

大枣中4种功能性糖分的分离纯化及其单糖组成分析

赵子青, 原超, 林勤保*
(山西大学应用化学研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 大枣粗低聚糖用强碱性阴离子交换树脂脱色, 再经DEAE-52纤维素柱初步纯化, 得到3个组分JuBO1、JuBO2、JuBO3, 其中JuBO1过Sephadex G-25凝胶柱层析进一步纯化, 得JuBO1-1、JuBO1-2两个单一组分, 同时JuBO2、JuBO3过Sephadex G-15凝胶柱层析脱盐。4种大枣功能性糖分经冷冻干燥后用气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱法测定, 得到其单糖组成, 其中JuBO1-1的单糖组成为阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖, JuBO1-2单糖组成为阿拉伯糖、鼠李糖、果糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖, JuBO2的单糖组成为阿拉伯糖、果糖和葡萄糖, JuBO3的单糖组成为阿拉伯糖、鼠李糖、果糖和葡萄糖。将分离纯化得到的4种样品分别进行凝胶色谱分析, 结果得到JuBO1-1的平均分子质量为5952D, JuBO1-2的平均分子质量为545D, JuBO2的平均分子质量为108629D, JuBO3的平均分子质量为2624D。

关键词: 大枣; 低聚糖; 多糖; 分离; 纯化; 结构分析

Isolation, Purification, and Structural Analysis of Four Functional Saccharides from Chinese Dates

ZHAO Zi-qing, YUAN Chao, LIN Qin-bao*
(Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Crude oligosaccharides were obtained from Chinese dates by hot water extraction, decolorized using (201 × 7) 717 type strongly alkaline anion exchange resin, and purified on DEAE-52 cellulose column to obtain three fractions, JuBO1, JuBO2 and JuBO3. JuBO1 was further purified by Sephadex G-25 column chromatography to obtain two single components, JuBO1-1 and JuBO1-2. Besides, JuBO2 and JuBO3 were desalted by Sephadex G-15 column chromatography, along with JuBO1-1 and JuBO1-2, lyophilized and analyzed by HPLC and GC-MS for monosaccharide composition. The monosaccharide composition consisted of arabinose, mannose, galactose and glucose for JuBO1-1, arabinose, rhamnose, fructose, mannose, galactose and glucose for JuBO1-2, arabinose, fructose and glucose for JuBO2 and arabinose, rhamnose, fructose and glucose for JuBO3. The average molecular weights of JuBO1-1, JuBO1-2, JuBO2 and JuBO3 were determined by gel filtration chromatography to be 5952, 545, 108629 D and 2624 D, respectively.

Key words: Chinese date; oligosaccharide; polysaccharide; separation; purification; structural analysis

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0070-05

目前, 研究者从大枣中分离纯化得到了多种功能性成分, 包括多糖^[1-2]、芦丁^[3]、多酚类^[4]及三萜酸^[5]等。功能性低聚糖是指对人、动物、植物等具有特殊生理作用的一类分子质量较低(单糖数在2~10之间)的碳水化合物^[6]。关于大枣低聚糖的分离纯化, 本研究室采用水浸提法提取, 膜分离技术分离得到大枣粗低聚糖, 再用Sephadex-G15柱层析进行分离纯化, 得到一种大枣低聚糖产品^[7], 但是该方法得到的大枣低聚糖产品尚属于混合产品, 需要进一步的分离纯化。

国内外单糖组分的色谱分离测定方法目前主要有气相色谱法(GC)^[8-9]、高效液相色谱法(HPLC)^[10]和薄层色谱法(TLC)^[11]等。本研究采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)和高效液相色谱法(HPLC)来实现大枣功能性糖分的单糖组成测定, 两法各有其优缺点, 可相互补充。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2012-07-09

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201004041-08)

作者简介: 赵子青(1984—), 女, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: zzq0627@163.com

*通信作者: 林勤保(1968—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品分析。E-mail: qblin@sxu.edu.cn

