

· 研究简报 ·

香云多糖的分子表征和稀溶液性质研究*

郑昌仁 余考明 吴永虎 王国用

(南京化工学院化工系, 南京, 邮政编码: 210009)

傅庭治 欧惠春

(南京大学生物系, 南京, 邮政编码: 210008)

关键词 多糖、分子表征、稀溶液、香菇云芝

香菇和云芝是一类高等腐生真菌, 菌种系由树上采集的子实体分离得到, 由菌种培养得到的香菇和云芝菌丝体可以用来提取香云多糖。据国内外文献报道^[1,2], 香云多糖不仅对多种疾病有较好的疗效, 而且还具有强烈的抑瘤作用。近年来国内外学者对其化学特性进行了研究, 发现由不同的培养方法和经不同的纯化处理可以得到不同的产物。Sasaki的研究指出, 香云多糖的抗肿瘤活性是以分子量适当的较之分子量低的活性要高^[3]。但是迄今关于真菌多糖的分子量与分子量分布, 分子的详细结构、形态及结构形态与药理之间的确切关系仍不甚了解。为此, 本文特就香云多糖的分子表征和稀溶液性质进行了研究。

1. 样品分级^[4] 由南京大学生物系提取的香云多糖样品, 采用水作溶剂, 以无水乙醇为沉淀剂, 温度为 $30 \pm 0.05^\circ\text{C}$, 进行逐步沉淀分级。分级依次共得6个级分。置于真空烘箱中(45°C)干燥至恒重。

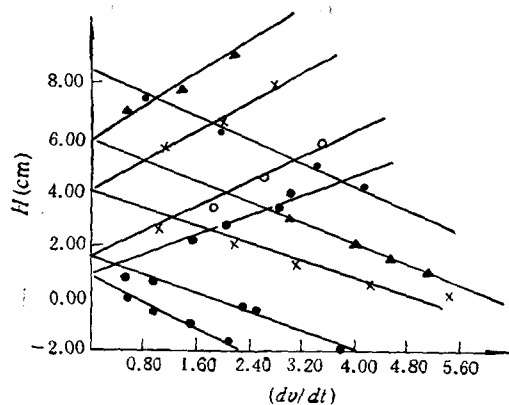


图1 香云多糖溶液的压力-流速外推图

用 DMF-H₂O(1:1) 置换数小时后, 再用 H₂O 置换两次。

将所测数据 Δh 对 dv/dt 作图, 如图1所示。当外推到 $dv/dt = 0$ 处即可求得

2. 动态膜渗透压法测定数均分子

量^[4-7] 采用改良的 Bruss 小体积渗透计, 以外推流速为零的快速动态渗透压法进行测定^[5]。实验温度控制在 $30 \pm 0.02^\circ\text{C}$, 溶剂为水。

半透膜系采用天津造纸四厂生产的再生纤维素玻璃纸, 先在 20% 乙醇水溶液中浸泡20天, 再按无水乙醇, 无水乙醇-DMF (1:1) 和 DMF 的顺序进行置换, 且各浸泡5小时以上, 最后用 DMF 置换两次, 存放在 DMF 中待用。移入水溶剂中之前需

* 1989年3月11日收到。

Δh_0 , 溶液密度 ρ 与 Δh_0 的积即是渗透压 π

$$\pi = \Delta h_0 \rho \text{ (g/cm}^2\text{)} \quad (1)$$

一般可由预先测出的密度~浓度曲线上查出各浓度的密度值。将各样品配成 5 个不同浓度溶液, 测得 5 个 π 值, 再由 $(\pi/C)^{1/2}_{C \rightarrow 0} \sim C$ 作图, 然后由公式

$$[(\pi/C)^{1/2}]^2 = RT/\bar{M}_n \quad (2)$$

求得 $\bar{M}_n$, 见表 1。

3. 第二维利系数 A_2 的求取按照方程

$$(\pi/C)^{1/2} = (RT/\bar{M}_n)^{1/2} + \frac{1}{2}A_2(\bar{M}_n \cdot RT)^{1/2} \cdot C \quad (3)$$

表 1 香云多糖各级分的分子量及 A_2 值

级 分	$(\pi/C)^{1/2}_0$	$\bar{M}_n$	Slope	A_2
1	18.00	7.94×10^4	4.52×10^4	0.0633
2	31.00	2.68×10^4	1.13×10^5	0.272
3	40.00	1.61×10^4	1.53×10^5	0.476
4	43.00	1.39×10^4	1.61×10^5	0.539
6	54.00	8.82×10^3	1.68×10^5	0.705

