

魔芋葡甘寡糖硫酸酯的分离纯化与理化分析

黄 皓, 干 信 *

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430068)

摘 要: 制备的魔芋葡甘寡糖硫酸酯经过乙醇二次沉淀、透析、浓缩和真空冷冻干燥, 得到粗品; 葡聚糖凝胶层析分离纯化其组分, 通过硫酸根和糖含量的检测, 分别得到硫酸酯化与未硫酸酯化的组分 I、II; 醋酸纤维膜电泳结果为一条单一谱带, 说明样品已达到电泳纯; 凝胶色谱测定重均相对分子质量 1595D, 数均相对分子质量 1572D, 分子量分布 PDI (MW/MN) 为 1.01, 表明样品是单分散性分子量分布。

关键词: 魔芋葡甘寡糖; 硫酸化; 纯化

Separation, Purification and Physicochemical Analysis of the Hydroxylpropyl Oligo-konjac Glucomannan Sulfate

HUANG Hao, GAN Xin*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430068, China)

Abstract: The oligo-konjac glucomannan sulfate product was prepared after alcohol sediment twice, with dialysis and vacuum freezing drying. By determining respectively the contents of sulfate and sugar, the sulfated sample I and non-sulfated sample II were obtained by gel filtration. The sample I appeared as a single band by separax electrophoresis. The weight average of relative molecular weight of hydroxylpropyl sulfated oligo-konjac glucomannan is 1595D, the number average of relative molecular weight is 1572D, and PDI (MW/MN) is 1.01 by GPC.

Key words: oligo-konjac glucomannan sulfating purification

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)02-0030-04

魔芋是食药两用的多年生草本植物, 属天南星科魔芋属。目前, 国内对魔芋的开发主要集中于食品加工等领域, 与国外研究水平存在较大差距。由于魔芋富含的魔芋葡甘聚糖(KGM), 具有优良的生物亲和性, 易制成

各种衍生物, 尤其是硫酸酯衍生物具有抗病毒、抗肿瘤等多种生理活性功能^[1]。为了更好地研究其作为功能食品的性质和生理活性, 更好地拓展魔芋的应用范围, 促进我国魔芋产业的发展, 本文报道了经合成制备的魔芋

收稿日期: 2006-01-25

*通讯作者

基金项目: 中国、波兰国际科技合作项目(30-668)

作者简介: 黄皓(1979-), 男, 博士研究生, 研究方向为分子食药生物工程。

- quantitative study[J]. J Agric Food Chem, 1987(4): 540-544.
- [3] BUTTERY R G, TERANISHI R. Quantitative studies on origins of fresh tomato aroma volatiles[J]. J Agric Food Chem, 1988, 36: 1247-1250.
- [4] SONG Jun, FAN Li-hua. Application of solid phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 3721-3726.
- [5] BUTTERY R G, SEIFERT R M, LING L C. Volatile tomato components: characterization of 6,10,14-trimethyl-pentadeca-5,9,13-trien-2-one[J]. Chem Ind (London), 1969: 238.
- [6] DIRINCK P, SCHREYEN, SCHAMP N. Aroma quality evaluation of tomatoes, apples, and strawberries[J]. J Agric Food Chem, 1977, 25: 759-762.
- [7] STEVENS M A, A A K, ALBRIGHT-HOL TON M, et al. Genotypic variation of flavor and composition in fresh market tomatoes[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1977, 102: 680-689.
- [8] BUTTERY R G. Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits in flavor science sensible principles and techniques[M]//ACREE T E, TERANISHI R, Eds; ACS Books: Washington, DC, 1993: 259-286.
- [9] BALDWIN E A, NISPERO-CARRIEDO M O, MOSHONAS M G. Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for certain constituents of two tomato cultivars during ripening[J]. J Am Soc Hort Sci, 1991, 116: 265-269.

