

藤茶水溶性多糖的分离纯化及性质的研究

罗祖友¹, 程超¹, 李伟¹, 吴谋成²

(1. 湖北民族学院生物科学与技术学院 湖北 恩施 445000; 2. 华中农业大学食品科技学院 湖北 武汉 430070)

摘要:经水提、醇沉、Sevag法脱蛋白的藤茶多糖(AGP), 通过DEAE-Sephadex A-25和Sephadex G-200柱层析, 得到多糖AGP-3和AGP-4。HPLC和Sephadex G-200柱层析鉴定AGP-3和AGP-4为分子量相对均一的蛋白多糖, 硫酸-咔唑反应、考马斯亮蓝G-250反应均呈阳性。

关键词:藤茶; 多糖; 分离; 纯化; 性质

Isolation, Purification and Characterization of Water-soluble Polysaccharides from *Ampelopsis grossedentata*

LUO Zu-you¹, CHENG Chao¹, LI Wei¹, WU Mou-cheng²

(1. School of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Polysaccharide from *Ampelopsis grossedentata* (AGP) was obtained after being extracted with hot water, precipitated with alcohol and removed free protein with Sevag method. AGP was isolated and purified by DEAE-Sephadex A-25 and Sephadex G-200 column chromatography, two pure polysaccharides (AGP-3 and AGP-4) were gained. The results of HPLC and Sephadex G-200 column chromatography illustrated that both AGP-3 and AGP-4 were protein-bound polysaccharides with comparatively homogenous molecular weights. Also, the two polysaccharides were colored by coomassie brilliant blue G-250 and carbazole reaction.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; polysaccharide; isolation; purification; characterization

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0151-04

藤茶, 也称显齿蛇葡萄 [*Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang], 是我国特有的药食两用植物^[1]。藤茶不仅含有丰富的生物活性成分—藤茶黄酮^[2-3], 也有较高含量的多糖^[4]。关于藤茶多糖的提取, 国内外报道不多。本研究在已确定的藤茶水溶性多糖提取工艺的基础上, 对藤茶多糖作进一步的分离纯化与性质研究, 以期更为有效地利用藤茶资源和研究藤茶多糖生物活性提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藤茶原料: 由鄂西藤茶公司提供, 经粉碎过筛后得藤茶粗粉, 封装、备用。

1.1.2 主要试剂

DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-200均为Pharmacia(USA)产品; 多糖标准品Pullulan系列, 日本东京化成公司产品; 牛血清白蛋白(电泳纯), 中科

院新疆化学所生化试剂厂; 考马斯亮蓝G-250、三氯甲烷等均为国产分析纯产品; 透析袋(D32)为Bromma公司产品。

1.1.3 主要仪器与设备

紫外可见分光光度计, UV-265 FW, Shimadzu, Japan; 真空冷冻干燥机, 扬子江蜂业公司冷冻干燥生产线; 旋转蒸发器, Buchi RE111, Switzerland; 高压液相色谱仪, Agilent 1100, USA。

1.2 方法

1.2.1 藤茶多糖粗品的提取制备

按前期研究优化的多糖提取工艺^[4], 称取藤茶粗粉, 经石油醚浸泡、回流除去色素、小分子糖等物质, 残渣晾干。以1:25料水比于95℃水浴浸提2次, 每次4h, 得到多糖的浸提液, 真空浓缩后, 加入浓缩液3倍体积的95% EtOH, 静置2h, 收集沉淀, 再复溶-醇沉一次, 冷冻干燥, 得到灰褐色的藤茶水溶性多糖粗品, 以粗品重量相对原料计算多糖得率, 约为7.0%~

收稿日期: 2006-09-11

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2006); 湖北省“十五”重点科技攻关项目(2001AA204A03)

作者简介: 罗祖友(1963-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物与功能食品化学。

7.5%。

1.2.2 藤茶多糖粗品的初步纯化

采用 Sevag 法^[5], 对多糖粗品进行脱蛋白、脱色处理, 得到初步纯化的藤茶多糖(polysaccharides from *Ampelopsis grossedentata*, AGP)。

