

# 不同醇沉部位双参多糖的单糖组成及抗氧化活性研究

李彩艺,米丹,王甜,王乐,杨宗斌,王福生\*

大理大学药学与化学学院,大理 671000

**摘要:**研究不同醇沉部位对双参多糖的单糖组成及抗氧化活性的影响。双参经沸水提取、脱蛋白和大孔吸附树脂柱层析处理得水溶性成分,再经40%、60%和80%醇沉得粗多糖TGP-1、TGP-2和TGP-3。采用PMP-HPLC方法对粗多糖的单糖组成进行分析,以粗多糖对DPPH·羟自由基和超氧阴离子的清除作用作为评价指标,评价它们的体外抗氧化活性。结果表明,TGP-1和TGP-2的单糖组成相同而摩尔比不同,它们均含Man-GluN-GalA-Glc-Gal-Ara,其中,TGP-1摩尔比为0.06:0.03:0.33:3.90:0.63:0.41;TGP-2摩尔比为0.08:0.06:1.05:15.71:0.92:0.49;TGP-3中含有GalA-Glc-Gal-Ara,其摩尔比为0.49:5.65:0.50:0.35。抗氧化活性测试结果表明,TGP-3抗氧化活性最强,TGP-1抗氧化活性最弱。

**关键词:**双参;多糖;单糖组成;抗氧化活性;

中图分类号:R914.1;R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0064-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.009

## Monosaccharide composition and antioxidant activity of crude polysaccharides from *Triplostegia glandulifera* with different alcohol precipitation

LI Cai-yi, MI Dan, WANG Tian, WANG Le, YANG Zong-bin, WANG Fu-sheng\*

College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

**Abstract:** To study the effect of different alcohol precipitation on the composition and antioxidant activity of *Triplostegia glandulifera* polysaccharides. Water-soluble components was obtained by boiling water extraction, deproteinized, and macroporous resin column chromatography, then the crude polysaccharides of TGP-1, TGP-2 and TGP-3 were obtained by 40%, 60% and 80% alcohol precipitation. PMP-HPLC methodology was used to analyze the monosaccharide compositions of TGP-(1-3). Finally, their antioxidant capacity was studied by scavenging of DPPH, hydroxyl and superoxide anion free radical method. The results showed that the polysaccharides TGP-1 and TGP-2 were composed of *D*-mannose, *D*-glucosamine hydrochloride, *D*-galacturonic acid, *D*-glucose, *D*-galactose and *D*-arabinose, the molar ratio of TGP-1 is about 0.06:0.03:0.33:3.90:0.63:0.41, and the TGP-2 is about 0.08:0.06:1.05:15.71:0.92:0.49. Moreover, TGP-3 were composed of *D*-galacturonic acid, *D*-glucose, *D*-galactose and *D*-arabinose and their molar ratio was 0.49:5.65:0.50:0.35. Antioxidant capacity test results showed that the antioxidant capabilities of TGP-(1-3) were obviously different, among which TGP-3 had the strongest antioxidant capacity, and TGP-1 had the weakest antioxidant capacity.

**Key words:** *Triplostegia glandulifera*; polysaccharides; monosaccharide composition; antioxidant activity

双参(*Triplostegia glandulifera* Wall.)为川续断科双参属植物,又称萝卜参、对对参和童子参,产于云南、西藏、四川、陕西南部、湖北西部、甘肃南部及台湾等地<sup>[1,2]</sup>。双参因有补肾、健脾益气 and 活血调经的功能,常用于治疗久病体虚,补血补气<sup>[1,2]</sup>,在

大理地区民间治疗糖尿病肾病疗效确切。动物实验表明:双参粗提物有一定的降血糖作用<sup>[3]</sup>;双参粗提物能提高四氧嘧啶糖尿病模型小鼠心、肝和肾组织的SOD活性,并能降低心、肝和肾组织中MDA含量,这种作用可能通过清除自由基及抗脂质过氧化过程实现,预示双参对糖尿病患者的重要器官有保护作用<sup>[4]</sup>。双参粗提物能明显提高小鼠的抗应激能力<sup>[5]</sup>。为发现双参的活性成分,课题组对双参的化学成分进行了研究,发现双参小分子成分主要有

收稿日期:2019-08-20 接受日期:2019-10-11

基金项目:国家自然科学基金(31860098);云南大学教育部自然资源药物化学重点实验室开放基金(2019KF01)

