

• 制剂与炮制 •

不同提取方法对宁夏枸杞多糖化学组成
及生物活性的影响研究宰清勇^{1,2}, 陈华国^{1,2}, 谢文^{1,2}, 周欣^{1,2*}

(1. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001;

2. 贵州师范大学 贵州省药物质量控制及评价技术工程实验室, 贵州 贵阳 550001)

[摘要] 以宁夏枸杞为研究对象, 采用不同提取方法选择性提取得到 5 种多糖组分 (LBP-1~LBP-5), 探索提取方法对 LBP 的化学组成、结构特征和生物活性的影响。化学组成分析结果表明 5 种 LBP 均未检出生物碱, 总多糖质量分数在 (81.95%±1.6%)~(92.96%±0.76%), 糖醛酸质量分数在 (8.26%±0.46%)~(24.81%±0.46%), 蛋白质质量分数在 (0.06%±0.03%)~(1.35%±0.13%)。5 种 LBP 单糖组成成分基本相同, 主要包括葡萄糖、木糖和半乳糖, 但是不同单糖之间含量比例有显著性差异。红外光谱分析结果表明 5 种 LBP 都具有多糖的典型红外光谱特征。核磁共振特征光谱分析结果表明 5 种 LBP 都存在 α 和 β 2 种构型。此外, LBP-2、LBP-3 和 LBP-4 中还存在能增强多糖活性的三螺旋结构。活性筛选结果表明 5 种 LBP 的生物活性侧重点具有明显差异。其中, LBP-3 表现出更高的脂质氧化清除率, 抗氧化活性与阳性对照组相当; LBP-4 对 α -淀粉酶的抑制率和乙醇脱氢酶的激活率强于其他组分, 且质量浓度为 10 g·L⁻¹ 时, 对 α -淀粉酶的抑制率略高于阳性对照组; LBP-2 对 α -葡萄糖苷酶以及透明质酸酶展现出更强的抑制活性。该研究可为枸杞多糖的精准化开发与利用提供理论依据。

[关键词] 枸杞多糖; 不同提取方式; 化学组成; 生物活性

Effects of different extraction methods on chemical compositions and
biological activities of polysaccharides from *Lycium barbarum*ZAI Qing-yong^{1,2}, CHEN Hua-guo^{1,2}, XIE Wen^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Engineering Laboratory for Quality Control & Evaluation Technology of Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] In this study, five polysaccharides from *Lycium barbarum* (LBPs) (LBP-1~LBP-5) were selectively extracted by different extraction methods, and the chemical composition, structural characteristics, and biological activities of LBPs were explored. The results of chemical composition analysis showed that alkaloids were not detected in the five LBPs. The total polysaccharide content was (81.95%±1.6%)~(92.96%±0.76%), the uronic acid content was (8.26%±0.46%)~(24.81%±0.46%), and the protein content was (0.06%±0.03%)~(1.35%±0.13%). The monosaccharide compositions of the five LBPs were basically same, mainly including glucose, xylose, and galactose. However, there was significant difference in the content ratio of different monosaccharide. The results of infrared spectra analysis indicated that the five LBPs had typical infrared spectral characteristics of polysaccharides. The results of nuclear magnetic resonance characteristic spectrum analysis revealed that the five LBPs had two configurations of α and β . Meanwhile, there were triple helix structures in LBP-2, LBP-3, and LBP-4, which enhanced the activities of polysaccharides. The

[收稿日期] 2022-05-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (31570358); 贵州省高层次创新人才培养项目 [黔科合人才 (2015) 4033 号]

[通信作者] * 周欣, 博士, 教授, 研究方向为中药质量控制、药物体内代谢以及药品、保健食品开发, Tel: (0851) 86690018, E-mail: alice9800@sina.com

[作者简介] 宰清勇, 硕士研究生, E-mail: 1599651508@qq.com

results of activities screening suggested that the biological activities of the five LBPs were significantly different. LBP-3 showed the highest lipid oxidation clearance rate, and its antioxidant activity was equivalent to that of the positive control group. The inhibitory rate of LBP-4 on α -amylase and its activation rate of alcohol dehydrogenase were better than those of other fractions, and the inhibitory rate of LBP-4 on α -amylase was slightly higher than that of the positive control group when the mass concentration was $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. LBP-2 showed stronger inhibitory activity against α -glucosidase and hyaluronidase. This study provides references for the precise development and utilization of LBPs.

[Key words] polysaccharides from *Lycium barbarum*; different extraction methods; chemical compositions; biological activities

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220620.301

植物多糖是一类生物活性显著的天然产物,也是当前的研究热点之一。同一植物中的多糖类成分通常由相对分子质量从几百到几万甚至几十万、上百万的糖类物质组成,属于一类相对分子质量跨度非常大的混合物。因此,针对同一植物采用不同的提取方法获得的多糖其组成和结构特征会存在潜在的、显著的差异,进而影响生物活性。然而,目前研究者们对植物中的多糖大多采用单一的提取方法进行提取,并经过纯化后开展进一步的结构表征、生物活性测试等研究。这些研究工作虽然对于特定活性的药效物质发现具有积极意义,但是,由于提取物的化学组成与生物活性息息相关,当前对多糖类物质的研究方式还有改进空间,可以从提取物化学组成与生物活性关联性的精准度方面开展相关研究,从而更加有利于植物多糖的深度开发与利用。在此背景下,针对同一植物,对不同提取方式下获得的多糖组分进行化学组成、结构特征以及生物活性等方面的对比分析,探寻其共性和差异性就显得尤为必要,有利于相关植物的精准化开发与利用。本研究以宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 为示范对象,设计了冷水浸提、冷水浸提后的滤渣沸水提取、50%乙醇溶液超声辅助提取、50%乙醇溶液超声辅助提取后的滤渣 25%乙醇溶液超声辅助提取、热水浸提等 5 种方法提取出 5 种枸杞多糖(polysaccharides from *Lycium barbarum*, LBPs),比较它们之间的化学组成和结构差异,并对 5 种 LBPs 的脂质抗氧化活性、抑制 α -淀粉酶活性、抑制 α -葡萄糖苷酶活性、抑制透明质酸酶活性和激活乙醇脱氢酶活性进行对比分析,探寻其共性和差异性,以期对枸杞多糖的精准化开发利用提供理论支持。

1 材料

Agilent 1260 infinity II 型高液相色谱系统(安捷伦科技有限公司);IR Affinity-1S 型傅立叶变换红外光谱仪(日本岛津公司);Varian INOVA 400 MHz

型核磁共振仪(美国瓦里安公司);XS105DU 型十万分之一分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Max Plus 384 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);FD-80 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