1.2.3 AGP 的分级纯化

采用 DEAE-Sephadex A-25 柱层析对 AGP 进行初次分级。分级条件: 19mm × 55cm 色谱柱, DEAE-Sephadex A-25 湿法装柱, 床高约 45cm, 0~0.5mol/L NaCl 溶液阶段洗脱, 流速 0.5ml/min, 分部收集洗脱液, 10min/管。硫酸苯酚法^[6]跟踪检测多糖(以 A₄₉₀ 表示)和紫外吸收法检测蛋白质(以 A₂₈₀ 表示)。以吸光值对洗脱体积(管数)作图, 得到洗脱曲线, 合并收集各洗脱峰部分, 透析后减压浓缩、冻干, 得到藤茶多糖 AGP 的一次分级组分。

对 AGP 一次分级收集的主要组分再进行 Sephadex G-200 柱层析分离纯化, 以获得分子量分布相对集中的纯化组分。柱层析条件: 19mm × 55cm 色谱柱, Sephadex G-200 湿法装柱, 床高约 45cm, 蒸馏水洗脱, 流速 10ml/h, 分部收集洗脱液, 3ml/管。同上方法跟踪检测多糖和蛋白质。根据洗脱曲线, 合并洗脱峰部分, 减压浓缩, 冻干, 得到二次纯化组分。

1.2.4 藤茶多糖的纯度鉴定

参考文献方法^[7-9]进行。

常压凝胶柱层析: 取 10mg 多糖样品, 溶于小体积双蒸水中, 上 Sephadex G-200 柱(19mm × 55cm), 用双蒸水洗脱, 流速 6ml/h, 分部收集, 3ml/管。同上法跟踪检测, 并绘制洗脱曲线图。

高效凝胶柱色谱(HPLC) Agilent 1100 HPLC; Plaquagel-OH MIXED 柱; 示差检测器; 洗脱剂为醋酸盐缓冲液(0.2mol/L NaAc-0.2mol/L HAc, pH6.0); 流速 1.0ml/min; 柱温 25℃; 保留时间 12min。样品浓度 1.0mg/ml, 进样 50μl。记录样品色谱曲线。

1.2.5 糖含量及相关成分分析

基本理化性质的测定^[8,10]: 溶解性测定; 碘反应; 硫酸-吡啶反应; 考马斯亮蓝 G-250 反应等。

糖含量分析: 以葡萄糖为标准样品, 硫酸-苯酚法检测中性糖含量; 以葡萄糖醛酸为标准样品, 吡啶-硫酸法测定多糖中己糖醛酸含量^[11-12]。

蛋白质含量分析: 以牛血清白蛋白为标准样品, 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量^[13]。

2 结果与分析

2.1 藤茶多糖粗品的脱蛋白效果

按水提(1次)、醇沉工艺制备粗多糖, 进行 Sevag

脱蛋白次数与脱蛋白效果的比较, 以脱蛋白后再醇沉、冻干后的多糖重量相对原料计算得率, 并分别测定糖含量及蛋白质含量, 结果如表 1 所示。

表 1 藤茶多糖 Sevag 法脱蛋白的效果
Table 1 Deprotein effects of Sevag method on polysaccharides from *Ampelopsis grossedentata*

样品	1	2	3	4	5	6
脱蛋白(次)	0	1	2	3	4	5
多糖得率(%)	5.79	4.66	4.65	4.42	4.23	3.68
多糖含量(%)	38.31	43.17	44.51	43.45	43.36	43.66
蛋白质含量(%)	2.45	2.03	2.02	2.00	2.00	2.01

表 1 显示, 随脱蛋白次数的增加, 而多糖得率下降; 脱蛋白后的多糖产品相对糖含量与不脱蛋白样品(No. 1)相比均有较大提高, 但脱蛋白次数对产品中相对糖含量影响不大(No. 2~6); 蛋白质含量在经过 1 次 Sevag 处理后, 均较未处理者减少, 但随次数增加, 各处理间差异不明显。说明, 藤茶多糖在随 Sevag 法脱蛋白的同时, 多糖也去除部分, 并随脱蛋白次数的增加而多糖得率减少, 而多糖产品在经过一次脱蛋白处理后, 蛋白质含量变化不大。说明, 经过一次脱蛋白处理后, 多糖中的大部分游离蛋白已去除, 多糖中可能存在结合蛋白而不能单独去除, 随脱蛋白次数增加, 蛋白质和多糖被同时去除, 而使多糖得率下降, 但相对糖含量和蛋白质含量变化不大。