\*通信作者 Tel:86-872-2257409;E-mail:wfsyn@163.com

环烯醚萜及其苷类、三萜及其皂苷类成分等<sup>[6-8]</sup>。同时发现双参中含有丰富的水溶性成分,且水溶性部位的抗氧化活性最强,能显著提高小鼠的抗应激能力。由此推测:双参中的活性成分可能为多糖类成分。因此,本实验对不同醇沉双参多糖的单糖组成及抗氧化活性进行研究。双参经沸水提取,Sevage法脱蛋白,AB-8大孔吸附树脂柱层析处理,再分别用40%、60%和80%乙醇醇沉得到粗多糖TGP-1、TGP-2和TGP-3。采用柱前衍生化法对TGP-(1-3)的单糖组成进行分析。考察PMP衍生化方法学的稳定性、精密度和灵敏度。以TGP-(1-3)对DPPH、羟自由基和超氧阴离子的清除作用作为评价指标,评价它们的体外抗氧化活性。本文首次报道了不同醇沉对双参多糖的单糖组成以及抗氧化活性的影响。为进一步研究双参多糖的结构、药理活性和作用机制提供实验依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 试剂

磷酸盐缓冲溶液 pH = 6.8(上海雷磁有限公司),DPPH(1,1-二苯基-2-苦基肼自由基,北京索莱宝有限公司),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 PMP(阿拉丁试剂有限公司),*D*-葡萄糖醛酸(批号 170730 纯度 > 98%),*D*-无水葡萄糖(批号 171206 纯度 > 99%),*D*-盐酸氨基葡萄糖(批号 171210 纯度 > 99%),*L*-岩藻糖(批号 170831 纯度 > 98%),*D*-甘露糖(批号 170921 纯度 > 99%),*D*-半乳糖(批号 171206 纯度 > 99%),*D*-阿拉伯糖(批号 171219 纯度 > 98%)均购自上海融禾医药科技有限公司,*D*-半乳糖醛酸(CAS号 91510-62-2 纯度 > 97% 上海源叶生物有限公司);三氟乙酸(国药集团化学试剂有限公司),乙腈色谱纯,其它试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

湘立离心机 TD5A-WS(湖南湘立科学仪器有限公司),Nicolet 380 FT-IR(Nicolet 380 科学仪器部),TU-1901 双光束紫外分光光度计(北京谱析通用仪器有限责任公司);电子分析天平 ATY224(株式会社岛津制作所),HPLC-1260 型高效液相色谱仪,色谱柱 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 × 250 mm, 5-Micron)。

### 1.3 材料

药用植物于2017年10月采自于云南省大理州云龙县五宝山,经大理大学段宝忠教授鉴定为川续断科双参属植物双参(*Triplostegia glandulifera*

Wall.)的地下根,植物样本(编号:wfs-20171017)存放于大理大学药学与化学学院王福生教授课题组。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 × 250 nm, 5-Micron, 美国 Agilent 公司);流动相(A):磷酸盐缓冲溶液(pH = 6.8), (B):乙腈,梯度洗脱(0 ~ 10 min, 15% ~ 17% B; 10 ~ 18 min, 17% ~ 22% B; 18.5 ~ 20 min, 22% ~ 23.5% B; 20 ~ 32 min, 23.5% ~ 31% B),柱温 30 °C,流速:0.8 mL/min,检测波长为 250 nm。

### 2.2 单糖对照品衍生物的制备

精密称取 *D*-葡萄糖醛酸 30.0 mg、*D*-盐酸氨基葡萄糖 37.1 mg、*D*-阿拉伯糖 35.2 mg、*D*-无水葡萄糖 34.0 mg、*D*-半乳糖 32.2 mg、*D*-甘露糖 36.1 mg、*D*-半乳糖醛酸 32.0 mg 和 *L*-盐藻糖 34.2 mg。分别置于 10 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度制成混合标准单糖溶液,充分摇匀。取 100 μL 单糖混合标准溶液置于具塞式封管中,依次加入 100 μL 0.3 mol/L NaOH, 200 μL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液,混匀,在 70 °C 油浴中加热搅拌反应 1 h 后,冷却至室温,加 100 μL 0.3 mol/L HCl 溶液中和过量的 NaOH,使其溶液呈中性。加入 500 μL 蒸馏水,再加入 500 μL 氯仿萃取,反复萃取 5 次。水相用 0.22 μm 滤膜过滤得混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

