

碱提麻竹竹秆多糖的相对分子质量测定及单糖组成分析

潘文慧¹, 阮期平^{1*}, 边清泉²

(1. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川绵阳 621000; 2. 绵阳师范学院化学与化学工程学院, 四川绵阳 621000)

摘要 [目的] 获得更多的竹资源信息。[方法] 采用碱法提取麻竹竹秆多糖, 提取物用 Sevag 法去蛋白, 95% 乙醇醇沉, 透析, DEAE-52 纤维素柱分离纯化, 得到多糖 DLP1 和 DLP2, 并对多糖进行了相对分子质量测定及单糖组成分析。[结果] 测得多糖 DLP1 和 DLP2 的相对分子质量分别为 61 500 和 1 780 000 u; 经气象色谱测定 DLP1 由岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其质量比为 111.25:17.81:1:12.43:2.43; DLP2 由岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和甘露醇组成, 其质量比为 198.22:3.27:9.16:25.06:10.96:1。[结论] 该实验为麻竹多糖研究打下基础, 为竹资源的深度开发提供科学依据。

关键词 麻竹多糖; 碱提; 相对分子质量; 组成分析

中图分类号 S795.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)26-0010-03

Determination of Relative Molecular Weight of Polysaccharides Extracting by Alkali Solution from the Pole of *Dendrocalamus latiflorus* and Analysis of Their Monosaccharide Composition

PAN Wen-hui¹, RAN Qi-ping^{1*}, BIAN Qing-quan² (1. College of Life Science and Biotechnology, Mianyang Teachers' College, Mianyang, Sichuan 621000; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Mianyang Teachers' College, Mianyang, Sichuan 621000)

Abstract [Objective] To know more about bamboo. [Method] The polysaccharides in the pole of *D. latiflorus* were extracted by alkali solution. The proteins were removed by Sevag agent from extraction. The polysaccharides in extraction were precipitated by alcohol of 95%, and then dialyzed by dialysis bag, separated by DEAE-52 cellulose column. Polysaccharides of DLP1 and DLP2 were obtained, and their relative molecular weights were measured and monosaccharide compositions were analyzed. [Result] The relative molecular weights of polysaccharides DLP1 and DLP2 were detected to be 61 500 and 1 780 000 u. Their monosaccharide composition was determined by gas chromatography. DLP1 was composed of fucose (Fuc), rhamnose (Rha), alabinose (Ala), glucose (Glu) and galactose (Gal) at a quality ratio of 111.25:17.81:1:12.43:2.43. DLP2 was composed of fucose (Fuc), rhamnose (Rha), alabinose (Ala), glucose (Glu), galactose (Gal) and mannitol (Mnt) at a quality ratio of 198.22:3.27:9.16:25.06:10.96:1. [Conclusion] The work laid a good foundation for studying on polysaccharides of *D. latiflorus*, and provided scientific basis for further development of bamboo resource.

Key words Polysaccharide in *D. latiflorus*; Alkali solution extraction; Relative molecular weight; Composition analysis

我国竹资源极其丰富, 竹秆作为竹材的主要原料, 长期未得到有效的利用, 随着现代社会资源利用率的提高, 竹产品的开发近年来成为热点。竹中含有多种活性成分^[1-6], 如多糖、黄酮、皂苷、矿质元素等, 它们可以成为多种产品的原材料。竹多糖有抗氧化、抗癌、降血压、增加机体免疫功能等多种功效^[6-11], 值得重点关注。目前对竹多糖的研究多集中在提取工艺上^[12-17], 有关其分离纯化技术、相对分子质量测定及其结构测定的研究报道不多^[18-20]。周跃斌等^[19]曾采用 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex 凝胶柱层析等方法分离纯化了毛竹多糖。姚曦等^[20]采用离子色谱法、凝胶色谱法分析了梁山慈竹竹秆多糖组成及分子量分布, 结合傅立叶红外光谱、核磁共振和热稳定性分析探讨了该多糖结构和性质。吴金松^[21]采用离子交换柱和凝胶柱分离纯化了大叶麻竹竹笋多糖, 并用气象色谱和核磁对其进行结构分析。Qin 等^[22]采用离子交换柱和分子筛层析分离纯化了玉竹多糖, 并用核磁对其进行结构分析。笔者选择报道较少的麻竹为研究对象, 对麻竹竹秆多糖进行分离纯化、相对分子质量和单糖组成测定, 为麻竹多糖的结构和药理研究提供纯品及技术保障, 为麻竹资源的深度开发提供科学依据。

