

核桃隔膜多糖的分离纯化及单糖组成分析

高莉¹, 王强², 帕提古力·玛合木提^{1,*}

(1.新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046; 2.新疆大学理化性质测试中心, 新疆乌鲁木齐 830046)

摘 要:目的: 分离纯化核桃隔膜多糖并分析其单糖组成。方法: 核桃隔膜经水提醇沉、冷冻干燥得水溶性多糖, 经DEAE-纤维素52离子柱和SephadexG-100凝胶柱分离纯化后得到多糖组分PDJL-A₁₁(diaphragma of *Juglans regia* L. acid polysaccharide)。运用紫外光谱鉴定纯度, 气相色谱分析多糖的单糖组成。结果: 核桃隔膜多糖PDJL-A₁₁单糖组成为: 阿拉伯糖、果糖、甘露糖、鼠李糖和葡萄糖, 其物质的量比为2.11:6.52:8.81:12.59:15.58。结论: 建立了核桃隔膜多糖分离纯化的方法, 确定了其单糖组成及其物质的量比、可为核桃隔膜药理学研究提供参考。
关键词: 核桃隔膜; 多糖; 纯化; 气相色谱; 单糖组成

Isolation, Purification and Monosaccharide Composition Analysis of Polysaccharide from Diaphragma of *Juglans regia* L.

GAO Li¹, WANG Qiang², PATIGUL Mahmut^{1,*}

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China ;

2. Test Center of Physical and Chemical Characteristic, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

Abstract : The purpose of this work was to isolate and purify polysaccharide from diaphragma of *Juglans regia* L (PDJL) and analyze its monosaccharide composition. A water-soluble crude polysaccharide was obtained by water extraction, ethanol precipitation and freeze-drying. The crude polysaccharide was purified to obtain a fraction of PDJL-A₁₁ on DEAE-cellulose52 column and SephadexG-100 column. The purity of PDJL-A₁₁ was analyzed by UV spectrophotometer. The monosaccharide composition and molecular ratio of PDJL-A₁₁ were analyzed by gas chromatography. The monosaccharide composition of PDJL-A₁₁ was composed of arabinose, fructose, mannose, rhamnose and glucose with a molar ratio of 2.11: 6.52: 8.81: 12.59: 15.58.

Key words : diaphragma of *Juglans regia* L. ; polysaccharide ; purification ; gas chromatography ; monosaccharide composition

中图分类号: TS201.23

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)21-0182-04

核桃隔膜(diaphragma of *Juglans regia* L.)又名核桃分心木, 为胡桃科(*Juglandaceae*)胡桃属(*Juglans* L.)植物核桃的带骨质内果皮的种隔^[1]。在维吾尔族民间常用它泡服, 具有补肾涩精、治疗多汗、尿频、遗尿、口腔溃疡、牙龈出血等多重功效^[2-3]。相关研究表明^[4], 核桃隔膜中含有蛋白质、多糖、黄酮、生物碱、挥发油、有机酸、强心苷、甾类、皂苷等多种化学成分。而目前, 对于其化学成分的研究仅限于黄酮、色素和挥发油。多糖作为一种重要的活性成分, 除了有抗病毒、抗肿瘤、抗衰老的生理功能外, 还有免疫调节、降血糖、抗凝血等作用^[5-6]。

本实验运用离子交换和凝胶层析对核桃隔膜多糖提取物分离纯化, 紫外光谱和凝胶层析鉴定纯度, 采用气相色谱对PDJL-A₁₁的单糖组分进行分析, 以期为核桃隔膜多糖的结构解析、构效关系及生物活性的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃隔膜(和田薄皮核桃)购于乌鲁木齐市二道桥。DEAE-cellulose52、SephadexG-100 Whatman公司; 葡萄糖、果糖、木糖、半乳糖、甘露糖、鼠

