

库尔勒香梨酸性多糖 PSAP-1 的分离纯化及其糖醛酸含量测定

米合热尼沙·阿木热江^{1#}, 胡 晟^{1#}, 任国瑞¹, 海力茜·陶尔大洪^{1*}, 杨 飞^{1,2*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆维吾尔自治区分析测试研究院, 乌鲁木齐 830011)

摘 要: **目的** 分离纯化库尔勒香梨酸性多糖(*Pyrus sinkiangensis* Yu. acidic polysaccharide, PSAP-1), 检测红外吸收并对其所含糖醛酸进行含量测定。**方法** 经 DEAE-650M、HW-55F 及 Sephacryl S-300 色谱柱进行分离纯化 PSAP-1, 通过蒽酮-硫酸法测定多糖含量, 红外光谱法确定其化学键或官能团信息, 采用间羟基联苯法测定 PSAP-1 中糖醛酸的含量。**结果** 葡萄糖对照品和 PSAP-1 的吸光度在 0.04~0.12 mg/mL 质量浓度范围内线性关系良好, PSAP-1 含量为 61.51%, 精密度、稳定性、重复性和加样回收率的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)分别为 0.2%、1.3%、1.7%、1.4%, 均小于 2.0%; 红外图谱显示, PSAP-1 中有糖醛酸的特征吸收峰。确定 D-半乳糖醛酸和 PSAP-1 的吸光度在 0.035~0.055 mg/mL 质量浓度范围内线性关系良好, 糖醛酸的含量为 62.78%, 精密度、稳定性、重复性和加样回收率的 RSD 分别为 0.14%、0.31%、1.00%、1.10%, 均小 2.0%。**结论** 本研究从新疆库尔勒香梨中得到多糖含量高、富含糖醛酸的酸性均一多糖组分 PSAP-1, 所确定的 PSAP-1 多糖含量和糖醛酸含量测定方法准确可靠, 为库尔勒香梨的深层研究提供了基础依据。

关键词: 库尔勒香梨; 酸性多糖; 分离纯化; 红外图谱; 糖醛酸

Separation and purification of acidic polysaccharide PSAP-1 from *Pyrus sinkiangensis* Yu. and its uronic acid content determination

MIHERENISHA A-Mu-Re-Jiang^{1#}, HU Sheng^{1#}, REN Guo-Rui¹,
HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong^{1*}, YANG Fei^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;
2. Analysis and Testing Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To separate and purify *Pyrus sinkiangensis* Yu. acidic polysaccharide (PSAP-1) from *Pyrus sinkiangensis* Yu., and detect infrared absorption and determine the content of uronic acid in it. **Methods** PSAP-1 was separated and purified by DEAE-650M, HW-55F and Sephacryl S-300 chromatographic columns. The content was

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01A141)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021D01A141)

#米合热尼沙·阿木热江与胡晟为共同第一作者

#MIHERENISHA A-Mu-Re-Jiang and HU Sheng are Co-first Authors

*通信作者: 海力茜·陶尔大洪, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: hailiqian2471@sina.com

杨 飞, 博士, 研究员, 主要研究方向为天然药物分析研究。E-mail: 279533257@qq.com

*Corresponding author: HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong, Professor, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, No.393, Xinyi Road, Xinshi District, Urumqi 830011, China. E-mail: hailiqian2471@sina.com

YANG Fei, Ph.D, Professor, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, No.393, Xinyi Road, Xinshi District, Urumqi 830011, China. E-mail: 279533257@qq.com

determined by anthrone-sulfuric acid method, and the chemical bond or functional group information was determined by infrared spectroscopy, and the content of uronic acid in PSAP-1 was determined by *m*-hydroxybiphenyl method.

Results The absorbances of glucose reference substance and PSAP-1 were in good linear relationships within the mass concentration range of 0.04–0.12 mg/mL. The content of PSAP-1 was 61.51%, and the relative standard deviations (RSDs) of precision, stability, repeatability and sample recoveries were 0.2%, 1.3%, 1.7% and 1.4%, respectively, which were all less than 2.0%. Infrared spectrum showed that there was a characteristic absorption peak of uronic acid in PSAP-1. The absorbances of *D*-galactouronic acid and PSAP-1 were in good linear relationships within the mass concentration range of 0.035–0.055 mg/mL. The content of uronic acid was 62.78%, and the RSDs of precision, stability, repeatability and sample recoveries were 0.14%, 0.31%, 1.00%, 1.10%, which were all less than 2.0%. **Conclusion** In this study, PSAP-1, an acidic homogeneous polysaccharide component with high polysaccharide content and rich uronic acid, is obtained from *Pyrus sinkiangensis* Yu. in Xinjiang. The methods used for the determination of PSAP-1 polysaccharide content and its uronic acid content are accurate and reliable, providing a basic basis for the deep research of *Pyrus sinkiangensis* Yu..

