

桑叶多糖的分离纯化及组成研究

欧阳臻, 陈 钧, 李永辉

(江苏大学生物与环境工程学院制药工程系, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 本文对桑叶多糖的提取、分离纯化和单糖的组成进行了研究。桑叶经热水提取乙醇沉淀得多糖粗品, 经脱蛋白, 乙醇分级沉淀、DEAE-纤维素柱和Sephadex G-100柱层析, 纯化得MP11、MP12、MP13三个多糖组分。经糖腈乙酐化处理后进行气相色谱分析得知MP11由Rha、Ara、Xyl、Man、Glu、Gal组成, 其比例为21:16:3:3:1:20; MP12由Rha和Glu组成, 其比例为3:1; MP13主要由Rha组成。为桑叶多糖的进一步研究提供了基础。

关键词: 桑叶; 多糖; 分离纯化; 气相色谱; 组成

Separation, Purification and Composition Analysis of Polysaccharides in Leaves of *Morus alba* L.

OUYANG Zhen, CHEN Jun, LI Yong-hui

(School of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The crude polysaccharides from Leaves of *Morus alba* L. were obtained by extracting hot water and precipitating with alcohol. The free proteins were removed from crude polysaccharides and then the crude *Morus* polysaccharides (MP1) were isolated and purified by DEAE-cellulose column and Sephadex G-100 gel column chromatography. The result showed that MP1 was composed of three pure polysaccharides (MP11, MP12, MP13). After converting the hydrolyzed polysaccharide into acetylated aldononitriles it was analysis by gas chromatography. The chemical components and the ratio showed follows: MP11:Rha:Ara:Xyl:Man:Glu:Gal=21:16:3:3:1:20; MP12:Rha:Glu=3:1; MP13's component was mainly Rha. All these work could establish foundation for the further study of *Morus* Polysaccharides.

Key words: leaves of *Morus alba* L.; polysaccharides; isolation purification; gas chromatography; component

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)03-0181-04

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。是国家卫生部公布的药食两用的中药, 味苦、甘, 性寒, 归肺、肝经, 《神农本草经》称桑叶为“神仙叶”,

收稿日期: 2004-05-08

基金项目: 江苏省农业科技攻关项目(BE2004352)

作者简介: 欧阳臻(1964-), 女, 副教授, 博士生, 主要从事天然产物有效成分的研究及新药开发。

具有滋阴补血, 疏散风热, 益肝通气, 降压利尿之功效。《本草纲目》称桑叶乃手足阳明之药, 汁煎代茗, 能止消渴, 明目长发。《寿世保元》以桑叶为主的扶桑至宝丹“久服不以自登上寿”。现代药理研究证明桑叶具有降血糖、降血压、抗菌和抗病毒等多种药理活性。桑叶多糖为桑叶有效成分之一具有显著的降血糖作用^[1,2]。因此研究多糖成分开发降糖新药和功能性食品

method to determine free fat in emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17: 55-62.

- [2] M E Leser, M Michel. Aerated milk protein emulsions-new microstructural aspects[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1999, (4): 239-244.
- [3] Boode K, P Walstra. Partial coalescence in oil-in-water emulsions[M]. Colloids Surf. A; Physicochem Eng. 1993.
- [4] K I Segall, H D Goff. A modified ice cream processing rou-

tine that promotes fat destabilization in the absence of added emulsifier[J]. International Dairy Journal, 2002, (12): 1013-1018.

- [5] D Goff. Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions[J]. J Dairy Sci, 1997, 80: 2620-2630.
- [6] H D Goff, W K Jordan. Action of emulsifiers in promoting fat destabilization during the manufacture of ice cream[J]. J Dairy Sci, 1989, 72: 18-29.

前景十分广阔。对桑叶多糖的提取工艺及含量测定的研究文献已有一些报道^[3,4],而对其多糖的组成研究迄今未见报道。本文主要报道了桑叶多糖的提取纯化及组成研究,桑叶脱脂后经水提、醇析,经DEAE-纤维素和Sephadex G-100柱层析得到MP11、MP12、MP13三个酸性多糖组分,并经薄层色谱和气相色谱分析确定桑叶多糖的单糖组成,为进一步研究桑叶多糖的化学结构和生物活性提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

桑叶采集于江苏大学桑树园,经镇江市药品检验所陈黎主任药师鉴定为桑科Moraceae植物桑*Morus alba L.*的叶,干燥后,粉碎,过50目筛,备用。DEAE纤维素购于英国Whatman公司。鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)标样购于Sigma公司。三氟乙酸、醋酸酐、吡啶等为分析纯,购于上海化学试剂公司。