#### 2.3.1 双参粗多糖的提取

称取干燥双参样品 2.0 kg,粉碎,加入 10 倍量 95% 乙醇冷浸 24 h,此操作重复 3 次,得低极性小分子成分为主的粗提物;药渣加入 5 倍量水加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并滤液,减压浓缩得水溶性成分为主的粗提物。粗提物采用 Sevage 法去除蛋白,再经 AB-8 大孔吸附树脂柱层析分离,以蒸馏水作为洗脱剂,利用苯酚硫酸法检测,得到水溶性多糖类成分,将其浓缩至 600 mL,依次加入无水乙醇至醇沉浓度为 40%、60% 和 80%,置于 4 °C 冰箱 24 h, 3 500 rpm 离心 10 min,沉淀冷冻干燥分别得双参多糖 TGP-1、TGP-2 和 TGP-3。

#### 2.3.2 衍生化供试品溶液制备

取粗糖样品 20.0 mg,置于 10 mL 容量瓶,配制成 2 mg/mL 样品溶液,取样品溶液 1 mL 于具塞式封管,加入 1 mL 4 mol/L 三氟乙酸(TFA)溶液,氮气保护,于 110 °C 油浴加热反应 8 h 后,减压浓缩蒸

干,残渣加入甲醇,重复5次至TFA除尽,加入100  $\mu\text{L}$  热水使其溶解,得样品水解液。精密吸取样品水解液100  $\mu\text{L}$ ,同2.2项下方法进行衍生化,溶液过0.22  $\mu\text{L}$  滤膜后得供试品溶液。

## 2.4 方法学考察

### 2.4.1 精密密度试验

按2.2项下处理混合标准单糖对照品。进样20  $\mu\text{L}$ ,连续进样6次,分别计算八个单糖出峰时间和峰面积RSD值。*D*-甘露糖、*D*-盐酸氨基葡萄糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、*D*-阿拉伯糖和*L*-岩藻糖的出峰时间RSD值在0.07%~0.13%范围内,峰面积的RSD值在0.08%~0.66%范围内,结果表明仪器精密密度良好。

### 2.4.2 重复性试验

称取粗多糖TGP-1、TGP-2和TGP-3各6份,每份约35 mg,按2.3.2项下方法处理得多糖水溶液。依次进样20  $\mu\text{L}$ ,结果显示TGP-1和TGP-2多糖中含*D*-甘露糖、*D*-盐酸氨基葡萄糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖和*D*-阿拉伯糖。出峰时间的RSD值分别在0.3%~1.92%和0.87%~1.73%范围内,峰面积的RSD值分别在1.7%~2.80%和1.43%~2.12%范围内;TGP-3多糖中含*D*-葡萄糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖和*D*-阿拉伯糖。

出峰时间的RSD值在1.03%~2.67%范围内,峰面积的RSD值2.01%~3.02%范围内,表明该方法重复性良好。

### 2.4.3 稳定性试验

取TGP-1、TGP-2和TGP-3多糖水解衍生化处理后的供试品溶液,室温下存放,分别于4、8、12、24、36、48 h测定,记录出峰时间和峰面积。结果TGP-1和TGP-2中*D*-甘露糖、*D*-盐酸氨基葡萄糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-无水葡萄糖、*D*-半乳糖和*D*-阿拉伯糖出峰时间RSD值分别在0.16%~0.24%和0.37%~1.53%范围内;峰面积RSD值在0.32%~1.81%和0.45%~2.35%。TGP-3中*D*-葡萄糖醛酸、*D*-无水葡萄糖、*D*-半乳糖和*D*-阿拉伯糖出峰时间RSD值在0.20%~1.27%范围内,峰面积的RSD值在0.51%~2.03%范围内。表明双参多糖水解液在48 h内稳定性良好。

## 2.5 紫外全波长扫描

精密称取TGP-1、TGP-2和TGP-3各10 mg置10 mL容量瓶,加蒸馏水定容。配制成1 mg/mL的多糖溶液,在200~900 nm波长范围下扫描。以确

定多糖中蛋白质和核酸的清除效果。

## 2.6 红外光谱表征

### 2.6.1 供试品的制备

取TGP-1、TGP-2和TGP-3粉末于65  $^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重,分别取样品粉末约1 mg至玛瑙研钵中,加入溴化钾粉末100 mg最为分散剂,充分研磨混匀。取适量的细粉平铺于模具中,以18 MPa压力下1 min取出,以透光率强者作为供试品。

### 2.6.2 红外光谱条件

透明薄片于红外光谱仪进行4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ 红外光谱扫描,扫描32次,分辨率4  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描实时扣除 $\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CO}_2$ 的背景。