大枣粗低聚糖提取液, 本研究室自行制得^[7]。

(201×7)717强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂 成都科龙化工试剂厂; DEAE-52纤维素交换树脂 英国Whatman公司; 葡聚糖凝胶Sephadex-G25、Sephadex-G15 美国Pharmaci公司; 吡啶、六甲基二硅氮烷、三甲基氯硅烷、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP) 天津市光复精细化工研究所; 核糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖 天津市化学试剂三厂; 半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸 天津一方科技有限公司; 聚乙二醇800 天津市登峰化学试剂厂; 聚乙二醇1000、6000 天津市清华津英科技有限公司; 聚乙二醇10000、20000 天津市科密欧化学试剂开发中心。

1.2 仪器与设备

BSZ-160F电脑自动部分收集器、HL-2B数显恒流泵 上海精科实业有限公司; 层析柱(1.6cm×30cm、1.6cm×80cm、2.6cm×30cm) 上海精密科学仪器有限公司; 1200 Series高效液相色谱仪 美国Agilent公司; 气相色谱-质谱联用仪 美国Thermo Finnigan公司; LC-20A高效液相色谱仪、RID-10A示差折光检测器 日本岛津公司; Rtx-5MS毛细管柱(30m×0.25mm, 0.25μm) 美国Thermo Finnigan公司; 色谱柱(300mm×7.8mm) 美国Waters公司。

1.3 大枣粗低聚糖脱色

1.3.1 静态吸附实验^[12-14]

准确量取一定量经预处理的强碱性阴离子交换树脂于具塞磨口三角瓶中, 加入50mL质量浓度为2g/100mL的大枣粗低聚糖溶液, 在恒温40℃条件下, 于恒温气浴振荡器中于120r/min进行振荡吸附, 考察树脂用量和脱色时间对大枣粗低聚糖溶液的脱色率和保留率的影响。

1.3.2 脱色率的测定和计算^[15]

在420nm检测波长测定大枣粗低聚糖脱色率。分别测定大枣粗低聚糖样品溶液脱色前的吸光度 A_1 和脱色后的吸光度 A_2 , 并按式(1)进行计算树脂的脱色率 X 。

$$X/\%=(A_1-A_2)/A_1 \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 保留率的测定和计算^[16]

采用苯酚-硫酸比色法, 在490nm波长处测定吸光度, 测定大枣粗低聚糖样品溶液脱色前糖含量(C_1)和脱色后含量(C_2), 并按式(2)计算保留率 Y 。

$$Y/\%=C_2/C_1 \times 100 \quad (2)$$

1.4 大枣粗低聚糖的分离纯化^[17-18]

取脱色后的粗低聚糖液15mL, 质量浓度为5g/100mL, 上DEAE-52纤维素层析柱(2.6cm×30cm), 先用200mL蒸馏水进行洗脱, 再用0.1、0.3、0.5mol/L NaCl进行分段梯度洗脱, 每个浓度洗脱200mL, 部分收集器收集, 5mL一管, 流速为1mL/min。苯酚-硫酸法进行测定吸光度(A_{490nm}), 绘制洗脱曲线, 得到3个组分

JuBO1、JuBO2、JuBO3, 将JuBO1上Sephadex G-25凝胶层析柱(1.6cm×80cm), 得JuBO1-1、JuBO1-2两个单一组分, 同时JuBO2、JuBO3过Sephadex G-15凝胶层析柱(1.6cm×30cm)脱盐; 将上述得到的4个部分产品分别冷冻干燥, 得到最终产品。

1.5 气相色谱-质谱联用法检测大枣功能性糖分的单糖组成

1.5.1 样品水解

称取2mg样品, 加入2mL 0.02mol/L三氟乙酸(TFA), 封口后于105℃的烘箱内水解2h, 冷却至室温, 加入蒸馏水60℃旋蒸浓缩^[19-20]。

1.5.2 衍生物的制备^[21]

取样品水解产物, 并称取2mg单糖标准品, 分别加入1.2mL吡啶, 振荡, 使其充分溶解, 然后依次加入0.4mL六甲基二硅氮烷和0.2mL三甲基氯硅烷, 在60℃水浴反应10min, 离心, 取上层液体, 经直径0.45μm的滤膜过滤后, 待测。

