

用气相色谱和红外光谱对羧甲基化 南瓜多糖结构的研究

柳 红 张 静

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院 西安市长安南路 199 号 710062)

摘 要 采用超声辅助法提取南瓜多糖并对其进行分离和羧甲基化; 邻苯三酚自氧化法测定羧甲基南瓜多糖对超氧阴离子自由基的清除作用; 气相色谱法、红外光谱对南瓜粗多糖及其组分 API 的化学结构进行了分析。结果表明, 羧甲基南瓜多糖能有效清除超氧阴离子自由基, 并随着浓度的增加清除作用增强。该结果提示羧甲基南瓜多糖具有抗氧化性。气相色谱证明南瓜多糖由阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、果糖、半乳糖、葡萄糖组成。南瓜 API 多糖由阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、果糖、半乳糖、葡萄糖组成。红外光谱分析证实南瓜多糖具有糖类物质的特征吸收峰, 同时存在呋喃环和吡喃环。

关键词 南瓜多糖, 气相色谱, 红外光谱, 紫外光谱, 结构分析。

中图分类号: O 657. 7⁺ 2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2008)03-0313-06

1 前言

多糖是由 10 个以上单糖通过糖苷键连接而成的聚糖, 在自然界分布极广, 在高等植物、藻类、菌类及动物体内均有存在, 是自然界含量最丰富的生物聚合物。多糖具有多方面的功能, 如能量储存、结构支持、防御功能等^[1]。多糖的结构是其生物活性的基础, 结构与功能之间密切相关, 因此, 研究多糖的构效关系具有十分重要的意义。

多糖分子中的取代基对多糖的活性影响很大, 因而对多糖进行分子修饰有望得到活性更强、应用范围更广的多糖衍生物。在多糖的结构修饰方法中, 羧甲基化法因具有制备过程简单、试剂成本低及生成物无毒性等优点, 已成为一种较常用的衍生化方法。本文从我国传统的降血糖食物南瓜中提取水溶性南瓜多糖, 对其进行分离和羧甲基化修饰, 用气相色谱和红外光谱对羧甲基化南瓜多糖结构进行了研究, 探讨了羧甲基南瓜多糖对超氧阴离子自由基的清除作用, 以期初步了解其抗氧化性的结构与效应的关系, 期望通过羧甲基化的方式提高南瓜多糖的抗氧化性, 为人工设计和合成多糖类抗氧化药物提供理论基础, 为南瓜多糖的利用开发新途径。红外光谱广泛应用于物质的化学组成分析。气相色谱广泛用于分析单糖的组成。

2 实验部分

2.1 材料与仪器

标准单糖: 鼠李糖、阿拉伯糖、核糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖均购于 Signa 公司, 十六烷基三甲基溴化氨(CTAB), 邻苯三酚, 吡啶, 六甲基二硅胺烷, 三甲基氯硅烷, 甲醇、乙醇均为分析纯。

国家自然科学基金资助项目(20772077); 教育部科学技术研究重点项目(104167)

联系人, 手机: (0) 13572932261; E-mail: zhangjin@snnu.edu.cn

作者简介: 柳红(1980—), 女, 西宁市人, 硕士研究生, 主要从事食品功能成分的研究。

收稿日期: 2007-12-14; 接受日期: 2008-01-03



2.2 仪器

U-3010 Spectrophotometer 紫外分光光度计(日本日立公司制造); E-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); CQ-600 超声波发生器(19.5kHz, 陕西翔达超声技术工程部); A phal-4 真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司); EQU NX55 傅立叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 南瓜多糖的提取

按文献[2]的方法制备。

2.3.2 南瓜多糖的分离

按文献[3]的方法稍加改进, 称取 2g 南瓜粗多糖, 加水 50mL, 加入 3% 的十六烷基三甲基溴化氨(CTAB) 50mL, 静置 12h 生成沉淀, 5000—6000r/min 离心 10min 收集沉淀。沉淀部分用 10% 的氯化钠水溶液溶解, 再加入 3 倍体积乙醇, 产生乳白色沉淀, 收集沉淀, 蒸馏水溶解后, 经透析、冻干得到白色粉末状 AP1。

2.3.3 羧甲基南瓜多糖的制备^[4,5]