KEY WORDS: *Pyrus sinkiangensis* Yu.; acidic polysaccharide; separation and purification; infrared spectrum; uronic acid

0 引言

库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yu.)为蔷薇科, 梨属果实, 主要种植在新疆库尔勒周边地区^[1], 属于天然绿色食品。民间素有滋阴、润肺、消痰、保肝明目之美誉。现代药理学研究表明, 库尔勒香梨富含多糖、维生素、生物碱类、三萜类、黄酮类等成分^[2], 并具有免疫调节、抗氧化、抗炎、抑菌、抗溃疡、抗肿瘤及镇咳祛痰等药理作用^[3-4]。

多糖又称为多聚糖, 一般是指由 10 个或以上单糖聚合而成的一类生物大分子, 在高等植物、藻类、真菌类及动物体内均有存在^[5-6]。已有研究表明植物多糖具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗过敏和抗肿瘤等多种生物学活性^[7-12]。从天然植物提取的多糖中以酸性多糖居多, 其毒副作用小^[13]。酸性多糖是指含糖醛酸有关的羧基或硫酸根等酸性基团的多糖, 是一种重要的生命物质^[14], 其中糖醛酸为酸性糖分子中羟甲基氧化成羧基的产物。近代药理学研究发现, 天然植物酸性多糖具有体内抗 Lewis 肺癌的活性^[15], 可以显著促进巨噬细胞的增殖、刺激巨噬细胞的吞噬能力, 诱导一氧化氮(NO)和免疫调节细胞因子的产生^[16]。目前, 对于库尔勒香梨多糖的研究仅限于总多糖, 对酸性多糖成分含量测定、结构分析等尚未见报道。因此本研究选择低毒、环保及操作简便的水提醇沉法提取库尔勒香梨粗多糖, 经阴离子交换柱 DEAE-650M、HW-55F 色谱柱以及 Sephacryl S-300 色谱柱进行分离纯化, 得到干燥的库尔勒香梨酸性多糖(*Pyrus sinkiangensis* Yu. acidic polysaccharide, PSAP-1), 采用红外光谱法(infrared spectroscopy, IR)^[17]探讨其特征官能团, 并通过间羟基苯法^[18]测定其含量, 拟为库尔勒香梨酸性多糖的结构分析和

生物学活性研究提供理论依据并为酸性多糖质量控制分析方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

库尔勒香梨果实, 购于新疆九鼎农产品批发市场, 经新疆医科大学药学院生药/天药教研室丛媛媛教授鉴定为库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yu.)果实。

无水乙醇(分析纯, 天津市鑫铂特化工有限公司); 葡萄糖(glucose, Glc)标准品(纯度≥98%)、苯基酚(纯度 97%)、*D*-半乳糖醛酸(*D*-galacturonic acid monohydrate, *D*-GA)、蒽酮(分析纯)(上海展云化工有限公司); 溴化钾(KBr)(色谱纯)、浓硫酸(H₂SO₄)、氯化钠(NaCl)、无水四硼酸钠、氢氧化钠(分析纯)(天津市盛奥化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

HWS-28 型电热恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司); UV-2700 型紫外分光光度计[岛津仪器(苏州)有限责任公司]; FTIR-8400S 傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司); SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); N-1001 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); AL204 型电子分析天平[*d*=0.0001 g, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 库尔勒香梨酸性多糖 PSAP-1 的制备

新鲜库尔勒香梨果实洗净, 去核切片, 在阴凉通风处晾干。用 95%乙醇脱脂 6 h, 过滤, 挥发乙醇, 粉碎, 按 1:30 (g/mL)水提 2 次(70℃, 每次 95 min)合并提取液,

浓缩,用乙醇沉淀(含醇量达80%),搅拌封口4℃冰箱中过夜。沉淀在90℃水浴锅中挥发乙醇呈膏状,加水溶解(适量),透析(截留分子量为 $M=7000$ Da)48 h后浓缩,置-80℃冰箱,冷冻干燥后即得库尔勒香梨总多糖。

