

沙枣多糖 EAP-2 的提取纯化及初步分析

王青宁¹, 吕兴连¹, 彭韵硕², 武季玲²

(1. 兰州理工大学石油化工学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730060)

摘 要: 沙枣果肉干粉经脱脂, 热水提取, 醇析, 三氯乙酸结合四次 Sevag 法脱蛋白, 活性炭脱色得到沙枣多糖(EAP)粗品, 再经 DEAE-纤维素柱层析、透析得到纯化的 3 个级分 EAP-1、EAP-2 和 EAP-3。对糖含量较高的精多糖 EAP-2 进行定性化学反应和紫外光谱鉴定表明, EAP-2 不含蛋白质、核酸和淀粉, D-半乳糖醛酸的含量为 2.3%。经高效液相色谱对 EAP-2 的单糖基分析表明, EAP-2 中含有 L-鼠李糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-甘露糖、D-葡萄糖及 D-半乳糖 7 种中性糖。红外光谱鉴定表明, EAP-2 具有多糖类物质的结构特征。

关键词: 沙枣; 多糖; 提取纯化; 初步分析

Extraction, Purification and Preliminary Analysis of *Eleagnus angustifolius* L. Polysaccharide-2

WANG Qing-ning¹, LU Xing-lian¹, PENG Yun-shuo², WU Ji-ling²

(1. College of Petrochemical Technology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

2. College of Life Sciences and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730060, China)

Abstract: The crude *Eleagnus angustifolius* L. polysaccharide was obtained by a series of steps of degreasing, hot water extraction, alcohol precipitation, trichloroacetic acid treatment and further purified four times Sevag deproteinization and decoloring. EAP-1, EAP-2 and EAP-3 were gained by DEAE-cellulose and dialysis method. Qualitative chemical reaction and UV analysis indicated that EAP-2 is an acid polysaccharide with 2.3% D-galacturonic acid and without any protein, nuclear acid and starch. The units of the neutral monosaccharide are identified by HPLC as rhamnose, xylose, arabinose, fructose, mannose, glucose and galactose. The polysaccharide structure of EAP-2 is identified by IR.

Key words: *Eleagnus angustifolius* L.; polysaccharides; extraction and purification; preliminary analysis

中图分类号: S789.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0043-04

沙枣是胡颓子科胡颓子属落叶灌木, 分布于我国“三北”地区和中西亚半干旱一带的区域, 沙枣果实具有多种药物用途和营养价值, 沙枣果实浸出物的浓缩液有抗炎作用, 可用于肠炎, 腹泻的治疗, 是我国新疆、伊朗和土耳其民间治疗作呕和胃胀的传统药方^[1-2]。药理实验也表明, 对实验引起腹泻的动物, 有抑制小肠运动功能^[3]。目前, 对于沙枣多糖(*Eleagnus angustifolius* L. polysaccharides, 简称 EAP)的研究, 国内外均未见报道。本文对沙枣多糖进行了提取纯化, 分析了其基本理化性质, 并对纯化级分 EAP-2 的结构、成分和单糖基进行了初步分析, 这对系统研究沙枣多糖的结构以及进一步弄清其结构与功能的关系具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

沙枣(成熟时采摘, 果实呈矩圆形, 长 18~25mm,

直径 8~15mm) 新疆产, 由甘肃农科所提供; DEAE-Cellulose 上海试剂二厂; D-半乳糖醛酸 Sigma 公司; RC-38-1000 透析袋 Pharmacia 公司; 三氯乙酸 日本 NACALAI TESQUE 公司; 其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2 仪器

FlashEA1112 元素分析仪 美国 Finnigan 公司; Nexus670FT-IR 红外光谱仪 美国 Nicolet 公司; HP1100 型高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司; CR-22G 高速离心冷冻机 日本 Hitachi 公司; U-2001 紫外分光光度计 日本 Hitachi 公司; DZF-6020 真空干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; LGJ- 型冷冻干燥机 上海医用仪器厂。

1.3 沙枣多糖的提取^[4]

