

海螵蛸多糖的提取分离及活性组分 CPS-1 的纯化

魏江洲¹, 张建鹏¹, 刘军华¹, 王顺春², 冯伟华^{1*}, 焦炳华^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

[摘要] **目的:**从海洋中草药海螵蛸(乌贼骨)中提取分离得到多糖活性物质。对粗多糖中主要的活性组分 CPS-1 进行纯化, 得到成分相对均一的天然活性多糖。 **方法:**用热水抽提法提取海螵蛸多糖粗品, 并对提取工艺进行正交设计, 优化提取方法。对粗品组分进行总糖量测定。用 DEAE-Sepharose F. F 柱及 Sepharose CL-6B 柱对海螵蛸多糖粗品进行分离。通过活性检测实验确定活性部分。最后使用 Sephacryl S-300 柱进一步纯化。用 HPLC 来检测精品多糖的纯度。标准曲线法测定相对分子质量。 **结果:**成功得到海螵蛸粗多糖。经过离子交换柱 DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Sepharose CL-6B 柱及分子筛 Sephacryl S-300 柱的进一步分离纯化和活性跟踪, 最后得到相对均一的活性精品多糖 CPS-1, 其含糖量达 93.6%, 相对分子质量为 1×10^6 。 **结论:**不同的提取条件影响海螵蛸多糖的得率。不同性质的分离材料能够将相对分子质量及电荷有差异的多糖分离, 达到分离的目的。精品多糖 CPS-1 是从海洋中草药海螵蛸中得到的均一多糖组分。

[关键词] 海螵蛸; 多糖类; 分离和提纯; CPS-1

[中图分类号] R 282.77 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0017-05

Extraction of Cuttlebone polysaccharides and purification of their active component CPS-1

WEI Jiang-zhou¹, ZHANG Jian-peng¹, LIU Jun-hua¹, WANG Shun-chun², FENG Wei-hua^{1*}, JIAO Bing-hua^{1*} (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of T. C. M, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

[ABSTRACT] **Objective:** To extract the active polysaccharides from traditional Chinese herb-cuttlebone and to purify cuttlebone polysacchride salts 1(CPS-1), an active component of crude polysaccharides, so as to obtain refined natural active polysaccharides. **Methods:** Hot-water extraction method was optimized by orthogonal designing and was used to extract crude polysaccharides from cuttlebone. The total sugar contents of crude polysaccharides were determined. DEAE Sepharose F. F column and Sepharose CL-6B column were applied to separate CPS-1 from the crude polysaccharides. The active components were determined by animal experiments and Sephacryl S-300 column was used for further purification of CPS-1. HPLC was used to determine the purity of refined CPS-1 and the molecular weight of CPS-1 was determined by polysaccharides standard curve. **Results:** Crude polysaccharides were successfully extracted from cuttlebone. After purification with DEAE Sepharose F. F column, Sepharose CL-6B column and Sephacryl S-300 column and activity study, refined CPS-1 with average molecular weight (1×10^6) was obtained, and the sugar content reached 93.6%. **Conclusion:** Different extraction conditions have different extraction results for crude polysaccharides and different separation materials can separate the mixed polysaccharides by their molecular weights or charge characteristics. CPS-1 is a natural active polysaccharide extracted from cuttlebone.

[KEY WORDS] cuttlebone; polysaccharides; isolation and purification; CPS-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1):17-21]

海螵蛸(*Endoconcha Sepiae*), 又名乌贼骨, 是海洋动物无针乌贼(*Sepiella maindroni de Rechel-brune*)、金乌贼(*Sepia esculenta Hoyle*)的干燥内壳^[1], 为传统中药材。其性咸、涩、温, 有收敛止血、涩精止带、制酸、敛疮等作用。乌贼骨在临床多用于治疗各种溃疡, 具有很好的疗效。它本身作为食品加工行业的废料, 少数回收作为中药材, 大部分都没有得到很好的利用。