称取3 g 库尔勒香梨总多糖溶解于70 mL 蒸馏水,在室温条件下离心2次(15 min/次,转速为4500 r/min),上清液上样于DEAE-650M(内径55 mm×高度19 cm)色谱柱,用0.5 mol/L NaCl进行洗脱,透析(截留分子量为 $M=7000$ Da)48 h,浓缩,冷冻干燥得到酸性多糖(PSA)。将3 g PSA加适量蒸馏水溶解,离心,上清液上样于DEAE-650M 色谱柱,用0.1~0.5 mol/L NaCl进行梯度洗脱,采用蒽酮-硫酸法制作洗脱曲线,取量最多的组分用HW-55F 凝胶色谱柱分离纯化,浓缩,透析(截留分子量为 $M=3500$ Da),冷冻干燥。进一步用Sephacryl S-300柱分离,透析,冷冻干燥,备用^[19-20]。

1.3.2 库尔勒香梨酸性多糖 PSAP-1 均一性的确定

称取1 mg分离纯化后的库尔勒香梨酸性多糖PSAP-1,用1 mL去离子水溶解后,配制成1 mg/mL溶液,无菌滤膜过滤后于高效凝胶渗透色谱仪分析。色谱条件:Agilent 1200 system,检测器:示差检测器,色谱柱:PL aquagel-OH MIXED-H (300 mm×7.5 mm, 8 μm),流动相:0.1 mol/L NaNO₃,流速0.2~0.6 mL/min,柱温:36℃。根据多糖组分出峰图的峰形进行判别其均一性。

1.3.3 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 含量的测定

(1)最大吸收波长的测定

制备0.1 mg/mL的Glc对照品溶液,吸取1.0 mL至具塞试管,加水至2 mL,置冰水浴加5.0 mL 蒽酮-硫酸溶液(1 mg/mL)摇匀,在沸水浴反应10 min,冷却,进行紫外-可见分光光度法(ultraviolet-visible spectrophotometry, UV-Vis)全波长扫描。精密称取PSAP-1 10 mg置25 mL容量瓶,加蒸馏水溶解并定容至刻度,相同方法进行全波长扫描。

(2)Glc 标准曲线的绘制

分别移取0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.4 mL Glc对照品溶液,各加入1.0 mL的蒸馏水,根据“1.3.3”(1)法在最大吸收波长处测定吸光度值 A ,空白为蒸馏水。以质量浓度为横坐标(X , mg/mL),吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线。

(3)库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 含量的测定

精确吸取1.0 mL PSAP-1样品溶液,加入1.0 mL水,根据“1.3.3”(1)法测定 A ,带入回归方程,根据式(1)求出其含量。

$$\text{多糖含量}/\% = C \times V/m \times 100\% \quad (1)$$

式中: C —多糖质量浓度(mg/mL); V —溶液体积(mL); m —PSAP-1质量(mg)。

1.3.4 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 含量测定的方法学考察

(1)精密度实验

精密量取PSAP-1溶液1.0 mL,加1.0 mL蒸馏水混匀,根据“1.3.3”(1)所述方法测 A 值($n=6$),求相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)值。

(2)稳定性实验

精密量取6份PSAP-1溶液1.0 mL,加1.0 mL蒸馏水,根据“1.3.3”(1)所述方法在0、30、60、90、120 min时测 A 值,求RSDs值。

(3)重复性实验

精密称取6份PSAP-1 10 mg置于25 mL容量瓶中,加水溶解并定容至刻度,分别吸取1.0 mL加1.0 mL蒸馏水混匀,按“1.3.3”(1)法测 A 值,求RSDs值。

(4)加样回收率实验

从PSAP-1样品溶液(0.4 mg/mL)中吸取9份0.2 mL(约0.1080 mg)分3组,每组分别加0.86、1.10、1.30 mL对照品溶液(0.1 mg/mL),摇匀,加水至2.0 mL,根据“1.3.2”(1)法测 A 值,求RSDs值。

1.3.5 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 的 IR 分析

精密称取PSAP-1 2 mg与200 mg KBr在玛瑙研钵中研磨混匀后压片,在4000~400 cm⁻¹区域内进行IR分析,确定糖苷键的构型及观察其他官能团^[21]。

