

## 研究报告

# 薯蓣多糖的分离纯化和性质鉴定

罗丽萍, 高荫榆

南昌大学生命科学学院, 南昌 330031

**摘要:** 以我国资源量巨大的薯蓣为原料, 采用中试设备, 利用水提醇沉法提取多糖。研究了活性炭脱色工艺, 经初步纯化获得薯蓣多糖(PSPV), 并研究了其理化性质。DEAE-纤维素柱对来自于二个季节的 PSPV 进行分离、纯化, 分别得到 PSPV I 和 PSPV II、PSPV III 三个多糖组分, 高效凝胶过滤色谱法测定三个组分的分子量分别为  $6.278 \times 10^4$  D,  $3.801 \times 10^4$  D 和  $1.418 \times 10^4$  D, 气相色谱结合标样测定单糖组成。研究结果为充分高效利用薯蓣资源提供了理论依据。

**关键词:** 薯蓣多糖, 中试, 分离, 纯化, 性质

## Isolation and Identification of Polysaccharide from Sweet Potato Vines

Liping Luo, and Yinyu Gao

School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China

**Abstract:** China is the largest country of cultivating sweet potato in the world. The resources of sweet potato vines (SPV) are huge. To exploit the rich resources, SPV of XuShu 18 was selected as raw materials since it is cultivated in China widely. Polysaccharide from SPV was extracted by pilot instrument and precipitated by ethanol. The decoloring technology was studied. By primary purification, we obtained the polysaccharide from SPV (PSPV) and studied its physical and chemical characters. Using DEAE-cellulose column and NaCl solution as eluting reagent, three kinds of pure polysaccharide, named PSPV I, PSPV II and PSPV III respectively, were obtained. Then the molecular weight distribution and sugar compositions were studied using High Performance Gel Filtration Chromatography and GC. The followings are the results. PSPV I was separated from PSPV which was extracted from SPV harvested in the middle of June. Its M.W. is  $6.278 \times 10^4$  D and is mainly composed of Xylose, Mannose and Glucose. PSPV II and PSPV III were separated from PSPV which was extracted from SPV harvested in the middle of October. Their M.W. are  $3.801 \times 10^4$  D and  $1.418 \times 10^4$  D respectively. PSPV II is mainly composed of Mannose and Galactan. PSPV III is mainly composed of Glucose, Xylose and Rhamnose. The results provide theoretical basis for the utilization of SPV.

**Keywords:** polysaccharides from SPV (PSPV), pilot test, isolation, identification

多糖是由单糖通过糖苷键结合而成的大分子碳水化合物, 由于具有提高机体免疫功能、清除氧化自由基、降血糖和免疫调节等作用, 多糖的研究引起人们的高度重视。目前主要以中草药多糖为主,

有些甚至源于名贵中药, 而资源的日渐紧缺不利于多糖的研究和应用, 开发优质而又来源广泛的新资源, 将有利于多糖产业化和可持续发展<sup>[1-4]</sup>。

甘薯(*Ipomoea batatas* Lam.)为旋花科甘薯属植

**Received:** March 7, 2008; **Accepted:** March 17, 2008

Supported by: the Key Agricultural Project from Science and Technology Department of Jiangxi Province(No. 2003CB415100).

**Corresponding author:** Liping Luo. Tel: +86-791-3969519; Fax: +86-91-3969519; E-mail: lluo2@126.com

江西省科技厅农业重大项目(No. 2003CB415100)。

物, 薯蓣为其地上部分统称。我国是世界上甘薯栽培面积最大的国家, 年产干薯蓣达  $3.5 \times 10^{10}$  kg<sup>[5,6]</sup>。目前这一巨大的资源大部分都被废弃, 造成浪费和污染。其实薯蓣营养丰富, 具多种保健功能, 且富含多糖。在小试研究的基础上, 本文以广泛栽培的徐薯 18 薯蓣为原料, 对薯蓣多糖(Polysaccharide from sweet potato vines, 以下简称为 PSPV)进行中试提取, 研究了其脱色工艺, 并进行分离、纯化, 测定了纯化级分的分子量和单糖组成。研究结果为薯蓣资源利用提供了理论依据。

