

# 油松花粉多糖分离纯化及结构分析的初步研究

范三红, 刘艳荣, 杨民乐, 周立波  
(山西大学生命科学与技术学院 山西 太原 030006)

**摘要:** 油松花粉经热水提取, Sevag 法除蛋白, 乙醇沉淀得多糖。采用 Sephadex G-100 柱层析对多糖进行初步分离纯化, 用红外光谱、紫外-可见光谱、气相色谱分析对花粉多糖的结构进行初步研究。结果表明: 纯化的油松花粉多糖为杂多糖, 至少由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖 6 种单糖组成。另外, GC 图谱显示油松花粉多糖还含有一个未知的单糖, 峰面积非常小, 含量比较低。UV 检测显示油松花粉多糖在波长 260nm 与 280nm 处未见有核酸和蛋白特征吸收峰, 经 IR 检测证实油松花粉多糖具有多糖类物质的特征吸收峰。  
**关键词:** 油松花粉; 多糖; 分离纯化; 结构分析

Separation, Purification and Structural Analysis of Polysaccharide from Chinese Pine Pollen

FAN San-hong, LIU Yan-rong, YANG Min-le, ZHOU Li-bo  
(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** A polysaccharide from Chinese pine pollen was obtained through hot water extraction, Sevag deproteinization and Sephadex G-100 chromatography and was analyzed structurally by IR spectroscopy, UV-vis spectroscopy and gas chromatography (GC). The polysaccharide was highly heterogeneous and was mainly composed of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose. Besides, GC analysis revealed that the polysaccharide contained an unknown monosaccharide with a small peak area suggesting low content. No characteristic absorption of nucleic acid or protein in the polysaccharide was observed in its UV-vis spectrum and it exhibited characteristic IR absorption of polysaccharide.

**Key words:** Chinese pine pollen; polysaccharide; separation and purification; structural analysis

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)15-0127-03

油松花粉是长寿树种油松的精华, 内含生命体所需的全部营养成分, 总量达 200 多种, 堪称“微型营养库”<sup>[1]</sup>。服用后能在很短的时间内被人体快速吸收, 促进人体正常新陈代谢, 提高肌体免疫能力, 对人类有很好的保健价值。油松花粉作为保健食品是安全的, 对人体没有任何毒副作用<sup>[2]</sup>。由于多糖具有更多的药理作用和多种多样的生物活性功能, 使花粉多糖越来越受到人们的关注。油松花粉具有增强免疫等多种生物功能与其功能因子成分有关<sup>[3-4]</sup>, 而油松花粉多糖的研究较少, 本实验对油松花粉多糖组成进行分析, 旨在为进一步研究油松花粉多糖结构提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

油松花粉由山西省安泽县亿家康乳业发展有限公司提供。

Sephadex G-100 Pharmacia 公司; 30% 双氧水、三氯甲烷、正丁醇、95% 乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚、溴化钾、三氟乙酸 (TFA)、吡啶、醋酸酐、盐酸羟胺均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司; 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖 美国 Sigma 公司。

### 1.2 仪器与设备

SHB-III 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; R 系列旋转蒸发器 上海申生科技有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; TD-5 台式高速离心机 上海安亭科学仪器厂; HRZG-50 真空干燥箱 青岛海尔特种电冰柜有限公司; SP2102JPC 型紫外可见分光光度计 上海广谱仪器有限公司; A204 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; 101-2B 型电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司; 毛细管色谱柱 (CP-sil8n 30m × 0.25mm, 0.25μm) 美国瓦里

收稿日期: 2009-05-16

作者简介: 范三红 (1963-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: shf729@yahoo.com.cn

安公司; GC2010气相色谱仪 日本 Shimadzu公司; FT-R 380傅里叶变换红外光谱仪 (配有 DTGS/KBr 检测器) 美国 Nicolet公司; 恒流泵 BT 01-100 保定兰格恒流泵有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 油松花粉多糖纯品制备<sup>[5]</sup>

干燥油松花粉破壁, 脱脂后水浴提取, 提取液离心分离后合并上层液, 滤液旋转蒸发浓缩即得油松花粉粗提液, 加 30%  $H_2O_2$  至糖液体积的 10%, 置 58 °C 水浴中保温 1h 至浓缩液呈淡黄色, 期间不断搅拌, 使色素充分氧化而除去。再用 Sevag 法除蛋白 (重复 5 次), 离心, 倾出上层清液, 用 95% 乙醇沉淀 (乙醇加入量为上清液体积的 4 倍), 醇沉淀于冰箱中过夜, 再离心分离, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗一次, 真空干燥至恒重, 即得油松花粉精制多糖。将精制多糖再经 Sephadex G-100 分离纯化, 收集主峰部分得油松花粉多糖纯品。