1.5.3 GC-MS仪器条件^[8, 22]

毛细管柱: Rtx-5MS(30m×0.25mm, 0.25μm); 电子轰击(EI)离子源; 传输线温度270℃; 离子源温度250℃; 质量扫描范围33~650m/z; 溶剂延迟时间6min; 载气流量1.2mL/min; 进样量1μL; 分流比50:1; 进样口温度250℃; 升温程序: 初始温度100℃, 以10℃/min升至180℃, 再以3℃/min升至240℃, 保持5min; 对采集到的质谱图利用NIST谱库进行检索。

1.6 高效液相色谱法检测大枣功能性糖分的单糖组成

1.6.1 混合单糖标准品溶液的制备

分别取对照品甘露糖、鼠李糖、核糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖25mg, 蒸馏水溶解, 并转移至50mL容量瓶定容, 摇匀。

1.6.2 样品衍生物的制备

吸取混合标准溶液0.2mL和水解样品, 依次加入0.2mL 0.5mol/L PMP甲醇溶液和0.2mL 0.3mol/L NaOH水溶液, 70℃水浴加热30min, 并不时振摇, 取出室温放置10min, 再加入0.25mL 0.3mol/L HCl水溶液, 混匀后用5.0mL氯仿分3次萃取, 充分振荡。上层水相加水补充至2mL, 混匀, 过0.22μm滤膜待测。

1.6.3 HPLC仪器条件^[23-24]

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm); 柱温: 25℃; 进样量: 20μL; 流速: 0.8mL/min; 检测波长: 254nm; 流动相: 流动相A, 15%乙腈+20mmol/L磷酸盐缓冲液(KH₂PO₄-NaOH, pH 6.9); 流动相B, 40%乙腈+20mmol/L磷酸缓冲液(KH₂PO₄-NaOH, pH 6.9); 梯度洗脱程序: 0~12min, 0~10%A; 12~28min, 10%~20%A; 28~45min, 20%A; 45~47min, 20%~0%A。

1.6.4 分子质量测定仪器条件^[7]

色谱柱: Ultrahydrogel™ Linear 300mm×7.8mm, 美国Waters公司; 流速: 0.4mL/min; 温度: 35℃; 时间: 60min; 流动相: 超纯水; 进样量: 50μL。

2 结果与分析

2.1 大枣粗低聚糖的脱色结果

2.1.1 树脂用量对大枣粗低聚糖溶液脱色效果的影响

树脂用量分别为1、3、5、7、9、11mL, 振荡4h, 测定大枣粗低聚糖提取液样品的脱色率和保留率, 结果见图1。

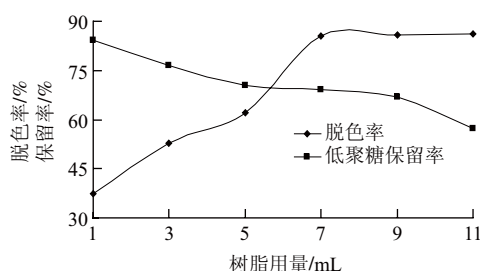


图1 树脂用量对大枣粗低聚糖溶液脱色效果的影响

Fig. 1 Effect of resin loading on the decolorization and oligosaccharide recovery of crude oligosaccharide extract

由图1可知, 随着树脂用量的增加, 保留率下降, 在树脂用量为5~9mL时, 保留率在70%之上; 脱色率随着树脂用量的增加而增加, 当树脂用量为7mL时, 脱色率达到85%, 之后变化不明显。综合两条曲线可以得出在树脂用量为7mL时树脂脱色效果最佳, 且保留率也不低, 因此树脂用量选择7mL。

2.1.2 脱色时间对大枣粗低聚糖溶液脱色效果的影响

树脂用量7mL, 脱色时间分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0h, 测定大枣粗低聚糖提取液的脱色率和保留率, 结果见图2。

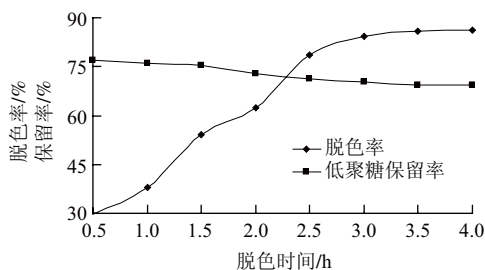


图2 脱色时间对大枣粗低聚糖溶液脱色效果的影响

Fig. 2 Effect of adsorption time the decolorization and oligosaccharide recovery of crude oligosaccharide extract