收稿日期: 2010-02-06

作者简介: 高莉(1984—), 女, 硕士, 主要从事资源植物成分分析研究。E-mail: gaoli40130@163.com

* 通信作者: 帕提古力·玛合木提(1959—), 女, 教授, 本科, 主要从事资源植物成分研究。

E-mail: patigulimahemuti@126.com

李糖、阿拉伯糖 上海试剂公司；无水乙醇、氯仿、正丁醇、丙酮、乙醚、浓硫酸、氯化钠、盐酸、盐酸羟胺、吡啶、醋酸酐、碳酸钡、肌醇等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

S24 可见分光光度计 上海棱光技术有限公司；RE-52A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂；SHZ-D 循环水式真空泵、HH-S 型水浴锅 巩义市英峪予华仪器厂；DHG-9141A 型电热恒温干燥箱 上海精宏试验设备有限公司；D-37520 离心机 德国 Kendro 公司；ALPHA1-2LD 真空冷冻干燥机 德国 Martin Christ 公司；HT6890 气相色谱仪 美国 Aglient 公司。

1.3 方法

1.3.1 核桃隔膜粗多糖的提取

精确称取 100g 经过脱脂处理的核桃隔膜干粉，90% 乙醇 300mL 在 95℃ 提取 2h，抽滤，滤渣挥干溶剂，按水料比 1:80(m/V)、温度 90℃，水浴浸提 180min，抽滤，滤渣可用少量温水冲洗，得到核桃隔膜可溶性多糖浸提液。将多糖浸提液 60℃ 真空浓缩成小体积，按体积比 3:1 加入 Sevag 混合液(氯仿与正丁醇体积比为 4:1)，剧烈振荡 20min 后，4000r/min 离心 15min，收集上清液，仍按体积比 3:1 加入 Sevag 混合液，重复 10~13 次至中间层无变性蛋白。收集上清液，加入 3 倍体积的无水乙醇置 4℃ 冰箱过夜，5000r/min 离心 5min 沉淀多糖，沉淀用乙醚和丙酮各洗涤两次，真空冷冻干燥，称质量，备用。

1.3.2 核桃隔膜粗多糖的纯化

1.3.2.1 DEAE-纤维素 52 柱层析^[7-8]

柱规格为 3cm × 39.5cm，有效柱长 15.5cm，50mg/mL 糖液上样 6mL，采用 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱。控制流速 0.5mL/min，5mL/管。蒽酮-硫酸法^[9]隔管跟踪检测多糖流出部位，收集同一洗脱峰的多糖样品，以管号为横坐标，多糖洗脱液的吸光度为纵坐标，做洗脱曲线。

1.3.2.2 Sephadex G-100 柱层析^[10]

将 DEAE-纤维素 52 柱层析洗脱组分经透析、浓缩、冷冻干燥后配成 20mg/mL 溶液，上样 4mL，用 0.1mol/L NaCl 溶液洗脱，柱规格为 2cm × 40cm，有效柱长 25.5cm，流速为 0.2mL/min，3mL/管。蒽酮-硫酸法^[9]隔管跟踪检测多糖流出部位，收集同一洗脱峰的多糖样品，以管号为横坐标，多糖洗脱液的吸光度为纵坐标，做洗脱曲线。

1.3.3 亚级组分 PDJL-A₁₁ 纯度鉴定

1.3.3.1 SephadexG-100 纯度鉴定

经过 SephadexG-100 分离纯化后的亚级组分 5mg 溶

解于 0.1mol/L NaCl 溶液中，上样 1mL，0.1mol/L NaCl 溶液洗脱，流速 0.1mL/min，2mL/管。

1.3.3.2 紫外光谱纯度鉴定

SephadexG-100 分离纯化后的亚级组分 PDJL-A₁₁，经透析、浓缩、冷冻干燥后配成 0.5mg/mL 溶液，在 UV-2450 紫外-可见分光光度计上从波长 200nm 扫描到 600nm，蒸馏水作空白对照，检测有无核酸(波长 260nm 处)和蛋白质(波长 280nm 处)特征吸收峰。