## 2.7 抗氧化活性测试

### 2.7.1 清除DPPH活性作用的测试

根据改良的Kao等<sup>[9]</sup>的方法,检测TGP-1、TGP-2和TGP-3对DPPH的清除能力。将多糖溶液配制成浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的样品溶液,向96孔板中加入不同浓度的样品溶液,每个样品浓度设5个复孔,再向各孔中加入150  $\mu\text{L}$  DPPH甲醇溶液,以相同浓度的Vc溶液作阳性对照组,蒸馏水作空白对照,于室温黑暗处放置30 min后,酶标仪517 nm波长处测定吸光度值。按公式 =  $(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$  计算TGP-(1-3)的清除率。

### 2.7.2 清除羟自由基作用的测试

采用Fenton法<sup>[10]</sup>检测TGP-1、TGP-2和TGP-3对羟基自由基的清除能力。将多糖溶液配制成浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的样品溶液。取10 mL试管,依次加入6 mmol/L的 $\text{FeSO}_4$ 溶液1 mL,6 mmol/L的水杨酸溶液1 mL,最后加入6 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液1 mL,37  $^{\circ}\text{C}$ 下反应1h,以相同浓度的Vc溶液作阳性对照组,蒸馏水作空白对照组,于510 nm处测定吸光度值。按公式 =  $(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$  计算TGP-(1-3)清除率。

### 2.7.3 清除超氧阴离子作用测试

将多糖溶液配制成浓度0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的样品溶液。取10 mL试管加入1 mL多糖溶液,依次向试管中加入0.05 mol/L Tris-HCl (pH = 8.2) 4.5 mL,25 mmol/L邻苯三酚0.4 mL,于25  $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应5 min后,加入8 mmol/L HCl 1 mL终止反应,以相同浓度的Vc作阳性对照组,蒸馏水作空白对照组。于299 nm处测定吸光度值。按公式 =  $(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$  计算不同醇沉浓度多糖对超氧阴离子的清除率。

### 3 结果与分析

#### 3.1 HPLC 条件下建立八种单糖混合溶液的标准曲线

分别配制成浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、

0.8 mg/mL 的混合单糖系列溶液,按 2.2.3 项下方法进行衍生化处理,分别进样 20  $\mu$ L 进行测定。以进样浓度  $x$ (mg/mL)为横坐标,峰面积  $y$  为纵坐标,得各单糖的回归方程和相关系数。结果见表 1。

表 1 单糖的标准曲线

Table 1 Calibration curve equations for monosaccharides

单糖 Monosaccharide	线性回归方程 Regression equation	线性范围 Linearity range (mg/mL)	相关系数 Correlation coefficient $R^2$
<i>D</i> -甘露糖 <i>D</i> -Mannose	$y = 406.3x + 108.65$	0.50 ~ 8.00	0.999 5
<i>D</i> -盐酸氨基葡萄糖 <i>D</i> -Glucosaminehydrochloride	$y = 588.62x - 49.41$	0.52 ~ 8.50	0.999 5
<i>D</i> -葡萄糖醛酸 <i>D</i> -Glucuronic acid	$y = 145.22x + 45.12$	0.47 ~ 7.50	0.999 8
<i>D</i> -半乳糖醛酸 <i>D</i> -Galacturonic acid	$y = 321.59x + 113.87$	0.44 ~ 6.90	0.999 9
<i>D</i> -葡萄糖 <i>D</i> -Glucose	$y = 191.55x + 250.95$	0.44 ~ 7.00	0.999 6
<i>D</i> -半乳糖 <i>D</i> -Galactose	$y = 482.59x + 96.92$	0.38 ~ 6.00	0.999 6
<i>D</i> -阿拉伯糖 <i>D</i> -Arabinose;	$y = 298.8x + 210.95$	0.50 ~ 7.80	0.999 7
<i>L</i> -岩藻糖 <i>L</i> -Fucose.	$y = 126.25x + 318.95$	0.56 ~ 9.00	0.999 8

#### 3.2 混合单糖对照图谱与 3 种多糖指纹图谱比较

在 2.1 项的色谱条件下,混合单糖衍生物、TGP-1 多糖衍生物、TGP-2 多糖衍生物和 TGP-3 多糖衍生物分别进样 20  $\mu$ L,记录色谱图,结果显示:各色谱峰的分度良好,TGP-(1-3) 主峰与混合单糖对照品溶液的主峰的保留时间保持一致。结果见图 1 和表 2。双参多糖 TGP-1、TGP-2 和 TGP-3 经衍生化处理,并与混合单糖标准品溶液对比。结果显示:TGP-1 和 TGP-2 中均含有 *D*-甘露糖、*D*-盐酸氨基葡萄糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-无水葡萄糖、*D*-半乳糖和 *D*-阿拉伯糖。TGP-1 中各单糖组成的摩尔比为 0.06:0.03:0.33:3.90:0.63:0.41;而 TGP-2 的摩尔

