

大粒车前子多糖乙醇分级及其理化性质研究

殷军艺¹, 聂少平^{1,*}, 林慧霞¹, 邹伟^{1,2}, 李昌¹, 王远兴¹, 谢明勇¹

(1. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510641)

摘要: 采用热水法从大粒车前子中提取、分离出多糖(*Plantago asiatica* L. crude polysaccharide, PLCP), 加水复溶后依次用 40% 和 60% 乙醇分级, 得到不同级分多糖(PLCP-1 和 PLCP-2), 上清液部分记为 PLCP-3。凝胶柱层析法考察 PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 凝胶色谱行为, GC 测定单糖组成, 红外和紫外光谱检测光谱性质, 并测定糖含量、糖醛酸含量和蛋白含量。结果表明: PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 均为酸性多糖, 蛋白含量较低, 其糖含量依次为 71.06%、76.71% 和 64.78%。紫外和红外测定结果显示, PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 均为酸性多糖, 且含有一定量的蛋白。PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 主要含有阿拉伯糖和木糖, 还有少量的鼠李糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖等, 但具体摩尔组成比例相差较大。

关键词: 大粒车前子多糖; 乙醇分级; 凝胶色谱; 单糖组成; 光谱性质

Ethanol Fractionation and Physico-chemical Properties of Polysaccharides from Seeds of *Plantago asiatica* L.

YIN Jun-yi¹, NIE Shao-ping^{1,*}, LIN Hui-xia¹, ZOU Wei^{1,2}, LI Chang¹, WANG Yuan-xing¹, XIE Ming-yong¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Crude polysaccharides extracted from seeds of *Plantago asiatica* L. (*Plantago asiatica* L. crude polysaccharide, PLCP) with hot water were successively fractionated by different concentrations (40% and 60%) of ethanol into two precipitation fractions named PLCP-1 and PLCP-2 and one supernatant fraction name PLCP-3. The physicochemical properties of PLCP-1, PLCP-2 and PLCP-3 were analyzed by UV and IR spectroscopy, GC and Sephacryl TM S-400 HR gel-filtration chromatography. UV and IR spectral analysis indicated that PLCP-1, PLCP-2 and PLCP-3 all were acidic polysaccharides containing a little amount of protein. The sugar contents of PLCP-1, PLCP-2 and PLCP-3 were 71.06%, 76.71% and 64.78%, respectively. Arabinose and xylose were the main monosaccharides in the polysaccharides and other monosaccharides such as rhamnose, glucose, mannose and galactose were also detected but the mol ratios of the monosaccharides were different.

Key words: polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L.; ethanol fractionation; gel chromatography; monosaccharide composition; spectral properties

中图分类号: O652.4; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)17-0034-04

车前子为大粒车前(*Plantago asiatica* L.)或平车前(*Plantago depressa* Willd.)的干燥成熟种子^[1], 夏、秋二季种子成熟时采收果穗, 晒干, 搓出种子, 除去杂质。车前子被我国卫生部列为可用于保健食品的物品, 也是我国传统中医用药之一。车前子种皮外表细胞壁含有 10%~30% 黏液质, 为一种亲水性胶体, 属多糖类物

质, 是车前子中主要的有效成分, 常被称为车前子多糖或车前子胶, 可用于流体食品改善口感和作为医药品的缓溶剂等方面。

车前子多糖具有缓泻、降血糖、降血脂、抗炎及免疫等活性^[2-5]。但由于车前子多糖具有很高的黏度, 制约其进一步地分离纯化, 影响了结构测定进程。因此

收稿日期: 2009-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(20802032); 高等学校博士学科点专项科研项目(200804030001);

江西省自然科学基金项目(2008GZH 0050); 江西省教育厅 2008 年度科技计划项目(GJJ08056)

作者简介: 殷军艺(1986—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品化学与食品分析。E-mail: hongyu112233@163.com

* 通讯作者: 聂少平(1978—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学与工程、食品营养与安全及糖生物学。

