

香加皮多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性研究

张瑞平, 任昭辉, 张皓楠, 张晓平, 刘鹏飞, 王小莉

Isolation, Purification, Monosaccharide Composition and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Cortex Periplocae

ZHANG Ruiping, REN Zhaohui, ZHANG Haonan, ZHANG Xiaoping, LIU Pengfei, and WANG Xiaoli

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022080349>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

香加皮精多糖的单糖组成、热重和热裂解分析

Monosaccharide Composition, Thermogravimetric and Thermal Gravimetric Analysis of Corlex Periplocae Polysaccharide

食品工业科技. 2019, 40(6): 256-262,272 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.043>

红曲霉菌胞外多糖的分离纯化、结构鉴定及抗氧化活性测定

Isolation and purification, structure identification and antioxidant activity of Monascus purpureus exopolysaccharide

食品工业科技. 2017(12): 92-96 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.12.017>

双孢菇柄多糖柱层析纯化及单糖组成

Column chromatographic purification and monosaccharide composition of polysaccharide extracted from *Agaricus bisporus* stipe

食品工业科技. 2018, 39(12): 16-20 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.12.004>

可口革囊星虫体腔液多糖碱提工艺优化及其抗氧化性研究

Study on Alkaline Extraction Process Optimization of Polysaccharides from Coelomic Fluid of *Phasolosma esculenta* and Its Antioxidant Activity *in vitro*

食品工业科技. 2021, 42(19): 204-210 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010036>

兰州肉苁蓉多糖的组成分析及抗氧化活性

Composition Identification and Antioxidant Activity of *Cistanche lanzhouensis* Polysaccharides

食品工业科技. 2021, 42(15): 96-103 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010193>

灵芝子实体和孢子粉纯化多糖体外抗氧化活性研究

Antioxidant Activities of *Ganoderma lucidum* Fruit Body and Spore Powder Polysaccharide *in Vitro*

食品工业科技. 2019, 40(16): 27-31 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.16.005>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张瑞平, 任昭辉, 张皓楠, 等. 香加皮多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 71-78. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080349

ZHANG Ruiping, REN Zhaohui, ZHANG Haonan, et al. Isolation, Purification, Monosaccharide Composition and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Cortex Periplocae[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 71-78. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080349

· 研究与探讨 ·

香加皮多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性研究

张瑞平¹, 任昭辉², 张皓楠¹, 张晓平¹, 刘鹏飞^{1,*}, 王小莉^{3,*}

(1. 河南农业大学烟草学院, 河南郑州 450046;

2. 吉林烟草工业有限公司技术中心, 吉林延吉 133001;

3. 河南牧业经济学院动物医药学院, 河南郑州 450046)

摘要:目的: 分离纯化香加皮多糖 (Cortex Periplocae Polysaccharides, CPP), 并对其单糖组成和抗氧化活性研究, 以期在食品领域的开发和应用提供参考。方法: 通过水提醇沉和 Sevag 法除蛋白得到香加皮粗多糖, 经 DEAE-52 纤维素柱分离纯化得到 4 种多糖组分 CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3, 并对其化学成分检测、分子量测定、单糖组成分析、红外光谱和抗氧化活性分析。结果: 4 种多糖的糖含量分别为 82.20%、77.13%、75.23% 和 72.85%, 且都含有糖醛酸; 相对分子量分别为 685、477、411 和 572 kDa。4 种多糖均为甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖按照不同摩尔比组成的杂多糖。红外光谱表明 4 种多糖含有 β -糖苷键且具有呋喃环。抗氧化实验结果显示 4 种多糖均具有一定的抗氧化性, 总体抗氧化能力顺序为: CPP0>CPP3>CPP1>CPP2。结论: 从香加皮中提取得到的 4 种酸性多糖, 糖含量高、相对分子量大且均具有抗氧化活性, 其中 CPP0 组分抗氧化活性最好。

关键词: 香加皮, 多糖, 分离纯化, 红外光谱, 单糖组成, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)13-0071-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080349

本文网刊:



Isolation, Purification, Monosaccharide Composition and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Cortex Periplocae

ZHANG Ruiping¹, REN Zhaohui², ZHANG Haonan¹, ZHANG Xiaoping¹, LIU Pengfei^{1,*}, WANG Xiaoli^{3,*}

(1. College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. Technology Center, Jilin Tobacco Industry Co., Ltd., Yanji 133001, China;

3. College of Animal Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Objective: In this experiment, polysaccharides from cortex periplocae (CPP) were isolated and purified, and their monosaccharide composition and antioxidant activity were investigated, so as to provide a reference for the development and application of CPP in the food industry. Methods: The crude polysaccharides were obtained by aqueous extraction, alcoholic precipitation and protein removal by Sevag method, and four polysaccharide fractions CPP0, CPP1, CPP2 and CPP3 were separated and purified by DEAE-52 cellulose column. The chemical composition, molecular weight, monosaccharide composition, infrared spectrum and antioxidant activity were analyzed. Results: The sugar contents of these four polysaccharides were 82.20%, 77.13%, 75.23% and 72.85%, respectively, and all of them contained glyoxylate. The relative molecular weights were 685, 477, 411 and 572 kDa, respectively. The four polysaccharides were all heteropolysaccharides composed of mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose in different

收稿日期: 2022-09-02

基金项目: 国家自然科学基金 (21801064); 河南省科技厅科技攻关项目 (212102110353); 吉林烟草工业有限责任公司科技项目 (JSZX-2019-03)。

作者简介: 张瑞平 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 多糖的提取与应用, E-mail: 2941352346@qq.com。

* 通信作者: 刘鹏飞 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 香料的制备与应用, E-mail: liupengfei523@126.com。

王小莉 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 多糖的提取与应用, E-mail: xiaoliwang325@126.com。

molar ratios. The infrared spectra showed that four polysaccharides contained β -glycosidic bonds and with furan rings. The antioxidant experiments showed that all four polysaccharides had certain antioxidant properties, and the overall antioxidant capacity was in the following order: CPP0>CPP3>CPP1>CPP2. Conclusion: The four acidic polysaccharides extracted from cortex periplocae have high sugar content, high relative molecular weight, and antioxidant activity, among which CPP0 fraction has the best antioxidant activity.