1.2 仪器

HP-4890气相色谱仪 美国惠普公司;Startorius电子天平 德国;紫外可见分光光度计 上海优尼科公司;层析柱(25cm×2.6cm i. d、60cm×1.6cm i. d、90cm×1.5cm)、恒流泵、自动分部收集器 上海沪西仪器厂;Buchi R-200型旋转蒸发仪 瑞士Buchi公司;冷冻干燥机 德国Christ公司。

2 实验方法

2.1 桑叶粗多糖的提取

取粉碎后的桑叶100g,依次用石油醚、乙酸乙酯和95%乙醇回流脱脂,残渣干燥后加5倍量蒸馏水,90℃提取4次,合并提取液,真空减压浓缩至一定体积。加30%的三氯乙酸脱蛋白,离心,除去变性蛋白,浓缩至一定体积,用氨水调pH至8.0,加入H₂O₂进行氧化脱色(45℃保温1h)。透析除去H₂O₂及一些有机溶剂和小分子杂质后,浓缩至一定体积,加95%乙醇,使含醇量达到50%,4℃放置过夜,离心收集沉淀,复溶于水,再次醇析,冷冻干燥后得粗多糖组分MP1。上清液继续加入95%乙醇,使含醇量达到80%,同前处理得粗多糖组分MP2。根据组分的收率和初步活性试验,对MP1组分进一步纯化分析。

2.2 分离纯化

取MP1多糖粗品溶于水,以DEAE-52纤维素柱(50×2.6cm)析层析,依次用水、0.05~0.5mol/L的NaCl溶液洗脱,分别收集洗脱液(每管10ml),以改良的苯酚-硫酸法^[5]跟踪检测,根据洗脱曲线收集。取0.1~0.3mol/L NaCl溶液洗脱部分,蒸馏水透析3d,冷冻干燥,再

经Sephadex G-100柱层析(60×1.0cm)层析,蒸馏水洗脱,以改良的苯酚-硫酸法跟踪测定,得较为纯化的桑叶多糖MP11, MP12, MP13。

桑叶多糖的提取纯化流程:

桑叶→粉碎→石油醚回流脱脂→乙酸乙酯回流脱脂→95%乙醇回流脱脂→热水浸提→离心→澄清液→浓缩→脱蛋白→透析→离心分离→减压浓缩→醇析→离心分离→溶剂抽干→桑叶多糖粗品→DEAE柱层析→Sephadex G-100柱层析→桑叶多糖MP11, MP12, MP13。

2.3 桑叶多糖组成单糖的组分分析

2.3.1 薄层色谱分析

分别称取L-鼠李糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖和D-木糖各15mg,分别置10ml容量瓶中加水至刻度,得各单糖标准品溶液。另取各单糖15mg,置10ml容量瓶中,加水至刻度,得单糖标准品混合溶液。

取MP11, MP12, MP13各5mg干燥样品,加入2.0mol/L的H₂SO₄溶液0.5ml,封管,100℃水解6h,取出,加入BaCO₃中和,3000r/min离心除去BaSO₄沉淀,上清液冷冻干燥,即获得各多糖的水解液,备用。

取已配制好的单糖标准品溶液和混合单糖标准品溶液,分别点于含0.3mol/L的磷酸二氢钠的硅胶G板上,先以丙酮:水=24:1展开,取出,晾干后,再以正丁醇:乙酸乙酯:异丙醇:醋酸:水:吡啶=35:100:60:35:30:35展开,展距20cm,以苯胺-邻苯二甲酸显色。按以下公式计算R_f值。

$$R_f = \frac{\text{起始线到斑点的距离}}{\text{起始线到溶剂前沿的距离}}$$

样品MP11, MP12, MP13水解液,按相同的方法展开、显色,计算R_f值。

2.3.2 气相色谱分析

2.3.2.1 多糖的水解

取多糖MP11、MP12和MP13各10mg,加入2mol/L的硫酸各2ml,100℃封管,水解6h, BaCO₃中和,高速离心,除去沉淀,冷冻干燥,备用。

2.3.2.2 糖的衍生化

采用糖腈乙酰法^[6]:称取各种标准单糖和MP11、MP12、MP13水解后的糖样各10mg,分别加入盐酸羟胺8mg,吡啶0.5ml,于90℃水浴加热30min并振荡,取出冷却至室温,加入醋酸酐0.5ml,在90℃继续加热30min进行乙酰化,产物经0.45μm滤膜过滤后,注入气相色谱进行分析。

色谱条件:HP-1 21000mm×0.2mm弹性石英毛细管

色谱柱；载气：氮气；检测器：氢火焰离子化检测器（FID）；柱温：柱室起始温度 130℃，保留 5min，程序升温 4℃/min，中止温度 240℃；汽化温度 280℃；检测器 250℃。