选定 Sevag 处理 3 次, 进行藤茶多糖的初步纯化得到 AGP。

2.2 AGP 的 DEAE-Sephadex A-25 柱层析

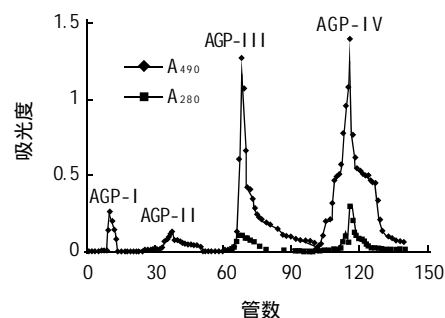


图 1 AGP 在 DEAE-sephadex A-25 柱上的洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of AGP on DEAE-sephadex A-25 column

采用 DEAE-Sephadex A-25 柱层析对 AGP 进行分级, 其洗脱曲线如图 1 所示。经蒸馏水、0.1、0.3 和 0.5mol/L NaCl 溶液洗脱后(分别对应 1~20, 21~50, 51~100, 101~140 管), 得到 4 个多糖洗脱峰 AGP-I、AGP-II、AGP-III 和 AGP-IV, 收集主要级分 AGP-III 和 AGP-IV。

2.3 AGP-III 和 AGP-IV 的 Sephadex G-200 柱层析

通过 Sephadex G-200 凝胶柱, AGP- 分出 3 个亚级分, AGP- 分出 2 个亚级分, 如图 2 所示。分别收集主要亚级分, 经浓缩、冷冻干燥得到 2 个相应组分 AGP-3 和 AGP-4。

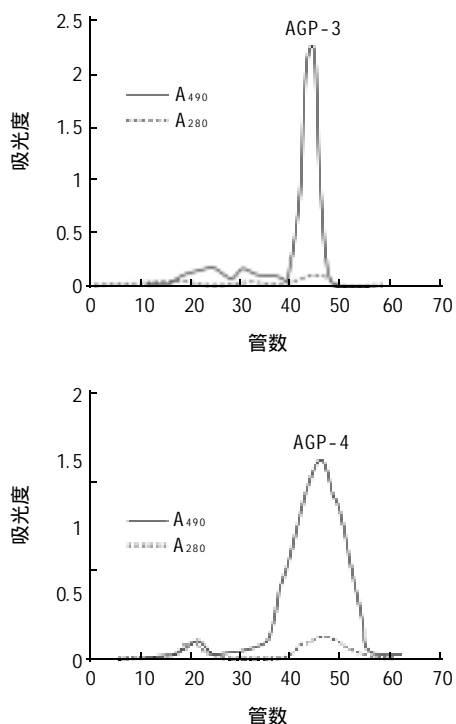


图2 Sephadex G-200 对 AGP-III 和 AGP-IV 的分离纯化
Fig.2 Chromatographic isolation of AGP-III and AGP-IV on Sephadex G-200 column

2.4 藤茶多糖分级组分的纯度鉴定

2.4.1 常压凝胶柱层析检测

AGP-3、AGP-4 分别上 Sephadex G-200 柱层析, 结果如图 3 所示。洗脱曲线均为单一对称峰, 说明该 2 种组分的分子量分布相对均一。

追踪藤茶多糖 AGP 逐级分离及纯度鉴定的柱层析洗脱曲线, 洗脱液的 A_{280} 曲线与多糖 A_{490} 曲线基本保持一致的变化趋势, 特别是对应于 AGP-3、AGP-4 组分的分布, 说明 AGP-3、AGP-4 中含有结合蛋白。

