

DEAE 纤维素纯化玉米须总多糖的工艺优选

孙晓雪, 康杰, 王昶, 王伟明*

(黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

[摘要] 目的: 优选玉米总多糖的 DEAE 纤维素纯化工艺, 确定中性多糖和酸性多糖的比例。方法: 采用蒽酮-浓硫酸法测定总多糖含量, 检测波长 625 nm。通过单因素试验考察上样量、洗脱剂浓度及用量对 DEAE 纤维素纯化玉米须总多糖的影响。结果: 最佳纯化工艺为上样量 0.75 BV, 分别用 10 BV 水和 15 BV 的 0.1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱, 可较充分地将中性总多糖和酸性总多糖洗脱下来; 中性多糖和酸性多糖分别占总多糖的 30.43% 和 58.88%, 纯度分别提高了约 2.5 和 2 倍。结论: DEAE 纤维素纯化玉米须总多糖效果较好, 该法适合玉米须总多糖的纯化, 可分离中性总多糖和酸性总多糖。

[关键词] 玉米须总多糖; 中性多糖; 酸性多糖; 葡萄糖; DEAE 纤维素

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0028-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150028

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1535.006.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:35

Optimization of Purification Process for Total Polysaccharides in Stigma Maydis with DEAE Cellulose

SUN Xiao-xue, KANG Jie, WANG Chang, WANG Wei-ming*

(Heilongjiang Traditional Medical Academy of Sciences, Harbin 150036, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total polysaccharides from Stigma Maydis by DEAE cellulose and determine proportion of neutral and acidic polysaccharides. **Method:** Anthrone sulfuric acid method was adopted to determine the content of total polysaccharides with detection wavelength at 625 nm. Single factor tests were used to investigate effects of sample amount, concentration and dosage of eluant on purification process of total polysaccharides from Stigma Maydis by DEAE cellulose. **Result:** The best purification process was as following: sample volume of 0.75 BV, eluted with 10 BV of water and 15 BV of 0.1 mol·L⁻¹ NaCl solution; concentrations of neutral and acidic polysaccharides in total polysaccharides were 30.43% and 58.88%, purities of them increased about 2.5 and 2 times, respectively. **Conclusion:** Purification of total polysaccharides from Stigma Maydis with DEAE cellulose was suitable and it could separate neutral polysaccharides and acid polysaccharides at the same time.

[Key words] total polysaccharides from Stigma Maydis; neutral polysaccharides; acidic polysaccharides; glucose; DEAE cellulose

玉米须味甘、淡, 性平, 入阳明胃经, 归肾、肝、胆经, 功效利尿消肿、清肝利胆^[1]。总多糖作为玉米须的主要有效成分之一, 具有利尿、降压、降血糖、利

胆、保护肝损伤、调节免疫等药理活性^[2]。目前对玉米须总多糖的研究主要集中于提取分离、含量测定、药理药效等方面, 其中分离纯化常采用传统的水

[收稿日期] 20131115(012)

[基金项目] 黑龙江省科技攻关项目(GA12C102)

[第一作者] 孙晓雪, 硕士, 从事中药质量标准及保健食品开发研究, Tel:18704636760, E-mail: caoyang3115253@163.com

[通讯作者] * 王伟明, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药及保健食品开发研究, Tel:13904611646, E-mail: zyyjy@163.com

提醇沉法、脱色法和脱蛋白法^[3],这些方法往往只能得到粗多糖,杂质很多,脱色效果亦不理想。现在国内外对药材中多糖类物质的纯化常在以上传统方法的基础上,联合应用 DEAE-纤维素柱层析和凝胶色谱对粗多糖进一步纯化、精制,取得较好的效果^[4-5],且 DEAE-纤维素柱层析法还可分离中性多糖和酸性多糖。故本实验采用 DEAE 纤维素柱层析法纯化玉米须总多糖,验证该方法的适用性并考察其工艺参数,为该成分的精制及其相关研究提供参考。

1 材料

UA-160 型紫外分光光度计(日本岛津公司),AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。玉米须由哈尔滨东金现代农业股份有限公司提供,产地黑龙江,经黑龙江中医研究院研究员方自若鉴定为绥玉 7 号玉米的玉米须,即禾本科植物玉米 *Zea mays* L. 雌蕊的花柱和柱头;DEAE-52 型纤维素(国药集团化学试剂有限公司),葡萄糖对照品(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 100317),水为去离子水或纯水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总多糖的含量测定

