

荠菜多糖的分离纯化与单糖组成分析

王 华¹,熊淑娟²,曹 轩²,陈临溪²,唐国涛²

(1. 南华大学附属第一医院药剂科,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学药物药理研究所)

摘要: **目的** 对荠菜多糖进行分离纯化并分析其单糖组成。 **方法** 采用超声法提取总多糖,除蛋白,用 SephadexG-75 进行纯化,水解后用气相色谱分析其单糖组成。 **结果** 分离得到两个多糖组分 1 和 2。气相色谱鉴定出其中四种单糖组成,D-木糖、L-鼠李糖、D-甘露醇和 D-葡萄糖,其组成比例为 1:1.8:270.8:1。 **结论** 从荠菜多糖中分离出两种多糖组分,组分 2 由 8 种多糖组成,鉴定出其中 4 种。

关键词: 荠菜多糖; 分离纯化; 单糖组成; 气相色谱

中图分类号:R917 **文献标识码:**A

Isolation, Purification and Monosaccharide Composition Analysis of Polysaccharide from Shepherdspurse Herb

WANG Hua, XIONG Shujuan, CAO Xuan, et al

(The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** to isolate and purify the polysaccharide and analyze the monosaccharide composition. **Methods** the polysaccharide extraction removing the proteins were purified through sephadex G75, the polysaccharide components were analyzed by gas chromatography (GC) after hydrolyzation. **Results** two monosaccharide components were obtained after purification. Four monosaccharide compositions concluding D-xylose, L-rhamnose, D-mannose and D-glucose were measured by GC in the second components and the proportion were 1:1.8:270.8:1. **Conclusion** two polysaccharide fractions were isolated from Shepherdspurse Herb. The second fraction was composed of eight kinds of monosaccharide and four of them were identified.

Key words: Polysaccharide of Shepherdspurse Herb; isolation and purification; monosaccharide compositions; gas chromatography (GC)

荠菜 (Shepherdspurse Herb), 始载于《千金食治》为十字花科植物荠菜的带根全草。荠菜为药食同源植物,江南有三月三吃荠菜的习俗。荠菜的药用价值很高,全株入药,具有明目、清凉、解热、利尿、治痢等药效,其花与籽可以止血^[1,3]。荠菜多糖是荠菜的主要有效成分之一,多糖具有多种生物功能,如增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗病毒、降血糖等^[4]。荠菜多糖对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌有一定的抑制作用^[5],另外

具有一定的清除氧自由基的作用^[6]。

对荠菜多糖的成分分析,还未见文献报道。本试验对荠菜多糖进行了分离纯化,通过气相色谱法对照已知单糖气相色谱峰确定多糖中单糖的组分,并计算其摩尔比,为荠菜多糖的合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

标准单糖 (科密欧、Biosharp、aladdin 公司), 4 mol/L 三氟乙酸, 甲醇, 氢氧化钠, 硼氢化钠, 三甲基氯硅烷, 六甲基二硅醚烷, 吡啶, 分子筛。所用试

剂皆为分析纯。

1.2 实验仪器

解剖瓶,氮吹仪,恒温水浴箱,HP-5 石英毛细管色谱柱,超低温冷冻储存箱(中科美菱);AR2140 型电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司);6890N Network GC System 气相色谱仪(美国 Agilent 公司);TD25 型低速离心机(沙平凡仪器仪表有限公司);XMTD-8222 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);FD-1B-50 型冷冻干燥机(京博医康实验仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取 称取芥菜药材粉末 30 g,加 4 倍量 95% 乙醇回流提取脱脂,药渣加 300 mL 蒸馏水超声 1 h,过滤,离心,取上清液,得粗多糖提取液。

1.2.2 多糖的纯化 多糖提取液通过木瓜蛋白酶法脱蛋白^[7],透析,离心,上清液加入乙醇使之体积分数达到 90%,离心得沉淀,沉淀用水配制成浓度为 5% 的多糖溶液,离心,上清液用 Sephadex G-75 层析柱分离(2.6 mm × 40 cm),用双蒸水进行洗脱,洗脱液用自动收集仪收集(每管 4 mL),分别收集洗脱液,透析,冻干,计算产率。

