

经过分级纯化的多糖在测定结构前须检查其纯度及测定分子量。

检查纯度最常用的判断方法：

(1) 用 G C 、HPLC 测定组成多糖的单糖的摩尔比是否恒定。

用不同的柱型测定结果更为可靠。

(2) 电泳只出现一条带。

如可用聚丙烯酰胺凝胶电泳、醋酸纤维素薄膜电泳及玻璃纤维纸电泳。对于中性多糖可采用高压电泳，以硼酸盐为缓冲液，可增大其迁移速度。

(3) 凝胶柱层析图呈现对称的单峰。若有“拖尾”现象，说明其均一性不够好。

阴离子交换层析纯化

用 DEAE 一纤维素 52(2.6x100cm) 柱层析, 0.1mol/LNaCl 洗脱, 流速 6ml/h, 按 2ml 一管分部收集, 苯酚一硫酸法逐管检测, 绘制收集体积与糖含量之间的关系曲线。看是否有单一对称峰。

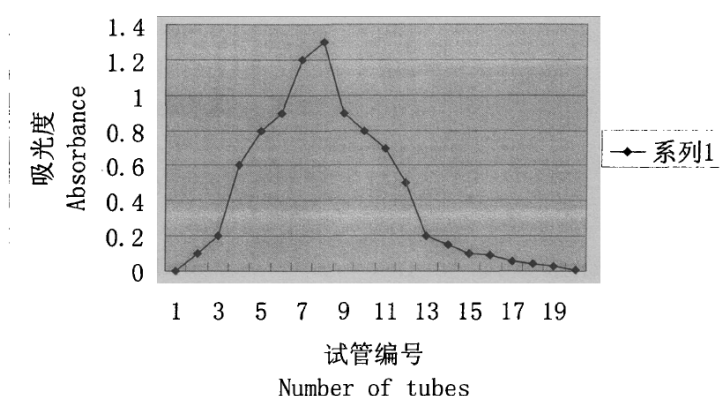


图2 多糖 PW2 柱色谱图

按照 Ye 等报道, 采用 DEAE 一 52 一纤维素交换柱层析法(2.6x30cm)对鲍氏层孔菌菌丝体粗多糖进行初步分离。DEAE 一纤维素凝胶预处理:称取 DEAE 一 52 一纤维素凝胶干粉,加入约 10 倍体积质量比(ml/g)的 0.5mol/LNaOH 溶液浸泡 30 分钟, 倒出上清液, 用大量去离子水反复浸洗至 pH 值近中性;再用相同体积的 0.5mol/LHCl 溶液浸泡 30 分钟, 倒出上清液, 用大量去离子水反复浸洗至 pH 值近中性;最后用相同体积的 0.5mol/LNaOH 溶液再浸泡 30 分钟, 用大量去离子水反复浸洗至 pH 值中性。处理完毕后, 进行湿法装柱, 用去离子水 0.5mol/LNaCl 溶液, 去离子水依次分别平衡(流速 1.0ml/min)2 一 3 个柱体积备用。

糖样 100mg 溶于 5ml 的去离子水中, 离心除去不溶物, 上样于 DEAE 一 52 一纤维素阴离子层析柱(2.6x30cm, Cl⁻型), 分别采用去离子水 0.1 和 0.3mol/LNaCl 溶液进行分段梯度洗脱, 流速 1.0ml/min, 自动收集器分部收集(10ml/管), 每梯度 20 管。用硫酸一苯酚法跟踪检测各管多糖含量(490nm 处吸收值), 以收集的管数为横坐标。吸光值(490nm)为纵坐标绘制 DEAE 一 52 一纤维素色谱柱洗脱曲线。依据洗脱峰型, 合并相同组分, 50℃旋转蒸发浓缩, 对去离子水透析 48h 以去除 NaCl 及小分子杂质, 最后将透析内液冷冻干燥, 得初步纯化产品。

初步纯化多糖得率计算公式:

多糖得率(%)=纯化多糖质量/粗多糖质量 x100%

葡聚糖凝胶层析纯化

采用 Sephadex G-100 凝胶层析法对 DEAE-52 一纤维素初步纯化的不同组分的多糖样品进一步纯化。葡聚糖凝胶(sephadexG 一 100)的预处理:称取 sephadexG 一 100 凝胶干粉, 加入 30 倍体积质量比(ml/g)的去离子水, 沸水浴 5 小时使其溶胀。冷却后用去离子水反复浸洗, 减压脱气后进行湿法装柱, 用 0.1MNa₂SO₄溶液平衡(流速 0.25ml/min)2 一 3 个柱体积备用。

分别称取经 DEAE 一纤维素一 52 初步纯化的各多糖组分样品 20mg, 溶于 2 ml 0.1 M Na_2SO_4 溶液中, 上样于 SephadexG 一 100 层析柱 (2.6x60cm) 用 0.1M Na_2SO_4 溶液洗脱, 流速 0.25 ml/min, 分步收集 (5ml/管)。

用硫酸一苯酚法跟踪检测各管多糖含量 (490nm 处吸收值), 以收集的管数为横坐标。吸光值 (490nm) 为纵坐标绘制 sePhadexG 一 100 色谱柱洗脱曲线。依据洗脱峰型, 合并相同组分, 50°C 旋转蒸发浓缩, 对去离子水透析 48h 以去除 Na_2SO_4 ; 及小分子杂质, 最后将透析内液冷冻干燥, 得不同纯化产品。

纯化多糖得率计算公式:

纯化多糖得率 (%) = 纯化多糖质量 / 粗多糖质量 $\times 100\%$

(鲍氏层孔菌菌丝体粗多糖)

(4) 纸层析法呈单一集中斑点。

取 0.5% 的多糖样品溶液 50ul, 点样于新华中速滤纸 (3cmx20cm) 距端点 1cm 处的中部, 以正丁醇: 浓氨水: 水 (40:50:5) 为展开剂, 饱和 2 小时以上, 在室温下展开 6h, 取出吹干, 用 0.5% 甲苯胺蓝液染色, 立即用 95% 乙醇漂洗至背景褪色, 看是否只有一个清晰的斑点。

(5) 琼脂糖 (Agarose) 凝胶电泳法

在琼脂糖板 (厚度为 0.2cm) 上点样 3 — 5ul 采用浓度为 0.075mol/L, pH8.6 的巴比妥缓冲液, 电泳 1—1.5h, 电压为 64 — 80V, 甲苯胺蓝 (浓度为 1%) 染色, 醋酸乙醇混合溶液 (醋酸: 乙醇: 水 = 0.1:5:5) 脱色。多糖纯品经电泳展开后, 看是否呈现单一斑点, 斑点是否清晰。

(6) 紫外分光光度法

将多糖 PWZ 加 0.9% NaCl 溶液溶解, 配成浓度为 1mg/ml 的溶液, 采用 UV — 160A 紫外可见光谱仪扫描 (200nm — 300nm) 观察 260nm、280nm 处是否有吸收峰。

多糖的分子量测定:

过去用超速离心沉降法、光散射法、渗透压法、粘度法等, 这些方法操作复杂且误差较大, 现已少用。现在较常用的方法有凝胶过滤法和高效凝胶液相色谱法, 这两种方法须先用已知分子量的标准多糖对照测定样品的分子量。

一般来说, 多糖结构分析包括以下几点:

(1) 单糖组成分析: 研究确定单糖的种类及摩尔比;

完全酸水解后用高效液相色谱方法 (HPLC) 或气相色谱方法测定。

(2) 糖苷键类型: 研究确定糖苷键及支链点连接位置;

甲基化分析方法

高碘酸氧化法与 Smith 降解法

(3) 糖环大小: 研究确定糖苷键为呋喃糖或吡喃糖;

红外光谱

(4) 异头碳构型: 研究确定糖苷残基的 α -或 β -构型;

2D NMR. (Two dimensional Nuclear Magnetic Resonance) 光谱分析方法测

(5) 确定单糖残基和重复单元的序列

甲基化分析方法与磁共振光谱分析方法结合分析, 一般会参考多糖的单糖组成及摩尔比信息以利于解析多糖结构。

高碘酸氧化法

薄层层析 (TLC) —— 定性,

气相色谱法

(6) 取代基团位点: 研究 OH-修饰基团的种类和取代位点, 如 O-磷酸化, 乙酰基取代, O-

硫酸化等；

比色分析方法

(7) 多糖分子量分布的研究。

紫外光谱

定性与定量方法

薄层层析：残基定性

气相色谱：残基定量

气质联用：残基定量

高效阴离子色谱法：残基定量

鉴定结构常用物理化学方法：

高效液相色谱：确定单糖组分和相对分子量

红外光谱分析：测定多糖的官能团，不仅可以检测酮糖、醇糖的呋喃糖环或吡喃糖环的构象和糖苷键的构型

核磁共振： α -构型与 β -构型残基的比例；判断异头碳构型；推断主链和支链连接键型

鉴定结构复合方法：

甲基化分析：推断出多糖样品中糖基的连接方式及各种连接键型的比例

高碘酸氧化法与 Smith 降解法：判断糖苷键的位置、直链多糖的聚合度及支链多糖的分支数目

糖苷乙酸酯衍生物的气相色谱法：单糖组成和摩尔比

各种多糖化学结构鉴定方法的具体实施方案

1、酸水解

(1) 完全酸水解

称取 20mg 样品，加入 2mL $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 于安培管中沸水浴水解 8h，水解液用 BaCO_3 中和至 pH =7，离心，取上清液置冰箱冷藏备测。（阿魏侧耳子实体多糖分离纯化及其化学结构的初步研究）