1.3.4 单糖组成分析

1.3.4.1 样品完全酸水解^[11]

精确称取 20mg PDJL-A₁₁ 置于安瓿瓶中，加入 2mol/L 硫酸溶液 5mL，酒精灯真空封管，置于烘箱里 110℃ 水解 6h，取出冷却至室温后加入 BaCO₃ 粉末静置过夜，待其中和至中性，离心除去 BaCO₃ 沉淀，取上清液，冷冻干燥得到样品单糖混合物，备用。

1.3.4.2 内标肌醇六乙酸酯的制备^[12]

称取 3g 肌醇，加入 4.5g 盐酸羟胺，45mL 醋酸酐和 3mL 吡啶，在 90℃ 水浴中加热 2h 并不断搅拌。将反应液冷却至室温后倒入 50mL 冰水，使肌醇六乙酸酯析出。过滤后加 20mL 水洗涤，将压干后产物放入 100℃ 烘箱中烘干备用。制备的肌醇六乙酸酯用气相色谱检验应呈现单峰。

1.3.4.3 糖腈乙酯衍生物的制备

精确称取水解后的样品单糖混合物 10mg，盐酸羟胺 10mg，内标 7mg，加入 0.5mL 吡啶，放入 90℃ 水浴中加热反应 30min 并振荡。取出冷却至室温，加入 0.5mL 醋酸酐，在 90℃ 水浴中继续反应 30min 进行乙酰化，取清液进行气相色谱分析。标准单糖的糖腈乙酯衍生物采用同法制备。

1.3.4.4 气相色谱条件

HT6890 气相色谱仪配备 HP-5 石英毛细管柱，FID 检测器，程序升温：柱初温 190℃，保留 2min，以 5℃/min 升温至 230℃，保留 5min；汽化室温度：230℃；进样量：1μL；分流比 30:1；载气 N₂：1mL/min；H₂：30mL/min；空气：300mL/min。

1.3.4.5 气相色谱定性定量分析^[13-14]

将样品与标准单糖的色谱峰保留值进行对照以确定样品中单糖的种类，采用内标法根据内标物和试样的质量以及内标物和被测组分的峰面积求出样品中单糖的含量及物质的量比。

2 结果与分析

2.1 DEAE-纤维素 52 柱层析

由图1可知,用水洗脱获得了一种中性多糖组分,命名为PDJL-W。由图2可知,NaCl溶液梯度洗脱出现了3种酸性多糖组分,按照出峰顺序分别命名为PDJL-A₁、PDJL-A₂、PDJL-A₃。由于其余组分含量较低,很难收集足够的量进行后续研究,所以通过DEAE-纤维素52柱层析只对PDJL-A₁组分进行下一步Sephadex G-100的分离纯化。

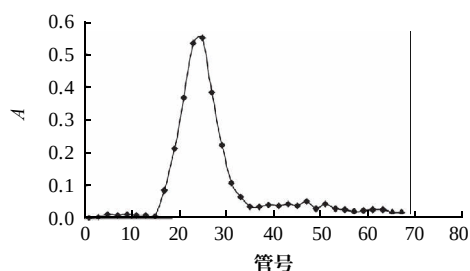


图1 核桃隔膜多糖 DEAE-cellulose52 柱层析水洗脱曲线图
Fig.1 Water elution curve of PDJL on DEAE-52 column

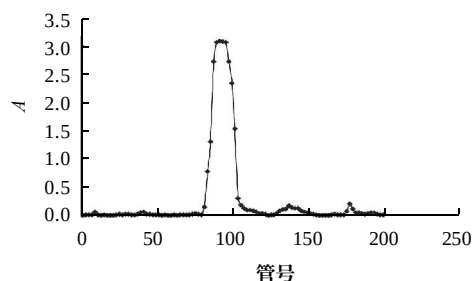


图2 核桃隔膜多糖 DEAE-cellulose52 柱层析盐洗脱曲线图
Fig.2 Salt elution curve of PDJL on DEAE-52 column

