

文章编号: 1001-1498(2008)06-0792-05

白蜡虫多糖的提取及单糖组分分析

何钊, 孙龙, 冯颖*, 陈晓鸣

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:采用水提醇沉法对资源昆虫——白蜡虫中水溶性多糖组分进行提取, 测定了提取物的多糖含量、蛋白含量和氨基酸含量; 以 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 为柱前衍生化试剂, 利用毛细管区带电泳 (CZE) 对其多糖的单糖组成及摩尔比率进行分析, 对电泳缓冲液的浓度和 pH 值进行了优化。结果表明: 白蜡虫水溶性多糖的提取率为 2.1%, 多糖含量为 $256 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 蛋白含量为 $242 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 白蜡虫多糖由葡萄糖、甘露糖及半乳糖 3 种单糖组成, 其摩尔比为 1.0: 85.0: 93.0。

关键词: 白蜡虫; 多糖; 毛细管电泳; 单糖; 衍生

中图分类号: S899.1 **文献标识码:** A

The Extraction of Polysaccharide from White Wax Scale and Analysis of Monosaccharide Compositions

HE Zhao, SUN Long, FENG Ying, CHENG Xiaoming

(Research Institute of Resources Insects, CAF, Laboratory of Cultivation and Utilization of Resource Insects,

State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: White Wax Scale (*Ericenus pela* Chavannes) polysaccharide was extracted with water, and precipitated by alcohol. The contents of polysaccharide, protein and amino acids were measured. The capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed to separate and identify the monosaccharide composition of white wax scale polysaccharide. In this method, white wax scale polysaccharide was hydrolyzed into component monosaccharides and subsequently derived with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP), the concentration and pH of buffer were studied and optimized. The results showed extracting ratio of polysaccharide was 2.4%, content of polysaccharide was $256 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, content of protein was $242 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, the polysaccharide consisted of glucose, mannose, galactose with the molar ratio of 1.0: 85.0: 93.0.

Key words: white wax scale, polysaccharide, CZE, monosaccharide, derivation

多糖是广泛存在于自然界的天然高分子化合物, 是生物体内的重要大分子之一, 在自然界广泛分布于高等植物、动物、微生物、藻类、真菌等机体内, 具有增强机体免疫、抗肿瘤、降血糖、抗衰老等多种生物活性, 受到人们的广泛关注, 成为医药和食品领域的研究热点之一^[1]。

目前国内外对植物、真菌来源的多糖研究较多, 如香菇多糖、云芝多糖、猪苓多糖、黄芪多糖、牛膝多糖等, 动物来源多糖中的硫酸软骨素、肝素等几种研究也较为充分, 而对昆虫来源的多糖涉及很少^[2], 目前有报道的昆虫来源多糖主要有: 发现蚕蛹多糖可以增强小鼠的非特异性免疫、细胞免疫及体液免

收稿日期: 2008-06-04

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划重点项目 (2006BAD06B07)、国家林业局引进国外先进农业技术项目 (20064116) 部分研究内容

作者简介: 何钊 (1976—), 男, 浙江义乌人, 助理研究员, 硕士, 从事资源昆虫利用的研究。

* 通讯作者。

疫^[3-4];从虻虫提取的多糖类物质能延长凝血时间,增加纤溶系统活力^[5]。可见对昆虫多糖的研究目前主要集中在生物活性方面,对昆虫多糖提取分离及结构鉴定方面的研究报道较少。白蜡虫(*Ericenusa pella* Chavannes)是我国一种传统资源昆虫,属同翅目(Homoptera)蜡蚧科(Coccidae),其雄虫分泌的白蜡以其优良的性质被广泛应用于机械、化工、轻工、医药、食品、农业等行业,雌成虫繁殖后代,在传统白蜡生产中,雄虫生产白蜡,大量怀卵的雌虫除用于繁殖后代外,未得到充分利用^[6]。目前研究发现白蜡虫雌成虫具有一定的抗突变、免疫调节功能,其中多糖类物质是主要功效成分之一^[7-8]。本实验以白蜡虫雌成虫为研究材料,对白蜡虫中水溶性多糖进行提取,并分析其单糖组成,可为昆虫来源多糖研究提供一定的参考价值,丰富活性多糖的来源,为进一步深化昆虫资源的综合利用,开发昆虫食品或药物奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

