

# 荞麦蜂花粉的氧化应激防护及其活性成分分析

卢静<sup>1</sup>, 王丽<sup>2</sup>, 左丽丽<sup>1</sup>, 赵现明<sup>1</sup>, 王振宇<sup>1,3,\*</sup>

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090;

2. 国家知识产权局专利局专利审查协作江苏中心, 江苏苏州 215011;

3. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 本文研究了荞麦蜂花粉的醇提取物和水提取物, 测定了其体外抗氧化能力及其对骨髓干细胞增殖的促进能力, 据此筛选出功能性更强的荞麦蜂花粉水提取物, 研究其对骨髓干细胞的辐射防护作用, 并测定了其氨基酸和多糖的组成。结果表明: 荞麦蜂花粉水提取物及醇提取物均具有一定的抗氧化能力, 且呈剂量依赖关系。荞麦蜂花粉水提取物对骨髓干细胞促增殖活性最高可达 74.74%, 其促进作用显著高于醇提取物。荞麦蜂花粉水提取物主要成分为糖及蛋白质, 其富含多种氨基酸, 其中谷氨酸含量最高, 其次为天冬氨酸、赖氨酸、苏氨酸及丝氨酸。荞麦蜂花粉水提取物的单糖组成主要为核糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖, 其物质的量比为 0.35:0.95:27.78:0.93:1.70:13.19:16.16。

**关键词:** 荞麦蜂花粉, 骨髓间充质干细胞, 增殖, 抗氧化, 辐射防护

## Protective effect of buckwheat bee pollen on oxidative stresses and their component analysis

LU Jing<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, ZUO Li-li<sup>1</sup>, ZHAO Xian-ming<sup>1</sup>, WANG Zhen-yu<sup>1,3,\*</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. Jiangsu Patent Examination Cooperation Center of State Intellectual Property Office, Suzhou 215011, China;

3. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The present study was to investigate buckwheat bee pollen in terms of its antioxidant capacities and its ability to promote the proliferation of bone marrow stem cells. The water extract of buckwheat bee pollen (WEBBP) performed better than its ethanol extract in radical scavenging and stem cell pro-proliferation. Afterwards the protective effect of WEBBP on irradiated bone marrow stem cells were studied and its components were determined. The results showed that both water and alcohol extracts of buckwheat bee pollen showed dose-dependent antioxidant abilities. WEBBP demonstrated a better capacity in promoting stem cell proliferation (74.74%) than its alcohol extract. The main components of WEBBP were carbohydrate and protein. In addition, it had varieties of amino acids, with glutamate being the highest in content, followed by aspartate, lysine, threonine and serine. The monosaccharide components of WEBBP's carbohydrates were measured. They concluded ribose, rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose, with a molar ratio of 0.35:0.95:27.78:0.93:1.70:13.19:16.16.

**Key words:** buckwheat bee pollen; bone marrow stem cells; proliferation; antioxidant; radio-protective

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)03-0130-06

花粉作为植物的雄性生殖细胞, 在植物的生命过程中具有重要作用, 被赋予“植物生命之源”的称号。花粉含有植物发育所需要的全部营养物质, 是很好的药食同源食品。蜂花粉是蜜蜂采蜜带回的花粉团, 其生理活性功能在近年来得到了广泛深入的研究。现已有很多关于蜂花粉的免疫活性、抗菌、抗肿瘤和促进淋巴细胞增殖活性等研究, 使其在食品、

药品、化妆品等领域得到了广泛的应用。

蜂花粉含有丰富的多酚、黄酮、多糖、不饱和脂肪酸等生物活性物质, 这些活性物质使蜂花粉具有多种活性功能。Leja M 等人的研究发现, 蜂花粉多具有较强的抗氧化活性, 且其抗氧化能力与多酚含量成正相关<sup>[1]</sup>。Li F 等人指出山楂蜂花粉中含有一种水溶性多糖, 具有良好的免疫增强功能<sup>[2]</sup>。Medeiros K 等人研究发现蜂花粉具有良好的抗过敏功能, 且指出黄酮类物质是主要的抗过敏活性物质<sup>[3]</sup>。