(2) 部分酸水解

称取糖样 70mg，80℃ 条件下，0.05M 三氟乙酸水解 2h。降至室温后，离心（4000r/min，10min），将沉淀干燥，留做 GC 分析。上清用无水乙醇除酸至中性（pH 为 6-7），蒸馏水透析 48h；将袋外透析液浓缩，真空干燥，留做 GC 分析；袋内液浓缩至 5ml 左右，加 10 倍体积无水乙醇，醇沉过夜，离心（4000r/min，10min），沉淀常规干燥，作 GC 分析；上清浓缩，真空干燥，留做 GC 分析。

2、高效液相色谱

确定样品的单糖组成

色谱条件为：

色谱柱为 Shodex KS804 Sugar (300mm \times 7.8mm)

柱温 40 度

流动相为水

流速 $0.8\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$

检测用 410R I 示差检测器，数据处理用 810GPC 软件进行。

同时用鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、木糖、果糖、葡萄糖、岩藻糖 8 种单糖进

行对照, 根据峰值确定样品的单糖组成。

分子量的测定以标准分子量的葡聚糖 Pulluan 作分子量测定标准。让其通过**高压液相色谱柱**, 条件同上, 先以分子量对数与对应的保留时间作标准曲线, 从标准葡聚糖 Pulluan 的工作曲线上可以求得该成分分子量。

例如: (阿魏侧耳子实体多糖分离纯化及其化学结构的初步研究)

将水解后的多糖样品 PW2 进行 HPLC 分析, 结果如表所示:阿魏侧耳子实体多糖 PW2 经过酸水解后, 得到 2 种单糖:葡萄糖和半乳糖, 摩尔比例 1.77:1。

例如:

经 HPLC 测定后对照标准曲线得多糖 PW2 的分子量为 3.18×10^4 。(阿魏侧耳子实体多糖分离纯化及其化学结构的初步研究)

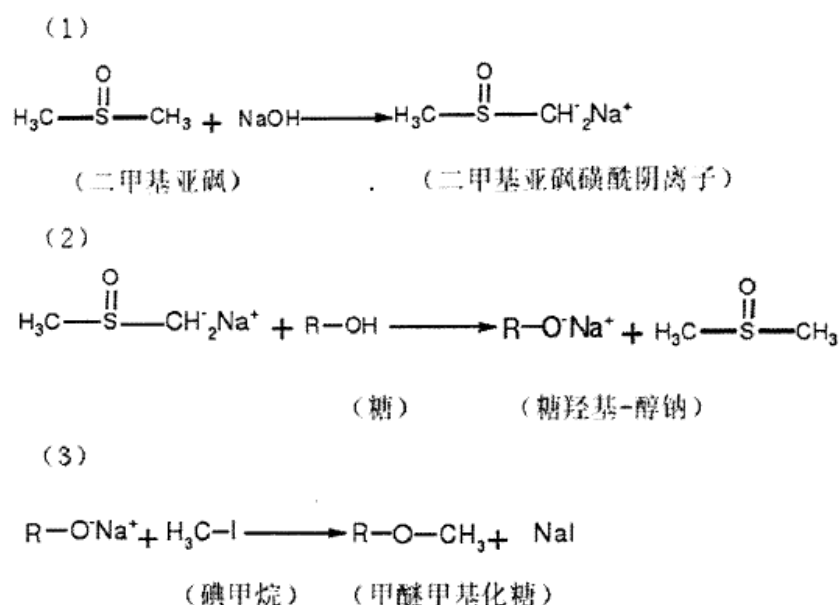
4、甲基化分析

(1)基本原理

先将多糖中各种单糖残基中的游离羟基全部甲基化, 然后将多糖中的糖苷键进行完全酸水解, 水解后得到的化合物, 其羟基所在的位置, 即为原来单糖残基的连接点。同时根据不同甲基化单糖的比例, 可以推测出此种连接键型在多糖重复结构中所占的比例。

用此种方法得到的羟基及 NaBH_4 还原醛基后产生的羟基, 经乙酰化可得到甲基化的糖醇乙酸酯(此产物易挥发, 可进行 GC 分析), 再经 GC 与 GC-MS 分析, 通过气相色谱的出峰顺序和对质谱谱图的主要离子碎片的分析便可以较准确地确定糖的连接键型。

反应通式如下:



(2)甲基化反应

取充分干燥的多糖样品 10 mg, 溶解在 2.0 ml 的二甲基亚砜 (DMSO) 中。在 N_2 保护下快速加入干燥的 NaOH 粉 50 mg, 用 N_2 排出空气, 加盖密封, 室温反应 1.0 h 并间歇振荡。在 N_2 保护下缓慢滴加碘甲烷 1.0 ml, 用 N_2 排出空气, 加盖密封, 室温继续反应 1.0 h 并间歇振荡, 反应完成后加 0.5 ml 水终止反应。反应液先用自来水流水透析 48 h, 再用蒸馏水透析 24 h, 透析液冷冻干燥得第一次甲基化样品。第一次甲基化样品继续甲基化, 反应步骤同上, 得第二次甲基化样品。如此重复甲基化三次。甲基化后的样品用红外光谱检测, 3700

cm^{-1} — 3100 cm^{-1} ，附近无羟基的特征吸收峰，表明甲基化反应完全。

(3) 甲基化样品的衍生化

上述完全甲基化多糖样品加入 2 mol/l 的三氟乙酸(TFA) 3.0 ml ， 120°C 密闭水解 2.0 h 。冷却后 50°C 减压蒸发干，加 2.0 ml 甲醇再蒸发干，重复三次，最后蒸发干得完全甲基化多糖的水解产物。加蒸馏水 2.0 ml 使其溶解，再加硼氢化钠 25 mg ，振荡后室温还原反应 2.0 h 。反应完后滴加 0.1 mol/l 醋酸分解过量的硼氢化钠并调 pH 值至 $5.5\sim 7.0$ 弱酸性。反应液 50°C 减压蒸发蒸干，加 2.0 ml 甲醇再蒸干，重复三次，最后蒸发干。

上述蒸发干样品加入 1.0 ml 醋酸酐和 1.0 ml 吡啶，封管后在沸水浴中反应 1.0 h 。反应液 50°C 减压蒸发干，加 2.0 ml 甲醇再蒸发干，重复三次，最后蒸发干。加入丙酮 1.0 ml ，用 $0.45\mu\text{l}$ 尼龙微孔滤膜过滤，取样进行 GC/MS 分析。

(4) 衍生化样品的 GC/MS 分析

多糖样品经甲基化、水解、还原、乙酰化后得到甲基化糖醇乙酸酯，进行 GC/MS 联机分析，根据文献的相对保留时间和不同单糖的主要离子碎片(m/e)，推断出多糖样品中糖基的连接方式及各种连接键型的比例。

本实验采用的条件为:GC (Varian CP3800 型)和 MS (Varian Saturn 2200 型)气相—质谱联用仪, DB-5MS 石英毛细管柱($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\mu\text{m}$);程序升温, 初温 80°C , 保持 1 min , 以 $8^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 210°C , 保持 1 min , 再以 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 260°C , 保持 1 min ; 氮气作载气, 进样口温度 250°C , 分流比 $1:50$, 柱流速 1.0 ml/min ; 电子电离源(EI 源) 70 eV , 倍增器电压 350 V , 灯丝电流 $250\mu\text{A}$, 接口温度 260°C , 离子源温度 180°C , 质荷比(m/z)扫描范围 $30\sim 450$, 扫描速率 2.5 scan/sec 。(胞式层孔菌菌丝体多糖分离纯化、结构鉴定及其生物活性研究)

流程图如下: (MAEP-2a-2b 是安络小皮伞菌丝体多糖的某个过程中第某个样品)

NaOH-DMSO 混悬液制备

NaOH 1g

- ↓ 加 1mL 水溶解
- ↓ 加 1mL 脱水 DMSO (分子筛 240℃烘 3h, 加 DMSO 密封过夜)
- ↓ 搅拌, 离心, 重复此操作 10-15 次
- ↓ 沉淀加 1mL 脱水 DMSO, 充氮气密封搅拌过夜

NaOH-DMSO 混悬液

甲基化

MAEP-2b-2a 样品 20mg

- ↓ 真空干燥 24h, 加脱水 DMSO 0.5mL, 充氮气密封搅拌过夜
- ↓ 加 0.5mL NaOH-DMSO 混悬液, 充氮气密封搅拌 6h
- ↓ 加 0.3mL 碘甲烷, 充氮气搅拌密封 10h
- ↓ 搅拌下室温吹尽剩余的碘甲烷, 加 2mL 水终止反应
- ↓ 加 3mL 氯仿, 搅拌离心, 弃去水层
- ↓ 氯仿层用水洗脱 2 次, 吹干氯仿层