白蜡虫采自云南昆明,采于雌成虫产卵后、幼虫还未孵化前的 4 月下旬,样品采回后,水洗净,55 烘干后存冰箱低温保存备用。

仪器: Beckman-Coulter P/ACE MDQ 高效毛细管电泳仪及相应工作站,二极阵列检测器(DAD),50 μm ×58.5 cm 石英毛细管(有效长度 50 cm,河北永年锐沓色谱器件有限公司);日立 835-50 型氨基酸自动分析仪。

实验试剂:衍生化试剂: PMP(美国 Acros 公司);葡萄糖(Glc)(上海生工);阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、鼠李糖(Rha)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)(美国 Acros 公司),其余试剂皆为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 白蜡虫多糖的提取 采用水提醇沉法提取:白蜡虫去杂质、洗净烘干、粉碎,加 8 倍去离子水于 80 ℃ 水浴中提取 4 h,共提取 3 次,合并提取液,减压浓缩至原提取液体积的 1/10;浓缩液中加入 4 倍(v/v)95%乙醇,4 ℃ 下静置 24 h,离心得多糖沉淀,反复 3 次,冷冻干燥。将冻干后样品配制成 1%水溶液,用 Sevag 法(氯仿:正丁醇=4:1)去除游离蛋白,乙醇沉淀后冷冻干燥,得白蜡虫多糖。

1.2.2 白蜡虫多糖含量测定 糖含量测定^[9]:苯酚

-硫酸法测定,以葡萄糖为标样。以葡萄糖浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为:

$$A = 0.0092C - 0.0062 (R^2 = 0.9977).$$

蛋白含量测定^[10]:考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为标样。以蛋白浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程:

$$A = 0.0065C + 0.0659 (R^2 = 0.9926).$$

氨基酸分析^[11]:酸水解样品后采用氨基酸自动分析仪检测。

1.2.3 多糖组分分析 多糖水解:称取白蜡虫多糖 20 mg 置于安瓿瓶中,加入 H_2SO_4 溶液($2 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2 mL,封管,110 ℃ 下水解 6 h,然后用浓 NaOH 中和,0.45 μm 滤膜过滤,定容于 10 mL 容量瓶备用。

衍生物的制备^[12-13]:取 50 μL 单糖标准水溶液($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)或多糖水解样,加入 50 μL NaOH 溶液($0.3 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 60 μL PMP 溶液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲醇溶液),混匀后置于 70 ℃ 水浴中加热反应 30 min,取出室温放置 10 min;再加入 50 μL HCl($0.3 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)中和,加入 0.5 mL 去离子水混匀,然后用 1 mL 氯仿涡旋萃取,离心分层,弃去下层有机相,重复萃取 3 次,得到上层水相,用于 CZE 分析;同时以蒸馏水为空白对照进行衍生、电泳确定空白对照峰。

电泳操作条件优化:对缓冲液 pH 值、浓度进行考察,确定最优电泳条件;电泳温度:25 ℃;工作电压:20 kV,进样方式:0.5 psi 压力进样;进样时间:0.5 s;检测波长:245 nm。

1.3 标准样及样品测定

取衍生后的标准单糖,分别测定各单糖的出峰时间;将 6 种单糖进行混合后进行测定,最后进行白蜡虫多糖中单糖的测定。

2 结果与分析

2.1 白蜡虫多糖提取

采用水提醇沉法提取的白蜡虫多糖为灰白色粉末状固体,其 1%水溶液呈棕黄色,提取率 2.1%,多糖含量 $256 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,蛋白含量 $242 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。氨基酸分析的结果表明多糖中含有常见的 17 种氨基酸,总量为 $180.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (表 1),试验结果表明从白蜡虫雌成虫提取的多糖可能为多糖-蛋白复合物。

表 1 白蜡虫多糖氨基酸分析

氨基酸	含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	氨基酸	含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
ASP 天门冬氨酸	28.9	LE 异亮氨酸	6.1
THR 苏氨酸	8.9	LEU 亮氨酸	8.2
SER 丝氨酸	10.9	TYR 酪氨酸	4.8
GLU 谷氨酸	36.3	PHE 苯丙氨酸	6.8
GLY 甘氨酸	10.4	LYS 赖氨酸	16.4
ALA 丙氨酸	8.3	HIS 组氨酸	2.9
CYS 胱氨酸	5.7	ARG 精氨酸	8.3
VAL 缬氨酸	7.1	PRO 脯氨酸	6.0
MET 蛋氨酸	4.2	氨基酸总量	180.2

