

女贞子多糖相对分子质量与组成分析

战兴晓, 刘希光*, 刘祥龙, 吕 静, 孙敬林, 孙祥斌

鲁东大学化学与材料科学学院, 山东 烟台 264000

摘 要: 目的 透析进一步纯化女贞子多糖, 通过对女贞子多糖相对分子质量及组成分析, 为探究多糖生物活性与其组成之间的关系提供理论数据。方法 实验以女贞子为研究对象, 采用水提醇沉法提取女贞子多糖, 通过 Sevage 法、过氧化氢、透析等方法纯化多糖, 凝胶渗透色谱分析多糖相对分子质量, 三氟乙酸水解后采用高效液相色谱-示差检测器分析多糖组成。结果 女贞子多糖重均相对分子质量为 10 721, 数均相对分子质量为 10 673, 女贞子多糖由葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖 3 种单糖所组成, 其物质的量比为 9.14 : 8.10 : 5.18。结论 此种方法纯化后的女贞子多糖组成较为均一, 纯度较高, 采用高效液相色谱-示差检测器无需柱前衍生化即可分析多糖中单糖组成。

关键词: 女贞子多糖; 透析; 相对分子质量; 高效液相色谱-示差检测器; 单糖组成

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253 - 2670(2019)18 - 4288 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.006

Molecular weight and composition determination of polysaccharide from *Ligustrum Lucidum*

ZHAN Xing-xiao, LIU Xi-guang, LIU Xiang-long, LV Jing, SUN Jing-lin, SUN Xiang-bin

School of Chemistry and Materials Science, Ludong University, Yantai 264000, China

Abstract: Objective To study the relative molecular mass and composition of *Ligustrum lucidum* polysaccharide purified by dialysis, and provide the theories for the relationship between the biological activity and the internal composition. **Methods** In this paper, *L. lucidum* as an object was studied. Polysaccharide was isolated by water extraction and ethyl alcohol precipitation and purified by Sevage method, hydrogen peroxide and dialysis. After the acidolysis of trifluoroacetic acid, the molecular weight was measured by GPC, and the composition of polysaccharide was analyzed by HPLC-RID. **Results** The *M_w* of polysaccharide was 10 721, and the *M_n* of polysaccharide was 10 673. *L. lucidum* polysaccharide consisted of glucose, rhamnose, and arabinose, the molar ratio of these monosaccharide was 9.14 : 8.10 : 5.18. **Conclusion** The purified polysaccharide composition is more homogeneous, and the monosaccharides of polysaccharides was easily analyzed by HPLC-RID without column derivatization.

Key words: *Ligustrum lucidum* polysaccharide; dialysis; relative molecular mass; HPLC-RID; monosaccharide composition

女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的成熟果实。现代药理研究表明女贞子具有提高免疫力、抗衰老、抗疲劳、降糖、调脂、抗骨质疏松等功效^[1-3]。女贞子多糖是女贞子基础物质组成之一, 是生物活性大分子, 具有抗菌、抗衰老、增强免疫等多种生物活性。当前, 国内外专家学者主要偏向于研究女贞子苷、醇、酸的提取^[4-6]及女贞子多糖的生物活性^[7-8], 但对女贞子多糖的脱蛋白工艺及单糖组成方面鲜有报道, 对女贞子多糖的相对分子质量大小及分布未见报道。本课题采用传统多糖

提取工艺——水提醇沉法提取女贞子多糖^[9], 采用透析法进一步纯化多糖, 并采用相关分析技术研究了女贞子多糖的相对分子质量大小及多糖组成。本实验丰富了女贞子多糖科学, 不仅为其他药材中多糖组成分析方法的选择提供了理论依据, 同时也为进一步探究女贞子多糖的外在生物活性与其相对分子质量、聚合度、组成之间的关系提供了基础数据。

1 仪器与材料

RE-3000 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; LD-200 高速多功能粉碎机, 浙江永康市红太阳机电

收稿日期: 2019-02-03

作者简介: 战兴晓 (1995—), 男, 研究方向为天然药物中活性物质提取与活性分析。Tel: 18810667513 E-mail: zhanxingxiao1995@126.com

*通信作者 刘希光, 男, 教授, 研究方向为天然药物中活性物质提取与活性分析。Tel: 13963882897 E-mail: xgliu1986@163.com

有限公司; TGL-16M 台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; LC-20AT 高效液相色谱, 岛津检测技术有限公司; venusil 糖柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 天津博纳艾杰尔科技有限公司; Waters1515 凝胶渗透色谱, 美国 Waters 公司; 聚偏氟乙烯超滤膜, 上海亚兴净化材料厂。