石油醚(批号 20211001429)、无水乙醇(批号 20210901)均购于天津致远化学试剂有限公司;1-苯基-3-甲基-吡唑啉酮(PMP,批号 RH291414)购于上海易恩化学技术有限公司;三氯乙酸(TCA,批号 20201080188)购于天津市科密欧化学试剂有限公司;木瓜蛋白酶(批号 422P021)、大豆卵磷脂(批号 1008V022)、硫代巴比妥酸(TBA,批号 830V033)、 α -葡萄糖苷酶(批号 413N011)、 α -淀粉酶(批号 1210W021)、阿卡波糖(批号 330M031)、透明质酸酶(批号 421D0211)、乙醇脱氢酶(批号 128G024)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+ ,批号 113Z029)均购于北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖(批号 20015)、葡萄糖醛酸(批号 20015)、甘露糖(批号 20485)、半乳糖(批号 20483)、木糖(批号 21471)、半乳糖醛酸(批号 20444)、鼠李糖(批号 20521)均购于贵州迪大科技有限公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS,批号 2038149)购于上海逍鹏生物科技有限公司。

宁夏枸杞原药材购于贵州省贵阳市同济堂药店(产地宁夏中宁,批号 201001),经贵州师范大学药物质量控制及评价技术工程实验室陈华国教授鉴定为茄科植物宁夏枸杞 *L. barbarum* 的干燥成熟果实。

2 方法

2.1 枸杞多糖提取与纯化

取 3 kg 宁夏枸杞经干燥后打磨成粉,依次加入石油醚和 80%乙醇溶液 6 L(料液比 1:2),各回流脱脂 2 h,水浴加热挥干溶剂后,平均分成 3 份,提取方法见图 1。滤液合并浓缩后调节 pH 到 6~7,然后加入 3%木瓜蛋白酶,50 °C 水浴 45 min,离心后取上清液 1:1 加入质量浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCA 溶液,室

温静置 20 min, 离心回收上清液, 重复操作 5 次。将上清液过截留相对分子质量为 8~14 kDa 的滤膜以

除去小分子物质, 然后加入 4 倍量的无水乙醇, 冰箱静置 12 h, 离心收集沉淀, 冷冻干燥, 即得 LBP_s。

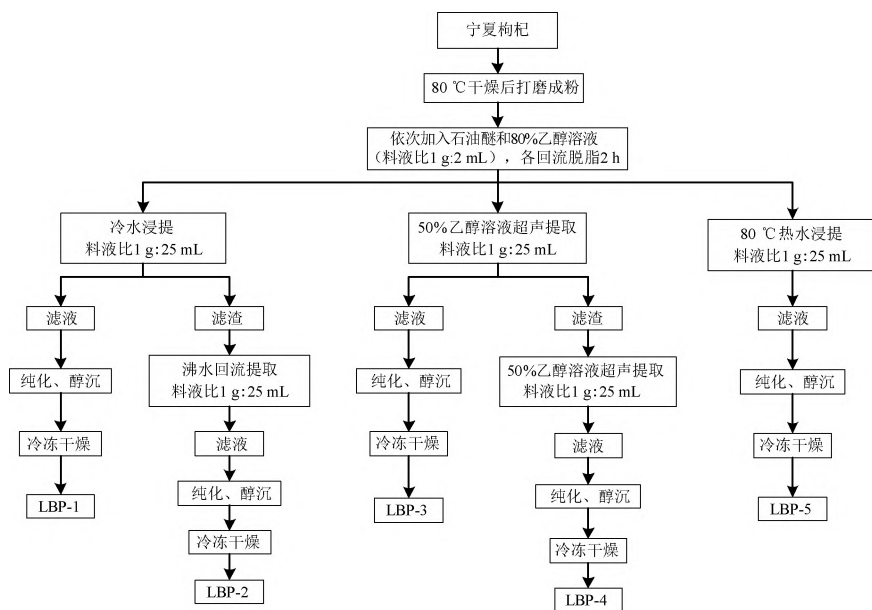


图 1 枸杞多糖提取流程

Fig. 1 Extraction flow of polysaccharides from *Lycium barbarum*

2.2 枸杞多糖化学组成测定

2.2.1 总多糖含量测定 以葡萄糖为对照品, 在参考文献的基础上, 采用苯酚-硫酸法测定 5 种 LBP_s 的总多糖含量^[1]。

2.2.2 蛋白质含量测定 以牛血清蛋白为对照品, 在参考文献的基础上, 采用考马斯亮蓝 G-250 法测定 5 种 LBP_s 蛋白质含量^[1]。

2.2.3 糖醛酸含量测定 以葡萄糖醛酸为对照品, 在参考文献的基础上, 采用硫酸-咔唑法测定 5 种 LBP_s 的糖醛酸含量^[1]。

2.2.4 生物碱检测 以碘化铋钾为沉淀试剂, 在参考文献的基础上, 定性检测 5 种 LBP_s 是否存在生物碱^[2]。

2.3 枸杞多糖结构特征

2.3.1 刚果红染料测定三螺旋结构 将各组分多糖样品溶液(1 g·L⁻¹) 与等浓度的刚果红溶液 1:1 混合均匀, 然后加入一定体积的 NaOH 溶液, 使溶液中 NaOH 终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol·L⁻¹, 室温放置 20 min 后, 以纯水代替样品作为对照, 在 400~600 nm 进行扫描。然后以 NaOH 浓度(mol·L⁻¹) 为横坐标, 以最大吸收波长(λ_{max}) 为纵坐

标作图^[3]。

2.3.2 单糖组成分析 采用 PMP 柱前衍生化 HPLC 分析单糖组成^[4]。分别取 10 mg 各组分多糖样品, 分别加入 3 mol·L⁻¹ HCl 溶液完全酸水解, 然后与单糖对照品一起用 0.5 mol·L⁻¹ PMP 溶液衍生化, 得到的反应产物进液相色谱分析。

色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm), 流动相 PBS(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~28 min, 16% B; 28~45 min, 16%~19% B; 45~48 min, 19%~25% B; 48~55 min, 25% B), 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 245 nm, 柱温 30 °C。

2.3.3 红外光谱分析 将干燥的各组分多糖样品分别与 KBr 研磨压片, 在扫描范围 4 000~400 cm⁻¹ 采集 LBP_s 的官能团信息。

2.3.4 核磁共振分析 分别取 15 mg 各组分多糖样品溶于 500 μL D₂O, 将多糖溶液移入核磁管中, 在核磁共振波谱仪上采集 LBP_s 的一维氢谱图和二维碳谱图, 化学位移用 δ 表示。

2.4 体外生物活性测定

2.4.1 抗氧化活性测定 参照 CHEN F 等^[5] 方法,

稍作修改。在试管中依次加入 1 mL 样品溶液和 1.8 mL 大豆卵磷脂溶液(1 g·L⁻¹),将混合物在 37 °C 恒温水中反应 15 min,之后加入 0.5 mL TCA 溶液(200 g·L⁻¹)、0.5 mL TBA 溶液(8 g·L⁻¹)。反应在沸水浴中进行 15 min,冷却到室温,离心(3 500 r·min⁻¹,10 min)。取上清液在 532 nm 波长处测定吸光度 A ,以 Vit C 作为阳性对照,按公式(1)计算脂质过氧化的清除率。