甲基化产物

水解还原乙酰化

甲基化样品

- ↓ 加 2mol/L 三氟乙酸 1ml, 密封,
- ↓ 置 121℃ 水解 1.5 小时, 吹干
- ↓ 加 1mol/L 氨水 0.5ml, 硼氢化钠 20mg
- ↓ 室温反应 1.5 小时, 吹干
- ↓ 残渣加 10% 醋酸甲醇溶液 1ml, 吹干
- ↓ 加 0.5ml 吡啶, 1ml 醋酸酐密封
- ↓ 置 121℃ 烘箱中 3 小时, 吹干
- ↓ 残渣加 3ml 水溶解, 加 1ml 氯仿萃取
- ↓ 氯仿层吹干

部分甲基化部分乙酰化糖醇衍生物

部分甲基化部分乙酰化糖醇衍生物的 GC-MS 分析

由 2.3 过程得到的衍生物加入 0.2 ml 丙酮溶解, 进行 GC-MS 分析。

色谱条件:

色谱柱: DB-1 石英毛细管柱 (30m×0.32mm);

进样口温度: 250℃;

柱温: 120℃;

升温程序: 120℃保持 5min, 5℃/min 升温到 220℃;

进样量: 0.2μl。

例如: 经过甲基化反应的 MAEP-2b-2a 通过 GC-MS 分析, 结合其各峰位保留时间和质谱

碎片峰，判断样品的结构并计算摩尔百分比。

表 13 MAEP-2b-2a 中糖苷键连接方式

Glycosyl residue	Fragment	Configure	molar ratio
Ara	2,3-Me ₂	1→5	2.66
Fuc	2,4-Me ₂	1→3,1→5	1.31
Man	2,3,4,6-Me ₄	末端	19.58
	3,4,6-Me ₃	1→2	20.83
	2,3,4-Me ₃	1→6	25.06
	3,6-Me ₂	1→2, 1→4	2.48
	3,4-Me ₂	1→2 1→6	12.0
	2,3,4,6-Me ₄	末端	1.82
Gal	2,4,6-Me ₃	1→3	1.81
	2,6-Me ₂	1→3, 1→4	1.26
	2,3,4,6-Me ₄	末端	2.66
Glu	2,3,4,6-Me ₄	末端	2.66
	2,3,4-Me ₃	1→6	7.52

从表 14 中，可以看出 MAEP-2b-2a 中糖部分是以（1→2,1→6）连接的 Man（甘露糖）为主链。（1→2）连接的 Man（甘露糖）在其 4 位上有分枝点，（1→6）连接的 Man 在其 2 位上有分枝点。在这些分枝点上，连接着由 Gal 和 Glu 为主组成的侧链。MAEP-2b-2a 的非还原末端是由 Gal, Man, Glu 组成。从甲基化结果的摩尔百分比计算，各分枝点摩尔百分比之和低于非还原末端摩尔百分比之和，由 PMP 衍生化组成糖分析结果可知，MAEP-2b-2a 尚含约 9%的 GalA，糖醛酸在复杂多糖中可能以分枝点的形式存在，故推测在 MAEP-2b-2a 中还有大量的 GalA 作为分枝点而存在。（络小皮伞菌丝体多糖）

表 2- 1 NTPS 的部分甲基化 Alditol 乙酸酯在气相层析上的相对滞留时间和糖苷键的连接方式及摩尔百分比

FMAA	t _r (min)	Linkage	mol %
1, 3, 5, 6-O Ac- 2, 4-O Me- Man	25. 63	→3, 6-D-Manp 1→	9. 29
1, 5-O Ac- 2, 3, 4, 6-O Me- Man	27. 27	T-D- Manp 1→	11. 01
1, 4, 5-O Ac- 2, 3-O Me- Ara	26. 37	→5-L- Araf 1→	6. 44
1, 2, 5-O Ac- 3, 4-O Me- Ara	29. 29	→2-L- Arap 1→	13. 28
1, 5-O Ac- 2, 3, 4, 6-O Me- Gu	27. 80	T-D- Gup 1→	4. 34
1, 4, 5, 6-O Ac- 2, 3-O Me- Gu	28. 14	→4, 6-D- Gup 1→	5. 83
1, 5, 6-O Ac- 2, 3, 4-O Me- Gu	29. 42	→6-D- Gup 1→	26. 90
1, 5-O Ac- 2, 3, 4, 6-O Me- Gal	23. 38	T-D- Gal p 1→	11. 68
1, 5, 6-O Ac- 2, 3, 4-O Me- Gal	26. 51	→6-D- Gal p 1→	3. 77
1, 3, 5-O Ac- 2, 4, 6-O Me- Gal	27. 36	→3-D- Gal p 1→	7. 46

表 2-2 ATPS 的部分甲基化 Al dit ol 乙酸醋在气相层析上的相对滞留时间和糖苷键的连接方式及摩尔百分比

PMAA	t _r (m in)	Li nkage	mol %
1, 2, 4, 5- O Ac- 3- O Me- Rha	28. 25	→2, 4- L- Rhap 1→	9. 93
1, 2, 5- O Ac- 3, 4- O Me- Fuc	29. 73	→2- L- Fucp 1→	4. 55
1, 4, 5- O Ac- 2, 3- O Me- Ara	26. 51	→5- L- Ar af 1→	10. 76
1, 5, 6- O Ac- 2, 3, 4- O Me- Gu	24. 27	→6- D- G up 1→	16. 00
1, 5- O Ac- 2, 3, 4, 6- O Me- Gal	23. 39	T- D- Gal p 1→	8. 23
1, 3, 5- O Ac- 2, 4, 6- O Me- Gal	25. 63	→3- D- Gal p 1→	1. 74
1, 5, 6- O Ac- 2, 3, 4- O Me- Gal	26. 37	→6- D- Gal p 1→	3. 82
1, 4, 5- O Ac- 2, 3, 6- O Me- Gal (6, 6' - d ₂)	30. 34	→4- D- Gal pA1→	49. 10

(茶源多糖结构鉴定)

5、红外光谱分析

取干燥样品微量，压片，全波段扫描。

例如：阿魏侧耳子实体多糖分离纯化及其化学结构的初步研究

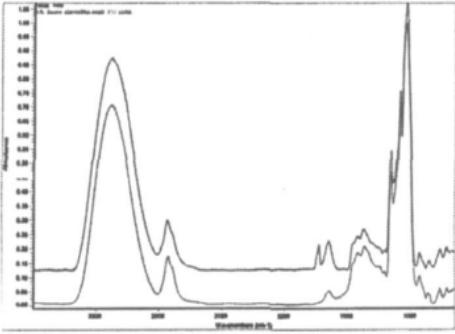


图 1 红外环糊精对照图

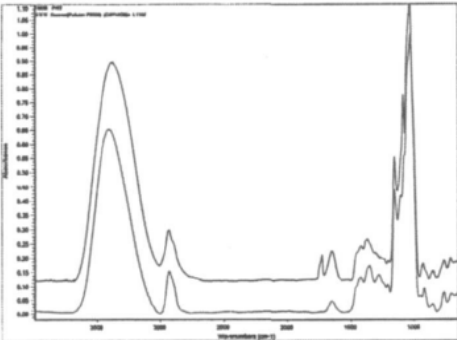


图 2 红外葡萄糖对照图

图中显示在 4000cm⁻¹~ 650cm⁻¹区内的是具有多糖类物质的一般特征。

3372cm⁻¹的吸收峰是 O-H 和 N-H 的伸缩振动峰，2931cm⁻¹为 C-H 的吸收峰，即为-CH 和-CH₂ 的共振吸收峰。这两类是糖类的特征吸收峰。848cm⁻¹吸收峰表明在 PW2（文中提纯的第二种成分）多糖纯品结构中**存在 α 型**(即 α 端基差向异构体), 1026cm⁻¹、1081cm⁻¹ 和 1152cm⁻¹ 的吸收峰表明 PW2 中的糖环为**吡喃糖环**，这是由醚键 C-O-C 振动而产生的吸收峰;而呋喃糖环在此区间上只有两个强吸收峰。在 890cm⁻¹处有微弱吸收，表明样品中含有**少量 β 型糖苷键**，而在 810cm⁻¹处没有振动吸收峰表明**没有甘露糖**的存在。928cm⁻¹为糖类分子振动吸收峰，即 **D-吡喃糖**的非对称环伸缩振动产生。而 1725cm⁻¹的存在，表明多糖含有**糖醛酸基团**，即 PW2 为酸性多糖。

红外吸收(cm^{-1})	官能团	结构特征
3372	-OH	O-H 伸缩振动
2931	-CH ₂	C-H 伸缩振动
1725	-CHO	C=O 非对称伸缩振动
1647	多糖的水合振动峰	C-O
1417	-COOH	C-O(羧基)
1368	-COO	C=O(羧基)
1152/ 1081/ 1026	C-O-C	C-O(脂肪醚)
928	C-O-C	D-葡萄糖吡喃糖的非对称环伸缩振动
848	C-H	α 端基差向异构体
761	C-O-C	D-葡萄糖吡喃糖的对称环伸缩振动