近年来, 我国有学者对荞麦蜂花粉的活性物质

收稿日期: 2013-06-13 \* 通讯联系人

作者简介: 卢静(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物分离工程与极端环境营养学。

进行了纯化和测定,并对其黄酮、多糖及多肽等活性成分的生理活性功能进行了一定程度的研究,指出其具有一定的抗氧化活性,但未见关于荞麦蜂花粉氧化应激防护的系统报道,而国外也尚无荞麦蜂花粉的详细报道。本文比较了荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物的体外抗氧化能力以及促骨髓干细胞增殖的能力,并研究了荞麦蜂花粉水提取物的氧化损伤防护作用,测定了其营养活性物质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

荞麦蜂花粉 市售级别,购于哈尔滨松霖园艺有限公司;福林酚、ABTS、Trolox 购于 sigma 公司;其他无机试剂均为分析纯 购于天津市科密化学试剂制造有限公司;胎牛血清和  $\alpha$ -MEM 培养基生物纯,购于 HyClone 公司。

Model 550 酶标仪 美国 Bio-Rad 公司;HEPACCLASS100 CO<sub>2</sub> 培养箱 美国 Thermo 公司;LC1200 液相色谱分析仪 美国 Agilent 公司;7890A 气象色谱分析仪 美国 Agilent 公司;L-8800 全自动氨基酸分析仪 日本日立公司;其他仪器设备均系国产。

### 1.2 实验方法

1.2.1 荞麦蜂花粉提取物的制备 荞麦蜂花粉提取物的制备参考 LEBLANC B 的方法,稍作改动。将蜂花粉于 40℃ 下烘干,粉碎过 40 目筛。取 5g 蜂花粉,分别用 100mL 去离子水和 70% 乙醇进行提取。首先于 4℃ 下磁力搅拌提 5h,然后采用超声辅助提取 90min,每隔 30min 震荡一次,然后放入 4℃ 冰箱过夜。取出后 3000r/min 离心 10min,取上清定容至 100mL。活性物质含量的测定和抗氧化实验测定均在提取物制备 7d 内完成<sup>[4]</sup>。

1.2.2 花粉提取物体外抗氧化活性的测定

1.2.2.1 清除 ABTS 自由基能力 ABTS 母液及工作液的配制参照 FAN<sup>[5]</sup> 等给出的方法,在 734nm 下,将 ABTS 母液稀释至  $A_0 = 0.700 \sim 0.720$ ,然后取 0.1mL 稀释的样品与 ABTS 工作液 1.4mL 混匀后,暗处反应 6min,在 734nm 下测定不同梯度样品的吸光度  $A$ 。Trolox 作为阳性对照。

$$\text{清除能力}(\%) = (1 - A/A_0) \times 100$$

1.2.2.2 清除羟基自由基能力 在测定管中依次加入 0.5mL 不同浓度的样品,1mL 水杨酸(9mmol/L, 50% 的乙醇作溶剂),1mL 硫酸亚铁(9mmol/L),最后加入 1mL 双氧水(8.8mmol/L)启动反应,在 37℃ 下反应 30min,于 510nm 下测定吸光度  $A$ ,空白管中不加样品测定吸光度  $A_0$ ,对照管中不加双氧水测定吸光度  $A_0$ 。抗坏血酸为阳性对照<sup>[6]</sup>。

$$\text{清除能力}(\%) = (1 - (A - A_0)/A_0) \times 100$$

1.2.3 荞麦蜂花粉提取物促骨髓干细胞增殖活性研究

1.2.3.1 骨髓干细胞的提取 取 150~180g 的 SD 大鼠股骨,用新鲜培养液冲洗(含 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM)骨髓,收集到 10mL 离心管中 1000r/min 离心 10min 后弃上清,加入 3mL 培养液重悬细胞,然后

移入培养瓶培养 24h 半量换液,48h 后全量换液<sup>[7-8]</sup>。待细胞融合度达到 80%~90% 后,用胰酶消化,传代培养。

1.2.3.2 骨髓干细胞增殖实验 用胰酶消化细胞,准确计数,铺到 96 孔板中(100 $\mu$ L/孔),经 72h 后,更换培养液并加入 5 $\mu$ L 不同浓度的蜂花粉提取物,培养 72h 后,用 MTT 的方法,在 490nm 下测定吸光度<sup>[9-10]</sup>。

1.2.4 辐射对骨髓干细胞的氧化损伤研究 骨髓干细胞铺于 96 孔板中,<sup>60</sup>Co  $\gamma$ -射线辐射(8Gy),在辐射前 24h 加入 20% 不同浓度(低、中、高剂量浓度分别是 0.5、0.75、和 1mg/mL)的蜂花粉提取物,辐射后培养 24h 后,用 MTT 法,在 490nm 下测定吸光度,计算细胞的存活率。正常组为未辐射未加药骨髓干细胞,模型组为辐射但未加药骨髓干细胞。