2.2 单糖组成分析

2.2.1 单糖衍生物电泳条件的选择 电泳的各种条件,如电压(电流)、电泳温度、经验量、毛细管长度和内径等都对分离有影响,但当上述条件固定后影响单糖分离能力的关键因素主要是缓冲液的 pH 值和浓度,本论文对这 2 个关键因素进行了选择试验。

(1)缓冲液 pH 值:糖能够与硼酸根形成带电络合物,有利于促进分离,络合物的浓度与缓冲液的 pH 值密切相关,对电泳的分离度存在一定的影响,在一定 pH 值范围内,糖的分离度一般与 pH 值成正比, pH 值太高时分离度反而下降^[14-15]。将 6 种单糖衍生物及空白对照分别进样分析,得到各个单糖衍生物的电泳出峰时间,进行峰归属,然后考察 $75 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 硼酸缓冲液在 pH 值 9.5、9.65、9.79、9.93、10.1、10.35、10.8 七种情况下对上述 6 种糖分离度和分离时间的影响。

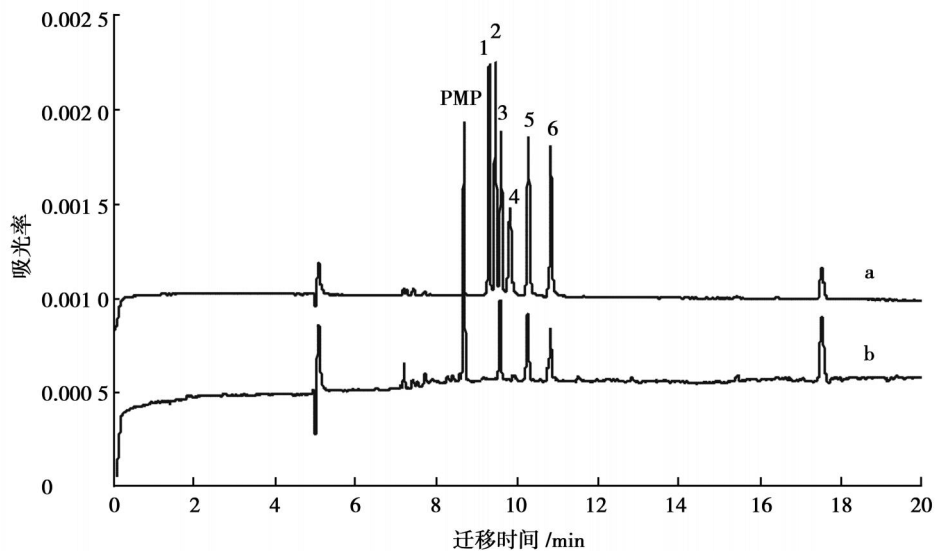
在实验范围内,在 pH 值小于 9.65 时,阿拉伯

糖与葡萄糖衍生物峰迁移时间一致,不能达到分离,随着 pH 值的增加,电流增加,各衍生物的迁移时间都增大,彼此间的分离度也增加。缓冲液在 pH 值 10.35 电泳时各单糖衍生物的峰达到基线分离,虽然更高 pH 值的缓冲液还能增加分离度,但也会带来基线不稳,重复性差等不利因素^[14],故实验选用 pH 值 10.35 的硼酸溶液为缓冲体系分离各单糖衍生物。

(2)缓冲液浓度:缓冲液浓度的变化会引起溶液电导的变化,从而引起峰型的前伸、拖尾,故选择合适的缓冲液浓度对提高分离效果具有重要的作用^[14-16]。将 6 种单糖标准液混合后衍生,考察 pH 值 10.35 时 25 、 50 、 75 、 100 、 200 、 $300 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 硼酸缓冲液对单糖—PMP 衍生物的电泳影响。