葡甘寡糖硫酸酯(hydroxylpropyl oligo-konjac glucomannan sulfate, HOGS)的分离纯化及理化性质研究。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

葡聚糖凝胶 Sephadex G-25(进口分装); 醋酸纤维素薄膜; 甲苯胺蓝(分析纯) 武汉顺天生物技术有限公司; 葡聚糖(Dextran) 瑞典Pharmacia公司。

1.2 仪器设备

电动搅拌器(DJ-1型) 江苏大地自动化仪器厂; 超级恒温器(CS-501型) 中华人民共和国重庆试验仪器厂; 低速大容量离心机(TLG-100) 北京医用离心机厂; 透析袋(45-1000) 上海绿鸟公司(进口分装); 冷冻干燥机(LGJ-10) 军事医学科学院 722型光栅分光光度计 上海第三分光仪器厂; 电泳仪(JY600) 北京君意东方电泳设备有限公司; 凝胶过滤色谱仪(Waters 510型) 美国Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 HOGS 粗品的制备

采用改进的甲酰胺-氯磺酸法, 借鉴前期的魔芋葡甘寡糖硫酸酯化制备工艺^[2], 选取最佳硫酸酯化工艺条件: 10g 魔芋葡甘寡糖、25ml 氯磺酸、100ml 甲酰胺, 反应温度 68℃, 反应时间 3h。首先在冰水浴中制备硫酸酯化试剂, 将氯磺酸滴加到甲酰胺中, 控制氯磺酸滴加速度, 使反应体系温度在 5℃以下。反应完全后, 加入魔芋葡甘寡糖, 充分混合后, 移入恒温器, 在 68℃下搅拌(500/min)反应 3h。

将硫酸酯化反应制备的魔芋葡甘寡糖硫酸酯样品用蒸馏水溶解, 待冷却后加入 98% 的乙醇使之沉淀过夜, 在常温下离心, 转速 3000r/min, 时间 20min。将离心得到的沉淀再次用蒸馏水溶解, 同理加入 98% 的乙醇, 静置过夜, 二次离心。沉淀用蒸馏水溶解, 抽滤, 除去不溶物, 调节样品溶液 pH 至 7 左右, 并减压浓缩。浓缩液透析 3d, 去除 NH_4^+ 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 等离子。透析液减压浓缩, 真空冷冻干燥得 HOGS 粗品。

1.3.2 HOGS 的组分分离

Sephadex G-25 凝胶柱用 0.2mol/L NaCl 溶液平衡一天、流速为 5~6ml/h, 然后上样(10mg 样品溶于 1ml 蒸馏水中), 保持流速, 用 0.04mol/L 吡啶-0.02mol/L 醋酸(1:1)缓冲液洗脱, 用 BSZ-160 自动部分收集器收集洗脱分离的样品, 转速 4.0r/min, 按 3ml 体积分步收集。用蒽酮-硫酸法测定糖在 620nm 处 A 值, 得到洗脱体积与 A 的关系曲线^[5]。

1.3.3 糖含量检测

采用蒽酮-硫酸法。取糖浓度 50μg/ml 左右的样品

溶液 1.00ml, 加入蒽酮试剂, 迅速浸入冰水浴中冷却, 放入沸水浴中, 管口加盖玻璃球以防蒸发, 自水浴重新煮沸起计时, 准确煮沸 10min 后取出, 用自来水冷却, 室温静置 10min 左右, 于 620nm 处比色测定。以葡聚糖为标准糖制作标准曲线。

1.3.4 硫酸根含量检测

采用比浊法^[3]。精确称量样品, 1mol/L HCl 作溶剂, 配置 1.5mg/ml 样品液, 封管在 100℃下加热 2~3h, 冷却后吸取 0.2ml 加入 3.8ml 3% 三氯乙酸和 1ml 氯化钡-明胶试液, 混合后在室温下静置 15~20min, 测定在 360nm 处的光吸收值, 以 0 管对照, 得 A_1 ; 另以明胶试液代替氯化钡-明胶试液, 以 0 管对照, 测定在 360nm 处的光吸收值, 得 A_2 。用 1mol/L HCl 溶液配制硫酸钾标准溶液, 同法操作, 制作标准曲线。