石油醚、无水乙醇、四氯化碳、过氧化氢等试剂均为分析纯, 产自天津市大茂化学试剂厂; 单糖标准品均产自国药集团化学试剂有限公司, 鼠李糖 (批号 63010234、质量分数 99.0%)、阿拉伯糖 (批号 XW00877291、质量分数 99.0%)、甘露糖 (批号 63009013、质量分数 99.0%)、果糖 (批号 63003034、质量分数 99.0%)、葡萄糖 (批号 63005518、质量分数 99.0%)。

实验所用的女贞子为烟台芝罘区所产, 经鲁东大学化学与材料科学学院柳全文副教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的果实。

2 方法

2.1 女贞子多糖提取^[10]

选取晒干后女贞子若干, 经纯水多次洗涤后红外辐射干燥箱干燥, 干燥后的女贞子经粉碎机粉碎过 40 目筛, 再次烘干得粉末状女贞子, 经 10 倍质量石油醚回流 2 次, 每次 3 h, 减压抽滤, 滤渣经 10 倍质量无水乙醇回流 2 次, 每次 3 h, 经过初步除杂后的女贞子粉末放入干燥箱中干燥至乙醇挥发完全。在料液比 1:20、温度 70 °C、提取时间 3 h、提取次数 3 次的条件下提取多糖, 减压抽滤, 将得到的提取液旋转浓缩至原体积的 1/5, 冷却至常温^[9]。改变提取温度, 探究其温度对多糖提取率的影响。

2.2 女贞子多糖纯化

综合考虑 2 种脱蛋白方法对于女贞子多糖脱蛋白率及多糖保留率的影响, 选用 Sevage 法脱蛋白。加入预先配制好的 Sevage 溶液 (正丁醇-四氯化碳 1:4), 按照多糖浓缩液-Sevage 溶液 5:1 的体积比加入, 充分震荡 30 min, 静置, 离心除去中下层凝胶变性蛋白, 重复多次, 直至中层无凝胶状蛋白为止, 经紫外分光光度计检测在 280 nm 处无吸收^[11]。5 000 透析袋中透析 24 h 以除去小分子杂质, 利用活性炭在 70 °C 下保温 4 h 初步脱去色素。冷却至 40 °C, 逐滴滴加过氧化氢, 恒温水浴保温 4 h 氧化脱色。旋蒸浓缩, 加入无水乙醇至体积分数为 50%, 4 °C 环境下静置过夜, 离心得多糖沉淀, 乙醇、丙酮多次洗涤, 真空干燥, 密封保存。离心后的清液继续

加入乙醇得体积分数为 70%、80% 的多糖沉淀。

2.3 女贞子多糖相对分子质量分布测定

分析天平称取 10~20 mg 女贞子多糖, 加入 5 mL 左右的去离子水, 震荡溶解多糖, 静置 12 h, 取上清溶液, 采用水为流动相, 标准曲线则以不同相对分子质量的葡聚糖为标准品, 测定多糖相对分子质量分布。

2.4 女贞子多糖组成分析^[12-14]

2.4.1 单糖标准液及单糖标准混合溶液配制 分别精确称取鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、果糖、葡萄糖定容于 10 mL 量瓶中, 经 0.45 μm 超滤膜超滤后配成 6 mg/mL 左右的单糖标准溶液。精确称取鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、果糖、葡萄糖定容于 25 mL 量瓶中, 经过 0.45 μm 超滤膜超滤后配成 4 mg/mL 左右的单糖标准混合溶液。

2.4.2 多糖样品水解 称取精制多糖 6 mg 于 8 mL 安瓿瓶中, 加入 3 mol/L 的三氟乙酸溶液 8 mL, 充入氮气后酒精喷灯封口, 于 115 °C 下水解 8 h, 冷却至室温, 将水解液转移到 25 mL 圆底烧瓶中, 在 40 °C 下减压蒸馏将三氟乙酸蒸出, 旋蒸液中加入少许甲醇继续旋蒸确保三氟乙酸完全除尽, 加入适量去离子水溶解单糖, 定容至 10 mL 量瓶中, 经 0.45 μm 聚偏氟乙烯超滤膜超滤后密封放置。

2.4.3 高效液相色谱测试条件 色谱柱: venusil 糖柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 83% 乙腈 (色谱纯), 进样量 10 μL, 体积流量 1 mL/min, 柱温 40 °C; 检测器: 示差折光检测器 (RID)。