2.2 Sephadex G-100 柱层析

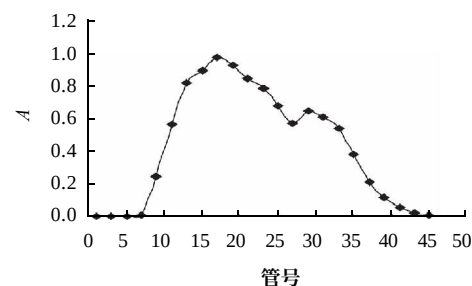


图3 核桃隔膜多糖 PDJL-A₁-Sephadex G-100 柱层析盐洗脱曲线
Fig.3 Salt elution curve of PDJL-A₁ on Sephadex G-100 column

由图3可知,在17管左右形成了一个明显的主峰,但在此峰峰腰处即29管处出现了一个小峰。说明PDJL-A₁中含有两种分子质量相差不太大的多糖组分,在凝胶柱上分离效果不好。为了能够得到分子质量比较均一的多糖,只收集1~27管洗脱液做后续研究,并将其命名为PDJL-A₁₁。

2.3 核桃隔膜多糖 PDJL-A₁₁ 纯度鉴定

2.3.1 Sephadex G-100 纯度鉴定

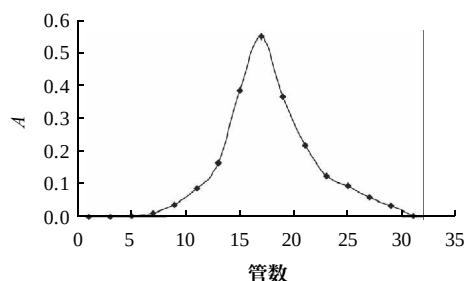


图4 PDJL-A₁₁ 的 Sephadex G-100 纯度鉴定
Fig.4 Purity identification of PDJL-A₁₁ on Sephadex G-100 column

将PDJL-A₁₁溶解于0.1mol/L NaCl溶液中,通过Sephadex G-100层析柱洗脱得到了一个单一对称峰。(图4)说明通过分离纯化得到的核桃隔膜酸性多糖PDJL-A₁₁样品是均一的纯多糖,可以对其进行结构及性质的研究。

2.3.2 紫外光谱纯度鉴定

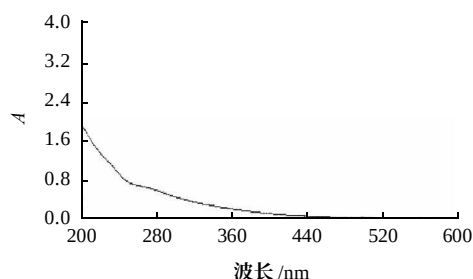


图5 PDJL-A₁₁ 的紫外-可见光谱图
Fig.5 UV-visible spectrum of PDJL-A₁₁

如图5所示,PDJL-A₁₁的紫外光谱图在紫外光区波长280nm处和可见光区没有吸收峰,说明不含蛋白质和色素,波长260nm处有一个较小的吸收峰,说明其组分含有少量核酸。

2.4 单糖组成分析

7种标准单糖糖腈乙酰化衍生物的GC分析结果见表1,样品单糖组成的GC分析结果见图6。

表1 标准单糖糖腈乙酰化衍生物的GC分析结果
Table 1 GC analytical data of seven monosaccharide standards

单糖标准品	保留时间/min	单糖标准品峰面积/(Pa·s)	内标物峰面积/(Pa·s)
葡萄糖	9.600	6743.93457	3005.22852
木糖	5.969	6645.65039	2907.96826
果糖	14.961	2589.87720	2246.41895
甘露糖	9.354	5510.08350	2293.04370
鼠李糖	5.523	5292.37061	2888.64868
阿拉伯糖	5.775	5485.46826	3048.37769
半乳糖	9.980	5020.27832	2387.96704

