

黄秋葵多糖结构分析及细胞毒性研究

闵莉静, 李敬芬

(湖州师范学院 生命科学院, 浙江 湖州 313000)

摘要:以黄秋葵种子为试材,用水煮醇沉法提取黄秋葵多糖并纯化,研究分析了黄秋葵多糖的组分与结构,并对黄秋葵多糖的细胞毒性进行了研究。结果表明:通过提取得到的天然黄秋葵多糖中糖含量为 28.15%,其主要有鼠李糖、阿拉伯糖、D-木糖、D-果糖及 D-葡萄糖等几种单糖成分;细胞毒性试验表明,黄秋葵多糖与葡萄糖的细胞毒性相近,属于低毒材料。

关键词:黄秋葵;多糖;结构;细胞毒性

中图分类号:S 649 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)14-0167-04

多糖是来源于高等植物细胞壁、动物细胞膜、微生物细胞壁中的多羟基高分子化合物^[1]。多糖类化合物是当今世界上仅次于煤炭、石油和天然气的第四大能源^[2]。植物多糖往往具有多种生理活性,而且由于其没有细胞毒性,而成为研究热点^[1]。黄秋葵多糖是从药食兼用的植物—黄秋葵果实中提取的一种天然植物多糖,具有降脂、降压、抗癌、抗热应激性、抗疲劳等生理活性^[2]。

现从黄秋葵种子中提取天然黄秋葵多糖,并经过柱纯化、酸水解,研究其单糖组成;并对黄秋葵多糖的细胞毒性进行了研究,以期为黄秋葵多糖的深度开发提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄秋葵种子购自当地农贸市场;萘酚、硫酸、三氟乙酸、甲醇、乙腈均为分析纯(双林化学试剂厂);葡聚糖、鼠李糖、D-木糖、木糖醇、岩藻糖、D-果糖、D-葡萄糖、半乳糖、甘露糖均为标准品(上海西宝生物科技有限公司);Sephadex HW-40C(日本 TOSOH 公司);甲基噻唑基四唑(MTT)、胰蛋白酶均购自 Sigma-Adrich 公司;DMEM(高糖)培养基购自吉诺生物有限公司;小牛血清(FCS)均购自杭州四季青生物工程材料有限公司。SMC-7721 细胞(肝癌细胞)培养于含有 10% 小牛血清的 1640 培养基中,由浙江大学肿瘤免疫所赠送。磷酸缓冲液(PBS)溶液:8.0 g NaCl, 3.4785 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.9 g NaH_2PO_4 , 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 溶于 1 000 mL 蒸馏水;MTT 溶液:5 mg/mL 甲基噻唑基四唑×PBS 液,过滤除菌,避光,20℃ 保存。主要仪器:透析膜(M_w 8 000~14 400)购自 Pierce 公司;FD-1 冰冻干燥

机(北京德天佑科技发展有限公司);VV1800PC 全扫描紫外可见分光光度计(海美谱达仪器有限公司);Thermo Forma 恒温摇床;Sony -80℃ 冰箱;Thermo Multiskan Mk3 酶标仪(Thermo 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 黄秋葵多糖的提纯 取黄秋葵果实若干,加水浸泡,100℃ 回流 4 h(×4),过滤,取滤液,合并滤液,浓缩,滴加乙醇($v:v=1:3$),4 000 r/min 离心,取沉淀,加水透析(M_w :8 000~14 400)48 h,4 000 r/min 离心,取上清,烘干得粗品,将粗品溶于水后,过柱(Sephadex HW-40C),冻干成淡黄色粉末^[3]。

1.2.2 萘酚-硫酸法测定黄秋葵多糖含量 葡萄糖标准曲线:精密称取 0.05 g 葡萄糖标准品,纯净水溶解,定容为 0.5 g/L 的葡萄糖标准溶液,作为储备液。分别移取储备液配置成浓度为 5、15、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。依次移取不同浓度的标准溶液 1.0 mL 于比色管中,分别加入 4.0 mL 2.0 g/L 萘酚-硫酸溶液,冰水浴,加完后,同时放入沸水浴中 10 min,取出冷却,室温放置 10 min。以蒸馏水作空白,于 621 nm 处测吸光度,作标准工作曲线,用最小二乘法得回归方程为: $A=0.0093C+0.0312(R^2=0.9779)$ ^[4]。由于吸光度值随糖浓度的变化呈线性,所以可以用外标一点法测定样品中的糖含量,如下:

