矿区. 将铁芒其叶子用蒸馏水和去离子水清洗,沥干,保存在聚乙烯袋中,在冰柜( $-20^{\circ}\text{C}$ )中储存备用. 我们曾报道了本实验室用中子活化法测定该铁芒其叶子中的稀土元素含量为  $3\,358\text{ mg/kg}^{[8]}$ .

### 1.2 稀土元素结合多糖的提取流程

为探索稀土元素在铁芒其叶中与多糖的结合状态,所采用的提取和分离多糖的流程<sup>[9~11]</sup>见图 1. 用 Sevag 法脱去蛋白后的多种多糖分别上 Sephadex G-200 凝胶柱,用  $0.9\%$  NaCl 溶

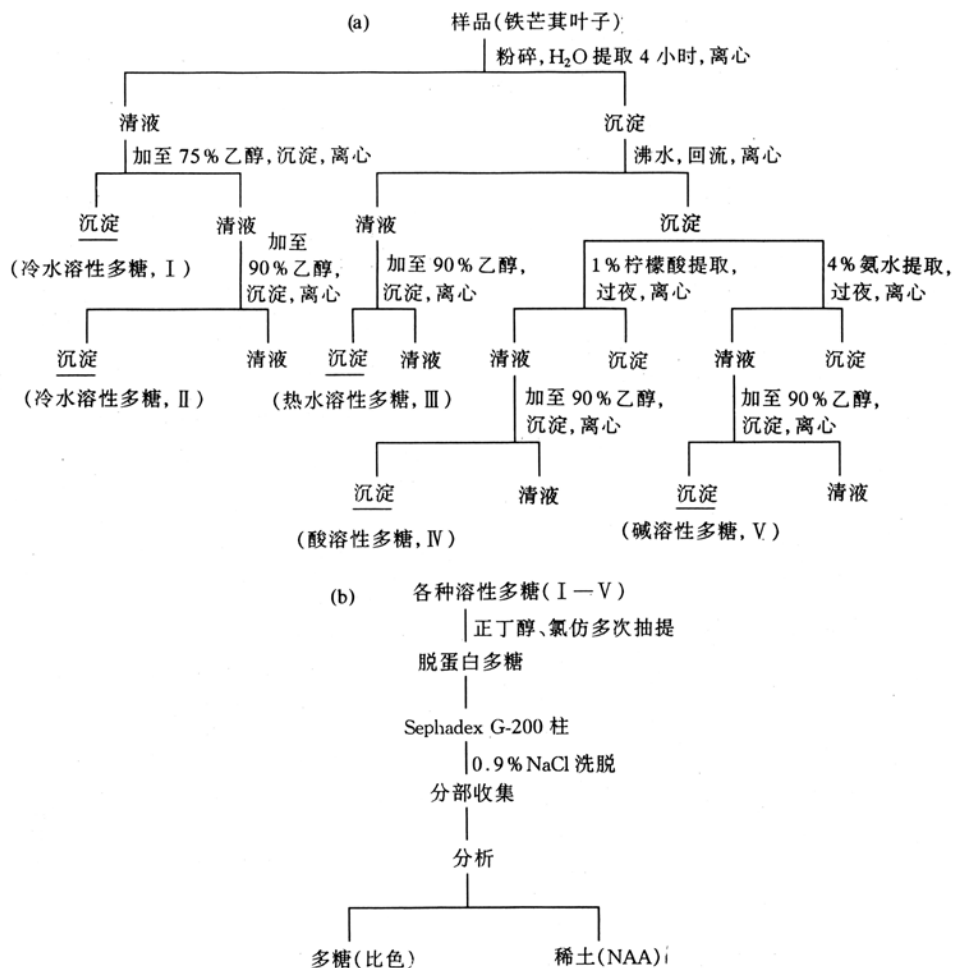


图 1 稀土结合多糖的提取流程(a)及分离和分析程序(b)

液淋洗. 得到了脱蛋白的多糖洗脱液, 一部分用行硫酸蒽酮比色法(620 nm)测定糖峰, 另一部分用中子活化法测定稀土元素含量.

1.3 稀土元素的分析方法

将脱蛋白的多糖洗脱液样品, 仔细地分别转移到纯净的聚四氟乙烯膜上, 在红外灯下烤干, 包叠成方形(10 mm×10 mm), 外面再用高纯铝箔包好用于中子活化分析. 将人工配制的稀土元素混合标准及作为分析质量控制的标准参考物质: 中国的 GBW 07605(茶叶)和美国的 NIST SRM-1575(松针)及 SRM-1572(柑桔叶)与已制备好的样品一起送入中国原子能科学研究院的重水反应堆中照射 16 h, 热中子注量率为  $7 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 衰变 8 d 和 20 d 后用 HPGe 探测器进行  $\gamma$  放射性测量, 分别得到样品中 8 个稀土元素(La, Ce, Nd, Sm, Eu, Tb, Yb 和 Lu)的含量. 探测器的分辨率为 1.85 keV(对于<sup>60</sup>Co 的 1 332 keV 能峰).