1.3.6 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 中糖醛酸含量的测定

(1)最大吸收波长的测定

吸取1 mg/mL的D-GA对照品溶液0.5 mL置于10 mL容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,摇匀,吸取1 mL置于具塞试管中,在冰水浴加入6 mL 四硼酸钠-硫酸溶液(称取478 mg无水四硼酸钠,加100 mL浓硫酸,超声溶解),混匀,在沸水浴反应5 min后立即取出置冰水浴冷却,加间羟基联苯溶液(称取150 mg间羟基联苯标准品,加100 mL 0.5% NaOH溶液溶解)0.1 mL显色,5 min振荡,超声除气泡,进行全波长扫描。制备0.4 mg/mL PSAP-1溶液,同法进行全波长扫描^[22-23]。

(2)D-GA 标准曲线的绘制

精密吸取D-GA对照品溶液0.35、0.40、0.45、0.50、0.55 mL置于10 mL容量瓶,加水定容至刻度,吸取1.0 mL按“1.3.6”(1)所述方法在最大吸收波长处测 A 值,绘制A-C(D-GA对照品溶液浓度)标准曲线。

(3)PSAP-1 中糖醛酸含量的测定

从0.4 mg/mL的PSAP-1样品溶液中吸取1.0 mL加4.0 mL水,摇匀,从中吸取1.0 mL,根据“1.3.6”(1)所述方法在最大吸收波长处测 A 值,将 A 值带入回归方程,计算PSAP-1中糖醛酸的含量。

1.3.7 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 中糖醛酸含量测定的方法学验证

(1)精密度实验

精密量取1.0 mL PSAP-1溶液,加4.0 mL水混匀,从中吸取1.0 mL,根据“1.3.6”(1)所述方法测 A 值($n=6$),求RSDs值。

(2)稳定性实验

精密吸取PSAP-1溶液1.0 mL($n=6$),加4.0 mL蒸馏

水, 吸取 1.0 mL, 根据“1.3.6”(1)所述方法在 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、6.0 h 测 A 值, 求 RSDs 值。

(3)重复性实验

精密称取 PSAP-1 10 mg ($n=6$)置于 25 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 吸取 1.0 mL 加 4.0 mL 蒸馏水混匀, 吸取 1.0 mL, 根据“1.3.6”(1)所述方法测 A 值, 求 RSDs 值。

(4)加样回收率实验

从 PSAP-1 样品溶液(0.1 mg/mL)中吸取 9 份 0.3 mL 分 3 组, 各组分别加 0.24、0.30、0.36 mL 的 0.1 mg/mL D -GA 对照品溶液, 摇匀, 加水至 2.0 mL, 根据“1.3.6”(1)所述方法测 A 值, 求 RSDs 值。

1.4 数据处理

数据统计学分析采用 Excel 16.0 及 SPSS 26.0 软件。

2 结果与分析

2.1 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 分离纯化结果

如图 1、2 所示, 库尔勒香梨粗多糖经 DEAE-650M 柱第一步分离后得到的 PSA 再次用 0.1 和 0.2 mol/L NaCl 梯度洗脱分别得到 PSA-1-1、PSA-1-2 及 PSA-2 共 3 个组分, 均为浅棕色粉末。冷冻干燥后因 PSA-1-1、PSA-1-2 质量较少, 富集相对困难, 故仅对 PSA-2 继续分离。如图 3, PSA-2 经 HW-55F 凝胶柱分离纯化得到 4 个组分(PSA-2-1、PSA-2-2、PSA-2-3 和 PSA-2-4), 均为黄色粉末。其中 PSA-2-4 质量最多, 故对其继续进行分离纯化。

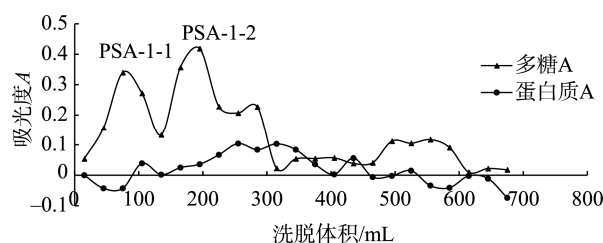


图 1 库尔勒香梨多糖的阴离子交换柱 DEAE-650M 0.1 mol/L NaCl 洗脱曲线

Fig.1 Elution curves of polysaccharides from *Pyrus sinkiangensis* Yu. on anion exchange column DEAE-650M with 0.1 mol/L NaCl

