

傅里叶变换红外光谱法测定当归果胶多糖的酯化度

孙元琳^{1,3}, 崔武卫², 顾小红³, 汤 坚³, 申瑞玲⁴

1. 运城学院生命科学系, 山西 运城 044000

2. 加拿大农业部食品研究所, 安大略 湖州 N1G 5C9

3. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

4. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002

摘 要 应用红外光谱技术建立了一种对果胶多糖酯化度(DE)进行快速定量分析的方法。以当归果胶多糖为测试样品,采用傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)建立了DE与 $A_{1730}/(A_{1730} + A_{1630})$ 之间的线性回归方程,相关系数为0.985 2,表明果胶多糖的DE与其在1 730和1 630 cm^{-1} 处的吸收峰面积之间有良好的线性关系。经测定,从当归中提取的果胶多糖粗品和纯品的酯化度介于42.36%~54.06%之间。将FTIR法与传统的化学滴定法进行比较,两种方法间相对误差为7%,并具有良好的重现性,且与传统方法相比具有样品用量少、操作简单、快捷、灵敏度高等特点。FTIR测定果胶多糖酯化度具有可行性,可成为替代化学滴定法的一种的快速易行而准确的方法。

关键词 FTIR; 果胶多糖; 酯化度; 当归

中图分类号: R286 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0682-04

引 言

果胶多糖是存在于植物(水果、蔬菜、中草药)细胞壁中的一种结构复杂的胶状聚合物,主要以 α -D-1,4-GalA为基本组成单元,且GalA的羧基有不同程度的甲酯化($-\text{COOCH}_3$)。酯化度(DE)是分析果胶多糖的一项常规指标,通常以羧基酯化的百分比或甲氧基含量表示。不同的DE影响着果胶产品的溶解性、凝胶性、稳定性以及乳化性,是决定其凝胶机理的一个主要因素^[1]。

测定果胶DE公认的标准方法为化学滴定法,但此法样品用量大、操作过程复杂且费时。近年来,红外光谱作为一种快速光谱分析技术已越来越多地应用于多糖的鉴定与组成分析。其主要优点在于简便、快速、低消耗以及样品需求量少、不破坏样品等。国内外学者已将傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)作为研究多糖化学结构与性质的一种有效工具^[2-6]。目前国内尚无使用红外光谱法测定果胶DE的报道,本实验应用傅里叶变换红外光谱仪对果胶多糖的酯化度(DE)进行快速定量分析,并与传统的化学滴定法进行比较,研究其可行性。

1 试验部分

1.1 实验材料、试剂和仪器

主要试剂: 不同酯化度果胶标准品, Sigma公司; KBr(光谱纯), 上海试剂一厂。**主要仪器**: 傅里叶变换红外光谱仪, Nicolet Nexus型; FTS 7000型, Thermo Electron公司。**实验材料**: 当归, 购自无锡山禾药业有限公司, 经鉴定为二级岷归。

1.2 实验方法

1.2.1 当归多糖的制备

提取^[7]: 当归粉碎后, 经水提、醇沉、透析、冷冻干燥得粗多糖W-ASP。水提剩下的沉淀采用50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaOH、0.5%的EDTA溶液室温提取, 得粗多糖E-ASP。

纯化^[8]: W-ASP经DEAE-Sepharose CL-6B柱层析梯度洗脱, 分别收集单一峰组分, 透析, 冷冻干燥得到3个纯化组分W-ASP1, W-ASP2和W-ASP3。

1.2.2 红外光谱(FTIR)分析

将果胶标样和当归多糖测试样品干燥, 真空条件下研磨成粉状。分别取果胶标样(DE 64%)和测试样品微量, KBr研磨压片, 采用Nicolet Nexus FTIR于4 000~400 cm^{-1} 范

收稿日期: 2007-12-06, 修订日期: 2008-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(20776135)和山西省青年科研基金项目(2007021042)资助

作者简介: 孙元琳, 1971年生, 运城学院生命科学系副教授 e-mail: sylwts@yahoo.com.cn; sylwts@hotmail.com

国内扫描。扫描 32 次,分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.2.3 FTIR 法测定样品酯化度(DE)