3、核磁共振

将样品 10mg，溶于 D₂O(重水)中，溶解温度 80℃，分别在 400MHz 和 500MHz 上测定 ¹HNMR 和 ¹³CNMR。（阿魏侧耳子实体多糖分离纯化及其化学结构的初步研究）

（1）氢谱分析

例如：

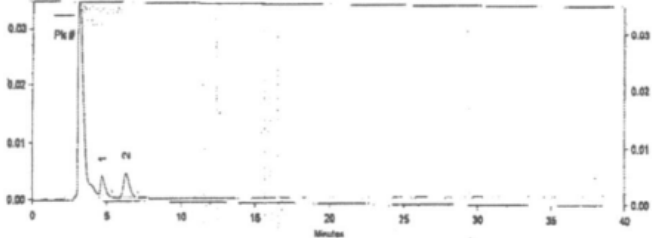


图 3 核磁共振氢谱图

5.39 吸收峰表明样品的主要构型为 α -构型，由于存在 4.97 吸收峰的存在，表明存在少量的 β -构型（ α -构型 C-1 信号在 δ 103 以下，H-1 信号在 δ 5.0 以上； β -构型 C-1 信号在 δ 104 以上，H-1 信号在 δ 5.0 以下）。且 α -构型与 β -构型残基的比例为 1：0.2843。

（2）碳谱分析

例如：

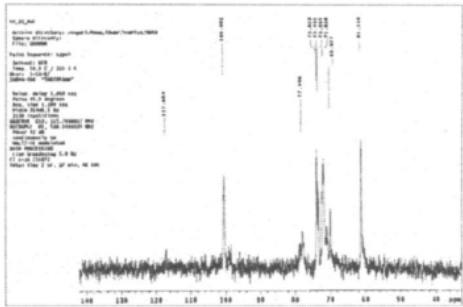


图 4 核磁共振图谱

表 2 PW2 核磁共振光谱解析结果

C	¹³ C δ_c 谱(ppm)	H	δ_H (ppm)
C ₁	100.40(α), 117.08(β)	H ₁	5.39(α), 4.97(β)
C ₂	73.491	H ₂	3.6432(α)
C ₃	73.823	H ₃	3.8454(α)
C ₄	71.828, 77.906(被取代)	H ₄	3.9585(α)
C ₅	73.525	H ₅	3.4370(β)
C ₆	61.11, 69.977(被取代)		

由图及表 2 可以看出： $C-1$ 信号在 100.4ppm，即处在 90-103 之间，表明多糖的异头碳的构型为 α -构型，同时可以看到存在一个微弱的 117ppm 峰，表明样品中有少量的 β -构型，峰的相对高度正比于碳的数目，即 α -构型与 β -构型残基的比例为 1：0.29，这个结果和红外光谱以及氢谱的结论完全吻合。

图中 70~76 之间的碳共振峰分别是未被取代的 C-2、C-3、C-4，其中， α 与 β 两种构型的共振峰重叠严重，由于 77.906 为被取代的 C-4 的糖苷键的共振峰，图中可以看出存在重叠峰，这是由于 α 与 β 两种构型和两种单糖造成的，（小邱：不是很明白它的意思，后面推测说应该是 C-4 上有支链）C-6 部分共振峰由 61.114 向低场移动到 69.977 表明多糖 PW2 存在 1-6 糖苷键，根据峰高比例可以大约看出多糖 PW2 的主链为 1-6 糖苷键，存在 1-4 糖苷键的支链。由 C-1 和 C-6 的峰高比例可以看出多糖 PW2 的支链不多。

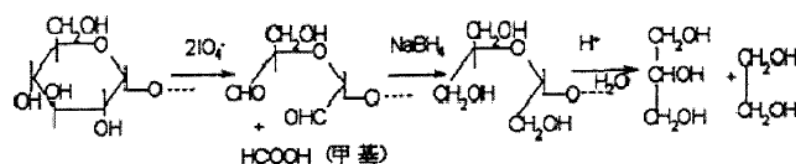
6、高碘酸氧化法与 Smith 降解法

(1) 原理

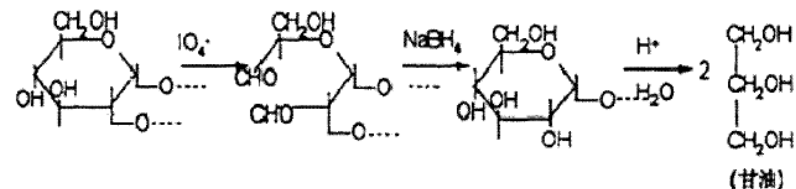
高碘酸氧化是一种选择性的氧化反应，它只能作用于多糖分子中连二羟基及连三羟基处。当连二羟基的 C-C 键被断开后，产生相应的醛；当断裂连三羟基的 C-C 键时，产生甲酸及相应的醛。此反应定量进行，每断开 1 mol C-C 键，消耗 1 mol 高碘酸，由此可知，每生成 1 mol 甲酸必然对应消耗 2 mol 高碘酸。因此，通过测定高碘酸消耗量及甲酸生成量，便可以判断糖苷键的位置、直链多糖的聚合度及支链多糖的分支数目等。

高碘酸氧化产物经 NaBH_4 还原，得到的多糖醇用稀酸在温和条件下水解，可发生特异性降解，即 Smith 降解。Smith 降解的特点是只打断被高碘酸破坏的糖苷键，而未被高碘酸氧化的糖残基仍连在糖链上。这样，多糖醇经 Smith 降解，就可以得到小分子的多元醇和未被破坏的多糖或寡糖片段，对这些产物进行分析，便可以推断出糖苷键的键型及其位置。

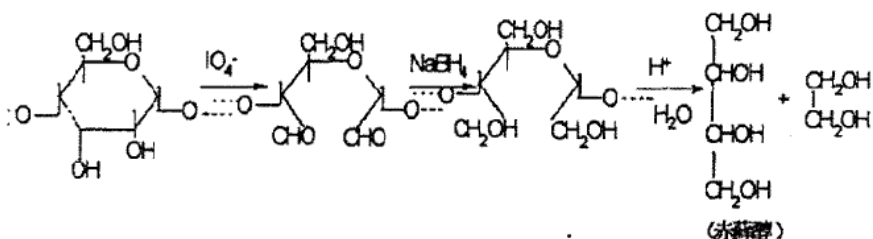
1. 以 1→2 位键和 (1→6 类似)



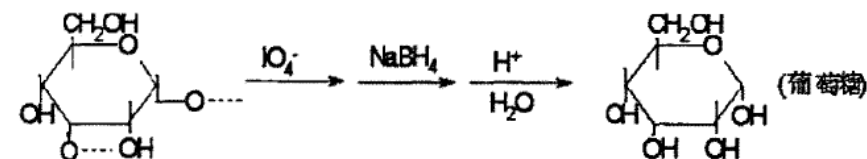
2. 以 1→2 位键和 (1→2, 6 类似)



3. 以 1→4 位键和 (1→4, 6 类似)



4. 1→3 位键和 (1→3, 6; 1→2, 3; 1→3, 4; 1→2, 3, 4 类似)



(2) 高碘酸钠标准曲线绘制

各取适量的 NaIO_4 (15 mmol/L) 和 NaIO_3 (15 mmol/L) 溶液，以 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 和 0:5 的体积比分别相混合。取不同比例的混合液 0.1 ml 稀释 250 倍至 25 ml，分光光度计测

量各管 223 nm 处的吸光值。以混合液中的 NaIO₄ 浓度(mmol/L)为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制 NaIO₄ 标准曲线。

(3)高碘酸氧化

精确称取多糖样品 25 mg, 用 15 mmol/l 的 NaIO₄ 溶液将多糖配成 1.0 mg/ml 溶液, 振荡使其溶解。2h 后取多糖溶液 0.1 ml 稀释 250 倍至 25 ml, 分光光度计测量 223 nm 处的吸光值。多糖溶液置 4℃冰箱, 暗处反应, 并间歇振荡。间隔 6h 取样 0.1 ml 稀至 25 ml, 测 223 nm 处吸光值, 直至吸光值基本稳定。根据反应前后的吸光值和 NaIO₄ 标准曲线计算出 NaIO₄ 消耗量。加乙二醇 1.0 ml, 静置反应 1h 以还原过量的高碘酸。

取反应液 1.0 ml, 加 50ul 酚酞指示剂, 用 0.5 mmol/L 的 NaOH 溶液滴定, 计算甲酸的生成量。反应液加硼氢化钠 50mg, 静置反应 20 h 以还原多糖醛成稳定的多羟基化合物。用 0.1 mol/L 的乙酸调反应体系的 pH 值为 5.5-7.0, 分解多余的硼氢化钠。反应液用自来水流水透析 48 h, 再用蒸馏水透析 24 h。透析液 50℃减压蒸发至干, 加入甲醇 2.0 ml, 再蒸干, 如此重复 3 次, 最后蒸干获多糖的高碘酸氧化产品待作 Smith 降解使用。

(4) Smith 降解及 GC 分析

将减压蒸干的多糖高碘酸氧化产品, 进行三氟乙酸(TFA)水解, 再制备糖腈乙酸酯衍生物, 最后用 GC 进行检测。

7、糖腈乙酸酯衍生物的气相色谱法 (鲍氏层孔菌菌丝体多糖的结构分析)

