

毛竹叶水溶性多糖 BPS1_1 的色谱研究

周跃斌¹, 周向荣^{1,2}, 王 伟³

(1.湖南农业大学产业处, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省标准化研究院, 湖南 长沙 410007;

3.湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 将毛竹叶多糖粗提物通过柱色谱进行分离后得到 BPS1_1, 运用紫外扫描、薄层色谱、气相色谱对 BPS1_1 的理化性质进行了实验。结果表明, BPS1_1 的理化性质与文献报道的结果相似; 其单糖组成: 未知单糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖分别为 0.50%、4.42%、13.90%、6.63%、11.49%、46.06%、17.00%, 与文献报道结果不同。

关键词: 毛竹叶; 水溶性多糖; 柱色谱; 薄层色谱; 气相色谱

Study on Characteristics of Water Soluble Polysaccharide BPS1_1 Extracted from *Phyllostachys pubescens* Leaves by Chromatography

ZHOU Yue-bin¹, ZHOU Xiang-rong^{1,2}, WANG Wei³

(1.Product Agent, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Chin;

2.Hunan Standardization Institute, Changsha 410007, Chin;

3.Research Center for Natural Products, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The polysaccharides from *Phyllostachys pubescens* leaves were purified by DEAE-52 cellulose column chromatography and Sephadex G-75 glucan gel column chromatography successively, and a kind of polysaccharide named as BPS1_1 was obtained. In order to study the physicochemical characteristics of the polysaccharide, ultra violet spectroscopy (UV), thin-layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC) were employed. Results showed that the components of the polysaccharide include an unknown monosacchride, rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galatose with contents of 0.50%, 4.42%, 13.90%, 6.63%, 11.49%, 46.06% and 17.00%, respectively. These are remarkably different from data reported in the past literatures.

Key words: *Phyllostachys pubescens* leaves; water soluble polysaccharide; column chromatography; thin-layer chromatography; gas chromatography

中图分类号: Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)08-0027-04

竹叶多糖(BPS)是一种具有多种生理功能和开发价值的植物活性多糖, 临床试验和动物试验均证明竹叶多糖有抗癌^[1]、调节免疫^[2]以及抗氧化^[3-5]等作用, 对人体有独特的保健功效, 从而引起生物学家、药理学家和化学家的极大兴趣。日本从 60 年代起就对竹(*sasa albom arg inata*)多糖进行了深入研究, 证实竹多糖具有明显的药用效果^[6], 国内外对竹叶多糖的研究以前多集中在箬叶^[6-8]等上, 而毛竹(*Phyllostachys pubescens*)作为我国南方最主要的经济竹种之一, 占我国竹林总面积的 70%^[9], 有着箬叶无可比拟的资源优势, 因此近年来已逐渐成为国内研究的热点, 国内对毛竹叶多糖的研究多集中

在药理作用^[10]、提取^[11-12]等方面, 而对多糖进一步的分离、纯化、结构测定、结构和功能关系等方面的研究工作远远不能满足实际的需要, 本实验通过水提醇沉法获得毛竹叶多糖, 采用柱色谱技术进行分离纯化, 薄层色谱和气相色谱对其单糖的组成成分进行分析, 以期为毛竹叶保健资源的深度开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样品为 3~5 年毛竹叶, 于 2006 年 12 月采自湖南益阳, 经洗净低温烘干后粉碎, 取过 60 目筛产品, 采用

收稿日期: 2008-04-15

基金项目: 湖南省科技厅项目(B-138)

作者简介: 周跃斌(1963-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为天然产物研究与开发。E-mail: chowyuebin@163.com

提取温度 70℃、时间 20min、固液比 1:20、浸提 3 次的超声波提取法获得竹叶多糖提取物(BPS)。

1.2 试剂

95% 乙醇、氯仿 长沙市湘科精细化工厂；丙酮、正丁醇、浓硫酸、三氟乙酸、二苯胺、D-葡萄糖、D-甘露糖、L(+)-鼠李糖 国药集团化学试剂有限公司；苯酚、氯化钠 武汉江北化学试剂有限公司；苯胺 中华医药集团上海化学试剂；乙酸乙酯 天津科密欧化学试剂开发中心；D-半乳糖、L(+)-阿拉伯糖、D-木糖 上海试剂二厂；二甲基亚砜(DMSO) Sigma 公司；PMS Promaga 公司。以上试剂均为分析纯。