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

其中 A_x 为加入样品后测得的吸光度; A_0 为同体积的纯水代替样品测得的吸光度; A_{x0} 为样品溶液本身的吸光度。

2.4.2 对 α -葡萄糖苷酶活性的影响 参照 CHEN J C 等^[6]方法,稍作修改。取 50 μ L 样品溶液和 25 μ L α -葡萄糖苷酶溶液(100 U·L⁻¹)混合,37 °C 下反应 10 min,之后加入 25 μ L 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(1.5 mmol·L⁻¹)。充分混匀后于 37 °C 下反应 30 min,加入 100 μ L 碳酸钠溶液(0.2 mol·L⁻¹)终止反应。在 405 nm 波长处测定吸光度 A ,以阿卡波糖作为阳性对照,按公式(2)计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A_{c2} - (A_1 - A_{c1})}{A_0 - A_{c2}} \times 100\% \quad (2)$$

其中 A_1 为加入样品后测得的吸光度; A_0 为用同体积的纯水代替样品溶液测得的吸光度; A_{c1} 为用同体积 PBS 代替酶液测得的吸光度; A_{c2} 为用同体积的 PBS 和纯水代替酶液和样品溶液测得的吸光度。

2.4.3 对 α -淀粉酶活性的影响 参照 FAN M H 等^[7]方法,稍作修改。取样品溶液与 α -淀粉酶溶液(0.5 g·L⁻¹)各 100 μ L 于具塞试管中,混匀后于 37 °C 反应 20 min,再向混合液中加入 100 μ L 可溶性淀粉溶液(10 g·L⁻¹),37 °C 下反应 5 min,加入 200 μ L DNS 试剂,沸水浴加热 5 min,于冰水浴中冷却并加入 2 mL 纯水稀释。在波长 540 nm 处测定吸光度 A ,以阿卡波糖作为阳性对照,按公式(2)计算 α -淀粉酶抑制率。

2.4.4 对透明质酸酶活性的影响 参照 MÖLLER S 等^[8]方法,稍作修改。分别取样品溶液、透明质酸酶溶液(1 g·L⁻¹)和透明质酸钠溶液(3.44 g·L⁻¹)各 100 μ L,混匀后于 37 °C 反应 15 min,再向混合液中加入 2 mL 含十六烷基三甲基溴化铵(25 g·L⁻¹)的

NaOH(20 g·L⁻¹)溶液终止反应。15 min 后在波长 400 nm 处测定吸光度 A ,将公式(2)中的 PBS 替换为乙酸-乙酸钠缓冲溶液,计算透明质酸酶抑制率。

2.4.5 对乙醇脱氢酶活性的影响 采用改良后的瓦勒-霍赫(Valle-Hoch)法检测 LBP 对乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase,ADH)的活性。在 96 孔测定板中依次加入 100 μ L 焦磷酸钠缓冲液(pH 8.8),70 μ L NAD⁺溶液 2 mmol·L⁻¹,35 μ L 乙醇(2 mol·L⁻¹),20 μ L 各组分枸杞多糖溶液,混合后在 35 °C 下加盖温育 5 min,然后立即加入 20 μ L ADH 溶液(1 U·mL⁻¹)。摇匀后立即在 340 nm 处测定吸光度,每隔 10 s 记录 1 次,连续测定 5 min^[9]。以纯水代替多糖样品溶液作为空白组。以 A_{340} 对时间作图,取反应初始时线性部分,计算每分钟 A_{340} 的增加值,根据 NAD⁺在 340 nm 处的摩尔消光系数为 6.20,按公式(3)计算酶活力,ADH 的活性以每分钟 NADH 生成的纳摩尔数表示。按公式(4)计算抑制率(激活率)。

$$\text{ADH 活性} = \Delta A_{340} \times \frac{\text{反应总体积}}{\text{酶量}} \times \frac{10^6}{6.2 \times 10^3} \quad (3)$$

$$\text{抑制率(激活率)} = \frac{\text{对照组酶活性} - \text{加药测定组酶活性}}{\text{对照组酶活性}} \times 100\% \quad (4)$$

2.5 数据处理

数据处理采用 MestReNova、Origin2019、Graph-Pad Prism 7、SPSS 20 等软件进行分析。

3 结果

3.1 不同提取方法得到的枸杞多糖化学组成

宁夏枸杞经过干燥粉碎、脱脂除去极性小分子后,采用不同方法提取,经过除蛋白、纯化得到的 5 种 LBP 其化学组成测定结果见表 1。葡萄糖标准曲线方程为 $Y = 5.1762X + 0.1068$,相关系数 $R^2 = 0.9991$,线性关系良好;牛血清蛋白质标准曲线为 $Y = 4.2584X + 0.1791$,相关系数 $R^2 = 0.9944$,线性关系良好;葡萄糖醛酸标准曲线为 $Y = 5.2456X + 0.1$,相关系数 $R^2 = 0.9992$,线性关系良好。LBP-4 总多糖含量(葡萄糖当量)最高,LBP-5 的总多糖含量最低。LBP-5 与 LBP-3 的总多糖含量无显著性差异,但 LBP-3 的总多糖含量显著低于其他 3 个组分($P < 0.05$),可能是因为在提取过程中引入了小分子物质和其他成分,使得其组分更加复杂,提高了分离纯化的难度。5 种 LBP 的蛋白质质量分数在 $(0.06\% \pm 0.03\%) \sim (1.35\% \pm 0.13\%)$,说明使用的

除蛋白方法可以有效的除去游离蛋白质,蛋白质含量降低不仅能够提高多糖的溶解度,还有利于多糖分子跨膜进入生物体内发挥多糖的药理功效^[10]。5 种 LBP 的糖醛酸质量分数在 $(8.26\% \pm 0.46\%) \sim (24.81\% \pm 0.46\%)$,说明 5 种 LBP 为酸性多糖。其中, LBP-4 的糖醛酸含量最高, LBP-3 的糖醛酸含量最低,且与其他 4 种 LBP 有极显著性差异 ($P < 0.001$)。从提取溶剂极性判断,极性小的溶剂不利于糖醛酸的提取。此外,5 种 LBP 均未检出生物碱。

表 1 不同提取方法对枸杞多糖化学组成的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 1 Effects of different extraction methods on chemical compositions of polysaccharides from *Lycium barbarum* ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

多糖组分	总多糖	糖醛酸	蛋白质
LBP-1	92.19 $\pm$ 1.22 ²⁾	13.31 $\pm$ 0.32 ²⁾	0.56 $\pm$ 0.02 ²⁾
LBP-2	84.80 $\pm$ 1.39 ¹⁾	18.55 $\pm$ 0.44 ²⁾	0.20 $\pm$ 0.02 ²⁾
LBP-3	83.26 $\pm$ 1.47	8.26 $\pm$ 0.46	1.35 $\pm$ 0.13
LBP-4	92.96 $\pm$ 0.76 ²⁾	24.81 $\pm$ 0.46 ²⁾	0.06 $\pm$ 0.03 ²⁾
LBP-5	81.95 $\pm$ 1.60	16.23 $\pm$ 0.28 ²⁾	1.20 $\pm$ 0.26 ¹⁾