1.2.5 荞麦蜂花粉水提取物主要成分含量分析

1.2.5.1 总多酚含量测定 参考 Fan Ziluan<sup>[5]</sup> 的方法测定总多酚含量,并稍作修改。以没食子酸配制标准溶液,制作标准曲线。

1.2.5.2 总黄酮含量测定 参照 FAN Ziluan<sup>[5]</sup> 的方法测定总黄酮含量,并稍作修改。以儿茶素配制标准溶液,制作标准曲线。

1.2.5.3 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定蜂花粉提取物中蛋白质含量。

1.2.5.4 总糖含量测定 总糖含量的测定参照杨晓萍等<sup>[11]</sup> 提供的方法,即蒽酮-硫酸法。以 D-葡萄糖为标准品,绘制总糖的标准曲线。

1.2.5.5 氨基酸组成分析 用日立 L-8800 型氨基酸分析仪,根据张华<sup>[12]</sup> 等人的方法测定荞麦蜂花粉水提取物中氨基酸含量。

1.2.5.6 单糖组成分析

a.单糖的水解 采用三氟乙酸将多糖分解为单糖。用 5mL 2.0mol/mL 的三氟乙酸(TFA)将 30.0mg 荞麦蜂花粉水提取物完全溶解,封管并于 110℃ 水解 4h。待水解液冷却至室温,50℃ 减压蒸干,加入 5mL 甲醇溶解,用氮气吹干,重复溶解吹干 4~5 次,以完全除去 TFA。

b.单糖乙酰化 糖类物质本身没有足够的挥发性,本实验将单糖衍生为具有挥发性的糖醇乙酸酯,以进行气相色谱分析。将单糖溶液或混标液用 4mL 去离子水溶解,加入 40mg 硼氢化钠还原 3h,每 30min 震荡一次。向反应液中加入适量乙酸以除去多余的硼氢化钠。50℃ 减压蒸干,加入 5mL 甲醇溶解,用氮气吹干,重复溶解吹干 4~5 次,以除去硼酸。110℃ 烘干 20min 以除去水分。加入 6mL 乙酸酐和 2mL 吡啶,100℃ 反应 3~5h,沉淀完全溶解后,80℃ 减压蒸干,加入 5mL 氯仿溶解。用等体积的去离子水洗涤 2~3 次,除去多余的乙酸酐和其他离子,最后加入无水硫酸钠除水后,过滤上机。

c.单糖混和标准工作液的配制 准确称量 7 种标准单糖(D-核糖,L-鼠李糖,L-阿拉伯糖,D-木糖,D-甘露糖,D-葡萄糖,D-半乳糖)各 0.1000g,用去离子水定容至 100mL。分别移取单糖混合标准储备液 0.25、0.50、2.50、5.0、10.0mL 置于 10mL 棕色容

量瓶中,用去离子水定容,得到浓度为 0.025、0.050、0.250、0.500、1.000mg/mL 的标准工作液。

d.GC-MS 分析 气相色谱条件:色谱柱为 DB-5 弹性石英毛细管柱(60m × 0.25mm × 0.25 $\mu$ m),程序升温条件为初温 200 $^{\circ}$ C,以 25 $^{\circ}$ C/min 升至 250 $^{\circ}$ C,保持 10min,载气为 He,进样量为 1 $\mu$ L,流速为 1.0mL/min。进样口温度 250 $^{\circ}$ C,分流比 1:10。

质谱条件:电子轰击源 EI,电子能量 70eV,倍增器电压 350v,接口温度 250 $^{\circ}$ C,离子源温度 150 $^{\circ}$ C,四级杆温度:230 $^{\circ}$ C,质量数扫描范围 35~450amu,用 NIST02 质谱库检索加以确认。

1.2.6 数据分析 实验数据采用平均值  $\pm$  标准差的形式呈现,文中图表采用 origin8.5 绘制,统计检验采用 SPSS19.0 软件,差异性分析采用 one-way ANOVA 方法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荞麦蜂花粉提取物体外抗氧化活性

根据荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物体外清除 ABTS 和羟基自由基能力比较其抗氧化活性。