在 $(\pi/C)^{1/2}-C$ 图中为一直线, 斜率为 $\frac{1}{2}A_2(\bar{M}_n \cdot RT)^{1/2}$ 则

$$A_2 = 2(\bar{M}_n RT)^{-1/2} \times \text{斜率} \quad (4)$$

各级分的 A_2 值见表 1。

由表 1 可清楚地看到, 香云多糖水溶液的第二维利系数 A_2 随分子量 $\bar{M}_n$ 的增大而逐渐减小, 另 $A_2 > 0$, 表明了水是香云多糖的良溶剂。

膜的渗漏对实验结果的影响可通过静态平衡法加以判断, 当渗透作用占优势时, 测量毛细管弯月面上升。超过 1.5 小时后, 因有较多低分子溶质透过半透膜, 而使弯月面逐渐下降 (H 减小), 但若把曲线外推至 $t = 0$, 所得平衡点与该温度下动态测定结果相等,

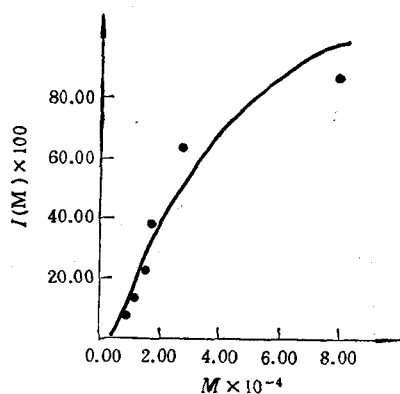


图 2 香云多糖的分子量累积重量分布曲线

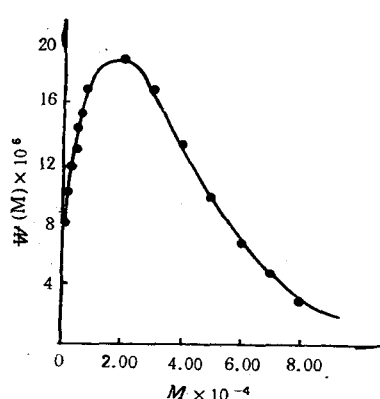


图 3 香云多糖的分子量微分重量分布曲线

故采用动态法宜在 1.5 小时内完成一个浓度的测定, 否则会因小分子部分渗漏而对实验结果带来较大的误差。

4. 香云多糖的分子量分布^[4]

(1) Schulz-Dinlinger 习惯法 从分级数据作出累积重量分布曲线与分子量微分分布曲线, 见图 2 和图 3。

(2) Tung 函数法^[4] 目前对各种高聚物级分的分子量分布符合得相当好的分布函数是董履和函数。

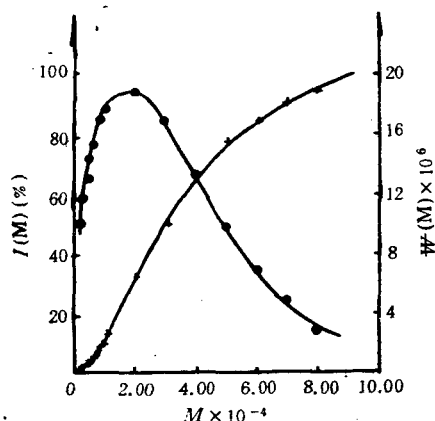


图 4 Tung 函数法处理所得的分子量分布曲线

求得 Tung 函数的两个参数 $a = 2.547 \times 10^{-7}$, $b = 1.437$ 由 Tung 函数法处理的分子量分布曲线见图 4。

(3) Tung 函数近似法^[4] 应琦琮、钱人元等用 Tung 函数来描述各级分的分子量分布, 并假定在每一级分的累积重量分数 $I(M) = 0.5$ 处的分子量 $M_{\frac{1}{2}}$ 等于该级分的 $\bar{M}_w$ 或 $\bar{M}_n$, 这样处理的方法, 即谓之 Tung 函数近似法。由于从 Tung 函数计算的每个级分的累积分布曲线, 实际上与对称于平均分子量的一条直线相接近, 因此对中间级分可近似地把每一级分的 M 轴上的 $\frac{1}{2} M_i$ 与级分的累积重量分数