比为 0.08:0.06:1.05:15.71:0.92:0.49。TGP-3 中含有 *D*-葡萄糖醛酸、*D*-无水葡萄糖、*D*-半乳糖和 *D*-阿拉伯糖,其单糖组成的摩尔比为 0.49:5.65:0.50:0.35。

#### 3.3 紫外全波长扫描分析

蛋白质中含有色氨酸残基和络氨酸残基,其分子内部存在着共轭双键,故在 280 nm 处有一吸收峰。核酸的组成成分中具有嘌呤、嘧啶碱基,这些碱基均具有共轭双键,在紫外光区的 250 ~ 280 nm 处有强烈的吸收作用,最大吸收值在 260 nm 左右。图 2 表明多糖 TGP-(1-3) 在 260 和 280 nm 均没有吸收峰,故双参多糖中的蛋白质和核酸清除效果良好。

表 2 样品溶液的单糖组成及摩尔比

Table 2 Monosaccharide composition and molar ratio of sample solution

样品溶液 Sample solution	单糖组成 Monosaccharide composition	摩尔比 Molar ratio
TGP-1	Man GluN GalA Glc Gal Ara	0.06:0.03:0.33:3.90:0.63:0.41
TGP-2	Man GluN GalA Glc Gal Ara	0.08:0.06:1.05:15.71:0.92:0.49
TGP-3	GalA Glc Gal Ara	0.49:5.65:0.50:0.35

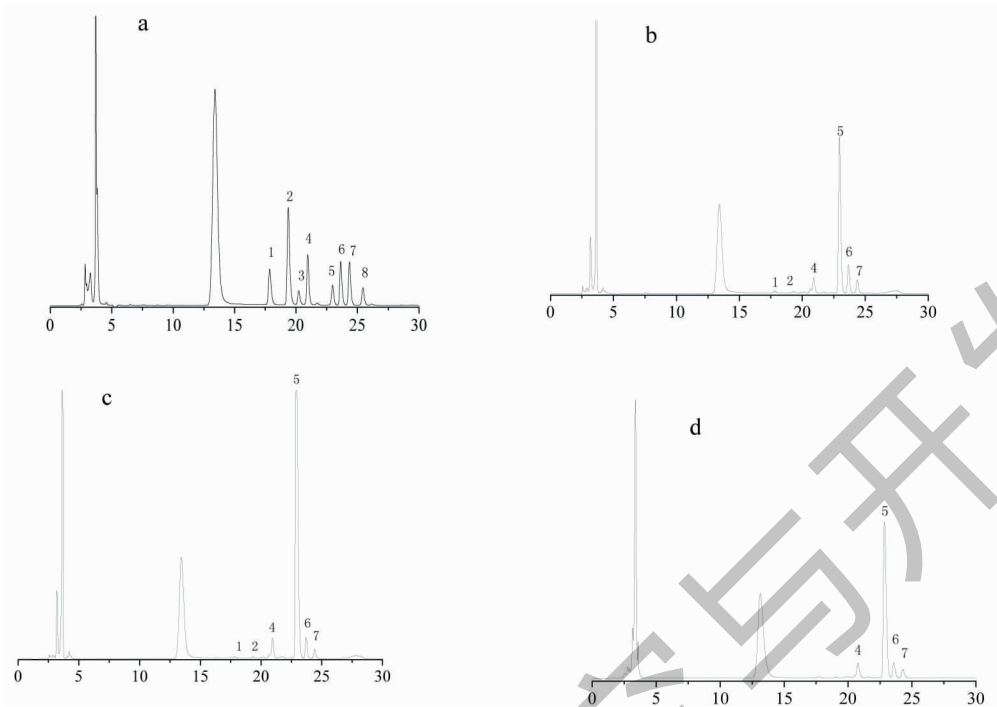


图1 混合单糖标准品和不同醇沉多糖水解液的PMP衍生化产物色谱图

Fig. 1 Chromatogram of PMP derivatization product of mixed monosaccharide standard and different alcohol precipitation polysaccharide hydrolysate