2.1.1 荞麦蜂花粉提取物清除 ABTS 自由基活性 荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物清除 ABTS 自由基的能力如图 1 所示。二者都具有一定的清除 ABTS 自由基的能力,且其清除活性随浓度的增加而增强。荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物清除 ABTS 自由基活性的  $EC_{50}$  值(清除率达到 50% 时,提取物的浓度)分别为 13.68 和 12.32mg/mL。可见,水提取物清除 ABTS 自由基的能力高于醇提取物,但二者之间并无显著性差异( $p > 0.05$ ),不过二者均高于阳性对照 Trolox( $EC_{50}$  值为 108.47mg/mL,图 2)。

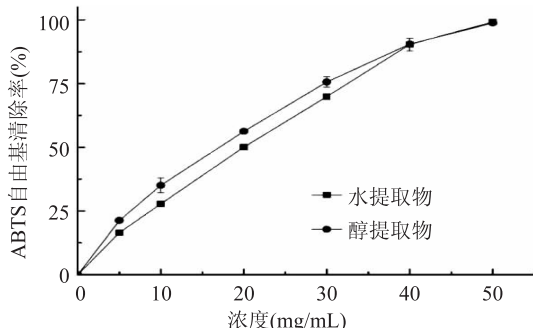


图 1 荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物清除 ABTS 自由基比较

Fig.1 ABTS scavenging capacities of water and ethanol extracts of buckwheat bee pollen

2.1.2 荞麦蜂花粉提取物清除羟自由基活性 荞麦蜂花粉提取物清除羟自由基能力如图 3 所示。水提取物和醇提取物均具有一定的清除羟自由基的能力,其中水提取物在浓度为 50mg/mL 时,清除率最大可达到 91.90%,而醇提取物清除率最大只有 9.55%。可见,荞麦蜂花粉水提取物清除羟自由基的能力显著强于醇提取物( $p < 0.01$ )。然而,荞麦蜂花粉水提取物清除羟自由基能力( $EC_{50}$  值为 11.17mg/mL)弱于阳性对照抗坏血酸( $EC_{50}$  值 0.30mg/mL,图 4)。

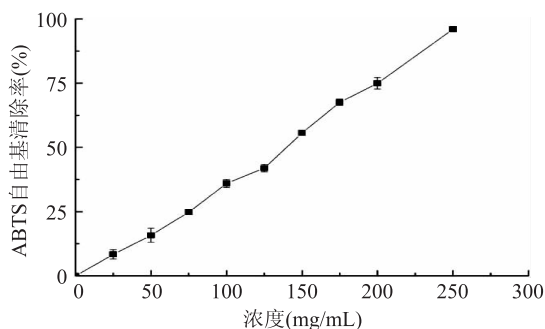


图 2 Trolox 清除 ABTS 自由基能力

Fig.2 ABTS scavenging capacity of Trolox

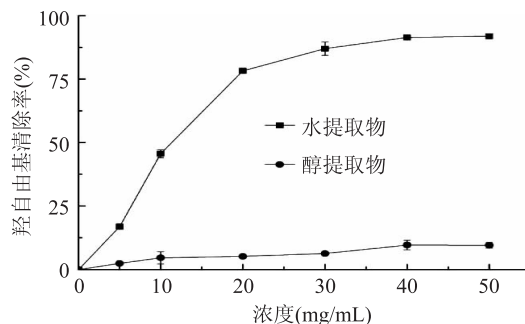


图 3 荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物清除羟自由基能力比较

Fig.3 Hydroxyl radical scavenging capacities of water and ethanol extracts of buckwheat bee pollen

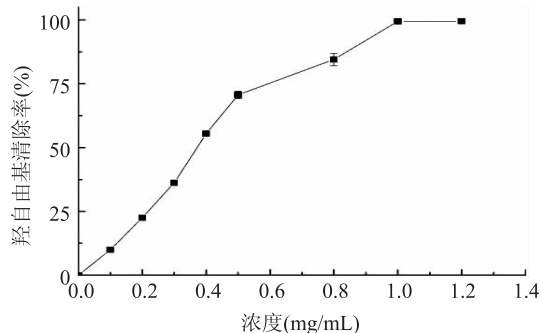


图 4 抗坏血酸清除羟自由基能力

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging capacity of ascorbic acid

### 2.2 荞麦蜂花粉促骨髓干细胞增殖活性

荞麦蜂花粉提取物对骨髓干细胞增殖能力的影响如图 5 所示。可以看出,二者均具有一定的促增殖能力。荞麦蜂花粉水提取物浓度在 1.0mg/mL 时促骨髓干细胞增殖能力最大,达到 74.74%;而醇提取物促骨髓干细胞增殖能力在浓度 0.75mg/mL 时达到最大,为 28.01%。可以看出,荞麦蜂花粉水提取物比醇提取物具有更高的促骨髓干细胞增殖的能力。

