

山药多糖 RDPS-I 组分的纯化及理化性质的研究^{*}

赵国华¹ 李志孝² 陈宗道¹

1(西南农业大学食品科学学院, 重庆, 400716)

2(兰州大学应用有机化学国家重点实验室, 兰州, 730070)

摘要 山药经水浸提分离, 浸提液脱蛋白, 透析, 乙醇沉淀物经 DEAE-52 纤维素及 Sephadex G-100 色谱纯化得白色粉末状多糖 RDPS-I。Sephacose CL-6B 凝胶色谱分析表明 RDPS-I 为多糖纯品。定性化学反应表明 RDPS-I 不含核酸、蛋白质、酚类物质和糖醛酸, 是一种非淀粉类中性纯粹多糖, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25}(\text{H}_2\text{O})$ 为 +188.4 (c=0.8), 特性粘度 $[\eta]$ 为 16.48 $\times 10^{-3}(\text{mL/g})$, 相对分子质量为 42 200。完全酸水解后纸层析及气相色谱分析确定 RDPS-I 的糖基组成为葡萄糖、甘露糖和半乳糖, 摩尔比为 1:0.37:0.11。

关键词 山药, 多糖, 理化性质

山药, 拉丁名为 *Dioscorea opposita* Thunb., 薯蓣科薯蓣属植物, 《本草纲目》对其的记载是“益肾气, 健脾胃, 止泻痢, 化痰涎, 润皮毛”, 现代医学研究表明, 山药具有多种生物活性, 如延缓衰老^[1], 防治糖尿病, 抗氧化, 促进免疫功能^[2], 抗突变^[3], 降血糖^[4] 等功能。并认为山药中的主要功效成分是山药多糖。但有关山药多糖的分离纯化和理化性质只有一些较为粗略的研究报道, 缺乏系统而深入的研究。本文详细研究了山药水溶性多糖组分 RDPS-I 的分离纯化方法和它的理化性质, 为山药多糖的进一步研究和利用奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

山药, 由西南农业大学实验农场提供。

1.2 主要试剂

DEAE-纤维素 (DE-52) 为 Whatman 公司产品, Sephadex G-100, Sepharose 和已知分子质量的 Dextran 为 Pharmacia 公司产品, 标准单糖为 E. Merck 公司产品。

1.3 主要仪器

自动部分收集器 (BSZ-100, 上海沪西分析仪器厂), 分光光度计 (751G, 上海分析仪器厂), 离心机 (LXJ-64-01, 北京医疗仪器修理厂), 旋片式真空泵 (ZX250, 上海真空泵厂), 微量分析天平 (Sartorius, 西德), 旋光仪 (341, 美国 Perkin 仪器公司), 粘度计 (NDJ-97, 同济大学实验仪器厂), 元素分析仪 (Vario EL, Gerömen Elementar)。

1.4 多糖分离纯化的路线

多糖分离纯化的路线为:

材料准备→前处理→破碎→浸提→离心分离→减压浓缩→乙醇沉淀→离心分离→脱蛋白→透析→离心分离→减压浓缩→乙醇沉淀→离心分离→溶剂抽干→乙醚回流→DEAE-52 纤维素柱色谱→Sephadex G-100 柱层色谱→纯度鉴定

1.5 多糖含量的测定

硫酸-蒽酮法^[5]。

1.6 多糖纯度鉴定和分子质量测定^[6]

纯度鉴定: 凝胶色谱法。分别取上述分离纯化所得的多糖样品各 10 mg, 溶于最小体积的 0.1 mol/L NaCl 溶液中, 小心将其完全加到 Sepharose CL-6B 柱 (15 mm \times 900 mm) 顶,

第一作者: 博士, 讲师。

*国家自然科学基金重点资助项目 (No. 39730480)

