

# 大米草多糖的提取及其单糖组成的 GC-MS 分析

徐年军, 何艳丽, 武 敏, 严小军

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 分析了海洋滩涂生物大米草(*Spartina anglica*)中的多糖成分和单糖组成, 为这种生物资源的开发提供科学依据。利用水提醇沉、Sevag 法脱蛋白得到纯大米草多糖, 经三氟乙酸降解、糖腈乙酸酯衍生, 最后用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)分析大米草多糖中的单糖组成。结果表明大米草单糖组成为鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖, 其质量分数分别是: 4.13%, 3.02%, 11.94%, 8.89%, 6.82%, 27.18%, 38.00%。大米草多糖是一种可利用的食品资源, 其主要成分半乳糖、葡萄糖都是营养价值很高的单糖, 大米草多糖可深入研究开发其生物活性用作保健食品。

**关键词:** 大米草(*Spartina anglica*); 多糖; 单糖组成; GC-MS 分析

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)09-0015-04

大米草(*Spartina anglica*)是一种具有生态影响的海洋滩涂植物, 目前对我国沿海生态和生物多样性、滩涂养殖等造成了较大的负面影响。但大米草是一种具有顽强生命力的植物, 其有效的控制和生态防除是一个世界性的难题<sup>[1]</sup>。同时大米草在沿海滩涂防风护堤、促淤造田等方面也具有一定的正面生态效应<sup>[2]</sup>。在这种情况下, 对大米草生物资源的开发利用是一种最佳的选择<sup>[3]</sup>。

大米草生物量大、用途很多, 大米草多糖和黄酮类活性物质可用作保健食品。关于大米草多糖的新闻报道很多, 主要涉及多糖的提取等, 如上海寿琪多糖食品研究所与福州中卫多糖科技公司合作进行了大米草多糖的提取并申请了相关的专利。但大米草生物活性物质的研究报道很少, 大米草多糖理化性质及单糖组成分析方面的研究未见报道<sup>[4]</sup>。作者首次研究了大米草多糖的单糖成分分析, 为大米草多糖的开发利用打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

新鲜大米草(*Spartina anglica*)于 2005 年 4 月采于浙江象山县鹤浦沿海滩涂。大米草洗净后去除根部, 将茎叶剪碎后备用。

### 1.2 仪器和试剂

单糖标准品购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 本实验中所用的主要有赤藓糖(erythrose)、鼠李糖(rhamnose)、核糖(ribose)、阿拉伯糖(arabinose)、岩藻糖(fucose)、木糖(xylopyranose)、甘露糖(mannose)、

葡萄糖(glucose)、半乳糖(lactose)和肌醇(inositol)。试剂盒 HMDS(Hexamethyldisilazane, 六甲基二硅烷)+TMCS, 3:1(Sylon HT)购自美国 Supelco 公司, 其他试剂为国产分析纯。主要分析仪器有岛津公司的气相色谱-质谱仪(Shimadzu QP2010 GC-MS), Supelco 公司生产的 30 m×0.25 mm×0.25 μm SPB-50 色谱柱; Thermo 公司的 Multiskan MK3 型酶标仪等。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 大米草多糖的提取纯化

新鲜大米草样品 40 g 于 60℃ 烘干 12 h, 液氮冷冻后碾碎, 于 90℃ 恒温水浴浸提 5 h, 过滤, 滤渣重复提取 2 次, 合并提取液, 旋转蒸发浓缩至 100 mL。加入乙醇于冰箱中过夜沉淀, 沉淀物用无水乙醇洗涤数次, 60 mL 水溶解。按 Sevag 法<sup>[5]</sup>除蛋白质, 透析除去杂质。加适量蒸馏水溶解, 冷冻干燥, 得大米草多糖共 64 mg。

### 1.3.2 大米草多糖的进一步纯化

将得到的大米草多糖样品进行 Sephadex DEAE A50 凝胶柱层析(2.2 cm×20 cm), 蒸馏水和 1 mol/L NaCl 恒速洗脱, 等体积自动接收, 硫酸苯酚法<sup>[6]</sup>检测洗脱样品中的总糖含量, 绘制洗脱曲线, 根据洗脱样品峰截取第 8~18 管(每管 4 mL, SPI), SPI 为大米