$$A_{\text{标准点}}/A_{\text{样品点}} = C_{\text{标准点}}/C_x \quad (1),$$

$$\text{糖含量}(\%) = C_x/C_{\text{原液}} \times 100\% \quad (2),$$

其中, $A_{\text{标准点}}$:标样的吸光度,单位:Abs; $A_{\text{样品点}}$:样品的吸光度,单位:Abs; $C_{\text{标准点}}$:标准点浓度,单位: $\mu\text{g/mL}$; C_x :样品中黄秋葵多糖浓度,单位: $\mu\text{g/mL}$; $C_{\text{原液}}$:样品中黄秋葵多糖表观浓度,单位: $\mu\text{g/mL}$ 。

精密称取黄秋葵多糖干粉若干,加水溶解,100 mL 定容。移取 1.0 mL 溶液按上述操作显色,于 621 nm 处测吸光度。

第一作者简介:闵莉静(1981-),女,硕士,实验师,研究方向为天然产物的提纯与结构修饰。

收稿日期:2012-03-06

1.2.3 凝胶渗透色谱(GPC)测定黄秋葵多糖分子量 以分子量分别为 10 500、43 200、76 900、188 000 Da 的葡聚糖标准品为标准点, GPC 测定保留时间, 作标准工作曲线, 用最小二乘法得回归方程为: $y = -1.5319x + 21.653$ ($R^2 = 0.9955$)。色谱条件: Agilent 1100, SEDEX75 型蒸发光散射检测器(ELSD), 检测器灵敏度: 7, 雾化温度: 55℃, 雾化压力: 3.06 bar, 色谱柱: Tsk-GeL 3000PWXL(7.8 mm×300 mm), 柱温: 30℃, 流动相: 水/N₂, 流速: 1.0 mL/min。

1.2.4 多糖链的酸水解 准确称取黄秋葵多糖样品若干, 加入 2.0 mL 2.0 mol/L 的 CF₃COOH, 110℃, 恒温油浴, 回流 2 h, 每隔 0.5 h 取 1 次样, 至 3.5 h 后, 于水解至 8 h 后再取 1 次样。取出的水解液于 45℃, 低压浓缩, HPLC 检测成分。色谱条件: Agilent 1100, SEDEX55 型蒸发光散射检测器(ELSD), 检测器灵敏度: 5, 雾化温度: 40℃, 雾化压力: 3.0 bar, 色谱柱: HypersilNH 25 μm(4.6 mm×250 mm), 柱温: 25℃, 流动相: 乙腈-水(v:v=82:18), 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 10.0 μL^[5]。

1.2.5 高效液相分析单糖组分 色谱条件: Agilent 1100, SEDEX55 型蒸发光散射检测器(ELSD), 检测器灵敏度: 5, 雾化温度: 40℃, 雾化压力: 3.0 bar, 色谱柱: HypersilNH25 μm(4.6 mm×250 mm), 柱温: 25℃, 流动相: 乙腈-水-甲醇(v:v=85:10:5), 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 10.0 μL。

1.2.6 黄秋葵多糖细胞毒性^[6] 将 Cos-7 细胞接种到 96 孔板上, 5 000 细胞/孔, 培养 24 h。吸去每孔中旧培养液, 黄秋葵多糖和葡萄糖标准品在含 10% FCS 的 DMEM 中分别配制成浓度梯度为 0.010、0.025、0.050、

0.100、0.250、0.500 和 1.000 mg/mL 的溶液。每孔加入上述溶液各 0.15 mL, 4 复孔。糖液与细胞共培养 24 h 后, 吸去旧的培养液, 每孔加入 100 μL 含 5.0 μg/mL MTT 的无血清 DMEM(5 mg/mL MTT 10.0 mL 加入到 90 μL DMEM 中), 37℃培养 4 h。翻板法弃去液体, 每孔加入 100 μL DMSO, 震荡 10 min。在酶标检测仪上, 570 nm 波长处测定 OD 值。同时作好细胞全活对照和细胞全死对照, 均为 6 复孔。

$$\text{细胞存活率}(\%) = (X - X_{0\%}) / (X_{100\%} - X_{0\%}) \times 100\% \quad (3),$$