沙枣果肉干粉, 以 95% 的乙醇室温浸提四次, 残渣于通风处自然凉干后按一定的液料比加入蒸馏水, 回

收稿日期: 2005-11-10

作者简介: 王青宁(1958-), 女, 副教授, 主要从事生物化工和精细化学品的研究。

流提取 3 h, 重复多次。合并提取液, 浓缩, 离心除去不溶物, 在缓慢搅拌下, 向上清液不断加入一定量 95% 的乙醇(终质量浓度为 75%), 低温静置过夜, 虹吸上清液, 下层于 4℃ 下离心(3000r/min, 30min), 收集沉淀物, 先后以 95% 乙醇、无水乙醇、无水丙酮洗涤后复溶于水, 先用三氯乙酸除去大部分蛋白质, 再经四次 Sevag 脱蛋白法去除残留的蛋白质, 活性炭脱色, 减压浓缩, P_2O_5 真空干燥, 得到去除部分杂质的沙枣多糖。

1.4 EAP 粗品的纯化

取 1.3 得到的 EAP 粗品 1.8g 上 DEAE- 纤维柱(2.6 × 60cm), 以含 NaCl 为 0.05 ~ 1.5mol/L 的 PBS 溶液(pH7.6) 梯度洗脱, 控制流速 1ml/min, 每管按 4ml 收集, 隔管检测, 苯酚- 硫酸显色, 作洗脱曲线。分别收集各主峰部分的洗脱液, 减压浓缩, 浓缩液对水透析, 真空冷冻干燥后分别得到相应纯化的级分。

1.5 EAP 粗品得率计算

按公式 $w(\text{多糖得率}) = (\text{EAP 粗品重} / \text{沙枣粉实体干重}) \times 100\%$ 计算沙枣多糖得率。

1.6 EAP 粗品的理化性质和纯度分析

溶解性测定; 碘- 碘化钾反应; 斐林试剂反应; 中性糖含量由苯酚- 硫酸法测定^[5]; 半乳糖醛酸含量由咔唑- 硫酸法测定^[6]; 蛋白质的含量由考马斯亮蓝法测定; 碳、氢和氮元素含量的测定。

1.7 紫外扫描分析

取 EAP-2 适量, 溶解于适量蒸馏水配成 1.5mg/L 的水溶液, 经 U-2001 紫外分光光度计于 200 ~ 360nm 扫描。

1.8 多糖分子构型分析

取 2mg EAP-2, 经 KBr 压片, 扫描范围为 4000 ~ 650 cm^{-1} 。

1.9 EAP-2 单糖基组成分析^[7]

精确称取 EAP-2 6.5mg, 加入 6ml 2mol/L CF_3COOH , 封管, 110℃ 水解 5 h, 将多糖水解液减压浓缩, 加入 4ml 甲醇, 减压抽干(反复处理 3 次), 加入 1.2ml 蒸馏水溶解, 完全酸水解产物水溶液过 0.45 μm 滤膜后, 用 HPLC 进行分析测定, 同时用标准混合糖作对比。

标准混合糖溶液的配制: 配制浓度均为 1500mg/L 的九种糖或糖醛酸的贮备液, 进样前用蒸馏水稀释至工作溶液要求的浓度。

HPLC 条件^[8]: ZORBAX 糖分析色谱柱(4.6 × 250mm), 示差折光检测器(RID); 柱温: 35℃; 检测池温度: 35℃; 流动相: 乙腈: 乙酸乙酯和: 水 = 75: 10: 15 (体积比); 阶梯洗脱: 0 ~ 12min, 1.2ml/min; 12 ~ 15min, 2.0ml/min。

2 结果与分析

2.1 提取条件的确定

2.1.1 沙枣粉颗粒度和固液比

沙枣粉的颗粒度越小, 越有利于多糖的浸出, 但沙枣粉容易结块, 不利于过滤操作。固液比过小, 可提高多糖的浸出率, 但提取时间变长, 提取能耗增大。在提取试验中发现, 当沙枣粉的颗粒度在 20 目、固液比为 1:10 时, 沙枣粉恰能全部浸入溶剂, 此时过滤操作较为容易, 所需溶剂最少, 单次提取多糖得率达 0.43% (回流提取 2h) 与相同条件下固液比为 (1:12) ~ (1:15) 得到的多糖得率 0.45% ~ 0.49% 相差不大。从节约溶剂和能耗、过滤操作及多糖得率考虑, 选用 20 目的沙枣粉, 提取固液比为 1:10 较佳。