结果表明:随着缓冲液浓度增加,各单糖迁移时间随之增加,6 种单糖衍生物的分离度也随之改善。这主要由于缓冲液浓度增加使毛细管双电层电位减少,导致电渗流下降引起^[16]。缓冲液浓度过小不能有效分离 6 种单糖,但浓度增加也会造成电流过大、焦耳热现象显著及分析时间过长等问题^[14]。为缩短分析时间,降低基线噪音,选择硼酸缓冲液浓度为 $75 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 白蜡虫多糖组分分析 (1)多糖样品的单糖种类确定:根据上述优化的电泳分析条件($75 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 硼酸缓冲液、pH 值 10.35、电压 20 kV、25 柱温、检测波长 245 nm),对白蜡虫多糖水解衍生物进行电泳分析,结果如图 1 所示。



a 标准单糖; b 白蜡虫多糖水解物. 1 - 木糖; 2 - 阿拉伯糖; 3 - 葡萄糖; 4 - 鼠李糖; 5 - 甘露糖; 6 - 半乳糖

图 1 单糖与白蜡虫多糖水解衍生物电泳图谱

根据电泳谱图与标准混合单糖谱图进行对照,根据出峰时间的对应关系,确定白蜡虫多糖由葡萄糖、甘露糖及半乳糖组成。

(2)线性关系分析:配置葡萄糖、甘露糖和半乳糖均为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准混合溶液,逐级稀释进行衍生化反应和电泳分析,以对照品单糖衍生物峰面积 Y 与对照品单糖浓度 X 进行线性回归,结果如表 2 所示。在实验浓度范围内,各单糖的浓度与

峰面积具有良好的线性相关性。

(3)白蜡虫多糖的单糖组成和回收率、精密度测定:对多糖的水解液进行衍生、电泳,由电泳结果根据标准曲线计算各单糖间的比率关系,并连续 3 次进样,计算 3 种单糖峰面积的进样精密度 (RSD)。另外在已测定含量的多糖水解液中加入一定量单糖溶液,计算回收率。结果如表 3 所示。

表 2 三种单糖的标准曲线

单糖	标准曲线 ($n=6$)	相关系数 R ($n=6$)	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
葡萄糖	$Y = -50.74 + 34.13X$	0.997 4	10 ~ 110
甘露糖	$Y = 38.61 + 52.55X$	0.996 0	10 ~ 100
半乳糖	$Y = 170.84 + 58.48X$	0.991 6	10 ~ 100

表 3 多糖中单糖组成及回收率、精密度实验

单糖	多糖样品中单糖检测量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入单糖量 / μg	回收率 / %	精密度 (RSD) / % ($n=3$)
葡萄糖	34.6	0.38	99.0	1.94
甘露糖	29.2	0.39	102.1	1.90
半乳糖	32.5	0.41	101.2	2.50

实验表明 3 种单糖的峰面积相对标准偏差 (RSD) 均小于 3%, 此检测方法具有较高的精密度; 葡萄糖、甘露糖及半乳糖的平均回收率分别为 99.0%、102.1%、101.2%, 表明具有较高的准确度; 根据电泳结果及标准曲线计算出白蜡虫多糖中的单糖比率为葡萄糖 甘露糖 半乳糖 = 1 0.85 0.93。

3 结论与讨论

从白蜡虫雌成虫中提取得到多糖为灰白色粉末状固体, 易溶于水, 不溶于有机溶剂, 多糖含量 $256 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 蛋白含量 $242 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 收率为 2.1%。以 BMP 为柱前衍生化试剂, 通过对硼酸电泳缓冲液的 pH 值及浓度的优化, 利用毛细管区带电泳测定白蜡虫多糖为杂多糖, 由葡萄糖、甘露糖及半乳糖 3 种单糖组成, 其摩尔比为 1 0.85 0.93。

目前已从动植物中分离得到各种均多糖、杂多糖, 并研究了一些多糖的活性功能, 对多糖的结构与其活性的关系研究已有一定的进展^[17-18]: 认为糖基组成和糖苷键类型不同, 生物学活性存在较大差异, 香菇多糖是以 (1-3) 葡聚糖主链结构, 具有抗肿瘤作用及提高细胞免疫及体液免疫功能, 而同是葡聚糖主链的淀粉, 其糖苷键为 (1-4) 键型, 却没有生物学活性, 这在一定程度上源于二者主链糖苷键的类型不同^[19]; 支链的长度、取代度和位置对多糖的活性也有一定的影响, 茯苓多糖由于支链过长而不