#### 1.3.2 油松花粉多糖的紫外吸收光谱

将纯化后的油松花粉多糖配制成 1.0mg/ml 溶液, 在 200~500nm 范围内进行紫外-可见光区扫描。观察在 280~260nm 附近特征吸收峰。

#### 1.3.3 油松花粉多糖的红外光谱测定

称 1mg 多糖干燥样品, 与 KBr 混合研磨后压片, 采用红外光谱仪扫描分析, 波长范围为 4000~400 $cm^{-1}$ , 观察吸收峰, 初步分析多糖的构型<sup>[6]</sup>。

#### 1.3.4 油松花粉多糖的单糖组成分析

##### 1.3.4.1 多糖水解

称取 10mg 油松花粉多糖于水解管中, 加入 2mol/L 的三氟乙酸 (TFA) 2ml, 加盖用生料带密封, 120 °C 烘箱中水解 6h, 冷却至室温, 取水解产物减压干燥至无水, 然后向其中加入蒸馏水, 浓缩并真空干燥, 蒸干以彻底除去 TFA, 得到水解后的单糖混合物。

##### 1.3.4.2 单糖的糖脲乙酸酯衍生物的制备<sup>[7]</sup>

准确称取恒重的标准对照单糖 (鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖) 各 5mg 于 10ml 具塞试管, 加入 10mg 盐酸羟胺和 0.5ml 吡啶, 然后放入 90 °C 水浴中 30min, 振荡, 取出后冷却至室温, 加入 0.5ml 乙酸酐, 在 90 °C 下继续反应 30min 进行乙酰化, 反应产物为糖脲乙酸酯衍生物, 反应产物经滤膜过滤后可直接进行气相色谱分析。同样方法处理多糖水解物。

##### 1.3.4.3 气相色谱分析条件

载气:  $N_2$  流量 47ml/min; 空气流量 400ml/min;  $H_2$  流量 30ml/min; 检测器: FID; 进样口温度: 240 °C; 检测器温度: 270 °C; 柱温: 采用程序升温, 升温速

率为 120 °C/min, 以 8 °C/min 的速率升至 184 °C, 保持 5min, 再以 1 °C/min 速率升至 190 °C, 保持 3min, 再以 3 °C/min 升至 210 °C, 保持 10min; 进样量: 1 $\mu$ l; 分流比: 50:1。

通过比较标准单糖和样品中单糖的相对保留时间, 确定样品中的单糖种类, 根据峰面积计算各单糖的相对摩尔比。

## 2 结果与分析

### 2.1 油松花粉多糖的柱层析

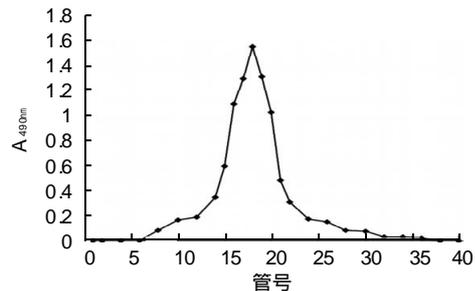


图1 油松花粉多糖 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶洗脱曲线  
Fig.1 Elution curve of Chinese pine pollen polysaccharide on Sephadex G-100 column

从图 1 可以看出, 经过蒸馏水充分洗脱至无糖分检出, 12~24 号管之间出现单一对称峰, 初步判断纯化后多糖为均一组分, 得到的组分相对较纯。合并洗脱液减压浓缩, 真空干燥得到较纯的油松花粉多糖。

### 2.2 油松花粉多糖紫外吸收光谱分析

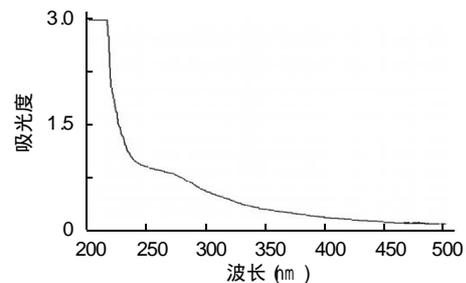


图2 油松花粉多糖的紫外-可见光谱扫描图  
Fig.2 UV-vis spectrum of Chinese pine pollen polysaccharide

如图 2 所示, 纯化后的多糖在 260~280nm 波长处没有特征吸收峰, 曲线 260~280nm 波长处不是非常平滑, 可能是多糖中还有极少量的与糖结合的蛋白。

### 2.3 油松花粉多糖红外光谱测定

由图 3 可知, 红外图谱在 3419.42 $cm^{-1}$  有吸收峰, 说明有糖类存在的分子内氢键和 O-H 伸缩振动, 2923.51 $cm^{-1}$  和 2853.03 $cm^{-1}$  两组特征吸收峰代表了 C-H 的伸缩振动, 1236.96 $cm^{-1}$  和 1415.95 $cm^{-1}$  处小的吸收峰为 C-H 变形振动, 1737.66 $cm^{-1}$  处为糖乙酰胺吸收峰, 1624.59 $cm^{-1}$  出现的