2.1.2 提取次数和时间

在固液比为 1:10 的条件下, 做四组提取试验, 每组提取 1 次, 其他条件同 1.3, 提取时间与多糖得率及纯度的关系见表 1。

表 1 提取时间与多糖得率及纯度的关系

Table 1 The relationship between extract time and yield and purity

提取时间(h)	多糖得率(%)	纯度(%)
2.0	0.43	83.7
2.5	0.58	75.3
3.0	0.69	77.4
3.5	0.71	76.5

从表 1 可知, 随着提取时间的延长, 沙枣多糖的得率逐渐提高, 而多糖纯度变化规律则不明显, 提取 3.5 h 与 3 h 的多糖得率基本一致。因此, 从节约时间考虑, 选择第一次提取时间 3 h 为宜。

在回流提取条件下, 试验分三组进行, 每组进行 3 次试验, 第一组试验 3 次的提取时间分别为 3、3 和 1 h, 第二组试验 3 次的提取时间分别为 3、2 和 1 h, 第三组试验 3 次的提取时间分别为 3、1 和 1 h, 提取次数与多糖得率的关系见表 2。

表 2 提取次数与多糖得率的关系

Table 2 The relationship between extract times and yield

项目	第一组			第二组			第三组		
提取次数	1	2	3	1	2	3	1	2	3
提取时间(h)	3	3	1	3	2	1	3	1	1
多糖得率(%)	0.66	0.28	0.05	0.65	0.23	0.08	0.65	0.19	0.09
总得率(%)	0.99			0.96			0.93		

从表 2 可见, 三组多糖平均得率的变化范围均较小, 第一组和第二组得到的多糖得率最高。第一组提取 2 次(3、3h)与提取 3 次(3、3、1h)得到的平均得率(分别为 0.94% 与 0.99%)变化不大; 第二组提取 2 次(3、2h)与提取 3 次(3、2、1h)得到的平均得率(分别为 0.88% 与 0.96%)变化也不大。从节约时间和简化操作步骤以及

综合多糖得率上考虑,选择回流提取次数为2次,每次3h较适宜。

综上所述,沙枣多糖最佳提取工艺条件为:沙枣粉:水=1:10(g/ml);回流提取2次,每次3h;沙枣粉的颗粒度为20目;多糖溶液的醇沉浓度为75%。

按上述优化的提取条件进行了3次提取试验,多糖提取率分别为0.73%、0.73%和0.75%(平均值为0.737%),对应的多糖纯度分别为79.2%、80.6%和78.7%(平均值为79.5%),提取率和纯度的相对标准偏差RSD值分别为1.57%和1.24%,说明该工艺条件具有较好的重现性。

2.2 EAP粗品分析

EAP粗品呈浅棕色,由此可见,活性炭的脱色效果并不理想,这些色素可能与沙枣多糖中含有的酚酸类物质有关^[9];吡唑-硫酸反应测得EAP粗品中的D-半乳糖醛酸含量为5.4%;元素分析测得EAP粗品中碳、氢、氮的含量分别为42.17%、6.33%和1.04%(质量分数)。

2.3 EAP粗品纯化及EAP-2的理化性质分析

EAP粗品经DEAE-Celulose柱分离纯化得到三个级分,如图1所示。各级分的收率(以EAP粗品计)分别为EAP-1(33%)、EAP-2(38%)和EAP-3(12%)。对层析图谱峰形较为对称、糖含量较高的EAP-2进行了进一步研究,EAP-2的冻干品呈浅黄色絮状固体,无味,易溶于热水,不溶于无水乙醇、甲醇、丙酮、甲苯、氯仿等有机溶剂。EAP-2与碘-碘化钾反应呈阴性,表明EAP-2中不含淀粉;EAP-2与斐林试剂反应呈阴性,表明EAP-2中不含游离单糖。吡唑-硫酸反应测得EAP-2中的D-半乳糖醛酸的含量为2.3%。

苯酚-硫酸法测得沙枣果肉、EAP粗品及EAP-2的中性糖含量分别为3.24%、62.16%及97.6%,在通过粗提纯化了19.2倍的基础上,通过DEAE-celulose又纯化了1.6倍,EAP-2含有的中性糖纯度高,该纯化工艺具有较好的操作性。