到目前为止, 对海洋生物多糖的研究主要集中于藻类多糖^[2], 对于来源于动物体软组织的中草药活性多糖的研究还未见报道。本文对从海螵蛸中提取分离的多糖活性成分 CPS-1 的纯化进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂、仪器 海螵蛸购于浙江舟山, 经浙江海洋学院海洋生物教研室赵盛龙教授鉴定为曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)的骨状内壳, 干品经

[基金项目] 国家高技术研究发展计划/863 计划(2004AA2Z3C30); 浙江省科技计划项目(2005ZJKJH2202)。Supported by National High-tech R&D Program/863 Program(2004AA2Z3C30) and Zhejiang Science and Technology Research Program(2005ZJKJH2202)。

[作者简介] 魏江洲, 硕士。E-mail: smmufalcon@126.com

* Corresponding author. E-mail: fwh402@163.com; Jiaobh@uninet.com.cn

过粉碎。苯酚、硫酸、氯仿、乙醇(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司)。硼氢化钠(NaBH₄)、二甲亚砜(DMSO)、葡萄糖及 Dextran 系列葡聚糖标准品(Sigma 公司)。H-S 电热恒温水浴锅(江苏东台电器厂)。旋转蒸发仪 BÜCHI 011 型(瑞士 BÜCHI 公司)。冷冻干燥机 BECKMAN CUOLTER J-251 型高速离心机(BECKMAN CUOLTER 公司)。DEAE Sepharose F.F 填料, Sephacryl S-300 填料, Sepharose CL-6B 填料, 自动部分收集仪(Pharmacia Biotech 公司)。高效液相 HP1100(Agilent 公司)。KS-804、KS-805 柱(Agilent 公司)。

1.2 海螵蛸粗多糖的提取分离及分离条件优化

1.2.1 热水法分离提取粗多糖 取经过粉碎的乌

贼骨粉 5 kg,加水 20 L 煮 8 h,趁热纱布过滤,残渣重复提取 2 次,合并 3 次水提液,浓缩至 10 L,8 000 r/min 离心 10 min。上清液用 Sevege 法^[3]除蛋白 3 次。除蛋白浓缩液中加入 2 倍乙醇醇沉过夜。离心,收集沉淀,复溶于蒸馏水,再离心,弃去不溶物,上清第二次醇沉,所得沉淀用蒸馏水溶解,用流水透析 48 h。透析液冷冻干燥^[4]。得到海螵蛸多糖粗品 10 g。

1.2.2 提取条件的优化 影响多糖提取的主要因素有粉碎时间、提取时间、提取温度和溶剂体积。在单因素实验的基础上,针对这些因素采用正交法确定提取条件。根据因素位极表(表 1),分 9 组实验。每组实验取海螵蛸粉末 50 g 提取粗多糖。

表 1 海螵蛸粗多糖的提取条件对糖含量的影响表

Tab 1 Influence of extraction condition for cuttlebone crude polysaccharide on sugar contents

No.	Grinding time (t/min)	Extract time (t/h)	Extract temperature (T/°C)	Solvent volume (V/ml)	Sugar content (%)	Protein content (%)
1	A ₁ (3)	B ₁ (8)	C ₁ (60)	D ₁ (200)	77.45	4.2
2	A ₁	B ₂ (12)	C ₂ (70)	D ₂ (400)	60.55	3.7
3	A ₁	B ₃ (16)	C ₃ (80)	D ₃ (600)	75.31	4.7
4	A ₂ (5)	B ₁	C ₂	D ₃	75.24	5.4
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	83.20	5.6
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	64.67	4.3
7	A ₃ (7)	B ₁	C ₃	D ₂	83.69	6.6
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	86.27	2.4
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	89.03	5.9
Sugar content	R1	190	207	202	218	
	R2	196	200	199	185	
	R3	225	204	210	208	
	R	12	2	4	11	
Protein content	R1	13	16	11	16	
	R2	15	12	15	15	
	R3	15	15	17	13	
	R	1	2	2	1	

