

猪屎豆种子胶多糖的单糖组分分析

郭守军, 杨永利, 张启明, 余建保, 朱友冲, 洪俊江

(韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041)

摘要:采用气相色谱法、高效液相色谱法和薄层层析法研究猪屎豆种子胶多糖的单糖组分及其含量, 实验结果表明, 猪屎豆种子胶多糖主要是由半乳糖和甘露糖组成的半乳甘露聚糖, 气相色谱法测定其单糖组分百分含量分别为 25.377% 和 60.282%; 半乳糖与甘露糖物质的量的比为 1:2.375。液相色谱测定其单糖组分百分含量分别为 29.261% 和 70.739%; 半乳糖与甘露糖物质的量的比为 1:2.417。结论: 气相色谱法与 HPLC 测定结果非常接近。该方法简便、实用、可靠, 适用于半乳甘露聚糖的单糖组分定性和定量的分析。

关键词:猪屎豆; 多糖; 薄层层析法; 气相色谱法; 高效液相色谱法

Monosaccharide Composition Analysis of Polysaccharide Gum from *Crotalaria mucronata* Seed

GUO Shou-jun, YANG Yong-li, ZHANG Qi-ming, SHE Jian-bao, ZHU You-chong, HONG Jun-jiang

(Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

Abstract: Monosaccharides composition of the polysaccharide gum from *Crotalaria mucronata* seed were analyzed using thin layer chromatography (TLC), GC and HPLC methods. GC analysis indicated that there were 25.377% of *D*-galactose and 60.282% of *D*-mannose with their molar ratio at 1:2.375, while HPLC analysis indicated that there were 29.261% of *D*-galactose and 70.739% of *D*-mannose with the molar ratio at 1:2.417. The *D*-galactose/*D*-mannose molar ratio results obtained from GC and HPLC analysis were close.

Key words: *Crotalaria mucronata*; polysaccharide; TLC; GC; HPLC

中图分类号: TS201.26

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)22-0264-04

猪屎豆(*Crotalaria mucronata* Desv)为蝶形花科猪屎豆属半灌木状草本, 别名三圆叶猪屎豆(福建)、野黄豆(广东)、假地豆、狗屎豆(潮汕)等, 广泛分布于广东、广西、云南、福建、江西、湖南、浙江、台湾、湖北和山东等地, 野生旷野间、村旁、田边、灌木丛中, 或为栽培, 资源丰富。猪屎豆种子是我国南方地区十分常见的一种传统中药, 有清热祛湿、解毒散结、消积、补肝肾、明目、固精等功效^[1-2]; 种子中的猪屎豆碱, 具抗肿瘤作用^[3-4]。猪屎豆种子胶简称猪屎豆胶, 是从猪屎豆种子胚乳中提取出的一种多糖胶, 主要成分是半乳甘露聚糖。

半乳甘露聚糖可作为增稠剂、凝胶剂、稳定剂和凝聚剂等广泛应用于食品、医药、石油、纺织、造纸、炸药及污水处理等工业^[5]; 由于半乳甘露聚糖具有较强的吸水和保水能力, 在土壤保湿、可降解的食品保鲜和化妆品中也得到应用^[6-7]。

近年来的研究表明, 半乳甘露聚糖胶具有降血糖、

降血脂、减肥、抗凝、抗溃疡、抗病毒、免疫调节等作用^[8-9], 并且不同来源的半乳甘露聚糖胶其活性也不同, 这主要与半乳甘露聚糖胶的半乳糖和甘露糖的物质之比及精细结构不同有关。有关猪屎豆种子胶多糖的单糖组分的研究未见报道。本研究通过薄层层析和气相色谱、液相色谱分析对猪屎豆种子多糖的单糖成分进行分析, 为该多糖的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

猪屎豆种子 云南省林木种苗站。

阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、半乳糖和赤藓糖(纯度>99%) 美国 Sigma 公司; 所用其他化学试剂均为分析纯。

薄层电动涂敷器 武汉药科新技术开发公司; 6890N 气相色谱仪 美国安捷伦气公司; DZF-6050 型真空干燥箱 上海博迅实业有限公司; LGJ-18 型冷冻干燥机 北