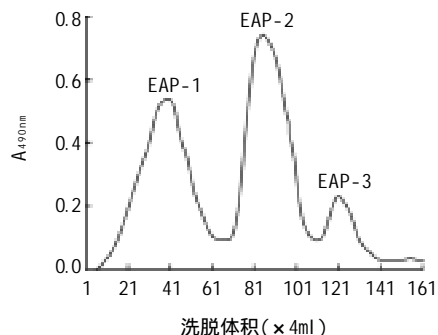


图1 EAP-2在DEAE-纤维素柱上的流出曲线
Fig.1 The flow curve of EAP-2 on DEAE-cellulose

2.4 EAP-2的紫外扫描分析

取EAP-2适量,配成1.5mg/L的水溶液,经紫外

扫描分析表明,其蛋白质吸收峰(280nm)不明显,见图2,表明EAP-2基本上不含蛋白质(考马斯亮蓝法定量测得EAP-2中蛋白质的含量约为0.8%,这些蛋白质与糖结合在一起形成糖蛋白缀合物,一般难以去除。),无核酸(260nm)和其它杂质吸收峰。

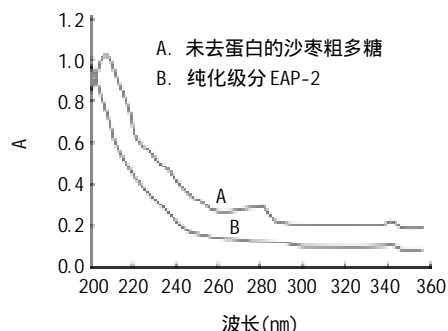


图2 EAP-2及未去蛋白的EAP粗品紫外光谱图
Fig.2 UV spectrum of EAP-2 and crude *Eleagnus angustifolius* L. polysaccharide

2.5 EAP-2的红外分析

红外光谱可用于检测多糖中糖苷键的结构和构型。EAP-2的红外扫描结果见图3,特征吸收峰及归属如下:宽而强的峰 3417.96cm^{-1} ,O-H伸缩振动峰,表明多糖中存在分子内和分子间的氢键; 2934.60cm^{-1} ,C-H伸缩振动峰; 1607cm^{-1} ,C=O非对称伸缩振动峰; $1425.48\sim 1243.76\text{cm}^{-1}$,C-H变角伸缩振动峰; 1146.51cm^{-1} ,C-O伸缩振动峰; 1097.53cm^{-1} ,O-H变角振动峰; 959.01cm^{-1} ,末端脱氧糖-CH₂振动峰; 894.41cm^{-1} 处有吸收峰,是吡喃糖型C-H变角振动的特征吸收峰,表明EAP-2有糖苷键。

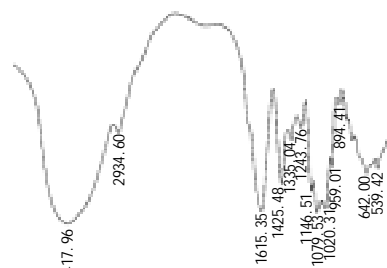
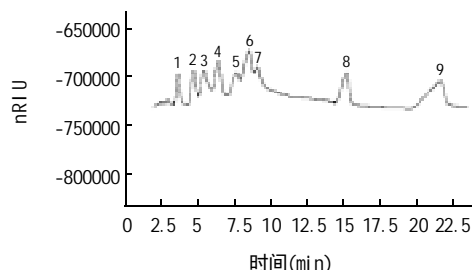


图3 EAP-2的红外光谱图
Fig.3 IR spectrum of EAP-2

2.6 EAP-2的单糖基组成

传统定性分析多糖中单糖基的方法主要是纸层析和薄层层析,纸层析也可以作为定量分析,但准确度和重现性不及高效液相色谱法,衍生化法可以很大程度提高糖分析的检测灵敏度,但操作繁琐,不可避免地会引入误差。本文在参考文献[8]的基础上,采用适当的流动相,以HPLC完成了EAP-2中中性单糖基的分析,

能把各种单糖的峰分开,其分离效果较好。标准糖的 HPLC 色谱图见图 4 所示,各种糖的出峰顺序依次为: L-鼠李糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-蔗糖和 D-乳糖。



