

南瓜多糖的组成及摩尔比测定

孔庆胜 蒋 滢¹(济宁 272013 济宁医学院生化教研室;¹ 苏州医学院)

摘要 目的:研究南瓜多糖的单糖组成及摩尔比。方法:南瓜(Pumpkin)干粉经热水提取,Sevag法弃蛋白,透析,乙醇沉淀,沉淀干燥物再经Sephadex G-100柱层析纯化,即得南瓜多糖纯品(Pumpkin Polysaccharide,简称PP)。用聚丙烯酰胺凝胶电泳证明为均一体。结果:凝胶过滤法测其分子量为 1.6×10^4 。PP用酸完全水解,经纸层析表明由D-葡萄糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖、木糖和D-葡萄糖醛酸组成。其摩尔比分别为0.181:0.083:0.069:0.031:0.175。结论:南瓜多糖将有可能作为一种新的高效低毒的降血糖药物。

关键词 南瓜;多糖

Isolation purification of polysaccharide from the pumpkin and the study of its monosaccharide composition

Kong Qingsheng(Kong QS), Jiang Ying(Jiang Y) (Department of Biochemistry, Jining Medical College, Jining's 272013)

ABSTRACT **OBJECTIVE**:To investigate PP monosaccharide composition and determine its molar ratio. **METHODS**:

Form the pumpkin, growing in Shandong, polysaccharide (PP) was isolated by the methods of hot water extraction, deproteinization, removal of lipid and Sephadex G-100 chromatography. Some chemical and physical properties of the polysaccharide were examined. The PP was judged to be homogeneous by electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 1.6×10^4 based on analyses of paper chromatography. **RESULTS:** The PP was composed mainly of D-glucose, D-galactose, L-arabinose, xylose and D-glucuronic acid in the molar ratios of 0.181: 0.083: 0.069: 0.031: 0.175 respectively. **CONCLUSION:** PP is a prospective drug to lower blood sugar level.

KEY WORDS pumpkin, polysaccharide

近 10 年来,人们发现从植物中提取多糖具有多方面的生物功能,其中包括对中草药提取的酸性杂多糖的研究。南瓜作为消渴药在祖国医学典籍中早有记载。但有关其生物活性和化学分析均未见报道。本文报告了南瓜多糖的提取、纯化和理化分析。

1 方法和结果

1.1 仪器和试剂

岛津双波长薄层扫描仪 CS-930, 自带 DR-2 数据处理机, 岛津 UV-3000 型紫外分光光度计, 冷冻干燥机。Dextran 标准品, Sephadex G-75, Sephadex G-100 和 Sephadex G-200 (Pharmacia 产品)。L-阿拉伯糖, L-鼠李糖和 D-葡萄糖醛酸 (Sigma 产品)。木糖 (E. Merck 产品)。岩藻糖 (Colnbrook Berks England 产品), D-半乳糖, D-甘露糖和 D-葡萄糖 (上海试剂二厂)。

1.2 PP 的提取、分离和纯化

取南瓜(产自山东济宁,收获期在10月份)干品,粉碎,经甲醇回流,再用热水搅拌煮沸6h,离心后,上清液用Sevag法除蛋白,反复数10次,以常水透析48h。适当浓缩,浓缩液加95%乙醇搅匀,冰箱放置过夜,离心得沉淀物。此沉淀物以水溶解重复醇析一次,然后将沉淀物用75%乙醇,无水乙醇,乙醚洗涤,冷冻干燥即得南瓜多糖粗品,收率为6.0%。把多糖粗品溶于0.1 mol/L NaCl 溶液中,经Sephadex G-100 柱层析(4.5 × 80cm),用0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱,流速0.7 ml/min,用硫酸苯酚法部分收集检测,结果见图1。

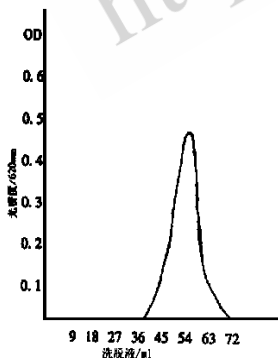


图1 Sephadex G-100 柱层析分离和纯化 PP

收集糖反应阳性高峰部分,扎袋透析72h。透析液减压浓缩至适当体积,再经Sephadex G-100 柱层析,用硫酸苯酚法检测,将收集到的多糖单一峰部对蒸馏水透析72h,冰冻干燥,得南瓜多糖纯品。

1.3 PP 的纯度鉴定

聚丙烯酰胺凝胶电泳纯度检查:聚丙烯酰胺凝胶浓度为7.5%,缓冲液pH8.3 Tris-甘氨酸缓冲液。样品浓度为3.0%,每管进样30μl,电压110V,电流每管约1mA,电泳1.5和2h。用阿利新蓝8GX染色,结果表明为单一区带。见图2。