1.2.3 多糖的成分测定 (1)多糖的水解:1 mg 的多糖样品(组分 2)溶解在 2 mL 的 4 mol/L 的 TFA 溶液中,充氮气加盖密封,置 100 °C 水解 6 h。然后用氮气除水。(2)单糖的还原:水解糖样品溶解在 0.5 mL 的 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液中,加入 10 mg 的硼氢化钠,在 60 °C 还原 1 h。加乙酸至无气泡逸出为止。用氮气除去水,加入 1 mL 甲醇并振荡溶解后,用氮气除去甲醇。这样反复 5 次以除去硼酸根。残渣在冷冻干燥机中干燥 6 h^[8]。(3)单糖的甲基化:干燥物加入 1 mL 4A 分子筛干燥的吡啶,振荡使其溶解,再依次加入 0.5 mL 六甲基二硅醚烷和 0.2 mL 的三甲基氯硅烷,振荡,混合均匀,置于 4 °C 冰箱中反应 12 h,使其充分反应,完全衍生成糖的三甲基硅醚衍生物。离心机离心 8 min (4 000 r/min),取上清液,进行 GC 分析。(4)气相色谱分析:气相色谱条件为:HP-5 石英毛细管色谱柱(50 m × 0.22 mm,0.25 μm);EI 源,电子能量 70 eV,分子量扫描范围 33 ~ 550,柱箱温度 130 ~ 290 °C,每分钟升高 10 °C,进样口温度 295 °C,载气氮气流速 1.2 mL/min,分流比 50:1,检测器温度 300 °C。在此方法下对各糖样进行检测并得到相关的气相色谱图。

3 结 果

3.1 多糖组分的分离

经过柱层析,自动收集仪收集(每管 4 mL),苯酚—硫酸法显色,以洗脱管数—吸光度值(A)绘制洗脱曲线(见图 1)。根据曲线,分别收集洗脱液,透析,冻干,得到多糖组分 1 和 2,从图中可以看出芥菜多糖明显分为 2 个洗脱峰,之后趋于平缓,说明多糖已完全洗脱下来,两个峰对称性较好,说明其均一性较好,可能为均一多糖。共含量分别为 1.83% 和 5.62%。

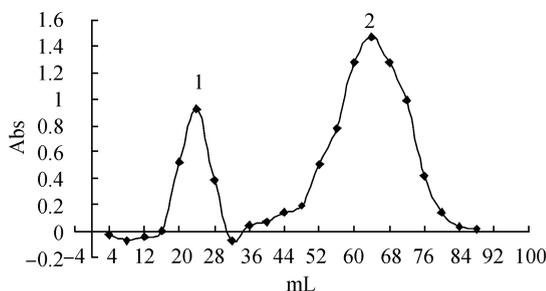


图 1 芥菜多糖经 Sephadex G-75 层析柱洗脱曲线

3.2 单糖组成的测定

取 9 种单糖对照品 10 mg,按上述方法甲基化,得到的反应产物可直接进样分析,结果见表 1。表中保留时间是鉴定单糖种类的主要标准,峰面积 [S]用来计算单糖含量。从表 1 中可知,几种主要单糖的保留时间相对集中,时间段为 8 ~ 11 分钟,在该段时间内出现的为各单糖的特征峰。本次实验中 D-果糖和 D-山梨醇存在两组数据,其余单糖均有一组数据。

将标准单糖混合后进行气相分析,所得结果见图 2。数据见表 2。

将芥菜多糖水解甲基化后进行气相分析,所得结果见图 3。数据见表 3。

3.3 结果分析

将标准糖与芥菜多糖的气相图谱与数据进行对比析,可分析出芥菜多糖的水解产物中含有四种已知的单糖成分,这四种单糖分别为 D-木糖,L-鼠李糖,D-甘露醇,D-葡萄糖。分别对应图中的四个峰值,其一一对应关系见表 4。