2 结果与讨论

2.1 多糖与稀土元素的结合

从铁芒萁叶中提取的不同溶性多糖, 经脱蛋白并通过 Sephadex G-200 凝胶柱, 得到了冷水溶性多糖, 热水溶性多糖, 酸溶性多糖和碱溶性多糖的洗脱曲线及相应的 REEs 含量分布曲线(见图 2 至图 6). 因为 8 个稀土元素的含量分布曲线几乎相同, 因此图中只给出了 Sm 和 Yb 的分布曲线(分别代表轻稀土元素和重稀土元素). 从图中可以看出, 在多糖洗脱曲线中, 低分子量的糖峰与稀土元素含量分布曲线峰的位置基本重合, 说明 REEs 与低分子量的多糖是有结合的. 这可能是由于结构复杂的多糖链上的羟基对 REEs 发生作用所致. 另外, 虽然本工作中得到的多糖是已经脱掉蛋白后的多糖, 但仍可能有残留的磷酸根及羧基, 这些活性较强的残基与 REEs 可以发生更强的作用. 总而言之, 有关生物大分子与 REEs 的结合机理很复杂, 需有待进一步深入探讨.

2.2 冷水溶性多糖

从图 2 和图 3 可见, 用乙醇提取的冷水溶性多糖经脱蛋白后, 稀土元素主要与小分子量的多糖紧密结合, 其分子量分别为  $2.2 \times 10^4 \text{ u}$ (75% 乙醇提取的冷水多糖)和  $2.05 \times 10^4 \text{ u}$ (90% 乙醇提取的冷水多糖);而在大分子量糖峰处, 没有发现稀土元素, 说明 REEs 不与大分子量多糖结合.

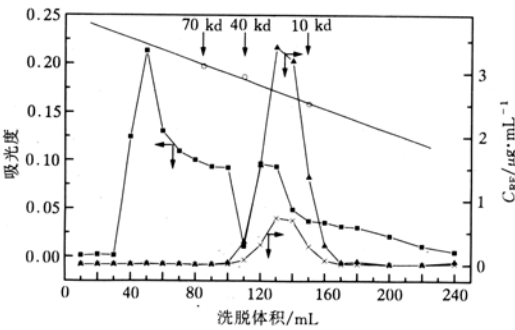


图 2 75% 乙醇提取的冷水多糖

—■—为多糖, —○—为标准, —▲—为 Sm, —×—为 Yb

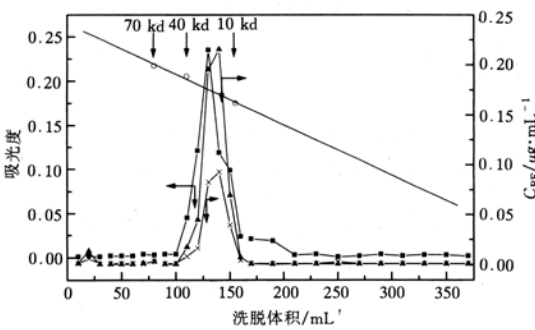


图 3 90% 乙醇提取的冷水多糖

说明同图 2

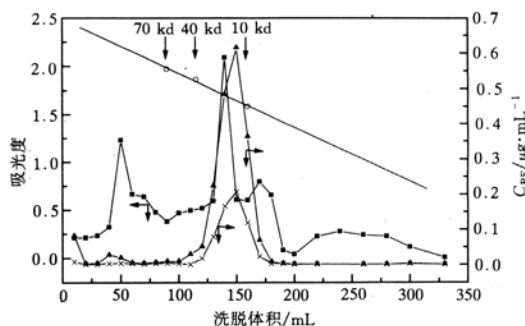


图 4 90%乙醇提取的热水多糖  
说明同图 2

## 2.3 热水溶性多糖

将提取冷水溶性多糖后的沉淀部分,再用沸水提取,用 90%乙醇沉淀多糖,经脱蛋白后上凝胶柱分离,得到了脱蛋白多糖和 REEs 的分布曲线(图 4). 结果表明 REEs 也是主要与小分子量多糖( $1.8 \times 10^4$  u)紧密结合,而与大分子量的多糖( $>20 \times 10^4$  u)不结合.