1.3 仪器与设备

LD5-10 型离心机 北京医用离心机厂；Buchi R-200 旋转蒸发器 瑞士 Buchi 公司；ALPHA 1-2L 型冷冻干燥机 德国 Marin Christ 公司；层析柱(1.6 × 60、2.6 × 30)、分部收集器 上海亚荣化学仪器厂；BT00-300M 型恒流泵 保定兰格恒流泵有限公司；DHG-9246A 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏试验设备有限公司；4504MP 微量电子天平 瑞士 Startorius 公司；UV-2550 型紫外分光光度计 日本岛津公司，CAMAG III 高效薄层色谱(HPTLC) 瑞士卡玛公司；SP-6890 气相色谱仪 山东鲁南瑞虹加工仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 毛竹多糖的分离与纯化

将 BPS 用 Sevag 法脱蛋白质，乙醇分级沉淀，收集 DEAE-52 纤维素柱层析主要洗脱峰 BPS1，进一步用 Sephadex 葡聚糖凝胶柱 G-75 层析纯化，冷冻干燥后得到竹叶多糖 BPS1₁。

1.4.2 竹叶多糖的分离

DEAE-52 纤维素经蒸馏水、0.5mol/L NaOH、0.5mol/L HCl 预处理后，制备纤维素层析柱，层析柱(Φ 2.6 × 20cm)，有效柱长 16cm。床体积为 84.9ml。BPS 饱和溶液上样体积为 8.0ml。选择 NaCl 溶液为洗脱剂进行梯度洗脱，控制流速为 1ml/min。用试管每 5min 收集 1 管。

1.4.3 竹叶多糖的纯化

Sephadex 葡聚糖凝胶，用蒸馏水、0.5mol/ml NaOH、0.1mol/ml NaCl 溶液预处理。选用 Φ 1.6 × 60cm Sephadex 凝胶柱，有效长度 55cm，床体积 110ml。取 2ml(约 30mg)BPS 液上样。以 H₂O、0.1mol/ml NaCl 溶液为脱液进行梯度洗脱，调节洗脱液的流速：在 0.1BV/h，分部收集，每 12min 收集 1 管，G-75 凝胶柱层析每管 1.5ml；G-100 凝胶柱层析的每管 2.0ml。用硫酸-苯酚法逐管检测各管洗脱液的吸光度。

1.4.4 竹叶多糖的水解

取 20mg 多糖样品 BPS1₁，置于 8ml 安培管中，加

2mol/L TFA 4~6ml，封管，于 121℃ 水解 2.0h。

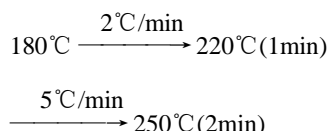
1.4.5 薄层色谱分析

水解完毕，冷却，溶液于 40℃ 下减压浓缩至干，加 3ml 甲醇蒸干，重复操作 4~5 次，以除尽 TFA。然后加 0.5ml 蒸馏水溶解样品，取 5μl 在硅胶板上与标准单糖对照进行薄层分析，初步测定多糖样品的单糖残基种类，并判断水解反应是否完全。

展开剂为乙酸乙酯:甲醇:冰醋酸:水(12:3:3:2)。显色剂为苯胺-二苯胺 85% 磷酸液，喷洒后于 110℃ 加热烘烤 10min 显色。

1.4.6 GC 色谱分析

取多糖水解样 15mg 和标准单糖各 10mg，依次加入盐酸羟胺 10mg、吡啶 0.5ml，90℃ 水浴反应 30min 并振荡，取出后冷却至室温，加入醋酸酐 0.6ml 90℃ 水浴继续反应 30min 进行乙酰化，生成具有挥发性的糖腈乙酸酯衍生物，将反应产物直接进行气相色谱分析，并根据气相色谱各峰的面积比计算出单糖重量百分比。色谱条件：SP-6890 气相色谱仪；HP-5 毛细管柱(30m × 0.25mm, 0.25μm)；汽化室温度 250℃，检测器温度 300℃，柱温 180℃；程序升温：