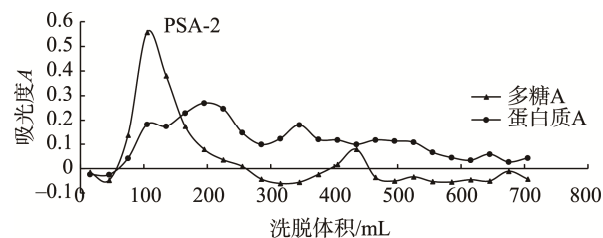


图 2 库尔勒香梨多糖的阴离子交换柱 DEAE-650M 0.2 mol/L NaCl 洗脱曲线

Fig.2 Elution curves of polysaccharides from *Pyrus sinkiangensis* Yu. on anion exchange column DEAE-650M with 0.2 mol/L NaCl

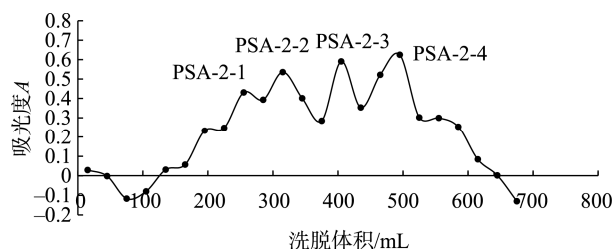


图 3 PSA-2 的 HW-55F 色谱柱洗脱曲线

Fig.3 Elution curve of PSA-2 on HW-55F column

PSA-2-4 经 Sephacryl S-300 洗脱后, 洗脱曲线呈近似尖锐的对称峰, 如图 4, 冷冻干燥后共得 321 mg 的浅黄色粉末, 命名为库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1。

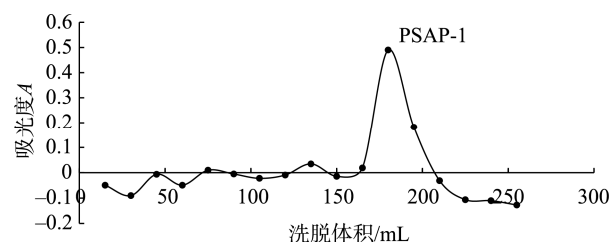


图 4 PSA-2-4 的 Sephacryl S-300 色谱柱洗脱曲线

Fig.4 Elution curves of PSA-2-4 on Sephacryl S-300 column

2.2 库尔勒香梨酸性多糖 PSAP-1 的均一性

如图 5 所示, 在保留时间 13.0 min 处, PSAP-1 呈近似对称单峰, 具有良好的均一性, 为高纯度多糖。

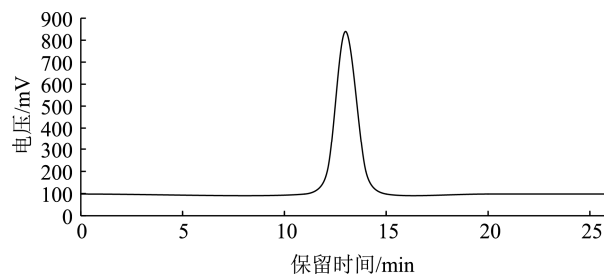


图 5 PSAP-1 的高效凝胶渗透色谱图

Fig.5 High performance gel permeation chromatogram of PSAP-1

2.3 库尔勒香梨均一多糖 PSAP-1 含量的测定结果

2.3.1 最大吸收波长扫描结果

经 400~800 nm 范围全波长扫描, 可知 Glc 对照品和 PSAP-1 样品溶液均在 629 nm 处有最大吸收, 结果如图 6 所示。

2.3.2 Glc 标准曲线及尔香梨酸性均一多糖 PSAP-1 含量的测定结果

根据 Glc 标准曲线, 得回归方程为 $Y=6.01X+0.0186$ (X 为 Glc 的质量浓度, Y 为吸光度), $r^2=0.9997$, 在 0.04~0.12 mg/mL 质量浓度范围内相关性系数 $r=0.9998$, 线性关系良好。将

PSAP-1 的 A 值 0.712 带入回归方程计算得 PSAP-1 含量为 61.51%。

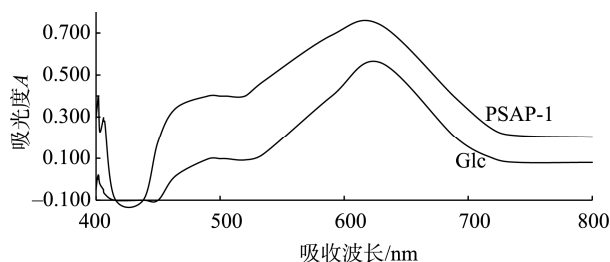


图 6 Glc 对照品和 PSAP-1 全波长扫描图

Fig.6 Full wavelength scanning charts of Glc reference and PSAP-1

2.3.3 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 含量测定的方法学考察结果

(1) 精密度结果

通过平行测定 6 次, 得到 PSAP-1 样品溶 A 平均值为 0.667, RSDs 为 0.2%, 低于 2.0%, 说明仪器具有良好的精密度。

(2) 稳定性结果

经 0、30、60、90、120 min 时间段测量 PSAP-1 样品溶液 A , 得到的 RSDs 为 1.3% < 2.0%, 说明此方法在 2 h 内稳定性良好。