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取于 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 25 mg,加水定容至 250 mL,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备与测定 精密称取干燥的玉米须 10 g,剪碎,加水 400 mL 煎煮 3 次,每次 1 h,提取液减压干燥,加水 10 mL 溶成稠膏状,边搅拌边加入 95% 乙醇 400 mL,放置 12 h,过滤,滤渣挥干溶剂后加水 50 mL 使溶解,加 Sevag 试剂(三氯甲烷-正丁醇=4:1)脱蛋白 3 次,水层即为粗多糖溶液,粗多糖溶液挥干有机溶剂,加水定容至 200 mL,即得 0.05 g·mL⁻¹ 供试品溶液。精密吸取待测溶液 2 mL 置于 10 mL 具塞试管中,加入 0.2% 蒽酮-浓硫酸溶液 5 mL,摇匀,置于沸水浴中加热 20 min,用冷水速冷至室温,以水作为空白对照,于 625 nm 处测定吸光度(A)^[6],计算总多糖质量浓度 0.785 3 g·L⁻¹。

2.1.3 精密密度试验 精密称取葡萄糖对照品溶液 3.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水定容后摇匀,精密量取该溶液 2 mL 置于具塞试管中,按 2.1.2 项下方法操作,于 625 nm 测定 5 次 A,计算 RSD 1.77%,说明仪器精密密度良好。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取葡萄糖对照品溶液 1,2,3,4,5,6 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,

加水定容,摇匀,得系列对照品溶液。精密吸取系列葡萄糖对照品溶液各 2 mL,分别置于 10 mL 具塞试管中,按 2.1.2 项下方法操作,以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 11.923C - 0.00798$ ($R^2 = 0.9934$),表明葡萄糖在 10~60 μg 与 A 呈良好线性关系。

2.1.5 稳定性试验 精密称取葡萄糖对照品溶液 5 mL 于 10 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,精密吸取 2.0 mL 置于 10 mL 具塞试管中,按 2.1.2 项下方法操作,在 0~60 min 间每隔 10 min 测定 1 次 A,结果 RSD 1.03%,说明对照品溶液在 1 h 内稳定性良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品溶液 5 份,分别加入不同量的葡萄糖对照品溶液,按 2.1.2 项下方法测定 A,计算平均回收率 100.81%,RSD 1.65%,表明本方法回收率较高。

2.2 DEAE 纤维素的前处理与装柱^[7] 将纤维素干粉在水中浸泡 5 h,抽滤,加 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液浸泡 3 h,抽滤,水洗至中性,抽干,加 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液浸泡 3 h,抽滤,水洗至中性,即可。将层析柱清洗干净,垂直固定至层析架上,加入水 1/3 BV,打开出液口,水流畅通,即刻轻轻倒入用水混溶至适宜浓度的纤维素,出液口流速控制在 6~8 滴/min,使纤维素缓慢沉降所需柱体积为止,加水冲洗柱子 5 h,使其达到平衡,即装柱完成。

2.3 DEAE 纤维素纯化条件优选

2.3.1 上样量考察 取预处理好的 DEAE-52 型纤维素湿法上柱(柱高 40 cm,柱体积 80 cm³,下同),将 2.1.2 项下供试品溶液缓缓倒入层析柱中,出液口流速控制在 0.8 mL·min⁻¹,收集流出液,每 10 mL 为 1 份,共收集 10 份,分别精密吸取 0.05 mL 置于试管中,加水补至 2.0 mL,按 2.1.2 项下方法测定 A,结果发现上样量在 60~70 mL 时,流出液中总多糖显色后在 625 nm 处的 A 发生突变,说明吸附接近饱和,故确定上样量 60 mL,即 0.75 BV,等价生药量 3 g。

2.3.2 洗脱剂浓度考察 按 2.3.1 项下确定参数上样后,依次加水 and 0.1,0.3,0.5,0.7 mol·L⁻¹ NaCl 溶液各 10 BV 洗脱,控制流速 1.0 mL·min⁻¹,将各洗脱液减压浓缩至 200 mL,按 2.1.2 项下方法测定 A,计算各洗脱液中总多糖质量浓度分别为 0.068 3,0.108 4,0.023 5,0.010 7,0.008 2 g·L⁻¹,洗脱率依次为 29.00%,46.03%,9.98%,4.59%,3.46%。结果表明加水和 0.1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液可将绝大部分

多糖类成分洗脱下来;根据纤维素分离多糖类成分的原理,水主要洗脱下中性多糖,而 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液主要洗脱下来酸性多糖。