2.4.2 高效凝胶色谱法鉴定

AGP-3、AGP-4 的 HPLC 检测结果如图 4 所示。说明藤茶多糖组分 AGP-3 和 AGP-4 为相对均一多糖。

2.5 藤茶多糖与纯化组分的理化分析

对初步纯化的藤茶多糖 AGP 及其二次分级组分 AGP-3 和 AGP-4 的理化性质分析显示: 经冷冻干燥得到的多糖样品分别为浅灰褐色和白色絮状固体, 水溶性好, 不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂; 不发生 KI-I₂ 反应, 属非淀粉多糖; 硫酸-吡啶反应、考马斯亮蓝 G-250 反应均呈阳性, 说明多糖组成中含有糖醛酸、蛋白质。

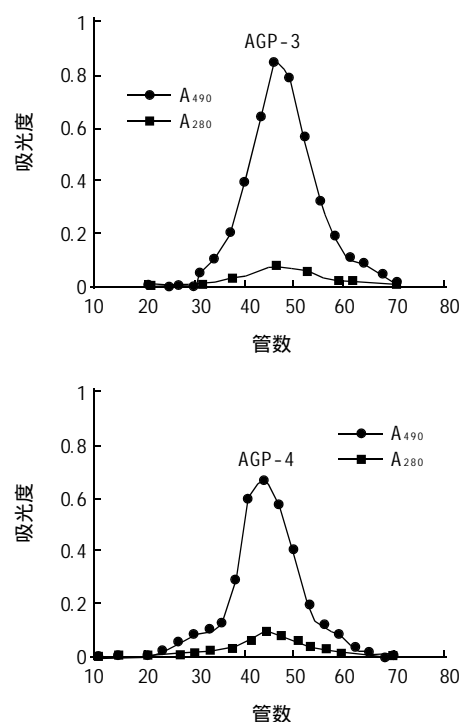


图3 AGP-3 和 AGP-4 的 Sephadex G-200 柱层析
Fig.3 Chromatographic of AGP-3 and AGP-4 on Sephadex G-200 column

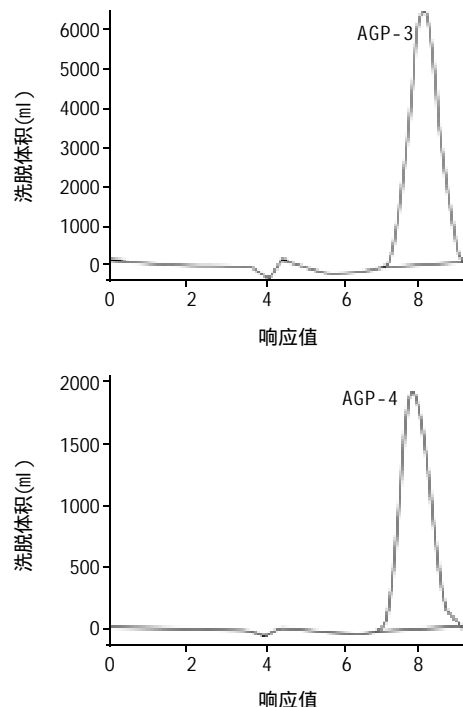


图4 AGP-3 和 AGP-4 的高效液相色谱
Fig.4 HPLC of AGP-3 and AGP-4

进一步测定表明: AGP-3 和 AGP-4 的中性糖含量分别为 57.6% 和 46.2%, 糖醛酸含量分别为 32.3% 和 45.7%, 蛋白质含量分别为 3.5% 和 4.7%。

3 结论与讨论

3.1 首次对藤茶水溶性多糖进行提取分离。经 Sevag 法 3 次脱蛋白的藤茶多糖 AGP 得率约 4.5%。AGP 蛋白质含量 2.0%，多糖含量 43.4%。

关于植物多糖纯化脱蛋白的方法，文献报道有 Sevag 法、木瓜蛋白酶法、三氯乙酸法等。一般认为 Sevag 法处理 3~10 次可达到脱蛋白的效果，本实验对藤茶多糖进行 Sevag 处理时，第一次即有大量胶状物去除，以后每次都有一定量的胶状物产生，即不断有蛋白质被脱去；实际检测显示，多糖得率随 Sevag 处理次数增加而不断下降，但多糖产品的相对蛋白质含量从第二次开始即变化不大。表明，藤茶粗多糖中的游离蛋白经过一次 Sevag 处理，多数即被去除；以后再有蛋白质脱除，多数是与糖呈结合态的蛋白质，因而使得多糖被同时除去，从而使多糖得率下降。