吸收峰为 C=O 非对称伸缩振动, 1082.38 $\text{cm}^{-1}$  处强吸收峰为 C-O-C 或 C-O-H 的伸缩振动。

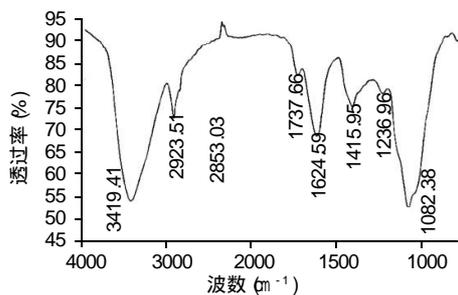


图3 油松花粉多糖的红外光谱图

Fig.3 IR spectrum of Chinese pine pollen polysaccharide

### 2.4 油松花粉多糖的气相色谱分析

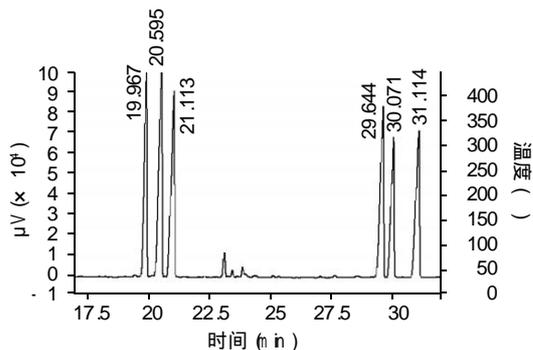


图4 标准单糖 GC 图谱

Fig.4 Gas chromatogram of aldononitrile acetate derivatives of standard monosaccharides

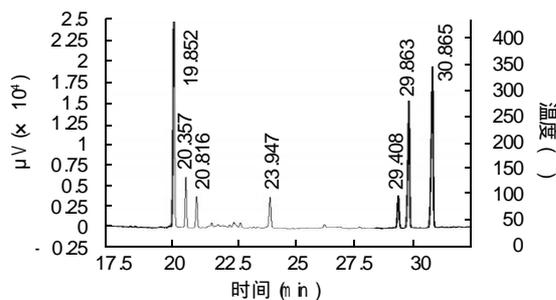


图5 油松花粉多糖 GC 图谱

Fig.5 Gas chromatogram of aldononitrile acetate derivative of Chinese pine pollen polysaccharide

六种单糖混合标品、油松花粉多糖经糖脲乙酸酯衍生的气相色谱图如图 4、5 所示。多糖至少由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖 6 种单糖

组成。多糖的单糖组成中以鼠李糖、半乳糖及葡萄糖含量比较高, 阿拉伯糖、木糖及甘露糖含量比较少。另外, GC 图谱显示油松花粉多糖还含有一个未知的单糖 (出峰时间在 23.94 $\text{min}$ ), 该峰的峰面积非常小, 因此含量也比较低。根据峰面积计算出各单糖的相对百分含量, 油松花粉多糖的单糖组分比例为: Rha:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc=1:0.2:0.14:0.15:0.63:0.86 (表 1)。

表1 不同单糖的混合标准品及样品 GC 保留时间和峰面积

Table 1 Retention time and peak of standard monosaccharide mixture and the pollen polysaccharides

单糖标准	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
混合标准品保留时间 ( $\text{min}$ )	19.967	20.595	21.113	29.644	30.071	31.114
多糖保留时间 ( $\text{min}$ )	19.852	20.357	20.816	29.408	29.863	30.865
多糖组成中单糖的峰面积	133571.6	26807.3	8180.0	20661.5	83866.3	114608.8
摩尔比	1	0.2	0.14	0.15	0.63	0.86

### 3 结论

油松花粉经水提醇沉、脱蛋白、柱层析可得到纯化多糖。多糖经水解、糖脲乙酰化后进气相色谱分析, 结果表明采用弱极性的 cp 8 型毛细管柱能完全分离油松花粉多糖的单糖组分, 且所需样品量少。该多糖的单糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和未知单糖。未知单糖的确定尚需找到合适的标品, 有待进一步研究。该实验方法为油松花粉多糖组成的测定提供一种快捷、方便的分析方法, 对多糖结构的进一步研究提供了理论基础。

### 参考文献:

- [1] 马成亮. 松花粉开发利用价值的研究[J]. 林业科技, 2002, 27(5): 59-60.
- [2] 田志环. 松花粉与人体健康[J]. 解放军保健医学杂志, 2007, 9(4): 255-256.
- [3] 何晓燕, 孙雪圆, 于智洋. 松花粉的有效成分及药理作用[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(9): 78-80.
- [4] PAULIG. The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species[J]. Clinical and Experimental Allergy, 2002, 32(6): 933-941.
- [5] 范三红, 周立波. 油松花粉多糖提取及其清除羟自由基活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 274-277.
- [6] 常建华, 董绮功. 波谱原理及解析[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [7] 张亮, 胡海宝, 黄朝瑜等. 南柴胡多糖分离与组成的初步研究[J]. 中草药, 2000, 31(9): 647-648.