E-mail: spnie@ncu.edu.cn

国内对车前子多糖的研究多集中在品质、临床和一些成分不明确的药理研究,对结构的认识更多是利用国外的研究成果^[6-9]。

大粒车前子是我国古代最早、最广泛使用的正品药材之一,主产于江西省吉安、吉水、泰和一带,年产量上千吨。本实验拟采用水提醇沉法从大粒车前子中制备得到精制车前子多糖,加水复溶后进行乙醇分级沉淀得到不同级分多糖。凝胶柱层析考察其色谱行为,GC分析单糖组成,并结合紫外、红外等方法全面考察各种多糖理化性质,以期为更快、更好分离纯化车前子多糖提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大粒车前子 江西吉安。

Sephacryl™ S-400 HR 葡聚糖凝胶填料 Amersham Biosciences 公司; D-半乳糖、鼠李糖、D-甘露糖、D-木糖、D-核糖、L-岩藻糖、D-阿拉伯糖和 D-葡萄糖醛酸 上海国药试剂公司; 考马斯亮蓝 G-250(进口分装) Fluka 公司; 牛血清蛋白 Amersco 公司; 葡萄糖、无水乙醇、丙酮、乙醚、氯仿、正丁醇、氯化钠、咪唑、盐酸羟胺、吡啶等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

6890N 型气相色谱仪(GC) 美国 Agilent Technologies 公司; ALPHA 1-2 冷冻干燥机 德国 Martin Christ 公司; Nicolet FT-IR 5700 型傅立叶红外光谱仪 美国 Thermo Electron 公司; TU-1900 双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; AL 104 电子天平 上海梅特勒-托利多仪器公司; 旋转蒸发器 上海申生科技有限公司; 电子恒温不锈钢水浴锅 上海宏兴机械仪器实业制造公司; TDL-5 型离心沉淀机 上海飞鸽系列离心机厂。

1.3 方法

1.3.1 车前子多糖制备

称取干燥车前子 50g 加入 80% 乙醇浸泡 24h, 双层滤布过滤后挥干乙醇。加 500ml 蒸馏水, 沸水浴回流提取 3h, 离心分离后双层滤布过滤, 滤渣重复提取一次, 合并滤液, 真空浓缩。加入 0.15% 木瓜蛋白酶作用 2h 后, 再用 Sevag 法脱蛋白, 反复进行 3 次至无蛋白层, 然后用流动自来水透析 48h, 蒸馏水透析 24h, 透析液真空浓缩醇沉(80%), 于 4℃ 冰箱中醇沉过夜, 再离心分离, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗两次, 冷冻干燥得精制车前子多糖(*Plantago asiatica* L. crude polysaccharide, PLCP)。

1.3.2 车前子多糖乙醇分级沉淀

称取 PLCP 加水复溶, 依次用 40%、60% 乙醇分级, 得不同级分多糖(依次为 PLCP-1、PLCP-2), 剩余上清液浓缩冻干(PLCP-3)。

1.3.3 理化指标测定

以木糖为标准, 苯酚-硫酸法测定糖含量^[10]; 以葡萄糖醛酸为标准, 硫酸-咪唑法测定糖醛酸含量; 以牛血清蛋白为标准, 考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量。

1.3.4 Sephacryl™ S-400 HR 凝胶柱色谱分析

用 26 XK × 60 cm 的 Sephacryl™ S-400 HR 葡聚糖凝胶层析柱考查 PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 凝胶色谱行为。流动相: 0.15mol/L NaCl; 流速: 1.25ml/min, 按 5ml/管收集; 苯酚-硫酸法跟踪检测多糖, 绘制洗脱曲线。

1.3.5 紫外和红外光谱分析

将样品溶液(1mg/ml)置于紫外-可见分光光度计中于 190~400nm 波长处扫描。

称取干燥样品 1~2mg, KBr 研磨后压片, 用 Nicolet FT-IR 5700 傅立叶变换红外光谱仪在 400~4000cm⁻¹ 区内进行扫描。

1.3.6 单糖组成分析

称取 3mg 样品于安培管中, 加入 2ml 浓度为 2mol/L 的三氟乙酸, 真空封管, 100℃ 水解 2h, 反应完成后冷却至室温, 70℃ 水浴 N₂ 挥干, 得到水解后的单糖混合物。

取鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、核糖和岩藻糖 8 种标准单糖各 2mg 于样品管中, 加入 10mg 盐酸羟胺, 0.5ml 吡啶溶解, 加塞, 90℃ 恒温水浴振荡 30min, 冷却至室温后, 加入 0.5ml 乙酸酐, 加塞, 90℃ 恒温水浴振荡 30min, 冷却至室温, 即得糖腈乙酸酯衍生物。将水解后的样品按照相同方法进行衍生。