注: a. 单糖混标; b. TGP-1; c. TGP-2; d. TGP-3; 1. *D*-甘露糖; 2. *D*-盐酸氨基葡萄糖; 3. *D*-葡萄糖醛酸; 4. *D*-半乳糖醛酸; 5. *D*-葡萄糖; 6. *D*-半乳糖; 7. *D*-阿拉伯糖; 8. *L*-岩藻糖。Note: a. Monosaccharide mixed standard; b. TGP-1; c. TGP-2; d. TGP-3; 1. *D*-Mannose; 2. *D*-Glucosamine hydrochloride; 3. *D*-Glucuronic acid; 4. *D*-Galacturonic acid; 5. *D*-Glucose; 6. *D*-Galactose; 7. *D*-Arabinose; 8. *L*-Fucose.

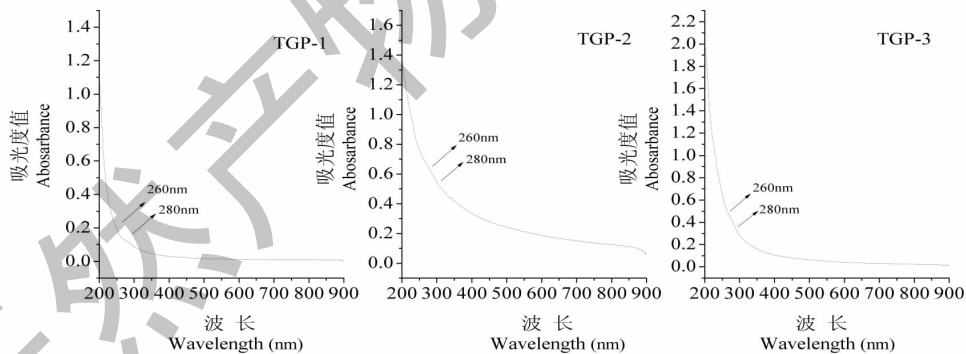


图2 TGP-(1-3)在200~900 nm下的紫外扫描图

Fig. 2 UV spectra of TGP-(1-3) in the 200-900 nm

### 3.4 红外光谱分析

TGP-(1-3)的红外光谱如图3所示。结果显示:在 $3\ 407\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的宽峰为O-H伸缩振动特征峰。 $3\ 000\sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰为糖链中饱和甲基或亚甲基C-H伸缩振动峰, $1\ 640\sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为C=O伸缩振动峰<sup>[11]</sup>。 $1\ 412\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为C-H的弯曲振动峰<sup>[12]</sup>。在 $1\ 100\sim 1\ 010$

$\text{cm}^{-1}$ 处吸收峰可能是吡喃糖环C-O-C的特征吸收<sup>[13]</sup>,多糖在 $850\sim 840\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 $\alpha$ -糖苷键的特征吸收<sup>[14]</sup>。

### 3.5 抗氧化活性分析

TGP-(1-3)对DPPH·、羟自由基和超氧阴离子的清除作用分别如图4a、4b和4c。结果显示:不同醇沉浓度的双参多糖对DPPH·消除能力在0.1~0.4

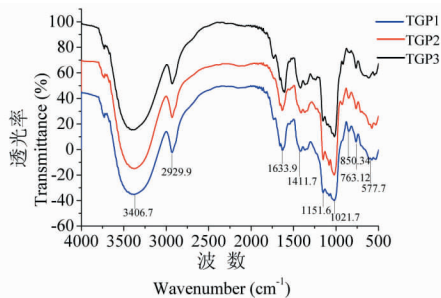


图3 TGP-(1-3)的红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectrum of TGP-(1-3)

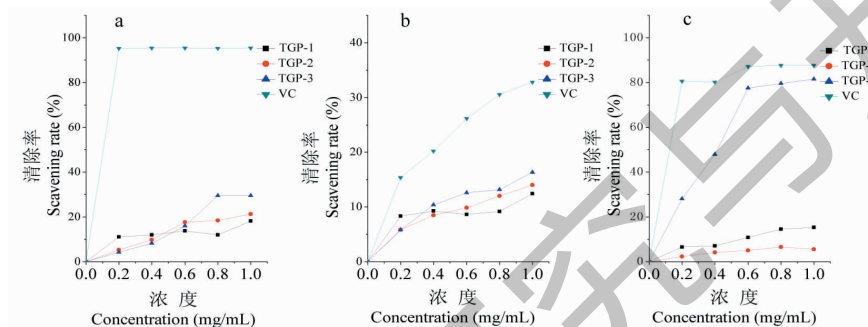


图4 不同醇沉部位对双参多糖清除DPPH、羟自由基和超氧阴离子的影响

Fig. 4 Effect of different alcohol precipitation on DPPH, hydroxyl and superoxide anion free radical scavenging of *T. glandulifera* polysaccharide