Key words: cortex periplocae; polysaccharide; isolation and purification; infrared spectroscopy; monosaccharide composition; antioxidant activity

香加皮别名北五加皮、羊奶藤,为萝藦科植物杠柳(*Periploca sepium* Bge.)的干燥根皮。据研究显示,香加皮具有强心、抗肿瘤、抗炎及免疫调节作用^[1-2],对于慢性心力衰竭也有很好的治疗作用,常作传统中药使用^[3]。多糖是一种高分子聚合物,由多个单糖通过糖苷键结合而成^[4],主要存在于动植物和微生物中^[5]。多糖因其在理化性质方面无毒副作用,而且具有热稳定、缓释性、药理活性以及吸水保湿性等特点^[6-8],在食品^[9]和医药等^[10]领域得到了广泛应用。近年来关于香加皮多糖的研究有了初步进展,段滴童等^[11]通过索氏提取器分离得到香加皮多糖,分析香加皮多糖的主要成分是乳糖和甘露糖,但提取得到的多糖含量较低。对于香加皮多糖的结构分析以及抗氧化活性的研究鲜有报道,限制了香加皮多糖的开发与应用。

本课题组前期对河南产地的香加皮通过水提醇沉法以及脱色脱蛋白后得到三种香加皮中性多糖,均由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,且具有较强的抗氧化活性^[12]。本实验以河北产地的香加皮为原料,通过水提醇沉法得到香加皮粗多糖,并对其纯化后的组分进行化学成分检测、分子量测定、单糖组分测定、红外光谱以及抗氧化活性研究,以期对香加皮多糖的深入开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

香加皮 购自河北保定中药材市场,产地为河北;单糖标准品:甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、无水葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡聚糖标准品(纯度 $\geq 98\%$)、纤维素柱 DEAE-52 北京索莱宝科技有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、ABTS(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐) 上海阿拉丁生科科技股份有限公司;乙腈(色谱纯)、浓硫酸、苯酚、氯仿等其他试剂(均为分析纯) 天津市大茂化学试剂厂。

BSZ-160F 自动部分收集器 上海之信仪器有限公司;UV-5200 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;Nicolet iS 50 傅里叶变换红外光谱仪

美国 Nicolet 公司;N-1300 旋转蒸发器 上海爱郎有限公司;Scientz-10N/A 冷冻干燥机 宁波新芝科技股份有限公司;LC-20AR 高效液相色谱仪 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 香加皮粗多糖的提取 参考王小莉^[13]的方法

略加改动。将香加皮磨碎后过 40 目筛,得香加皮粉末。取 2 kg 香加皮粉末,加入 3 L 无水乙醇浸泡脱脂,每次 6 h,共三次,抽滤,干燥。将蒸馏水按料液比 1:5 加入,提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,提取时间为 2 h,共三次,合并提取液,浓缩。离心去沉淀后加入 2 倍体积的无水乙醇混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 醇沉 24 h,离心取沉淀。将沉淀用蒸馏水复溶后于透析袋($M_w=3.5$ kDa)中透析 72 h,离心,冷冻干燥,即得香加皮粗多糖(Crude Cortex Periplocae Polysaccharides, C CPP)。

$$\text{CPPP 得率}(\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

式中: m 为香加皮粗多糖质量(g); M 为香加皮粉末质量(g)。

1.2.2 香加皮粗多糖的分离纯化 C CPP 先使用 Sevag 法^[14]脱蛋白 3 次后,再通过 DEAE-52 纤维素层析柱(26 mm \times 60 cm)进一步分离纯化。脱蛋白后的 C CPP 用蒸馏水溶解上样,依次用 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,洗脱流速为 1 mL/min,洗脱液用自动收集器收集,每个梯度收集 30 管,每管收集 10 mL。收集到的多糖溶液采用苯酚-硫酸法隔管检测,以管数为横坐标,吸光度为纵坐标作图得到洗脱曲线。合并单一糖峰,透析、浓缩、冷冻干燥,并计算出香加皮纯多糖(CPP)的得率:

$$\text{CPP 得率}(\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

式中: m 为香加皮纯多糖质量(g); M 为香加皮粗多糖质量(g)。

1.2.3 香加皮多糖的化学成分测定 采用苯酚-硫酸法测糖含量^[15]。取 1 mL 1 mg/mL 的样品溶液于试管中,加入 1 mL 5% 的苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸混匀,于 490 nm 处测其吸光度。以葡萄糖标准溶液(0、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$)建立标准曲线,得回归方程为 $y=0.0085x-0.0131$, $R^2=0.997$,根据此方程计算样品中的糖含量。

采用考马斯亮蓝法测蛋白质含量^[16]。取 1 mL 1 mg/mL 的样品溶液于试管中,加入 5 mL 的考马斯亮蓝溶液混匀,于 595 nm 处测其吸光度。以牛血清蛋白标准溶液(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$)建立标准曲线,得回归方程为 $y=0.0133x-0.1084$, $R^2=0.999$,根据此方程计算样品中的蛋白质含量。

采用硫酸-咔唑法测糖醛酸含量^[17]。取 1 mL 1 mg/mL 的样品溶液于试管中,在冰水浴中加入

3 mL 5 mg/mL 的四硼酸钠-硫酸溶液,混匀后于沸水浴中加热 5 min,冷却至室温后加入 0.1 mL 0.1% 吡啶溶液,静置 2 h 后在 530 nm 处测定其吸光度。以半乳糖醛酸标准溶液(0、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$)建立标准曲线,得回归方程为 $y=0.0164x-0.0952$, $R^2=0.999$,根据此方程计算样品中的糖醛酸含量。