### 2.3 荞麦蜂花粉水提取物对辐射后骨髓干细胞存活率的影响

综合 2.1 和 2.2 的实验结果,可以得出荞麦蜂花粉水提取物比醇提取物具有更好的体外抗氧化能力和促骨髓干细胞增殖能力。因此,以辐射诱导氧化伤害的骨髓干细胞为模型,研究了不同浓度荞麦蜂花粉水提取物对细胞存活率的影响,来探讨其对氧化伤害的防护作用,如图 6 所示。

表1 荞麦蜂花粉水提取物活性成分含量分析  
Table 1 Active components of buckwheat bee pollen

活性成分	总多酚	总黄酮	总糖	蛋白质
含量(mg/g 干重)	3.66 ± 0.30	0.21 ± 0.03	73.71 ± 0.60	38.66 ± 1.47

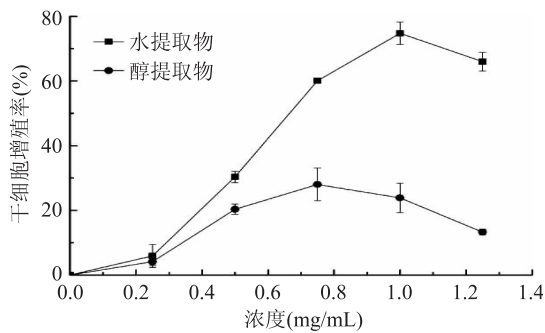


图5 荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物促骨髓干细胞增殖能力

Fig.5 Effect of water and ethanol extracts of buckwheat bee pollen on the proliferation of bone marrow stem cells

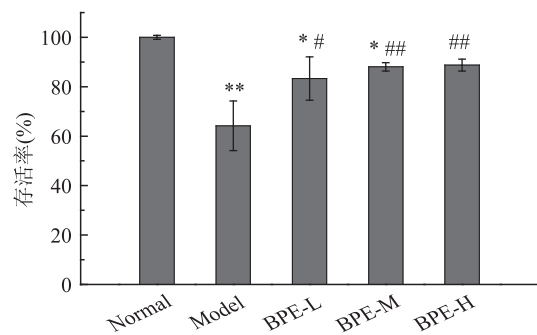


图6 荞麦蜂花粉水提取物对骨髓干细胞存活率的影响  
Fig.6 Effect of WEBBP on viabilities of bone marrow stem cells

注: \* 与正常组存在显著性差异,  $p < 0.05$ ,  
\*\* 与正常组存在极显著性差异,  $p < 0.01$ ,  
# 与模型组存在显著性差异,  $p < 0.05$ ,  
## 与模型组存在极显著性差异,  $p < 0.01$ .

结果显示,经8Gy  $\gamma$ -射线辐射后,辐射模型组的骨髓干细胞存活率显著( $p < 0.01$ )低于正常组,加药组骨髓干细胞存活率也低于正常对照组,但只有低、中剂量组显著( $p < 0.05$ )。加药组骨髓干细胞的存活率显著( $p < 0.05$ )高于辐射模型组,中、高剂量组极显著( $p < 0.01$ ),而且高剂量组与正常对照组无明显差异,说明荞麦蜂花粉水提取物可以保护骨髓干细胞免受辐射伤害,并能使存活率接近正常水平。这一结果与荞麦花蜂粉水提取物体外抗氧化和促干细胞增殖活性结果一致,故可以推断,其辐射防护作用可能与其抗氧化和促干细胞增殖活性相关。

#### 2.4 荞麦蜂花粉水提取物主要成分的确定

对荞麦蜂花粉水提取物进行成分分析,用福林酚法、 $AlCl_3$ 法、蛋白试剂盒和蒽酮硫酸法分别测定其中总多酚含量、总黄酮含量、蛋白含量和总糖含量。

总多酚回归方程:  $y = 0.0026x + 0.0215$

式中  $y$  为 760nm 处溶液的吸光度;  $x$  为溶液中的没食子酸含量 ( $\mu\text{g/mL}$ ), 方程的拟和度  $R^2 = 0.999$ 。