## 1 材料、仪器与方法

### 1.1 材料

徐薯 18 薯蓣, 分别于 6 月中旬和 10 月中下旬采自江西省农科院。

DEAE-纤维素-52, Whatman 公司; 标准多糖, Sweden, Pharmacia Uppsala 公司; 蓝色葡聚糖和 G-200, Pharmacia 公司产品; 标准单糖(葡萄糖、甘露糖、木糖、半乳糖、鼠李糖)及其试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

DTQ 多功能提取器: 湖南省衡阳市东泰医药机械制造有限公司; 101-2 型恒温干燥箱: 上海市实验仪器厂; RE52-4 旋转蒸发器: 上海亚荣; 756 紫外分光光度计: 上海精密; 420A 型 pH 计: 美国 Orion; SP-1910 紫外可见分光光度计: 上海光谱仪器有限公司; IR-FT 红外光谱仪(KBr 压片, Nicolet 5700): Thermo Electron Cooperation; LXJ-IIB 低速

大容量多管离心机: 上海医用分析仪器厂; 1.6 cm×50 cm 商品柱: 上海亚荣; BSZ-100 自动部分收集器、D100 B 数显定时蠕动泵: 上海青沪西仪器厂; 超低温冰箱: Thermo; FD-1 冷冻干燥机: 北京德天佑科技发展有限公司; SY3200 超声波清洗器: 上海声源; Shimadzu GC-9A 型气相色谱仪: 日本岛津公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 PSPV 的提取、纯化

(1) 中试提取的工艺流程(图 1)及操作要点: 操作要点: 薯蓣与水以物料比为 1:30 在多功能提取器中, 85°C 常压蒸煮提取 2 次, 每次 2 h, 过滤。滤液真空浓缩, 浓缩条件: 95°C 真空 0.06 MPa。初步浓缩液冷却后经离心机以 3000 r/min 的速度离心 30 min, 再用旋转蒸发器进行二次浓缩, 浓缩条件: 80°C, 真空 0.1 MPa。上述浓缩液中加入 95%, 5 倍浓缩液体积乙醇醇沉, 4000 r/min 离心 20 min, 保留沉淀。沉淀物真空干燥得粗多糖。

中试提取工艺的主要特点是: 以水为溶剂提取多糖, 以乙醇为溶剂提取类黄酮, 乙醇回收循环使用, 不使用有毒有害的辅助材料, 保证产品的卫生安全性能; 残渣可膨化制备特种膳食纤维, 确保了资源的充分、高效利用, 有利于发展循环经济。

(2) 脱蛋白、脱色处理: 由于薯蓣中含有大量的蛋白质和色素, 经上述步骤难以去除, 故还需进行脱蛋白和脱色。处理须不破坏多糖性质和结构, 因此脱蛋白采用温和的 Sevag 法, 脱色利用活性炭的物理吸附作用。