具有抗肿瘤活性, 需经过控制性氧化水解, 降低支链长度, 才具有活性, 通常认为食用菌活性多糖

(1-3)-D 聚糖, 分支度在 0.2 ~ 0.33 时生物活性较强^[20]; 此外取代基的种类、取代程度及空间结构与多糖的活性关系密切, 实验证明, 硫酸盐阴离子是硫酸化多糖抗病毒必须的离子结构^[21]。呈屈状螺旋的多糖活性较高, 呈可拉伸带状或皱纹型带状的多糖活性一般较低甚至没有活性, 三股螺旋构型是多糖最具活性的空间构像^[22]。现有研究结果表明组成活性多糖的单体、糖苷键等一级结构和高级结构的不同, 决定了活性多糖结构的多样性; 不同生物体来源的多糖结构不尽相同, 来源同一生物体的多糖结构也可能不尽相同^[19]。对不同来源多糖的扩大研究, 有助于加强多糖构效关系进一步认识。

国内外研究较多的多糖主要来源于植物与真菌, 如香菇多糖、云芝多糖、猪苓多糖、黄芪多糖、牛膝多糖等; 动物来源多糖中的硫酸软骨素、肝素等几种研究也较为充分, 对以上来源多糖的糖链结构等方面的分析研究方法相对较为充分^[11,18]。而对来源于昆虫的多糖研究较少, 昆虫来源多糖在结构上研究更少, 对其单糖组成、糖链连接等结构方面的研究更是不多, 本文通过毛细管电泳分析了白蜡虫多糖的组成, 其结果可对其它昆虫资源中多糖类物质的组分分析提供有益的参考。

参考文献:

- [1] 张高红, 郑永唐. 多糖化合物抗 HM 活性及应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 6 - 10
- [2] 方积年, 丁侃. 天然药物—多糖的主要生物活性及分离纯化方法 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 338 - 347
- [3] 孙龙, 冯颖, 何钊, 等. 蚕蛹多糖的碱液提取及免疫活性初步研究 [J]. 林业科学研究, 2007, 20(6): 782 - 786
- [4] 黄林清, 周世文, 张诗平, 等. 蚕蛹多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 解放军药学学报, 2002, 18(1): 11 - 13
- [5] 金伟, 王亚威. 虻虫抗凝血物质的药理研究 [J]. 中医药学报, 2000, 28(3): 58 - 60
- [6] 甘瑾, 冯颖, 陈晓鸣. 白蜡虫卵蛋白酶解工艺的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(5): 659 - 662
- [7] 冯颖, 陈晓鸣, 马艳, 等. 白蜡虫免疫调节作用试验研究 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(2): 221 - 224
- [8] 冯颖, 陈晓鸣, 何钊. 白蜡虫抗突变实验与主要功效成分分析 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(3): 284 - 288
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1994
- [10] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验 [M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2003
- [11] GB/T 5009.124-2003, 食品中氨基酸的测定 [S]
- [12] Susumu Honda, Shigeo Suzuki, Atsushi Taga. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 30: 1689 - 1714
- [13] Yang Xingbin, Zhao Yang, Wang Qingwei, *et al*. Analysis of the Monosaccharide Components in *Angelica* Polysaccharides by High Performance Liquid Chromatography [J]. Analytical Sciences, 2005, 21(10): 1177 - 1180
- [14] 赵燕, 杨兴斌, 李晓晔, 等. 中药大黄多糖中单糖组成的毛细管区带电泳分析 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(4): 323 - 326
- [15] 陈义. 毛细管电泳技术及应用 [M]. 第二版. 北京: 化工出版社, 2006
- [16] 盛筱, 丁晨旭, 刘凌君, 等. 糖类衍生物在毛细管区带电泳下的分离研究 [J]. 分析化学, 2008, 36(1): 280 - 284
- [17] 毛跟年, 许牡丹. 功能食品生理特性与检测技术 [M]. 北京: 化工出版社, 2005: 33 - 56
- [18] 高小荣, 刘培勋. 多糖构效关系研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 229 - 231
- [19] Ishibashi Ken-ichi, Miura Noriko N, Adachi Yoshiyuki, *et al*. Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3- β -D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages in vitro [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(9): 1993 - 2000
- [20] 杜巍, 李元瑞, 袁静. 食用菌多糖生物活性与结构的关系 [J]. 食用菌, 2001(2): 3 - 5
- [21] 方唯硕, 刘相. 具有抗 HM 活性的天然产物 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1993, 8(2): 61 - 69
- [22] Saito H, Yoshioka Y, Aketagawa N U J, *et al*. Relationship between conformation and biological response for (1-3)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amoebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant [J]. Carbohydrate Research, 1991, 217: 181 - 190