

杨桃中多糖成分的纯化与鉴定

朱银玲^{1,2}, 谭竹钧²

(1. 广东海洋大学现代生物化学实验中心, 广东 湛江 524088)

(2. 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 本文对采用水煮乙醇沉淀法粗提出的杨桃多糖成分进行纯化与鉴定。首先将粗多糖用复合酶法去蛋白, 然后用凝胶过滤柱进行层析纯化, 最后通过紫外、红外扫描对纯化后的多糖进行纯度和结构鉴定及分子量测定。初步鉴定的结果表明, 杨桃多糖的平均分子量为 4.373×10^4 , 组分中含有乙酰氨基、硫酸基、吡喃环结构、 β -D-甘露吡喃糖环、 α -D-半乳吡喃糖结构和 α -D-甘露吡喃糖结构, 实验结果表明, 杨桃多糖中含有 β -D-甘露吡喃糖、 α -D-半乳吡喃糖、 α -D-甘露吡喃糖 3 种成分。

关键词: 杨桃多糖; 提取; 分离; 纯化; 鉴定

中图分类号: TS255.1; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)02-0161-04

Purification and Identification of Polysaccharides from

Averrhoa carambola L.

ZHU Yin-ling^{1,2}, TAN Zhu-jun²

(1. Experimental Modern Biochemistry Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)(2. College of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006 China)

Abstract: Crude *Averrhoa carambola* L. polysaccharides, obtained by extraction with hot water and precipitation with ethyl alcohol, were purified by gel filtration chromatography after removing the free proteins and then identified by ultraviolet spectrum scanning and IR spectroscopy. The results showed that the average molecular weight of the *Averrhoa carambola* L. polysaccharides was 4.373×10^4 . And the polysaccharides consisted of β -D-mannose pyranose, α -D-Galactopyranose and α -D-mannose pyranose.

Key words: *Averrhoa carambola* L. polysaccharides; extract; separate; purify; identify

杨桃除食用外, 还具有很好的药用价值, 据《本草纲目》上记载: 杨桃具有去风热、生津止渴、解酒毒、止血、拔毒生肌等多种功效^[1]。研究表明杨桃的药用价值主要来自于其所含的多糖, 其具有免疫调节剂、抗肿瘤、降血糖、降血脂等作用^[2,3]。从文献可知, 人们对杨桃的研究主要集中在杨桃多糖的提取上, 目前对杨桃多糖的结构研究相对较少。

本文采用广东湛江南亚热带植物研究所从台湾引种的新加坡红杨桃, 对其多糖进行提取、纯化, 并应用紫外-可见吸收光谱、红外光谱对其多糖成分进行初步分析、鉴定, 为杨桃多糖的应用提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样品

新鲜的新加坡红杨桃 (*Averrhoa carambola* L.),

收稿日期: 2007-10-31

作者简介: 朱银玲(1976-), 女, 实验师, 硕士研究生, 研究方向: 应用化学

由广东湛江南亚热带植物研究所提供。

1.1.2 主要仪器

电子天平(上海天平仪器厂), 电热恒温水浴锅(上海悦丰仪器仪表公司), 55P-72 型日立高速离心机(日立工业株式会社), 80-2 型台式低速离心机(上海医疗器械(集团)有限公司), TU-1901 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), R205B 型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司), 175C-3UMA500 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Bio-rad 公司), BS2100A 型自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂)。

1.1.3 主要试剂

无水乙醇, 95%乙醇, 丙酮, 无水乙醚, 蒽酮, 聚乙二醇, 浓硫酸, 葡萄糖, 三氯甲烷, 异戊醇, Sephadex G-100 凝胶(Pharmacia 公司)。所用实验试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 杨桃多糖的提取^[4-6]