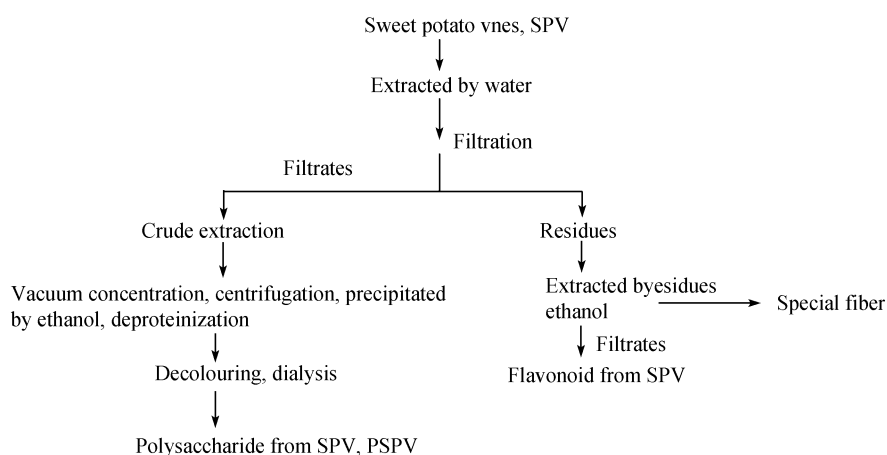


图 1 PSPV 中试提取的工艺流程

Fig. 1 Pilot-extract process flow chart of PSPV

粗多糖以适量去离子水溶解,配成约 2%水溶液,加 1/3 用量的 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=4:1),剧烈振摇 30 min, 4000 r/min 离心 20 min, 取上层水相,重复多次,直至水合茚三酮检测无颜色反应,说明无游离蛋白为止。取上层水相醇沉,沉淀过夜再离心,收集沉淀。

影响活性炭脱色的因素较多,为优化工艺,选取时间、温度、活性炭用量 3 个因素进行正交实验,用脱色率和含糖量作为脱色效率的指标。正交实验因素及水平见表 1。配制 5%多糖溶液进行试验,经 220~680 nm 波段扫描,在 355 nm 处有最大吸收峰,选择 355 nm 为检测波长,测定多糖脱色率及含糖量。数据处理采用加权平均法。评分标准为:将各项指标除以该列最大值再乘以 100,为该项得分。设定多糖脱色率( $x$ )和含糖量( $y$ )两者的权重系数为 0.5,对两项指标进行加权求和。通过公式  $z = 0.5x + 0.5y$ ,得综合评分( $z$ )。试验结果及方差分析见表 2、表 3。

表 1 活性炭脱色因素水平表  
Table 1 Design table of orthogonal test

Level	Factors		
	A Temperature /°C	B Time /min	C Content of active carbon/%
1	50	20	0.5
2	60	30	1.0
3	70	40	1.5

$$\text{脱色率}(x) = \frac{\text{脱色前吸光度} - \text{脱色后吸光度}}{\text{脱色前吸光度}} \times 100\%$$

$$\text{含糖率}(y) = \frac{\text{脱色后糖含量}}{\text{脱色前糖含量}} \times 100\%$$

脱色后的多糖溶液在自来水下透析(分子量小于 10 000)48 h,蒸馏水透析 24 h。所得即为 PSPV。

### 1.3.2 PSPV 物化性质的测定

多糖含量的测定采用蒽酮-硫酸法;淀粉的测定采用碘-碘化钾法;蛋白质含量测定采用凯氏定氮法;酸碱鉴定采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法;检测了 PSPV 的紫外和红外光谱<sup>[7-9]</sup>。

### 1.3.3 PSPV 的分离、纯化

用于分离纯化的 PSPV 分别提取自 6 月中旬和 10 月中下旬采集的薯蓣。PSPV 在 DEAE 纤维素柱中层析,NaCl 溶液梯度洗脱,隔管检测多糖含量,收集峰形单一对称、带较宽、多糖含量高的洗脱峰,经透

析、醇沉、冻干后得粉末多糖,低温密闭保存备用。

### 1.3.4 纯度检验及分子量测定

纯度检验采用凝胶柱层析法。根据多糖的分子量取 10 000 以上,选取 SephadexG-200 凝胶柱(1.5 cm×45 cm)层析。取样品各 3 mg 溶于最小体积的 0.05 mol/L NaCl 中,上柱。用 0.05 mol/L NaCl 溶液洗脱,流速 8 mL/h,按 2 mL/T 分部收集,跟踪检测糖含量,观察洗脱峰以检验纯度。

分子量测定采用高效凝胶过滤色谱法。用蓝色葡聚糖上柱,流速不变,1 mL/T 分管收集,每管测糖含量,洗脱体积为外水体积  $V_0$ 。再用 Dextran T-40, T-100, T-150, T-200, T-500 上柱,流速不变,1 mL/T 分管收集,各自得洗脱体积  $V_e$ 。由公式  $V_e/V_0 = K_1 + K_2 \lg Mw$  线性回归得  $K_1$  和  $K_2$ ,用待测样品的洗脱体积  $V_e$  代入上式即可得其分子量。