3 结果与讨论

3.1 桑叶多糖的提取纯化

桑叶粉末 100g 经脱脂、水提、采用三氯乙酸脱蛋白后，用乙醇分级沉淀，使乙醇浓度达到 50% 和 80%，冷冻干燥后分别得到 MP1、MP2 粗多糖组分，MP1 多糖组分为 2.5192g，收率为 2.52%，MP2 多糖组分为 0.7697g，收率为 0.77%。MP1 经 DEAE-52 纤维素柱层析，以改良的苯酚-硫酸法跟踪检测，得四个组分。这四个组分再分别过 Sephadex G-100 凝胶柱，水洗脱以改良的苯酚-硫酸法跟踪测定，其中 MP11、MP12 和 MP13 为单一对称峰。

3.2 桑叶多糖 MP11、MP12 和 MP13 单糖的组成分析

3.2.1 薄层色谱分析结果

各标准单糖在薄层板上获得了良好的分离，各标准单糖的 R_f 值见表 1。

表 1 各标准单糖薄层色谱的 R_f 值
Table 1 R_f value of standard sugars in TLC

	鼠李糖	木糖	阿拉伯糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
R _f 值	0.63	0.41	0.27	0.21	0.15	0.10

根据不同单糖标样参考斑点的颜色和 R_f 值，同桑叶多糖水解所得单糖斑点和 R_f 值，确定桑叶多糖样品中有哪几单糖组成。结果表明，桑叶多糖纯化得 MP11，MP12，MP13 三个组分的单糖组成分别为：MP11 为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖六种单糖组成，MP12 是由鼠李糖和葡萄糖两种单糖组成，MP13 主要由鼠李糖一种单糖组成。

3.2.2 气相色谱分析结果

标准单糖及桑叶多糖 MP11、MP12 和 MP13 的气相

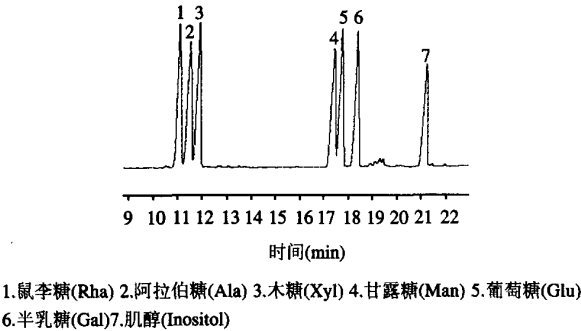
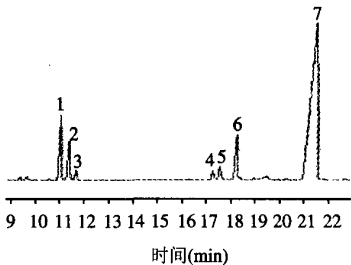
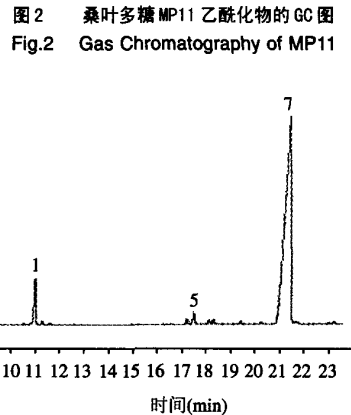


图1 标准单糖乙酰化物的 GC 图
Fig.1 Gas Chromatography of sugars standard



1.鼠李糖(Rha) 2.阿拉伯糖(Ala) 3.木糖(Xyl) 4.甘露糖(Man) 5.葡萄糖(Glu) 6.半乳糖(Gal)7.肌醇(Inositol)



1. 鼠李糖(Rha) 5. 葡萄糖(Glu) 7. 肌醇(Inositol)

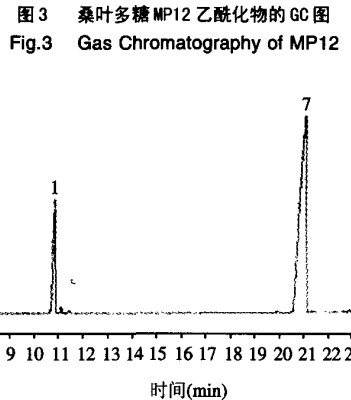


图4 桑叶多糖 MP13 乙酰化物的 GC 图
Fig.4 Gas Chromatography of MP13

色谱见图 1~4。由色谱图可以看出各单糖在此色谱条件下获得了良好的分离。

根据各标准单糖的气相色谱图确定各单糖的保留时间和响应因子，见表 2。

多糖的气相色谱通过与标准单糖的保留时间和响应因子对比确定糖的种类和摩尔比。结果表明，MP11 是含 6 种单糖的杂多糖，其组成为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖，其摩尔比为 21:16:3:3:1:20；MP12 是由鼠李糖和葡萄糖两种单糖组成，其

