

气相色谱 - 质谱联用法测定大枣低聚糖的单糖组成

林勤保¹, 蒋梅峰¹, 杨 春²

(1.山西大学应用化学研究所, 山西 太原 030006; 2.山西省农业科学院农产品综合利用研究所, 山西 太原 030031)

摘 要: 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, 得到大枣低聚糖, 用气相色谱 - 质谱联用法测定大枣低聚糖的单糖组成为阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖。同时测定了大枣中单糖的组成成分为果糖和葡萄糖。

关键词: 大枣; 低聚糖; 气相色谱 - 质谱联用; 单糖组成

GC-MS Determination of Monosaccharide Composition of Oligosaccharides from Fruits of Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill var. *muzao*)

LIN Qin-bao¹, JIANG Mei-feng¹, YANG Chun²

(1. Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Institute of Farm Products Comprehensive Utilization, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: Oligosaccharides were produced from fruits of Chinese jujube by extraction using water and membrane separation followed by purification by Sephadex-G15 column chromatography and were analyzed for their monosaccharide composition by GC-MS and monosaccharides obtained in the Sephadex-G15 column purification were also analyzed by GC-MS. The oligosaccharides were composed of arabinose, rhamnose, ribose, mannose, galactose and glucose. The monosaccharides from fruits of Chinese jujube were found to be mainly glucose and fructose.

Key words: Chinese jujube; oligosaccharide; GC-MS; monosaccharide composition

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)16-0210-03

大枣是鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物枣树(*Ziziphus jujuba* Mil1)的果实, 有极高的营养价值和很好的医疗保健作用。大枣中的糖分除了有大量的果糖和葡萄糖外, 还含有一定量的低聚糖和多糖。目前, 对于大枣多糖的研究, 已有较多的报道, 林勤保等^[1-2]对大枣多糖进行了分离纯化, 并采用高效液相色谱法对大枣多糖的单糖组成进行了研究; 杨云等^[3-4]采用光谱和色谱分析了大枣多糖的化学结构。

大枣中功能性低聚糖的结构研究, 国内外尚未见有文献报道。本研究采用膜分离技术及葡聚糖凝胶柱层析相结合的方法对大枣低聚糖进行分离纯化, 同时采用气相色谱 - 质谱联用技术对大枣低聚糖的单糖组成进行分析, 初步确定大枣低聚糖的单糖组成。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大枣, 采自山西临县, 品种为山西木枣。

Sephadex-G15(100~200目) 上海蓝季科技发展有限公司; 三氟乙酸、吡啶、六甲基二硅氮烷、三甲基氯硅烷、甲醇、活性炭、D-核糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-木糖均为分析纯。

1.2 仪器与设备

NF-4010实验室用膜分离装置 上海摩速科学器材有限公司; R201D- II 旋转蒸发器 郑州长城科工贸有限公司; 752N 紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; FA1004N 电子天平 上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂; OZKW-S-6 电热鼓风恒温干燥箱 北京医疗器械厂; 101-1ES 电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂; BSZ-160F 电脑自动部分收集器及 HL-2B 数

收稿日期: 2009-05-05

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目(2007)

作者简介: 林勤保(1968—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品化学。E-mail: qblin@sxu.edu.cn

恒流泵 上海精科实业有限公司; 气相色谱(Thermo Trace2000)-质谱(Polaris Q)联用仪及毛细管柱 Rtx-5MS (30m × 0.32mm i.d.) 美国 Thermo Finnigan 公司。

1.3 大枣低聚糖的制备

1.3.1 大枣中水溶性固形物的提取

采用水浸提法, 以料液比 1:8(m/m)、浸提温度为 60℃、浸提时间 12h、浸提次数 3 次为提取工艺参数, 对大枣中水溶性固形物进行提取。

1.3.2 大枣粗低聚糖的分离

将提取液浓缩到原体积的 1/3, 采用膜分离技术进行分离。首先选用截留分子量 50000D 的膜进行实验, 主要目的是除去大枣中的多糖、蛋白质等大分子物质, 收集透过液; 透过液采用截留分子量为 800D 的膜进行实验, 以除去以单糖为主的小分子物质; 收集截留液, 主要为粗低聚糖, 浓缩。浓缩液采用活性炭脱色。

1.3.3 大枣低聚糖的纯化^[5]