收稿时间: 2002-01-11, 改回时间: 2002-09-08

用 0.1 mol/L NaCl 洗脱, 流速为 8 mL/h, 每管收集 1 mL, 用硫酸-蒽酮法检测多糖。

分子质量测定: 凝胶色谱法。取用 0.1 mol/L NaCl 溶液充分溶胀 (48 h) 的 Sephadex G-100 装柱 (15 mm × 900 mm), 用 0.1 mol/L NaCl 溶液平衡 3 d, 先后将 5 种已知分子质量的葡聚糖标准品 (Dextran 系列, 相对分子质量分别为 10 000、40 000、70 000、110 000 和 500 000) 进行凝胶层析, 上样量各 5 mg, 用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速为 6 mL/h, 按 1 mL/管分部收集, 用硫酸蒽酮法检测多糖, 分别求得相对应的洗脱体积 V_e 。再用蓝色葡聚糖 (相对分子质量为 2 000 000) 上柱求得柱的外水体积 V_0 , 以 V_e/V_0 为纵坐标, $\lg M_r$ 为横坐标, 得到分子量测定标准曲线。取待测分子量的多糖样品 5 mg 上样, 按与 Dextran 标准品层析相同的条件操作, 求得相应的洗脱体积, 求得 V_e/V_0 值, 查标准曲线可求得多糖的分子质量。

1.7 多糖理化性质的测定^[7]

其理化性质测定包括溶解性测定, 硫酸吡啶反应, 斐林试剂反应, 三氯化铁反应, 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 络合反应, 双缩脲反应, 碘反应, 比旋光度测定, 特性粘度测定, 280 nm 吸收测定。

1.8 元素分析^[8]

按 Vario E L 元素分析仪的操作规程进行。

1.9 纸层析^[9]

分别取多糖 10 mg 置于安培管中, 加入 2 mL 2 mol/L 三氟醋酸 (CF_3COOH), 封管, 置于烘箱 120 °C 水解 2 h, 冷至室温, 用玻璃棉滤去残渣, 用少量水洗残渣 2 次, 合并滤液, 减压蒸干, 再加少量水 3 次, 减压蒸干以除去残存的 CF_3COOH 。取水解物少许, 加适量水温热溶解, 同时取各种标准单糖及糖醛酸配成水溶液, 点样于新华中速层析滤纸, 在 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{吡啶}) : V(\text{醋酸}) : V(\text{水}) = 5 : 5 : 1 : 3$ 系统中上行展开 (24 h), 吹干后喷苯胺-邻苯二甲酸显色液 (1 mL 苯胺和 1.66 g 邻苯二甲

酸溶于 100 mL 水饱和的正丁醇中), 置于烘箱 120 °C 加热 10 min 显色。

1.10 气相色谱^[10]

上述多糖水解物在真空干燥箱中 70 °C 减压干燥过夜。分别加入约 10 mg 盐酸羟胺及 1 mL 无水吡啶, 温热溶解后在 90 °C 反应 30 min, 冷至室温, 加入 1 mL 无水醋酸酐, 在 90 °C 下继续反应 30 min, 冷至室温, 加入 1 mL H_2O 搅拌, 再用 CCl_4 萃取 3 次, 每次 1 mL, 合并 CCl_4 层, 减压抽干。置真空干燥箱减压干燥 24 h。同法制备各种标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物, 分别进行气相色谱分析。色谱条件: OV-225 玻璃毛细管柱 (0.29 mm × 25 m); 柱温 235 °C; N_2 为载气, 流速 46 mL/min。

1.11 组成单糖摩尔比测定^[9]

以核糖为内标测定组成多糖的单糖的定量校正因子。精确称取组成多糖的单糖的标准物, 使标准物与内标的质量之比在 0.3 ~ 2.5 之间的 5 个不同浓度, 按 1.10 的方法进行气相色谱分析。以标准糖和内标的峰面积之比作为横坐标, 标准糖和内标的质量之比作为纵坐标求得它们的斜率即为该种标准糖的定量校正因子。

多糖单糖残基的摩尔比测定条件与测定定量校正因子的条件相同。以 L-阿拉伯糖为内标, 测定各糖残基的峰面积, 乘以 f/M (f : 该单糖的定量校正因子, M : 该单糖的分子质量) 所得的值即为该种单糖的摩尔比值。

2 结果与讨论

2.1 RDPS-I 的分离纯化

1 kg 山药 (干重) 粉碎后经乙醚脱脂后用水浸提, 离心分离除去淀粉, 上清液真空浓缩后, 用 Sevag 法脱蛋白 8 次, 置于透析袋中对自来水透析 3 d, 透析内液真空浓缩至一定体积, 加乙醇沉淀, 离心收集白色沉淀, 溶剂干燥得山药粗多糖 (27 g)。取山药粗多糖 1 g 溶于最小体积水中, 定量加到 DEAE-纤维素 (DE-52, Cl^- 型), 用水洗脱, 硫酸-蒽酮法检测多糖峰位, 分部收集, 乙醇沉淀, 溶剂干燥得