注: a. 不同醇沉部位双参多糖对DPPH清除的能力; b. 不同醇沉部位双参多糖对羟自由基清除的能力; c. 不同醇沉部位双参多糖对超氧阴离子清除的能力。Note: a. The ability of *T. glandulifera* polysaccharide to remove DPPH in different alcohol precipitation; b. The ability of *T. glandulifera* polysaccharide to remove hydroxyl radical in different alcohol precipitation; c. The ability of *T. glandulifera* polysaccharide to remove superoxide anion in different alcohol precipitation

#### 4 结论与讨论

本实验建立了双参多糖单糖组成的柱前衍生化高效液相分析方法,以乙腈和磷酸盐缓冲溶液(pH = 6.8)作为流动相,通过ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>柱,可较好地分离各双参多糖中的单糖成分。确定了双参多糖的单糖组成及摩尔比,TGP-1和TGP-2的单糖组成相同而摩尔比不同,它们均含有D-甘露糖、D-盐酸氨基葡萄糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖、D-半乳糖和D-阿拉伯糖,其中,TGP-1摩尔比为0.06:0.03:0.33:3.90:0.63:0.41,TGP-2摩尔比为0.08:0.06:1.05:15.71:0.92:0.49;而TGP-3中含有D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖、D-半乳糖和D-阿拉伯糖,其摩尔比为0.49:5.65:0.50:0.35。表明不同醇沉得到的双参多糖结构明显不同。

目前分析多糖的单糖组成,多采用GC衍生化法,由于其挥发性的限制及用GC衍生化法测试单糖组成时会受到单糖异构化的影响,使得GC衍生

mg/mL之间,TGP-1对DPPH的消除能力略大于TGP-2和TGP-3,当浓度达到0.8 mg/mL TGP-3消除DPPH的能力强于TGP-1和TGP-2。TGP-1、TGP-2和TGP-3对羟自由基均有一定的消除能力,并随浓度的增加,消除羟自由基的能力呈上升趋势。TGP-3的消除能力略强于其他两个组分。在不同浓度下TGP-1、TGP-2和TGP-3均对超氧阴离子清除有一定作用,其中TGP-3的效果最为显著。当浓度达到0.6 mg/mL时,TGP-3清除超氧阴离子的能力略低于V<sub>C</sub>。TGP-1和TGP-2对超氧阴离子的清除也有一定的效果,其中TGP-1的清除效果最弱。

化法在定分析时结果不太准确。PMP-HPLC法不受样品挥发性限制,且紫外检测器灵敏度高。本研究对PMP-HPLC柱前衍生化方法学考察,结果显示该方法精密度和准确度高,重现性好,衍生化的多糖水解液在48 h内稳定性良好,此方法适合分析双参粗多糖的单糖组成。经紫外全波长扫描,证明通过水提醇沉,sevage法脱蛋白和大孔吸附树脂柱层析的双参多糖中不含有蛋白质和核酸。通过红外光谱分析,提示不同醇沉所得的多糖均具有α-糖苷键的特征吸收以及吡喃糖环的特征吸收,为双参多糖的结构表征提供了参考依据。

本课题组前期实验表明:双参粗提物能提高四氧嘧啶糖尿病模型小鼠心、肝和肾组织的SOD活性,并能降低心、肝和肾组织中MDA含量,这种作用可能通过清除自由基及抗脂质过氧化过程实现,预示双参对糖尿病患者的的重要器官有保护作用。双参多糖的体外抗氧化活性测试结果提示,随着醇沉

浓度的增大,所得双参多糖的抗氧化活性越强,尤其以清除超氧阴离子作用最为显著,由此进一步推测双参中多糖类成分可能是对糖尿病肾病具有治疗作用的活性成分。本实验为双参均一多糖的分离纯化、结构表征、药理活性及其作用机制的进一步研究提供了基础材料。