收稿日期: 2010-03-09; 修回日期: 2010-04-23

基金项目: 浙江省卫生厅项目(2005B149); 浙江省自然科学基金项目(Y507263); 浙江省钱江人才计划项目(2007R10038); 宁波市自然科学基金项目(2007A610071)

作者简介: 徐年军(1973-), 男, 湖北赤壁人, 博士, 研究员, 主要从事海洋生物活性物质研究, 电话: 0574-87600458, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

草多糖主要组分, 为均一多糖。

### 1.3.3 多糖降解时间的确定

在 4 个反应瓶中各自加入 15  $\mu$ L 的 2 g/L 的大米草多糖溶液, 氮气吹干后分别加入 1 mL 的 2 mol/mL 的三氟乙酸, 120 $^{\circ}$ C 分别油浴 45、60、75、90 min, 获得 4 个降解单糖样品, 加入甲醇 1 mL(3 次), 减压蒸馏彻底去除三氟乙酸。

### 1.3.4 醛糖衍生化

单糖标准品和降解单糖样品分别加入 10 mg 盐酸羟胺和 0.5 mL 吡啶, 密封条件下在 90  $^{\circ}$ C 加热反应 30 min 生成糖肟, 加入 1:1 的醋酸酐后 90 $^{\circ}$ C 油浴 30 min 生成具有挥发性的糖腈乙酸酯衍生物, 氮气吹干后用二氯甲烷定容, GC-MS 进样分析。每个样品作 3 个平行样。

### 1.3.5 酮糖衍生化

酮糖衍生化直接用试剂盒, 待测样品加入六甲基二硅胺烷(HMDS)80 $^{\circ}$ C 油浴 60 min 后生成可挥发的衍生物, 氮气吹干后正己烷定容, 直接进行 GC-MS 分析。每个样品作 3 个平行样分析。

### 1.3.6 GC-MS 检测条件

主要实验条件参照 Ye 等<sup>[7]</sup>。GC 条件: 进样口温度为 250 $^{\circ}$ C, 载气为 99.99% 的高纯氦, 柱流速 1 mL/min, 初始柱前压 26.3 kPa, 柱起始温度 100 $^{\circ}$ C, 保持 3.5 min, 以 15 $^{\circ}$ C/min 升至 160 $^{\circ}$ C, 保持 20 min, 再以 15 $^{\circ}$ C/min 升至 200 $^{\circ}$ C, 保持 15 min, 再以 20 $^{\circ}$ C/min 升至 280 $^{\circ}$ C, 保持 5 min。分流进样, 分流比为 9.6。

MS 条件: 用电子轰击(Electron Impact, EI)源分析, 电子能量为 70 eV, 离子源温度 200 $^{\circ}$ C, 接口温度 250 $^{\circ}$ C。选取全程离子碎片扫描(SCAN)模式时, 质量扫描范围为 50~600, 溶剂延迟 3.5 min。选取特征离子碎片扫描(SIM)模式时, 醛糖选用 145  $m/z$ 、酮糖选用 217  $m/z$  为定量时的目标离子, 另选两个离子作为定性时的参考离子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大米草多糖的提取率

本实验为了保证提取样品的纯度, 提取率不是很高, 仅为 0.16%。提取过程中的主要损失步骤包括酒精沉淀、有机溶剂去蛋白、乙醇洗涤及层析柱纯化等。不同的提取方法, 特别是多糖提取过程中的脱蛋白的方法很多, Sevag 法是比较经典的方法, 目前已经广泛用于生物样品中糖复合物的提纯及提取过程中蛋白质的去除<sup>[6]</sup>。

大米草多糖的提取未见有专业文献报道。新闻报道中只提到双酶水解法和超低温冷冻干燥技术获得大米草多糖, 但具体的提取方法未见报道。相关的专利中大米草多糖的提纯方法(申请号: 200410069331.7)主要采用浸泡、酶解法获得大米草多糖, 采用超滤膜分离技术将大米草浓缩液过滤, 从而使大米草多糖的纯度提高了 60%以上, 没有对大米草多糖进行进一步纯化, 没有获得提取率等参数。

