

文章编号:1674-2869(2008)04-0036-03

乙酰化莼菜多糖中单糖组分的 GC-MS 分析

张平,俞智熙

(武汉工程大学分析测试中心,武汉 430074)

摘要:采用乙醇沉淀法从莼菜中提取多种多糖化合物,多糖化合物经水解,乙酰化后利用气相色谱-质谱法分析,确定了莼菜单糖的组成。研究表明,该方法是一种高效分离和高灵敏度检测鉴定莼菜多糖组分中单糖结构的定性定量方法。

关键词:莼菜;多糖;单糖;乙酰化;气相色谱-质谱

中图分类号:O658 **文献标识码:**A

0 引言

莼菜(*Brasenia schreber* J. F. Gmel)系睡莲科植物^[1],莼菜鲜样含水量高达97.5%,总糖含量为0.86%,其中主要是莼菜多糖,存在于莼菜茎叶上的透明黏液质中。

研究表明,从各种动植物中提取的多糖具有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、抗菌消炎和促进免疫等方面的生物功能^[2-4]。一些多糖已经制成药剂,用于临床治疗和保健。无论是多糖产品的开发,还是多糖生物功能的研究,都要求对多糖中单糖的组成进行分析。由于多糖的结构相当复杂,国内外研究者在多糖的分离提取纯化和结构分析方面已经做了不少工作,为了进一步开发和利用莼菜多糖资源,我们进行了深入的研究。由于单糖存在于植物果实中且结构复杂,进行分离纯化以及纯度鉴别较困难,因而必须寻求一种高效分离和高灵敏度检测鉴定多糖组分中单糖结构的气相色谱-质谱分析方法。由于糖类本身没有足够的挥发性,因此进行气相色谱分析时,必须先将其转化成易挥发,对热较稳定的衍生物。通常用的衍生化方法是硅烷化或乙酰化。由于硅烷化会产生衍生物的异构体,在色谱图上出现多峰,给定性和定量带来困难。如果采用先将糖还原为糖醇,再衍生为乙酸酯的方法,就可避免衍生物异构体的产生,进行色谱分析时,每种单糖都可以得到单峰,该法具有定性简单、可靠和定量准确的优点。

1 实验部分

1.1 样品、试剂与仪器

莼菜购于湖北省利川市清源(野生)蔬菜加工

厂,经湖北民族学院中药研究所监制,所有化学试剂均为分析纯。

Nicolet impact 420 付立叶变换红外光谱仪(美国尼高力公司);Finnigan Trace GC-MS 气相色谱-质谱联用仪(美国热电菲尼根质谱公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖化合物的提取及纯化方法 称取500 g洗净晒干的莼菜,经过研磨后加入1:1的乙醇-乙醚混合液,65℃水浴回流3 h去脂,残渣中加水,90~100℃水浴提取3~5 h,更换清水反复提取2~3次,合并深绿色多糖提取液,过滤,浓缩。向提取液中加入4倍体积的乙醇、离心分离,沉淀即为混合多糖粗品。用Sevag法除去多糖粗品中的蛋白质,II₂O₂除去色素,浓缩,冻干,即得多糖纯品。

1.2.2 多糖的水解 取多糖样品15 mg于安瓶中加入4 mol/L三氟乙酸4 mL,密封后在120℃恒温水解5 h,用N₂吹干三氟乙酸,加甲醇并吹干;

1.2.3 单糖的还原 水解产物加入0.5 mL、0.05 mol/L KOH溶液,再加入10 mgKBH₄,室温下反应6~8 h,加少许乙酸分解过量KBH₄,至无气泡产生为止。蒸干反应液,以酸性甲醇洗涤反应产物,蒸干甲醇液,重复3~4次以除去硼酸根,最后加入甲醇蒸干并于烘箱中105℃除净水份。

1.2.4 乙酰化衍生物 取水解得的单糖5 mg,加入0.5 mL吡啶、1 mL乙酸酐,加热2 h,冷却后加入甲苯2 mL,用N₂吹干,加入三氯甲烷,蒸馏水洗涤,用N₂吹干得到棕黄色的产物。此乙酰化的单糖醇用三氯甲烷稀释后进行气相色谱-质谱分析。

1.3 GC-MS分析条件

DB1色谱柱(美国安捷伦公司),(30 m×

收稿日期:2007-07-03

作者简介:张平(1962-),男,江西湖口人,高级工程师,研究方向:仪器分析实验和分析方法。

0.25 mm i. d, 0.25 μ m); EI 源, 电子能量 70 eV, 分子量扫描范围 35 ~ 550 amu, 进样口温度 220 $^{\circ}$ C, 接口温度 220 $^{\circ}$ C, 载气氮气 0.4 MPa; 分流比 25 : 1, 程序升温 60 $^{\circ}$ C $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280 $^{\circ}$ C (3 min).