其中, X: 糖液共培养后测定的 OD 值; X_{0%}: 细胞全死对照 OD 值; X_{100%}: 细胞全活对照 OD 值。

2 结果与分析

2.1 蒽酮-硫酸法测定黄秋葵多糖含量

由表 1 可知, 样品溶液吸光度值随多糖浓度的变化呈线性关系, 用外标一点法测定样品中的多糖含量, 约为 28.15%, 且平行性较好。

表 1 蒽酮-硫酸法测定黄秋葵多糖含量

Table 1 The content of okra polysaccharide with anthrone-sulfuric acid method

编号	原液浓度 /μg·mL ⁻¹	吸光度值 (Abs)	多糖浓度 /μg·mL ⁻¹	多糖含量 /%	平均值 /%
标准点	30	0.2142			
1	188	0.3747	52.48	27.91	28.15
2	188	0.3802	53.25	28.32	
3	188	0.3790	53.08	28.23	

2.2 凝胶渗透色谱(GPC)测定黄秋葵多糖分子量

由图 1 可以看出, 经过柱处理后的黄秋葵多糖馏分纯度较高, 在 t_R 6.194 min 处有 1 个峰, 根据葡聚糖标准曲线计算, 该峰对应分子量约为 191 838.9 Da。

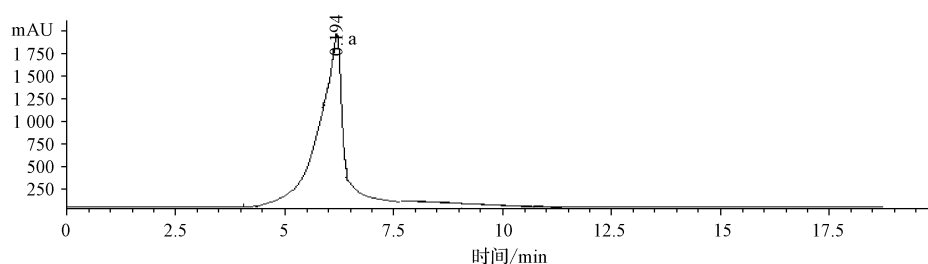


图 1 GPC 测定黄秋葵多糖分子量谱图

Fig. 1 Chromatograms of the molecular weight of okra polysaccharide determined by GPC spectra

2.3 多糖链的酸水解

由图 2 可知, 保留时间 2.4~2.9 min 为 CF₃COOH 峰, 4.9 min 左右为 CH₃CN 峰, 在所有的多糖水解液中不存在二糖, 均为单糖。观察黄秋葵多糖水解系列图可以发现, 随着水解时间的增长, 水解产物变得越来越简单, 这可能是由于水解液中残留酸对水解产物具有降解的破坏作用, 尤其是在水解 8 h 后水解产物已经全部降

解。从整个过程看来, 对于黄秋葵多糖, 水解条件选择应相对温和, 水解时间不宜太长, 一般选择水解时间为 2 h 左右效果最好。对于在保留时间 11~13 min 间几个峰位移的变化, 可能是 D-葡萄糖在稀酸的作用下, 形成烯醇负离子, 进而转变为果糖、甘露糖和葡萄糖的混合物(图 3)。