(3) 重复性结果

6 份 PSAP-1 溶液测得 A 平均值为 0.593, RSDs 为 1.7% < 2.0%, 表明该方法重复性良好。

(4) 加样回收率结果

考察蒽酮-硫酸法测定 Glc 加样回收率, 计算得平均回收率为 98.8%, RSDs 为 1.4% < 2.0%。表明该方法准确可行。

2.3.4 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 的 IR 分析结果

库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 的 RT-IR 光谱结果如图 7 所示, 在 3394 cm^{-1} 处为 O-H 的伸缩振动, 是糖类分子间或分子内存在氢键。在 2936 cm^{-1} 处为 C-H 的伸缩振动, $1300\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 处出现的峰为 C-OH 侧基和 C-O-C 糖苷带的伸缩振动, 这些特征峰表明 PSAP-1 确定为多糖^[24-25]。 $1200\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 之间的特征吸收峰证明糖链含有吡喃环结构^[26-27]。根据 1408 cm^{-1} 处出现的 -COOH 的 C-O 伸缩振动引起的吸收峰和 1612 cm^{-1} 处出现的 -COOH 或 -CO-基团的 C=O 非对称伸缩振动引起的吸收峰, 可确定 PSAP-1 具有

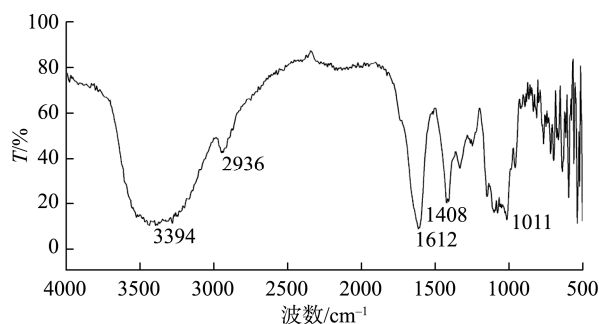


图 7 PSAP-1 红外光谱图

Fig.7 Infrared spectrogram of PSAP-1

糖醛酸的特征吸收^[28]。此外, 在 1090 cm^{-1} 处存在的 β -葡聚糖的特征吸收峰是由于 O-取代葡萄糖残基而存在^[29]。分析结果表明该样品中可能含有糖醛酸结构, 因此进一步对 PSAP-1 进行糖醛酸的含量测定来验证该推测。

2.4 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 中糖醛酸含量的测定结果

间羟基联苯法用于天然产物糖醛酸的质量控制检测时, 多糖中的中性糖对其测定结果的影响很小, 该方法对糖醛酸含量测定的特异性较强^[30]。故采用此法测定 PSAP-1 中糖醛酸的含量, 结果如下。

2.4.1 最大吸收波长扫描结果

在 400~800 nm 范围内全波长扫描, 测得 D-GA 对照品和 PSAP-1 样品溶液在 527 nm 处均有最大吸收, 结果见图 8。

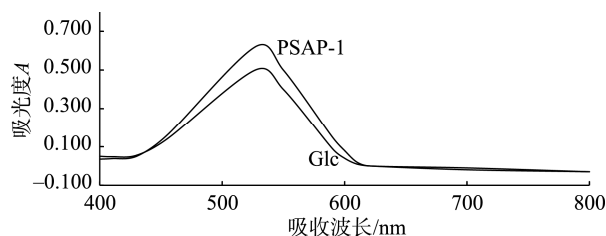


图 8 D-GA 对照品和 PSAP-1 全波长扫描图

Fig.8 Full wavelength scanning of D-GA reference and PSAP-1

2.4.2 D-GA 标准曲线及 PSAP-1 中糖醛酸含量的测定结果

由 D-GA 标准曲线可知, 回归方程为 $Y=15.28X-0.1824$ (X 为 D-GA 的质量浓度, Y 为吸光度), $r^2=0.9994$, 说明在 $0.035\sim 0.055\text{ mg/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好。将 PSAP-1 的 A 值 0.584 带入回归方程计算得到所含糖醛酸含量为 62.78%。