### 1.3.5 单糖组成分析

气相色谱结合标样测定单糖组成。制备标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物,待测样品经完全酸水解得水解单糖混合物后,采用与标准单糖相同的衍生化处理。反应产物直接进气相色谱分析。GC 工作参数:分离柱采用 SE-30 3.0 m × 3.5 mm 填充柱,日本岛津公司。操作条件:气体流速:  $N_2$ : 50 mL/min;  $H_2$ : 50 mL/min; 空气: 200 mL/min,柱温: 190°C,汽化温度: 250°C。检测器温度: 250°C。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性炭对粗多糖的脱色

活性炭脱色结果见表 2、表 3。由表可知,活性炭用量(因素 C)对脱色效果影响最大,是主要因素;温度、时间依次次之。方差分析结果表明:活性炭用量对脱色效果的影响达极显著水平,温度和时间无显著影响。最佳的脱色条件为  $A_2B_1C_1$ ,即: 0.5% 的活性炭,60°C 脱色 20 min。

### 2.2 PSPV 的物化性质

PSPV 为浅黄色粉末。溶于水,易溶于热水,不溶于高浓度乙醇、乙醚、丙醇、氯仿、乙酸乙酯等有机溶剂,三氯化铁反应为阴性,说明其不含多酚类物质。与 CTAB 溶液反应产生白色沉淀,证明为酸性多糖。蒽酮-硫酸法测定多糖纯度为 93.5%,凯氏定氮法测定其中蛋白质含量为 0.07%,碘-碘化钾反应为阴性,说明不含淀粉。

表 2 活性炭脱色正交试验结果

Table 2 Results of decolouring by active carbon in orthogonal test

No.	A	B	C	D	Decolouring rate/%	Content of saccharide/%	Comprehensive grade
1	1	1	1	1	85.2	75.5	94.0
2	1	2	2	2	95.0	57.5	87.1
3	1	3	3	3	96.9	48.2	81.9
4	2	1	2	3	95.1	64.3	91.7
5	2	2	3	1	95.7	54.6	85.6
6	2	3	1	2	90.9	72.1	94.9
7	3	1	3	2	95.0	50.2	82.3
8	3	2	1	3	92.5	69.8	94.0
9	3	3	2	1	95.5	60.0	89.1
R <sub>i</sub>	3.0	0.7	11				K=800.4

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance table of decolouring by active carbon

Source of variance	Sum of square	Df	Mean square	F	
A	14.48	2	7.24	6.11	
B	0.89	2	0.38	0.38	$F_{0.01}=99.00$
C	181.01	2	90.5	76.4*	$F_{0.05}=19.00$
Error (e)	3.85	2	1.925	1.925	*: ( $P<0.05$ )
New error (e')	4.74	4	1.185	1.185	** : ( $P<0.01$ )

PSPV 的紫外吸收光谱和红外光谱见图 2、图 3。紫外光谱表明, PSPV 仅在 220nm 附近有最大吸收峰, 在 280nm、260nm 及可见光区皆无明显吸收峰, 说明 PSPV 是不含蛋白质、核酸及其他色素等杂质的均一多糖。虽然凯氏定氮法测出尚含有 0.07% 的蛋白质, 但量极少。

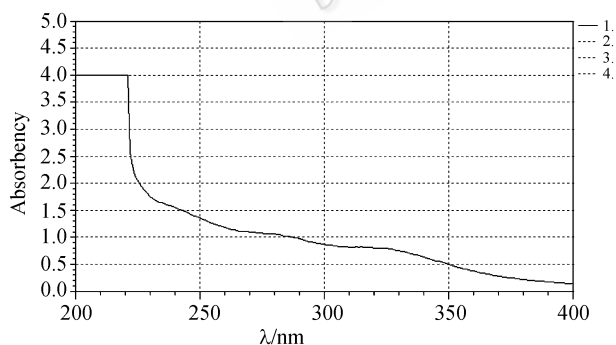


图 2 PSPV 的紫外光谱图  
Fig. 2 UV spectrum of PSPV

红外光谱表明, PSPV 具有典型的多糖特征吸收峰。其中, 3424.49  $\text{cm}^{-1}$  出现的吸收峰为 O-H 的伸缩振动, 主要是由多糖的配糖体羟基(缔和)伸缩振动引起的; 2934.55  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰与 C-H 的伸缩振动相对应; 1636  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为 -CHO 的