注:与 LBP-3 相比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.001$ 。

3.2 不同提取方法得到的枸杞多糖结构特征

3.2.1 三螺旋结构分析 刚果红可以与具有三重螺旋结构的多糖络合,络合物的最大吸收波长与刚果红溶液的最大吸收波长相比会发生红移^[11]。5 种 LBP 与刚果红溶液混合后,混合溶液的最大吸收波长随着 NaOH 最终浓度变化的曲线见图 2。与刚果红溶液相比, LBP-1 和 LBP-5 的最大吸收波长发生了蓝移,表明不具有三螺旋结构;其余 3 种 LBP 的最大吸收波长同刚果红相比,发生了红移,说明存在三螺旋结构。大分子多糖的构象不仅受糖苷键连接方式、支化程度及取代基团的静电排斥作用的影响,还容易受到溶剂、温度和 pH 的影响^[12]。因此, LBP-2、LBP-3 和 LBP-4 存在三螺旋结构的原因可能是由于高温和不同极性溶剂通过超声提取破坏了更多细胞壁的结构,使得更多构象的多糖物质释放出来。此外,有研究报道三螺旋结构能够赋予多糖更高的生物活性^[13],因此,推测 LBP-2、LBP-3 和 LBP-4 的生物活性可能高于 LBP-1 和 LBP-5。

3.2.2 单糖组成分析 通过 PMP 柱前衍生化 HPLC 测定结果与单糖对照品的保留时间进行对比,5 种 LBP 的单糖组成结果见表 2。实验结果与

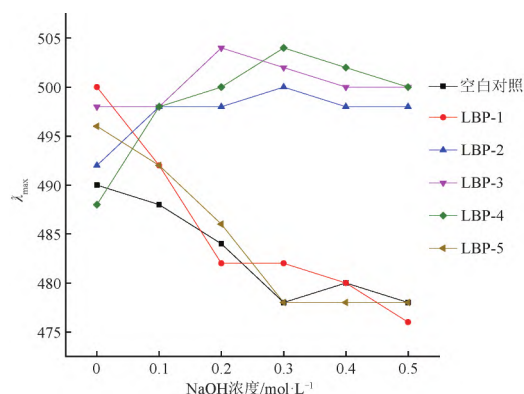


图 2 不同 NaOH 浓度下刚果红和枸杞多糖紫外-可见光最大吸收波长变化

Fig. 2 Maximum absorption wavelength of congo red and polysaccharides from *Lycium barbarum* varied under different NaOH concentration

先前报道宁夏枸杞中枸杞多糖的单糖组成相近^[14]。5 种 LBP 主要由葡萄糖构成,这可能是来自植物中纤维素的降解^[15],木糖、半乳糖次之。5 种 LBP 的中性糖含量相对较高,说明糖链支化程度高^[16]。LBP-4 葡萄糖含量最高,木糖和半乳糖的含量最低, LBP-5 葡萄糖含量最低,但其木糖和半乳糖含量最高。LBP-1 甘露糖和鼠李糖含量最低。此外, LBP-2 中还有半乳糖醛酸的存在,可能是由于高温破坏了细胞壁,使得多糖从细胞中溶出,增加了单糖的种类,且鼠李糖含量显著高于其他 4 种 LBP ($P < 0.001$)。产生这一现象的潜在原因在于同一植物中的多糖类物质相对分子质量范围较大,可以从几千到几万,甚至几十万上百万,是一类相对分子质量跨度非常大的混合物。不同的提取方法,由于提取溶液、提取温度、提取方式等发生了显著变化,因而所获得的多糖类物质会存在显著不同,从而导致检测出的单糖组分虽然种类上相似,但是比例却存在显著差异。

3.2.3 红外光谱分析 5 种 LBP 的红外光谱图见图 3。5 种方法提取得到的枸杞多糖均具有相似的糖类化合物特征吸收峰,表明不同提取方法对枸杞多糖的初级结构无明显影响。从图谱中可推测:在 3400 cm^{-1} 左右的吸收峰是由分子间和分子内 O-H、N-H 的伸缩振动引起的; 2900 cm^{-1} 左右吸收峰是甲基和亚甲基的 C-H 伸缩振动峰,为多糖的特

表 2 不同提取方法对枸杞多糖的单糖组成的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 2 Effects of different extraction methods on monosaccharide composition of polysaccharides from *Lycium barbarum* ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

多糖组分	甘露糖	半乳糖醛酸	鼠李糖	葡萄糖	木糖	半乳糖
LBP-1	0.72±0.005 ³⁾	—	0.68±0.002 ³⁾	83.67±0.083 ³⁾	7.59±0.073 ³⁾	7.34±0.013 ³⁾
LBP-2	1.65±0.005	3.85±0.037	7.11±0.073	64.39±0.077	12.35±0.045	10.66±0.008
LBP-3	0.85±0.001 ³⁾	—	1.07±0.008 ³⁾	66.36±0.014 ³⁾	15.13±0.025 ³⁾	16.60±0.0006 ³⁾
LBP-4	0.74±0.013 ³⁾	—	0.72±0.025 ³⁾	88.45±0.039 ³⁾	5.17±0.037 ³⁾	4.92±0.038 ³⁾
LBP-5	1.60±0.002 ³⁾	—	1.35±0.002 ³⁾	60.86±0.109 ³⁾	17.28±0.08 ³⁾	18.93±0.0318 ³⁾

注: 与 LBP-2 相比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

征吸收峰; 1 640 cm^{-1} 处的吸收峰是由一级氨基和二级氨基的 N-H 的边角振动或羧基的 C=O 对称伸缩振动所引起的, 这表明 5 种 LBP 可能都含有羧基基团; 1 400 cm^{-1} 处的吸收峰为多糖的 C-O 和蛋白质的 C-N 伸缩振动引起的; 1 040 cm^{-1} 左右的强吸收峰是糖苷键 C-O-C 的非对称振动峰, 为吡喃糖的特征吸收峰; 590 cm^{-1} 处为吡喃糖骨架的对称伸缩振动吸收峰。结合化学组成成分分析, 5 种 LBP 可能都是多糖与蛋白质的络合物。

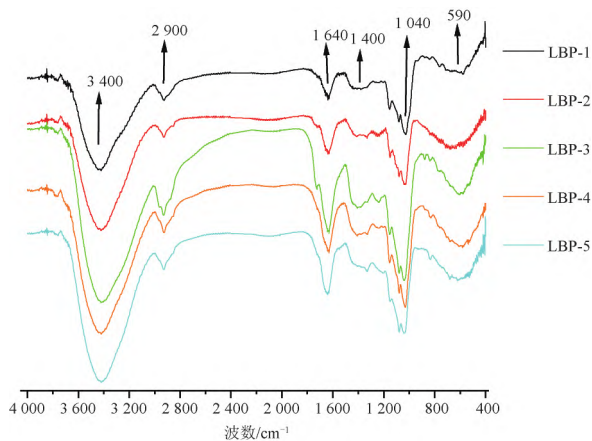


图 3 不同提取方法得到的枸杞多糖红外光谱
Fig.3 Infrared spectra of polysaccharides from *Lycium barbarum* obtained by different extraction methods

