

苟春林,张艳,李健.宁夏枸杞多糖的提取分离与组成[J].江苏农业科学,2013,41(6):246-247.

宁夏枸杞多糖的提取分离与组成

苟春林¹,张艳¹,李健²

(1.宁夏农林科学院农产品质量监测中心,宁夏银川 750002; 2.新疆精河县质量与计量研究所,新疆精河 833300)

摘要:宁夏枸杞经三氯甲烷-甲醇脱脂、水提醇沉、乙醇、丙酮和乙醚洗涤干燥、双氧水脱色、Savage法除蛋白后可得枸杞多糖;高效液相色谱测定枸杞多糖分子量为73 950~138 090 u;枸杞多糖中单糖分别有葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、木糖和甘露糖,其中含量较多的是葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖,其他单糖含量较低。

关键词:宁夏枸杞;枸杞多糖;分子量;单糖

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0246-02

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)系茄科枸杞属多年生落叶灌木^[1],果实味甘,性平,有滋肾补髓、养肝明目和祛风的作用,是传统滋补中药。近几十年来,许多学者对枸杞进行了深入研究,发现它在调节免疫、抗衰老、抗肿瘤、降低血脂和血糖等方面表现出广阔的应用前景,同时对枸杞子的化学成分及其药理也进行了大量的研究,发现枸杞含有丰富的氨基酸、无机盐、微量元素和维生素。目前枸杞质量评价指标是枸杞多糖(LBP)、甜菜碱、总糖的含量,其中尤以枸杞多糖为主。枸杞中所含主要活性成分枸杞多糖具有增强免疫力,抗肿瘤、抗衰老方面的药理作用,枸杞多糖含量是反映枸杞品质的重要指标。枸杞多糖不但能显著增强机体免疫功能,而且还具有免疫调节作用。研究发现,LBP能够对抗环磷酰胺对脾脏和胸腺造成的免疫损伤^[2],具有正向免疫调节作用,能增强NK细胞杀伤活性及增加白细胞数量^[3-4],齐春会等研究结果表明,LBP是枸杞中主要免疫活性成分,口服LBP对LACA小鼠脾细胞增殖反应和抗体生成反应均具有明显的促进作用^[5]。结果发现枸杞中具有免疫活性的有效成分是一类结构复杂的糖缀合物,其糖链部分可能是其发挥免疫活性的主要活性结构^[6]。马兴铭等在比较LBP、灵芝多糖、茯苓多糖等6种多糖对免疫功能的影响时发现,LBP加强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力最强^[7]。罗琼等对LBP的量效关系进行了研究,结果表明LBP有其最适剂量,并非剂量越大效果越好^[8],并与LBP粗品进行比较,各项免疫指标均有极显著差异。临床研究还发现,LBP对II型糖尿病有明显的免疫调节效应^[9]。LBP在预防糖尿病并发症发生中起重要作用^[10],能使四氧嘧啶糖尿病小鼠免疫功能恢复接近正常^[11],对四氧嘧啶糖尿病小鼠及正常小鼠均有降血糖作用^[12]。这为深层次开发利用枸杞资源及其临床应用提供了依据。

1 试验材料及仪器设备

1.1 试验材料

宁夏枸杞采自宁夏中宁;葡聚糖标准品(Sigam公司,购

于上海楚柏试验室设备有限公司);单糖标准品(Sigam公司,购于上海楚柏试验室设备有限公司)。

1.2 仪器设备

旋转蒸发器(RE-2000A,上海亚荣生化仪器厂提供);电子天平(PL202-L,瑞士MELTLER TOLEDO公司提供);纯水机(美国Millipore公司提供);Waters e2695高效液相色谱仪附2424蒸发光散射检测器(美国Waters公司提供);离子色谱仪(ICS-3000,美国戴安公司提供)。

2 研究内容

2.1 粗多糖提取

宁夏枸杞干果粉碎,三氯甲烷-甲醇(2:1)回流脱脂8~10 h近无色,挥干溶剂以后将脱脂后的宁夏枸杞样品放入烧杯中,分3次加15、12、10倍量的蒸馏水于90℃水浴提取,每次2 h;收集3次的滤液减压浓缩至约200 mL,转移到大烧杯中,加4倍量的95%乙醇,沉淀12 h后抽滤,并依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,干燥后便得到枸杞多糖的粗制品。