新鲜杨桃, 削去边角, 洗净, 用双蒸馏水冲洗, 置于阴凉通风处风干后晒干, 粉碎。称取杨桃干粉 50 g, 加入 2 倍体积 (100 mL) 的氯仿:甲醇 (2:1), 于 60 °C 下水浴回流脱脂 2 次, 每次 4 h。滤出溶剂, 残渣风干。残渣再以 10 倍体积的 95%乙醇水浴回流 2 次, 每次 3 h, 温度为 90 °C。回收乙醇, 取出残渣于空气中挥发风干溶剂。在残渣中加入 200 mL 蒸馏水, 在 90 °C 水浴中回流提取, 重复 3 次, 各次提取时间分别为 2.5 h、2 h、1.5 h。每次提取后均趁热过滤, 合并三次滤液为粗提液 (约 360 mL)。将粗提液用旋转蒸发仪减压浓缩至原体积的 1/6 (60 mL), 冷却后不断搅拌加入 6 倍体积的 95%乙醇, 调乙醇浓度约为 80%, 即有沉淀产生, 静置过夜充分沉淀。将沉淀溶液在 20 °C 下以 8000 r/min 的转速离心 10 min。沉淀用无水乙醇和丙酮各洗涤 2 次, 以 8000 r/min 离心 5 min, 注意每次在离心前将沉淀打散。离心后取出, 洗涤、冷冻、真空干燥后即得杨桃多糖粗品。

1.2.2 杨桃多糖的纯化

1.2.2.1 去蛋白^[5,6]

将杨桃多糖粗品溶于蒸馏水中, 调整 pH 值为 7, 加入胰蛋白酶 (为溶液体积的 3%) 于 65 °C 水中保温 1.5 h。加入 Sevag 试剂 (氯仿:异戊醇=5:1), 振荡 30 min 后, 使蛋白质与 Sevag 试剂生成絮状凝聚物, 以 4000 r/min 离心 15 min 除去沉淀。重复上述处理, 直至无凝聚物生成。在去蛋白后的溶液中加入无水乙醇 100 mL, 静置过夜, 离心分离出沉淀物。冷冻真空干燥得去蛋白的杨桃多糖。

1.2.2.2 多糖组分的分离纯化^[7-9]

将去蛋白的杨桃粗多糖溶于蒸馏水中, 经 Sephadex G-100 柱层析 (4.5×80 cm), 用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速 0.7 mL/min, 用部分收集器收集, 每管 3.5 mL, 共收集 100 管。用苯酚-硫酸法测定, 绘制流出体积与糖浓度的关系曲线见图 1。于 280 nm 处检测梯度洗脱液的吸光度, 绘制梯度洗脱曲线。收集糖反应阳性高峰部分, 旋转蒸发减压浓缩至原体积的 1/6, 加乙醇沉淀, 4 °C 放置过夜, 离心分离出沉淀物。冷冻真空干燥得纯化后的多糖纯品。

1.2.3 多糖鉴定

1.2.3.1 定性试验^[10]

溶解试验、Molish 反应、苯酚-硫酸法反应、蒽酮-硫酸法反应、茚三酮反应、碘-碘化钾反应。

1.2.3.2 总糖含量测定^[11,12]

还原糖的测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法; 总糖含量的测定采用蒽酮-硫酸比色法, 以葡萄糖为标准

品。

1.2.3.3 多糖分子量测定^[7]

取分子量分别为 1×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 7×10^4 , 2×10^6 (标准蓝色葡聚糖) 标准多糖 3 mg 溶于 3 mL 蒸馏水中, 充分溶解后相继均匀上样, 用 Sephadex G-100 (4.5×80 cm), 流速为 0.3 mL/min, 每 3 mL 收集一管。用硫酸-苯酚法检测各葡聚糖的洗脱体积 V_e , 用蓝色葡聚糖测出柱床的外水体积 V_0 , 将 V_e/V_0 与分子量对数作图得标准曲线。以相同条件将杨桃多糖 0.1 mol/L NaCl 溶液上柱, 测 V_e , 以回归方程求得样品的平均分子量。

1.2.4 光谱分析

1.2.4.1 紫外光谱^[13]

称取冻干杨桃多糖样品 1.2 mg, 加 4 mL 双蒸水溶解配成 0.3 g/L 的多糖溶液, 在 200~400 nm 区间进行扫描。

1.2.4.2 红外光谱^[12]