(1) 多糖样品水解采用完全酸水解法。

称取多糖样品 5mg 置安瓶瓶中, 加入 2 mol/l 三氟乙酸(TFA) 2ml 封管, 120℃水解 2 小时。水解液 50℃条件下旋转蒸发至干, 加入甲醇约 2ml, 再蒸发干, 如此重复 3 次, 最后蒸干待衍生物使用。

(2)糖腈乙酸酯衍生物的制备

水解后的糖样中加入 10 mg 盐酸羟胺、5 mg 肌醇(内标物)、0.6 ml 吡啶, 封口, 放入 90℃水浴中加热反应 30 min 并振荡。冷至室温, 再加入 1.0 ml 醋酸酐, 90℃水浴中继续反应 30 min, 冷却后得糖腈乙酸酯衍生物。反应产物可直接用于气相色谱分析。

(3) 衍生物的气相色谱检测

本实验采用的条件为:Agilent 6890N 气相色谱仪, 5%苯甲基硅氧烷毛细管色谱柱 HP-5, 30.0 mX320um X0.25um;氢火焰离子检测器(FID);色谱柱程序升温:1200C 保持 3min, 以 30C/min 速度升温至 2100C, 2100C 再保持 4 min;进样口、检测器温度分 250℃、280℃;进样体积 1.0ul, 氮气、氢气和空气的流速分别是 25 ml/min, 30 ml/min, 400 ml/min。

(4)标准单糖衍生与检测

鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖以及半乳糖等标准单糖同样进行糖腈乙酸酯衍生化, 然后以同样条件进行气相色谱分析。

根据色谱图中各色谱峰的出峰时间、峰面积以及单糖本身的摩尔质量可知样品的单糖组成和摩尔比。计算公式: $W_x = (A_x * W_i) / (A_i * f)$ 。

公式中 W_x 一样品中单糖质量(mg);

W_i 一样品中加入内标的质量(mg);

A_x 一样品中单糖的峰面积;

A_i 一样品中内标的峰面积;

f —相对校正因子: $f = W_i * A_s / (W_s * A_i)$ 。

8、薄层层析(TLC)

单糖残基的定性分析

(猴头菌实体多糖)

薄层层析(TLC): 取 2mg 多糖样品放入薄壁长试管中, 加入 2mol/L 三氟乙酸(TFA) 4mL, 在 110℃

下水解,中性多糖样品水解 2h,含糖醛酸样品水解 4h。样品水解溶液减压蒸干(低于 40℃)后,加入 3mL 甲醇再蒸干,重复以上步骤 4—5 次,以完全除去 TFA。再向样品中加入 0.5mL 左右的蒸馏水使样品完全溶解,取 5uL 在纤维素板上进行薄层层析,展开剂采用乙酸乙酯:吡啶:醋酸:水(5:5:1:3),显色剂为苯胺-邻苯二甲酸,110℃加热 10min 后显色,以标准单糖样品为对照。

(山药多糖)

4.3.1.1 山药中性多糖的薄层层析

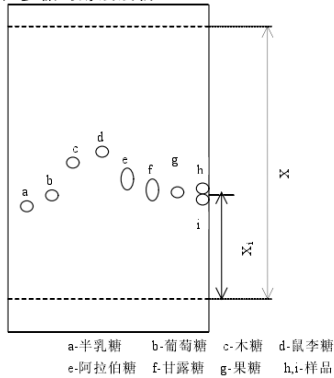


图 4.2 中性多糖的薄层层析
Fig4.2 The TLC of the neutral polysaccharide

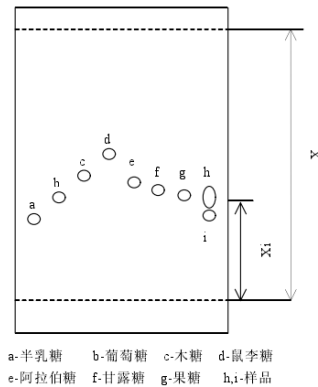


图 4.4 酸性多糖 1 的 TLC

表 4.3 酸性多糖 1 的 TLC 分析
Tab4.3 The TLC analysis of the acidity polysaccharide 1

样液	a	b	c	d	e	f	g	h	i
X	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4
X ₁	6.46	7.18	8.43	10.30	8.1	7.73	7.54	7.73	6.48
R _f	0.351	0.39	0.491	0.6	0.44	0.42	0.41	0.42	0.352
颜色	灰绿	灰绿	褐色	褐色	褐色	灰绿	灰绿	灰绿	灰绿

9、气相色谱法

(猴头菌体多糖)

(1) 标准单糖样品的乙酰化

精密称取等摩尔(2 mmol/L)的半乳糖、岩藻糖、木糖、鼠李糖、葡萄糖、甘露糖和阿拉伯糖,分别溶于 3 mL 蒸馏水中,加入 20-30 mg 硼氢化钠(NaBH₄),于室温下,间歇振荡,还原 3h,然后用冰醋酸中和过量的 NaBH₄,至溶液不再产生气泡为止,pH 应在 4-5 之间,加入 3mL 甲醇,减压浓缩蒸干,重复 4-5 次,以除去反应副产物硼酸及水分,然后置于真干燥器中过夜。次日,110℃烘箱中加热 15 min,充分除去残留的水分后,加入 4 mL 醋配,100℃反应 1h,冷却,然后加入 3 mL 甲苯,减压浓缩蒸干,重复 4-5 次,以除去多余的醋酐。将乙酰化后的产物用 3 mL 氯仿溶解后转移至分液漏斗,加入少量蒸馏水充分震荡后,除去上层水溶液,如此重复 4 次。氯仿层以适量的无水硫酸钠干燥,定容至 10 mL 待 GC 和 GC-MS 分析。

(2) 样品的乙酰化处理

取 2 mg 多糖样品,放入薄壁长试管中,加入 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA)4 mL,在 110℃水解 2h。将水解液低于 40℃减压蒸干,然后加入 3 mL 甲醇蒸干,重复上述操作 4-5 次,以完全除去 TFA。然后按照上述的方法进行还原、乙酰化,用氯仿定容至 5m1,待 GC 和 GC-MS

分析。

(3) GC 分析及定量

分别用单个单糖的标样按（1）法处理后用 GC 测定，确定每个单糖的保留时间。然后用单糖的混标按（1）法处理后用 GC 测定，重复进样 6 次，确定混合标准样品的气相色谱图和相对标准偏差(RSD1)。最后按（1）法平行处理六个混标样品后用 GC 测定，确定其相对标准偏差(RSD2)。

糖的定量分析:计算各糖组分的峰面积，利用面积归一法求出各糖组分的百分比例，并计算每种单糖的响应因子。然后根据等摩尔的标样组分，计算出样品的摩尔比。

(4) 色谱条件

气相色谱仪(GC)配备 DB-23 石英毛细管柱，30 m X 0.25 mm X 0.25 μ m。氢火焰离子化检测器(FID)，高纯氮作载气。程序升温:柱初温 120 $^{\circ}$ C，以 15 $^{\circ}$ C/min 升至 240 $^{\circ}$ C，恒 6.5 min。进样口温度 250 $^{\circ}$ C，分流比 1:50。检测器温度 250 $^{\circ}$ C 氢气 35 mL/min，空气 350 mL/min，尾吹气 30 mL/min。柱流速为 1 mL/min。

表 3.1 混合标准样的保留时间及其面积平均百分含量和相对标准偏差

Table 1.The retention time, the average area and relative standard deviation of standard mixture

Monosaccharide	Retent time	RSD1	RSD2	Average content (%)	Response factor
Rhamnose	8.318	1.56	3.17	12.57	0.91
Fucose	8.445	1.62	2.38	15.48	1.12
Arabinose	9.147	1.27	3.37	13.85	1.00
Xylose	9.853	1.13	3.38	13.88	1.00
Mannose	11.613	1.58	2.00	13.64	0.98
Galactose	12.148	1.82	1.10	15.30	1.10
Glucose	12.638	1.89	0.09	15.28	1.10

注： RSD Relative standard deviation

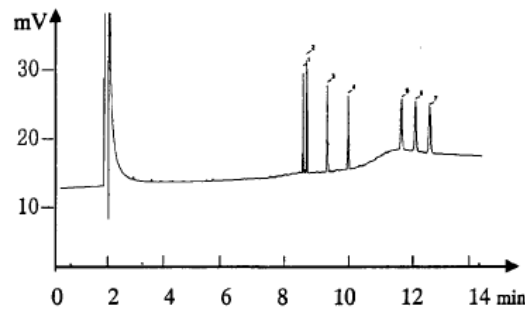


图 3.1 标准糖样中单糖的气相色谱图

Figure 3.1 Gas chromatogram of the monosaccharides in standard sample
1. Rhamnose; 2. Fucose; 3. Arabinose; 4. Xylose; 5. Mannose; 6. Galactose; 7. Glucose

表 3.2 样品的气相色谱分析结果

Table 3.2 Results of component sugars HEPF1 from GC			
Monosaccharide	Sample	Content*	Molar ratio
Rhamnose	8.342	3.519	0.278
Fucose	8.445	15.549	1.000
Galactose	12.195	62.330	4.029
Glucose	12.687	15.818	1.036