2.4.3 库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 中糖醛酸含量测定的方法学考察结果

(1) 精密度实验结果

经平行测定 ($n=6$), PSAP-1 样品溶液 A 平均值为 0.519, RSDs=0.14% 低于 2.0%, 说明该仪器精密度良好。

(2) 稳定性实验结果

经 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、6.0、12.0 h 测 PSAP-1 样品溶液 A , RSDs 值为 0.31% < 2.0%, 此方法在 6 h 内稳定性良好。

(3) 重复性实验结果

6 份 PSAP-1 样品 A 平均值为 0.579, 平均含量为 62.3%, RSDs 为 1.00% < 2.0%, 表明该方法重复性良好。

(4) 加样回收率实验结果

考察间羟基联苯法测定 D-GA 加样回收率, 计算得平均回收率为 99.1%, RSDs 为 1.10% < 2.0%, 表明该方法准确可行。

3 结 论

酸性多糖属于高分子化合物, 一般有较多分支, 结构复杂, 不易分离鉴定, 为其深入研究和临床应用带来了很大的阻碍。本研究采用课题组前期成熟的水提醇沉提取法和柱色谱分离的工艺来制备库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1, 采用蒽酮-硫酸法测得所得 PSAP-1 含量为 61.51%, 用间羟基苯法测得 PSAP-1 中的糖醛酸含量为 62.78%。最后通过 IR 分析推测其含有糖醛酸的特征吸收, 本研究中所使用的分离纯化方法操作简便、高效、低耗能, 具有可靠的纯化效果, 可避免有毒试剂的带入及对环境造成污染, 但对 PSAP-1 的结构组成分析的研究还过于单一, 后续可再用化学方法(甲基化、Smith 降解)以及仪器分析[核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)]等方式对其单糖组成、糖苷键的构型以及连接顺序和比例进行分析。本研究为库尔勒香梨酸性均一多糖 PSAP-1 的结构鉴定、含量测定方法的建立和药理学活性研究奠定了基础。