称取 4g 南瓜多糖, 加入 100mL 1mol/L 的 NaOH 溶液, 制成溶液甲; 再称取在 4g 氯乙酸加入 40mL 水, 缓缓加入 65mL 1mol/L 的 NaOH 溶液, 反应生成溶液乙。把溶液甲、乙混匀, 于 75℃ 恒温反应 8h, 冷却, 反应液用冰乙酸中和, 过滤, 滤液用流动水透析 3 天, 蒸馏水透析 1 天。浓缩, 用 3 倍体积的 95% 乙醇醇沉, 沉淀冷冻干燥得羧甲基南瓜多糖。

2.3.4 紫外光谱(UV)分析

将样品配成 0.1mg/mL 的水溶液, 在 190—330nm 进行紫外扫描。

2.3.5 羧甲基南瓜多糖体外清除超氧阴离子自由基的作用

采用邻苯三酚自氧化法^[6,7]。

具体步骤是: 自氧化速率的测定按表 1 加入 Tris-HCl 缓冲液 4.5mL, 在 25℃, 恒温水域中保温 20min, 加入邻苯三酚, 快速振荡混匀, 以空白作对照在 325nm 波长下, 每隔 0.5min 记

表 1 325nm 法加样表

| 试剂 | 空白(mL) | 自氧化(mL) | 样品管(mL) |
|----------|--------|---------|---------|
| Tris-HCl | 4.50 | 4.50 | 4.50 |
| 蒸馏水 | 0.50 | 0.40 | - |
| 邻苯三酚 | - | 0.10 | 0.10 |
| 多糖 | - | - | 0.40 |
| 总体积 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |

录一次值, 连续记录 3min。样品在同样条件下测定吸光值。

清除率(E%) = (对照的自氧化速率 - 样品的自氧化速率) × 100 / 对照的自氧化速率。

2.3.6 气相色谱研究

2.3.6.1 色谱条件

色谱柱: 石英毛细管柱; FID 检测器; 柱温, 150—250℃, 150℃ 保持 0.5min, 7℃/min 程序升温到 190℃, 再以 15℃/min 程序升温到 250℃; 检测器温度, 250℃; 进样口温度, 250℃; 载气: N₂, 30mL/min, Air, 350mL/min, H₂, 35mL/min。

2.3.6.2 完全酸水解

分别取南瓜粗多糖和南瓜 AP1 多糖各 20mg 置于具塞试管中, 加入 5mL 2mol/L 的硫酸, 封管于 110℃ 恒温水解 8h, 冷却后用 BaCO₃ 中和, 离心除去沉淀, 上清液经冷冻干燥得水解样品。

2.3.6.3 三甲基硅烷化^[8]

在水解样品中加入 0.6mL 吡啶摇动使其溶解后, 再依次加入 0.4mL 六甲基二硅胺烷和 0.2mL 三甲基氯硅烷, 在 60℃ 恒温反应 10min, 离心 20min, 取上清液进行气相色谱分析。标准单糖

不需水解, 可直接进行硅烷化。

2.3.7 红外光谱分析^[9]

将 1mg 干燥的样品与 100mg 溴化钾混合研磨压片, 在 4000—400cm⁻¹ 区间进行红外光谱扫描, 观察谱峰情况。

3 结果与讨论

3.1 紫外光谱(UV)分析

紫外光谱显示, 南瓜粗多糖和南瓜 AP1 多糖在 260nm, 280nm 处均无明显吸收, 说明该多糖不含核酸及蛋白质。

3.2 羧甲基化南瓜多糖体外清除超氧阴离子自由基的作用

实验结果(图 1)表明, 羧甲基化南瓜粗多糖和羧甲基化南瓜 AP1 多糖对超氧阴离子自由基均有一定的清除作用, 且随着加入量的增加清除率上升。从图 1 可看出, 相同浓度下羧甲基化南瓜 AP1 多糖对超氧阴离子自由基的清除作用高于羧甲基化南瓜粗多糖。

3.3 南瓜多糖的单糖组成分析

实验结果见表 2。9 种混合标准单糖的气相色谱分析见图 2, 南瓜粗多糖和南瓜 AP1 多糖的气相色谱分析见图 3 和图 4, 羧甲基化南瓜粗多糖和羧甲基化南瓜 AP1 多糖的气相色谱分析见图 5、图 6。气相分析表明, 南瓜粗多糖和羧甲基化南瓜粗多糖均由阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、果糖、半乳糖、葡萄糖组成。南瓜 AP1 多糖和羧甲基化南瓜 AP1 多糖均由阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、果糖、半乳糖、葡萄糖组成。