收稿日期: 2009-06-20

基金项目: 广东省自然科学基金项目(06028879); 韩山师范学院 2008 年教授基金项目(510076)

作者简介: 郭守军(1965—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: sjguo2006@yahoo.com.cn

京四环科学仪器厂; LC-6A 高压液相色谱仪 日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 猪屎豆种子胶的制备

种子泡涨, 手工剥离内胚乳(占种子组成的 33%), 内胚乳烘干、粉碎, 过 100 目筛, 得猪屎豆种子胚乳粉。

1.2.2 猪屎豆种子胶多糖的分离提纯^[10]

5g 猪屎豆种子胚乳粉溶于 700ml 蒸馏水中, 搅拌 3h, 离心沉降分离, 沉淀部分用水洗涤两次, 每次用水 200ml, 搅拌 1h 离心分离。合并上清液, 在搅拌时慢慢加入 6.5ml 斐林试剂析出铜络合物, 静置 1h, 倾出上清液, 用水洗涤 3 次, 离心分离得络合物, 向络合物中加 4°C 75ml 蒸馏水, 再滴加 0.5mol/L 的 HCl 使之全部溶解。加入 700ml 乙醇, 所得絮状物分别用乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 冷冻干燥得洁白多糖粉。

1.2.3 猪屎豆种子胶多糖组分的薄层色谱分析^[11]

称取猪屎豆种子胶多糖 10mg 于 10ml 安培瓶中, 加入 3ml 浓度为 2mol/ml 的三氟乙酸, 充入氮气后封管, 于 100°C 水解 3h, 冷冻干燥, 残留物再加入 3ml 浓度为 2mol/ml 的三氟乙酸, 条件同上重复水解一次, 冷冻干燥得水解后产物, 溶于水, 于 10ml 容量瓶中定容。分别称取标准单糖样品甘露糖、半乳糖及甘露糖和半乳糖的混合物各 10mg, 溶于水, 于 10ml 容量瓶中定容。

毛细管点样, 分别用硼酸和磷酸二氢钠修饰的硅胶薄层板进行薄层层析, 薄层色谱展开剂为正丁醇:乙酸乙酯:异丙醇:醋酸:水:吡啶 = 35:100:60:35:30:30(V/V), 苯胺-邻苯二甲酸为显色剂(邻苯二甲酸 1.6g 溶于水饱和的正丁醇 100ml, 加苯胺 0.93g(相当于 0.9ml)), 于 110°C 烘箱中 10min 显色。

1.2.4 猪屎豆种子胶多糖组分的气相色谱分析^[12-13]

1.2.4.1 标准单糖的糖醇乙酸酯衍生物的制备及定性分析

分别取 10mg 干燥的阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、核糖及 7 种糖混合标样, 分别加 30mg 硼氢化钾和 5mg 内标物肌醇, 加入 2ml 水, 振荡后在室温下放置 1.5h, 使糖还原成相应的糖醇。滴入醋酸分解过量的硼氢化钾, 至无气泡产生为止。溶液在 60°C 条件下减压浓缩至干。加入盐酸-甲醇溶液(1:1000, V/V)2ml, 振荡后减压蒸发至干, 重复 4 次以除去硼酸根, 于 105°C 真空干燥, 加入 0.5ml 吡啶和 1ml 醋酸酐, 充氮, 封管, 于 100°C 沸水浴中反应 1h, 置于 45°C 的真空干燥箱中减压蒸干, 加入 1ml 二氯甲烷, 振荡, 取上清液, 上清液直接进行气相色谱分析, 结果见图 2。

气相色谱条件: HP-5 石英毛细管柱(30m × 0.32mm, 0.25μm); 载气为纯氮气, 45ml/min; 空气流量为 450ml/min; 氢气流量为 40ml/min; 分流比为 50:1; 进样量为 1μl; 进样口温度为 280°C; FID 检测器温度: 280°C; 程序升温: 开始 80°C, 保持 4min; 第一阶段以 5°C/min 升到 180°C, 第二阶段以 0.5°C/min 升到 190°C, 第三阶段以 200°C 升到 250°C, 恒温保持 5min。

1.2.4.2 猪屎豆种子胶多糖的糖醇乙酸酯衍生物的制备^[11-13]