C=O 伸缩振动或 N-H 的变角振动; 1440.38 和 1236.63  $\text{cm}^{-1}$  处为 C-O 伸缩振动和 O-H 变角振动吸收峰; 1103.50  $\text{cm}^{-1}$  处出峰则是 C-O 伸缩振动的特征; 1250~950  $\text{cm}^{-1}$  之间存在吸收峰, 提示糖链构型为吡喃型<sup>[10,11]</sup>。

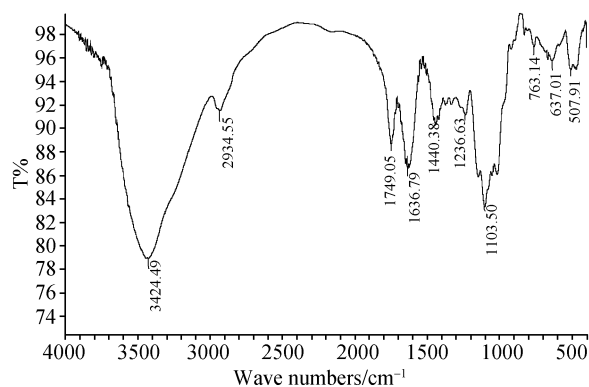


图 3 PSPV 的红外光谱图  
Fig. 3 The IR spectrum of PSPV

### 2.3 PSPV 的分离纯化及分子量测定结果

以 6 月中旬采集的薯蓣为原料得到的 PSPV, 经分离纯化得到一个级分 PSPV I。图 4 为洗脱峰示意图, 经洗脱可从 PSPV 中得到 25.3% 的 PSPV I。分子量测定结果见表 4。由回归方程  $V_e/V_0$

$=-1.0413\lg M_w+7.10149(r=0.9967)$ , 计算得 PSPV I 的分子量为  $6.278 \times 10^4$ 。经冷冻干燥后的 PSPV I 为灰白色粉末。

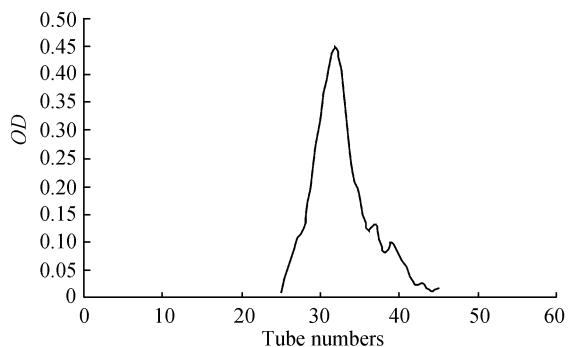


图4 PSPV DEAE-纤维素柱层析洗脱峰示意图  
Fig. 4 Purification profile of PSPV on DEAE-Cellulose

表4 不同分子量的标准多糖及样品洗脱体积与分子量  
Table 4  $V_e$  and molecular weight of T-dextran series and samples

Samples	$V_e$ /mL	$V_e/V_0$	$\lg M_w$	$M_w (\times 10^4)$
Blue Dextran	18		76.3	>200
Dextran T500	21	1.17	5.70	20
Dextran T200	26	1.44	5.30	20
Dextran T150	30	1.66	5.18	15
Dextran T100	35	1.94	5.00	10
Dextran T40	41	2.30	4.60	4
PSPV I	38	2.11	4.79	6.278
PSPV II	42	2.33	4.57	3.801
PSPV III	50	2.78	4.15	1.418

以 10 月中下旬采集的薯蓣为原料得到的 PSPV, 经分离纯化得到 2 个级份, 分别命名为 PSPV II 和 PSPV III, 图 5 为其洗脱峰示意图, 经洗脱可得到 19.5% 的 PSPV II 和 23.7% 的 PSPV III。PSPV II 和 PSPV III 的分子量分别为  $3.801 \times 10^4$  和  $1.418 \times 10^4$ 。经冷冻干燥后的 PSPV II 和 PSPV III 分别为灰白色粉末和浅黄色粉末。