由图2可知, 随着脱色时间的延长, 脱色率增加, 当时间在3.0h之后, 脱色率达到84%, 之后脱色率增加缓慢; 保留率随着脱色时间的增长而缓慢降低, 3.0h时保留率在70%之上。当脱色时间为3.0h, 脱色率高且保留率也

高, 选定脱色的最佳时间为3.0h。

2.2 大枣粗低聚糖的分离纯化

2.2.1 DEAE-52初步纯化

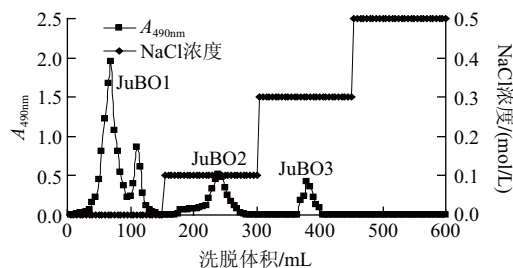


图3 DEAE-52纤维素层析初步纯化

Fig. 3 Elution profile of decolorized crude oligosaccharide extract on DEAE-52 cellulose column

由图3可知, 脱色后的大枣粗低聚糖经DEAE-52纤维素初步分离得到3个组分: JuBO1、JuBO2、JuBO3。JuBO1为蒸馏水洗脱部分, JuBO2为0.1mol/L NaCl洗脱部分, JuBO3为0.3mol/L NaCl洗脱部分。其中JuBO1所占比例最大, 且2个峰之间存在明显的重叠。

2.2.2 Sephadex G-25进一步纯化

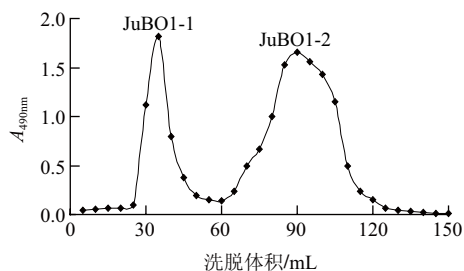


图4 水洗脱部分的凝胶柱层析洗脱曲线

Fig. 4 Elution profile of JuBO1 on Sephadex G-25 column

由图4可知, JuBO1过Sephadex G-25层析柱, 纯化得到2个单一对称峰: JuBO1-1、JuBO1-2。

2.3 平均分子质量的测定

2.3.1 聚乙二醇标准曲线

实验选用不同分子质量的聚乙二醇800、1000、6000、10000、20000, 通过高效凝胶色谱分析, 以保留时间为横坐标, 以分子质量的对数为纵坐标得到标准曲线方程 $y = -3.0575x + 33.428$, 相关系数为0.9928。

2.3.2 样品平均分子质量的测定

将分离纯化得到的4种样品分别进行凝胶色谱分析, 结果得到JuBO1-1的平均分子质量为5952D, JuBO1-2的平均分子质量为545D, JuBO2的平均分子质量为108629D, JuBO3的平均分子质量为2624D。其中JuBO1-2为低聚糖, 其余3个组分为多糖。

2.4 4种大枣功能性糖分的单糖组成分析

4种大枣功能性糖分样品用气质联用及高效液相色谱法同时检测, 得到的单糖组成, 见表1~2。大枣多糖JuBO1-1的单糖组成有阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖。

表1 气质联用法分析大枣功能性糖分的单糖组成
Table 1 GC-MS analysis of monosaccharide composition of four polysaccharide fractions