1 材料与方

1.1 仪器、材料与试剂 RE-2002 型旋转蒸发器, 上海耀

裕仪器设备有限公司; FD-1B-50 型高速冷冻离心机, 上海将来实验设备有限公司; UL trospec 3300 pro 型紫外可见分光光度计, Amersham biosciences; DEAE-52 纤维素, Whatman 公司; 透析袋 MD45 (截留相对分子质量 10 000 u), Spectrum 美国光谱; 1525 型高效凝胶渗透色谱系统, 美国 Waters 公司; GC-14B 气相色谱系统, 岛津公司; Dextran 标准多糖 (T10、T60、T120、T500、T1000 和 T2000), Sigma 公司; 葡萄糖 (Glc)、岩藻糖 (Fuc)、半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ala)、甘露醇 (Mnt)、鼠李糖 (Rha)、木糖 (Xyl) 等单糖标准品, 中国食品药品检定研究院; 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 粗多糖提取分离。 采集绵阳师范学院附近竹园中的麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus*) 竹秆, 洗净, 于恒温鼓风干燥箱中 80 °C 烘干, 粉碎, 过 6 号筛, 得到竹秆细粉。取 30 g 细粉加入 600 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液 (料液比 1:20), 充入适量 N₂, 于 4 °C 摇床上振荡 2 h, 过滤取滤液, 用 2 mol/L 的 HCl 调 pH 至 7。重复 2 次, 合并滤液, 浓缩滤液至原体积的 1/4。Sevag 法去蛋白, 重复 3 次。加入 3 倍体积 95% 的乙醇进行醇沉, 取沉淀。沉淀物加无水乙醇洗涤 2 次, 冷冻干燥, 即得粗多糖 (*Dendrocalamus latiflorus* polysaccharide, 以下简称 DLP)。

将碱法提取的 DLP 用适量蒸馏水溶解, 放入预处理后的透析袋 (截留相对分子质量 10 000 u) 中透析 3 d。DEAE-52 纤维素预处理, 湿法装柱, 制备成 2 cm × 20 cm 的层析柱。DLP 的饱和溶液过滤后, 1.0 mL 上样, 以 0.1 mol/L 的 NaCl 为洗脱剂, 流速 1 mL/min, 每 10 min 收集一管, 苯酚-

基金项目 四川省教育厅自然科学研究项目 (13ZB0115); 绵阳师范学院项目 (MA2010005)。

作者简介 潘文慧 (1975-), 女, 湖北黄冈人, 讲师, 硕士, 从事色谱分析工作。

收稿日期 2016-07-14

硫酸法检测。以管号为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,作图。分别收集洗脱信号较大的部分,重复上样,合并相同的出峰部分。再将收集的洗脱信号较大的部分,分别上样再纯化,收集洗脱信号较大的部分,分别旋转蒸发浓缩,得到多糖 DLP1 和 DLP2。

1.2.2 多糖的纯度鉴定及相对分子质量的测定。 Waters 高效凝胶色谱系统, Ultrahydrogel Linear 色谱柱 (7.8 mm × 300.0 mm, 8 μm), 两柱串联, 2410 示差检测器, 流动相为 0.1 mol/L 硝酸钠缓冲液, 流速为 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 2 个多糖样品按照它们在提取液中的配比 (4:11) 配成溶液, 20 μL 进样, 以电信号 MV 为纵坐标, 时间为横坐标, 得到色谱图, 观察峰型。Dextran 标准多糖 (T10、T60、T120、T500、T1000 和 T2000), 按照相同条件进样, 以其重均分子量的对数 $\log M_w$ 对保留时间, 用 HPGPC 软件进行拟合处理, 求标准曲线, 对样品进行分子量测定。