本文采用的提取方法具有较好的重复性, 特别是提取的纯度高, 可用于进行单糖组成分析和结构分析, 在随后的实验中也采用这种提取方法, 均获得了较满意的结果。

### 2.2 大米草多糖的纯度测定

大米草多糖用 Sephadex G-100 柱层析法检测, 得到了一个主要的洗脱峰, 根据其对称性特点判断其为均一多糖。紫外分光光度法检测表明大米草多糖无蛋白质存在。

### 2.3 大米草多糖酸降解时间的确定

在运用三氟乙酸对大米草多糖进行降解时, 研究了不同时间梯度下(45, 60, 75, 90 min)所获得的大米草单糖组成差异, 结果其组成和含量无显著差异( $P < 0.05$ ), 本文取含量相对较高的 60 min 作为最佳降解时间。

### 2.4 单糖标准品的 GC-MS 色谱分析

由于酮糖分析中未检测到酮糖, 本文仅列出 10 种醛糖的检测及其定量结果。

图 1 为用 SIM 模式检测得到的 10 种醛糖的 GC-MS 色谱图, 图示了 10 种单糖的出峰时间, 其中 1 为赤藓糖, 2 为鼠李糖, 3 为核糖, 4 为阿拉伯糖, 5 为岩藻糖, 6 为木糖, 7 为甘露糖, 8 为葡萄糖, 9 为半乳糖, 10 为肌醇, 其出峰时间分别是 15.47, 30.77, 30.99, 31.77, 31.88, 32.67, 43.61, 44.96, 46.01, 48.22 min。根据其质谱裂解峰分别对其对应的峰进行了确认。

### 2.5 大米草单糖的 GC-MS 色谱分析

运用同样的方法对大米草多糖进行单糖组成分析(图 2)。结果运用 GC-MS 分析方法, 从大米草单糖中共检测出 7 个明显的波峰, 根据与标准图谱(图 1)的出峰时间对比, 以及对该峰的质谱鉴定, 可判断出大米草单糖组成为鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。根据各峰面积比计算其相对百分含量, 分别为 4.13%, 3.02%, 11.94%,