1.3 海螵蛸粗多糖的纯化

1.3.1 第一次离子交换柱层析 取海螵蛸多糖粗品 1 g,加入蒸馏水 5 ml 溶解,80°C 水浴加热溶解 30 min,离心,不溶物再加入蒸馏水 5 ml,80°C 水浴加热溶解 30 min。合并两次上清,上 DEAE Sepharose F.F 柱,依次用蒸馏水、0.5 mol/L 氯化钠溶液洗脱,自动部分收集仪收集,苯酚硫酸法检测洗脱液中多糖含量,绘制洗脱曲线,根据洗脱曲线收集各多糖部位。将收集液浓缩,流水透析 48h,冷冻干燥。

1.3.2 分子筛柱层析 分别将水洗部分、盐洗部分分别溶于蒸馏水,再上样于 Sephacryl S-300 分子筛柱,蒸馏水洗脱。自动部分收集仪收集,苯酚硫酸法检测洗脱液中多糖含量,绘制洗脱曲线,根据洗脱

曲线收集各多糖部位。

1.3.3 第二次离子交换柱层析 盐洗部分经过 Sephacryl S-300,还不是非常均一,继续上 Sepharose CL-6B 柱,自动部分收集仪收集,苯酚硫酸法检测洗脱液中多糖含量,绘制洗脱曲线,根据洗脱曲线收集各多糖部位。干燥所得精品多糖。

1.4 CPS-1 含糖量的测定 用分光光度法测定含糖量。先用标准葡萄糖配置不同浓度的溶液,在用苯酚硫酸比色法来绘制标准曲线。

1.5 CPS-1 的纯度及 CPW-2 和 CPS-1 的相对分子质量测定 用 HPLC 法来测定 CPS-1 的纯度及计算大概相对分子质量。将 CPS-1 和 Dextran T 系列标准相对分子质量葡聚糖配制成 2 mg/ml 溶液,0.45 μm 针式微孔滤膜过滤,备用。将各种标准多

糖和多糖溶液依次进样, 测定保留时间。高效液相色谱条件: KS-805, KS-804 串联柱; 流动相: 水; VWD 检测器检测波长为 254 nm; 示差检测器 (RID) 检测池温度: 40℃; 分析时间: 50 min; 进样量: 25 μl ^[5]。

2 结果

2.1 海螵蛸粗多糖的提取分离及分离条件优化

正交实验结果见表 1。根据极差结果进行直观统计分析, 影响含糖量的因素大小分别为 $A > D > C > B$, 即粉碎时间和溶剂体积的影响作用较大。由实验结

果确定多糖的最佳提取条件为粉碎 5 min, 每 50 g 海螵蛸粉末加 200 ml 蒸馏水, 80℃ 提取 6 h。另外, 若根据得率进行分析, 最终也得到上述最优提取条件。按上述条件提取多糖, 得率为 2‰。

2.2 海螵蛸粗多糖的纯化 海螵蛸粗多糖经过 DEAE Sepharose F. F 柱后, 得到水洗部分和盐洗部分。洗脱曲线如图 1。水洗部分经过 Sephacryl S-300 后进一步纯化, 流出组分的 HPLC 洗脱曲线见图 2。通过图 2 洗脱曲线, 我们可以看出, 水洗部分经过 Sephacryl S-300 柱层析后, 可以收集到 2 个峰, 分别为 CPW-1 和 CPW-2。