RDPS。取 0.2g RDPS 溶于 2mL 0.1mol/L NaCl 中,使其通过用 0.1mol/L NaCl 平衡过的 Sephadex G-100 柱,硫酸-蒽酮法检测多糖峰位,蒸馏水洗脱,分步收集,乙醇沉淀,冷冻干燥后得山药多糖 RDPS-I 组分(0.13g)。

2.2 纯度鉴定及分子质量测定

取 10mg RDPS-I 溶解后经 Sepharose CL-6B 柱色谱得到其洗脱曲线是一对称的单一峰,证明 RDPS-I 已是均一多糖。按 $V_e/V_o - \lg M_r$ 关系得分子质量测定标准工作曲线。其回归方程为: $y = -0.7713x + 5.4381$ ($r = -0.9934$),根据 RDPS-I 的洗脱体积求得其相对分子质量为 42 200。

2.3 RDPS-I 的理化性质

RDPS-I 是白色粉末状固体,易溶于水,其碘-碘化钾反应、斐林试剂反应、CTAB 络合反应、三氯化铁反应、硫酸-吡啶反应、双缩脲反应、280 nm 吸收均为阴性,可见 RDPS-I 是一种不含多酚、无白质和糖醛酸非淀粉中性不含蛋白质和核酸的多糖。对 RDPS-I 的元素分析发现该多糖仅有 3 种元素组成,质量百分比为碳 43.02%,氢 6.10%,氧 50.88%,不含氮,比旋光度 $[\alpha]_D^{22}(\text{H}_2\text{O})$ 为 $+188.4$ ($c = 0.8$),特性粘度 $[\eta]$ 为 $16.48 \times 10^{-3}(\text{mL/g})$ 。

2.4 RDPS-I 的组成单糖分析

图 1a 是标准单糖的糖脲乙酸酯衍生物的气相色谱图,按出峰的先后依次为鼠李糖(3.952 min)、岩藻糖(4.698 min)、阿拉伯糖(5.175 min)、木糖(5.885 min)、甘露糖(9.832 min)、葡萄糖(11.587 min)、半乳糖(12.467 min)和内标肌醇(14.17 min)。图 1b 是 RDPS-I 完全水解物的糖脲乙酸酯衍生物的气相色谱图,图中有 3 个峰(9.782 min、11.517 min、12.372 min)。对比图 1a 和图 1b 可以肯定得出 RDPS-I 是一种由葡萄糖、甘露糖和半乳糖构成的一种杂多糖, RDPS-I 组成单糖的纸层析结构与此基本相同。

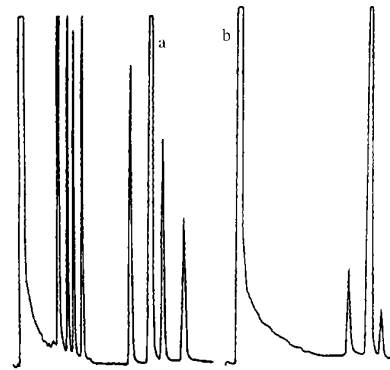


图 1 RDPS-I 组成单糖色谱图

2.5 RDPS-I 的摩尔比测定

表 1 是各种单糖的校正因子。在糖组成的气相色谱分析中葡萄糖、甘露糖和半乳糖的峰面积乘以相应的定量校正因子,测得 RDPS-I 组成单糖的摩尔比为 D-葡萄糖 : D-甘露糖 : D-半乳糖 = 1 : 0.37 : 0.11。

表 1 各种单糖的校正因子

葡萄糖		甘露糖		半乳糖	
W/W	A _i /A _s	W/W	A _i /A _s	W/W	A _i /A _s
0.513	0.455	0.485	0.500	0.682	0.610
0.857	0.970	0.914	0.967	0.938	0.855
1.487	1.345	1.628	1.770	1.537	1.428
2.249	1.789	1.852	1.801	2.188	1.815
3.017	2.600	3.649	3.753	3.179	2.809
0.9894 *		0.9983 *		0.9971 *	