FID 检测器；载气流速 1ml/min；分流 14.5ml/min，吹扫 4.0ml/min。

2 结果与分析

2.1 毛竹叶多糖 BPS 分离纯化

竹叶多糖用 DEAE-52 纤维素柱层析经 H₂O、0.1、0.3、0.5mol/ml 的 NaCl 溶液梯度洗脱后得到 4 个级份(见图 1)，即 BPS1(H₂O)、BPS2(0.1mol/ml NaCl)、BPS3(0.3mol/ml NaCl)、BPS4(0.5mol/ml NaCl)，收集主要组分 BPS1 进一步分析。对 BPS1 进一步洗脱，以水洗脱的曲线拖尾比较严重，选用 0.1mol/ml NaCl 溶液进行洗脱可以减少拖尾。因为葡聚糖凝胶系弱酸性物质，每 g 葡聚糖凝胶干胶中含 10~20μg 当量的羧基基团，该基团能与分离物中的电荷基团发生非特异性吸附作用，加入一定浓度的缓冲盐可以抑制凝胶的这种吸附作用，同时可减少洗脱峰的拖尾现象(图 2)。竹叶多糖 BPS1 经进一步分离纯化，减压浓缩，透析袋透析，冷冻干燥后，得到白色粉末状图 1、2 竹叶多糖 BPS1₁，

2.2 物理性质

竹叶多糖 BPS1₁，其易溶于水，不溶于乙醇、丙酮和甲醇等高浓度的有机溶剂，其溶液呈中性，pH7.0；

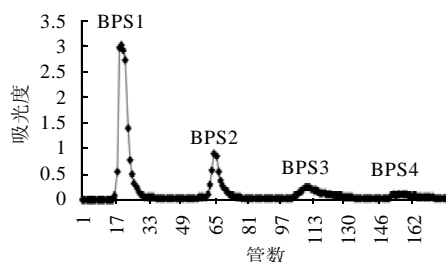


图1 BPS的DEAE柱层析洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of BPS by DEAE

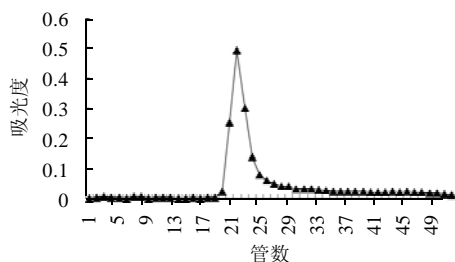


图2 BPS1的G-75 0.1mol/L NaCl洗脱曲线
Fig.2 0.1 mol/ml NaCl elution curve of BPS1 by G-75

I2-KI 试剂和茚三酮反应为阴性,说明 BPS1_1 中不具有淀粉结构,不含有蛋白质;与苯酚-硫酸、Molish 反应为阳性,说明 BPS1_1 具有糖的通性。

2.3 竹叶多糖的紫外-可见光谱分析

分别取一定量的 BPS1_1, 用二次蒸馏水配成溶液,在紫外-可见分光光度计上从波长 600nm 扫描到 200nm 的所得谱图见图 3。从图 3 可以看出,280nm、260nm 处的吸收很低,即无蛋白质(λ_{280nm})和核酸(λ_{260nm})^[6]。

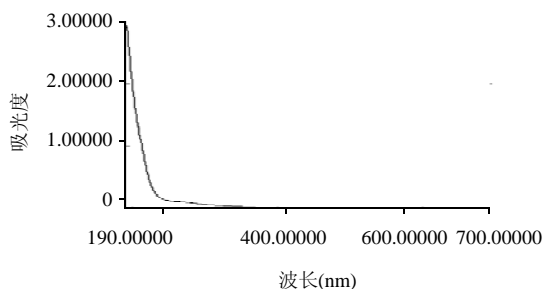


图3 BPS1_1 的紫外-可见光扫描图谱
Fig.3 UV-VIS scanning spectrogram of BPS1_1

2.4 竹叶多糖的水解及薄层色谱分析

由图 4 可初步判断 BPS1_1 中含有 D-甘露糖、D-半乳糖、葡萄糖、L(+)-阿拉伯糖等。

2.5 GC 色谱分析

竹叶多糖是一种中等相对分子质量的杂多糖,其组成及含量因品种、产地、栽培管理水平、采收季节、原料老嫩、加工方式和研究方法等不同而有所差异。经分析在竹叶多糖糖腈衍生物气相色谱图谱(图 5)中