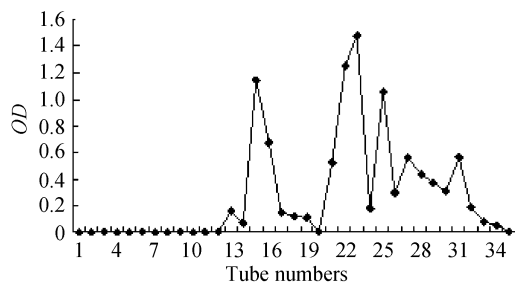


图5 PSPV DEAE-纤维素柱层析洗脱峰示意图(II)  
Fig. 5 Purification profile of PSPV on DEAE-Cellulose (II)

## 2.4 单糖组成研究结果

各标准单糖及多糖水解衍生物的保留时间见表 5。对比分析说明, PSPV I 由木糖、甘露糖、葡萄糖, PSPV II 由甘露糖和半乳糖, PSPV III 由葡萄糖、木糖和鼠李糖构成。实验结果表明, 不同季节采收的薯蓣, 其多糖组成及性质上存在较大差异。

表5 标准单糖及多糖水解衍生物的保留时间  
Table 5 Retention time of standard monosaccharide and polysaccharide derivatives (min)

Component	Standard monosaccharide	PSPV I	PSPV II	PSPV III
Xylose	2.94	2.90		2.86
Rhamnose	4.65			4.62
Mannose	6.42	6.40	6.38	
Galactan	6.99		6.96	
Glucose	7.52	7.51		7.56

## 3 结论与展望

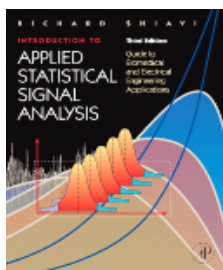
采用中试设备提取出薯蓣中的多糖, 制备出纯度为 93.5%, 几乎不含核酸及蛋白质的 PSPV, PSPV 具有典型的多糖特征吸收峰。由于薯蓣中含有各种氨基酸, 且热水浸提产生美拉德反应, 导致从中试设备提取出的多糖呈现酱褐色。利用在一定的温度和压力下, 活性炭表面可以自动地吸附那些能降低其表面能的物质, 可进行多糖的脱色。但活性炭在吸附色素的过程中也吸附多糖, 会对多糖得率产生影响。故本实验采用加权平均法, 以脱色率和含糖率为指标进行综合评定, 得到了优化的脱色工艺。经 DEAE-纤维素柱分离, 通过控制洗脱液不同离子强度可以较好地对 PSPV 进行组分分离。研究表明, 薯蓣多糖组成会因季节而变, 收获季节较晚的薯蓣, 其多糖组成趋于复杂。生产中, 南方甘薯往往于 10 月中下旬集中收获, 这时可产生大量的薯蓣, 是收购原料的最佳时期。提早刈割可能会影响正常生产。由于多糖的组成、结构和其生物活性密切相关, 故进一步研究薯蓣多糖生物活性与生产季节、甘薯品种、产地等的关系, 对资源的有效开发利用具有指导意义。

致谢 感谢江西省农科院在实验材料采集工作中提供的帮助!