表1 单个标准糖样气相色谱数据

单糖名称	保留时间[min]	峰宽[min]	峰面积[PA * S]	峰高[PA]	峰面积[S]
D-阿拉伯糖	8.458	0.0381	3178.1	1319	2.406
D-半乳糖	10.667	0.0427	3437.15479	1156.75671	1.69781
D-甘露糖	10.507	0.0470	926.09692	291.93457	0.65494
D-果糖	10.522	0.0669	526.76135	108.09804	0.09422
D-木糖	10.596	0.0344	163.45262	1035.0134	0.02924
D-木糖	8.353	0.0410	6491.19238	2294.64771	1.80188
D-葡萄糖	10.610	0.0423	1501.07361	541.76544	0.83070
D-山梨醇	10.513	0.0724	801.91815	154.79190	0.57888
D-山梨醇	10.597	0.0363	451.48413	200.35574	0.32591
L-鼠李糖	8.948	0.0384	4915.95068	1883.88818	1.60942
甘露醇	10.531	0.3115	9209.92578	358.73016	1.69172

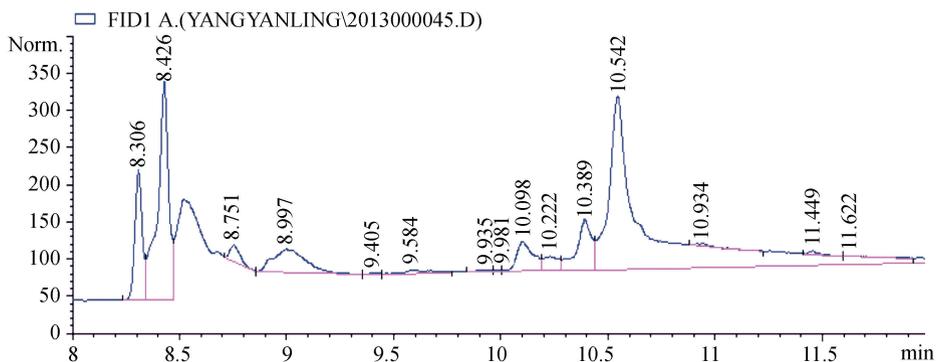


图2 标准单糖混合液气相色谱

表2 单个标准糖混合后的气相色谱数据

出峰顺序	保留时间	类型	峰宽[min]	峰面积[PA * S]	峰高[PA]	峰面积
1	8.306	BV	0.0388	425.62576	172.28845	0.05303
2	8.426	VV	0.0507	1063.27002	290.59045	0.13247
3	8.751	BV	0.0455	63.95581	21.03036	0.00797
4	8.997	VV	0.1335	319.02823	30.64082	0.03975
5	10.098	VV	0.0823	213.15427	38.66386	0.02656
6	10.389	VV	0.0691	326.24255	66.61997	0.04064
7	10.542	VBAS	0.1655	2965.21509	231.44263	0.36942