3 结果与讨论

3.1 女贞子多糖提取率分析

多糖提取率主要受料液比、提取温度、提取时间及提取次数 4 个方面的影响。王阳阳等^[15]研究发现温度对女贞子多糖的提取率影响较大, 温度改变多糖提取率可由 1.30% 提升到 3.18%, 而料液比及提取时间对于多糖提取率影响相对较小。基于对实验成本及后处理几个因素的考虑, 最佳料液比及提取时间的确定主要参照了相关文献报道的女贞子多糖最佳提取条件: 料液比 1:20、提取时间 3 h^[15-16], 并在此条件下着重探究多糖的最佳提取温度及提取次数。水提法在不同温度下的多糖提取率见表 1, 由表 1 可见, 水提法的多糖提取率较高, 多糖提取率保持在 3% 左右。在料液比 1:20、回流时间 3 h 条件下, 第 1 次回流后所提取的多糖量占总提取量的 70% 左右, 而在第 3 次回流后所提取的多糖量仅

表 1 多糖提取率

Table 1 Polysaccharide extraction yield

样品	样品量	提取温度/℃	提取时间/h	1 次提取多糖总量/g	2 次提取多糖总量/g	3 次提取多糖总量/g	多糖总提取率/%
1	109.52	70	3	2.128 7	2.874 6	3.121 3	2.85
2	83.00	75	3	1.857 5	2.376 0	2.517 0	3.03
3	62.64	80	3	1.492 4	1.946 5	2.064 3	3.30
4	36.01	85	3	0.824 5	1.008 6	1.164 6	3.23

占 5%，因此选用回流 3 次作为多糖的最佳提取次数。对于温度的影响，随着温度的升高，多糖的产率逐渐升高，80 ℃下多糖提取率最高为 3.30%，高于相关文献报道^[15,17]，说明此提取工艺较优，但随着温度的继续升高多糖提取率反而下降，这可能是由于温度过高导致部分多糖分解导致产率降低。

3.2 女贞子多糖凝胶色谱谱图分析

多糖相对分子质量分布是多糖科学研究中的重要内容之一^[18]。采用乙醇分级沉降所得到的多糖其生物活性有很大的差异，这是由于多糖的活性受其聚合度及相对分子质量影响导致，可通过相对分子质量大小估算出多糖中所含单糖的数量。凝胶色谱是多糖相对分子质量分布测定中最为常用的方法，一般采用不同相对分子质量的葡聚糖为标准品绘制标准曲线，根据相应保留时间测定多糖的相对分子质量。在凝胶色谱图中，能够得到多糖的重均相对分子质量 (M_w) 及数均相对分子质量 (M_n)， M_w/M_n 称为相对分子质量分布，它反映多糖的纯度，在谱图上则以洗脱峰的宽窄表现出来。 M_w/M_n 越接近于 1，表明提取的女贞子多糖相对分子质量分布越集中，纯度越高。图 1 为女贞子多糖凝胶色谱图，多糖相对分子质量呈正态分布， M_n 为 10 673， M_w 为 10 721， $M_w/M_n=1.00$ ，说明水提醇沉法提取的多糖杂质较少，组分较为均一，相对分子质量分布较