3.2.4 核磁特征分析 5 种 LBP 的 ^1H 谱数据见图 4A, 异头氢质子区信号在 δ 4.3~5.9, 其中 α 构型的糖残基的异头氢质子信号大于 δ 5.0, β 构型的糖残基的氢质子信号小于 δ 5.0^[17]。在 δ 3.0~3.90 出现了大量的多糖质子峰, 为典型的多糖信号, 在 δ 3.1~4.2 区域的信号归于糖苷环 C₂ 到 C₆ 的质子。5 种 LBP 的异头氢质子化学位移在 4.55~5.32, 表明均都有 α 和 β 构型的糖残基。 δ 4.7 处的倒峰可能是

由氘代试剂引起的。此外, 在 δ 3.2~3.5 存在较强的信号, 表明存在较多的 -OCH₃, 与红外光谱分析结果一致。 δ 1.1 附近存在较明显的 -CH₃ 信号, 为样品中残留乙醇的甲基, 但 LBP-5 未检测到乙醇的存在, 说明 LBP-5 的乙醇含量极少。

5 种 LBP 的 ^{13}C 谱数据见图 4B, 异头碳质子信号位于 δ 90~112, 大多数 α 构型糖残基的异头碳质子信号处于 δ 90~102, β 构型糖残基的异头碳质子信号位于 δ 102~112^[18]。5 种 LBP 的异头碳质子化学位移在 92~107.4, 进一步佐证了均含有 α 和 β 构型糖残基。在低场异头碳区域 δ 90~112 出现 5 种吸收峰, 表明 LBP 主要有 5 种糖残基组成。组成糖基 C₂~C₆ 的共振峰信号集中在 δ 60~90。 δ 81.1 处的强吸收峰说明含有大量的 C₃ 位取代的葡萄糖残基。 δ 69.5 处的信号说明葡萄糖的 C₆ 位发生取代, 糖残基的组成主要是葡萄糖, 与单糖组成成分分析结果一致。在低场区 δ 166 处有吸收峰信号, 说明 LBP 中含羰基, 与红外光谱结果一致。 δ 75~77 的 3 个信号为六碳糖的 C₂~C₅ 或五碳糖的 C₂~C₄ 被取代后的信号, δ 70~75 的信号为 C₂~C₅ 范围内未被取代的信号; δ 68~70 的信号为六碳糖的 C₆ 或五碳糖的 C₅ 被取代信号; 而 δ 55~65 的信号为未被取代的六碳糖的 C₆ 或五碳糖的 C₅ 信号。

综上所述, 不同提取方法对 LBP 的糖苷键没有显著影响, 但可能对含量有一定的影响。根据文献, 可将异头质子信号 δ 5.30/99.68 归属为 α -1,4-D-Glc^[19]; δ 5.13/99.7 归属为 α -Man_p^[20]; δ 4.55/101.8 归属于 β -1,4-D-Gal_p^[21]; δ 5.32/107.4 归属为 α -1,3-Ara_f^[18]; δ 4.05/68.8 归属为 α -1,2,4-Rha_f^[16]; δ 5.32/99.7 和 δ 5.28/99.5 归属于 α -1,4-Glc α -1,6-Glc 或 α -1,4,6-Glc^[22]; δ 5.26/98.55 归属为 α -1,2-Man^[23]。

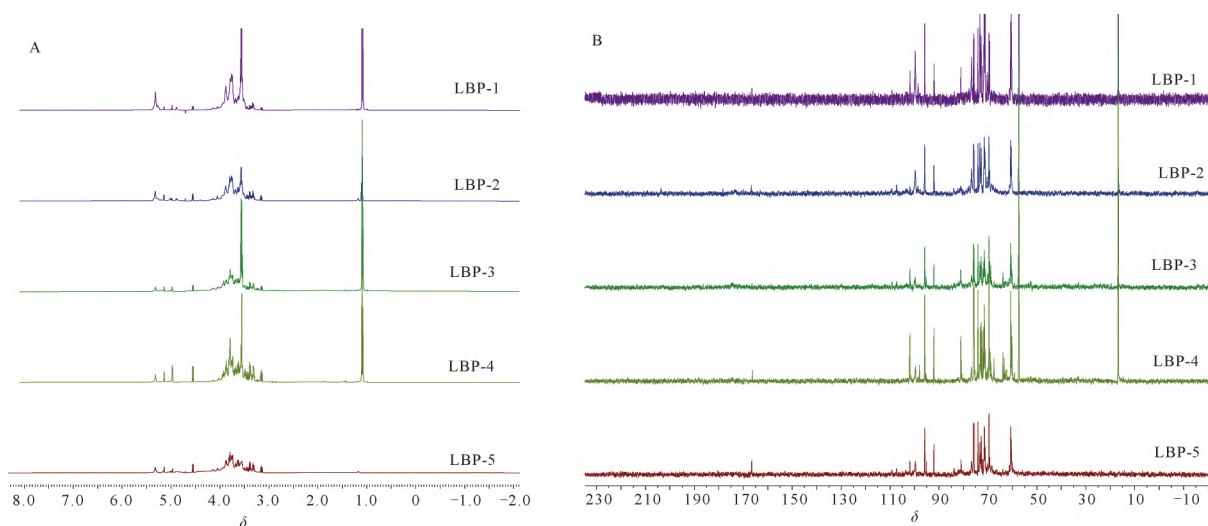
A. ^1H 谱; B. ^{13}C 谱。

图 4 不同提取方法得到的枸杞多糖核磁谱

Fig. 4 Nuclear magnetic resonance spectra of polysaccharides from *Lycium barbarum* by different extraction methods

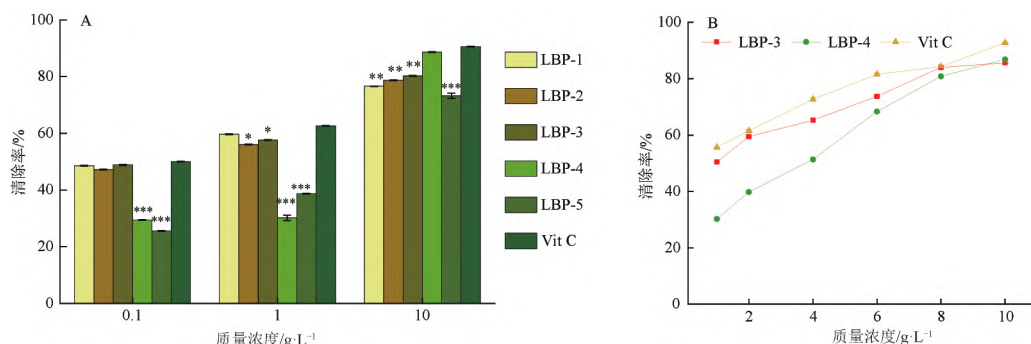
3.3 枸杞多糖体外活性分析

3.3.1 各组枸杞多糖对脂质抗氧化能力的影响

脂类是人体重要的营养物质,参与人体信号转导、髓鞘形成等多种生理活动,当脂质氧化时,产生的活性氧可诱发多种疾病,同时,食品中脂质或脂肪酸氧化也会引发食品安全问题^[24]。因此,维持脂质过氧化反应,保持活性氧基团生成和消耗动态平衡,对人体正常生理活动和提高食品保质期有重要意义。