样品	单糖衍生物的保留时间/min							
	阿拉伯糖	鼠李糖	核糖	木糖	果糖	甘露糖	半乳糖	葡萄糖
混标(n=3)	8.72±0.01, 8.78±0.01, 9.24±0.02, 9.62±0.01	9.00±0.07	9.04±0.02, 9.31±0.01, 9.56±0.02	10.25±0.01, 11.05±0.02	11.55±0.01, 11.70±0.00, 11.80±0.01	11.59±0.01, 13.51±0.01	12.58±0.02, 13.28±0.00, 13.44±0.00	13.31±0.05, 15.18±0.02
JuBO1-1	8.71, 8.77, 9.21, 9.61	—	—	—	—	11.59	12.56	13.30, 15.17
JuBO1-2	9.26	9.06	—	—	11.54, 11.69, 11.79	13.50	12.60	13.27, 15.16
JuBO2	8.71, 8.77, 9.21, 9.61	—	—	—	11.69, 11.78	—	—	13.32, 15.16
JuBO3	8.72, 9.22, 9.63	8.93	—	—	11.56, 11.81	—	—	13.36, 15.19

注：—，未测出。表2同。

糖。从低聚糖JuBO1-2在GC-MS、HPLC色谱图看出单糖中含量较高的主要是阿拉伯糖和葡萄糖，而甘露糖和半乳糖的相对含量较低(只列出大枣低聚糖JuBO1-2的色谱图，其余功能性糖分的谱图与此类似)。低聚糖JuBO1-2单糖组成有阿拉伯糖、鼠李糖、果糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖。单糖中含量较高的主要是葡萄糖、果糖和甘露糖，而阿拉伯糖、鼠李糖和半乳糖的相对含量较低。

表2 高效液相色谱法分析大枣功能性糖分单糖组成
Table 2 HPLC analysis of monosaccharide composition of four polysaccharide fractions

样品	单糖衍生物的保留时间/min							
	甘露糖	鼠李糖	葡萄糖醛酸	半乳糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	阿拉伯糖
混标(n=3)	19.94±0.00	24.58±0.32	27.58±0.26	29.74±0.24	35.41±0.68	38.84±0.60	40.30±0.44	41.61±0.39
JuBO1-1	19.94	—	—	—	35.03	38.84	—	41.22
JuBO1-2	19.94	24.87	—	—	35.42	39.42	—	41.87
JuBO2	—	—	—	—	34.75	—	—	41.97
JuBO3	—	24.83	—	—	36.07	—	—	41.55

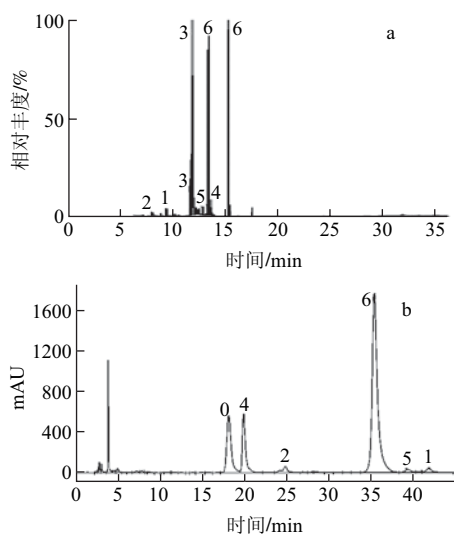


图5 JuBO1-2水解样的GC-MS图(a)和HPLC色谱图(b)

Fig.5 GC-MS (a) and HPLC (b) profiles of JuBO1-2 hydrolysate

大枣多糖JuBO2样品单糖组成有阿拉伯糖、果糖、和葡萄糖。单糖中含量较高的主要是阿拉伯糖和葡萄糖，而果糖的相对含量较低。

大枣多糖JuBO3单糖组成有阿拉伯糖、鼠李糖、果糖和葡萄糖。单糖中含量较高的主要是阿拉伯糖和葡萄糖，而果糖和鼠李糖的相对含量较低。

3 结论

强碱性阴离子交换树脂静态吸附的最佳脱色工艺条件是：树脂用量7mL/50mL，脱色时间3h，在该条件下脱色率可达84%，粗低聚糖保留率为70%。用DEAE-52纤维素、葡聚糖凝胶分离纯化得到4种大枣功能性糖分，并通过GC-MS、HPLC两种方法测定单糖组成，用HPLC法测定了平均分子量。对于大枣功能性糖分结构的确定及功能评价，有待进一步研究。