2.2 粗多糖精制

多糖粗品加水溶解,4 000 r/min离心10 min后取上清液,加30%双氧水适量,40℃保温4~6 h后,加三氯甲烷-正丁醇(4:1,Sevag法)溶液沉淀蛋白,取上清液;此步骤反复多次,直到无白色絮状沉淀出现为止。将除完蛋白的多糖溶液浓缩后,转移到分子排阻为8 000~10 000 Da的透析袋中,流水透析24 h,蒸馏水透析过夜,溶液颜色变淡,浓缩后真空干燥得枸杞多糖精制品。

2.3 多糖相对分子量的测定

凝胶渗透色谱法(GPC)测定多糖相对分子质量,以标准分子量葡聚糖Dextran 25 000($M=23\ 800$ u)、Dextran 50 000($M=48\ 600$ u)、Dextran 80 000($M=80\ 900$ u)、Dextran 150 000($M=147\ 600$ u)、Dextran 270 000($M=273\ 800$ u)、Dextran 410 000($M=409\ 800$ u)为标准曲线,配制成浓度为1.0 mg/mL的溶液。

高效液相色谱仪Waters e2695,蒸发光散射检测器Waters 2424,流动相流速为0.5 mL/min,色谱柱柱温为25℃,进样测定。检测器为蒸发光散射检测器(ELSD),色谱柱为Shodex Ohpak SB-803 HQ(300 mm×8 mm),流动相为高纯水,

收稿日期:2012-11-23

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关项目(编号:082164034)。

作者简介:苟春林(1980—),男,陕西汉中,人,硕士,助理研究员,从事农产品质量检测及方法研究。E-mail:gouchunlin@sina.com。

流速为0.5 mL/min,柱温为25℃,进样量20 μL/次,ELSD检测器漂移管温度为85℃,ELSD检测器N₂气压力275.8 kPa。

将多糖样品用超纯水配制成1.0 mg/mL的溶液,以同样的方法处理,记录色谱图,利用标准曲线(表1)求得多糖相对分子质量,样品 t_R 分别为12.204、12.828 8 min时,样品 M 分别为138 090、73 950 u。

表1 多糖分子量与保留时间的关系

多糖分子量 $M(u)$	保留时间 $t_R(min)$
25 000	14.117 3
50 000	13.127 7
80 000	12.720 6
150 000	11.596 9
270 000	11.504 2
410 000	11.416 5

注: $\ln M = 24.04 - t_R$, $r = 0.964 9$ 。多糖分子量范围73 950 ~ 138 090 u;线性范围25 000 ~ 410 000 u。

2.4 枸杞单糖测定

精确称取枸杞多糖约60 mg,溶于10 mL 4 mol/L三氟乙酸溶液中,密闭,110℃水解2 h。放至室温后,精确量取100 μL,氮气吹干。残余物加10 mL去离子水溶解,过孔径0.22 μm水系滤膜,进样。

ICS-3000离子色谱仪;CarboPac PA20分析柱,150 mm × 3 mm, S/N 002823;CarboPac PA20保护柱,50 mm × 3 mm, S/N 002652。检测器类型:脉冲安培检测器, Au电极, S/N 0050150,糖四电位波形。淋洗液组成及流速:0 ~ 17 min, 14 mmol/L NaOH;20 ~ 30 min, 100 mmol/L NaOH - 120 mmol/L NaAc;30.1 ~ 35 min, 200 mmol/L NaOH;35.1 ~ 40 min, 14 mmol/L NaOH。自动进样,10 μL。

宁夏枸杞多糖研究组成发现,枸杞多糖中含有大量的蛋白质,其中枸杞多糖中单糖以葡萄糖为主,其次依次是阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖,其含量比例为11.16 : 2.38 : 1.10 : 0.75 : 0.37 : 0.11(表2)。由此可知枸杞多糖是杂多糖同蛋白质结合的复合性多糖。