$I(M) = 0.5$ 处的连线, 作为该级分的分子量累积重量分布曲线的近似。而对第一级分和最后一个级分则用试差法求出 a 、 b 后按 $I(M) = 1 - e^{-aM^b}$ 处理, 然后将各级分的分布进行加和, 就可得到高聚物试样的分子量分布曲线。此法的优点是考虑了各级分间分子量分布的互相交迭, 因此比习惯法更接近试样的实际情况。对试样的第一级分和第六级份用 Tung 函数近似法计算处理。第二—五级分是采用直线近似线作为分布, 然后累加得图 5。用三种方法处理得到的分子量分布曲线的比较图, 见图 6 所示。

用三种方法——习惯法、Tung 函数法、Tung 函数近似法分别对分级数据进行处理, 从得到的微分分布曲线可看出, 用习惯法处理时分布曲线略有偏窄现象, 这固然有作图的技术问题, 但主要由于 Tung 函数法考虑了各级分之间分子量的交迭, 因而所得结果较好地反映了客观真实。从图 6 中可看出, 所得三个峰值很接近, 这也说明三种处理方法的有效性。

5. 浊度滴定法确定香云多糖溶液 θ 组成^[6-12] 通过多次实验, 确定以水为溶剂, 丙酮为非溶剂, 选择 25°C 为 θ 温度, 用 Abbe 折射仪测定香云多糖溶液的折射率、取折射率的转折点为其浊点、应用修正的 Elias 公式, 并通过作图求出香云多糖溶液的 θ 组成。由实验得到水-丙酮的体积比 89.4:10.6 为香云多糖的 θ 溶剂。关于确定香云多糖的 θ 组成详细工作, 作者已有论文述及^[12]。

6. 在 θ 条件下建立香云多糖的 Mark-Houwink 方程

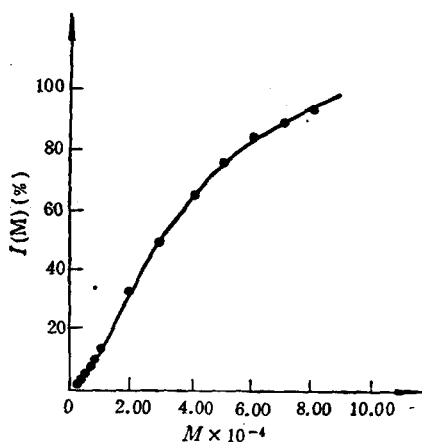


图5 Tung 函数近似法处理所得分子量分布曲线

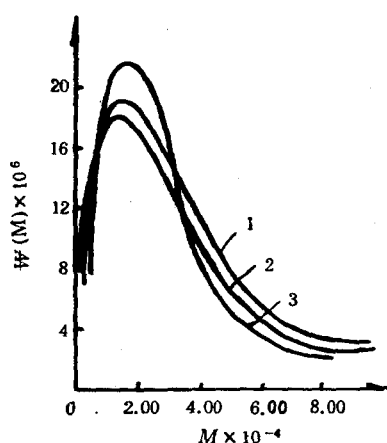


图6 用三种方法处理所得分子量分布曲线

特性粘度的测定,使用 I.D-4-0.54 mm Ubbelohd 稀释粘度计,温度控制 $25 \pm 0.01^\circ\text{C}$ 溶剂采用水与丙酮体积比为 89.4:10.6 的 θ 溶剂。

按照 Huggins 方程和 Kraemer 方程及外推法求出特性粘数。所得数据见表 2。

表2 各级分的数均分子量及特性粘数

级 分	I	II	III	IV	VI
$[\eta]_0(\text{ml/g})$	8.230	4.298	3.532	3.174	2.677
$\bar{M}_n$	7.94×10^4	2.68×10^4	1.61×10^4	1.39×10^4	8.82×10^3