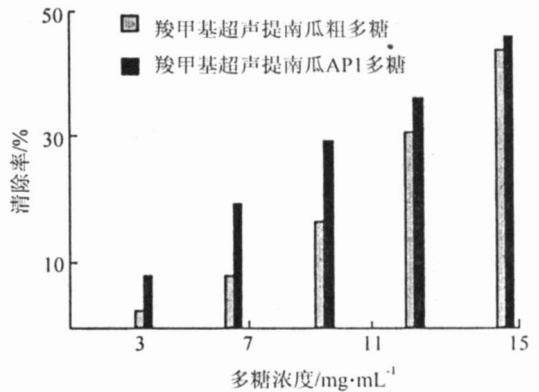


图 1 羧甲基化南瓜多糖对超氧阴离子自由基的清除作用

表 2 南瓜多糖单糖组成气相色谱分析结果

(t/m in)

| 单糖 | 标品保留时间 | 南瓜粗多糖保留时间 | 南瓜 AP1 多糖保留时间 | 羧甲基化南瓜粗多糖保留时间 | 羧甲基化南瓜 AP1 多糖保留时间 |
|------|-------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| 阿拉伯糖 | 4.187 | 4.183 | 4.185 | 4.178 | 4.188 |
| 鼠李糖 | 4.305 | 4.3 | 4.3 | 4.299 | 4.301 |
| 核糖 | 4.55, 4.717 | 4.508, 4.712 | 4.507 | 4.545 | 4.551 |
| 木糖 | 5.182 | — | — | — | — |
| 甘露糖 | 6.282 | 6.283 | — | 6.279 | — |
| 果糖 | 6.403 | 6.407 | 6.402 | 6.398 | 6.410 |
| 半乳糖 | 6.812 | 6.81 | 6.802 | 6.805 | 6.852 |
| 山梨糖 | 6.853 | — | — | — | — |
| 葡萄糖 | 7.115 | 7.117 | 7.108 | 7.112 | 7.109 |

3.4 南瓜多糖的红外光谱分析

南瓜粗多糖、南瓜 AP1 多糖、羧甲基化南瓜粗多糖及羧甲基化南瓜 AP1 多糖的红外光谱图分别如图 7、图 8、图 9、图 10。在红外光谱图 7 和图 8 中, 3413cm⁻¹ 处出现了一宽峰, 是 O—H 的伸缩振动, 表明多糖存在分子间和分子内氢键; 2932cm⁻¹ 和 2923cm⁻¹ 处为多糖分子 C—H 的伸缩振动引起的; 1745cm⁻¹ 处为 C=O 的伸缩振动; 1622cm⁻¹ 和 1618cm⁻¹ 处为多糖中结晶水的吸收峰和酰氨基 C=O 伸缩振动; 1400—1200cm⁻¹ 的吸收峰是 CH 键的变角振动; 1200—1000cm⁻¹ 之间的吸收峰是由多糖分子中两种 C—O 伸缩振动所形成; 922cm⁻¹ 和 915cm⁻¹ 为吡喃环的非对称伸缩振动; 828cm⁻¹ 和 832cm⁻¹ 为 D-型呋喃环的 C—H 键的变角振动; 767cm⁻¹ 和 762cm⁻¹ 为吡喃环的对称