标准样品的制备:将三种已知 DE 分别为 2%, 59%, 94% 的果胶标准样按比例配制成 DE 为 42.5% 和 76.5% 的果胶标准样。

标准曲线的制作:分别取 DE 为 26%, 42.5%, 59%, 76.5%, 94% 的果胶标准样采用 FTS 7000 系列 FTIR 在 $4\,000\sim400\text{ cm}^{-1}$ 范围内进行扫描。采用单次衰减全反射分析(ATR),DTGS 检测器(DIGILAB, Randolph, MA)。扫描 128 次,分辨率为 4 cm^{-1} ,每个样品测 3 次,相应数值取平均值。以 DE(%) 为纵坐标, $A_{1\,730}/(A_{1\,730} + A_{1\,630})$ 为横坐标,绘制标准曲线,建立线性回归方程。测试样品 W-ASP, E-ASP, W-ASP2 及 W-ASP3 的操作方法同上。

1.2.4 化学滴定法测定样品酯化度

参照文献[9]。称取 500 mg 多糖样品于锥形瓶,溶于 100 mL 无 CO_2 水中,滴入 5 滴酚酞试剂,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准 NaOH 溶液滴定样品,记录起始滴定值 V_1 ;加入 10 mL $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液,剧烈振荡,放置 15 min,再加入 10 mL $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液,振荡至粉红色消失;加入 3 滴酚酞试剂,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准 NaOH 溶液滴定样品,记录皂化滴定值 V_2 ,按以下公式计算 DE。

$$\text{DE}/\% = \frac{\text{皂化滴定值 } V_2}{\text{起始滴定值 } V_1 + \text{皂化滴定值 } V_2} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

当归多糖经纯化后的 3 个分级组分 W-ASP1, W-ASP2 和 W-ASP3 及果胶标准样品(DE 64%) 的 FTIR 光谱如图 1 所示。

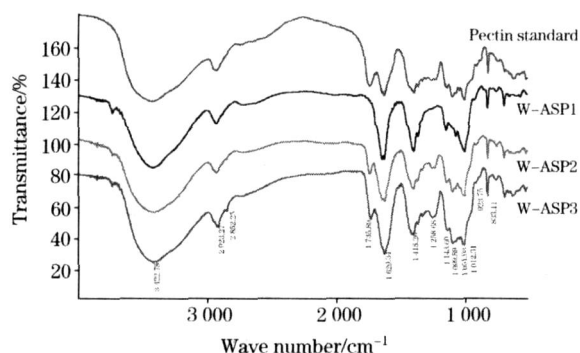


Fig 1 FTIR spectra of fractions from W-ASP purified on DEAE Sepharose CL-6B column

红外光谱显示,三种纯化多糖组分在 $500\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ 范围具有糖类的特征吸收峰。 $3\,600\sim2\,400\text{ cm}^{-1}$ 出现的宽峰是分子内或分子间 O—H 伸缩振动的结果。 $2\,923$ 和 $2\,852\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰由 C—H(CH, CH_2 和 CH_3) 伸缩振动引起,这个吸收峰常常被 O—H 伸缩振动引起的宽峰所掩盖。 $1\,370$ 和 $1\,418\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰属 C—H 的弯曲振动。 $1\,735\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 GalA 羧基形成的酯键($-\text{COOR}$)

C=O 的伸缩振动。 $1\,629\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收峰为羧酸盐($-\text{COO}^-$)的不对称伸缩振动,同时也是糖的水化物样品的吸收峰。 $1\,300\sim1\,000\text{ cm}^{-1}$ 间的吸收峰是由 C—O 伸缩振动所引起的,其中一种归属于糖环上的 C—O—H 和糖苷键 C—O—C,另一种则归属于 GalA 羧基的 C—O—H 以及 C—O—R。由于 833 cm^{-1} 有一强吸收峰, 923 cm^{-1} 附近有微弱吸收峰,说明多糖分子以 α 糖苷键为主,并含有一定量的 β 糖苷键^[10]。

经红外光谱比较可知,组分 W-ASP2 和 W-ASP3 含有糖醛酸,由羧基形成的酯键($-\text{COOR}$) 在 $1\,735$ 和 $1\,259\text{ cm}^{-1}$ 有特异吸收,表明为酸性多糖;同时 W-ASP2 和 W-ASP3 在 $1\,100$ 和 $1\,050\text{ cm}^{-1}$ 附近有强吸收,归属于 GalA 羧基形成的 $-\text{COOR}$ (C—O) 和 $-\text{COO}^-$ 的伸缩振动,这是果胶多糖中的 GalA 在指纹区的特征吸收峰^[11]。经比较,组分 W-ASP2 和 W-ASP3 与果胶标准样品的红外图谱相似,从而进一步证实了 W-ASP2 和 W-ASP3 主要为果胶多糖的推断。而且 W-ASP1 在 $1\,735$ 和 $1\,259\text{ cm}^{-1}$ 处没有吸收,在 $1\,100$ 和 $1\,050\text{ cm}^{-1}$ 只有弱吸收,归属于糖环上的 C—O—H 和糖苷键 C—O—C,因此为中性糖。