图4 竹叶多糖水解液薄层色谱图
从左到右依次为: D-甘露糖、D-木糖、D-半乳糖、样 1、样 2、葡萄糖、L(+)-阿拉伯糖。

图4 竹叶多糖水解液薄层色谱图
Fig.4 TLC chromatogram of hydrolysate of BPS

有 8.807、9.241、9.647、9.876、15.743、16.312、17.028min 属于单糖吸收峰,对应标准单糖图谱(图 6)上各自单糖为: 9.241min 对应 9.525min(鼠李糖), 9.647 对应 9.906 min(L(+)-阿拉伯糖), 9.876min 对应 9.989min(木糖), 15.743min 对应 15.641min(甘露糖), 16.312 对应

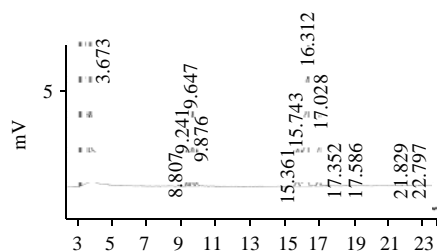
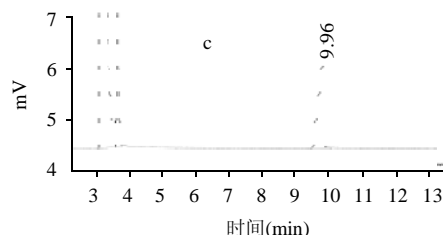
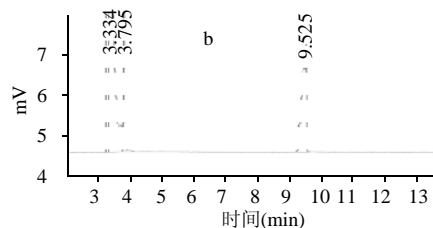
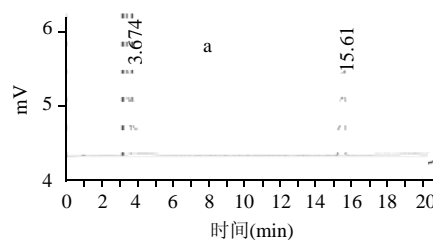
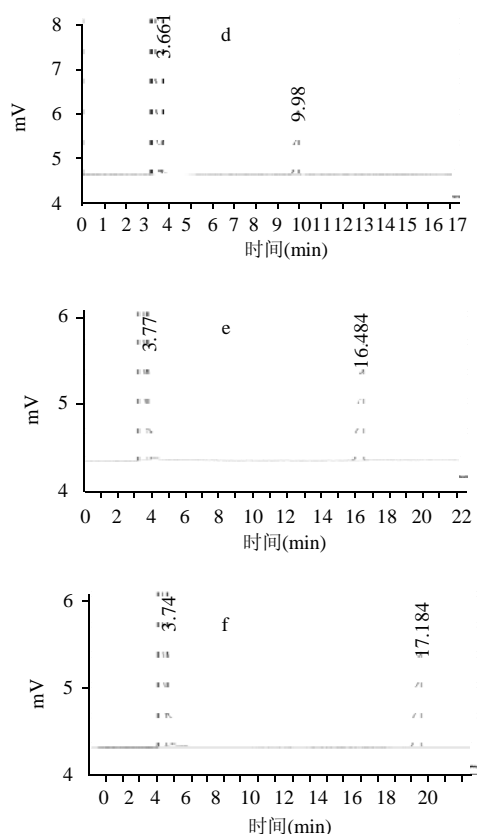


图5 竹叶多糖糖腈衍生物气相色谱图
Fig.5 GC chromatogram of BPS





a. 甘露糖; b. 鼠李糖; c. 阿拉伯糖; d. 木糖; e. 葡萄糖; f. 半乳糖。

图6 标准单糖气相色谱

Fig.6 GC chromatograms of standard monosaccharide

表2 竹叶多糖糖腈衍生化气相色谱出峰面积

Table 2 GC peak area of BPS

峰号	1	2	3	4	5	6	7	总计
名称	未知单糖	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖	
保留时间(min)	8.807	9.241	9.647	9.876	15.743	16.312	17.028	
峰面积(UV·s)	148	1313	4129	1970	3414	13683	5052	29709
含量(%)	0.50	4.42	13.90	6.63	11.49	46.06	17.00	100