1.3.7 GC 工作参数

色谱柱: DB1701 石英毛细管柱(30m × 0.25mm, 0.25 μm), 固定液为 SE-54; FID 检测器, 载气为 N₂。程序升温: 初始温度 170℃, 保持 2min, 以 10℃/min 升至 250℃, 250℃ 维持 20min; 色谱柱温度: 250℃; 进样口和检测器温度: 250℃; 进样量 1 μl, 分流比 20:1。

2 结果与分析

2.1 理化指标测定

表 1 PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 化学组成分析

Table 1 Chemical compositions of PLCP-1, PLCP-2 and PLCP-3

	糖含量(%)	糖醛酸含量(%)	蛋白含量(%)
PLCP-1	71.06	18.64	1.40
PLCP-2	76.71	26.50	1.20
PLCP-3	64.78	21.37	1.92

PLCP 经不同浓度乙醇分级沉淀所得产物 PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3。PLCP-1 呈灰白色絮状，PLCP-2 和 PLCP-3 则为浅灰色粉末状。3 种多糖的理化指标见表 1，PLCP-2 糖含量、糖醛酸含量比较高，分别达到 76.71%、26.50%，同时蛋白含量较低。

2.2 Sephacryl™ S-400 HR 凝胶柱层析

葡聚糖凝胶柱层析是根据多糖分子的大小和形状不同进行分离。介于这一原理，通过 Sephacryl™ S-400 HR 凝胶柱层析，可以在一定程度考察反映 PLCP-1、PLCP-2、PLCP-3 之间相对分子量的差异。

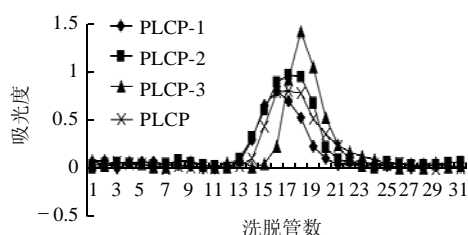
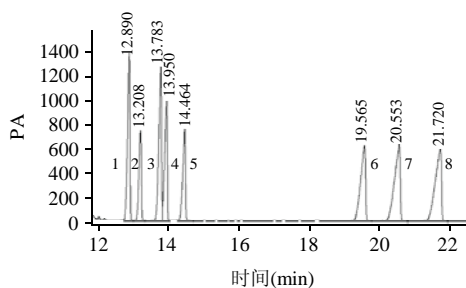


图 1 Sephacryl™ S-400 HR 凝胶柱洗脱曲线
Fig.1 Elution profiles of PLCP-1, PLCP-2 and PLCP-3 on Sephacryl™ S-400 HR column

由图 1 可见，PLCP 洗脱曲线分布最宽，从 14 管开始出峰直到 22 管结束。PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 三种多糖洗脱曲线相对较窄，洗脱曲线呈逐渐后推趋势。PLCP-1 和 PLCP-2 洗脱曲线有一定的重叠，其中 PLCP-3 洗脱曲线后移明显，比较对称。同时在实验中发现，PLCP-2 和 PLCP-3 进样时间明显比 PLCP-1 短，流速波动小。由此可知，采用乙醇对大粒车前子多糖进行分级，在一定意义上可以到达分离、纯化目的。但由于车前子多糖这一黏性多糖，夹带现象比较严重，从而使每一级分沉淀中有可能残留上一级沉淀产物。