1.3.5 纯度鉴定

采用醋酸纤维膜电泳^[4]。取醋酸纤维素薄膜(2×8cm)放在 pH12.5 的 0.025mol/L 硼酸盐缓冲液中浸泡 15~20min, 取出膜条, 夹在两层滤纸内吸去多余的缓冲液。另切 1~5mm 薄膜浸渍样品溶液约 1μl(10μg), 紧贴在离膜条一端 2cm 处, 使膜条点上细条状的多糖样品。按一般常规电泳方法, 两端用纸搭桥, 电压 250V, 电泳时间 20min, 取出膜条晾干后, 在 0.5% 甲苯胺蓝溶液中浸泡染色 10min, 然后在 1% 醋酸中漂洗, 至无糖区染色剂的底色完全脱去为止。

1.3.6 分子量分布测定

凝胶色谱法, 采用 TSKG-3000SW 凝胶过滤柱(300mm×7.5mm), 在 Waters 510 型 HPLC 仪上进行分离, 检测器为 410 型示差检测器, 并以葡聚糖为标准品进行测定。色谱条件为: 柱温 21℃(自动柱温控制系统); 柱压 5MPa(600 型恒压泵); 进样器 50μl; 进样量 20μl; 流动相为 HAc-NaAc 缓冲液(pH5); 流速 1.0ml/min; 洗脱时间 60min。

2 结果与分析

2.1 梯度沉淀样品所用乙醇浓度的确定

60%、70%、80% 三种不同浓度乙醇沉淀, 所得样品产物量及回收率比较见表 1。

表 1 不同浓度乙醇梯度沉淀样品量
Table 1 Different concentration samples by alcohol sentiment

乙醇梯度浓度(%)	60	70	80
乙醇用量(ml)	115	210	300
沉淀质量(g)	25.5	27.5	21.7
产物回收率(%)	22	26	18

由表 1 可知, 70% 乙醇梯度沉淀所得产物量最大, 回收率最高。故选择乙醇沉淀的终浓度为 70%。

经沉淀离心所得样品液采用分子量 1000 透析袋透析 3d, 经 AgNO_3 (检测 Cl^-)、 BaCl_2 (检测 SO_4^{2-}) 和铵试剂 (检测 NH_4^+ , 可跟铵离子反应生成黄色沉淀, NH_4^+ 多时会生成棕红色沉淀) 检测, 反应均为阴性, 达到了脱盐及除去小分子杂质的目的。

2.2 HOGS 的凝胶层析分离

HOGS 经葡聚糖凝胶层析分离得到 I、II 2 个组分, 洗脱曲线见图 1。

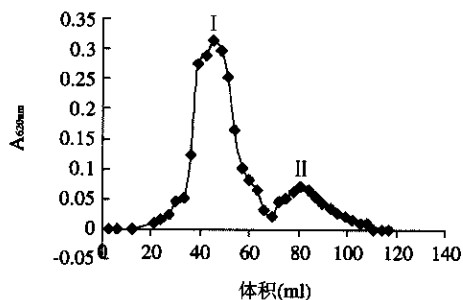


图1 HOGS 的凝胶层析洗脱曲线
Fig.1 Eluting curve of HOGS by gel filtrate

由图 1 可知, 组分 II 在洗脱体积 80ml 时峰值最大, 出峰时间较晚, 分子量较小, 可能是未硫酸酯化的葡甘寡糖; 主要组分 I 在洗脱体积 50ml 左右, 峰值达到最大, 出峰时间较早, 分子量较大, 可能是所需的纯化目标产物: 葡甘寡糖硫酸酯。

2.3 HOGS 组分 I、II 的糖含量、硫酸根含量结果见表 2。

表2 HOGS 组分 I、II 的糖含量及硫酸根含量
Table 2 Sugar and sulfate content of HOGS I, II

组分	糖含量(%)	硫酸根含量(%)
I	95.2	33.1
II	34.7	1.7

由表 2 可知, HOGS 组分 II 硫酸根含量很低, 仅 1.7%, 基本上未硫酸酯化, 更进一步证实其组分是未硫酸酯化的魔芋葡甘寡糖; HOGS 组分 I 硫酸根经检测含量达到 33.1%, 进一步证实是所需的纯化目标产物: 魔芋葡甘寡糖硫酸酯。