称取猪屎豆种子胶多糖 10mg 于 10ml 安培瓶中, 按照 1.2.3 节方法水解两次, 冷冻干燥, 得到猪屎豆种子胶多糖完全水酸解产物, 并按 1.2.4.1 节进行糖醇乙酸酯衍生物制备和气相色谱分析。

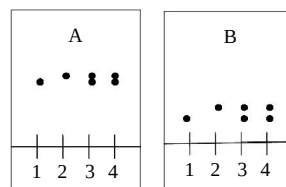
1.2.5 高效液相色谱分析

样品和标样的制备方法同 1.2.3 节。液相色谱条件: 色谱柱: Shodex SUGAR SP-G 0810 糖分析柱; 流动相: 纯 H₂O; 流速: 1.0ml/min; 检测器: Shodex RI-10A 示差折光检测器; 柱温: 80°C; 进样量: 20μl。保留时间定性, 外标法峰面积归一法定量。

2 结果与分析

2.1 薄层色谱分析

用两种不同的薄层层析板对猪屎豆种子胶多糖的组分单糖进行薄层色谱分析, 其薄层色谱分析结果见图 1, 测得各组分单糖 R_f 值见表 1。



1. 半乳糖; 2. 甘露糖; 3. 半乳糖和甘露糖混合物; 4. 猪屎豆种子胶多糖水解物; A. 硼酸修饰; B. 磷酸二氢钠修饰。

图 1 猪屎豆种子胶多糖的单糖组分薄层色谱

Fig.1 TLC chromatogram of monosaccharides in polysaccharides from *Crotalaria mucronata* seed gum

表 1 猪屎豆种子胶多糖组分的薄层色谱分析

Table 1 R_f of the monosaccharides in *Crotalaria mucronata* seed gum

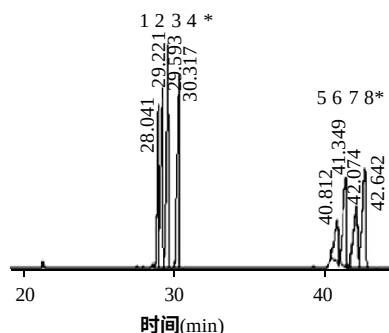
单糖名称	标准单糖 R _f	混合标准单糖 R _f	猪屎豆种子胶单糖组分的 R _f
D-甘露糖	*0.493/*0.200	*0.50/*0.214	*0.513/*0.207
D-半乳糖	*0.427/*0.114	*0.433/*0.121	*0.440/*0.118

注: *. 硼酸修饰的薄层; #. 磷酸二氢钠修饰的薄层。下同。

由图 1 和表 1 可知, 猪屎豆种子胶多糖组分单糖由甘露糖和半乳糖组成, 该结果亦被气相色谱分析结果所证实, 且在不同的薄层层析板中, 各种单糖的 R_f 差别

明显。其中用磷酸二氢钠修饰硅胶薄层层析板的分离效果最佳。

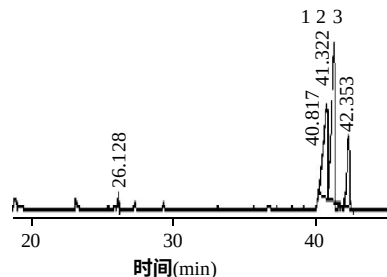
2.2 气相色谱分析



1. 鼠李糖; 2. 核糖; 3. 阿拉伯糖; 4. 木糖;
5. 肌醇; 6. 甘露糖; 7. 半乳糖; 8. 葡萄糖。

图2 标准单糖气相色谱图

Fig.2 GC chromatogram of monosaccharides mixed standard



1. 肌醇; 2. 甘露糖; 3. 半乳糖。

图3 猪屎豆种子胶多糖的气相色谱图

Fig.3 GC chromatogram of polysaccharide in *Crotalaria mucronata* seed gum

标准单糖及猪屎豆种子胶多糖样品经过衍生化后进行气相色谱分析。结果见图2、3和表2。由图2可知, 7种标准单糖的糖醇乙酸酯衍生物能得到良好的分离。根据图3各色谱峰与标准样品的保留时间对照可知, 猪屎豆种子胶多糖酸水解样品色谱图中, 各峰号代表的单糖分别为1号峰为内标肌醇、2号峰为甘露糖, 3号峰为半乳糖。