1.2.3 多糖水解及组成分析。 2 个安瓿瓶中分别加入 5 mg DLP1 和 DLP2, 2 mL 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA), 封瓶, 120 °C 下高温水解 3 h, 取出放置待其冷却, 除去 TFA, 分别加入 10 mg 盐酸羟胺, 0.5 mL 无水吡啶, 振荡溶解, 90 °C 水浴反应 30 min 后, 冷却到室温, 加入 2 mL 无水醋酸酐于 90 °C 水浴中乙酰化 30 min, 进行衍生, 得到的产物减压蒸干, 残渣加入 0.5 mL 三氯甲烷溶解。取各单糖对照品约 2 mg, 按上述步骤乙酰化。

日本岛津公司 GC-14B 型气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器 (FID), HP-5 毛细管柱 (30 m × 0.22 mm, 0.25 μm); 载气 N_2 流速 1.0 mL/min, 氢气流速 40.0 mL/min, 空气流速 400.0 mL/min, 尾吹流量 10.0 mL/min。进样口 250 °C, 检测器温度 250 °C, 进样量 3 μL, 程序升温, 初始温度为 180 °C, 维持 1 min 后, 3 °C/min 升温至 250 °C, 250 °C 保持 20 min, 分流比为 20:1。

2 结果与分析

2.1 多糖的分离纯化及相对分子质量测定 碱法提取得到 DLP 2.733 g, 得率为 9.11%, 比水煮法提取率略高^[23]。粗多糖在初次 DEAE-52 柱上, 用 0.1 mol/L 的 NaCl 洗脱, 主要得到 2 种多糖, 如图 1。经 DEAE-52 纤维素柱再纯化后得到 DLP1 和 DLP2, 两者干燥后称重, 分别为 0.384 4 和 0.982 1 g。2 种多糖经高效凝胶渗透色谱鉴定, 其峰形基本

对称, 为单一的纯品多糖, 如图 2 所示。根据“1.2.2”方法得到标准曲线为 $\log M_w = -0.506 4 t_R + 13.508 8 (r = 0.999 3)$, 相对分子质量测定结果见表 1。

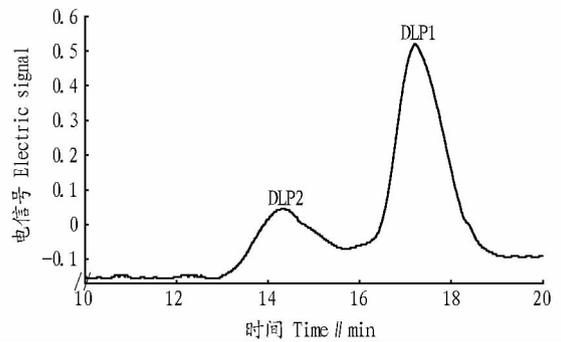


图 2 DLP1 和 DLP2 的凝胶色谱图

Fig. 2 Gel chromatograms of DLP1 and DLP2

2.2 多糖的组成成分 多糖经酸水解乙酰化后, 由气相色谱测定, 经样品与混标品图进行对照和峰面积比较, 得 DLP1 由岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成 (图 3), 其质量比为 111.25:17.81:1:12.43:2.43; DLP2 由岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成 (图 4), 其质量比为 198.22:3.27:9.16:25.06:10.96:1。

表 1 相对分子质量测定结果

Table 1 The determination result of relative molecular weight

多糖 Polysac- charide	保留时间 Retention time//min	重均分子量 (M_w) Weight-average molecular weight//u	数均分子量 (M_n) Number-average molecular weight//u	分布系数 Distribution coefficient $D(M_w/M_n)$
DLP2	14.33	1 780 000	998 000	1.78
DLP1	17.22	61 500	48 500	1.27