总黄酮回归方程:  $y = 0.0014x + 0.0154$

式中  $y$  为溶液在 510nm 处的吸光度;  $x$  为溶液中的儿茶素含量 ( $\mu\text{g/mL}$ ), 方程的拟和度  $R^2 = 0.999$ 。

总糖回归方程:  $y = 0.0094x + 0.0081$

式中:  $y$  为溶液在 620nm 处的吸光度;  $x$  为溶液中的葡萄糖含量 ( $\mu\text{g/mL}$ ), 方程的拟和度  $R^2 = 0.999$ 。

结果如表 1 所示,其总糖和总蛋白质含量较高,可以推测,荞麦蜂花粉水溶性物质中主要成分可能是水溶性多糖,也可能是糖蛋白。

为进一步了解荞麦蜂花粉的抗辐射机制,通过氨基酸分析仪测定荞麦蜂花粉水提取物中氨基酸组成,采用气相色谱法分析其单糖组成。

对荞麦蜂花粉水溶性成分中的蛋白质进行氨基酸分析,氨基酸分析图谱如图 7 所示,氨基酸组成如表 2 所示。

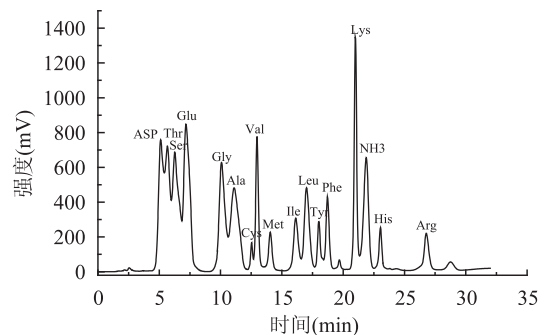


图7 氨基酸组成图谱

Fig.7 Amino acid composition chromatograms

荞麦蜂花粉水提取物中富含 17 种必需氨基酸和非必需氨基酸,占总氨基酸含量的比例在 2.10% ~ 13.30% 之间。其中谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、苏氨酸、丝氨酸含量较高,而蛋氨酸、组氨酸和半胱氨酸含量相对较低,这与李云捷<sup>[13]</sup>研究的玉米花粉多糖中氨基酸含量的趋势一致,说明不同花粉其氨基酸组成类似。值得一提的是,赖氨酸可以促进造血功能<sup>[14-15]</sup>,而荞麦蜂花粉水提取物中赖氨酸的含量很高,因此可以推测,赖氨酸可能对干细胞的增殖具有促进作用,降低辐射损伤造成的干细胞死亡率。

荞麦蜂花粉水溶性成分中,总糖是主要成分,本实验通过 GC/MS 测定荞麦蜂花粉中多糖的单糖组成,实验结果见图 8 和表 3 所示。

结果显示,荞麦蜂花粉水溶性多糖是由核糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,其摩尔比是 0.35:0.95:27.78:0.93:1.70:13.19:16.16。其中阿拉伯糖所占比例最高,比核糖高约 79 倍,其次是半乳糖、葡萄糖、木糖和鼠李糖、核糖。研究发现,阿拉伯糖、半乳糖在植物中可以以阿拉伯半乳糖的形式存在,此类中性多聚糖具有明显提高机体免疫

系统活力,尤其对巨噬细胞吞噬作用更具有显著促进作用。此外,阿拉伯半乳聚糖还具有抑制肿瘤转移的作用<sup>[16]</sup>,而 Cai Yizhong 对 112 种抗癌中草药提取物研究后指出,抗癌药物普遍具有较强的抗氧化作用,而天然产物抗辐射的主要机制之一就是其清除自由基的抗氧化能力<sup>[17]</sup>。由此可以推断,荞麦蜂花粉水提取物中可能含有阿拉伯半乳聚糖,具有提高机体免疫力的作用,提高辐射防护作用,而葡萄糖、核糖可为骨髓干细胞增殖提供能量和原料。

表2 氨基酸组成分析  
Table 2 Amino acid composition

氨基酸名称	缩写	含量(μg/mg)
天冬氨酸	Asp	30.45
苏氨酸	Thr	24.37
丝氨酸	Ser	24.04
谷氨酸	Glu	39.90
甘氨酸	Gly	16.32
丙氨酸	Ala	22.69
半胱氨酸	Cys	8.51
缬氨酸	Val	14.21
蛋氨酸	Met	6.28
异亮氨酸	Ile	12.46
亮氨酸	Leu	23.60
酪氨酸	Tyr	11.47
苯丙氨酸	Phe	15.20
赖氨酸	Lys	26.82
组氨酸	His	6.61
精氨酸	Arg	11.93
γ-氨基丁酸	GABA	0.58