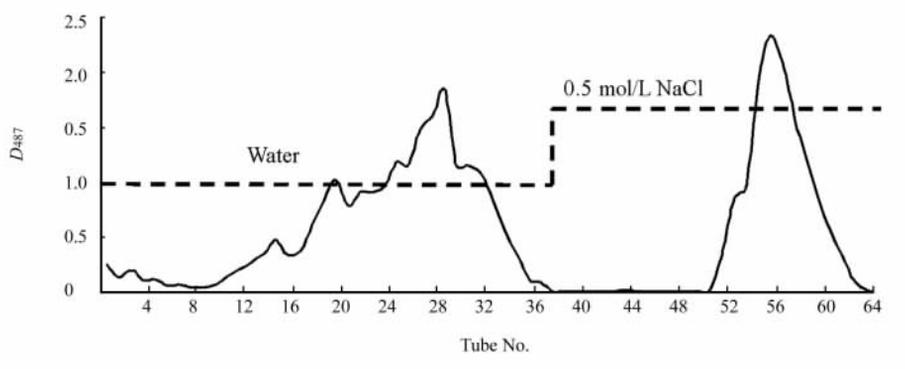


图 1 海螵蛸粗多糖经 DEAE Sepharose F. F 凝胶柱的洗脱曲线

Fig 1 Crude cuttlebone polysaccharide elution curve by DEAE Sepharose F. F

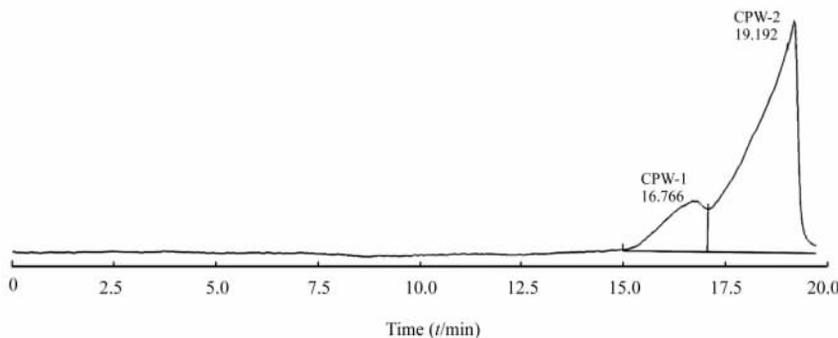


图 2 水洗部分经 Sephacryl S-300 流出组分的 HPLC 洗脱曲线

Fig 2 HPLC elution curve of outflow of water-eluted components with Sephacryl S-300 column elution

建立实验动物模型进行活性跟踪, 发现水洗部分中 CPW-1 的生物学活性不是非常显著。因此将其中含量较高的 CPW-2 再次经过 Sephacryl S-300 纯化, 进行纯度和相对分子质量的确定。

盐洗部分经过 Sephacryl S-300 进一步进行纯化。流出组分的 HPLC 洗脱曲线见图 3。盐洗部分经过 Sephacryl S-300 柱层析后, 可以收集到 3 个峰, 分别为 CPS-1、CPS-2 和 CPS-3。同时, 建立实验

动物模型进行活性跟踪, 发现盐洗脱部分中 CPS-1 的生物学活性比较最强, 因此将盐洗脱部分进一步进行纯化。

将盐洗部分经 Sephacryl S-300 流出组分浓缩后上 Sepharose CL-6B 柱, 得到 2 个峰, 将其保留时间与图 3 对照, 可以看出 2 个峰就是 CPS-1 和 CPS-2。盐洗部分经 Sephacryl S-300 后再经 Sepharose CL-6B 流出组分的 HPLC 洗脱曲线见图 4。将 2 个