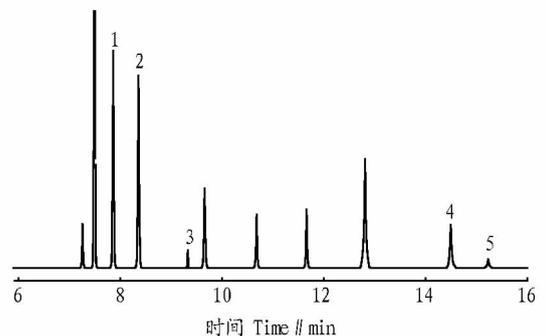


图 3 DLP1 的气相色谱图

Fig. 3 GC chromatogram of DLP1

3 结论

麻竹竹秆经碱提, 透析, 醇沉, DEAE-52 纤维柱分离纯化后, 得到 2 种多糖 DLP1 和 DLP2, 高效凝胶渗透色谱鉴别, 均为单一多糖, 其相对分子质量分别为 61 500 和 1 780 000 u。经气相色谱分析, 2 种多糖均由岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖等多种单糖组成。竹多糖具有多种的功效, 该实验对其分离纯化、相对分子质量测定和单糖组成分析, 为资源丰富但利用率低的竹的深入研究和有效开发利用提供重要的依据。

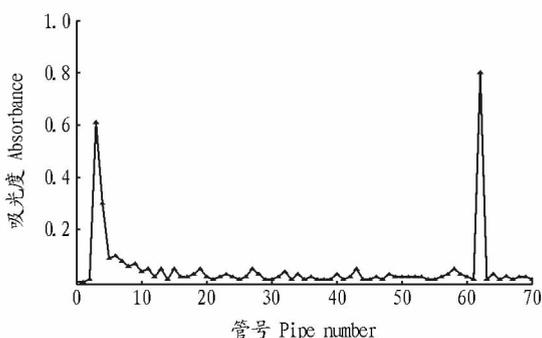


图 1 DLP 的 DEAE-52 柱层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of DLP by DEAE-52