## REFERENCES

- [1] Trommer H, Neubert RH. The examination of polysaccharides as potential anti-oxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International J of Pharmaceutics*, 2005, **298**: 153–163.
- [2] Ho CY, Lo TW, Leung KN, *et al.*. The immunostimulating activities of anti-tumor polysaccharide from K1 capsular polysaccharide antigen isolated from *Klebsiella pneumoniae*. *Immunopharmacology*, 2000, **46**: 1–13.
- [3] Huang ZX, Mei XT, Xu DH, Xu SB, Lü JY. Protection on the blood vessel of alloxan-induced diabetic mice of polysaccharides from *Spirulina* and *Sargassum thunbergii* Kuntze. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, **30**(3): 211–215.
- [4] 黄智璇, 梅雪婷, 许东晖, 许实波, 吕军仪. 螺旋藻多糖和鼠尾藻多糖对四氧嘧啶致糖尿病大鼠血管的保护作用. *中国中药杂志*, 2005, **30**(3): 211–215.
- [5] Alarcon-Aguilar FJ, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, *et al.*. Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *J of Ethnopharmacology*, 2000, **72**: 21–27.
- [6] Food and Agriculture Organization. Production year book 2000, vol. 54. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2002.
- [7] Villareal RL, Ison SCS, Lin SK, *et al.* Use of sweet potato leaf tips as vegetable. II. evaluation of yield and nutritive quality. *Br Poultry Sci*, 1979, **15**: 117–122.
- [8] Zhang WJ. *Biochemical Research Technology of Complex Carbohydrate*, 2nd ed. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999.
- [9] 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, 1999.
- [10] Kiho T, Sakusha M, Wang S, *et al.* Polysaccharides in fungi two branched (1→3) $\beta$ -D-glucans from hot water extract of *Yu er*. *Chem Pharm Bull*, 1991, **39**(3): 798–800.
- [11] Anatk, S, Surits B. Determination of the concentration of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol sulfuric acid method. *Carbohydr Res*, 1994, **254**: 157–167.
- [12] Meng QY, Liu ZH, Xu MY, *et al.* Extraction and analysis of *Sargassum hemiphyllum* polysaccharides. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, **24**(12): 1560–1562.
- [13] 孟庆勇, 刘志辉, 徐美奕, 东野广智. 半叶马尾藻多糖的提取和分析, 2004, **24**(12): 1560–1562.
- [14] Li CL, Yu GL, Zhao X, Wang Y, Li GQ, Xu ZP. Extraction and characterization of several polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chinese J of Biochemical Pharmaceutical*, 2004, **25**(1): 20–22.
- [15] 李春林, 于广利, 赵峡, 王莹, 李国强, 徐泽平. 灰树花菌丝体中几种多糖的分离及结构表征. *中国生化药物杂志*, 2004, **25**(1): 20–22.

## 爱思唯尔生物医学工程专业图书推荐



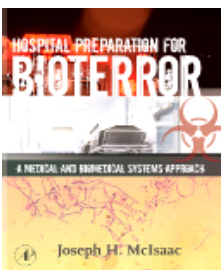
ISBN: 0120885816  
 ISBN-13: 9780120885817  
 Publication Date: 12/14/2006

**Introduction to Applied Statistical Signal Analysis**  
 Guide to Biomedical and Electrical Engineering Applications, 3<sup>rd</sup> Edition  
 By Shiavi

**Product Type:** Hardcover  
**Price:** \$93.95

**Subject Area:** Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

The third edition of *Introduction to Applied Statistical Signal Analysis* begins with a discussion of techniques for modeling and represents discrete data measurements, interpolation, and a definition of time series. Building from basic principles to illustrate complex application, this book provides a practical introduction to signal analysis techniques that are commonly used in a broad range of engineering areas including speech, biomedical signals, communications, and pattern recognition. The presentation style is designed for the upper level undergraduate or graduate student who needs a theoretical introduction to the basic principles of statistical modeling and the knowledge to implement them practically.



ISBN: 0120884402  
 ISBN-13: 9780120884407  
 Publication Date: 10/09/2006

**Hospital Preparation for Bioterror**  
 A Medical and Biomedical Systems Approach  
 By McIsaac

**Product Type:** Softcover  
**Price:** \$104.00

**Subject Area:** Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

*Hospital Preparation for Bioterror* provides an extremely timely guide to improving the readiness of hospitals or healthcare organizations to manage mass casualties as a result of bioterrorism, biological warfare, and natural disasters. Contributions from leading law enforcement agencies, hospital administrators, clinical engineers, surgeons and terror-prevention professionals provide the most comprehensive, well-rounded source for this valuable information. Chapters on logistics and protecting the infrastructure help personnel distinguish the specific risks and vulnerabilities of each unique institution and assists in identifying specific solutions for disaster and bioterrorism preparedness.

以上为爱思唯尔经典生物医学工程图书信息, 如果您对您的研究工作有所帮助, 请向所在图书馆推荐。谢谢!