环伸缩振动。因此,南瓜多糖和南瓜 AP1 多糖的单糖残基均以吡喃环和呋喃环的形式存在。

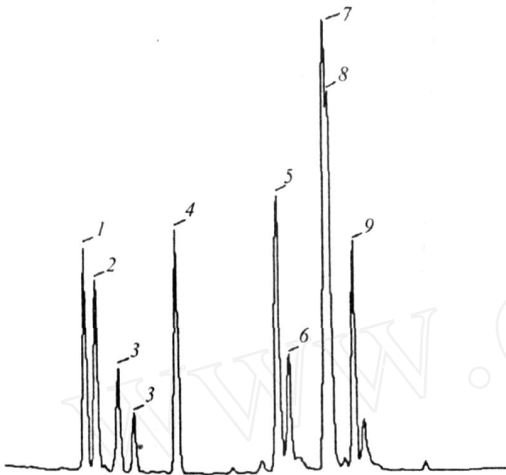


图 2 混合标准单糖气相色谱图

1——阿拉伯糖; 2——鼠李糖; 3——核糖; 4——木糖;
5——甘露糖; 6——果糖; 7——半乳糖; 8——山梨糖;
9——葡萄糖。

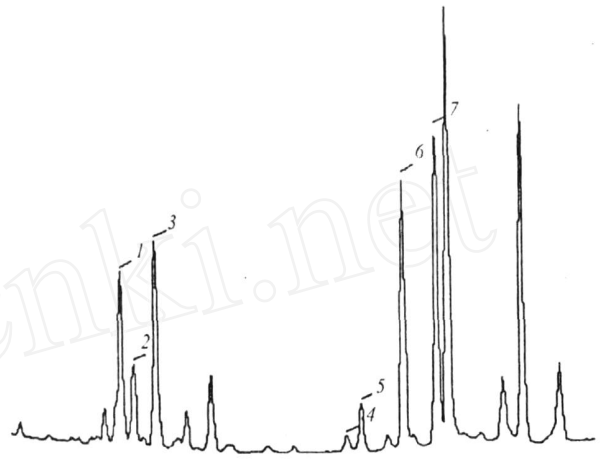


图 3 南瓜粗多糖衍生物的气相色谱图

1——阿拉伯糖; 2——鼠李糖; 3——核糖; 4——甘露糖;
5——果糖; 6——半乳糖; 7——葡萄糖。

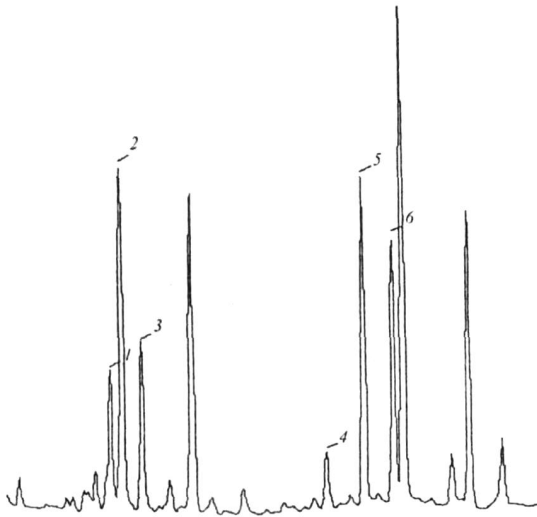


图 4 南瓜 AP1 多糖衍生物的气相色谱图

1——阿拉伯糖; 2——鼠李糖; 3——核糖;
4——果糖; 5——半乳糖; 6——葡萄糖。

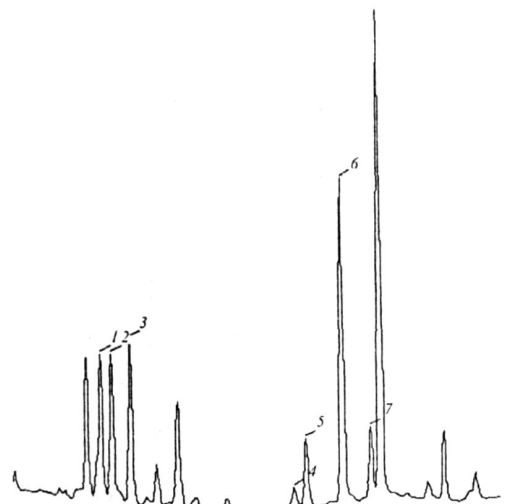


图 5 羧甲基南瓜多糖衍生物的气相色谱图

1——阿拉伯糖; 2——鼠李糖; 3——核糖;
4——甘露糖; 5——果糖; 6——半乳糖; 7——葡萄糖。

由图 9 和图 10 可看出: 在 1611 、 1609 ; 1425 、 1422 ; 1332 、 1333cm^{-1} 处出现了一 COO — 的特征吸收峰, 其中, 1611 、 1609cm^{-1} 处为 C—O 键对称与不对称伸缩振动的吸收峰为强峰, 在 1425 、 1422 ; 1332 、 1333cm^{-1} 处两个峰为中强峰, 证明了多糖确实已羧甲基化, 即为羧甲基化南瓜多糖。

4 结论

多糖的活性与多糖的结构、分子量、溶解性等诸多因素紧密相关, 而多糖结构是其生物活性的基础。多糖的化学修饰为多糖带来了新的结构, 引起了多糖理化性质和立体构象的变化, 导致了活性的变化。多糖经过化学修饰, 能显著提高多糖的活性, 甚至为多糖带来新的活性。