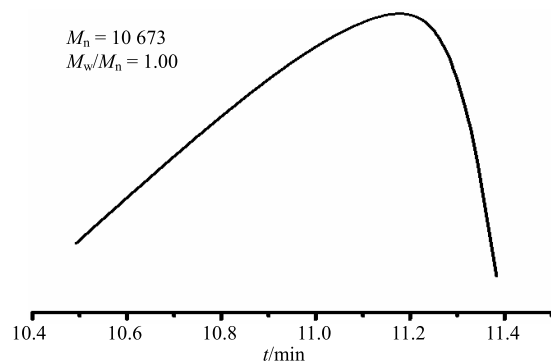


图 1 女贞子多糖凝胶色谱图

Fig. 1 Gel chromatogram of *L. lucidum* polysaccharide

为集中。

3.3 女贞子多糖水解液高效液相色谱谱图分析

不同种类的单糖因在糖柱中的保留时间不同而依次出峰。图 2 为在上述测试条件下鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖标准混合溶液的液相色谱图，图 3 为女贞子多糖水解液在上述条件下的液相色谱图。通过保留时间可对单糖进行定性分析，由表 2 可见，标准混合液与多糖水解液中单糖 HPLC 保留时间对比，3 种单糖在单糖标准液、单糖标准混合溶液、多糖水解液中相对保留时间一致，说明此法定性效果较好。在液相色谱图中，峰面积与质量浓度呈正比关系，因此通过峰面积可对单糖进行定量分析，由表 3 可见，女贞子多糖中葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖物质的量比为 9.14:8.10:5.18。有文献称女贞子多糖含有 5 种单糖^[18]，但在样品水解液液相色谱图中没有果糖和甘露糖的洗脱峰，究其原因可能是由于示差折光检测器检出限较高，灵敏度较低，在多糖样品处理过程中，由于多糖水解量比较少，或多糖水解不完全，导致果糖与甘露糖的浓

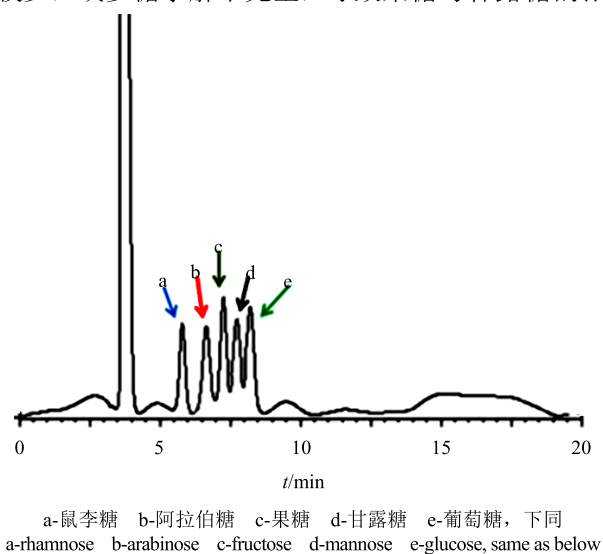


图 2 单糖混合标准溶液液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatography of standard mixed liquid of monosaccharides

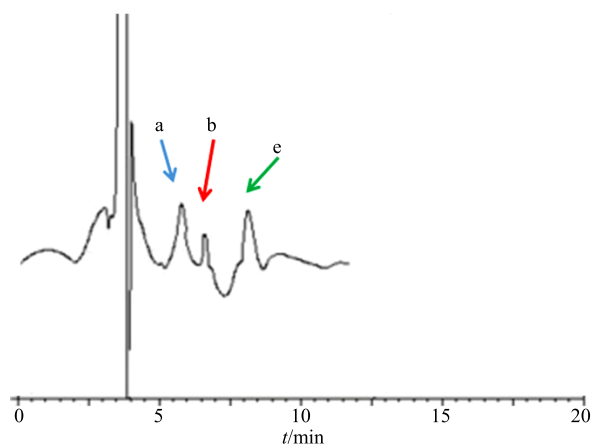


图 3 多糖水解液液相色谱图

Fig. 3 Liquid chromatogram of polysaccharide solution

度过低而不易被检测出来, 有关资料显示女贞子多糖中还含有甘露糖与果糖 2 种单糖, 但其所检测出的 3 种单糖相比较含量极少, 这更加证明了这一点。

4 讨论

中药是大自然赋予人类的瑰宝, 因含有多种生物活性而被广泛应用于临床医学上。多糖是中药组成的基础物质之一, 是药物活性大分子, 近年来, 不少专家学者都致力于中药中多糖提取及活性方面的研究。传统多糖组成分析方法主要有气相色谱法和高效液相色谱-紫外检测器, 但多糖本身难气化、在紫外光区无吸收等特点, 导致其首先需柱前衍生化生成易气化或有紫外吸收的衍生物^[19], 这无疑增

表 2 标准单糖与女贞子多糖水解液的 HPLC 保留时间对比

Table 2 Comparison of HPLC retention time between standard sugar and *L. lucidum* polysaccharide solution

标准单糖	t_R/min	标准混合溶液	t_R/min	多糖水解液	t_R/min
鼠李糖	5.796	鼠李糖	5.798	鼠李糖	5.802
阿拉伯糖	6.647	阿拉伯糖	6.655	阿拉伯糖	6.625
葡萄糖	8.237	葡萄糖	8.227	葡萄糖	8.252

表 3 标准混合溶液与多糖水解液的 HPLC 峰面积分析

Table 3 Analysis of HPLC peak area of standard sugar and *L. lucidum* polysaccharide solution

