

文章编号: 1000-5013(2008)02-0273-03

包心芥菜多糖的分离纯化及理化性质分析

蔡婀娜, 李夏兰, 魏国栋

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建泉州 362021)

摘要: 研究包心芥菜多糖的提取、分离和纯化技术, 并对得到的多糖进行初步的鉴定. 经醋酸纤维薄膜电泳和高效液相色谱分析证明, 所得到的包心芥菜多糖 WLP-2 为纯品, 不含蛋白质、核酸, 为非淀粉类均一多糖, 其相对分子质量为 433048. WLP-2 完全酸水解后, 经高效液相色谱分析确定其糖基的组成为鼠李糖(Rha)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)、葡萄糖(Glc)和半乳糖(Gal), 摩尔比为 3.21: 1.00: 1.66: 1.90: 4.03.

关键词: 包心芥菜; 多糖; 纯化; 理化性质

中图分类号: Q 539: S 631

文献标识码: A

包心芥菜具有抗癌、清热、利尿、养胃、解毒、降压、降脂等功能^[1-4], 这些可能与其中的多糖有关. 哈森其木格等^[5,6]曾对芥菜多糖进行过初步研究, 没有得到芥菜多糖纯品. 国外还未见芥菜(*Brassica juncea*)多糖的研究报道. 本文用热水提取芥菜, 得到了其中的非淀粉类多糖, 经过分离纯化, 得到了其中的主要组分 WLP-2, 并对其进行了理化性质分析.

1 实验部分

1.1 材料与仪器

(1) 材料. 包心芥菜(市购); DEAE-Sepharose CL-6B 和葡聚糖 Dextran 相对分子质量标准品(瑞典 Pharmacia 公司), 其他试剂为分析纯, 市售.

(2) 仪器. SP-2102UV 型单光束紫外/可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司), DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海精宏仪器有限公司), N-1000 型旋转蒸发仪(东京理化公司), 4K15 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司), MC99-3 型自动液相色谱分离层析仪(上海沪西分析仪器厂), 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Shodex Sugar KS-804 不锈钢色谱柱(8.0 mm × 300 mm, 日本昭光通商(上海)有限公司), ZORBAX Carbohydrate 柱(250 mm × 4.6 mm, 美国 Agilent 公司), UV-2401PC 型紫外光谱仪(日本岛津公司), FTIR 2000 型红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司), EC135-90 型电泳仪(美国 Thermo 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 热水提取 称取 100 g 包心芥菜干品, 加入 4 L 蒸馏水, 于 90 °C 热水恒温提取 120 min. 提取结束后用 4 层纱布过滤, 于离心机(4 000 r · min⁻¹) 离心 10 min, 取上层清液测定多糖质量浓度. 旋转蒸发浓缩上层清液至原体积的 1/8~1/10, 加入体积分数为 95% 的乙醇至溶液的乙醇体积数为 55%, 置于 4 °C 冰箱中醇析 3 h 后, 于离心机(6 000 r · min⁻¹) 上离心 15 min, 沉淀依次用无水乙醇和丙酮洗涤 3 次, 真空干燥, 即得到包心芥菜多糖粗品 WLCP.

1.2.2 碱提多糖的分离纯化 称取 3 g 的 WLCP 粗多糖, 加入 50 mL 的蒸馏水, 微热搅拌, 待多糖充分溶解后, 在 20 °C 条件下于离心机(9 000 r · min⁻¹) 上离心 20 min. 取上层清液于流水中透析 48 h, 直至多糖溶液中已经不含还原糖. 在蒸馏水中继续透析 24 h, 每 8 h 换一次水, 透析完后旋转蒸发至原来

收稿日期: 2007-10-28

作者简介: 蔡婀娜(1962-), 女, 实验师, 主要从事生化分离技术的研究. E-mail: ana@hqu.edu.cn.

基金项目: 泉州市科技计划项目(2007N03)

体积的1/3左右,离心($9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 30 min 得样品. 样品上 $1.6\text{ cm}\times 50\text{ cm}$ 的 DEAE- Sepharose CL-6B 柱, 上样量为 5 mL , 流速为 $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 经 $0\sim 1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 梯度洗脱, 每 5 min 收集 1 管洗脱液. 洗脱过程全程监控光密值 $D(260)$. 洗脱液用苯酚-硫酸法、考马斯亮蓝法和碘-碘化钾反应定性检测还原糖、蛋白质和淀粉. 最后, 洗脱液经浓缩, 真空干燥, 得到 WLP-2 样品.