表2 枸杞多糖中单糖含量

单糖名称	枸杞多糖中单糖含量(mg/L)				单糖含量(%)
	重复1	重复2	重复3	平均值	
鼠李糖	0.068 2	0.043 3	0.063 8	0.058 4	0.11
阿拉伯糖	1.301 2	1.145 1	1.280 8	1.242 4	2.38
半乳糖	0.575 0	0.572 4	0.572 2	0.573 2	1.10
葡萄糖	5.850 8	5.954 6	5.942 6	5.916 0	11.36
木糖	0.148 6	0.177 5	0.255 1	0.193 7	0.37
甘露糖	0.369 9	0.397 9	0.404 3	0.390 7	0.75

3 结论

在枸杞多糖的提取过程中,游离蛋白质也被提取出来,为

了提高枸杞多糖的纯度,脱去游离蛋白的方法有Sevag法、三氯乙酸法等,Sevag法比较温和,三氯乙酸法较剧烈,易影响多糖的生物活性。故本试验采用Sevag法脱枸杞多糖中的游离蛋白。由于枸杞多糖是含糖肽结构的多糖,所以在脱蛋白时,除脱去游离蛋白外,还会脱去部分小分子的糖蛋白,而且脱蛋白次数越多,和蛋白结合的多糖损失就越大。

枸杞经氯仿-甲醇脱脂、水提醇沉、乙醇、丙酮和乙醚洗涤干燥、双氧水脱色、Savag法除蛋白后可得枸杞多糖;高效液相色谱测定枸杞多糖分子量为73 950 ~ 138 090 u;枸杞多糖中单糖分别有葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、木糖和甘露糖,其中含量较多的是葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖,其他单糖含量较低。枸杞多糖是杂多糖同蛋白质结合的复合性多糖。

据文献报道,阿拉伯糖、半乳糖具有免疫活性、刺激NK细胞活性和血小板分离洗涤的功能,具有降低血液中胆固醇、葡萄糖和胰岛素水平的作用,是良好的膳食纤维^[13]。

参考文献:

- [1]路安民,王美林.关于中药现代化中的物种鉴定问题——基于枸杞分类和生产问题的讨论[J].西北植物学报,2003,23(7):1077-1083.
- [2]王静珍,熊建荣.枸杞多糖对小鼠胸腺和脾脏保护作用的研究[J].宁夏医学杂志,2001,23(11):661.
- [3]刘彦平,李积东.枸杞多糖对小鼠NK细胞和白细胞活性的免疫调节作用[J].青海医学院学报,2001,22(1):1-2.
- [4]刘彦平,张玉叶.枸杞多糖对小鼠T淋巴细胞亚群和淋巴细胞转化作用的研究[J].青海医学院学报,2000,21(4):4-5,10.
- [5]齐春会,张永祥,赵修南,等.枸杞粗多糖的免疫活性[J].中国药理学与毒理学杂志,2001,15(3):180-184.
- [6]齐春会,黄琳娟,张永祥,等.枸杞多糖合物及糖链的化学结构与免疫活性[J].中国药理学与毒理学杂志,2001,15(3):186-196.
- [7]马兴铭,赵进昌.六种多糖对小鼠免疫功能调节作用的比较[J].中药药理与临床,2003,19(4):14-15.
- [8]罗琼,张志华.纯品与粗品枸杞多糖对小鼠的免疫药理作用[J].中药材,1999,22(5):246-249.
- [9]王玲,蒋绿芝,张才军,等.枸杞多糖对2型糖尿病患者T淋巴细胞亚群和细胞因子的调节作用[J].河北中医,2001,23(12):888-890.
- [10]孙桂菊,张林,王少康,等.枸杞多糖、茶叶多糖混合物对I型糖尿病大鼠降血糖作用及对糖尿病并发症相关指标的影响[J].食品研究与开发,2003,24(2):75-78.
- [11]王玲,李维波.枸杞多糖对糖尿病小鼠模型免疫功能的影响[J].上海免疫学杂志,2000,20(3):159-162.
- [12]王玲,蒋绿芝.枸杞多糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠高血糖的防治作用[J].河北中医,2000,22(2):159-160.
- [13]黄桂东,钟先锋.阿拉伯半乳糖的研究进展[J].食品与机械,2006,22(4):141-144.