1.2.4 香加皮多糖的紫外全波长扫描 将香加皮多糖配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的水溶液,在 200~500 nm 波长范围内进行紫外波长扫描。

1.2.5 香加皮多糖均一性和分子质量的测定 参考王少杰等^[18]的方法分析香加皮多糖的均一性和分子质量。

色谱条件:采用 Shimadzu HPLC 系统(配有 LC-20AR 泵和 RID-2410 示差折光检测器),示差折光检测器温度 40 $^{\circ}\text{C}$,色谱柱:Shodex Sugar KS-804(8 mm \times 300 mm),柱温 50 $^{\circ}\text{C}$,流动相:超纯水,流速 1.0 mL/min,检测时间为 33 min。标品为不同分子量(4.32、12.6、73.8、126、289、496 kDa)葡聚糖。

1.2.6 香加皮多糖的单糖组分测定 参考余亦婷等^[19]的 PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮)柱前衍生化-HPLC 法并略作修改。

1.2.6.1 多糖的水解 称取 10 mg 香加皮多糖加入 8 mL 2 mol/L 的 TFA(三氟乙酸)置于试管中,密封后于烘箱中 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 4 h,反应结束后用旋转蒸发器蒸干,加甲醇溶液 2 mL 后蒸干,重复 3 次以除去 TFA,然后用 1 mL 超纯水复溶得香加皮多糖水解液。

1.2.6.2 多糖水解液的 PMP 衍生化 配制 6 种单糖浓度为 2 mg/mL 的标准溶液,各取 1.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加水定容后混匀。取 100 μL 混合单糖标准液和 100 μL 香加皮多糖水解液分别加入 100 μL 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液和 100 μL 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热反应 100 min,冷却至室温后加入 100 μL 0.3 mol/L 的 HCl 中和;加超纯水至 1 mL,再加入 1 mL 氯仿,振荡离心后弃去氯仿相,共萃取 3 次。水相经 0.45 μm 滤膜过滤后供 HPLC 进样分析。

1.2.6.3 色谱条件 Shim-pack GIST C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , Shimadzu),柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 250 nm,流速 1.0 mL/min,进样量 20 μL 。流动相 A 为 0.05 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(pH6.8),流动相 B 为乙腈溶液(等度洗脱,体积比 A:B=81:19),检测时间为 50 min。

1.2.7 香加皮多糖的红外光谱 称取 1 mg 香加皮多糖与 100 mg 溴化钾粉末混合,研磨均匀后用压片机压片,使用红外光谱仪在 4000~500 cm^{-1} 的范围内进行扫描。

1.2.8 香加皮多糖抗氧化活性的测定 称取不同质量的香加皮多糖,分别配制成 0.1、0.25、0.5、0.75、1 mg/mL 的水溶液,备用。

1.2.8.1 DPPH 自由基清除能力测定 根据文献 [20] 的方法配制 DPPH 乙醇溶液。取不同浓度的多糖溶液 1 mL,加 2 mL DPPH 乙醇溶液,对照组用无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液,空白以同体积蒸馏水代替多糖样品,以 V_C 作阳性对照,混匀后避光反应 30 min,于 517 nm 处测吸光度。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

1.2.8.2 ABTS⁺自由基清除能力测定 参考程爽等^[21]的方法配制 ABTS 乙醇溶液。取 2 mL 不同浓度的样品溶液,加 4 mL ABTS 乙醇溶液,对照组用无水乙醇代替 ABTS 乙醇溶液,空白以同体积蒸馏水代替多糖样品,混匀后避光反应 10 min,于 734 nm 处测吸光度,以 V_C 作阳性对照。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

1.2.8.3 OH 自由基清除能力测定 OH 自由基清除能力的测定根据文献 [22] 稍作修改。取 1 mL 不同浓度的多糖溶液分别加入 1 mL 6 mmol/L 硫酸亚铁溶液、1 mL 6 mmol/L 水杨酸乙醇溶液和 1 mL 6 mmol/L 过氧化氢溶液混合均匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热反应 1 h,冷却后在 510 nm 检测其吸光度,对照组用蒸馏水代替过氧化氢溶液,空白组用蒸馏水代替样品,以 V_C 作阳性对照。OH 自由基清除率的计算公式为:

$$\text{OH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

1.2.8.4 还原能力的测定 参考文献 [21] 测定样品的还原能力。取 1 mL 不同浓度的样品溶液加入 2 mL 1% 铁氰化钾溶液和 2 mL 磷酸盐缓冲液(pH6.6, 0.2 mol/L)均匀混合,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min。冷却后加入 2 mL 10% 三氯乙酸溶液,混合均匀后 5000 r/min 离心 10 min,取 2 mL 上清液,加入 2 mL 蒸馏水和 0.5 mL 1% 三氯化铁溶液反应 10 min,于 700 nm 处测吸光度,以 V_C 作阳性对照。吸光度越大,则多糖的还原能力越强。

1.3 数据处理

各实验均重复 3 次,使用 SPSS 26 和 Origin 2018 软件对数据进行显著性差异分析和作图。

2 结果与分析

2.1 香加皮粗多糖的分离纯化

通过“水提醇沉”法得到香加皮粗多糖的提取率为 3.19%。图 1 为 CCPP 通过 DEAE-52 纤维素柱分离得到的梯度洗脱曲线图,以 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,共得到 4 个多糖组分,分别为蒸馏水洗脱的 CPP0;0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱的 CPP1;0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱的 CPP2;0.3 mol/L NaCl 溶液洗脱的 CPP3,得率分别为 4.32%、5.26%、3.13% 和 4.28%。将各多糖组分分别进行收