5 种 LBP 的脂质氧化清除率见图 5A,在 $0.1 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 种 LBP 都具一定的抗脂质氧化能力,清除率明显上升。在 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,除 LBP-4 之外,其余 4 个

组分都显著低于 Vit C 的清除率($P < 0.01$, $P < 0.001$),其中 LBP-3、LBP-4 的清除率高于其他 3 种 LBP,其“量-效”关系见图 5B。在浓度范围内, LBP-3、LBP-4 的清除率都呈浓度依赖性增大,二者的 IC_{50} 分别为 0.4593 、 $2.767 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,同浓度下, LBP-3 的清除率是 LBP-4 的 6.02 倍。有研究报道多糖的抗氧化活性可能与其单糖组成、相对分子质量等结构特征有关,且木糖、半乳糖含量越高,其抗氧化能力可能越强^[12-25-27]。LBP-3 中存在三螺旋结构,且木糖、半乳糖含量较高,因此, LBP-3 的脂质抗氧化能力强于其他 LBP 的原因可能是上述结构共同作用的结果。

A. 5 种 LBP 的脂质抗氧化活性筛选; B. LBP-3、LBP-4 脂质抗氧化活性“量-效”曲线; 与 Vit C 比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。图 5 不同提取方法得到的枸杞多糖脂质抗氧化活性($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 5 Lipid antioxidant activity of polysaccharides from *Lycium barbarum* by different extraction methods($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

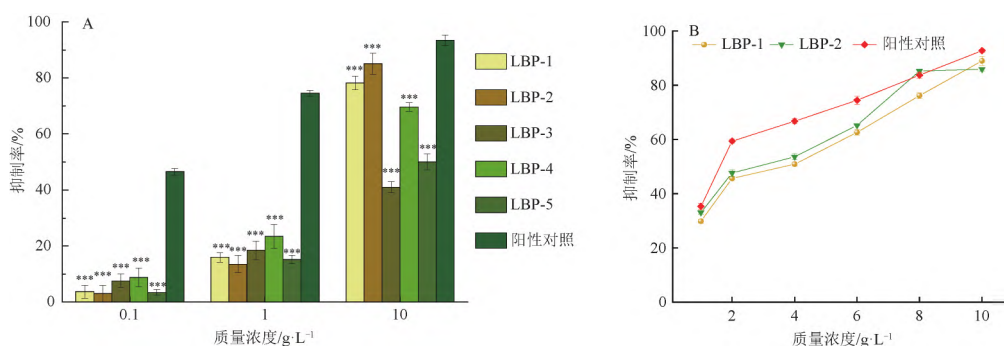
3.3.2 各组枸杞多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

5 种 LBP 对 α -葡萄糖苷酶活性影响见图 6A,在

$0.1 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 种 LBP 对 α -葡萄糖苷酶均具有抑制作用。在 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, LBP-1、LBP-2 对 α -葡萄糖苷

酶的抑制率高于其他 3 个组分。其“量-效”关系见图 6B。LBP-1 和 LBP-2 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率呈浓度依赖性增大, 两者的 IC_{50} 分别为 2.715 、 2.37 $g \cdot L^{-1}$ 。同浓度条件下, 二者对 α -葡萄糖苷酶的抑制率都低于阳性对照组, 但 LBP-2 的抑制率是 LBP-1 的 1.14 倍, 可以有效抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。先前有研究报

道, 多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性主要与多糖的相对分子质量、单糖组成和三螺旋结构等有关^[28], LBP-2 的单糖组成中有其他组分没有的半乳糖醛酸, 且鼠李糖含量显著高于其他 4 个组分 ($P < 0.001$)。此外, LBP-2 还含有三螺旋结构。因此, LBP-2 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用可能与单糖组成和构型有关。



A. 5 种 LBP 抑制 α -葡萄糖苷酶活性筛选; B. LBP-1、LBP-2 抑制 α -葡萄糖苷酶活性“量-效”曲线; 与阳性对照相比较 *** $P < 0.001$ 。

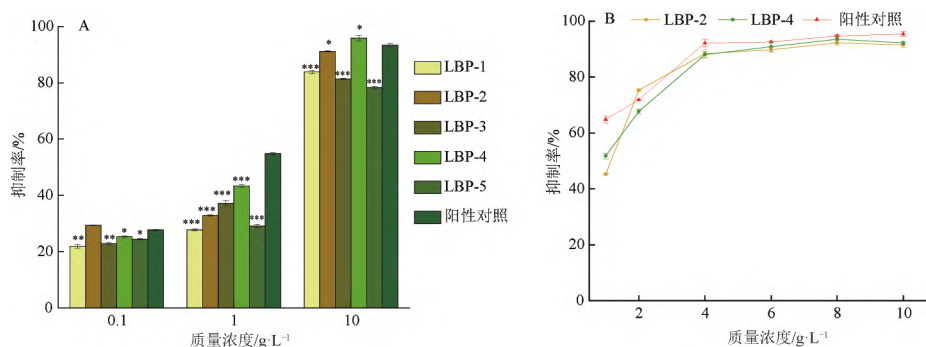
图 6 不同提取方法得到的枸杞多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

Fig. 6 Inhibition rate of polysaccharides from *Lycium barbarum* by different extraction methods on α -glucosidase ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

3.3.3 各组分枸杞多糖对 α -淀粉酶的抑制作用

5 种 LBP 对 α -淀粉酶活性影响见图 7A。5 种 LBP 对 α -淀粉酶均具有抑制作用, 其中 LBP-4 在质量浓度为 10 $g \cdot L^{-1}$ 时, 对 α -淀粉酶抑制率显著高于阳性对照组 ($P < 0.05$); 在 10 $g \cdot L^{-1}$ 时, LBP-2 和 LBP-4 的抑制率显著高于其他 3 个组分。在 $0.1 \sim 10$ $g \cdot L^{-1}$, LBP-2 和 LBP-4 对 α -淀粉酶的抑制率呈浓度依赖性增大关系, 见图 7B。两者的 IC_{50} 分别为 1.059 、 0.6178 $g \cdot L^{-1}$ 。同浓度条件下, 二者对 α -淀粉酶的抑制率都低于阳性对照组, 但 LBP-4 的抑制率是