称取冻干杨桃多糖样品 2 mg, 加入 200 mg 干燥的 KBr 晶体, 在红外灯照射下于研钵中轻轻研磨至极细, 用压片机压片, 经红外分光光度计 400~4000 cm⁻¹ 中红外区扫描, 测定透光率曲线。

2 结果与讨论

2.1 杨桃多糖的提取率

杨桃多糖粗品的提取率为 5.74%, 去蛋白后的提取率为 4.56%。

2.2 杨桃多糖的性质

2.2.1 多糖的物理性质

杨桃多糖呈灰白色粉末状, 溶于水, 不溶于乙醇、甲苯、氯仿、丙酮等有机溶剂。

2.2.2 化学性质

杨桃多糖在 Molish 反应中产生紫色环, 苯酚-硫酸法反应、蒽酮-硫酸法反应、茚三酮反应均呈阳性说明杨桃多糖样品中含糖; 碘-碘化钾反应呈阴性, 说明杨桃多糖样品中不含淀粉。

2.2.3 糖含量测定

杨桃多糖提取率=(杨桃多糖重量/杨桃原料重量)×100%, 多糖百分含量=(总糖%-还原糖%)×0.9 (0.9 是多糖的换算系数), 计算出杨桃多糖的提取率为 3.42%, 总糖含量为 70.5%。

2.2.4 多糖纯度分析

杨桃多糖经 Sephadex G-100 柱层析后的洗脱液用苯酚-硫酸法测定, 见图 1。结果表明, 杨桃多糖多糖纯品的洗脱峰为单一对称峰, 说明该样品纯度较高。

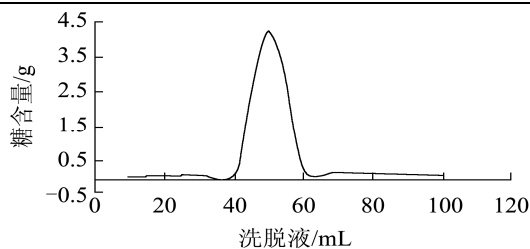


图1 杨桃多糖柱层析洗脱液流出体积与糖浓度的关系曲线

Fig.1 The correlative curve of eluting volume and sugar concentration by column chromatography

2.2.5 杨桃多糖的组分分析

杨桃多糖多糖纯品用 NaCl 溶液梯度洗脱的洗脱曲线见图2。从图2可见,用 0.1 mol/l 的 NaCl 梯度洗脱 100 管杨桃多糖,先后出现 3 个峰值,且峰形对称。分别出现于 1~0 管, 30~50 管, 80~100 管三个区间。且分别于第 7 管, 36 管, 85 管出现最高值。当洗脱完毕到 100 管时,吸光度已经趋于 0.1 左右。此结果初步表明杨桃多糖中含有 3 种组分,这三种组分都为均一组分并且分离完全,则可认为杨桃多糖主要由此 3 种组分组成。多糖溶液趋近无色,由此可见在过柱过程中对多糖也进行了明显的脱色作用。

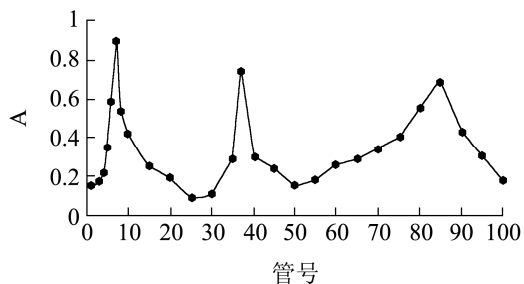


图2 杨桃多糖的洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of *Averrhoa carambola* L. polysaccharides

以标准葡聚糖分子量 (Y) 的对数值为纵坐标,相应的洗脱体积 (X) 为横坐标,得到标准曲线图,相关方程: $\text{LogMw}=5.2639-0.007145X$, $r=0.9992$,分别将第 7 管(洗脱体积为 21 mL),第 36 管(洗脱体积为 108 mL),第 85 管(洗脱体积为 245 mL)代入曲线方程算出杨桃多糖多糖的平均分子量为 4.373×10^4 。