峰分别收集,浓缩,再次上 Sepharose CL-6B 柱层析,可得到 CPS-1 精品多糖。

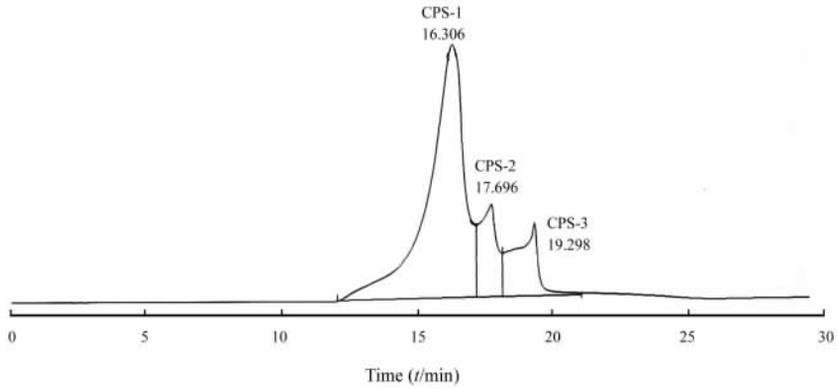


图 3 盐洗部分经 Sephacryl S-300 流出组分的 HPLC 洗脱曲线

Fig 3 HPLC elution curve of outflow of salt-eluted components with Sephacryl S-300 column

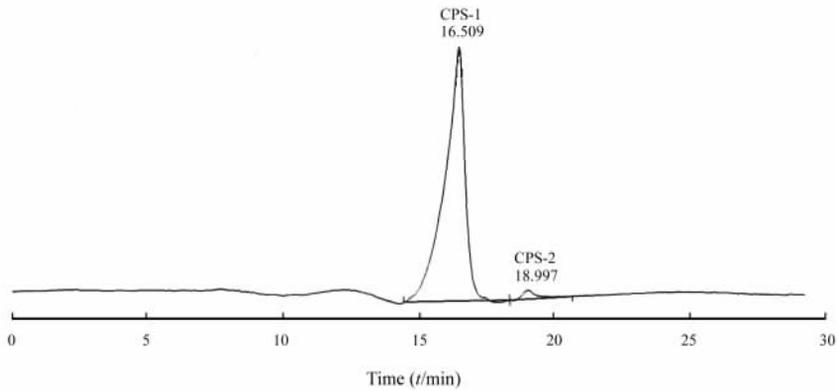


图 4 盐洗部分经 Sephacryl S-300 后再经 Sepharose CL-6B 流出组分的 HPLC 洗脱曲线

Fig 4 HPLC elution curve of outflow of salt-eluted components with Sephacryl S-300 column and Sepharose CL-6B column

2.3 精品多糖 CPS-1 含糖量测定、纯度检测及相对分子质量确定 利用葡萄糖标准曲线法计算出 CPS-1 的含糖量高达 93.6%。将所得均一多糖 CPS-1 进行 HPLC 层析,检测结果为单一对称峰。由于该多糖经过离子交换型凝胶和分子排阻型凝胶两种柱层析纯化所得,HPLC 检测为单一对称峰,因此认为该多糖为均一组分。见图 5。以 Dextran T 系列葡聚糖为对照,根据其洗脱体积计算得到 CPS-1 和 CPW-2 的相对分子质量分别为 1×10^6 和 1.1×10^5 。

3 讨论

本文对影响海螵蛸粗多糖提取的 4 个影响因素(粉碎时间,提取时间,提取温度,溶剂体积)用正交

设计的方法进行了优化,选出最适合提取的条件,从而保证了较高的多糖得率。

在分离纯化过程中,因为海螵蛸粗多糖中含有大量的色素,为深棕色的固体,所以我们选用 DEAE Sepharose F.F 凝胶柱对其进行初步的分离。该柱填料为弱阴离子交换纤维素,具有开放的长链骨架,多糖分子能自由进入和扩散,也有较大的表面积。纤维素具有亲水性,可使多糖分子在吸附和洗脱过程中不致变性而失活。而且该树脂对色素有很好的吸附作用,通过选择洗脱条件可以将多糖分子与色素分离开来。使用水和盐不同的梯度洗脱也能够达到很好的分离效果。对经过 DEAE 柱得到的流出组分进行进一步纯化时,还应当考虑其相对分子质量分布范围,从而选择合适分离范围的不同填料。