3.2 AGP 的分级纯化。DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离出 4 个级分，对其中 2 个主要级分 AGP- 和 AGP- 进一步在 Sephadex G-200 柱上分级纯化，分别收集主要亚级分，获得 AGP-3 和 AGP-4 组分。

3.3 AGP-3 和 AGP-4 的纯度鉴定与性质。经 Sephadex G-200 柱和 HPLC 鉴定，AGP-3 和 AGP-4 为分子量分布相对均一多糖。AGP-3 和 AGP-4 冻干样均为白色絮状的非淀粉多糖；二者中性糖含量分别为 57.6% 和 46.2%，糖醛酸含量为 32.3% 和 45.7%，蛋白质 3.5% 和 4.7%。

由于苯酚-硫酸法测定中性糖含量时存在己糖醛酸的干扰，而且以一种单糖作标准测定杂多糖的含量存在一定误差^[7]，本实验对藤茶多糖的中性糖含量测定值可能偏高，更准确的测定需要再根据杂多糖的单糖组成和己糖醛酸含量加以校正^[9]。

己糖醛酸的检测方法有比色法、纸色谱法、气相

色谱法、高效液相色谱法等^[7,14-15]。据研究，糖醛酸的存在是许多酸性多糖具有特征生物活性的重要原因之一^[16]。藤茶多糖的糖醛酸含量较高，为进一步进行生物活性的研究提供了依据。

参考文献：

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 二册[M]. 补编. 北京: 科学出版社, 1983: 349-356.
- [2] 覃洁萍, 许学健, 董明姣. 广西藤茶中黄酮类成分的提取工艺研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(3): 196-197.
- [3] 钟正贤, 覃洁萍, 周桂芬, 等. 广西藤茶总黄酮降血糖的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(9): 687-689.
- [4] 罗祖友, 杨晓萍, 吴谋成. 藤茶水溶性多糖与总黄酮的提取工艺研究[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 156-160.
- [5] 刘成梅, 万茵, 涂宗财, 等. 百合多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 89-90.
- [6] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉大学出版社, 1998: 27-30.
- [7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11-12; 29-38; 96-97.
- [8] 陈石良, 马青, 谷文英, 等. 灰树花胞外多糖的性质与结构[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(3): 244-248.
- [9] 何进, 张声华. 枸杞多糖的分离纯化及组成研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(12): 716-720.
- [10] 谭周进, 谢达平, 王征, 等. 蜜环菌多糖分离纯化及性质的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 49-53.
- [11] 刘桂敏, 赵秀梅, 陈菊娣, 等. 刺参酸性粘多糖质控分析方法的研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(2): 107-109.
- [12] BITTER T, MUIR H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Anal Biochem, 1962, 4(4): 330.
- [13] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992: 57-58.
- [14] NISHIDE E, ANZAI H, UCHIDA N, et al. Uronic acid carbazole reaction[J]. Hydrobiologia, 1990, 204/205: 573.
- [15] MICHAEL E Q, HANS N E. Differential gas-liquid chromatography method for determination of uronic acid in carbohydrate[J]. Analyst, 1994, 119: 1511.
- [16] 林启. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 113-140.

信 息

智利科学家开发新型低脂炸薯片

据智利《信使报》报道，智利天主教大学和圣地亚哥大学的研究人员正在联合开发一种新型炸薯片，可使这种油炸食品的脂肪含量从 35% 降至 15%。

智利天主教大学工学院化工系主任佩德罗·布琼介绍说，研究人员目前正尝试利用各种方法减少马铃薯片的表皮细孔，从而减少对油脂的吸收，包括在煎炸之前晾晒薯片，或从热油中捞出后迅速风干等等。

布琼说，研究人员最感兴趣的还是探讨在真空环境中煎炸薯片的可能性，因为这样可以将油温从普通环境中的 180 摄氏度降至 100 摄氏度到 120 摄氏度。这样做不仅能有效减少油脂吸收，而且可以避免马铃薯的营养成分过多流失。

报道说，智利两所大学的研究人员正加紧进行相关试验，预计不久将率先在本国企业中推广新的炸薯片方法。