2.3.3 洗脱剂用量考察 取预处理好的 DEAE-52 型纤维素湿法装柱,精密吸取供试品溶液 60 mL 上样,加水洗脱,收集洗脱液,每 0.5 BV 为 1 份,将每份洗脱液浓缩后加水定容至 25 mL,按 2.1.2 项下方法测定 A 以确认水洗脱完全,见图 1;加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液洗脱,同法收集洗脱液,按 2.1.2 项下方法测定 A,见图 2。结果显示加水约 10 BV 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 约 15 BV 洗脱后,洗脱液的多糖显色反应明显减弱。

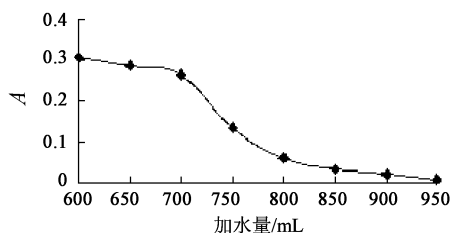


图1 水洗用量对玉米须总多糖 DEAE 纤维素纯化工艺的影响

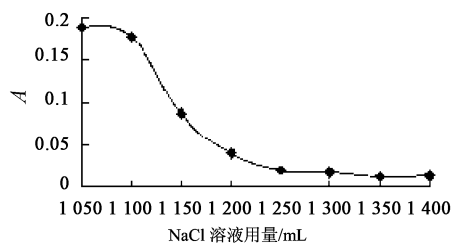


图2 NaCl 溶液用量对玉米须总多糖 DEAE 纤维素纯化工艺的影响

2.3.4 验证试验 精密称取干燥玉米须 3 份,每份 3 g,剪碎,各加水 120 mL 煎煮 3 次,每次 1 h,按 2.1.2 项下方法醇沉、脱蛋白后,加水定容至 60 mL,分别过 DEAE 纤维素柱,按优选的工艺条件进行纯化,收集洗脱液并减压浓缩至 500 mL,按 2.1.2 项下方法计算中性多糖质量浓度分别为 0.029 8, 0.027 7, 0.028 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,酸性多糖则分别为 0.054 6, 0.056 1, 0.055 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;中性多糖与酸性多糖占总多糖的质量分数分别为 30.43% 和 58.88%。

2.4 总多糖纯度测定 将 2.3.4 中粗多糖溶液浓缩干燥,称定质量,计算总多糖纯度分别为 14.46%, 14.02%, 14.74%。分别将经 DEAE 纤维

素柱纯化后的洗脱液浓缩干燥,称重,计算中性多糖纯度分别为 37.25%, 34.63%, 35.69%, 酸性多糖分别为 27.32%, 28.07%, 27.90%, 二者纯度较粗多糖粉末中总多糖纯度分别提高了约 2.5 和 2 倍。

3 讨论

玉米须总多糖的文献报道主要侧重于对其提取、粗纯化及功能活性的研究,对高纯度多糖类物质的活性、结构鉴定、构效关系的研究相对较少^[8],说明制备高纯度的玉米须总多糖,对其深入研究具有重要意义。在各种纯化方法中,纤维素柱层析是一种常用的多糖纯化方法,具有纯化率高、脱色效果较好的优点,同时还可分离中性多糖和酸性多糖。故本文采用该方法纯化玉米须总多糖并探索了其工艺条件,得到了纯度大幅提高的中性总多糖和酸性总多糖,为玉米须总多糖的深入研究提供参考。但此法存在分离速度较慢、条件要求较严格、成本较高等问题,今后可针对这些难点进行改进,还可研究应用凝胶柱层析将多糖按相对分子质量大小分离,进而对多糖的组成、结构、构效关系等方面进行研究。

[参考文献]

- [1] 徐燕,梁敬钰,邹忠梅.玉米须的化学成分[J].中国天然药物,2008,6(3):237.
- [2] 叶盛英,高文远.中药玉米须研究进展[J].中成药,2008,30(5):745.
- [3] 胡瑛瑛,楼肖成,郭勇,等.玉米须多糖的研究进展[J].安徽农学通报,2009,15(8):36.
- [4] Yang B, Jiang Y M, Zhao M M, et al. Structural characterisation of polysaccharides purified from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp [J]. Food Chem, 2009, 115(2): 609.
- [5] 孙玉军,陈彦,吴佳静,等.草乌多糖的分离纯化和组成性质研究[J].中国药学杂志,2000,35(11):731.
- [6] 惠秋沙.玉米须保健饮料中多糖含量的测定[J].食品研究与开发,2011,32(8):103.
- [7] 李敏晶,毛婕昕,付荣香. DEAE-纤维素分离提纯海带硫酸多糖的研究[J].广东化工,2010,37(9):30.
- [8] 赵文竹,于志鹏,于一丁,等.玉米须多糖的研究进展[J].食品科学,2010,31(11):289.

[责任编辑 刘德文]