根据 HPLC 洗脱曲线的保留时间,大概算出相对分子质量范围,然后选择了 Sephacryl S-300 分子筛柱填料和同样为阴离子交换树脂的 Sepharose CL-6B

柱填料对混合多糖进行了彻底而且有效的分离纯化,最终得到了均一的海螵蛸多糖精品 CPS-1。

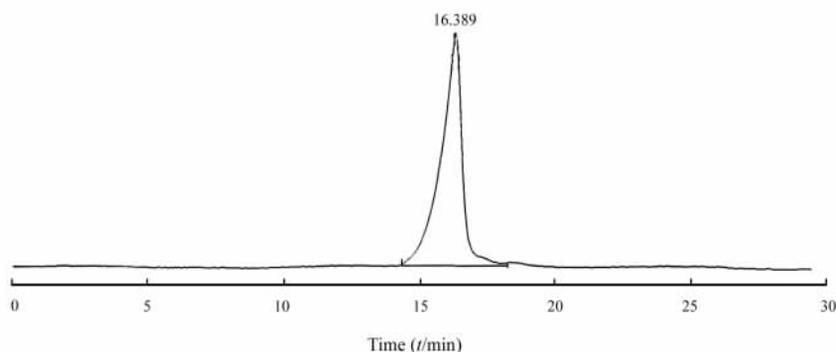


图5 海螵蛸多糖 CPS-1 的 HPLC 洗脱曲线

Fig 5 HPLC elution curve of cuttlebone polysaccharide CPS-1

在整个分离过程中,通过快速溃疡模型的动物实验^[6~8],对每个分离组分都进行了活性跟踪。这样可以使分离纯化更具有目的性,节省实验时间和实验材料。在整个活性跟踪实验中,CPS-1 表现出了最强的生物学活性,因此我们还将通过光谱与色谱结合的分析方法对纯品 CPS-1 进行结构确定,从而从结构上阐明其抗溃疡生物学活性的分子作用机制^[9~11]。

本实验为国内外首次从海螵蛸中提取分离得到海螵蛸粗多糖,并对其中的活性组分进行了进一步的纯化,得到精品多糖 CPS-1。在提取过程中,对分离条件进行了优化,同时进行了纯度、含糖量及相对分子质量的测定,完善了海洋中草药活性多糖分离纯化的技术平台。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京:化学工业出版社,2005. 207.
[2] Varki A. Essentials of glycobiology[M]. Oxford: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999. 35-38.

[3] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州:浙江大学出版社, 1994. 57-59.
[4] 姚滢,魏江洲,王俊,等. 厚壳贻贝多糖的提取和免疫学活性研究[J]. 第二军医大学学报,2005,26:896-899.
[5] 魏远安,方积年. 高效凝胶渗透法测定多糖纯度和分子量[J]. 药学学报,1989,24:532-535.
[6] 田朝阳,李雪霜. 乌贼骨的新用浅析[J]. 中医药信息,2001,18: 25.
[7] 赵云涛,李琨,黄燕,等. 海螵蛸入药部分和废弃部分 8 种无机元素分析[J]. 微量元素与健康研究,2003,20:26-27.
[8] 王琪琳,王海仁. 海洋生物多糖药用功能的新进展[J]. 生物学通报,2002,37:12-13.
[9] 方尔笠,顾洛,田苏平. 海螵蛸防治胃溃疡的机理探讨[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14:101-103.
[10] Ker YB,Chen KC,Chyau CC,et al. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia[J]. J Agric Food Chem, 2005,53:7052-7058.
[11] Sun Y,Tang J,Gu X,et al. Water-soluble polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: preparation, characterization and bioactivity[J]. Int J Biol Macromol,2005,36:283-289.

[收稿日期] 2005-09-22

[修回日期] 2005-12-13

[本文编辑] 尹茶