选用 1.6cm × 80cm 的 Z 型层析柱, 根据所需填充柱床的体积, 称取适量 Sephadex-G15, 装柱, 用高纯水按恒定流速 60ml/h 平衡。取 4ml 粗低聚糖溶液上清液上柱进行层析分离, 用蒸馏水洗脱, 流速为 1ml/min, 每管收集 4ml。用硫酸-苯酚法检测。按试管顺序比色, 在 490nm 波长处测定吸光度, 以洗脱体积为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制洗脱曲线。收集洗脱峰, 浓缩并干燥。

1.4 低聚糖的水解^[6-8]

称取 20mg 分离纯化得到的低聚糖, 加入 2ml 的浓度为 2mol/ml 三氟乙酸(TFA), 封口后于 105℃ 的烘箱内水解 2h, 冷却至室温, 滤去残渣, 用少量甲醇洗 2 次, 带走多余的 TFA, 最后置于 60℃ 烘箱内烘干。

1.5 衍生物的制备^[9]

取 1.4 节得到的低聚糖水解产物, 并称取 10mg 固体标准单糖样, 分别加入 1ml 吡啶摇动使其溶解后, 再加入 0.4ml 六甲基二硅氮烷和 0.2ml 三甲基氯硅烷, 振荡 10min 后室温下反应 4h, 4000r/min 离心 10min, 取上层清液进行气相色谱-质谱联用分析。

1.6 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析^[10-12]

GC 条件: 色谱柱: Rtx-5MS(30m × 0.25mm i.d.); 载气: 氦气(99.999%), 流量 1.2ml/min, 进样量 1μl; 分流比 50:1, 进样口温度 250℃。程序升温: 初始温度为 100℃, 以 10℃/min 升至 180℃, 再以 3℃/min 升至 240℃, 保持 5min。

MS 条件: EI 离子源; 传输线温度: 270℃, 离子源温度: 250℃, 溶剂延迟时间 6min, 扫描方式: 全扫描; 对采集到的质谱图利用 NIST 谱库进行检索。

2 结果与分析

2.1 大枣粗低聚糖的分离

采用膜分离技术除去大枣多糖、蛋白质及单糖等物质, 收集分子量 800~50000D 之间的截留液, 浓缩, 活性炭脱色。得到粗低聚糖样品。

2.2 大枣低聚糖的 Sephadex-G15 柱层析纯化结果

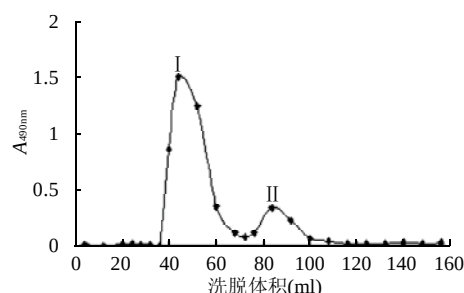


图1 大枣粗低聚糖的 Sephadex-G15 洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of crude extract of oligosaccharides from fruits of Chinese jujube on Sephadex-G15 column

从图 1 的洗脱曲线可知, 采用 Sephadex-G15 柱层析, 对大枣粗低聚糖进行纯化得到两种组分, 这与文献报道是一致的^[5]。但在本研究中, 峰 I (低聚糖) 的含量明显高于峰 II (单糖) 的含量, 这就充分说明了所选择的截留分子量为 50000D 的膜能将大枣多糖完全截留, 而截留分子量为 800D 的膜也能将大部分低聚糖截留, 并且最大程度地使单糖透过, 使截留物(粗低聚糖)中低聚糖的含量得到大幅度的提高。

与文献报道的研究结果^[5]相比, 采用膜分离与 Sephadex-G15 层析法相结合, 对大枣低聚糖的分离纯化具有明显的优点。本方法无需添加任何有机试剂, 并且能得到较大量的低聚糖, 膜分离法明显优于乙醇沉淀法。

2.3 气质联用分析结果

2.3.1 大枣中的单糖成分

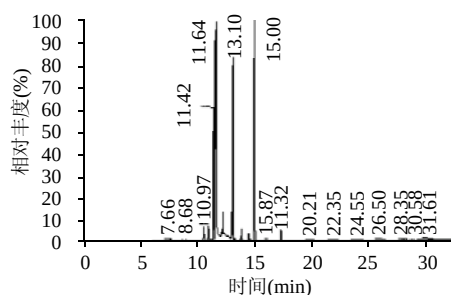


图2 大枣单糖 GC-MS 的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of monosaccharides obtained in the Sephadex-G15 column purification of oligosaccharides