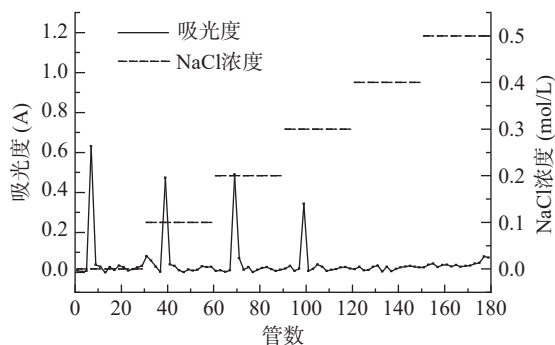


图1 香加皮多糖 DEAE-52 纤维素柱洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of polysaccharides on DEAE-52 cellulose column of CPPP

集,透析后经冷冻干燥得到粉末状多糖。其中 CPP1 为白色粉末,其余各组分均为浅棕色粉末。

2.2 香加皮多糖的化学组成

香加皮多糖各组分的化学成分如表1所示,通过苯酚-硫酸法测得4种多糖的糖含量顺序表现为:CPP0>CPP1>CPP2>CPP3,各组分之间的糖含量差异显著($P<0.05$)。除 CPP3 组分含有少量的蛋白质外,其余各组分均不含蛋白质或蛋白含量低于检出限。香加皮多糖各组分均含糖醛酸,说明4种多糖均为酸性多糖,其中 CPP2 组分的糖醛酸含量显著低于其它组分, CPP0 组分的糖醛酸含量最高,这与王小莉^[13]提取的香加皮多糖为中性多糖不一致,可能与香加皮产地有关。

表1 香加皮多糖的化学成分分析
Table 1 Chemical composition analysis of CPPS

编号	糖含量(%)	蛋白含量(%)	糖醛酸含量(%)
CPP0	82.20±0.48 ^a	—	31.06±0.70 ^a
CPP1	77.13±0.71 ^b	—	28.29±0.37 ^b
CPP2	75.23±0.63 ^c	—	23.82±0.24 ^c
CPP3	72.85±1.06 ^d	2.5±0.8	29.11±0.37 ^b

注:平均值±标准差;同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$);“—”表示未检测出。

2.3 香加皮多糖的紫外全波长扫描

图2为4种多糖在200~500 nm处的紫外扫描图,其中 CPP0、CPP1 和 CPP2 在260和280 nm处无明显的吸收峰,表明样品中均不含或含极少量的蛋白

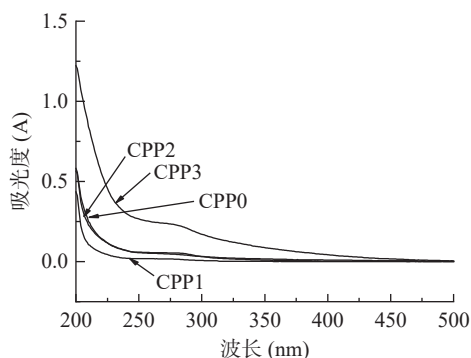


图2 香加皮多糖紫外全波长吸收光谱

Fig.2 UV full-wavelength absorption spectrum of CPPS

质和核酸,纯度较高。而 CPP3 在280 nm处有小的吸收峰,说明该组分含有少量的蛋白质,这与表1各多糖的化学成分组成相一致。

2.4 香加皮多糖的分子量分析

由图3可知,香加皮多糖各个组分均呈单一峰,峰型对称且陡峭,说明4种香加皮多糖均为单一的多糖组分,纯度较高。

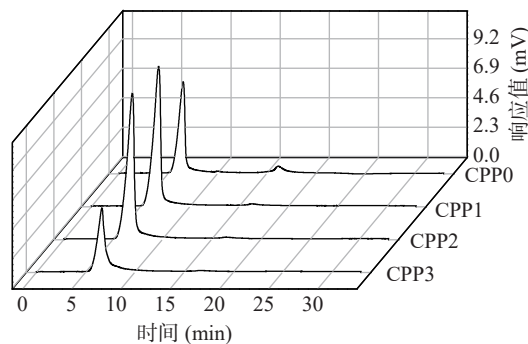


图3 香加皮多糖 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of CPPS

以标准葡聚糖分子量的对数值($\log Mw$)和保留时间(T)所建立的标准曲线为: $\log Mw = -0.5067T + 9.1478$, $R^2 = 0.9909$ 。CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 的保留时间分别是6.537、6.846、6.975和6.691 min,代入回归方程可得各多糖分子量分别为685、477、411和572 kDa。与河南产地的香加皮多糖^[13]比较可知,本实验所得香加皮多糖分子量偏大许多,可能是因为分离纯化方法不同或是香加皮产地不同,导致分子量差异较大^[23],具体原因需要进一步验证。

2.5 香加皮多糖的单糖组成

通过 HPLC 测定香加皮多糖的单糖组成,图4、图5为测定的混合标准品及样品的 PMP 衍生化色谱图。结果表明,香加皮的4种多糖组分中均含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖,但其摩尔比有明显差异。各多糖组分的摩尔比如表2所示, CPP0、CPP2 和 CPP3 均以葡萄糖、甘露糖、鼠李糖和半乳糖为主;CPP1 则以葡萄糖和半乳糖为主。4种多糖中葡萄糖含量均为最高,分别