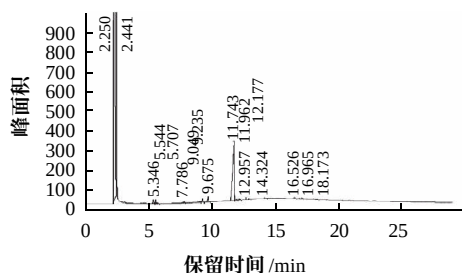


图6 样品单糖组成的气相色谱图

Fig.6 Gas chromatogram showing the monosaccharide composition of PDJL-A₁₁

将样品的气相色谱图与标准单糖气相色谱图进行对照,通过保留时间和峰面积对样品中的单糖进行定性定量分析,结果见表2。由表2可以确定样品PDJL-A₁₁中含有葡萄糖、果糖、甘露糖、鼠李糖和阿拉伯糖5种单糖,并计算得阿拉伯糖、果糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖的物质的量之比为2.11:6.52:8.81:12.59:15.58。

表2 PDJL-A₁₁的GC分析结果
Table 2 GC analytical data of PDJL-A₁₁

单糖	保留时间/min	峰面积/(Pa·s)	含量/%
鼠李糖	5.544	71.47570	1.58
阿拉伯糖	5.707	10.75666	0.24
甘露糖	9.235	72.71222	1.21
葡萄糖	9.675	121.88644	2.14
果糖	14.324	25.56034	0.90

3 结 论

本研究采用DEAE-cellulose52阴离子交换树脂和葡聚糖凝胶G-100层析柱从核桃隔膜中分离、纯化得到了一种酸性多糖PDJL-A₁₁。通过凝胶层析和紫外光谱分

析,表明PDJL-A₁₁为均一多糖组分。运用气相色谱分析时,由于多糖本身不具有挥发性,所以选择将其转化成易挥发、对热稳定的糖腈乙酸酯衍生物。该法具有操作方便、定性简单可靠、定量准确的优点。

通过气相分析,确定PDJL-A₁₁由葡萄糖、果糖、甘露糖、鼠李糖和阿拉伯糖5种单糖组成,并计算得出阿拉伯糖、果糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖的物质的量之比为2.11:6.52:8.81:12.59:15.58。

参 考 文 献 :

- [1] 郝容庭,张毅萍.中国核桃[M].北京:中国林业出版社,1992:78-81.
- [2] 菇克娅·沙德克.维吾尔医常药材学(下册)[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:53.
- [3] 孙龙生.核桃的经济价值[J].新农业,2007(1):50.
- [4] 王艳梅,高莉,帕提古丽·马合木提,等.核桃隔膜化学成分定性研究[J].食品工业科技,2008(12):123-124.
- [5] 郑敏,卢葵花,吴基良.大蒜多糖体外抗乙型肝炎病毒作用研究[J].中药药理与临床,2005,21(3):29-30.
- [6] 郑敏,梅贤臣,鲍翠玉.大蒜多糖体外抗柯萨奇病毒B作用[J].中国现代应用药学,2005,22(1):4-6.
- [7] 吴茜茜,吴克.海带岩藻多糖的分离与部分性质研究[J].食品与发酵工业,2001,27(10):39-42.
- [8] 孔庆胜,王彦英.南瓜多糖的分离、纯化及其降血脂作用[J].中国生化药物杂志,2000,21(3):130-132.
- [9] 张翼伸.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1983:163.
- [10] 赵永芳.生物化学技术原理及其应用[M].武汉:武汉大学出版社,1999:113-146.
- [11] 李健,刘宁,陈平,等.香菇多糖单糖组成及含量的测定方法研究[J].化学与黏合,2005,27(2):71-73.
- [12] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987:41-43.
- [13] 沈萍萍,付庭治.真菌多糖研究进展[J].南京大学学报,1991,27(3):524-529.
- [14] 朱明华.仪器分析[M].3版.北京:高等教育出版社,2000:52-54.