### 参考文献

- 1 Chinese Flora Editorial Board of the Chinese Academy of Sciences(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 1986: 46-47.
- 2 Dali Prefecture People's Government. Dali Chinese Medicine Resources(大理中药资源志)[M]. Yunnan: Yunnan Nationalities Publishing House, 1991: 265.
- 3 Liu XB, Guo MX, Li LX, et al. Study on the hypoglycemic effect of *Triplostegia glandulifera* wall[J]. Yun J Tradit Chi Med Mate Med(云南中医中药杂志), 2008, 29(5): 49-50.
- 4 Liu XB, Guo MX, Shi GR, et al. Studies on hypoglycemic mechanism of *Triplostegia glandulifera* wall[J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2012, 40: 16111-16112.
- 5 Liu XB, Guo MX, Xu J, et al. Study on the anti-stimulation action of *Triplostegia glandulifer* wall[J]. J Mod Med Heal(现代医药卫生), 2008, 24: 1265-1266.
- 6 Gui X, Wang FS. Study on irldroids of medicinal plants *Triplostegia glandulifera* [J]. Chin J Ethnopharm(中国民族民间医药), 2018, 27: 37-40.
- 7 Zhang ZZ, Chen YF, Wang FS. Study on triterpenoid compositions of medicinal plants *Triplostegia glandulifera*[J]. J Dali Univ(大理大学学报), 2017, 1(4): 6-8.

- 8 Chen YF, Zhang ZZ, Wang FS. Study on chemical components from n-butanol fraction of medicinal plants *Triplostegia glandulifera*[J]. J Dali Univ(大理大学学报), 2017, 1(4): 9-11.
- 9 Kao T H, Chen B H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(20): 7544-7555.
- 10 Yang T, Jia M, Zhou S, et al. Antivirus and immune enhancement activities of sulfated polysaccharide from *Angelica sinensis*[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50: 768-772.
- 11 Wu Y, Yi L, Li E, et al. Optimization of *Glycyrrhiza* polysaccharide liposome by response surface methodology and its immune activities [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 102: 68-75.
- 12 Ge Y, Duan Y, Fang G, et al. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: isolation, purification, structural features and antioxidant activities [J]. Carbohydr Polym, 2009, 77: 188-193.
- 13 Casu B, Scovenna G, Cifonelli A J, et al. Infrared spectra of glycosaminoglycans in deuterium oxide and deuterium chloride solution: quantitative evaluation of uronic acid and acetamidodeoxyhexose moieties [J]. Carbohydr Res, 1978, 63(6): 13-27.
- 14 Xue J, Tong S, Wang Z, et al. Chemical characterization and hypoglycaemic activities *in vitro* of two polysaccharides from *Inonotus obliquus* by submerged culture [J]. Molecules, 2018, 23(12): 2-14.

(上接第 50 页)

- 9 State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantine. GB2635-1992 Flue-cured tobacco[S]. Beijing: China Standard Press(中国标准出版社), 1992.
- 10 State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantine. GB2635-1992 Flue-cured tobacco[S]. Beijing: China Standard Press(中国标准出版社), 1992.
- 11 Yu JJ. Cigarette manufacturing technology[M]. Beijing: China Agri Press(中国农业出版社), 2003: 37-49.
- 12 Yan KY. Tobacco chemistry[M]. Zhengzhou: Zhengzhou University Press(郑州大学出版社), 2002.
- 13 Liu GS. Tobacco cultivation[M]. Beijing: China Agriculture Press(中国农业出版社), 2003.
- 14 Shao HF, Guo B, Ji XM, et al. Comparative analysis on chemical components in flue-cured tobacco leaf from the main to-

- 15 bacco growing areas of Yunnan Province[J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2007, 7: 1957-1959.
- 15 Zhao MQ, Su CT, Ji XM, et al. Effects of maturity on physical properties, chemical components and content of neutral aroma constituents in flue-cured tobacco[J]. Acta Agri Boreali-Sin(华北农学报), 2008, 23: 146-150.
- 16 Cao XY, Yang JM, Yang HQ, et al. Progress of terpenes in tobacco[J]. Crop Res(作物研究), 2013, 27: 296-301.
- 17 Hu HY, Xu, ZC, Su YS, et al. Research progress in factors influencing naphthadiene content in tobacco leaves [J]. Acta Agri Jiangxi(江西农业学报), 2010, 22(1): 17-20.
- 18 Chen ZY, LI XL, Wang Z, et al. Correlation analysis between non-volatile acids with sensory quality in flue-cured tobacco leaf[J]. J Zhengzhou Univ Light Ind; Nat Sci(郑州轻工业学院学报: 自科版), 2013, 28(3): 29-32.
- 19 Rumm JD. Tobacco Products with Vitamin E: US6079418 [P]. 1998-04-21.