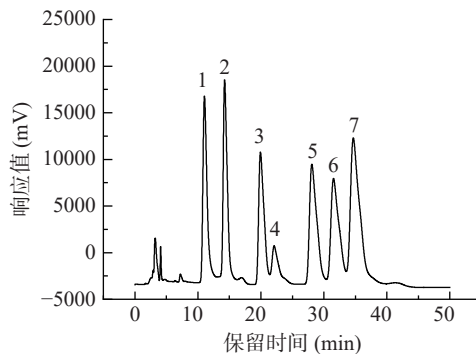


图4 单糖标准品 HPLC 分析图谱

Fig.4 HPLC analysis spectrum of monosaccharide standards

注:1.PMP; 2.甘露糖; 3.鼠李糖; 4.半乳糖醛酸; 5.葡萄糖; 6.半乳糖; 7.阿拉伯糖;图5同。

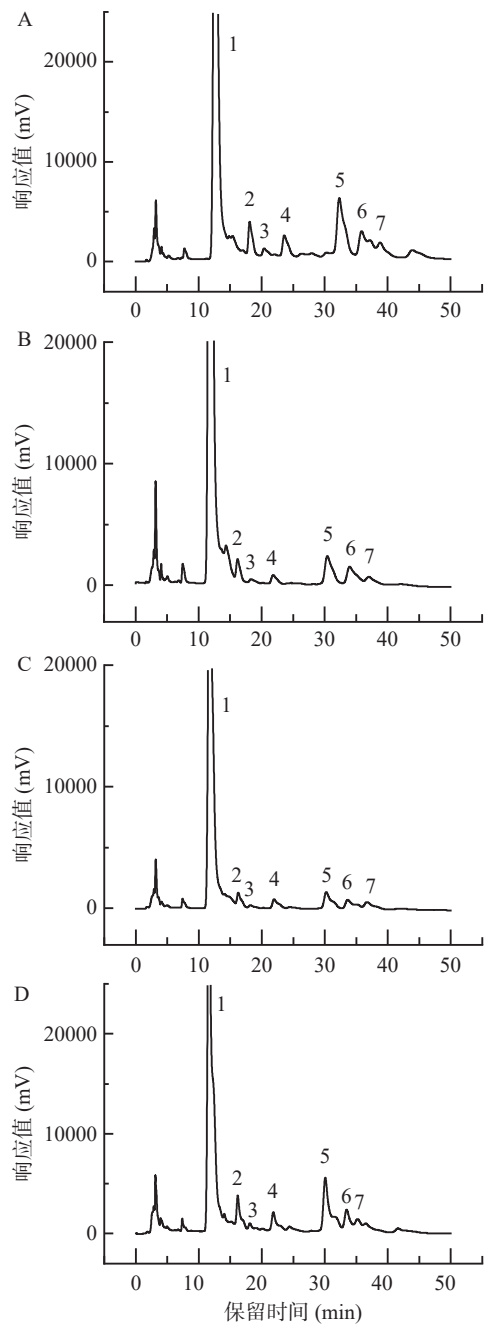


图5 CPP0(A)、CPP1(B)、CPP2(C)、CPP3(D)的HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC chromatograms of CPP0 (A), CPP1 (B), CPP2 (C), CPP3 (D)

表 2 香加皮多糖各组分单糖的摩尔比

Table 2 Molar ratios of monosaccharides of CPPS

编号	甘露糖	鼠李糖	半乳糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖
CPP0	1.65	1.61	1.25	4.71	1.74	0.99
CPP1	0.76	0.53	0.43	1.90	1.42	0.46
CPP2	0.48	0.57	0.15	1.11	0.31	0.17
CPP3	1.41	1.32	0.58	2.30	1.02	0.48

占其总摩尔比的 39.41%、34.55%、39.78% 和 32.35%; 阿拉伯糖含量较低, 分别占其总摩尔比的 8.28%、8.36%、6.09% 和 6.75%。4 种多糖中糖醛酸占比分别为 10.46%、7.82%、5.38% 和 8.16%, CPP0 糖醛酸含量最高, CPP2 糖醛酸含量最低, 与表 1 中测得

的糖醛酸含量趋势一致。在王小莉^[13]的研究中, 香加皮多糖分离出的 3 种组分均不含糖醛酸, 且阿拉伯糖含量较低, 与本实验结果不同, 这可能是因为产地不同而导致的单糖组成不同^[24]。

2.6 红外光谱分析

香加皮 4 种多糖组分的红外光谱图如图 6 所示, CPP0 与 CPP1、CPP2 和 CPP3 的红外光谱图差异较大。4 种多糖组分在 3400 cm⁻¹ 处的强吸收峰为 O-H 伸缩振动峰, 符合糖类的一般结构特征, 其中 CPP0 在 3400 cm⁻¹ 处强度最大, 说明羟基含量最多。1640 cm⁻¹ 处的吸收峰为 C=O 的非对称伸缩运动, 说明该多糖组分存在糖醛酸; 其中 CPP0 在 1640 cm⁻¹ 处的强度最大, 可判断其糖醛酸含量较多, 这与化学成分检测和单糖组成结果一致。CPP0 在 1432 cm⁻¹ 处的吸收峰与 CPP1、CPP2、CPP3 在 1380 cm⁻¹ 处的吸收峰均为 CH₃⁻ 的对称变角振动; 在 1000~1200 cm⁻¹ 附近的吸收峰为吡喃糖环的 C-O-C 伸缩振动和 C-O-H 的变角振动所引起的吸收峰。870 cm⁻¹ 附近的吸收峰为 β-糖苷键的特征峰; 620 cm⁻¹ 附近的吸收峰为呋喃环的特征吸收峰。说明香加皮的 4 种多糖均是含有 β-糖苷键且具有呋喃环的多糖。

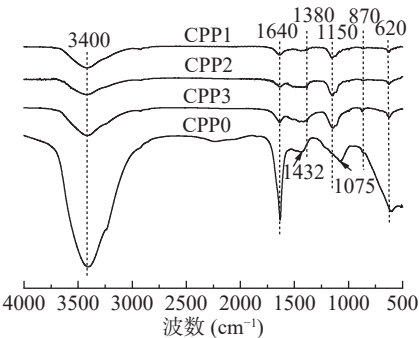


图 6 香加皮多糖的红外光谱图
Fig.6 FT-IR spectra of CPPS

2.7 香加皮多糖的抗氧化活性分析

2.7.1 DPPH 自由基清除能力 由图 7 可知, CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 对 DPPH 自由基均具有一定的清除能力, 其中 CPP0 对 DPPH 自由基的清除能力略高于另外 3 种多糖, 但 4 种多糖的自由基清除能力