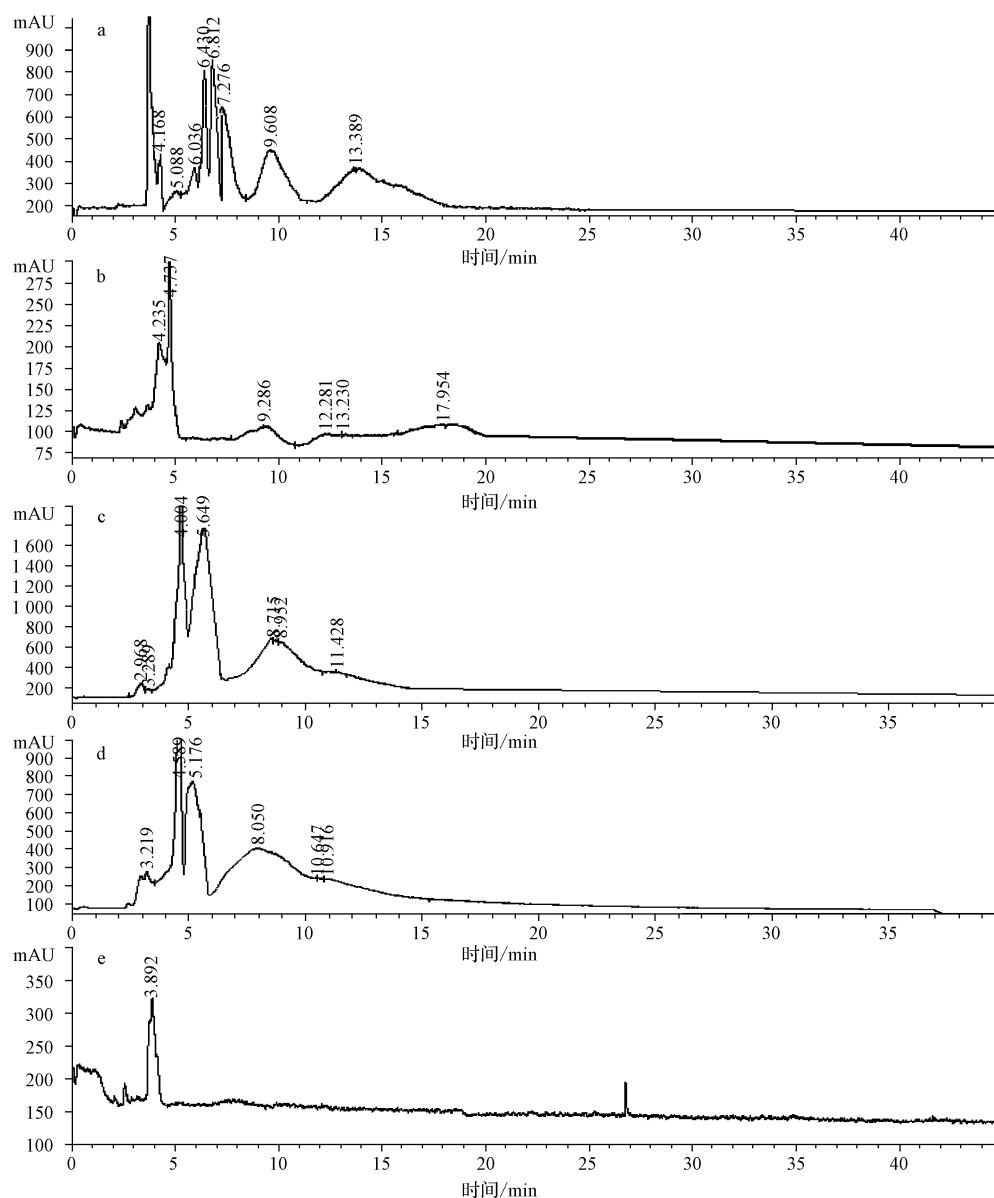


图2 黄秋葵多糖在不同水解时间取样色谱分析结果

注:水解时间依次为:a:2 h;b:2.5 h;c:3 h;d:3.5 h;e:8 h。

Fig. 2 Chromatograms result of okra polysaccharide in series hydrolysis time

Note: The hydrolysis time was a:2 h;b:2.5 h;c:3 h;d:3.5 h;e:8 h.

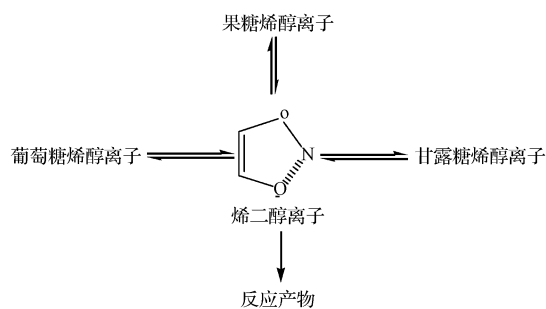


图3 葡萄糖、果糖和甘露糖烯醇化互变

Fig. 3 Interconversion among glucose, fructose and mannose enolization

2.4 高效液相分析单糖组分

考虑到单糖标准品在混合后,保留时间可能会相互影响,所以在对单糖标准品单个进样测定保留时间的基础上,又混合进样测定各单糖在混合组分中各自的保留时间(图4)。由于在黄秋葵多糖酸水解液分时段取样采集数据中,发现各成分保留时间存在粘连现象,所以在单糖组分分析中,在流动相中添加了甲醇,使流动相极性降低,各组分保留时间后移,其中保留时间3.3~3.9 min左右为 CF_3COOH 溶剂峰,5 min左右为流动相中 CH_3CN 峰。经测定,黄秋葵多糖酸水解液中存在鼠李糖、阿拉伯糖、D-木糖、D-果糖及D-葡萄糖等单糖种类。