2 结果讨论

2.1 蔬菜提取物中多糖的鉴定分析

Molisch 实验: 硫酸和多糖溶液分为两层, 层

与层之间有紫色环出现, 说明提取物确含有糖. 混合多糖纯品的 FI-IR 谱图如图 1 所示, 谱图中多处可见到多糖的特征峰. 如: 3 315 cm^{-1} , 2 933 cm^{-1} 的吸收峰分别为 O—H, C—H 的伸缩振动峰, 1 122 cm^{-1} , 1 084 cm^{-1} 处的吸收峰是多糖中 C—O, C—O—C 的伸缩振动和 C—OH 的弯曲振动特征峰. 在 1 000 ~ 700 cm^{-1} 的吸收峰则是 α -和 β -吡喃单糖形成的特征.

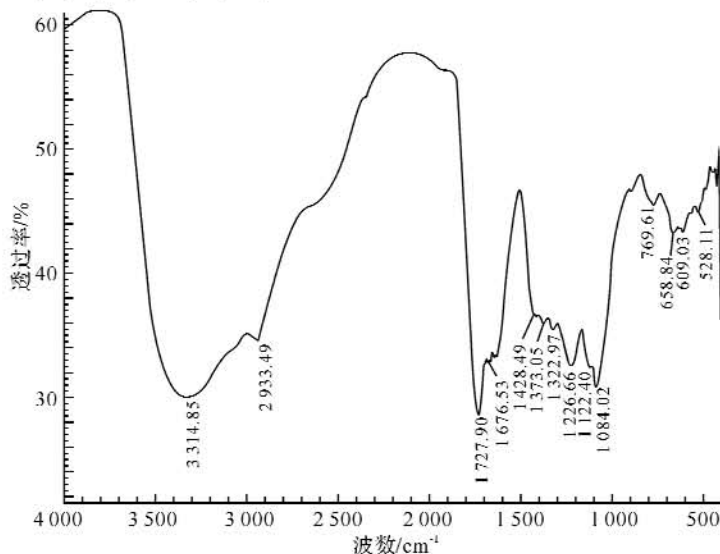


图 1 蔬菜多糖的 IR 光谱图

Fig. 1 Fourier transform infrared spectrogram of polysaccharide

2.2 乙酰化多糖中单糖组分的 GC-MS 分析

总离子流图如图 2 所示, 其质谱解析结果列于表 1, 经碎片分析并利用标准质谱 NIST 库进行检索, 图 2 中 14 个色谱峰被确认为单糖的乙酰化衍生物, 从表 1 中的峰面积百分比数据可以看出,

α -D-吡喃葡萄糖, β -D-吡喃甘露糖, L-鼠李糖、山梨糖、D-阿拉伯糖、D-吡喃半乳糖, 在该混合多糖中所占的比例较大, 是蔬菜多糖的主要成分, 与相关报道蔬菜多糖的化学结构基本一致^[6~7].

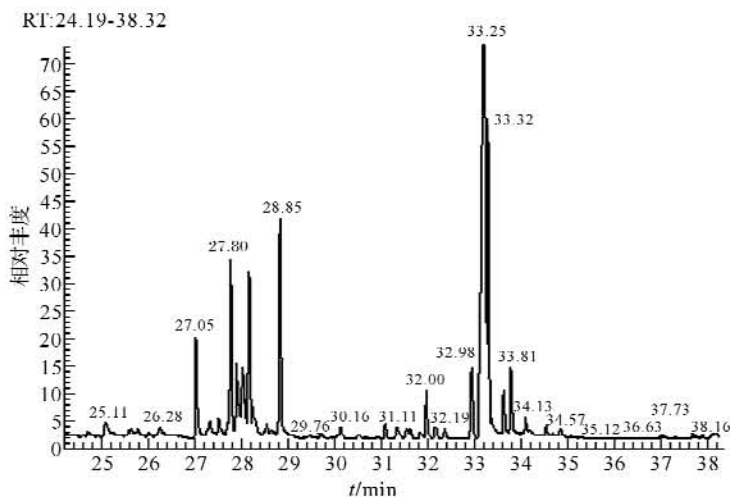


图 2 混合多糖乙酰化衍生物的总离子流色谱图

Fig. 2 Gas chromatography-mass spectrometric (GC-MS) total ion current profile of the acetylation of fractions