标准混合溶液	峰面积	质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	多糖水解液	峰面积	质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
鼠李糖	352 787	3.892	鼠李糖	120 466	1.329
阿拉伯糖	455 723	3.964	阿拉伯糖	89 328	0.777
葡萄糖	545 114	4.576	葡萄糖	196 079	1.646

加了工作量, 导致测定结果准确率降低, 如何简单地快速分析多糖组成是多糖科学研究的重要内容之一^[20]。本实验在料液比为 1:20, 提取时间为 3 h 条件下提取多糖, 并以此条件探究了女贞子多糖的最佳提取次数 3 次和最佳提取温度 80 °C, 采用 Sevage 试剂、过氧化氢对多糖进行了提纯, 透析法进一步除去小分子杂质后, 其多糖提取率可达 3.30%。经凝胶色谱分析, 多糖相对分子质量分布为 1.00, 说明提取后的多糖组分相对分子质量分布较为集中, 组分较为均一, 杂质较少。改进了传统多糖组成分析方法, 采用高效液相色谱-示差折光检测器 (HPLC-RID), 无需柱前衍生化测定了女贞子多糖中含量较高的几种单糖, 此法操作简单, 所得数据准确合理。女贞子多糖中葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖含量较高, 3 种单糖物质的量比为 9.14:8.10:5.18。

参考文献

- [1] 刘亭亭, 王 萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 228-234.
- [2] 张明发, 沈雅琴. 女贞子抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 536-542.
- [3] 郭鱼波, 马如风, 王丽丽, 等. 女贞子治疗骨质疏松作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 851-856.
- [4] Xia E Q, Yu Y Y, Xu X R, et al. Ultrasound-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait [J]. *Ultrasonics Sonochem*, 2012, 19(4): 772-776.
- [5] 李元圆, 何玉铃, 张永勋. HPLC 法同时测定台湾市售女贞子中红景天苷、女贞子苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 49(2): 230-233.
- [6] 任 爽, 李 铮, 王京辉, 等. 中药女贞子饮片中 8 个成分的含量比较研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8):

- 1393-1402.
- [7] 张振明, 蔡曦光, 葛 斌, 等. 女贞子多糖的抗氧化活性研究 [J]. 中国药师, 2005, 8(6): 489-491.
- [8] 李 璘, 邱荣丽, 程 革, 等. 女贞子多糖抗肿瘤作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1619-1922.
- [9] 朱扶蓉. 中药多糖提取纯化工艺研究概述 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(12): 1016-1018.
- [10] 张 岩, 马丽娜, 王 鹏, 等. 苦豆子多糖脱蛋白工艺比较 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(8): 921-925.
- [11] Kuang H X, Xia Y G, Liang J, *et al.* Fast classification and compositional analysis of polysaccharides from TCMS by ultra-performance liquid chromatography coupled with multivariate analysis [J]. *Carbohydr Polymers*, 2011, 84(4): 1258-1266.
- [12] 郭守军, 杨永利, 余建保, 等. 高效液相色谱法分析猪屎豆种子胶多糖中的单糖组成 [J]. 广西植物, 2010, 30(3): 422-425.
- [13] 胡 坪, 乔晚芳, 沈骏文, 等. 麦冬多糖单糖组成的分析方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 36(10): 50-56.
- [14] 郭 丹, 危 婷, 王向阳, 等. 星点设计-效应面优化法对女贞子多糖的提取工艺研究 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(8): 45-48.
- [15] 王阳阳, 冯清清, 武 蓉, 等. 女贞子多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性研究 [J]. 农产品加工 (学刊), 2012, 292(9): 41-44.
- [16] 黄宝旭, 刘军海, 张 静. 响应面分析法优化女贞子水溶性多糖提取工艺 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(11): 72-76.
- [17] 颜 军, 易 勇, 邬晓勇, 等. 黄芪多糖的相对分子量测定及单糖组成分析 [J]. 食品科技, 2012, 37(12): 278-283.
- [18] 张明月, 邹一可, 王彩云, 等. 女贞子多糖的提取工艺及单糖组成 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 87-89.
- [19] Wang X, Zhang L H, Wu J L, *et al.* Improvement of simultaneous determination of neutral monosaccharides and uronic acids by gas chromatography [J]. *Food Chem*, 2017, 220(1): 198-207.
- [20] Chen Z, Zhang W, Tang X Y, *et al.* Extraction and characterization of polysaccharides from Semen Cassiae by microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with spectroscopy and HPLC [J]. *Carbohydr Polymers*, 2016, 44(1): 263-270.