1.2.3 分析与鉴定方法 (1) 醋酸纤维薄膜电泳法^[7]. 醋酸纤维薄膜 $2\text{ cm}\times 8\text{ cm}$, 缓冲液为硼砂-NaOH (pH 10), 甲苯胺蓝染色, 体积分数为 90% 的乙醇作为漂洗液, $V(\text{无水乙醇}):V(\text{冰醋酸})=3:1$ 作透明液, 电泳鉴别 WLP-2 多糖均一性. (2) 高效液相色谱(HPLC)法. 称取 3 mg 的 WLP-2 样品, 溶于 1 mL 蒸馏水中, 用 HPLC 鉴定 WLP-2 多糖均一性, 并根据样品的色谱图, 对照标准曲线, 计算出 WLP-2 多糖的相对分子质量. 色谱条件: Shodex sugar KS-804 色谱柱, 示差检测器, 用蒸馏水洗脱, 洗脱速度为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$. 另称取 50 mg 的 WLP-2 多糖, 加入 2 mL , $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 后封管, 沸水加热 9 h . 产物在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中用 BaCO_3 缓慢中和至中性, 离心取上层清液, 浓缩得样品进行 HPLC 分析. 色谱条件: ZORBAX Carbohydrate 柱, 示差检测器, 流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=80:20$, 流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$. 在相同色谱条件下, 对照标准单糖的保留时间确定糖基组成. (3) 光谱分析. 分别对样品进行紫外光谱和红外图谱鉴定.

2 结果与讨论

2.1 多糖的洗脱图谱

初步纯化的粗多糖 WLCP 通过 DEAE- Sepharose CL-6B 凝胶柱进一步分离, 自动收集洗脱液, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 如图 1 所示(N 为管数). 根据洗脱曲线将 $60\sim 100$ 管合并, 多糖组分浓缩后用蒸馏水透析 24 h , 每 8 h 换一次水, 经浓缩、醇析、真空干燥, 可得分级的多糖 WLP-2. WLP-2 多糖为浅黄色疏松状粉末, 它可溶于水或稀酸、稀碱溶液, 尤其易溶于热水, 微溶于甲醇、乙醇, 不溶于乙醚、丙酮等有机溶剂. WLP-2 多糖对苯酚-硫酸反应呈阳性, 对考马斯亮蓝反应呈阴性, 对碘-碘化钾反应呈阴性, 说明 WLP-2 中可能不含蛋白质和淀粉. 洗脱过程 $D(260)$ 值均为 0, 说明 WLP-2 中不含核酸.

2.2 电泳分析

2.2 电泳分析

醋酸纤维薄膜电泳结果显示, WLP-2 的图谱呈单一条带, 表明 WLP-2 为均一多糖.

2.3 高效液相色谱分析

高效液相色谱(HPLC)结果显示, WLP-2 呈单一狭窄对称峰, 如图 2 所示. 表明 WLP-2 为均一多糖, 与醋酸纤维薄膜电泳结果相印证. 建立了标准多糖相对分子质量与保留时间的回归方程, 根据 WLP-2 多糖的 HPLC 保留时间为 6.006 min , 按多糖标准曲线回归方程可计算出 WLP-2 多糖相对分子质量为 $433\,048$. WLP-2 的 H_2SO_4

水解液经 HPLC 分析, 对照标准单糖的保留时间, 证明 WLP-2 为杂多糖, 糖基组成为鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖, 其摩尔比 $3.21:1.00:1.66:1.90:4.03$.

2.4 光谱鉴定

WLP-2 的紫外光谱在 $260, 280\text{ nm}$ 处无明显吸收峰, 进一步说明 WLP-2 不含核酸和蛋白质等杂质成分. WLP-2 的红外光谱(IR)结果显示, 其具有多糖类物质的特征吸收峰, 如图 3 所示. 其中在 $3\,425\text{ cm}^{-1}$ 处出现一个宽峰, 是 O-H 的伸缩振动峰, 表明多糖存在分子内和分子间的氢键; 在 $2\,927\text{ cm}^{-1}$ 的