2.3 单糖组成



1. 鼠李糖；2. 核糖；3. 岩藻糖；4. 阿拉伯糖；
5. 木糖；6. 甘露糖；7. 葡萄糖；8. 半乳糖。

图 2 标准单糖糖腈乙酸酯衍生物的 GC 图
Fig.2 GC chromatogram of monosaccharide standards

将单糖衍生得到的糖腈乙酸酯依次进样经 GC 分析，混合标样衍生物的气相色谱图如图 2 所示。8 种单糖衍生

物除岩藻糖衍生物和阿拉伯糖衍生物没有完全分离外，其他均得到较好地分离。

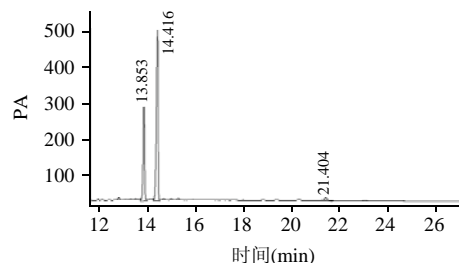


图 3 PLCP-1 单糖组成的 GC 图
Fig.3 GC chromatogram of monosaccharides from PLCP-1

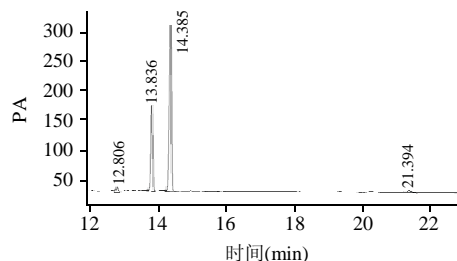


图 4 PLCP-2 单糖组成的 GC 图
Fig.4 GC chromatogram of monosaccharides from PLCP-2

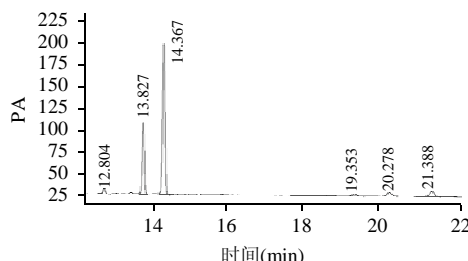


图 5 PLCP-3 单糖组成的 GC 图
Fig.5 GC chromatogram of monosaccharides from PLCP-3

表 2 车前子多糖的单糖物质的量的组成比
Table 2 Monosaccharide composition of PLCP-1, PLCP-2 and PLCP-3

	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
PLCP-1	—	26.19	53.79	—	—	1.00
PLCP-2	2.25	25.08	51.06	—	—	1.00
PLCP-3	0.56	8.33	18.61	0.33	0.63	1.00

注：“—”表示未检测到；以半乳糖物质的量为基准。

样品 GC 图见图 3~5。从表 2 中可以看出，PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 主要含有阿拉伯糖、木糖，此外还含有其他不同数量的单糖，但各种单糖的组成比例不大相同。

2.4 紫外光谱扫描

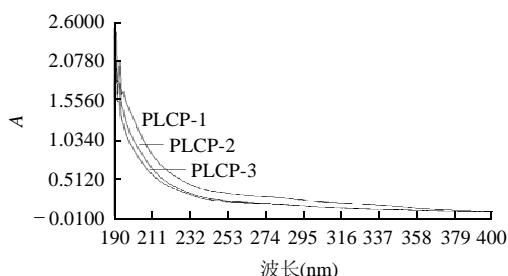


图6 PLCP-1、PLCP-2和PLCP-3溶液的紫外扫描光谱
Fig.6 UV scanning spectra of PLCP-1, PLCP-2 and PLCP-3

乙醇分级沉淀获得的多糖 PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 (1mg/ml), 经紫外-可见分光光度计扫描(波长范围为 200~400nm), 结果见图 6。3 种多糖在 260nm 处没有吸收峰, 说明不含核酸成分; 在 280nm 附近基本无吸收, 这可能和蛋白含量低有关。