LBP-2 的 1.71 倍。有研究报道枸杞多糖在质量浓度为 10 $g \cdot L^{-1}$ 时, 对 α -淀粉酶的抑制率为 25% ^[29], 远低于本研究 LBP-4 的 92.17% , 因此 LBP-4 能有效抑制 α -淀粉酶的活性。多糖对 α -淀粉酶抑制活性与糖醛酸结构密切相关^[30-31]。此外, 有研究发现多糖中木糖含量减少会增强对 α -淀粉酶的抑制作用^[32]。LBP-4 葡萄糖含量、糖醛酸含量不仅显著高于其他 4 个组分, 且木糖含量显著低于其他 4 个组分, 具有三螺旋结构。因此, LBP-4 对 α -淀粉酶的抑制作用可能上述结构共同作用的结果。



A. 5 种 LBP 抑制 α -淀粉酶活性筛选; B. 抑制 α -淀粉酶活性“量-效”曲线; 与阳性对照相比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 7 不同提取方法得到的枸杞多糖对 α -淀粉酶的抑制率 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

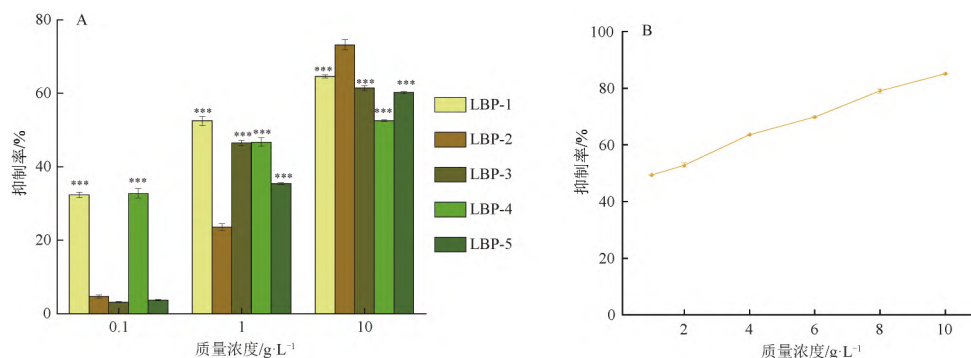
Fig. 7 Inhibition rate of polysaccharides from *Lycium barbarum* by different extraction methods on α -amylase ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

3.3.4 各组分枸杞多糖对透明质酸酶的抑制作用

大多数过敏反应是与体内透明质酸酶活性有关的 I 型过敏反应,透明质酸酶是一种水解酶,并与细胞通透性和许多炎症有关^[33]。

5 种 LBP 对透明质酸酶活性影响见图 8A,在 $0.1 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 种 LBP 对透明质酸酶均具有抑制作用。在 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 LBP-2 对透明质酸酶的抑制率显著高于其他 4 个组分 ($P < 0.001$)。其“量-效”关系见图

8B, LBP-2 对透明质酸酶的抑制率呈浓度依赖性增大关系, IC_{50} 为 $1.562 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。多糖对透明质酸酶的抑制活性主要与多糖相对分子质量、单糖组成和构象等结构相关^[34]。LBP-2 鼠李糖含量显著高于其他 4 个组分,同时具有三螺旋结构。因此 LBP-2 对透明质酸酶活性的抑制率高于其他组分,这可能与单糖组成和构象有关。当 LBP-2 的质量浓度 $\geq 1.562 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其能够达到中等抗过敏作用,具有良好的抗过敏活性^[33]。



A. 5 种 LBP 抑制透明质酸酶活性筛选; B. LBP-1、LBP-2 抑制透明质酸酶活性“量-效”曲线; 与 LBP-2 比较 *** $P < 0.001$ 。

图 8 不同提取方法得到的枸杞多糖对透明质酸酶的抑制率 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

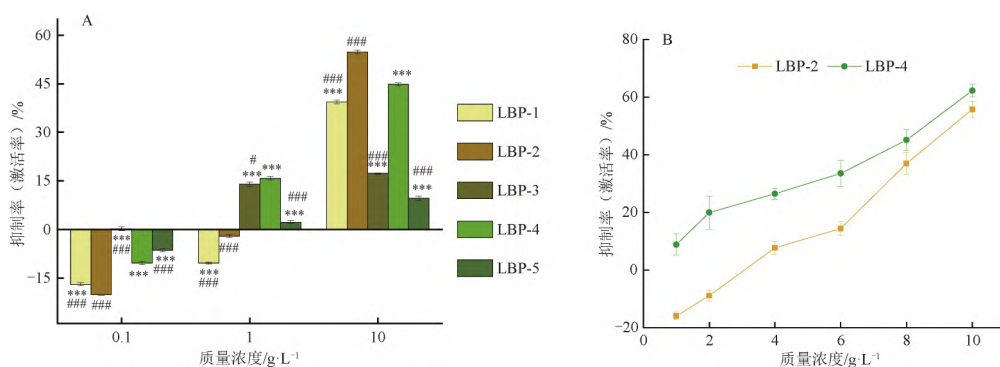
Fig. 8 Inhibition rate of polysaccharides from *Lycium barbarum* by different extraction methods on hyaluronidase ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

3.3.5 各组分枸杞多糖对乙醇脱氢酶的激活作用

ADH 是体内参与乙醇代谢的主要酶,能抑制人体对乙醇的吸收,从而减轻乙醇对人体消化系统、肝脏系统及神经系统的损害,起到解酒保肝作用^[35]。

5 种 LBP 对 ADH 活性影响见图 9A,在 $0.1 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 随着浓度的升高 5 种 LBP 对 ADH 抑制率明显下降,激活率逐渐上升。在 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, LBP-2、LBP-4 对 ADH 的激活率显著高于其他组分 ($P <$

0.001) 其“量-效”关系见图 9B。在浓度范围内, LBP-2、LBP-4 对 ADH 的激活率呈浓度依赖性增大,二者的 IC_{50} 分别为 9.35 、 $8.53 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,同浓度条件下, LBP-4 的激活率是 LBP-2 的 1.1 倍,可有效激活 ADH 活性,从而分解乙醇,达到解酒目的。多糖中糖醛酸含量对激活 ADH 有较大的影响^[36]。LBP-4 总多糖含量、糖醛酸含量高于其他 4 个组分,因此, LBP-4 对 ADH 的激活活性可能与糖醛酸含量有关。



A. 5 种 LBP 对 ADH 的活性筛选; B. LBP-2、LBP-4 对 ADH 激活活性“量-效”曲线; 与 LBP-2 相比较 *** $P < 0.001$; 与 LBP-4 相比较 ### $P < 0.001$ 。

图 9 不同提取方法得到的枸杞多糖对 ADH 的激活率 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig. 9 Activation rate of polysaccharides from *Lycium barbarum* by different extraction methods on ADH ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