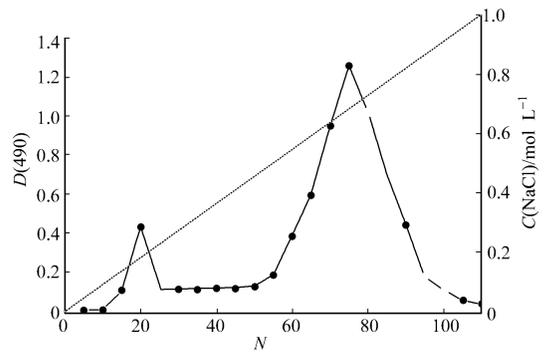


图 1 WLCP 的洗脱图谱

Fig. 1 Elution profile of WLCP

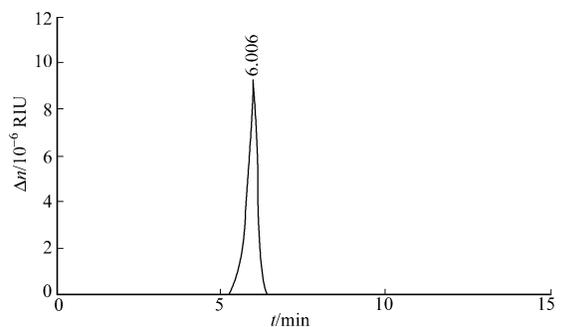


图 2 WLP-2 的高效液相色谱图

Fig. 2 Elution profile of WLP-2 on HPLC

吸收峰是 C-H 的伸缩振动峰; 在 $1\ 626\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 C=O 的伸缩振动峰; 而在 $1\ 423$, $1\ 323$, $1\ 101$, $1\ 017\ \text{cm}^{-1}$ 的峰为 C-H 的变角振动峰. 在 $890\ \text{cm}^{-1}$ 处有吸收, 而在 $850\ \text{cm}^{-1}$ 处没有吸收, 表明多糖的连接方式为 β 糖苷键, 而不是 α 糖苷键^[7].

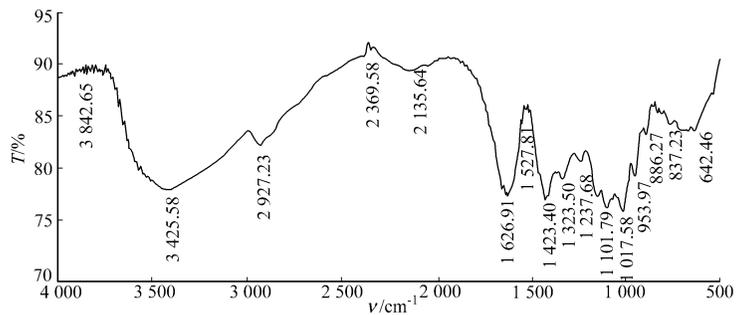


图 3 WLP 2 的红外光谱图

Fig. 3 IR spectra of WLP 2

3 结束语

采用热水法提取包心芥菜粗多糖,

经 DEAE-Sephrose CL-6B 柱层析分离纯化得到多糖 WLP-2, 并对得到的多糖进行初步的鉴定. 通过醋酸纤维薄膜电泳和高效液相色谱分析证明 WLP-2 为纯品, 光谱分析表明所得到的包心芥菜多糖 WLP 2 不含蛋白质、核酸, 为非淀粉类均一多糖.

参考文献:

- [1] 金贤荣. 芥菜的抗氧化作用[J]. 国外医学中医中药分册, 2003, 25(2): 107-109.
- [2] KHAN B A, ABRAHAM A, LEELAMMA S. Biochemical response in rats to the addition of curry leaf (*Murraya koeingii*) and mustard seeds (*Brassica juncea*) to the diet [J]. Plant Foods and Human Nutrition, 1996, 49(4): 295-299.
- [3] KHAN B A, ABRAJAM A, LEELAMMA S. Role of *Murraya koeingii* (curry leaf) and *Brassica juncea* (Mustard) in lipid peroxidation[J]. Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 1996, 40(2): 155-158.
- [4] GROVER J K, YADAV S, VATS V. Medicinal plants of India with anti diabetic potential [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 81(1): 81-100.
- [5] 哈森其木格, 贺锋嘎, 周晓军. 芥菜多糖的研究(I)——水溶性芥菜多糖的提取纯化和部分理化性质的鉴定[J]. 内蒙古民族师院学报: 自然科学汉文版, 1994, 9(2): 45-47.
- [6] 哈森其木格, 贺锋嘎. 芥菜多糖的研究(II)——芥菜多糖的分离与鉴定[J]. 化学世界, 1994(8): 439-440.
- [7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.

Isolation, Purification and Physicochemical Characteristics Analysis of the Polysaccharide from Mustard Leaf

CAI E-na, LI Xia-lan, WEI Guo-dong

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The extraction, isolation, purification and identification of water soluble polysaccharide from mustard leaf were studied. WLP 2 was identified by cellulose acetate film electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC) as homogeneous. WLP 2 was a non-starch polysaccharide without any protein and nucleic acid. Its average molecular weight was 433048. The results analyzed by HPLC after complete hydrolysis by acid showed that WLP 2 was mainly consisted of rhamnose, Xylose, arabinose, glucose and galactose in a molar ration of 3.21: 1.00: 1.66: 1.90: 4.03.

Keywords: mustard leaf; polysaccharide; purification; physicochemical characteristics

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)