$[\eta]$ - M 方程的订定,由 Mark-Houwink 方程 $[\eta] = KM^\alpha$ 可得

$$\lg [\eta] = \lg K + \alpha \lg M \quad (5)$$

由表 2 数据以 $\lg [\eta]_0$ 对 $\lg M$ 作图,见图 7 所得直线,其斜率为 α , 截距为 $\lg K$ 。在 θ 条件下香云多糖的 Mark-Houwink 方程为:

$$[\eta] = 2.59 \times 10^{-2} M^{0.509} \quad (6)$$

对于 θ 溶液,特性粘数与分子量的关系为 $[\eta]_0 = K_0 M^{\frac{1}{2}}$ 因此根据 α 的数值可以验证经修正的 Elias 浊点滴定法确定的 θ 条件是否正确,由计算得 $\alpha = 0.509$ 故所确定的 θ 条件是正确的。

Mark-Houwink 方程应由 $\bar{M}_w/\bar{M}_n \leq 1.25$ 的窄分布试样订定。若采用较宽分布的试样,且又使用 $\bar{M}_n$ 来确定 $[\eta] \sim M$ 关系式,即会产生较大的误差,这是由于 K 强烈地依赖于分子量分布的缘故。但分子量分布对 α 则无影响,因此只要对 K 值进行多分散性的改正。按对数正规分布^[13] $K_n = K(\bar{M}_w/$

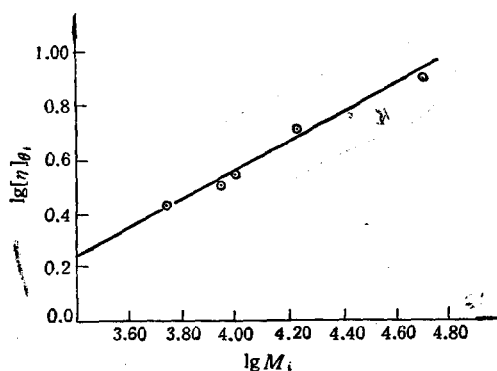


图7 香云多糖的特性粘数与分子量的关系

$\bar{M}_n^{(\alpha^2+\alpha)/2}$ 令 $K_n = K_\theta$, 多分散性改正因子 $q_n = (\bar{M}_w/\bar{M}_n)^{(\alpha^2+\alpha)/2}$, 则 $K = \frac{K_n}{q_n}$ 其中 K 值为单分散性的 $[\eta] \sim M$ 关系式 $[\eta] = KM^\alpha$ 中的常数, K_n 为 $[\eta] = K_n M_n^\alpha$ 式中的常数。在本工作中 K 即计算无扰尺寸所需 K_θ 值, 但由于未测香云多糖级分的重分子量, 故未算 q 值。

7. 香云多糖的无扰尺寸

由珠链模型出发, 可导出 $[\eta]$ 与 M 的关系。

$$[\eta] = K_\theta M^{\frac{1}{2}\alpha^3} \quad (7)$$

其中 α 为扩展因子, $\alpha = (\langle \bar{r}^2 \rangle / \langle \bar{r}_0^2 \rangle)^{1/2}$; $K_\theta = \phi \left(\frac{\langle \bar{r}_0^2 \rangle}{M} \right)^{3/2} \langle \bar{r}_0^2 \rangle$ 为无扰链均方末端距; $\langle \bar{r}^2 \rangle$ 为高分子链在非 θ 溶液中的均方末端距; ϕ 为 Flory 普适常数, 对于经一般分级的聚合物样品 ϕ 值取 2.5×10^{23} 。香云多糖的无扰链均方根末端距为:

$$\langle \bar{r}_0^2 \rangle^{\frac{1}{2}} = \left(\frac{K_\theta}{\phi} \right)^{1/3} M^{1/2} = \left(\frac{2.59 \times 10^{-2}}{2.5 \times 10^{23}} \right)^{1/3} M^{1/2} = 4.7 \times 10^{-9} M^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

Kirkwood 和 Riseman 曾指出^[5]在 θ 溶剂中, 特性粘数 $[\eta]_\theta$, 分子量 M 和分子链的尺寸之间有如下关系:

$$[\eta]_\theta = 2.84 \times 10^{23} \frac{h_0^3}{M} = 4.17 \times 10^{24} \frac{R_\theta^3}{M} \quad (9)$$

其中 h_0 为高分子链无扰尺寸末端距, R_θ 为高分子链无扰旋转半径, 因此根据测量的数据 $[\eta]_\theta$ 及 $\bar{M}_n$ 便可求出香云多糖各级分分子链的无扰尺寸。见表 3, 由以上公式可得 $R_\theta = 6.21 \times 10^{-9} ([\eta]_\theta \cdot M)^{1/3} \text{cm}$; $h_0 = 1.52 \times 10^{-8} ([\eta]_\theta M)^{1/3} \text{cm}$ 。