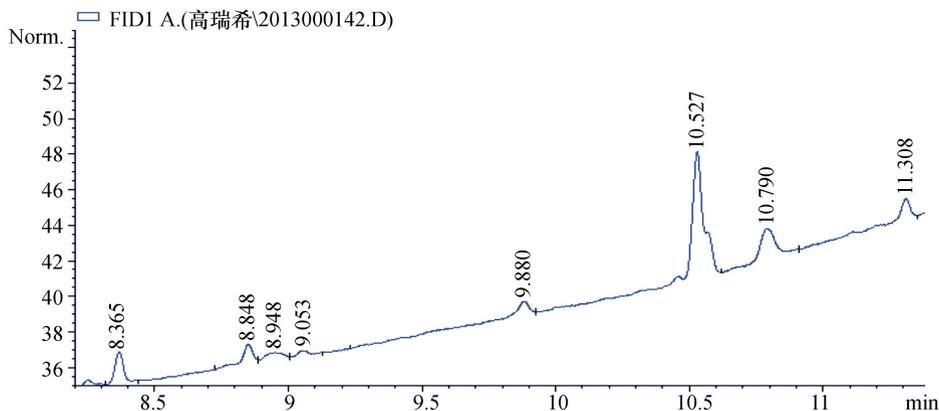


图3 芥菜多糖气相色谱

表 3 荠菜多糖气相色谱数据

出峰顺序	保留时间	类型	峰宽 [min]	峰面积 [PA * S]	峰高 [PA]	峰面积
1	8.365	BB	0.0349	3.69831	1.73064	0.00136
2	8.848	BV	0.0550	6.02034	1.49508	0.00222
3	8.948	VV	0.0973	6.55546	1.04332	0.00242
4	9.053	VB	0.0856	7.57998	1.16995	0.00279
5	9.880	BV	0.3036	98.93948	3.93207	0.03646
6	10.527	VBAS	1.0915	1138.89722	12.28570	0.41971
7	10.790	BVT	0.0612	6.60616	1.70566	0.00243
8	11.308	VVT	0.0375	2.79533	1.10504	0.00103

表 4 荠菜多糖分析出 4 种单糖组成及摩尔比值

单糖成分	出峰顺序	摩尔数 (μmol)	比例
D-木糖	1	0.05482	1.0
L-鼠李糖	3	0.09984	1.8
D-甘露醇	6	14.84465	270.8
D-葡萄糖	7	0.05728	1.0

4 讨 论

多糖的提取有多种方法^[9],有水提,碱水提取,单一或复合酶提取,超声波提取,双水相萃取,微波辅助提取等多种提取方法。本实验采超声波提取法,提取效率高,时间短^[10]。多糖除蛋白的方法选择木瓜蛋白酶除蛋白,其蛋白去除率及多糖保留率较高^[7]。多糖的结构分析手段很多,主要分为两大类,即化学分析法和物理分析法,本实验主要采用气相色谱分析了荠菜多糖的单糖组成,由于标准单糖的样品有限,我们只做了常见九种标准单糖,荠菜多糖的 GC 色谱图上有 8 个峰,但对应上的只有 4 种单糖,还有 4 个峰没有找到对应的标准单糖,我们在对多糖进行提取研究过程中,发现荠菜多糖在碱性条件下在水中会析出,而在酸性条件下溶解,我们认为可能其含有带碱性的基团,但从分析出的 4 种糖中,未发现带碱性的基团。其余的几种单糖组成需用更多的标准糖进行对比分析。多糖的大小,连接的位置等还有待通过核磁共振,质谱等做进一步研究。

参考文献:

- [1] 康秀荣,王秀兰,萨础拉.蒙药荠菜的研究进展[J].中国民族医药杂志,2012,(6):43-46.
- [2] 柳一红,姚运秋,李海龙,等.荠菜液对家兔血压影响的初步探讨[J].中华实用中西医杂志,2004,4(17):1551.
- [3] 岳兴如,阮耀,赵焯,等.荠菜抗炎止血药理作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(4):871-872.
- [4] Li B, Lu F, Wei XJ, et al. Fucoidan: structure and bioactivity[J]. Molecules, 2008, 13(8):1671-1695.
- [5] 杨咏洁,梁成云,崔福顺.荠菜多糖的超声波提取工艺及其抑菌活性的研究[J].食品工业冬科技,2010,4:146-148.
- [6] 张华,李官浩,杨咏洁,等.荠菜多糖的提取工艺及清除自由基作用的研究[J].江苏农业科学,2008,4:225-227.
- [7] 欧文,黄榕彬,曹轩,等.荠菜多糖提取液的除蛋白工艺研究[J].化工技术与开发,2012,41(11):7-10.
- [8] Happi Emaga T, Rabetafika N, Blecker CS, et al. Kinetics of the hydrolysis of polysaccharide galacturonic acid and neutral sugars chains from flaxseed mucilage[J]. Biotechnol Agron Soc Environ, 2012, 16(2):139-147.
- [9] Zhou HP, Zhu HY, Chen QH. Isolation, purification and analysis of the polysaccharide of enteromorpha proliferachinese[J]. Chinese Journal of Biochemistr, 1995, 11(01):91-94.
- [10] 许瑞波,毛茜,王吉,等.正交实验设计优选荠菜多糖的提取工艺[J].时珍国医国药,2010,21(8):1983-1984.

(此文编辑:秦旭平)