2.4 HOGS 纯度检测

HOGS 组分 I 醋酸纤维素薄膜电泳结果见图 2。

电泳结果为一条单一谱带, 说明经过乙醇二次沉淀、离心、透析和葡聚糖凝胶层析, HOGS 样品 I 已达到电泳纯。

2.5 HOGS 相对分子质量分布

由凝胶色谱图 3 可知, 只有一个单峰, 峰形成对称的高斯分布曲线。

分子量分析结果见表 3。

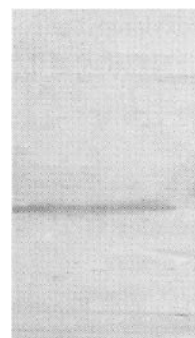


图2 HOGS 醋酸纤维素薄膜电泳图
Fig.2 Separax electrophoresis of HOGS

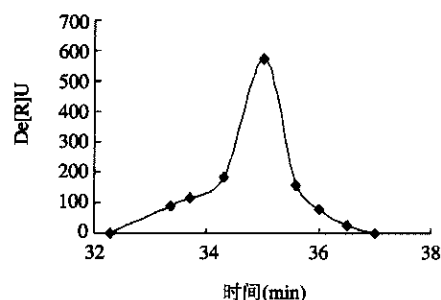


图3 HOGS 凝胶过滤色谱图
Fig.3 GPC result of HOGS

表3 HOGS 的凝胶过滤色谱分析结果
Table 3 GPC analysis of HOGS

样品名称	RT	MN	MW	MP	面积百分比(%)	面积
HOGS	35.010	1572d	1595d	1608d	97.76	44014676

由凝胶过滤色谱图分析及表 3 可知, 魔芋葡甘寡糖硫酸酯的分子量峰值 MP 为 1608D, 平均相对分子质量 1595D, 数均相对分子质量 1572D, 分子量分布 PDI (MW/MN) 为 1.01, 表明是单分散性分子量分布, 即分子量分布均一, 相对含量为 97.76%。

3 讨论

我国西部地区魔芋资源丰富, 本文以魔芋葡甘寡糖为原料, 在前期采用生物酶解方法得到葡甘寡糖的基础上, 制备了葡甘寡糖硫酸酯衍生物, 并通过一系列分离纯化方法得到了一定纯度的寡糖硫酸酯样品。凝胶过滤色谱分析表明, 样品是单分散性分子量分布, 即分子量分布均一。对于样品纯度的鉴定, 采用醋酸纤维素膜电泳进行鉴定, 单一谱带表明已达到了电泳纯水平。这为以后样品的性质、结构表征和生理活性功能方面的研究提供了科学依据, 对于扩展魔芋资源应用的范围及促进魔芋功能食品的研究开发具有重要意义。

参考文献:

姜辣素的电化学行为研究

刘成伦^{1,2}, 唐德容¹, 高瑜¹

(1. 重庆大学化学化工学院, 重庆 400044;

2. 西南资源开发及环境灾害控制工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘 要: 采用微分脉冲法和循环伏安法对姜辣素的电化学行为进行了探讨。结果表明, 姜辣素的良好抗氧化性源于其强的电化学活性; 在 pH4~9 的范围内, 姜辣素的电化学活性随着 pH 的降低而减弱; 姜辣素的氧化峰电位 E_{pa} 为 0.16V, 氧气的析出电势为 0.39V, 它与氧气作用时表现出还原性, 通过得氧而发生氧化反应; 姜辣素的循环伏安扫描曲线表现为准可逆反应。

关键词: 姜辣素; 电化学; 微分脉冲法; 循环伏安法

Research on Electrochemistry Behaviors of Gingerol

LIU Cheng-lun^{1,2}, TANG De-rong¹, GAO Yu¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China 2. Key Laboratory of Southwest Resources Exploitation and Environment Disaster Control, Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

Abstract: The electrochemistry behaviors of gingerol were tested with differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry in this article. The results indicated that the good anti-oxidation characteristic of gingerol was based on its great electrochemistry activeness. It was found that the activity was enhancing when pH was from 4 to 9, and gingerol's E_{pa} (electric potential of oxidation peak) was 0.16V, the precipitation electric potential of oxygen was 0.39V. Thus gingerol displayed the reducibility when it acted on active oxygen atoms, it took place oxidation reaction through receiving oxygen. Furthermore, the cyclic Voltammetry curve of gingerol indicated that the reaction was half reversible process.