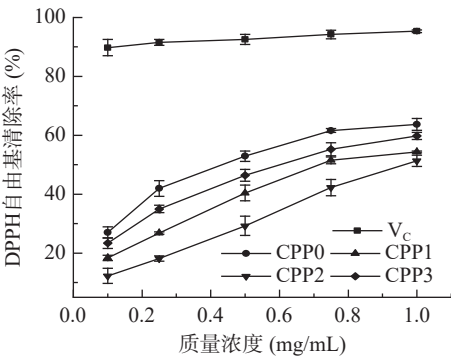


图 7 香加皮多糖的 DPPH 自由基清除能力
Fig.7 DPPH free radical scavenging capacity of CPPS

与 V_C 相比还有一定的差距。当样品浓度为 1 mg/mL 时, CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 的清除率分别为 63.71%、54.36%、51.37% 和 59.83%; 当样品浓度为 0.1~0.75 mg/mL 时, 其自由基清除率与多糖浓度基本呈线性关系; 当样品浓度高于 0.75 mg/mL 时, DPPH 自由基清除能力增加较缓慢。CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 的 IC_{50} 值分别为 0.43、0.72、0.97 和 0.60 mg/mL, 说明 CPP0 抗氧化活性最好。有研究表明甘露糖含量与清除 DPPH 自由基呈正相关^[25], 香加皮 4 种多糖组分中甘露糖和阿拉伯糖含量均表现为 CPP0>CPP3>CPP1>CPP2, 抗氧化能力也表现为此顺序, 这与艾于杰^[26]研究的茶多糖中阿拉伯糖含量越高, DPPH 自由基清除能力越差不符, 可能与多糖的空间结构有关, 需进一步验证。

2.7.2 ABTS⁺自由基清除能力 各多糖组分 ABTS⁺自由基清除能力如图 8 所示, CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 均可清除 ABTS⁺自由基, 且各组分的自由基清除能力与样品浓度存在明显的剂量效应。当质量浓度为 1 mg/mL 时, CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 清除率分别为 82.96%、70.30%、58.69% 和 78.83%, 均低于 V_C ; 其 IC_{50} 值分别为 0.37、0.71、0.85 和 0.68 mg/mL。已有研究表明, 分子量对多糖的抗氧化能力有一定的影响, 高分子量空间结构相对较稳定, 生物活性较高^[27]。香加皮的 4 种多糖组分抗 ABTS⁺自由基活性顺序为 CPP0>CPP3>CPP1>CPP2, 说明分子量越高, 香加皮多糖的抗氧化能力越强, 与 Xu 等^[28]研究一致。

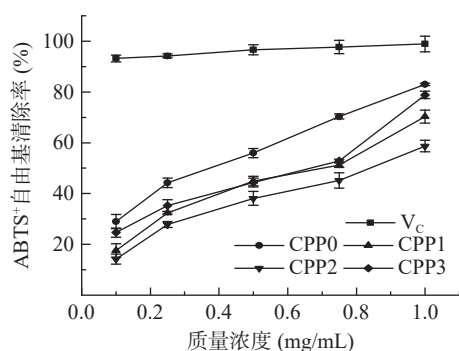


图 8 香加皮多糖的 ABTS⁺自由基清除能力
Fig.8 ABTS⁺ free radical scavenging capacity of CPPS

2.7.3 OH 自由基清除能力 由图 9 可知, 当多糖质量浓度为 0.1~1 mg/mL 时, 多糖质量浓度越大, OH 自由基清除率越高, 但其清除能力远远低于 V_C 。样品浓度为 1 mg/mL 时, 各多糖组分的清除率达到最大值, 分别为 65.24%、53.99%、50.30% 和 57.90%。CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 的 IC_{50} 值分别为 0.66、0.89、0.99 和 0.78 mg/mL, CPP2 的 OH 自由基清除率最低。有研究表明, 多糖之所以可以清除 OH 自由基, 是因为多糖中的糖醛酸可以和亚铁离子相结合, 抑制 OH 自由基的生成^[29]。本实验中糖醛酸含量顺序为 CPP0>CPP3>CPP1>CPP2, 与抗氧化顺序

一致, 这与凌洁玉等^[30]研究结果相吻合。据文献可知, 三七多糖^[31]和茯苓多糖^[32]在质量浓度为 1 mg/mL 时其对 OH 自由基清除率分别为 15.04% 和 25.12%, 低于同质量浓度下香加皮多糖的 OH 自由基清除率。

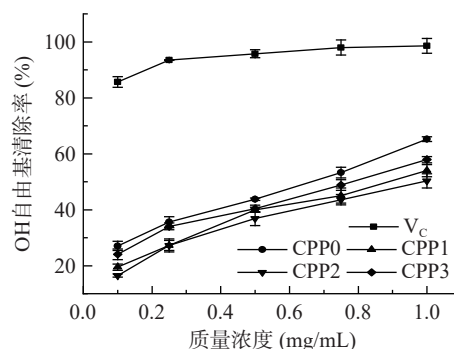


图 9 香加皮多糖的 OH 自由基清除能力
Fig.9 OH radical scavenging ability of CPPS

2.7.4 还原能力 各多糖组分的还原能力如图 10 所示, 吸光度表示多糖的还原能力, 还原力越强, 表明其抗氧化性越好^[33]。在 0.1~1 mg/mL 的测试范围内, 各组分的还原能力随多糖质量浓度的增大而增强。当样品质量浓度为 0.1、0.25 和 0.5 mg/mL 时, CPP1 和 CPP3 的还原能力无明显差异; 在浓度为 0.5~1 mg/mL 时, CPP3 的还原能力略高于 CPP1。在质量浓度为 1 mg/mL 时, CPP0、CPP1、CPP2、CPP3 和 V_C 的吸光度分别为 0.789、0.649、0.616、0.741 和 0.921, 说明还原能力强弱顺序为 V_C >CPP0>CPP3>CPP1>CPP2。CPP2 的还原能力低于 CPP0、CPP1 和 CPP3, 可能是 CPP2 各种单糖含量较低所致^[34]。