2.3 光谱分析

2.3.1 紫外光谱分析

杨桃多糖的紫外光谱扫描结果见图3。

图 3A 为杨桃多糖未用复合酶法去蛋白之前的紫外光谱扫描结果,显示未去蛋白杨桃多糖水溶液在波长 260 nm 处有明显特征吸收峰,而 280 nm 处吸收峰不是很明显,分析原因可能为:氯仿联合甲醇脱脂中已经去掉了部分蛋白。图 3B 为杨桃多糖用复合酶法

去蛋白之后的紫外光谱扫描结果,显示杨桃多糖水溶液在波长 260 nm 处几乎没有吸收峰,而 280 nm 处无吸收峰,由此可见复合酶法去蛋白的效果明显。

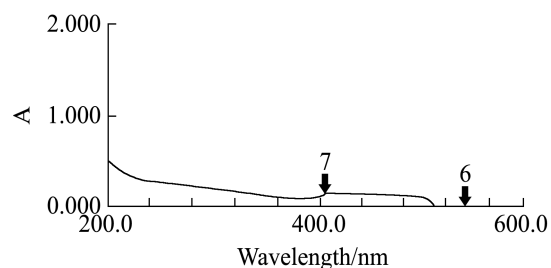
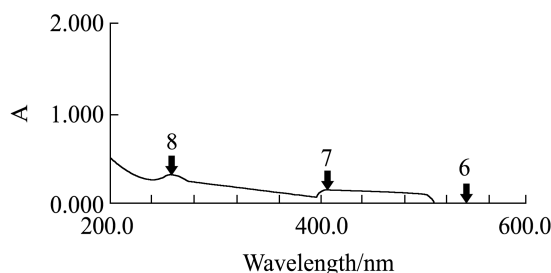


图3 杨桃多糖去蛋白前后的紫外光谱扫描图

Fig.3 Ultraviolet spectrum of *Averrhoa carambola* L. polysaccharides pre- and post-

2.3.2 红外光谱分析

杨桃多糖的红外光谱扫描谱图见图4,结果显示,在 3469.75 cm^{-1} 处出现一宽峰,为 O-H 的伸缩振动;在 $3000\sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ 区域内的吸收峰是糖类的特征峰,杨桃多糖在 2942.19 cm^{-1} 处的吸收峰,是多糖分子 C-H 伸缩振动; 1622.84 cm^{-1} 处的吸收峰为杨桃多糖中乙酰氨基的 C=O 伸缩振动,说明杨桃多糖中含有糖醛酸; 1322.76 和 1259.01 cm^{-1} 处为 C-H 的变角振动吸收峰,其中 1259.01 cm^{-1} 处吸收峰说明杨桃多糖是一种硫酸多糖; 1036.71 cm^{-1} 和 965.491 cm^{-1} 处为吡喃环结构的 C-O 和羟基的吸收峰; 899.183 cm^{-1} 吸收峰是 β -D-甘露吡喃糖环对称伸缩振动造成 C-H 变角振动的特征吸收峰; 821.573 cm^{-1} 是 α -D-半乳吡喃糖和 α -D-甘露吡喃糖的特征吸收峰。

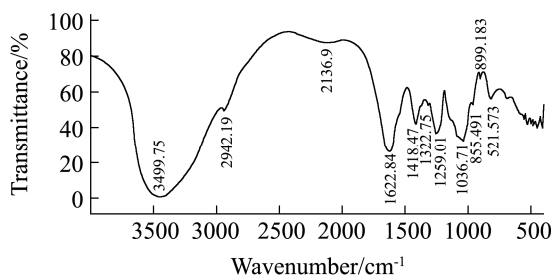


图4 杨桃多糖红外光谱扫描图

Fig.4 Infrared spectrum of *Averrhoa carambola* L. polysaccharides (下转第 172 页)