4 讨论

本实验采用 5 种不同的提取方式从宁夏枸杞中提取多糖类物质,得到了 5 种多糖组分,化学分析结果显示不同多糖组分的化学组成和结构特征存在较大的差异。5 种 LBP_s 中葡萄糖、木糖、半乳糖含量较高,表明枸杞多糖主要是中性聚糖组分。此外,不同的提取方法对多糖的糖苷键、特征官能团类型以及单糖组成种类没有显著影响,但是不同组分的单糖含量有显著性差异。LBP-2、LBP-3 和 LBP-4 中还存在三螺旋结构,表明温度和溶剂可能会对枸杞多糖的构象产生影响。

此外,体外活性测试结果表明不同方法提取得到的 5 种 LBP_s 虽然都具有一定的活性,且在浓度范围内,活性明显上升,但是不同方法提取得到的多糖组分生物活性侧重点不同。其中,LBP-3 相较于其他 4 个组分,极性较小,在脂质抗氧化能力方面优于其他组分;LBP-4 则在抑制 α -淀粉酶和激活乙醇脱氢酶活性方面表现出了较好的活性;LBP-2 与 LBP-1 在抑制 α -葡萄糖苷酶和透明质酸酶活性方面表现出了更高的生物活性。

综上所述,提取方法会对枸杞多糖化学结构和生物活性产生影响,对枸杞多糖进行开发利用时需根据不同的生物活性用途选择不同的提取方法,从而保障研究的精准性。

参考文献

- [1] 谭西. 桑葚多糖低浓度乙醇分级纯化、分子修饰及抗急性酒精性肝损伤活性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019.
- [2] 梁生旺, 贡济宇. 中药分析[M]. 10 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 131.
- [3] 常相娜, 陈雪峰, 龚频, 等. 融水香菇多糖结构表征及体外抗氧化、降糖活性[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 1.
- [4] 朱成香. 黄精多糖抗铅-铜复合重金属致肝损伤药效学评价及作用机制研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2021.
- [5] CHEN F, HUANG G L, YANG Z Y, et al. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 138: 673.
- [6] CHEN J C, ZHANG X, HUO D, et al. Preliminary characterization, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from *Mallotus furetianus* [J]. Carbohydr Polym, 2019, 215: 307.
- [7] FAN M H, ZHU J X, QIAN Y L, et al. Effect of purity of tea polysaccharides on its antioxidant and hypoglycemic activities [J]. J Food Biochem, 2020, 44(8): e13277.
- [8] MÖLLER S, SCHMIDTKE M, WEISS D, et al. Synthesis and antihyperlipidemic activity of carboxymethylated and sulfated hyaluronan

derivatives[J]. Carbohydr Polym, 2012, 90(1): 608.

- [9] 王杏, 邓青芳, 陈华国, 等. 桑椹多糖的结构表征及其对乙醇脱氢酶活性的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2329.
- [10] 杨秀艳, 薛志远, 杨亚飞, 等. 红芪多糖的复合酶联合超声提取工艺、理化特性及抗氧化活性的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2261.
- [11] 贾丰, 郭玉蓉, 杨曦, 等. 发酵苹果渣多糖分离纯化、结构及其与加工特性的关系[J]. 中国农业科学, 2017, 50(10): 1876.
- [12] 王家腾, 王贺聪, 刘蕾. 香菇多糖构效关系的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(19): 363.
- [13] GUO X Y, KANG J, XU Z Y, et al. Triple-helix polysaccharides: formation mechanisms and analytical methods [J]. Carbohydr Polym, 2021, 262: 117962.
- [14] 符梦凡, 赵一帆, 阎卫东. 柱前衍生化 HPLC 法分析枸杞多糖中单糖组成[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 186.
- [15] LI J W, AI L Z, HANG F, et al. Composition and antioxidant activity of polysaccharides from jujuba by classical and ultrasound extraction[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 63: 150.
- [16] 苏平, 孙昕, 宋思圆, 等. 提取方法对黄秋葵花多糖的结构组成及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 93.
- [17] 高涛, 唐华丽, 罗振宇, 等. 川明参粗多糖初级结构解析及其体外抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(8): 275.
- [18] 聂少平, 黄丹菲, 殷军艺, 等. 食物中多糖组分的结构表征与活性功能研究进展[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 46.
- [19] ZHI F, YANG T L, WANG Q, et al. Isolation, structure and activity of a novel water-soluble polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 133: 1201.
- [20] ZHAO T, MAO G H, FENG W W, et al. Isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Schisandra sphenanthera* [J]. Carbohydr Polym, 2014, 105: 26.
- [21] LIU W, LIU Y M, ZHU R, et al. Structure characterization, chemical and enzymatic degradation, and chain conformation of an acidic polysaccharide from *Lycium barbarum* L. [J]. Carbohydr Polym, 2016, 147: 114.
- [22] GONG G P, FAN J B, SUN Y J, et al. Isolation, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharide LBLP5-A from *Lycium barbarum* leaves [J]. Process Biochem, 2016, 51(2): 314.
- [23] 陈艳丽. 不同海洋生境来源微生物胞外多糖的结构及抗氧化活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [24] 徐美玲, 苏东雪, 周建玲, 等. 香薷解热颗粒对不同肥胖模型小鼠脂质代谢和慢性炎症的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1307.
- [25] SCHAICH K M, TIAN X, XIE J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays[J]. J Funct Foods, 2015, 14: 111.
- [26] THAMBIRAJ S R, PHILLIPS M, KOYYALAMUDI S R, et al.



- Antioxidant activities and characterisation of polysaccharides isolated from the seeds of *Lupinus angustifolius* [J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 74: 950.
- [27] 常丽坤, 张文晋, 曹也, 等. 苍术多糖提取分离、结构解析及生物活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(9): 2133.
- [28] MENG Y H, SU A P, YUAN S, et al. Evaluation of total flavonoids, myricetin, and quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. as inhibitors of α -amylase and α -glucosidase [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2016, 71(4): 444.
- [29] 李鑫鑫, 王一棠, 陈琛, 等. 12 种植物粗多糖的体外抗肥胖及抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(2): 222.
- [30] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 355.
- [31] JI H Y, LIU C, DAI K Y, et al. The extraction, structure, and immunomodulation activities *in vivo* of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Ind Crop Prod*, 2021, 173: 114085.
- [32] WANG C, LI W W, CHEN Z Q, et al. Effects of simulated gastrointestinal digestion *in vitro* on the chemical properties, antioxidant activity, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. *Food Res Int*, 2018, 103: 280.
- [33] 苏学素, 陈宗道, 焦必林, 等. 我国常见食物及其成分的过敏反应作用研究[J]. *西南农业大学学报*, 2000, 22(1): 77.
- [34] 焦中高, 刘杰超, 王思新, 等. 羧甲基化红枣多糖制备及其活性[J]. *食品科学*, 2011, 32(17): 176.
- [35] 叶松, 任凌丽, 陈曦, 等. 王氏保赤丸对急性酒精损伤小鼠醒酒护肝/胃作用及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(15): 3900.
- [36] DENG Q F, ZHOU X, CHEN H G. Optimization of enzyme assisted extraction of Fructus Mori polysaccharides and its activities on antioxidant and alcohol dehydrogenase [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 111: 775.

[责任编辑 孔晶晶]