标准糖: L-鼠李糖(3.6min); D-木糖(4.7min); L-阿拉伯糖(5.4min); D-果糖(6.3min); D-甘露糖(7.6min); D-葡萄糖(8.4min); D-半乳糖(9.0min); D-蔗糖(15.1min); D-乳糖(21.5min)。

图4 标准糖的 HPLC 分析色谱图

Fig.4 HPLC chromatography of standard mixture of carbohydrate

采取与标准糖色谱保留时间相对照的方法,经 HPLC 分析表明, EAP-2 由 L-鼠李糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-甘露糖、D-葡萄糖和 D-半乳糖

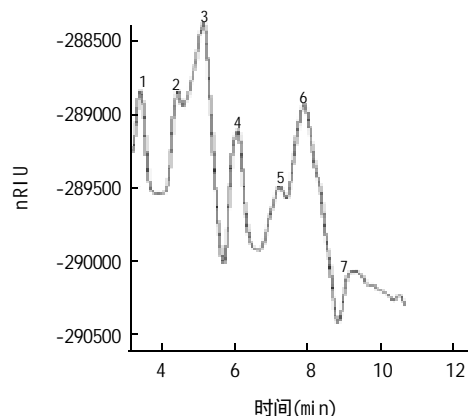


图5 EAP-2 样品的 HPLC 分析色谱图

Fig.5 HPLC chromatography of EAP-2 sample

组成,样品 EAP-2 的 HPLC 色谱图如图 5 所示。

从图 5 可见, EAP-2 的单糖基中主要含有 L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-葡萄糖组分,而 D-木糖、D-甘露糖和 D-半乳糖的含量较少,不含有 D-蔗糖和 D-乳糖组分。

3 结 论

本文主要研究了沙枣多糖的提取和纯化工艺,首次对沙枣多糖及其纯化级分的理化性质和结构进行了初步分析,得出了 EAP-2 主要是由 L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-葡萄糖为主的 7 种中性糖与含量为 2.3% 的 D-半乳糖醛酸组成的酸性杂多糖。多糖的结构和活性研究是多糖研究领域的难点,目前还没有沙枣多糖研究的报道,这将为进一步研究沙枣多糖的性质、结构以及生物活性奠定了基础。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1162-1164.
- [2] AHMADIANI A, HOSSEINY J, SEMNANIAN S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2000, 72: 287-292.
- [3] HOSSEINZADEH H, RAMEZANI M, NAMJOB N. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruit seeds in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 84: 275-278.
- [4] 江发寿, 刘金荣, 但建明, 等. 沙枣多糖的超声提取和含量测定[J]. 西北药学杂志, 2002, 17(1): 13-14.
- [5] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31: 550.
- [6] 郭欣, 高向东, 杨晓兵. 酸性多糖中的葡萄糖醛酸与中性糖的含量测定[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(2): 100-101.
- [7] 杨云, 孟江, 冯卫生, 等. 大枣酸性多糖 ZJ-6 的化学研究[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 55-58.
- [8] 赵仁邦, 刘孟军, 葛微, 等. 高效液相色谱法测定枣中的糖类物质[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 138-142.
- [9] AYAZ F A, BERTOFT E. Sugar and phenolic acid composition of stored commercial oleaster fruits[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2001, 14: 505-511.

信 息

Honest 公司推出新型塑料茶饮包装

近日, Honest 茶公司推出了一种可用于包装有机即饮茶饮料的新型塑料瓶, 这种塑料瓶不仅线条少, 使人们看上去更加圆滑, 而且很容易突出该种有机茶饮料的保健、低糖特点, 十分引人注目。

据悉, 这种塑料茶饮包装, 不仅可与玻璃容器相媲美, 而且能 100% 的回收利用。Honest 公司总裁 Seth Goldman 表示, 这种创新性的包装采用了一种新的灌装技术, 因而消除了在大多数热灌装塑料瓶上常见的热膨胀棱, 使得这种新型的设计外观清新高雅, 给人一种玻璃瓶的感觉。在图形设计方面, 采用了 Flowdesign 设计公司全新的设计方案, 使之与原有品牌保持了很强的一致性, 可望以此来帮助公司开拓新的销售市场。