2.5 红外光谱分析

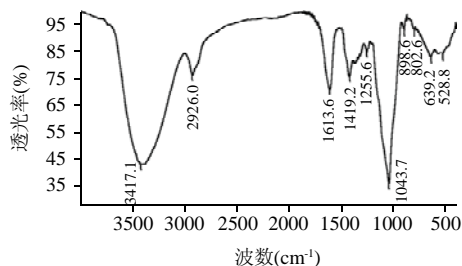


图7 PLCP-1 红外光谱图
Fig.7 IR spectrum of PLCP-1

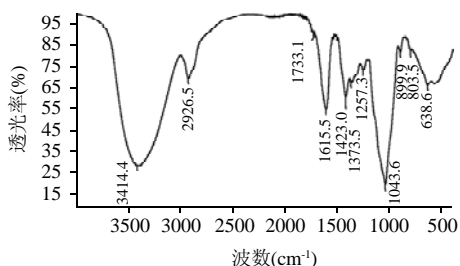


图8 PLCP-2 红外光谱图
Fig.8 IR spectrum of PLCP-2

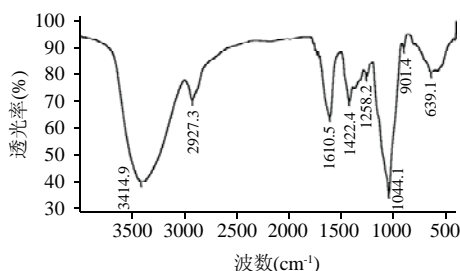


图9 PLCP-3 红外光谱图
Fig.9 IR spectrum of PLCP-3

红外光谱是一种有效研究分子官能团特征的手段。

图 7~9 在 3400~3000cm⁻¹ 出现的宽峰为糖类的 O-H 或蛋白质的 N-H 的伸缩振动; 2926cm⁻¹ 出现的峰为 C-H 的伸缩振动, 1400~1200cm⁻¹ 之间的一组峰应该是糖类的 C-H 变角振动, 由以上 3 个特征峰可以初步确定 PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 为多糖。1800~1550cm⁻¹ 之间吸收峰应该包含有一 COOH 的 C=O 吸收峰、酰胺基 RCONHR- 的振动吸收, 1420cm⁻¹ 附近的吸收峰应该为 N-H 的变角振动, 证明 3 种多糖应该含有蛋白质。1255cm⁻¹ 吸收峰为 COOH 中 O-H 的变角振动, 由此可以判断该 3 种多糖含有 -CHO 和 -COOH, 即含有糖醛酸。1045cm⁻¹ 应该吡喃型糖苷的特征吸收。899cm⁻¹ 附近的弱吸收为 β-吡喃糖环的非对称伸缩振动所造成的。

由此可知, 虽然经过乙醇分级, 但是 PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 基本都具有相同官能团。红外结果再次表明, 该 3 种多糖都是含有蛋白的酸性多糖。

3 结论

实验首次研究了大粒车前子多糖乙醇分级及其理化性质。结果表明, PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 糖含量较高, 蛋白含量较低, 且含有一定量的糖醛酸, 这与紫外和红外所得结论相一致。凝胶柱层析显示, 3 种多糖凝胶色谱行为有一定的差异性, 随着醇沉浓度的增加其对应洗脱曲线逐渐推后。GC 测定结果表明, PLCP-1、PLCP-2 和 PLCP-3 主要含有阿拉伯糖和木糖, 此外还有少量的鼠李糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖等, 但具体单糖摩尔组成比例有较大的差异。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 46.
- [2] 张振秋, 李锋, 孙兆姝, 等. 车前子的药效学研究[J]. 中药材, 1996, 19(2): 87-89.
- [3] 吴光杰, 田颖刚, 谢明勇, 等. 车前子多糖对便秘模型小鼠通便作用的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 514-516.
- [4] MASASHI T, MAEMI Y, KAZUYO I. Plant mucilages. XXIX. Isolation and characterization of a mucous polysaccharide, "plantago-mucilage A", from the seeds of *Plantago major* var. *asiatica*[J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(10): 2877-2884.
- [5] HUI L, WANG Q J. Evaluation of free hydroxyl radical scavenging activities of some Chinese herbs by capillary zone electrophoresis with amperometric detection[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 378(7): 1801-1805.
- [6] 唐永富, 黄丹菲, 殷军艺, 等. 车前子多糖对骨髓来源树突状细胞表型和吞噬功能的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 517-519.
- [7] FISCHER M H, YU N X, GRAY G R, et al. The gel-forming polysaccharide of psyllium husk (*Plantago ovata* Forsk)[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339: 2009-2017.
- [8] ALASSAF S, PHILLIPS G O, WILLIAMS P A, et al. Molecular weight, tertiary structure, water binding and colon behaviour of ispaghula husk fibre[J]. Proc Nutr Soc, 2003, 62(1): 211-216.
- [9] GUO Q, CUI S W, WANG Q, et al. Fractionation and physicochemical characterization of psyllium gum[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 73(1): 35-43.
- [10] 周超, 谢明勇, 万茵, 等. 车前子多糖的测定方法研究[J]. 分析实验室, 2008, 27(4): 10-13.