16.484min(葡萄糖)和17.028min对应17.184min(半乳糖), 8.807min处有一小峰,可能为一未知单糖,因此竹叶多糖由7种单糖组成,分别是鼠李糖、L(+)-阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和一未知单糖。由此也验证了薄层色谱分析结果。

根据面积归一化法,峰面积之比等于所含物质质量比,经推算可以得出各个单糖摩尔比大致为:鼠李糖:阿拉伯糖:木糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖=2.91:9.27:4.42:6.38:25.59:9.44。与文献报道的竹叶多糖极不相同。日本Kazumori K报道,日本箬竹叶多糖组成为:木糖46%,阿拉伯糖22%,葡萄糖16%,半乳糖16%。丁玉强等^[6]采用纸色谱和气相色谱法研究了从湖北恩施地区生长的箬竹叶中分离纯化的水溶性多糖的单糖组成为:鼠李糖

14%、岩藻糖53%、甘露糖12%、葡萄糖6%、半乳糖13%。唐莉莉等^[13]从毛竹叶中提取得一种中等相对分子质量的酸性杂多糖,根据标准品与样品的保留时间确定单糖种类,GC分析表明:组成BPS的糖基主要是鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖6种,其摩尔比为0.13:1.08:0.24:0.52:2.84:0.95,其中以葡萄糖为最多,HPLC法得到其分子量分布范围为 $10^3 \sim 10^5$ 。

3 结论

本实验确定了水溶性竹叶多糖的理化性质及其单糖组成,毛竹叶多糖BPS1_1为白色粉末状,易溶于水,不溶于乙醇、丙酮和甲醇等高浓度的有机溶剂,其溶液呈中性,pH7.0,不具有淀粉结构,不含蛋白质,具有糖的通性。

应用高效薄层色谱和气相色谱相结合确定了毛竹叶多糖单糖组成为:未知单糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖分别为0.50%、4.42%、13.90%、6.63%、11.49%、46.06%、17.00%,与文献报道结果不同。

参考文献:

- [1] 唐莉莉,徐榕榕,丁霄霖. 竹叶多糖对小鼠移植瘤的抑制作用[J]. 无锡轻工业大学学报,1998,17(3): 62-65.
- [2] 陈春英,黄雪华,周井炎,等. 硫酸酯化箬叶多糖的结构修饰及其抗艾滋病病毒活性[J]. 药学报,1998,33(4): 264-268.
- [3] 陈春英,罗湘,周井炎,等. 箬叶多糖及其化学修饰物、亚硒酸钠和GSH对Cu²⁺诱导的LDL氧化修饰的保护作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1998,14(4): 427-431.
- [4] 姚志湘,粟晖,韦建平,等. 竹叶中有效成分的提取条件及抗氧化活性的研究[J]. 广西工学院学报,2000,11(1): 57-59.
- [5] ZHANG Y, TIE X W, BAO B, et al. Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats[J]. British Journal of Nutrition, 2007, 97: 484-494.
- [6] 丁玉强,陈春英,ELMAHADI E A,等. 箬叶水溶性多糖的色谱研究[J]. 色谱,1996,14(6): 470-472.
- [7] CHEN C Y, DING Y Q, ELMAHADI E A. Study on the isolation, purification and physicochemical properties of polysaccharides from *Indocalamus tessellatus*[J]. Biomedical Chromatography, 1999, 13(1): 11-14.
- [8] 李水芳,文瑞芝,曾栋,等. 阔叶箬竹叶和箬竹叶中挥发油的提取及成分分析[J]. 色谱,2007,25(1):53-57.
- [9] 陆志科,廖威. 毛竹叶化学成分的初步测定[J]. 山西大学学报: 自然科学版,2003,26(1): 46-48.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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,2006,32(2):206-209.
- [13] 唐莉莉,丁霄霖. 竹叶多糖的分离提取及其生物活性研究[J]. 食品研究与开发,2000(1): 8-10.