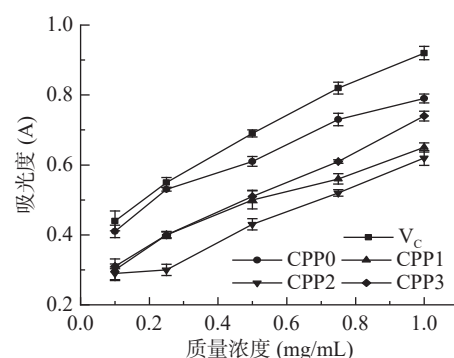


图 10 香加皮多糖的还原能力
Fig.10 Restoration capacity of CPPS

综上所述, 香加皮多糖具有一定的抗氧化能力, 但对不同的自由基或离子抗氧化能力不同, 因此在对香加皮多糖进行抗氧化能力评价时, 要综合多种抗氧化方法。4 种多糖在浓度为 1 mg/mL 时对于不同的自由基清除能力均表现出一致性, 其中纯水洗脱的 CPP0 清除 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、OH 自由基以及还原能力均表现出较高的活性, CPP3 和 CPP1 次之, CPP2 相对较弱。而王小莉^[13]研究的香加皮多糖的抗氧化性则是高浓度 NaCl 洗脱的组分强于纯水洗脱的组分, 这可能是由于产地不同而导致

的分子量和单糖组成不同,因此需要开展不同产地的相关研究。

3 结论

本实验通过“水提醇沉”法得到香加皮粗多糖,粗多糖经 Sevag 法脱蛋白和 DEAE-52 纤维素柱分离纯化后得到 4 种多糖组分 CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3。通过对 4 种多糖组分分析可得, CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 中糖含量和糖醛酸含量存在差异,分子量分别为 685、477、411 和 572 kDa。单糖组成结果表明 4 种多糖均为甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖按照不同摩尔比组成的杂多糖。红外光谱分析可知 4 种多糖均含有 β -糖苷键且具有呋喃环。抗氧化结果表明 CPP0、CPP1、CPP2 和 CPP3 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基以及 OH 自由基均具有一定的清除作用,其中 CPP0 的清除率最好;还原能力大小表现为 CPP0>CPP3>CPP1>CPP2。上述研究结果可为香加皮多糖的开发和应用提供参考,抗氧化能力强弱的影响因素仍需进一步探究。

参考文献

- [1] 徐硕,金鹏飞,徐文峰,等. 中药香加皮的研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(1): 118-121. [XU S, JIN P F, XU W F, et al. Advances on Chinese herbal medicine *Periplocae cortex*[J]. *North-west Pharmaceutical Journal*, 2017, 32(1): 118-121.]
- [2] 李金楠,赵丽迎,于静,等. 香加皮化学成分的研究[J]. *中成药*, 2010, 32(9): 1552-1556. [LI J N, ZHAO L Y, YU J, et al. Chemical constituents of the root barks of *Periploca sepium*[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2010, 32(9): 1552-1556.]
- [3] 杨雪,李梦雨,颜昌钰,等. 香加皮的化学成分与药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(12): 2772-2783. [YANG X, LI M Y, YAN C Y, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Periplocae cortex* and predictive analysis on Q-marker[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(12): 2772-2783.]
- [4] CHEN S H, HUANG H L, HUANG G L. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 1047-1053.
- [5] WANG M, ZHU P, ZHAO S, et al. Characterization, antioxidant activity and immunomodulatory activity of polysaccharides from the swollen culms of *Zizania latifolia*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 809-817.
- [6] LIU F, MA C, MC CLEMENTS D J, et al. Development of polyphenol-protein-polysaccharide ternary complexes as emulsifiers for nutraceutical emulsions: Impact on formation, stability, and bioaccessibility of β -carotene emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 578-588.
- [7] HU B, CHEN Q, CAI Q, et al. Gelation of soybean protein and polysaccharides delays digestion[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1598-1605.
- [8] 王笑月,刘效兰,薛燕,等. 黄精及其复配植物多糖提取工艺优化及人体保湿评价[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 221-225, 240. [WANG X Y, LIU X L, XUE Y, et al. Optimization of process extraction for polysaccharides of *Polygonatum* and its prescription and evaluation of moisture retention capacity of human body[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 221-225, 240.]
- [9] KONTOGIORGOS V. Polysaccharides at fluid interfaces of food systems[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2019, 270: 28-37.
- [10] BARCLAY T G, DAY C M, PETROVSKY N, et al. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 221: 94-112.
- [11] 段漓童,刘正猛,劳风云,等. 香加皮多糖分离提取及含量测定[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2007(7): 766-768. [DUAN L T, LIU Z M, LAO F Y, et al. Isolation, extraction and determination of *Cortex periplocae* polysaccharides[J]. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine*, 2007(7): 766-768.]
- [12] WANG X L, ZHANG Y F, LIU P F, et al. Purification, characterization, and antioxidant activity of polysaccharides isolated from *Cortex periplocae*[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1866.
- [13] 王小莉. 香加皮多糖提取纯化及其在烟草中的保润增香效应研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2018. [WANG X L. Extraction and purification of *Cortex periplocae* polysaccharides and their use in tobacco moisture retention and flavor enhancement[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2018.]
- [14] 曾凡珂,李伟,曹庸,等. 金樱子多糖提取、纯化及生理活性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7): 307-312. [ZENG F K, LI W, CAO Y, et al. Research progress on extraction, purification and physiological activities of polysaccharides from *Rosa laevigata* Michx[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(7): 307-312.]
- [15] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [16] 王艾平,周丽明. 考马斯亮蓝法测定茶籽多糖中蛋白质含量条件的优化[J]. *河南农业科学*, 2014, 43(3): 150-153. [WANG A P, ZHOU L M. Determination of protein content in *Camellia oleifera* seed polysaccharides by Coomassie brilliant blue method[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2014, 43(3): 150-153.]
- [17] 任珍芸,陈晓航,王玺,等. 硫酸-咔唑微孔板法检测肺炎链球菌荚膜多糖中糖醛酸含量[J]. *微生物学免疫学进展*, 2017, 45(2): 36-41. [REN Z Y, CHEN X H, WANG X, et al. Determination of uronic acid content in pneumococcal polysaccharide by sulfate-carbazole method in microplate[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2017, 45(2): 36-41.]
- [18] 王少杰,巴娟,张勇军,等. 白术多糖的分子量及其单糖组成分析[J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(5): 26-32. [WANG S J, BA J, ZHANG Y J, et al. Analysis of molecular weight and monosaccharide composition of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2019, 53(5): 26-32.]
- [19] 余亦婷,皮文霞,谢辉,等. PMP 柱前衍生化-HPLC 法分析不同生长年限黄芪中 6 种单糖的含量[J]. *中国药房*, 2021, 32(12): 1448-1452. [YU Y T, PI W X, XIE H, et al. Content determination of 6 kinds of monosaccharide in *Astragalus membranaceus* with different growth years by pre-column derivatization-HPLC[J]. *China Pharmacy*, 2021, 32(12): 1448-1452.]
- [20] SHEN S, JIA S, WU Y, et al. Effect of culture conditions on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Nostoc flagelliforme*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 198: 426-433.
- [21] 程爽,贺斐,付龙洋,等. 冬凌草硒多糖的制备及其抗氧化活性分析[J]. *精细化工*, 2021, 38(10): 2064-2071. [CHENG S, HE P, FU L Y, et al. Preparation of selenium polysaccharide from *Rab-*