图2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)电泳

A-1.5h; B-3.0h

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯度检查,证明PP的纯度较高。

1.4 PP 的理化性质及其组成定量分析

理化性质:PP为棕色粉末,溶于水,尤易溶于热水。不溶于高浓度的乙醇,丙酮,乙酸乙酯等有机溶剂。其水溶液呈透明粘稠状,可被2%的CTAB络合沉淀,与碘-碘化钾反应,茚三酮和氨基黑10B反应均为阴性。

含量分析:PP用硫酸苯酚法测糖含量为65.4%,硫酸咔唑法测糖醛含量为18.6%,PP的水份为8.4%,灰分为3.8%,紫外光谱在260和280nm处无蛋白质和核酸吸收峰。

1.5 PP 的分子量测定

采用凝胶过滤法测定分子量。用0.1 mol/L NaCl,流速3.0 ml/h,平衡Sephadex G-200 层析柱3d。先用乙知分子量的多糖标准品Dextran T10, T40, T70, T90 各5mg 分别流速0.12 ml/min,分别相继上柱,用0.1 mol/L NaCl 洗脱,分部收集,每管收集1.0 ml,用硫酸-苯酚法测定各管糖含量,分别求得洗脱体积 V_e 。然后再用蓝

色葡聚糖(Dextran T-2000)上柱,求得柱空体积 V_0 ,根据 V_c/V_0 值,查标准曲线,测得多糖的平均分子量为 16000。

1.6 PP 单糖组分种类分析

PP 中单糖的种类:称取 PP 10.0mg,以 1.0mol/L 硫酸 2.0ml 封管,于 100℃ 水解 6h,饱和 $Ba(OH)_2$ 水溶液中和,离心后上清液浓缩供点样用。采用美国 Whatman NO.1 慢速定性层析滤纸,纸长 40cm,展开系统为醋酸乙酯-吡啶-水 = 10:4:3 (V:V:V),上行法展开 18h。用标准单糖对照,硝酸银-氢氧化钠试剂显色,显色后,于 80℃ 加热 10min 观察,发现 PP 含有 D-葡萄糖, D-半乳糖, L-阿拉伯糖,木糖, D-葡萄糖醛酸。若以葡萄糖的 R_f 值为 1,则它们的相对 R_f 值之比为半乳糖-葡萄糖-阿拉伯糖-木糖-葡萄糖醛酸(0.82:1.00:1.21:1.53:2.59)。

PP 单糖组分的摩尔比测定:用 Shimadzu Dual-Wave Length TLC Scanner Model CS-930 扫描层析图。波长 500nm,线性化因子 $s_x = 1$,色谱,正常直线扫描,选择吸光度反射法,背景校正,低敏感性,狭缝 $7 \times 1 \text{ mm}$,扫描方向与展开方面平行。得 5 种单糖的峰面积。其比值为半乳糖-葡萄糖-阿拉伯糖-木糖-葡萄糖醛酸 = 15.09:40.18:10.73:6.56:26.44,摩尔比为 0.083:0.181:0.069:0.031:0.175。

2 讨论

用本文所述方法提取的 PP,收率高,纯度纯。PP 属酸性杂多糖,根据杂多糖的聚阴离子和电离性质,我们选用了 Sephadex G-100 对 PP 进行了分离,纯化,并且用电泳方法对 PP 的纯度进行了鉴定,证明是单一多糖。大多数杂多糖是由葡萄糖,甘露糖,半乳糖,木糖,阿拉伯糖和鼠李糖等中的几种单糖组成。PP 中含有半乳糖,葡萄糖,阿拉伯糖,木糖和葡萄糖醛酸,与报道比较符合。南瓜的杂多糖还未见报道,有关其生物学活性有待今后进一步探讨。

参考文献

- 1 张岚,任丽娟,顾玉诚.山豆中性多糖 SSA 的分离,纯化和性质.中草药,1993,24(1):8.
- 2 王丁刚,王淑红.茶叶多糖的分离,纯化分析及降血脂作用.中国药科大学学报,1991,22(4):225.
- 3 Hikino H, Yoshizawa M, Suzuki Y, et al. Isoation and hypoglycemic activity of trichosans A, B, C, D and E, glycans of *trichosanthes kirilowii* roots. *Planta Med*, 1989, 55(4): 349.
- 4 Kihō T, Tsujimura Y, Sakushima M, et al. Polysaccharides in fungi. XXXIII. Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharide (AC) from *tre mella fuciformis*. *Yakugaku Zasshi*, 1994, 114(5): 308.