南瓜多糖经过水解、硅烷化后, 进行气相色谱分析, 结果表明南瓜粗多糖和羧甲基南瓜多糖均由阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、果糖、半乳糖、葡萄糖组成。南瓜 AP1 多糖和羧甲基南瓜 AP1

多糖均由阿拉伯糖、鼠李糖、核糖、果糖、半乳糖、葡萄糖组成。红外光谱图证实南瓜多糖具有一般糖类物质的特征吸收峰, 同时存在吡喃环和呋喃环。羧甲基化后的南瓜多糖不但具有多糖的特征吸收峰, 还具有较强的羧基吸收峰, 证明了多糖确实已羧甲基化, 即为羧甲基南瓜多糖。

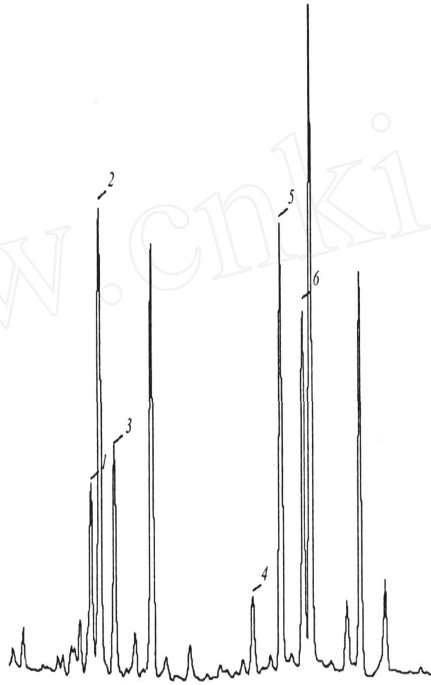


图 6 羧甲基南瓜 API 多糖衍生物的气相色谱图
 1——阿拉伯糖; 2——鼠李糖; 3——核糖;
 4——果糖; 5——半乳糖; 6——葡萄糖。

本文研究结果表明, 对超声提取得南瓜粗多糖和南瓜 API 多糖, 经过羧甲基化修饰后对超氧阴离子自由基均有一定的清除作用, 且呈一定的量效关系。实验发现, 相同浓度下羧甲基化超声提取南瓜 API 多糖对超氧阴离子自由基的清除作用高于超声提取南瓜粗多糖, 提示羧甲基化超声提取南瓜 API 多糖可能是南瓜多糖清除超氧阴离子自由基的最有效成分。

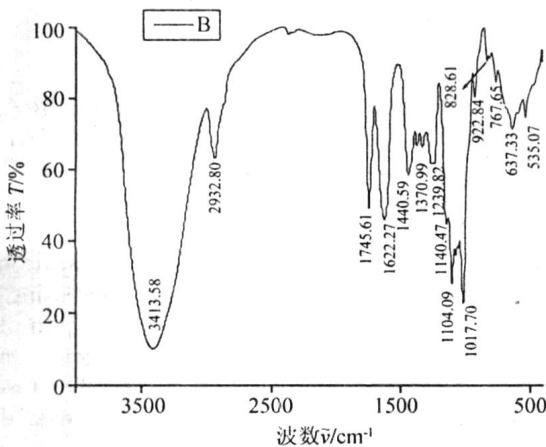


图 7 南瓜多糖的红外光谱图

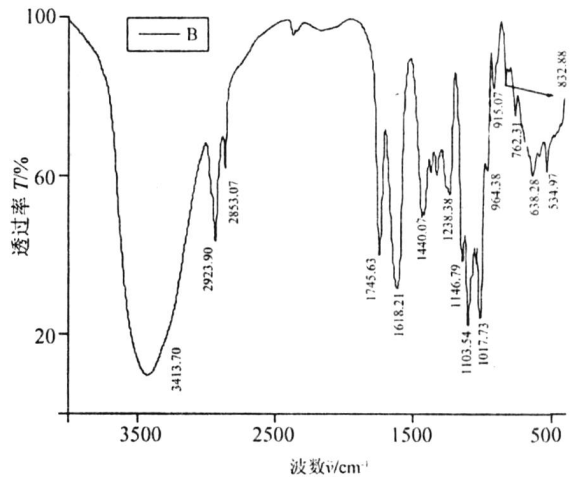


图 8 南瓜 API 多糖的红外光谱图

南瓜多糖经过水解、硅烷化后,进行气相色谱分析的实验方法所需样品量少,多糖硅烷化后衍生物挥发性强,制备快速、简便。为南瓜多糖组成的测定提供了一种灵敏、可靠的分析方法。