注：*面积归一法（area normalization method）

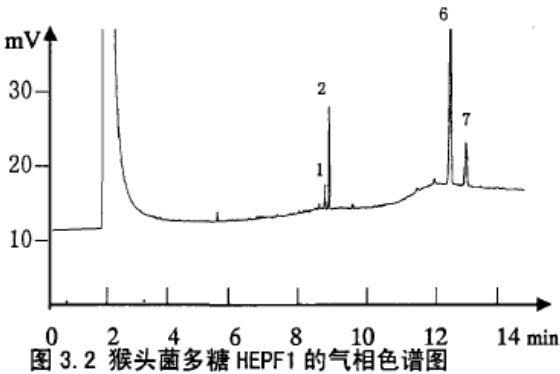


Figure 3.2 Gas chromatogram of the monosaccharides in HEPF1

表 4.1 中性多糖的薄层层析 R_f 值
Tab4.1 The TLC R_f value of the neutral polysaccharide

样液	a	b	c	d	e	f	g	h	i
X	17.2	17.2	17.2	17.2	17.2	17.2	17.2	17.2	17.2
X ₁	6	6.65	8.43	9.8	7.5	7.21	7.03	7.2	6.7
R_f	0.349	0.387	0.491	0.57	0.436	0.419	0.409	0.42	0.39
颜色	灰绿	灰绿	褐色	褐色	褐色	灰绿	灰绿	灰绿	灰绿

4.3.1.2 山药中性多糖的 GC-MS 分析结果

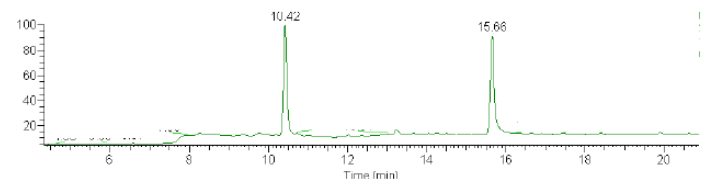


图 4.3 山药中性多糖的 GC-MS 图
Fig4.3 The GC-MS of the neutral polysaccharide

表 4.2 山药中性多糖的 GC-MS 分析
Tab4.2 The analysis of the neutral polysaccharide by GC-MS

	葡萄糖	甘露糖
保留时间 (min)	10.42	15.66
摩尔比	0.56	0.44

山药水溶性中性多糖水解物的乙酰化衍生物的色谱图见图 4.3。单糖定性采用

10、高效阴离子色谱法
(猴头菌体多糖)

取 2 mg 多糖样品放入薄壁长试管中,加入 2 mol/L 三氟乙酸(TFA) 4 mL,在 110℃下水解,中性多糖样品水解 2h,用超纯水溶解定容至 100 mL 容量瓶,稀释 100 倍后上样测定。色谱条件:分离柱采用 Dionex 公司 CarboPac™PA20 预处理、CarboPac™PA20 检测柱;脉冲安培检测器工作参数:E1 为 100 mV, 400 ms; E2 为-2000mv, 20 ms; E3 为 600 mV, 10 ms; E4 为 -100 mV, 70 ms。流动相:分别采用浓度为 2.5 mmol/L 的 NaOH 作淋洗液;淋洗方法采用单一浓度淋洗。流速:0.45mL/min;上样量:25 uL;温度 30℃。

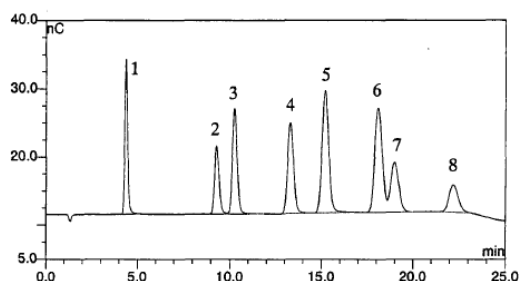


图 3.3 标准糖样中的高效阴离子色谱图

Figure 3.3 HPAEC of the monosaccharides in standard sample

1. Fucose; 2.Rhamnose; 3.Arabinose; 4.Galactose; 5.Glucose; 6. Xylose; 7. Mannose; 8.Fructose

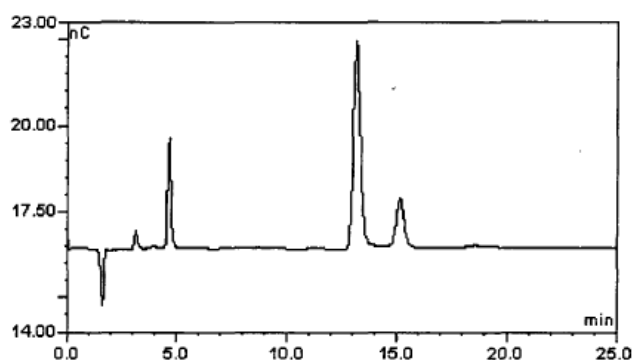


图 3.4 HEPF1 的高效阴离子色谱图

Figure 3.4 HPAEC of the monosaccharide in HEPF1

11、气质联用

(猴头菌体多糖)

取处理的乙酰化产物,上 GC-MS, 色谱条件:气相-质谱联用(GC-MS)配备 DB-5MS 石英毛细管柱, 30 m X 0.25 mm X 0.25 um。程序升温:柱初温 80℃, 保持 1 min, 以 5 0C/min 至 200 0C, 再以 2 0C/min 至 215 °C, 最后以 20 °C/min 至 270 °C 氦气作载气, 进样口温度 250 °C, 分流比 1:50, 柱流速为 1 mL/min。 EI (70eV), 倍增器电压 350 v, 灯丝电流 250 uA, 接口温度 200℃, 离子源温度 250℃, 质量数扫描范围 42-462 amu, 扫描速率 2.5 scan/秒。

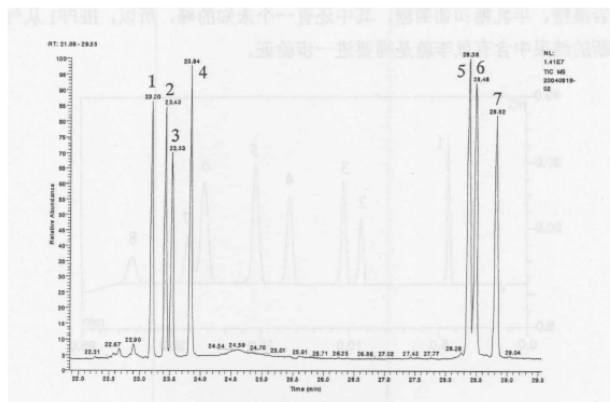


图 3.5 单糖混合标准品的总离子流图

Figure 3.5 Total ion chromatogram of complex standard monosaccharides

1. *L*-鼠李糖 (*L*-rhamnose, 23.20 min) 2. *L*-岩藻糖 (*L*-fucose, 23.43 min) 3. *D*-阿拉伯糖 (*D*-arabinose, 23.53 min)
4. *D*-木糖 (*D*-xylose, 23.84 min) 5. *D*-甘露糖 (*D*-mannose, 28.38 min) 6. *D*-葡萄糖 (*D*-glucose, 28.48 min) 7. *D*-半乳糖 (*D*-galactose, 28.82)

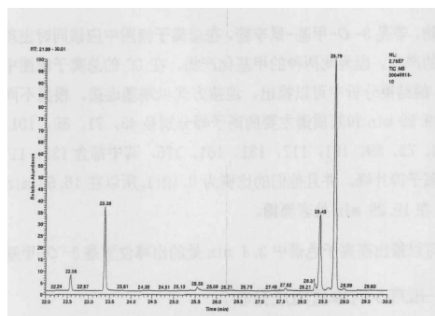


图 3.6 HEPF1 的部分总离子流图

Fig 3.6 Part of total ion chromatogram from acetate derivative of HEPF1

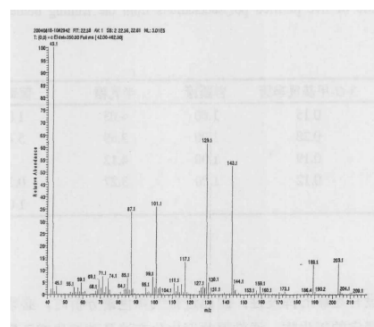


图 3.7 保留时间为 22.58 min 处的质谱图

Figure 3.7 Mass spectrum of 3-*O*-methyl methylpentose at the retention time (22.58 min)

根据 HEPF1 的总离子流图(图 3.6), 通过各峰的保留时间和质谱可以确定其含有岩藻糖、葡萄糖和半乳糖, 但是在保留时间 22.58 min 处有一未知物峰。根据 22.58min 处的质谱图(图 3.7)可知, 该组分在 m/z 43, 87, 101, 117, 129, 143, 189 和 203 处有碎片离子峰。其中 m/z 203 和 189 是 3-*O*-甲基-甲基戊糖糖醇乙酸酯衍生物的一级片段, 而耐 z 129 和 143 是由一级片段 m/z 189 和 203 部分裂解产生乙酸根(-AcOH, -60)而产生的二级片段, 与文献完全一致。由此可以断定此峰是 3- *O*-甲基-甲基戊糖的糖醇乙酸酯衍生物。由于 3-*O*-甲基-甲基戊糖有两种存在形式, 3- *O*-甲基-鼠李糖或 3- *O*-甲基-岩藻糖, 判断具体的哪一种, 还需要进一步验证。