表 3 香云多糖分子链的无扰尺寸

级 分	I	II	III	IV	VI
$[\eta]_\theta (\text{ml/g})$	8.230	4.798	3.532	3.174	2.677
$\bar{M}_n$	7.94×10^4	2.68×10^4	1.61×10^4	1.39×10^4	8.82×10^3
$h_0 (\text{\AA})$	132	76.7	58.5	53.7	43.6
$R_\theta (\text{\AA})$	53.9	31.3	23.9	21.7	17.8
$(\bar{r}_0^2)^{1/2} \times 10^7 (\text{\AA})$	13.2	7.69	5.96	5.54	4.41

参 考 文 献

- [1] 傅庭治、欧惠春、李兆兰, 南京大学学报, (自然科学版), 1932, (2), 574.
- [2] 傅庭治、欧惠春、李兆兰, 中草药, 1983, 14(3), 13.
- [3] Tsukagoshi, S., *Cancer Therapy abs.*, 1977 17, 423.
- [4] 郑昌仁, 高聚物分子量及其分布, 化学工业出版社, 北京, 1986, 7.
- [5] Bruss, D. B. and Stross, F. H., *Anal. Chem.*, 1960, 32, 1456.
- [6] Bruss, D. B. and Stross, F. H., *J. Polym. Sci.*, 1961, 55, 381.
- [7] 张俐娜、程应清、张世村、石玉琴, 塑料工业, 1979, 3, 13.
- [8] Elias, H.-G., *Makromol. Chem.*, 1959, 33, 140.
- [9] Cornef, C. F. and Ballegaaijen, Van, H., *Polymer* 1966, 7, 293.
- [10] Tung, L. H., *Fractionation of Synthetic polymer*, Marcell Dekker, New York, 1977.
- [11] Elias, H.-G., *Makromol. Chem.*, 1961, 50, 1.

- [12] 郑昌仁、钱晓茵、王海波、傅庭治、欧惠春, 高分子学报, 1988, 3, 227.
 [13] Bareiss, R. E., Polymer Handbook, 2nd, ed Brandrup, J. and Immergut, E. H; Wiley IV-115, 1975.
 [14] 冯新德等, 高分子化学与物理专论, 中山大学出版社, 1984.
 [15] Kirkwood J. G. and Riseman, J. The Intrinsic Viscosity and diffusion constants of flexible macromolecules in solution, *J. Chem. Phys.*, 1948, 16, 565.

MOLECULAR CHARACTERIZE AND STUDIES ON THE DILUTE SOLUTION BEHAVIOR OF LENTINUS EDODES AND POLYTICTUS VERSICOLOR

ZHENG Changren, YU Kaoming, WU Yonghu, WANG Guoyong

(Department of Chemical Eng. Nanjing Institute of Chemical Tech. Post code 210009)

FU Tingzhi and OU Huichun

(Department of Biology, Nanjing University, Post code 210008)

ABSTRACT

The polysaccharide of lentinus edodes and polytictus versicolor has been fractionated by repeated precipitation method.^[1,5] All fractions and the unfractionated samples have been characterized by rapid dynamic membrane osmometry.^[3,5] For its aqueous solution, the second virial coefficient A_2 decreases as the molecular weight increases. The relationship is $A_2 = 2$ slope $(\bar{M}_w RT)^{-1/2}$.

Determination of the distribution curve by means of fractional precipitation. Separation of a polysaccharide into six fractions by a fractional precipitation carried out. The distribution-curve of integral and differential is obtained.

After according to the modified Elias' cloud-point titration method and using an Abbe's refractometer to define the cloud-point,^[6-10] it was found that water/acetone (89:11 by volume) is a θ solvent for the polymer at 25 ± 0.05 C. For θ conditions, the intrinsic viscosities were determined by capillary viscometry. Thus a monodispersed $[\eta] - M$ relationship has been obtained:

$$[\eta]_{\theta} = 2.59 \times 10^{-2} M^{0.509}$$

From the result above the unperturbed dimension $(r_0^2)^{1/2}$ was found to be $4.7 \times 10^{-9} M^{1/2}$.

Key words Polytictus, Molecular characterization, Dilute solution, Lentinus edodes, Polytictus versicolor