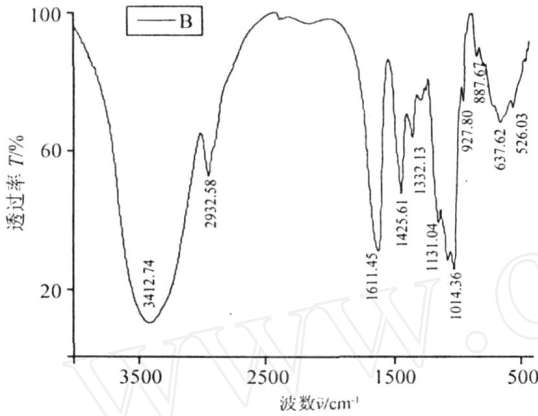


图 9 羧甲基化南瓜多糖的红外光谱图

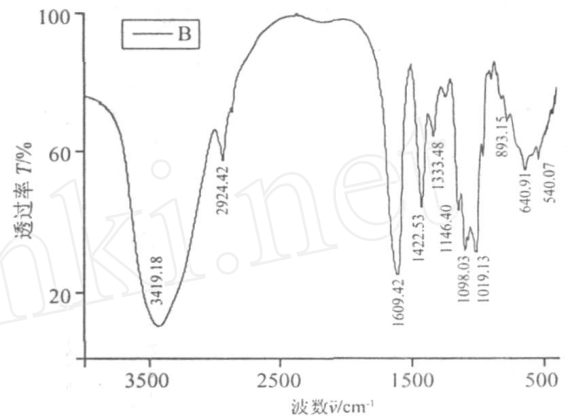


图 10 羧甲基化南瓜 API 多糖的红外光谱图

参考文献

- [1] 高小荣, 刘培勋. 多糖构效关系研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(2): 229—231.
- [2] 柳红, 张静. 紫外分光光度法测定南瓜多糖的含量及抗氧化性[J]. 光子学报, 2005, 34(Z3): 11—13.
- [3] 高澎, 杨铁虹, 贾敏, 梅其炳, 赵文明, 曹之宪, 赵德化. 当归多糖的分离、纯化及分析鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(14): 1311—1314.
- [4] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖(CMP)的制取及鉴定[J]. 食用菌学报, 1996, 3(3): 31—36.
- [5] 王雁, 杨祥良, 邓成华, 顾小曼, 周井炎, 徐辉碧. 羧甲基化虎奶多糖的制备及抗氧化性研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(4): 411—414.
- [6] 陈畅, 罗珊珊, 张长铠等. 3 种虫草抗氧化活性的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 25(4): 212—214.
- [7] 张宏, 谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报, 2002, 33(6): 677—681.
- [8] 李俊卿, 赵宇, 李志萍等. 海蒿子多糖DE I、DE II 组分分离纯化、结构及抗癌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(5): 564—567.
- [9] Park J K, Khan T, Jung J Y. Structural Studies of the Glucuronic Acid Oligomers Produced by Gluconacetobacter Hansenii Strain [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 63(4): 482—486.

Detem nation of Molecular Structure of Carboxymethyl Pumpkin Polysaccharide by Gas Chromatography and IR Spectroscopy

LU Hong ZHANG Jing

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, P. R. China)

Abstract The pumpkin polysaccharide was extracted by ultrasonic method. The pumpkin API polysaccharide was obtained from the precipitate with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The pumpkin polysaccharide was carboxymethylated by ClCH_2COOH in NaOH aqueous solution. The method of antioxidant reaction system of pyrogallol was performed to investigate the scavenging action of pumpkin polysaccharide on superoxide radical. The composition was identified through hydrolyzing with acid and analyzed by GC and IR. The carboxymethyl pumpkin polysaccharide had the ability to scavenge superoxide radical. The scavenging effects increased with the increasing of concentration. The carboxymethyl pumpkin polysaccharide had antioxidative property. The pumpkin polysaccharides was composed of arabinose, rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose and glucose. The pumpkin API polysaccharides was composed of arabinose, rhamnose, ribose, fructose, galactose and glucose. The analysis result of FT-IR spectra of pumpkin polysaccharide showed that there were characteristic absorption bands of polysaccharide. The monosaccharides in the polysaccharide existed as pyranoid and furanoid.

Key words Pumpkin Polysaccharide, GC, IR Spectroscopy, UV Spectroscopy, Structure Analysis