结合图 2 和表 1 可知, 大枣中单糖的组成主要为果糖和葡萄糖, 并且都是 D- 构象型。单糖组分中果糖的相对含量为 50.06%, 葡萄糖的相对含量为 41.05%, 总糖含量为 91.11%。这说明大枣中主要的单糖组分为果糖和葡萄糖。

表1 大枣中单糖的组成分析表

Table 1 GC-MS data for analyzing monosaccharides obtained in the Sephadex-G15 column purification of oligosaccharides

序号	保留时间 (min)	单糖衍生物 Cas #	峰面积(%)	单糖名称
1	11.42	19126-98-8	10.89	D-果糖
2	11.64	19126-98-8	39.17	D-果糖
3	13.11	6736-97-6	18.26	D-葡萄糖
4	15.00	2775-90-8	22.79	D-葡萄糖

2.3.2 大枣低聚糖气质分析图

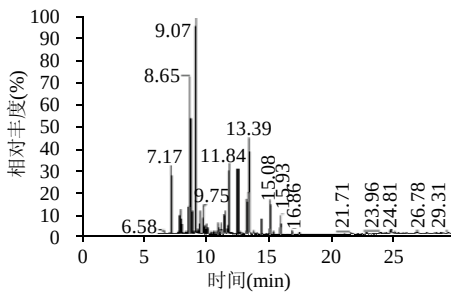


图3 大枣低聚糖 GC-MS 的总离子流图

Fig.3 Total ion current chromatogram of oligosaccharides from fruits of Chinese jujube

表2 大枣低聚糖的单糖组成分析表

Table 2 GC-MS data for analyzing monosaccharide composition of oligosaccharides from fruits of Chinese jujube

序号	保留时间 (min)	单糖衍生物 Cas#	峰面积 (%)	单糖名称
1	7.88	55399-49-0	1.62	阿拉伯糖
2	8.65	1768-95-2	16.9	阿拉伯糖
3	8.79	19127-15-2	1.86	L-鼠李糖
4	9.07	33648-69-0	22.73	D-核糖
5	9.47	56271-69-3	1.87	D-核糖
6	9.75	55057-21-1	2.43	α-L-鼠李糖
7	11.50	—	4.64	D-甘露糖
8	12.48	1769-00-2	7.47	D-半乳糖
9	13.18	56192-86-0	4.7	葡萄糖
10	13.39	19126-99-9	16.17	D-葡萄糖
11	15.09	6736-97-6	4.82	D-葡萄糖

低聚糖经过水解衍生的样品，在 GC-MS 上测定得到结果如图 3，分析结果表 2 所示，大枣低聚糖的单糖组成有阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、半乳糖

和葡萄糖。大枣低聚糖的单糖组成中含量较高的主要是阿拉伯糖、核糖及葡萄糖，而鼠李糖、甘露糖和半乳糖的相对含量较低。这与大枣多糖的组成单糖有明显的不同^[2]。

3 结 论

大枣水溶性固形物经膜分离初步分离，Sephadex-G15 柱层析纯化，得到大枣低聚糖和单糖。GC-MS 分析表明大枣低聚糖中的单糖组分为阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖。本研究的结果为大枣低聚糖的深入研究和大枣的进一步开发利用提供了基础的研究数据。同时实验测定得知大枣中单糖主要为果糖和葡萄糖。

参考文献：

[1] 林勤保, 高大维, 于淑娟, 等. 大枣多糖的分离和纯化[J]. 食品工业科技, 1998(4): 20-21.

[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(3): 57-60.

[3] 杨云, 弓建红, 冯卫生, 等. 大枣中性多糖的化学研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(12): 1215-1216.

[4] 杨云, 孟江, 冯卫生, 等. 大枣酸性多糖 ZJ-6 的化学研究[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 55-58.

[5] 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.

[6] ZHAO Z H, LI J, WU X M, 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.

[7] ZHAO J, MONTEIRO M A. Hydrolysis of bacterial wall carbohydrates in the microwave using trifluoroacetic acid[J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(14): 2498-2503.

[8] LIU C H, LI X D, LI Y H, et al. Structural characterisation and antimutagenic activity of a novel polysaccharide isolated from *Sepiella maindroni* ink[J]. Food Chemistry, 2008, 110(4): 807-813.

[9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.

[10] 顾林, 姜军. 山药多糖的分离纯化及组成研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 158-161.

[11] 郭方遒, 聂娟伟, 黄兰芳. 气质联用法分析枸杞水溶性粗多糖中单糖组成[J]. 光谱实验室, 2007, 24(5): 886-889.

[12] 贺亮, 殷宁. 苦楝果多糖的分离纯化及组成分析[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 35-38.