Key words: gingerol; electrochemistry; differential pulse voltammetry; cyclic voltammetry

中图分类号: Q646.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)02-0033-04

生姜(*Zingiber officinale*)是一种民间常用的中草药, 具有解热、镇痛、抗炎的作用, 并且由于生姜香辣味独特, 作为一种食品和食品添加剂深得百姓喜爱。近年来, 许多研究表明, 生姜中的辣味成分具有很强的抗氧化活性^[1-2]。姜辣素是生姜中主要呈味成分和药用成分, 是多种物质的混合物, 其组成中均含有 3- 甲氧基 - 4- 羟基苯基官能团, 根据其官能团的不同, 将其分为六类(如图 1)^[3]。姜辣素的研究是目前天然抗氧化剂中较

为热门的研究, 从国内外研究现状来看, 对姜辣素的提取、含量测定、抗氧化活性的测定以及产品开发生的研究较多, 而从电化学的角度对姜辣素的抗氧化性能, 使用条件的控制, 以及反应机理的研究较少。抗氧化剂作为一种电活性物质, 在体内进行的清除氧自由基的过程与电极上发生的氧化还原过程类似, 亦是通过电子转移来实现的, 可以认为抗氧化活性实质上是一种电化学性质^[4], 因此, 用电化学方法研究天然抗氧化剂将是

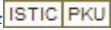
收稿日期: 2006-01-25

基金项目: 重庆市委自然科学基金计划资助项目(CSTC, 2006BB1180); 重庆市高等学校优秀中青年骨干教资助计划项目
作者简介: 刘成伦(1963-), 女, 副教授, 博士后, 主要从事应用物理化学和食品科学研究。

- [1] 徐文清. 硫酸酯化多糖研究的新进展[J]. 天津药学, 2002, 14(6): 1-4.
[2] 张迎庆, 干信, 邹辉, 等. 魔芋葡甘低聚糖硫酸酯化衍生物的制备及结构分析[J]. 药物生物技术, 2001, 8(4): 200-203.
[3] 刘红英. 海带岩藻聚糖硫酸酯测定方法的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2): 236-240.

- [4] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 7.
[5] 汪建明, 赵征, 王勇志. 低聚糖的分离与鉴定[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(3): 3-5.
[6] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.

魔芋葡甘寡糖硫酸酯的分离纯化与理化分析

作者: [黄皓](#), [干信](#), [HUANG Hao](#), [GAN Xin](#)
作者单位: [华中农业大学食品科学技术学院, 湖北, 武汉, 430068](#)
刊名: [食品科学](#) 
英文刊名: [FOOD SCIENCE](#)
年, 卷(期): 2007, 28 (2)

参考文献(6条)

1. [吴东儒](#) [糖类的生物化学](#) 1987
2. [汪建明](#); [赵征](#); [王勇志](#) [低聚糖的分离与鉴定](#) [期刊论文] - [食品研究与开发](#) 2000 (03)
3. [张惟杰](#) [复合多糖生化研究技术](#) 1987
4. [刘红英](#) [海带岩藻聚糖硫酸酯测定方法的研究](#) [期刊论文] - [青岛海洋大学学报](#) 2002 (02)
5. [张迎庆](#); [干信](#); [邹辉](#) [魔芋葡甘低聚糖硫酸酯化衍生物的制备及结构分析](#) [期刊论文] - [药物生物技术](#) 2001 (04)
6. [徐文清](#) [硫酸酯化多糖研究的新进展](#) [期刊论文] - [天津药学](#) 2002 (06)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702003.aspx