- dosia rubescens* and analysis of its antioxidant activity[J]. *Fine Chemicals*, 2021, 38(10): 2064–2071.]
- [22] 宋丽丽, 闻格, 霍姍浩, 等. 小黄姜多糖的分离纯化及其结构特征及抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(12): 73–79. [SONG L L, WEN G, HUO S H, et al. Isolation, purification, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Zingiber officinale* Roscoe[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(12): 73–79.]
- [23] 徐雯雯, 陆春霞, 肖潇, 等. 桑黄多糖的提取纯化技术及药理作用研究进展[J]. *蚕学通讯*, 2022, 42(3): 20–30. [XU W W, LU C X, XIAO X, et al. Research progress on the extraction and purification technology and pharmacological effects of polysaccharides from *Sanghuangporus*[J]. *Newsletter of Sericultural Science*, 2022, 42(3): 20–30.]
- [24] 闫征, 郝利民, 张黎明, 等. 3种不同产地灵芝子实体主要化学成分比较[J]. *食品科学*, 2019, 40(6): 240–246. [YAN Z, HAO L M, ZHANG L M, et al. Comparison of main chemical constituents in *Ganoderma lucidum* fruiting bodies collected from three producing regions[J]. *Food Science*, 2019, 40(6): 240–246.]
- [25] WANG L, LIU H M, Xie A J, et al. Chinese quince (*Chaenomeles sinensis*) seed gum: Structural characterization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75: 237–245.
- [26] 艾于杰. 抗氧化活性茶多糖构效关系研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019. [AI Y J. Study on the conformational relationship of antioxidant active tea polysaccharides[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.]
- [27] LI F, GAO J, XUE F, et al. Extraction optimization, purification and physicochemical properties of polysaccharides from *Gynura medica*[J]. *Molecules*, 2016, 21(4): 397.
- [28] XU Z, LI X, FENG S, et al. Characteristics and bioactivities of different molecular weight polysaccharides from *Camellia* seed cake[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 1025–1032.
- [29] 胡彦波, 翟丽媛, 刘扬, 等. 薇菜多糖的分离纯化及体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 59–66. [HU Y B, ZHAI L Y, LIU Y, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Osmunda japonica*[J]. *Food Science*, 2022, 43(1): 59–66.]
- [30] 凌洁玉, 周文轩, 庄志雄, 等. 鲜辣椒多糖组分变化初步分析及抗氧化活性研究[J]. *东北农业科学*, 2022, 47(3): 145–149. [LING J Y, ZHOU W X, ZHUANG Z X, et al. Analysis of components and antioxidant activity of *Fermented cayenne* polysaccharides[J]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2022, 47(3): 145–149.]
- [31] 伍晓萍, 代玉玲, 张玲, 等. 三七多糖吸湿、保湿性能及体外抗氧化活性[J]. *昆明医科大学学报*, 2022, 43(5): 1–6. [WU X P, DAI Y L, ZHANG L, et al. Studies on moisture-absorption-retention and antioxidant activity of *Panax notoginseng* polysaccharides *in vitro*[J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2022, 43(5): 1–6.]
- [32] 孙明杰, 张越, 姚亮, 等. 茯苓多糖的分离纯化、组成及其抗氧化活性研究[J]. *安徽中医药大学学报*, 2022, 41(1): 86–91. [SUN M J, ZHANG Y, YAO L, et al. Isolation, purification, composition, and antioxidant activity of *Poria cocos* polysaccharides[J]. *Journal of Anhui University of Chinese Medicine*, 2022, 41(1): 86–91.]
- [33] 董扬, 郝利民, 刘宇琪, 等. 不同破壁方法对灵芝孢子粗多糖抗氧化活性的影响[J]. *食品科学*, 2017(17): 101–106. [DONG Y, HAO L M, LIU Y Q, et al. Extracts and biological activities of Sporodem-broken spores of *Ganoderma lucidum*[J]. *Food Science*, 2017(17): 101–106.]
- [34] 冯湘沅, 成莉凤, 谢纯良, 等. 不同品种黄麻叶多糖的理化特征及抗氧化活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(8): 1278–1284. [FENG X Y, CHENG L F, XIE C L, et al. Study on the physicochemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharides from different varieties of jute leaves[J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32(8): 1278–1284.]