12、苯酚·硫酸法总糖含量测定

(1) 标准曲线的制作

葡萄糖标准品在 105℃烘箱条件下干燥至衡重, 取 20 mg 于 500 mL 容量瓶中定容。分别吸取 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL, 1.2 mL, 1.4 mL, 1.6 mL, 1.8 mL 葡萄糖标准液于试管中, 并加水补至 2.0 mL。加入配制好的 6% 苯酚溶液 1.0 mL, 用移液管吸取 5.0 mL 浓硫酸, 待静止 10 min 后摇匀, 再在室温下放置 20 min, 待反应完全。于 490nm 下测吸光度, 并绘制标准曲线。

(2) 样品含量测定

配制 1 mg/mL 的粗多糖溶液。稀释后, 测定吸光值, 根据标准曲线计算总糖含量。

13、糖醛酸含量测定

(1) 试剂配制

间羟基联苯(m-hydroxydiphenyl)试剂:0.15%间羟基联苯,以0.5%氢氧化钠配制,置于冰箱中保存,1月内稳定。

四硼酸钠—硫酸试液:配制0.0125 mol/L四硼酸钠的浓硫酸溶液。

半乳糖醛酸标准溶液:精密称取半乳糖醛酸60 mg,置于100 mL容量瓶中,加水溶解,定容。稀释标准溶液至60ug/mL,定容后备用。

(2) 标准曲线制作

分别精确量取0uL, 5uL, 100uL, 150 uL, 200uL, 250 uL, 300 uL, 350uL半乳糖醛酸标准溶液于比色管中,补加水至0.25 mL,在冰水浴中预冷,加入1.5 mL四硼酸钠硫酸试液。振摇混合后,在沸水浴中加热5 min。冰水浴冷却至室温后,加25uL间羟基联苯试液。摇匀后,在520 nm处测定吸光值,绘制标准曲线。

(3)样品测定

取0.1 mg/mL多糖水溶液0.1 mL,加水补足至1mL,余操作同标准曲线,平行测定三次,根据吸光度从标准曲线上求得糖醛酸含量。

14、分子质量测定

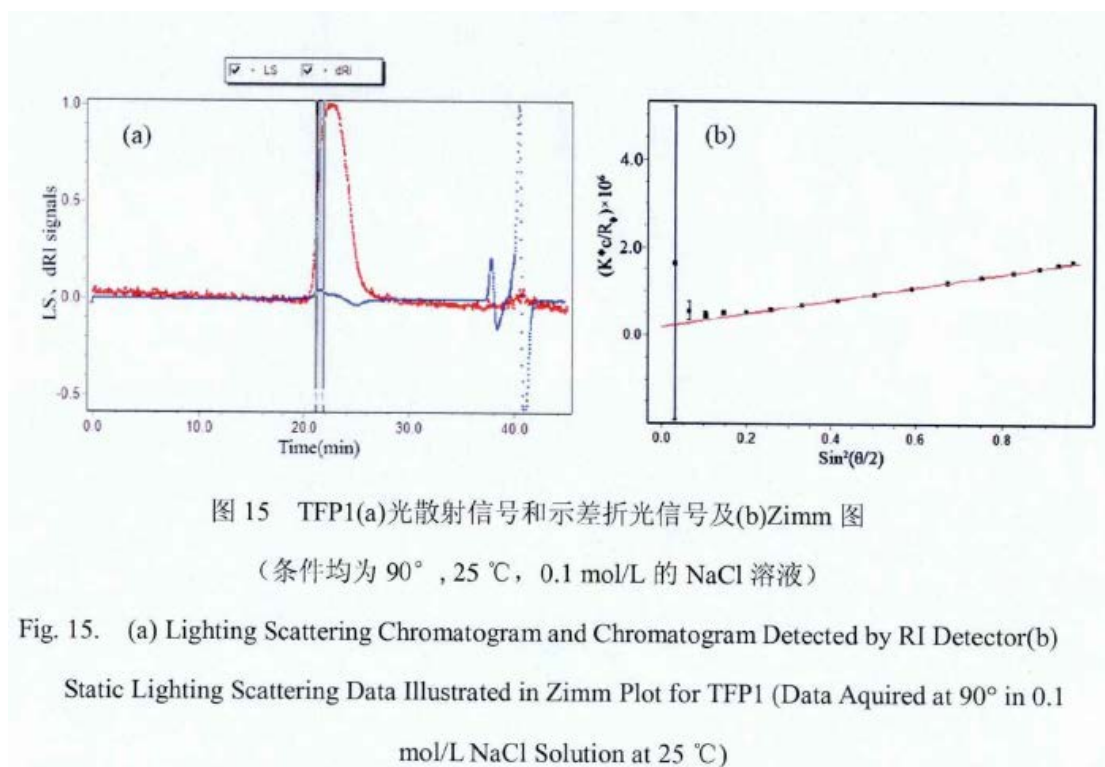
示差折光指数增量(dn/dc)通过OPTILAB折光仪在633 nm和25℃下测定, dn/dc 值为0.14。 dn/dc 描述的是大分子溶液折光指数相对于溶质浓度的变化,它的值得大小有其自身性质决定的,受溶剂、温度、测量波长等因素的影响,也是用光散射测定聚合物分子量不可少的常数。

光散射(LS)测定角度为900, TFP1的流出体积为28 mL。根据方程6-1和6-2,通过 Kc/R_θ 。对 $\sin^2(\theta/2)+Kc$ 作图得到Zimm曲线(图15(b)),在纵坐标的交点为重均分子量 M_w 的倒数。

$$K = 4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda_0^4 \quad (6-1)$$

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2 n^2}{3\lambda_0^2} \langle S^2 \rangle_z^{1/2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right) + 2A_2 c \quad (6-2)$$

公式中字母的意义:K为光学常数,c为多糖溶液的浓度(mg/mL), R_θ 为瑞利因子,n为溶剂的折光指数, λ_0 为入射光波长, $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 均方根旋转半径, N_A 为Avogadro常数, I_0 和 I_θ 分别为入射光强和散射光强,代表光源到测量点得距离。



根据 Zimm 图计算得到 TFP1 在 NaCl 溶液中各个参数见表 1 , TFP1 的重均分子量(M_w)大小为 5.832×10^6 Da; Z 均方根旋转半径($\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$)是用来描述大分子的尺寸,它的大小可以用来判断聚合物的伸展范围和刚性,该值比较大时说明多糖是伸展的刚性链,值比较小则代表紧密缠绕的线团, TFP1 的 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 为 191.3 nm 说明 TFP1 是伸展的刚性链;多分散系数(M_w/M_n)为 1.005,说明 TFP1 分子量分布均匀。所以用本研究中的提取纯化方法得到的银耳多糖 TFP1 是分子量较大的均一多糖,糖链是伸展的刚性链。

表 1 TFP1 分子量和均方根旋转半径

Table 1. Malor Mass and Average Mean Square Radius for TFP1				
	$M_w \times 10^{-6}$	$M_n \times 10^{-6}$	$\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$	M_w/M_n
	(Da)	(Da)	(nm)	
TFP1	5.832 ± 0.18	5.805 ± 0.11	191.3 ± 0.91	1.005

14、碘-碘化钾反应

银耳多糖 TFP1 溶液与碘试剂(含 0.02% I₂ 的 0.2% KI 溶液)混匀,测定 300-700 nm 范围内的吸收光谱,若在 565 nm 处有最大吸收则说明多糖有较少的分支和较短的侧链[161]。如图 16 所示,TFP1 与 I₂-KI 的反应物最大吸收峰在 351nm,而 565 nm 处并没有最大吸收,说明 TFP1 可能存在较长的侧链和较多的分支。另外,TFP1 与 I₂-KI 反应呈阴性,说明不含淀粉。

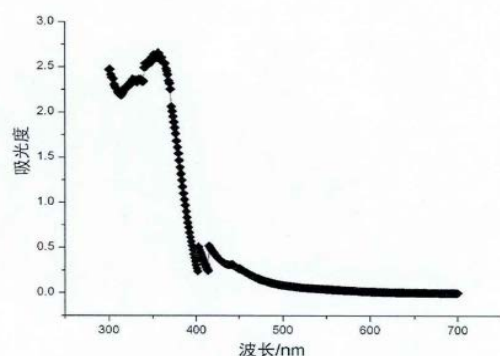


图 16 银耳多糖 TFP1 与 I₂-KI 反应物紫外-可见光谱图

Fig. 16. The Scanning Spectra of TFP1 Reacted with I₂-KI using Ultraviolet-Visible Light Spectrophotometer