8.89%, 6.82%, 27.18%, 38.00%。

结果表明大米草多糖的单糖成分中主要是半乳糖(38.00%), 葡萄糖(27.18%)和阿拉伯糖(11.94%),

共占单糖总量的 77.12%。而这 3 种糖都是人类食品中主要的单糖成分, 表明大米草多糖是一种很好的多糖资源, 可用于开发相关的保健食品或药品。

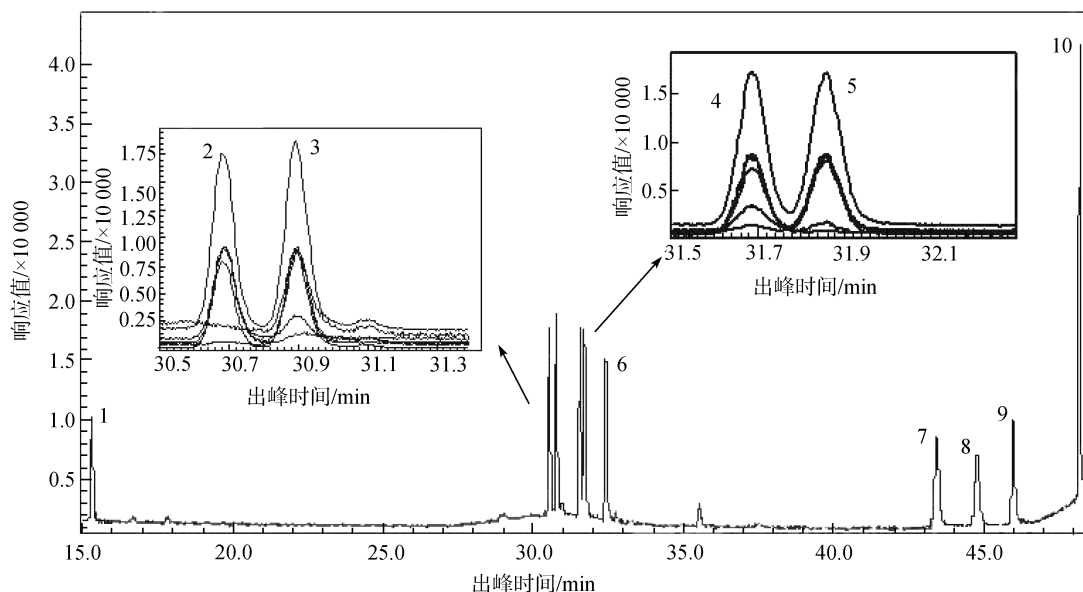


图 1 标准单糖的 GC-MS 色谱图

Fig. 1 GC-MS chromatogram of standard monosaccharides

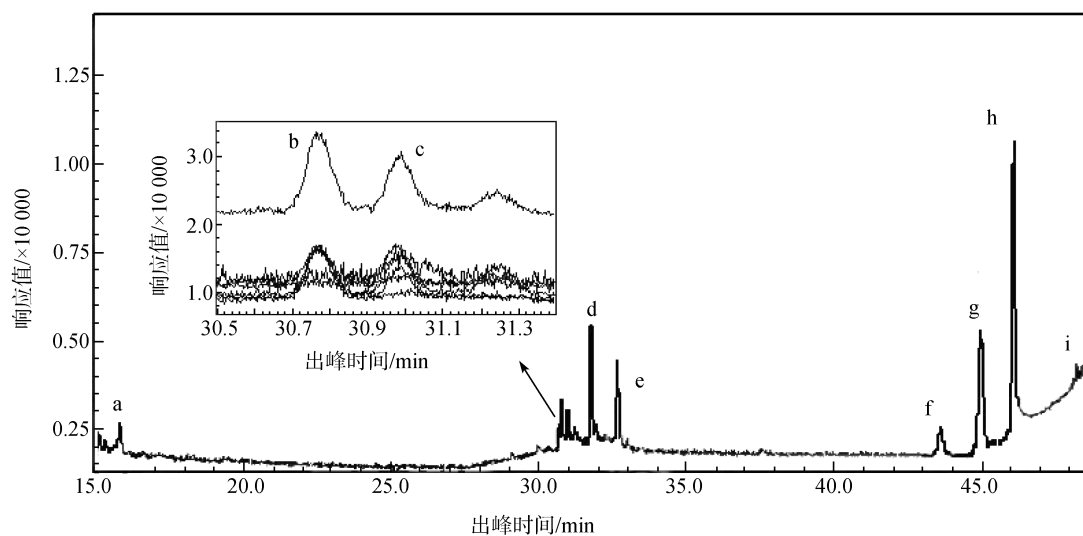


图 2 大米草单糖的 GC-MS 色谱图

Fig. 2 GC-MS chromatogram of the monosaccharides from *Spartina anglica*

a. 赤藓糖, b. 鼠李糖, c. 核糖, d. 阿拉伯糖, e. 木糖, f. 甘露糖, g. 葡萄糖, h. 半乳糖, i. 肌醇

a. Erythrose, b. Rhamnose, c. Ribose, d. Arabinose, e. Xylopyranose, f. Mannose, g. Glucose, h. Lactose, i. inositol

## 2.6 GC-MS 进行单糖分析的优点

目前对多糖的单糖组成分析主要用气相色谱法(GC)<sup>[8]</sup>、高效液相色谱(HPLC)<sup>[9]</sup>或者高效毛细管电泳(HPCE)分析。一般认为, GC、HPLC、HPCE 在定量方面具有一定的优势, 但在定性方面却存在不足:

单纯依靠时间定性不够准确, 特别是有杂质峰干扰的情况下, 无法准确判断色谱图中的峰是属于样品峰, 还是属于杂质峰。相对 GC-MS, 气相色谱所获得的色谱峰缺乏选择性, 杂质峰混在样品峰中势必带来峰面积的增加, 样品处理过程中的杂质也容易

引起积分面积的变化,给样品制备和定量带来了一定的困难。GC-MS 在单糖组成的定性方面具有特效、快速的特点,依靠其 FID 图谱的峰面积定量具有和直接用 GC 的色谱图同样的效果<sup>[10, 11]</sup>。