## 2.4 碱溶性多糖和酸溶性多糖

经热水提取多糖后的沉淀,一部分用于氨水提取得到碱溶性多糖;另一部分用柠檬酸提取得到酸溶性多糖. 多糖提取液再经脱蛋白

和 Sephadex G-200 凝胶柱分离,得到脱了蛋白的多糖的洗脱曲线和 REEs 的含量分布曲线(图 5 和图 6). 特别应该指出的是,从碱溶性多糖曲线及相应的 REEs 分布曲线(图 5)可以明显地看到,稀土元素与小分子量(约  $1.2 \times 10^4$  u)碱溶性多糖结合的相当牢固,说明在该碱性条件下,稀土元素并没有以氢氧化物沉淀形式从多糖中分离出来,而是与多糖结合成稳定的生物大分子化合物. 相反,在酸性条件下,稀土元素与多糖的结合被破坏. 由图 6 可看出,在酸溶性多糖的糖峰处(为  $>4 \times 10^4$  u)没有检测出稀土元素. 这可能是由于在酸性条件下多糖被水解,或柠檬酸与稀土元素络合而使其与多糖分离.

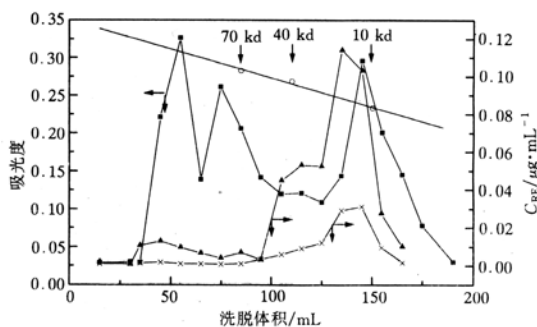


图 5 碱提取多糖  
说明同图 2

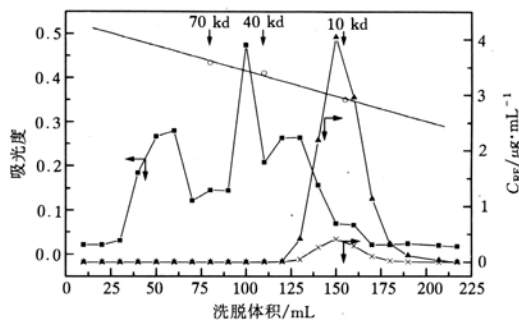


图 6 酸提取多糖  
说明同图 2

## 3 结论

(1)植物体内稀土结合多糖的研究文献报道极少. 我们首次从天然植物铁芒其叶中提取分离出了几种溶性多糖. 经脱蛋白,在水溶性(包括冷水和热水溶性多糖)及碱溶性多糖中,稀土元素与小分子量的多糖紧密结合,这可能是由于结构复杂的多糖链上的羟基或者是残留的磷酸根及羧基与 REEs 发生作用所致. 本工作证明了在植物体内多糖能够与稀土元素结合,初步探讨了生物大分子与 REEs 结合的可能性.

(2)稀土元素分子活化分析为研究植物体内稀土元素与生物大分子的结合状态提供了一种灵敏可靠的方法,使得 REEs 的体内(in vivo)研究有可能更深入一步.

## 参 考 文 献

- 1 Ehmann W D, Yates S W. Nuclear and radiochemical analysis (Reviews). Anal Chem, 1988, 60(12): 42R~62R
- 2 Blotcky A J, Hansen G T. Simultaneous determination of selenite and Trimethylselenonium ions in urine by anion exchange chromatography and molecular neutron activation analysis. Anal Chem, 1987, 59: 2 063~2 066
- 3 Stone S F, Hancock D, Zeisler R. Characterization of biological macromolecules by electrophoresis and neutron activation. J Radioanal Nucl Chem, 1987, 112(1): 95~108
- 4 Jayawickreme C K, Chatt A. Determination of protein-bound trace elements in bovine kidneys. I. Neutron activation subcellular fractions. J Radioanal Nucl Chem, 1987, 110(2): 583~593
- 5 刘元方,宿明明,胡建信,等. 放射性示踪法研究结合稀土的四膜虫膜蛋白. 同位素, 1989, 2(4): 193
- 6 钟淑琳, 闵蔚宗. 茶叶中分离出一种稀土-脂多糖. 科学通报, 1994, 39(9): 863
- 7 Guo F Q, Wang Y Q, Sun J X, et al. Study on REE bound proteins in natural plant fern *Dicranopteris dichotoma* by MAA. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles, 1996, 209(1): 91~99
- 8 王玉琦, 孙景信, 陈红民, 等. 中子活化研究稀土矿区植物体中稀土元素分布特征. 中国稀土学报, 1997, 15(2): 160~164
- 9 张惟杰主编. 复合多糖生化技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 209~225
- 10 Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* murill. Agric Biol Chem, 1990, 54(11): 2 889~2 896
- 11 Mizuno T, Inagaki R, Kanao T, et al. Antitumor activity and some properties of water-insoluble heteroglycans from Himematsutake. the fruiting body of *Agaricus blazei* murill. Agric Biol Chem, 1990, 54 (11): 2 897~2 905