表2 标准单糖糖脂乙酰化物结果分析表

Table 2 Alditol acetate analysis of standard sugars in GC

	Rha	Ala	Xyl	Man	Glu	Gal
保留时间	11.14	11.57	11.95	17.47	17.80	18.43
响应因子	1.13	0.8	1.21	1.18	1	1.10

摩尔比为 3:1; 桑叶多糖 MP13 主要由鼠李糖组成。

3.3 讨论

3.3.1 多糖的水解常采用盐酸、硫酸、三氯乙酸、三氟乙酸等水解。其中, 硫酸和三氟乙酸为多糖研究中最通用的水解方法。本实验中桑叶多糖采用硫酸水解, 碳酸钡中和, 具有水解效果好, 廉价易得的优点。

3.3.2 目前, 多糖的单糖组成测定主要采用气相色谱法, 主要有糖醇乙酯法、三甲基硅醚法、糖脂乙酯法及三氯乙酯法。其中, 糖脂乙酯衍生化法具有制备简单、试剂易得、异构峰少等优点, 是目前气相色谱法测定多糖组成的常用的衍生化方法。本实验桑叶多糖采用糖脂乙酯衍生化后进行气相色谱仪测定 MP11、MP12 和 MP13 的单糖组成, 结果较好, 阐明了桑叶多糖的单糖组成特征。

4 结论

采用水提醇沉从桑叶中提取水溶性粗多糖, 经脱蛋白, 脱色后, 分别经 DEAE-纤维素柱和 Sephadex G-100

凝胶柱层析, 纯化得 MP11、MP12、MP13 三个多糖组分。经薄层层析和气相色谱分析得知 MP11 由 Rha、Ara、Xyl、Man、Glu、Gal 组成, 其摩尔比为 21:16:3:3:1:20; MP12 由 Rha 和 Glu 组成, 其摩尔比为 3:1; MP13 主要由 Rha 组成。本实验初步弄清了桑叶多糖的单糖组成, 为桑叶多糖的进一步结构分析和活性研究提供了基础。

参考文献:

- [1] 陈福君, 卢军, 张永煜. 桑的药理研究(I): 桑叶降糖有效组分对糖尿病动物代谢的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(1): 24.
- [2] Hosseinzadeh H, Sadeghi A. Antihyperglycemic effects of *Morus nigra* and *Morus alba* in mice[J]. Pharm Pharmacol Lett, 1999, 9(2): 63-65.
- [3] 赵骏, 钟蓉, 王洪章, 等. 桑叶多糖提取工艺优选[J]. 中草药, 2000, 31(3): 347-348.
- [4] 欧阳臻, 李永辉, 宿树兰, 等. 桑叶多糖的含量测定[J]. 食品科学, 2003, 28(5): 291-293.
- [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(9): 550-553.
- [6] Varma R, Varma RS, Wardi AH. Separation of aldononitrile acetates of neutral sugars by gas-liquid chromatography and its application to polysaccharides[J]. J Chromatogr, 1973, 77: 222-227.

信息

食品检验检测资源调查工作在全国范围内开展

为保障人民群众的身体健康和安全, 2004 年国务院第 59 次常务会议专门研究了我国的食品安全问题, 国发[2004] 23 号《国务院关于加强食品安全工作的决定》对加强食品安全工作作出了重大部署, 明确提出进一步建立和完善我国食品检验检测体系。国家质检总局、农业部、卫生部、商务部、国家工商总局、国家食品药品监督管理局、国家认监委等国务院七部局(委)联合下发了《关于食品检验检测体系建设有关工作安排的通知》和《关于开展食品检验检测资源调查的通知》。文件要求在全国范围内组织开展食品检验检测资源调查工作, 以期建立中国食品检验检测资源数据库, 为建设我国食品检验检测体系提供基本数据支持。食品检验检测资源既包括向社会提供公正检测服务的食品检测机构, 也包括移动检测设施, 高校、科研机构、企业内部检测资源, 以及外资、合资、私营等各种经济形式的食品检测机构。有能力开展食品检验检测的机构, 可向当地质量技术监督局或行业主管部门索取网络用户名和密码(或电子版、书面版调查表), 按要求填报有关信息, 以便成为我国食品检验检测体系的组成部分, 进一步发挥现有检测资源的作用。全国食品检验检测资源调查网络系统访问地址为 www.cnca.gov.cn。参加数据填报的机构可从该网址首页“热点专栏”的“全国实验室资源调查系统(食品检验检测资源调查系统)”中点击进入。有关使用帮助及模板程序可在该系统的“相关文件下载”中下载使用。