## 2.7 大米草多糖成分分析的意义

大米草是一种具有负生态效应的海洋滩涂生物,对其开发利用具有很重要的经济和社会生态意义,许多报纸上都介绍了上海寿琪多糖食品有限公司在大米草多糖提取上的成功事例。但到现在为止,该技术还未见有新的进展,主要因为大米草多糖究竟有什么样的生物活性还不是很清楚,相关的应用性基础研究还有很多工作有待完成。本实验室对大米草多糖进行了一年多的研究,发现了大米草多糖降解产物对羟基自由基具有较强的清除活性,对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶也具有一定的抑制活性(数据未发表)。而对大米草多糖的组成分析是深入了解大米草多糖的结构和化学组成的必要步骤。接下来的工作我们准备用不同方法降解大米草多糖,研究其降解产物的化学结构与生物活性之间的关系,为大米草开发利用提供理论基础和技术支持。

### 参考文献:

[1] Hacker S D, Heimer D, Hellquist C E, *et al.* A marine plant *Spartina anglica* invades widely varying habitats: potential mechanisms of invasion and control [J]. *Bio-*

*logical Invasion*, 2001, 3: 211-217.

- [2] Lorne K K, Paul H. Exotic species and estuaries: managing *Spartina anglica* in Tasmania, Australia [J]. *Ocean & Coastal Management*, 2000, 43(7): 573-584.
- [3] Qin P, Xie M, Jiang Y S, *et al.* *Spartina* green food ecological engineering [J]. *Ecological Engineering*, 1998, 11(1-4): 147-156.
- [4] 徐年军, 严小军, 徐继林, 等. 大米草中生物活性物质的筛选[J]. *海洋科学*, 2005, 29(3): 17-19.
- [5] Bimalendu R. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features[J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 66(3): 408-416.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第 2 版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 36-41.
- [7] Ye F T, Yan X J, Xu J L, *et al.* Determination of aldoses and ketoses by GC-MS using differential derivatisations [J]. *Phytochemical Analysis*, 2006, 17(6): 379-383.
- [8] Osborn H M I, Lochev F, Mosley L, *et al.* Analysis of polysaccharides and monosaccharides in the root mucilage of maize (*Zea mays* L.) by gas chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 831(2): 267-276.
- [9] Yang X B, Zhao Y, Wang Q W, *et al.* Analysis of the monosaccharide components in *Angelica* polysaccharides by high performance liquid chromatography [J]. *Analytical Sciences*, 2005, 21(10): 1177-1180.
- [10] 邓永智, 李文权, 袁东星. 海水小球藻中多糖的提取及其单糖组成的气相色谱-质谱分析[J]. *分析化学*, 2006, 34(12): 1697-1701.
- [11] Zhou P, Xie M Y, Nie S P, *et al.* Primary structure and configuration of tea polysaccharide [J]. *Sciences in China Series C (Life Sciences)*, 2004, 47(5): 416-424.

# Extraction of polysaccharides from *Spartina anglica* and analysis of the monosaccharide composition by gas chromatography-mass spectrometry

XU Nian-jun, HE Yan-li, WU Min, YAN Xiao-jun

(Applied Marine Biotechnology Key Laboratory of the Ministry of Education, College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Mar., 9, 2010

**Key words:** *Spartina anglica*; polysaccharides; monosaccharide composition; GC-MS

**Abstract:** To study the polysaccharides and analysis their monosaccharide compositions of the *Spartina anglica*, purified polysaccharides were obtained by hot water extraction, ethanol precipitation, and de-protein by Sevag method. The polysaccharides were hydrolyzed to monosaccharides by 2 mol/mL trifluoroacetic acid in 120°C oil-bath for 1h. The derived monosaccharides were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The *S. anglica* polysaccharides consisted of rhamnose, ribose, arabinose, xylopyranose, mannose, glucose, lactose, with their relative percentages being 4.13%, 3.02%, 11.94%, 8.89%, 6.82%, 27.18%, and 38.00%, respectively. It is predicted that the polysaccharides of the *S. anglica* are a potential food resource, with the main monosaccharides, i.e. lactose and glucose, being of very high nutritional value. Further study for their applications in functional foods is warranted.

(本文编辑: 张培新)