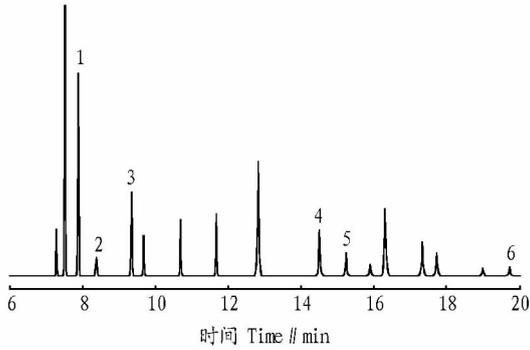


图4 DLP2的气相色谱图

Fig. 4 GC chromatogram of DLP2

参考文献

- [1] 喻谨, 汤锋, 岳永德, 等. ICP-MS 法分析 10 种笋竹属竹叶中矿质元素质量分数[J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(2): 19-22.
- [2] 成聘睿, 史正军, 刘瑞华, 等. 龙竹秆材化学成分分析[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(4): 236-239.
- [3] 唐国建, 杨金梅, 丁雨龙, 等. 空心箭竹化学成分的研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(15): 3679-3682.
- [4] 孟鑫, 谈旭, 掌权, 等. 绿液预处理对毛竹化学成分及酶水解糖化的影响[J]. 南京林业大学学报, 2014, 38(4): 118-122.
- [5] 姚曦, 岳永德, 汤锋. 梁山慈竹挥发油成分的 GC/MS 分析及抑菌活性评价[J]. 光谱实验室, 2013, 30(5): 2344-2350.
- [6] 姚曦. 梁山慈竹 (*Dendrocalamus farinosus*) 竹秆化学成分及生物活性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014: 66-71.
- [7] 李飞跃, 喻国光, 陈金珠, 等. 竹叶主要化学成分分析及其生物活性研究现状[J]. 江西林业科技, 2006(4): 34-36.
- [8] 任美玲, 吕兆林, 张柏林. 竹叶多糖的研究现状与进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 383-387.
- [9] 冯宇超, 王成章, 陈文英, 等. 不同品种竹叶多糖的化学特征及其含量研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(6): 81-85.
- [10] 黄伟, 张志发, 杜俊峰, 等. 箭竹多糖理化分析及对肿瘤抑制作用研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(7): 39-41.
- [11] 郭磊, 管雨晴, 李梅云. 慈竹竹叶多糖体外抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(16): 9-11.
- [12] 张海容, 白娟, 魏增云, 等. 超声萃取-响应面法优化淡竹叶多糖提取方法研究[J]. 化学研究与应用, 2013, 25(3): 303-310.
- [13] 任雪峰, 吴冬青, 林敏, 等. 响应面分析法优化玉竹多糖提取工艺[J]. 光谱实验室, 2013, 30(6): 3090-3097.
- [14] 李胜华, 郁建平. 竹叶多糖的提取工艺[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2006, 27(1): 118-121.
- [15] 周跃斌, 王伟, 李适, 等. 竹叶多糖提取条件的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(2): 206-209.
- [16] 毛燕, 王学利. 毛竹叶枝多糖提取的对比研究[J]. 林产化工通讯, 2001, 35(2): 11-13.
- [17] 陈亮, 张炜, 陈元涛, 等. 响应面法优化黑果枸杞多糖的超声提取工艺[J]. 食品科技, 2015, 40(1): 220-226.
- [18] 叶林, 张虹. 质谱及色谱-质谱联用技术在多糖结构分析中的应用[J]. 理化检验-化学分册, 2010, 46(11): 1355-1359.
- [19] 周跃斌, 王伟, 周向荣, 等. 毛竹竹叶多糖分离与纯化技术研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 156-159.
- [20] 姚曦, 岳永德, 汤锋. 梁山慈竹 (*Dendrocalamus farinosus*) 竹秆水溶性多糖的分离提取及结构分析[J]. 食品工业科技, 2015(20): 120-123.
- [21] 吴金松. 大叶麻竹笋多糖的分离纯化和鉴定[D]. 重庆: 西南大学, 2015: 57-77.
- [22] QIN H L, LI Z H, WANG P. A new furostanol glycoside from polygonatum odoratum[J]. Chinese chemical letters, 2003, 14(12): 1259-1260.
- [23] 刘康莲, 冯定坤, 贺银菊, 等. 超声波辅助法提取麻竹叶多糖及其工艺优化[J]. 食品科技, 2014, 39(10): 238-240.
- [24] MATHUR N, VYAS A. Changes in isozyme patterns of peroxidase and polyphenol oxidase by VAM fungi in roots of *Ziziphus* species[J]. J Plant Physiol, 1995, 145: 498-500.
- [25] 王明元, 夏仁学. 缺铁和过量重碳酸盐胁迫下丛枝菌根真菌对积活性氧代谢的影响[J]. 广西植物, 2010(5): 661-665.
- [26] 宰学明, 郝振萍, 张焕仕, 等. NaCl 胁迫下 AM 真菌对滨海叶片中抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 植物生理学报, 2013, 49(1): 41-46.
- [27] 曾广萍, 张霞, 刘红玲, 等. 盐胁迫下 AM 真菌对红花耐盐性的影响[J]. 植物生理学报, 2011, 47(11): 1069-1074.
- [28] HE Z Q, HE C X, ZHANG Z B, et al. Changes in antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress[J]. Coll Surf B; Biointerfaces, 2007, 59: 128-133.
- [29] CARET C T, GRIEVE C M. Mineral nutrition, growth and germination of *Antirrhinum majus* L. (Snapdragon) when produced under increasingly saline conditions[J]. Hortic Sci, 2008, 43: 710-718.

(上接第9页)

- [49] ALGUACIL M M, HERMANDEZ J A, CARAVACA F, et al. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrubs species afforested in a degraded semi-arid soil[J]. Physiol Plant, 2003, 118: 562-570.
- [50] RUOZ-LOZANO J M, AZCÓN R, PALMA J M. Superoxide dismutase activity in arbuscular-mycorrhizal *Lactuca sativa* L. plants subjected to drought stress[J]. New Phytol, 1996, 134: 327-333.
- [51] PALMA J M, LONGA M A, RÍO L A, et al. Superoxide dismutase in vesicular-arbuscular red clover plants[J]. Physiol Plant, 1993, 87: 77-83.
- [52] RUOZ-LOZANO J M, COLLADOS C, BAREA J M, et al. Clonig of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress[J]. J Exp Bot, 2001, 52: 2241-2242.
- [53] GHORBANLI M, EBRAHIMZADEH H, SHARIFI M. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean[J]. Biol Plant, 2004, 48: 575-581.