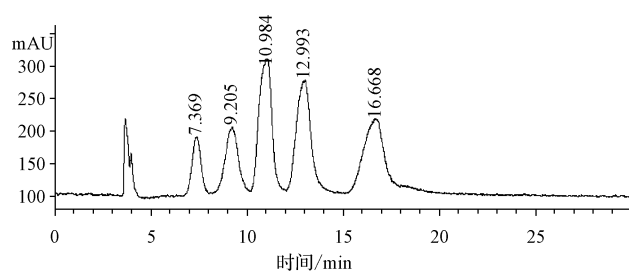


图4 单糖标准品混合进样谱图

Fig. 4 Chromatogram of monosaccharide standard mixture sample

表2 黄秋葵多糖酸水解液中各单糖成分保留时间

Table 2 The retention time of okra monosaccharide ingredients in polysaccharide hydrolysate solution

保留时间 t_R / min	单糖组分
7.014	鼠李糖
8.754	阿拉伯糖
9.957	D-木糖
12.490	D-果糖
15.084	D-葡萄糖

2.5 黄秋葵多糖细胞毒性

由图5可以看出,黄秋葵多糖的细胞毒性与葡萄糖类似,在整个浓度范围内,细胞存活率随着糖液浓度的增加而降低,但在高浓度状态下,细胞存活率仍在60%以上,属于低毒性材料,生物兼容性好。这一结果为黄秋葵多糖的进一步开发利用提供一个很好的试验数据支持。

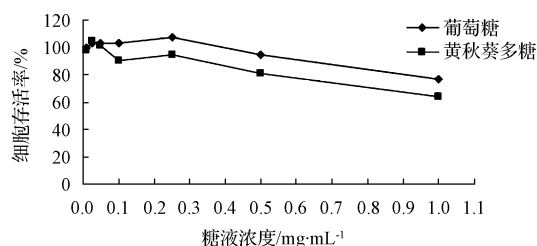


图5 细胞毒性试验数据

Fig. 5 The data of cytotoxicity assay

3 结论与讨论

该试验从黄秋葵种子中提取的黄秋葵多糖,经透析、过柱等纯化处理,冷冻干燥得黄秋葵多糖干粉。以葡萄糖为标准品,蒽酮-硫酸法测定多糖含量,约为28.15%,以葡聚糖为标准品,凝胶渗透色谱测定分子量,约为191 838.9 Da,多糖链经 CF_3COOH 酸水解后,高效液相色谱测定单糖组分,初步确定主要为鼠李糖、阿拉伯糖、D-木糖、D-果糖及D-葡萄糖等几种单糖成分,MTT法测定黄秋葵多糖细胞毒性,对比葡萄糖,该材料细胞毒性较低,生物兼容性较好,有望深度开发利用。

参考文献

- [1] 周静华,左绍远.植物多糖生物学活性研究进展[J].大理学院学报,2012,11(6):36-37.
- [2] 方向晨.生物质在能源资源替代中的途径及前景展望[J].化工进展,2011,30(11):2333-2339.
- [3] 李欣,王玉英.介绍一种药食同源的蔬菜—黄秋葵[J].名优特新,2012(10):50.
- [4] 方积年.多糖分离纯化及其纯度鉴别,分子量测定[J].药学通报,1984(19):622-625.
- [5] 吴东儒.糖类的生物化学[M].北京:高等教育出版社,1987:890.
- [6] Feather M S, Harris J F. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry[J]. R S Tipson and D Horton, 1973(28):161-212.

Study on Polysaccharide Structure Analysis and Cytotoxicity Assay of Okra

MIN Li-jing, LI Jing-fen

(School of Life Sciences, Huzhou Normal College, Huzhou, Zhejiang 313000)

Abstract: Taking the okra seeds as raw material, after extracted okra polysaccharide by boiled alcohol sink method and purified it, okra polysaccharide component and structure, and the cell toxicity were studied. The results showed that the sugar content was 28.15% in the extracts from okra seeds, and the okra polysaccharides were composed of rhamnose, arabian sugar, D-xylose, D-fructose and D-glucose as well as several monosaccharide compositions; cytotoxicity assay experiment showed that the cell toxicity of okra polysaccharide was similar to that of glucose, and it belonged to low virus material.

Key words: okra; polysaccharide; structure; cytotoxicity assay