参考文献：

- [1] 吴娜, 杨洁, 许海燕, 等. 若羌大枣多糖的分离纯化及抗氧化活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(2): 319-323.
- [2] 林勤保, 高大维, 于淑娟, 等. 大枣多糖的单糖组成的高效液相色谱法研究[J]. 郑州粮食学院学报, 1998, 19(3): 57-60; 82.
- [3] 苗利军, 刘孟军, 彭红丽, 等. 枣果中总黄酮含量分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(22): 9460-9461.
- [4] XUE Ziping, FENG Weihua, CAO Jiankang, et al. Antioxidant activity and total phenolic contents in peel and pulp of Chinese jujube (*Ziziphus Jujuba* Mill) Fruits[J]. Journal of Food Biochemistry, 2009, 33(5): 613-629.
- [5] GUO S, DUAN J A, TANG Y, et al. High-performance liquid chromatography: two wavelength detection of triterpenoid acids from the fruits of *Ziziphus jujuba* containing various cultivars in different regions and classification using chemometric analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 49(5): 1296-1302.
- [6] PATEL S, GOYAL A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1119-1128.

- [7] 蒋梅峰, 林勤保. 大枣低聚糖的分离纯化及结构分析[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 376-378.
- [8] 林勤保, 蒋梅峰, 杨春. 气相色谱-质谱联用法测定大枣低聚糖的单糖组成[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 210-212.
- [9] MATULOVÁ M, CAPEK P, KANEKO S, et al. Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of coffee arabica instant coffee powder[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(8): 1029-1036.
- [10] 颜军, 侯贤灯, 徐开来. 柱前衍生HPLC分析银耳多糖的单糖组成[J]. 中国测试, 2011, 37(1): 44-46.
- [11] 潘慧芳, 胡长鹰. 番木瓜中低聚糖的提取分离及结构鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(11): 148-151.
- [12] 黄小焕, 胡建锋, 邱树毅, 等. 树脂对菊芋粉除杂液脱色效果的影响及其脱色工艺[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(3): 177-180.
- [13] 秦为辉, 张晓琳, 陈新, 等. 多杀菌素发酵提取液的脱色工艺研究[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(1): 48-52.
- [14] LIU J, LUO J, SUN Y, et al. A simple method for the simultaneous decoloration and deproteinization of crude levan extract from *Paenibacillus polymyxa* Ejs-3 by macroporous resin[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 6077-6083.
- [15] 张强华, 熊清平, 石莹莹. 大孔树脂对甜菊糖苷溶液的脱色研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 249-252.
- [16] 邹义芳, 任爱农, 姚苗苗, 等. 大孔吸附树脂对红花多糖脱色工艺的影响研究[J]. 中国药房, 2011, 22(15): 1380-1382.
- [17] LI Liyan, JIANG Xiaolu, GUAN Huashi, et al. Preparation, purification and characterization of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Pseudomonas* sp. H2j 216[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(6): 794-800.
- [18] GE Y, DUAN Y, FANG G, et al. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* Var. *francheti*: isolation, purification, structural features and antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(2): 188-193.
- [19] ZHAO Jianqiang, MONTEIRO M A. Hydrolysis of bacterial wall carbohydrates in the microwave using trifluoroacetic acid[J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(14): 2498-2503.
- [20] LIU Chunhui, LI Xiaodong, LI Yuhua, et al. Structural characterisation and antimutagenic activity of a novel polysaccharide isolated from *Sepiella maindroni* ink[J]. Food Chemistry, 2008, 110(4): 807-813.
- [21] WANG Li, ZHANG Hongbin, ZHANG Xiaoyan, et al. Purification and identification of a novel heteropolysaccharide Rbps2a with anti-complementary activity from defatted rice bran[J]. Food Chemistry, 2008, 110(1): 150-155.
- [22] ZHAO Zhihui, LI Jun, WU Xiangmei, et al. Structures and immunological activities of two pectic polysaccharides from the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. Cv. Jinsixiaozao Hort.[J]. Food Research International, 2006, 39(8): 917-923.
- [23] 陈克克. 地瓜儿多糖的单糖组成实验中两种流动相的比较研究[J]. 陕西农业科学, 2009(5): 41-45.
- [24] 杨兴斌, 赵燕, 周四元, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成[J]. 分析化学, 2005, 33(9): 1287-1290.