表 1 多种多糖的乙酰化衍生物气相色谱-质谱分析结果

Table 1 Gas chromatography-mass spectrometric (GC-MS) analysis results from acetylation of fractions

保留时间 <i>t</i> /min	分子式	相对分子量	单糖衍生物 Derivatives of Monosaccharide	峰面积百分比/%
27.80	C ₁₄ H ₂₀ O ₉	332	四乙酰化 β-L-鼠李糖 Tetraacetyl β-1-rhamnose	7.69
27.93	C ₁₄ H ₂₀ O ₉	332	2,3,4-三-O-乙酰化-六-脱氧-α-D-吡喃葡萄糖 Acetyl, 2,3,4-tri-o-acetyl-6-deoxy-α-D-glucopyranoside	2.48
28.18	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₁	390	五 O 乙酰化山梨糖 Sorbose, Penta O actyl	6.96
28.28	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	318	四乙酰化来苏糖 Lyxopyranose tetraacetate	3.25
30.16	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	362	1,2,3,4,5-五-O-乙酰化-D-木糖醇 1,2,3,4,5-penta-O-acetyl-D-xyliol	0.35
32.00	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	318	1,2,3,5-四乙酰化-β-吡喃核糖 1,2,3,5-Tetraacetyl-β-ribofuranose	1.23
32.98	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	318	2,3,4,5-四乙酰化 D-阿拉伯糖 D-Arabinose 2,3,4,5-tetraacetate	2.25
33.25	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390	五乙酰化 α-D-吡喃葡萄糖 α-D-Glucopyranose, Pentaacetate	15.59
33.33	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390	五乙酰化-β-D-吡喃甘露糖 β-d-Mannopyranose, Pentaacetate	9.87
33.65	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390	五乙酰化 D-吡喃葡萄糖 D-Glucofuranose, Pentaacetate	1.42
33.82	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390	五乙酰化 D 吡喃半乳糖 D Galactofuranose, Pentaacetate	2.68
34.12	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390	五乙酰化甘露糖 Mannose Pentaacetate	0.50
34.41	C ₁₄ H ₂₀ O ₁₀	420	1,2,4,6-四乙酰化-D-葡萄糖 1,2,4,6-Tetraacetyl-d-glucose	
34.57	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₂	434	六乙酰化艾杜糖 Iditol hexaacetate	0.334

3 结 语

a. 莼菜多糖的提取采用的是乙醇沉淀法,利用多糖不溶于乙醇,则可得到多糖粗产品。

b. 莼菜多糖粗品的纯化,是用 Scvag 法除去多糖粗品中的蛋白质,双氧水法除去色素,浓缩,冻干,即得多糖纯品。

c. 通过对莼菜中多糖中的单糖组分分析可知其主要成份为 β D 吡喃甘露糖,α D 吡喃葡萄糖,山梨糖,来苏糖,D-阿拉伯糖,β 吡喃核糖,β-L-鼠李糖,D-吡喃半乳糖等,与相关报道莼菜多糖的化学结构基本一致。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册). 上海:上海科技

出版社,1991:1816.

- [2] Nobuyuki Y. Tetsuro Y. NcoPlasm inhibitors from *Brasenia schreberi*;JP,7818714 [P].1990-06-12.
- [3] 王 琪. 含莼菜具有抗菌消炎作用的糖果[J]. 国外医药:植物药分册.1992,7(4):191.
- [4] 江德武. 以莼菜浸膏为活性成分的抗菌药[J]. 国外医药:植物药分册.1992,7(3):139.
- [5] 石川五月. 莼菜的成分研究[J]. 京都女子大学食物学会志,1961,(10):48.
- [6] 王淑如,夏尔宁,周 岚. 莼菜多糖的提取分离及某些生物活性的研究[J]. 中国药科大学学报.1987,18(3):187.
- [7] Misaki A, Smith F. Structure of the polysaccharide of the Japanese water plant, *Brasenia Schveberi*[J]. J F Gmal Agr Food chem,1962,10(2):104.

Analysis of the acetylation elements of monosaccharide in *Brasenia schreberi*'s polysaccharide

ZHANG Ping, YU Zhi-xi

(Analysis and Testing Center, Wuhan Insitute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The method of alcohol classification sedimentation is used to extract many polysaccharide compound from *brasenia schreberi* and determination of monosaccharides in polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. What elements of the monosaccharides in *brasenia schreberi* are made clear. The real sample tests showed this method can be used for the sensitive and accurate determination of structure,extraction,isolation of *Brasenia schreberi*.

Key words: *brasenia schreberi*; polysaccharide; monosaccharide; acetylation; gas chromatography mass spectrometry

本文编辑:张 瑞