2.2 FTIR 法测定样品酯化度(DE)

将不同酯化度的果胶标准样进行扫描分析,每个样品测 3 次,相应数值取平均值。结果表明,对于高 DE 的果胶多糖样品, $3\,000\sim2\,800\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰主要归属于 GalA 的甲氧基($\text{O}-\text{CH}_3$) C—H 的伸缩振动。此峰由于被 O—H($2\,400\sim3\,600\text{ cm}^{-1}$) 的宽峰部分掩盖因此无法用于 DE 的定量分析。 $1\,730$ 和 $1\,630\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰分别归属于羧酸酯($-\text{COOR}$) 的 C=O 和羧酸盐($-\text{COO}^-$) 伸缩振动^[10]。图谱显示,当 DE 为 26% 时, $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 处酯键($-\text{COOR}$) C=O 的吸收峰很小,趋于直线;随着 DE 的升高,吸收峰强度和峰面积随之增加,而 $1\,630\text{ cm}^{-1}$ 处游离羧酸盐($-\text{COO}^-$) 的吸收峰强度和峰面积逐渐降低;当 DE 为 94% 时,吸收峰趋于直线,二者之间此消彼长。由于 DE 表示酯化的羧基占全部羧基的百分数,因此,DE 可通过与 $A_{1\,730}/(A_{1\,730} + A_{1\,630})$ (A: 峰面积) 建立线性回归方程求得。

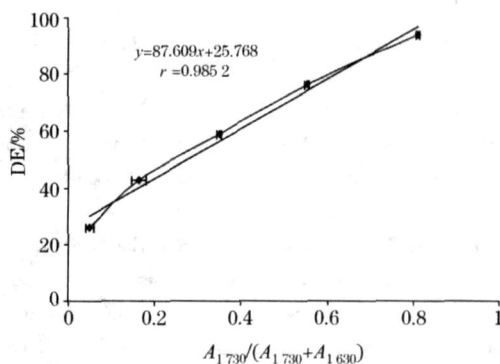


Fig 2 Calibration curve of DE determined by FTIR spectra of pectin standards

图 2 为 FTIR 测定果胶多糖 DE 的标准曲线,图中显示 DE 与 $A_{1\,730}/(A_{1\,730} + A_{1\,630})$ 之间的线性回归方程为 $y =$

87.609 x + 25.768, 相关系数 r 为 0.985 2, 表明果胶多糖的 DE 与其在 1 730 和 1 630 cm^{-1} 处的吸收峰面积之间有良好的线性关系。

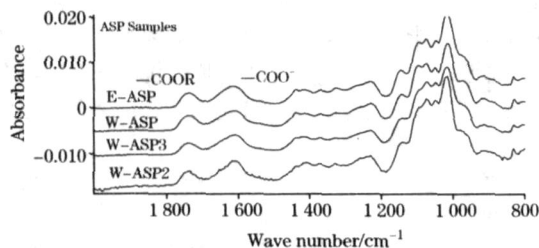


Fig 3 Fourier transform infrared spectra of pectic polysaccharide samples from *Angelica sinensis*

图 3 为当归粗多糖及其纯化分级组分的 FTIR 光谱图。经计算, 当归粗多糖及其分级组分的 DE 值介于 42.36 % ~ 54.06 % 之间(表 1)。尽管粗多糖 E-ASP 采用 50 mmol · L⁻¹ NaOH 的稀碱液提取, 但其 DE 依旧存在(51.06 %), 表明稀碱液提取果胶多糖对 DE 影响并不明显。

2.3 化学滴定法测定样品的酯化度

采用化学滴定法测定了当归多糖样品的 DE, 并将 FTIR 法与化学滴定法进行了比较。由于化学滴定法所需样品量较高, 因此, 选用当归粗多糖 W-ASP 和 E-ASP 为测试样品。表 1 结果表明, 两种方法间相对误差为 7 %, 并具有良好的重现性, 但化学滴定法测 DE 需要的样品量远远高于 FTIR, 且操作步骤繁琐, 对于得率较低的纯化样品会受到一定限

制。而采用 FTIR 测定果胶多糖的 DE 具有样品用量少、操作简单、灵敏度高、重复性好、分析速度快等特点。

Table 1 DE of pectic polysaccharide samples from *angelica sinensis* obtained by different methods