15、刚果红实验

刚果红是一种酸性染料,分子式 $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$,分子量 696.66,能溶于水和乙醇,可与具有三股螺旋构象的多糖形成络合物,络合物的最大吸收波长同刚果红相比发生相对位移,在一定的 NaOH 浓度范围内,表现为最大吸收波长特征性变化(变成紫红色),当 NaOH 浓度大于 0.3 mol/L 后最大吸收波长急剧下降。若随着 NaOH 的浓度升高,多糖最大吸收波长相应减小,但相对于刚果红本身最大吸收波长减少明显缓慢,则说明多糖未表现出三股螺旋结构。如图 17,随着 NaOH 的浓度升高,刚果红与银耳多糖形成的络合物的最大吸收波长相应减小,但相对于刚果红本身最大吸收波长减小的缓慢,说明银耳多糖 TFP1 可能不具有三螺旋结构。

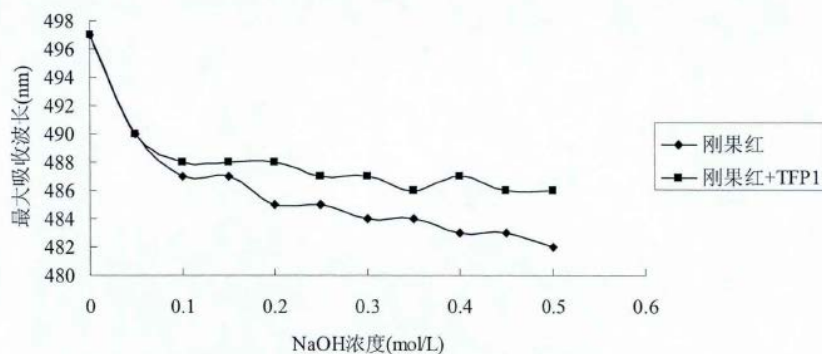


图 17 TFP1 与刚果红反应曲线图

Fig. 17. Curve for TFP1 Reacted with Congo

16、粘度检测

高分子的粘度是流体力学性质的内容,反映高分子之间的摩擦力,特性粘度值反映的是单个高分子在特定浓度下对溶液粘度的贡献,其值的大小并不随浓度改变而改变,多糖溶液特性粘度($[\eta]$)与分子量大小有关。

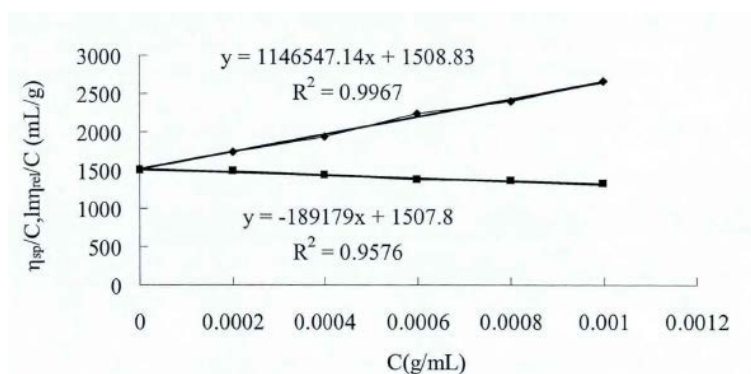


图 18 TFP1 特性粘度

Fig. 18. Intrinsic Viscosity of TFP1

Huggins方程: $\eta_{sp}/C=[\eta]+K_h[\eta]^2C$

Kraemer方程: $(\ln\eta_r)/C=[\eta]-K_k[\eta]^2C$

K_h 和 K_k 分别为高分子在特定条件下某溶剂中的常数; $[\eta]$,特性粘度; η_{sp} 增比粘度; η_r 相对粘度; C ,高分子溶液浓度。

由 Huggins 方程($y= 1146547.14x + 1508.83$)和 Kraemer 方程($y = -189179x+ 1507.8$)计算的 TFP1 的特性粘度 $[\eta]=1508.3$ mL/g (如图 18)。表 2 中是一些生物多糖在 25 °C并以 0.1 mol/L NaCl 作为溶剂的条件下测定的特性粘度,银耳多糖与其它一些样品相比占有相对较大的流体力学体积,一定条件下特性粘度与分子量大小成正比,进一步说明 TFP1 具有较大的分子质量,与激光光散射测得的大重均分子量吻合。 $[\eta]$ 值比较大时说明多糖是伸展的刚性链, $[\eta]$ 值比较小则表示大分子是紧密缠绕的线团。所以银耳多糖 TFP1 在 $25\pm0.01^\circ\text{C}$ 的 0.1 mol/LNaCl 溶液中具有较高的刚性,分子链较为伸展。银耳多糖由于其高粘度大大影响其在工业生产方面的利用,而反过来如果能好好利用它的这个特点,开发它作为化妆品和食品的增稠剂,不仅可以达到使产品增加粘度的效果,同时由于其本身就是营养价值很高的成分而能起到保健的作用。

表 2 几种多糖的特性粘度对比 (0.1 mol/L NaCl, 25 °C)

Table 2. Intrinsic Viscosity of Several Polysaccharide(Detected in 0.1 mol/L NaCl at 25 °C)

	$[\eta](\text{mL/g})$	Mw(g/mol)	Reference
Tea Flower Polysaccharide-1, 2	0.767, 0.207	15.9×10^4 , 1.12×10^4	Han Q, et al.(2011) ^[35]
Tragacanth-1~5* (<i>Astragalus ossypinus</i>)	4.42~19.6	$0.18\sim1.6\times10^6$	Mohammadifar MA, et al.(2006) ^[36]
Chitosans-1,2*	840, 1003	1.12×10^6 , 1.26×10^6	Signini R, et al.(1999) ^[37]
<i>Cyathea medullaris</i> polysaccharide	848	3×10^6	Tha Goh KK, et al.(2011) ^[38]
Succinoglycan-1~8	104~9800	$0.104\sim8.7\times10^6$	Kido S, et al.(2001) ^[39]
TFP1	1508.3	5.832×10^6	—

注: 带*数字在原论文中没有, 为了便于理解在本文中的编号。

通常 Huggins 方程常数 K_h 值位于 0.3-0.8 之间,当 K_h 为 0.3-0.4 时说明大分子聚合物的溶剂是良溶剂(good solvent),当 K_h 为 0.5-0.8 时说明溶剂是 θ 型,而 K_h 大于 0.8 时说明生物大分子发生了聚集,溶剂是不良的(poor solvent)。根据 Huggins 方程计算银耳多糖 TFP1 的 $K_h=0.51$,说明 0.1 mol/L NaCl 的水溶液对于 TFP1 是 θ 型溶剂, θ 型溶剂说明每个多糖分子都处于充分扩散状态,没有分子内或分子间的大分子聚集,或者是大分子的占有体积与聚集效应抵消而呈现未被干扰状态[44],即可以认为高分子链之间的作用力等同于高分子和溶剂的相互作用力,宏观上热力学性质遵循理想溶液规律,可以认为溶剂属于良溶剂。所以银耳多糖在溶液中处于充分舒展的状态,用 0.1 mol/L NaCl 溶液作为样品的溶剂测定的特性粘度是可靠的。

17、原子力显微镜

如图 19(a),样品 TFP1 呈现球状,图 19(b)三维图像中多糖样品呈火焰状突,图 19(c)为 19(a)中划线部分的纵切面高度图。用软件 NanoScope8.0 分析计算得样品颗粒的直径大小为 11.45 ~75.25 nm,高度为 0.865 ~10 nm,从而可以判断大多数由多个分子聚集而成的。图 20 中多糖成光滑的圆形颗粒,颗粒高度在 0.5~1.0nm 之间,在单个多糖分子的高度 0.1-1 nm 的范围内。根据一级结构特征分析、碘-碘化钾实验、SEC-LLS 及特性粘度判断 TFP1 应该是具有多分支的伸展刚性链,但在 AFM 观察到的形貌呈不规则球状,一方面可能是因为云母片本身带负电荷,银耳多糖由于含有糖酸也带负电荷,产生的斥力作用使多糖分子聚集在一起,另外多糖本身有大量的羟基存在,分子内的作用力进一步促进多糖分子形成团状。水分子与多糖上大量羟基之间的作用使水分子不易散失,形成较强的凝胶网络结构,这可能是引起多糖溶液流动性小的根源所在。据研究多糖被硫酸化后,由于多糖分子上的羟基基团被硫酸根取代,硫酸根使多糖的构象转变成伸展的刚性链。高度分支化的多糖由于其独特的分支结构在溶液中呈球形链构象,tao 等[43]用高温、高压从虎奶菇菌核中提取出一种水不溶性高支化多糖(TM3a),这是一种结构复杂的高分子量 β -D-葡聚糖,支化度为 67.5%,由于分子量很高,即使有支链也很难溶于水,根据它在 0.25 mol/L LiCl/DMSO 中的特性粘度($[\eta]$)、分子质量(M_w)、均方根旋转半径($\langle S^2 \rangle^{1/2}$)和流体力学半径(R_h)推算出的 $[\eta]$ - M_w 关系为: $[\eta]$ - $M_w^{0.3+0.01}$ 、 $\rho=\langle S^2 \rangle^{1/2}/R_h$ 为 1.3,由上述数据确定高支化多糖 TM3a 在溶液中呈球形链构象,而且用高分辨透射电镜观察到 TM3a 为球状形态。所以 AFM 观察到的 TFP1 球状形貌可能与自身带电荷、分子内氢键作用及具有多分支结构有关。