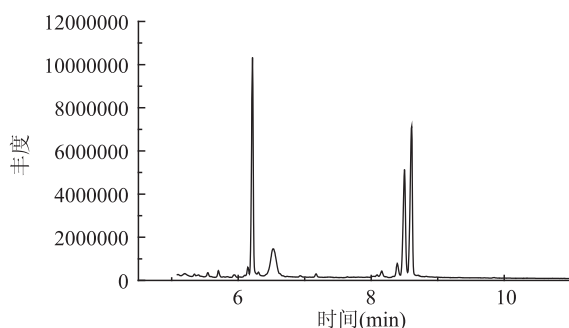


图8 单糖组成图谱

Fig.8 GC-MS chromatograms of monosaccharides

表3 单糖组成摩尔比

Table 3 The molar ratio of monosaccharides

单糖	保留时间(min)	摩尔比
核糖(ribose)	6.10	0.35
鼠李糖(rhamnose)	6.15	0.95
阿拉伯糖(arabinose)	6.22	27.78
木糖(xylose)	6.31	0.93
甘露糖(mannose)	8.39	1.70
葡萄糖(glucose)	8.50	13.19
半乳糖(galactose)	8.61	16.16

### 3 结论

荞麦蜂花粉水提取物和醇提取物均具有一定的体外抗氧化活性和促骨髓干细胞增殖活性,且水提取物的活性要强于醇提取物。以辐射诱导氧化损伤的骨髓干细胞为模型,确定了荞麦蜂花粉水提取物对氧化损伤也具有一定的防护作用。成分分析研究发现,荞麦蜂花粉水提取物总糖和蛋白质含量较高,推测其主要活性成分可能为糖蛋白或水溶性多糖。本实验为荞麦蜂花粉天然辐射防护剂和抗氧化物的研发提供了一定的理论依据,为荞麦蜂花粉活性功能的进一步开发奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Leja M, Mareczek A, Wyzgolic G, et al. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species[J]. Food Chem, 2007, 100(1): 237-240.
- [2] Li Fei, Yuan Qipeng, Rashid F. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(1): 80-88.
- [3] Medeiros K, Figueredo C, Figueredo T, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 119(1): 41-46.
- [4] Leblanc B, Davis O, Boue S, et al. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen [J]. Food Chem, 2009, 115(4): 1299-1305.
- [5] Fan Ziluan, Wang Zhenyu, Liu Jiaren. Cold-field fruit extracts exert different antioxidant and antiproliferative activities *in vitro* [J]. Food Chem, 2011, 129: 402-407.
- [6] 王艳敏. 蜂花粉中有效成分的提取及功能性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2010: 1-2.
- [7] Lennon D, Caplan A. Isolation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Experimental Hematology, 2006, 34(11): 1606-1607.
- [8] Lee J, Kosinski P, Kemp D. Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation [J]. Experimental Cell Research, 2005, 307(1): 174-182.
- [9] 许春姣, 翦新春, 郭峰, 等. 黄芪多糖对犬骨髓基质干细胞增殖及超微结构的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(5): 432-436.
- [10] Lin J, Tang C. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation [J]. Food Chem, 2007, 101: 140-147.
- [11] 杨晓萍, 吴谋成. 油菜蜂花粉多糖的提取、分离、结构及生物活性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005: 8-24.
- [12] 张华, 杨鑫, 张英春, 等. 玉米蛋白中可溶性蛋白水解氨基酸组成的测定 [J]. 中国粮油学报, 2007, 6(22): 19-22.
- [13] 李云捷. 玉米花粉多糖的分离、纯化、结构鉴定及抗氧化活性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005: 5-6.
- [14] 于瑞, 王兴涌. 各类氨基酸的应用研究进展 [J]. 化工中间

# 印度块菌多糖的纯化及其理化性质研究

肖伟东<sup>1</sup>, 邵丽梅<sup>2</sup>, 孔庆龙<sup>1</sup>, 刘 蓓<sup>2</sup>, 樊 建<sup>1,\*</sup>, 赵天瑞<sup>1</sup>

(1. 昆明理工大学化学工程学院, 云南昆明 650500;

2. 云南省供销合作社科学研究所, 云南昆明 650221)