Fragments	DE/ %	
	FTIR methods	Titrimetric analysis
W-ASP	54.06	58.24
E-ASP	51.06	54.91
W-ASP2	42.36	-
W-ASP3	47.14	-

3 结 论^[12-15]

应用红外光谱技术建立了一种对果胶多糖酯化度(DE)进行快速定量分析的方法。DE 与 $A_{1730} / (A_{1730} + A_{1630})$ 之间的线性回归方程($r = 0.985 2$)表明, 果胶多糖的 DE 与其在 1 730 和 1 630 cm^{-1} 处的吸收峰面积之间有良好的线性关系。将 FTIR 法与传统的化学滴定法进行比较, 两种方法间相对误差为 7 %, 具备良好的重现性, 与传统方法相比具有样品用量少、操作简单、灵敏度高、重复性好、分析速度快等特点。

经测定, 从当归中提取的果胶多糖粗品和纯品的酯化度介于 42.36 % ~ 54.06 % 之间。FTIR 测定果胶多糖酯化度具有可行性, 可成为替代化学滴定法的一种的快速易行、准确的方法。

参 考 文 献

- [1] WU Dong-ru (吴东儒). Biochemistry of Carbohydrate (糖类的生物化学). Beijing: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 1988. 96.
- [2] Ploger A. J. of Food Science, 1992, 57: 1185.
- [3] Grasdalen H, Bakoy O E, Larsen B. Carbohydrate Research, 1988, 184: 183.
- [4] Monsoor M A, Kalapathy U, Protor A. Food Chemistry, 2001, 74: 233.
- [5] LIU Yan, LIU Shun-hang, WANG Jun-quan (刘 岩, 刘顺航, 王俊全). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2007, 27(6): 1093.
- [6] LU Yong-jun, QU Yan-ling, CAO Zhi-qiang (芦永军, 曲艳玲, 曹志强). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1457.
- [7] SUN Yuan-lin, GU Xiao-hong, LI De-yuan, et al (孙元琳, 顾小红, 李德远, 等). Food Science (食品科学), 2005, 12: 48.
- [8] Sun Y L, Tang J, Gu X H. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 36: 283.
- [9] NING Zheng-xiang (宁正祥). Handbook of Food Ingredient Analysis (食品成分分析手册). Beijing: Light Industry Press of China (北京: 中国轻工业出版社), 1988.
- [10] Zhabankov R G, Adrianov V M, Marchewka M K. J. of Molecular Structure, 1997, 436: 637.
- [11] Meseguer I, Aguilar V, Gonzalez M J, et al. J. of Food Composition and Analysis, 1998, 11: 285.
- [12] Taylor K A, Buchanan-Smith J G. A. Anal. Biochem., 1992, 201: 190.
- [13] Garleb K A, Bourquin L D, Fahey G G, et al. J. of Food Science, 1991, 56: 423.
- [14] Pappasa C S, Malovikova A, Hromadkova Z, et al. Carbohydrate Polymers, 2004, 56: 465.
- [15] LU Hui-shan, YING Yi-bin, FU Xia-ping, et al (陆辉山, 应义斌, 傅霞萍, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2007, 27(3): 494.

Determination of Degree of Esterification in Pectic Polysaccharides from *Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

SUN Yuan-lin^{1,3}, CUI Wu-wei², GU Xiao-hong³, TANG Jian³, SHEN Rui-ling⁴

1. Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China

2. Food Research Program, Agriculture and Agri-Food Canada, Ontario, Canada N1G 5C9

3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

4. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

Abstract An infrared spectroscopy method for rapid quantitative determination of the degree of esterification (DE) of pectic polysaccharides was developed. Taking pectic polysaccharides from *angelica sinensis* as samples, the calibration curve was established between DE and the ratio of $A_{1730} / (A_{1730} + A_{1630})$. The square of the linear correlation coefficient was 0.822, indicating a good linear relationship between the DE and the absorbent area at 1730 and 1630 cm^{-1} . Using this method, the DE of pectic polysaccharides from *angelica sinensis* was determined to be between 42.36% and 54.06% for crude and purified samples respectively. The relationship between infrared spectroscopy data and titrimetrically determined DE values was investigated, indicating an excellent reproducibility. This method is characterized by less sample, simple manipulation, higher sensibility, and speedy analysis compared to chemical method and other instrumentations. FTIR shows a good feasibility and can be a rapid, alternative method to titrimetric analysis for DE determination.

Keywords FTIR; Pectic polysaccharides; Degree of esterification; *Angelica sinensis*

(Received Dec. 6, 2007; accepted Mar. 12, 2008)