2.3 单糖的定量分析^[11-13]

根据谱图2的峰面积可以计算出各标准单糖的相对

响应因子, 计算公式如下:

$$f_i' = \frac{f_i}{f_s} = \frac{A_s W_i}{A_i W_s}$$

式中: i 为不同单糖组分; S 为内标物质肌醇; m 为被测多糖; f_i' 为组分 i 相对定量校正因子; W_i 为组分的质量; A_s 为所用内标的峰面积; W_s 为所用内标的质量; A_i 为组分的峰面积。各单糖的校正因子见表2。

采用内标法测定混合标准单糖的百分含量, 各单糖的含量计算公式如下:

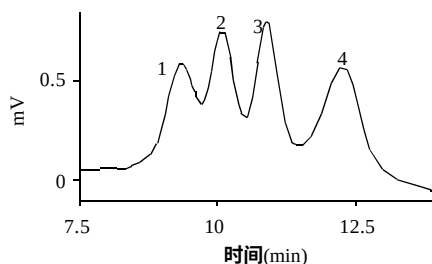
$$P_i(\%) = \frac{W_i}{W_m} \times 100 = \frac{A_i f_i' W_s}{A_s f_s' W_m} \times 100$$

式中: $P_i(\%)$ 为被测组分含量; W_s 和 W_m 为内标物和被测多糖样品的质量; W_i 为被测组分的质量, A_i 和 A_s 为被测组分和内标物的峰面积(图2); f_i 和 f_s 为被测组分和内标物的质量校正因子。标准单糖和猪屎豆种子胶多糖的单糖组分的气相色谱分析结果表2。

由图2、3和表2可知, 依照内标气相色谱的面积归一化方法, 得到猪屎豆种子胶多糖的单糖组分半乳糖和甘露糖的百分含量分别为25.377%和60.282%, 其物质的量之比为半乳糖:甘露糖 = 1:2.375。该实验方法所需样品量少, 无拖尾现象, 而且衍生物很稳定, 单糖乙酰化后不会产生异构体^[11,13]

2.4 高效液相色谱分析

标准单糖及猪屎豆种子胶多糖液相色谱图见图4、5, 分析结果见表3。



1. 葡萄糖; 2. 木糖; 3. 半乳糖; 4. 甘露糖。

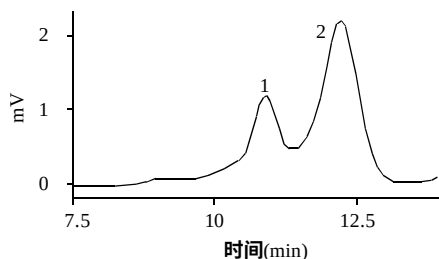
图4 混合标准单糖的液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of standard mixed monosaccharides

表2 标准单糖和猪屎豆种子胶多糖的单糖组分的气相色谱分析结果

Table 2 GC determination of standard monosaccharides and monosaccharides in *Crotalaria mucronata* seed gum

标准单糖	鼠李糖	核糖	阿拉伯糖	木糖	肌醇	甘露糖	半乳糖	葡萄糖
标准单糖保留时间(min)	28.941	29.221	29.593	30.317	40.812	41.349	42.047	42.642
组分 i 相对定量校正因子 f_i'	1.11441	0.73370	0.70937	0.72140	1.00000	1.016085	1.11674	0.86795
猪屎豆胶多糖的单糖组分保留时间(min)					40.923	41.395	42.420	
猪屎豆胶多糖的单糖的峰面积					863.92834	1025.10266	392.63632	
猪屎豆胶多糖的单糖组分含量(%)						60.282	25.377	
猪屎豆胶多糖的单糖组分物质的量的比						2.375	1	



1. 半乳糖; 2. 甘露糖。

图5 猪屎豆种子胶多糖的液相色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of polysaccharides in *Crotalaria mucronata* seed gum

表3 标准单糖和猪屎豆种子胶多糖的单糖组分的液相色谱分析结果
Table 3 HPLC determination of standard monosaccharides and monosaccharides in *Crotalaria mucronata* seed gum