**摘要:**以云南产印度块菌为原料, 采用水提醇沉法从其子实体中提取粗多糖, 经过 Sevage 法脱蛋白、DEAE-52 纤维素柱层析分离, 得到 3 种多糖组分 PTI-1、PTI-2、PTI-3, 选择 PTI-2 通过 Sephadex G-100 柱进一步纯化, 得到了均一纯多糖, 命名为 PTI-2A, 并对 PTI-2A 进行基础理化测定。结果表明: PTI-2A 分子量为 193388.2u, 易溶于水、稀酸、稀碱, 不溶于甲醇、丙酮、氯仿、乙醚和二甲基亚砷等有机溶剂, 不含蛋白质、核酸、酚类、淀粉和游离单糖。

**关键词:**印度块菌, 多糖, 纯化, 理化性质

## Purification and determination of physicochemical property of *Tuber indicum* polysaccharide

XIAO Wei-dong<sup>1</sup>, TAI Li-mei<sup>2</sup>, KONG Qing-long<sup>1</sup>, LIU Bei<sup>2</sup>, FAN Jian<sup>1,\*</sup>, ZHAO Tian-rui<sup>1</sup>

(1. Faculty of Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2. Science and Research Institute of Yunnan Federation of Supply and Marketing Cooperative, Kunming 650221, China)

**Abstract:** The crude polysaccharide was extracted from the India truffle fruit body produced in Yunnan by the water extraction and alcohol sink method. After the separation of the Savage deproteinization and the DEAE cellulose column chromatography, three components: PTI-1, PTI-2, PTI-3 were obtained, among which PTI-2 was further purified by sephadex G-100 gel chromatography. And then a single polysaccharide called PTI-2A was got and the basal physicochemical properties of it was measured. The result showed that molecular weight of PTI-2A was 193388.2u and it was easily dissolving in water, dilute acid, dilute alkalis, but insoluble in organic solvent like methanol, acetone, chloroform, diethyl ether and dimethyl sulfoxide, etc., and it didn't contain protein, nucleic acid, phenols, amyllum and free monosaccharide.

**Key words:** tuber indicum; polysaccharide; purification; physicochemical property

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)03-0135-03

块菌(*Genus Tuber*), 又称块菇、无娘果、猪拱菌, 因子实体呈球形、半球形或不规则块状而得名块菌, 属于囊菌门(*Ascomycota*)块菌属(*Tuber F. H. Wigg.*)<sup>[1]</sup>。块菌(*Genus Tuber*)具有极高的经济价值, 是世界上最为昂贵的食用菌, 在欧洲被称为“黑色的钻石”“地下黄金”。其除了具有高营养价值、独特香气和风味外, 还拥有良好的生物活性, 主要活性成分有块菌多糖、 $\alpha$ -雄烷醇、神经酰胺等, 已经确定的生物活性包括抗病毒<sup>[2]</sup>、抑菌<sup>[3-4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、抗突变<sup>[6]</sup>

等。目前对块菌粗多糖的提取和含量的测定研究较多, 但对块菌多糖的纯化与表征研究较少, 刘娟<sup>[7]</sup>等从块菌菌丝体中分离出一均一多糖, 并对其进行了分子量的测定和单糖组成分析。本实验采用 DEAE-52 纤维素柱层析对块菌粗多糖进行分离, 再通过 Sephadex G-100 柱对其进一步纯化, 采用高效液相色谱法鉴定其纯度, 并对其理化性质进行研究, 以期后续块菌多糖进一步研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、岩藻糖、鼠李糖、肌醇标品为色谱纯 贵州迪大生物有限公司; 甲醇、丙酮、氯仿等试剂均为分析纯 广东光华科技股份有限公司; DEAE-52 纤维素、Sephadex G-100 柱层析填料, Dextran 系列葡聚糖(T10、T40、T70、T100、

收稿日期: 2013-08-21 \* 通讯联系人

作者简介: 肖伟东(1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品科学与工程研究。

基金项目: 云南省科技厅社会发展科技计划科研院所技术开发研究专项(2011CF015)。

体, 2011, 10: 13-17.

[15] 徐琪寿. 氨基酸药理学研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(1): 30-32.

[16] 黄占华. 微波与超声波辅助提取落叶松中的阿拉伯半乳

聚糖及纯化[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2003: 9-12.

[17] Cai Yizhong, Luo Qiong, Sun Mei, et al. Antioxidative activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medical plants associated with anticancer[J]. Life Sciences, 2004, 74(17): 2157-2184.