注: 表示该种单糖的校正因子。

3 结 论

经水浸提、脱蛋白、透析、乙醇沉淀、离子交换色谱和凝胶色谱分离纯化可从山药根茎中获得不含蛋白质、核酸、酚类物质和糖醛酸的为非淀粉类中性纯粹多糖 RDPS-I。该多糖有葡萄糖、甘露糖和半乳糖(1 : 0.37 : 0.11)组成,比旋光度 $[\alpha]_D^{22}(\text{H}_2\text{O})$ 为 $+188.4$ ($c = 0.8$),特性粘度 $[\eta]$ 为 $16.48 \times 10^{-3}(\text{mL/g})$,相对分子质量为 42 200。

参 考 文 献

- 1 朱红艳, 许金俊. 时珍国医国药, 1999, 10(6): 468
- 2 赵国华, 李志孝, 陈宗道. 营养学报, 2002, 待发表

- 表
- | | | | |
|---|---|----|---|
| 3 | 阚建全, 王雅茜, 陈宗道等. 营养学报, 2001, 23 (1): 76~78 | 7 | Kiho T, Sakushima M, Wang S et al. Chem. Pharm. Bull., 1991, 39(3): 798~800 |
| 4 | 郝志奇, 杭秉茜. 中国药科大学学报, 1991, 22 (3): 158~160 | 8 | Bao X F, Dong Q, Fang J N. Acta Biochem. et Biophysic. Sinica, 2000, 32(6): 557~561 |
| 5 | 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 14 | 9 | 叶淳渠, 方积年. 药理学报, 1981, 16(7): 524~528 |
| 6 | 吴梧桐, 余品华, 夏尔宁等. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(4): 393~398 | 10 | 李志孝, 黄成钢, 陈谦等. 兰州大学学报(自然科学版), 2000(35): 78~80 |

Purification and Physico-chemical Properties Analysis of Chinese Yam Polysaccharides Friction RDPS-I

Zhao Guohua¹ Li Zhixiao² Chen Zongdao¹

1(College of Food, Southwest Agricultural University, Chongqing, 400716)

2(National Key Laboratory of Applied and Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, 730000)

ABSTRACT A polysaccharide named RDPS-I was isolated from Chinese yam with water extraction, alcohol sedimentation, Sevag deprotein, DEAE-52 column and Sephadex G-100 column, its purity was identified by Sepharose CL-6B. RDPS-I was a non-starch polysaccharide, did not contain any protein, nuclear acid, polyphenol and uronic acid, its specific rotary was $+188.4(\text{H}_2\text{O}, c=0.8)$, specific viscosity was $16.48 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$, average molecular weight was 42 200u. The composed monosaccharide were identified by GC and paper chromatography as glucose, mannose and galactose with a molar ratio of 1:0.37:0.11.

Key words Chinese yam, polysaccharide, physico-chemical properties

行业动态

我国奶业发展存在 5 大问题

我国奶业发展存在着奶牛价格偏高、奶源紧张、对奶类消费缺乏客观分析、奶业重数量轻质量和个别地区牛奶相对过剩 5 大问题。

牛源紧张, 牛价增长速度远远超过奶畜增长的承受能力。按目前的奶牛价格, 青年育成牛每头价格 8000~9000 元为合理价格, 但现在每头牛价格高达 1.2~1.5 万元。

奶源紧张。从总体看, 乳品加工能力增长大于奶源的增长, 不少地方出现奶源紧张。奶源激烈竞争造成部分地区市场秩序混乱。

对消费增长的速度缺乏客观分析, 将最近 2 年由于宣传力度加大造成的突然性增长视为正常增长, 将由于我国消费水平低, 具有很大消费增长空间视为实际增长能力。

奶业生产重数量轻质量, 片面理解高新技术的应用, 轻视现有成熟技术的推广应用。奶牛繁育体系建设中一些基础性工作没有受到足够重视, 总体生产水平提高不大。

个别地区出现了奶牛相对过剩, 农民卖奶难, 乳品加工企业趁机压价收购, 奶农利益受到损害。

2 个客观因素制约着我国奶产业发展: 一是良种奶牛数量少, 仅有 500 万头; 奶畜产奶水平低, 成年母牛年均产奶量仅为 3000 kg; 机械化挤奶率低, 比例只有 5%~10%。二是乳制品加工生产规模小, 劳动生产率, 生产成本低, 奶类消费水平低, 农村人均年消费量不到 1L。