单糖	葡萄糖	木糖	半乳糖	甘露糖
标准单糖保留时间(min)	9.313	10.086	10.902	12.271
猪屎豆胶多糖的单糖组分保留时间(min)			10.908	12.234
猪屎豆胶多糖的单糖的峰面积			43138	105070
猪屎豆胶多糖的单糖组分含量(%)			29.261	70.739
猪屎豆胶多糖的单糖组分物质的量的比			1	2.417

猪屎豆种子胶多糖完全酸水解产物,经保留时间定性由半乳糖和甘露糖组成,通过内标法峰面积归一进行定量,得半乳糖和甘露糖百分含量分别为29.261%和70.739%,半乳糖:甘露糖=1:2.417。该色谱条件下,四种标准单糖能得到较好的分离,尤其是半乳糖和甘露糖在普通氨基糖分析柱中较难分离,但在SP-G 0810糖分析柱上得到了良好的分离效果。

3 结论

3.1 气相色谱、液相色谱和薄层色谱分析结果表明,猪屎豆种子多糖主要由甘露糖和半乳糖两种单糖聚合而成,用气相色谱和液相色谱方法测定两者的物质的量比分别为2.375:1和2.417:1。

3.2 在不同的薄层层析板中,各种单糖的 R_f 差别明显。其中用磷酸二氢钠修饰硅胶薄层层析能对甘露糖和半乳糖达到完全分离。

3.3 本实验气相色谱方法所需样品量少,无拖尾现象,而且衍生物很稳定,单糖乙酰化后不会产生异构体。

3.4 液相色谱分析猪屎豆种子胶多糖的单糖组分,酸水解后不需要衍生化,可直接进行分析。该色谱条件下,4种标准单糖能得到较好的分离,尤其是半乳糖和甘露糖在普通氨基糖分析柱中较难分离,但在SP-G 0810糖分析柱上得到了良好的分离效果。此方法简便快速,可以在20min内可以完成。而且在柱温在80℃条件下进行分析操作,单糖不会产生异头碳异构体。

3.5 GC和HPLC对猪屎豆种子胶多糖单糖组分的分析结果非常接近,本实验为半乳甘露聚糖中单糖组分的分析提供参考依据。

参考文献:

- [1] 吴修仁. 潮汕生物资源志略[M]. 广州: 中山大学出版社, 1997: 116.
- [2] 吴修仁. 广东药用植物简编[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1989: 188.
- [3] 李林珍, 朱海燕, 石京山, 等. 猪屎豆属植物化学成分及药理活性研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 724-730.
- [4] 吴晓军, 程功臻. 单猪屎豆碱的²NMR[J]. 分析科学学报, 2005, 21(1): 45-47.
- [5] 蒋建新, 张卫明, 朱莉伟, 等. 半乳甘露聚糖植物胶的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(4): 1-5.
- [6] CAMACHO M M, MARTINEZ-NAVARRETE N, CHIRALT A. Rheological characterization of experimental dairy creams formulated with locust bean gum (LBG) and λ -carrageenan combinations[J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 243-248.
- [7] TAPIE N, MALHIAC C, HUCHER N, GRISEL M. Determination of galactose and mannose residues in natural galactomannans using a fast and efficient high-performance liquid chromatography/UV detection[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1181: 45-50.
- [8] BIN-HAFEEZ B, HAQUE R, PARVEZ S, et al. Immunomodulatory effect of fenugreek extract in mice[J]. International Immunopharmacology, 2003, 3(2): 257-263.
- [9] PANDIAN R S, ANURADHA C V, VISWANATHAN P. Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) on experimental gastric ulcer in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 81: 393-397.
- [10] 蒋建新, 朱莉伟, 徐嘉生. 野皂荚豆胶的研究[J]. 林产化学与工业, 2000, 20(4): 59-62.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 3版. 杭州: 浙江大学出版社, 1994, 20-202.
- [12] 杨永利, 郭守军, 罗军德, 等. 苦豆子胶多糖组分气相色谱与薄层色谱分析[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 159-161.
- [13] 陈清花, 李文权, 张赛金, 等. 海洋微藻多糖组成的气相色谱分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(4): 495-498.