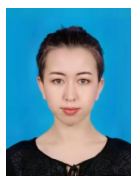
参考文献

- [1] ZHANG F, ZHAN P, TIAN H, *et al.* Optimization of HS-SPME using artificial neural network and response surface methodology in combination with experimental design for determination of volatile components by gas chromatography-mass spectrometry in Korla pear juice [J]. *Food Anal Method*, 2018. DOI: 10.1007/s12161-018-1173-6
- [2] 陈莉, 乔丽洁, 莫罕美竟, 等. 响应面法优化库尔勒香梨中三萜类化合物提取工艺及其抗氧化活性评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(10): 3169–3175.
CHEN L, QIAO LJ, MU HMJY, *et al.* Optimization of extraction process and antioxidant activity evaluation of triterpenoids from Korla pear by response surface methodology [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(10): 3169–3175.
- [3] 乌英, 孙梅, 程煜凤, 等. 库尔勒香梨公梨母梨果肉中多糖的提取工艺研究[J]. *西北药学杂志*, 2015, (3): 230–233.
WU Y, SUN M, CHENG YF, *et al.* Extraction of polysaccharides from Korla fragrant pear, male pear and female pear [J]. *J Northwest Pharm*, 2015, (3): 230–233.
- [4] 海力茜·陶尔大洪, 李亚童, 乌英, 等. 库尔勒香梨粗多糖镇咳祛痰作用研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(4): 1327–1331.
HAILIQIAN TERDH, LI YT, WU Y, *et al.* Study on antitussive and expectorant effects of crude polysaccharides from Korla pear [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(4): 1327–1331.
- [5] 王恒禹, 刘玥, 姜猛, 等. 多糖在食品工业中的应用现状[J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 431–438.
WANG HY, LIU Y, JIANG M, *et al.* Application status of polysaccharides in food industry [J]. *Food Sci*, 2013, 34(21): 431–438.
- [6] 潘俨, 孟新涛, 车凤斌, 等. 库尔勒香梨果实发育成熟的糖代谢和呼吸代谢响应特征[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(17): 3391–3412.
PAN Y, MENG XT, CHE FB, *et al.* Response characteristics of glucose metabolism and respiration metabolism in mature Korla pear fruit [J]. *J Agric Sci Chin*, 2016, 49(17): 3391–3412.
- [7] 刘晓辉, 高超, 丁婷婷, 等. 款冬叶 3 种功效成分对小鼠免疫调节作用实验研究[J]. *轻工学报*, 2018, 33(2): 35–41.
LIU XH, GAO C, DING TT, *et al.* Experimental study on the effect of three bioactive components in *Tussilago farfara* L. leaf on immune regulation of mice [J]. *J Light Ind*, 2018, 33(2): 35–41.
- [8] 高云龙, 徐梦豪, 朱纪海, 等. 冰岛刺参生物活性研究进展[J/OL]. *轻工学报*: 1–15. [2022-07-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1437.TS.20211021.0926.002.html>
GAO YL, XU MH, ZHU JH, *et al.* Research progress on biological activity of *Stichopus japonicus* in iceland [J/OL]. *J Light Ind*: 1–15. [2022-07-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1437.TS.20211021.0926.002.html>
- [9] WANG L, LI C, HUANG Q, *et al.* Biofunctionalization of selenium nanoparticles with a polysaccharide from *Rosa roxburghii* fruit and their protective effect against H₂O₂-induced apoptosis in INS-1 cells [J]. *Food Funct*, 2019, 10: 539–553.
- [10] CHEN GJ, KAN JQ. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Rosa roxburghii* fruit and assessment of its antioxidant *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Macromol*, 2018, 107: 166–174.
- [11] TONG H, JIANG G, GUAN X, *et al.* Characterization of a polysaccharide from *Rosa davurica* and inhibitory activity against neutrophil migration [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, (89): 111–117.
- [12] ZHU Q, LIAO C, LIU Y, *et al.* Ethanolic extract and watersoluble polysaccharide from *Chaenomeles speciosa* fruit modulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, (144): 441–447.
- [13] CHEN ZE, RIZIYAMU W, JI JH, *et al.* Structural characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. [J]. *J Agric Chem*, 2017, 65(44): 9685–9692.
- [14] 雷曦, 邸晶蕊, 付志飞, 等. 酸性多糖的结构鉴定及生物活性研究发展趋势[J]. *天津中医药大学学报*, 2021, 40(6): 796–801.
LEI X, DI JR, FU ZF, *et al.* Structure identification and development trend of acidic polysaccharides [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2021, 40(6): 796–801.
- [15] 阿依夏古丽·巴卡斯, 胡晨, 陈莉, 等. 茺菁酸性多糖 BRAP-2 体内抗 Lewis 肺癌活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(15): 5111–5116.
AYIXIAGULI BKS, HU S, CHEN L, *et al.* Study on the anti-Lewis lung cancer activity of *Brassica rapa* L. acid polysaccharide-2 *in vivo* [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(15): 5111–5116.
- [16] SHUANG S, KEJUAN L, LONG X, *et al.* Characterization of polysaccharide from *Helicteres angustifolia* L. and its immunomodulatory activities on macrophages RAW264.7 [J]. *Biomed Pharm*, 2019, 109: 262–270.
- [17] 李亚童, 阿依夏古丽·巴卡斯, 海力茜·陶尔大洪, 等. 新疆茺菁酸性多糖分离纯化、抗氧化活性研究及红外表征[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1050–1057.
LI YT, AYIXIAGULI BKS, HAILIQIAN TERDH, *et al.* Isolation, purification, antioxidant activity and infrared characterization of acid polysaccharides from turnips in Xinjiang [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(4): 1050–1057.

- [18] 李亚平, 周鸿立. 多糖中糖醛酸含量测定方法的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 49(17): 207–211.
LI YP, ZHOU HL. Research progress in determination of uronic acid content in polysaccharides [J]. Food Res Dev, 2019, 49(17): 207–211.
- [19] 周凯. 库尔勒香梨多糖结构鉴定及免疫调节活性与抗气道炎机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
ZHOU K. Structure identification, immunomodulatory activity and anti-airway inflammation mechanism of polysaccharides from Korla pear [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2020.
- [20] HT A, KAI ZB, FEI YA, *et al.* Structure, immunostimulatory activity, and the effect of ameliorating airway inflammation of polysaccharides from *Pyrus sinkiangensis* Yu. [Z]. 2021.
- [21] 邓红梅, 徐国强, 丘慧萍, 等. 石榴皮多糖的提取、纯化和结构分析[J]. 化学与生物工程, 2018, 35(11): 38–43.
DENG HM, XU GQ, QIU HP, *et al.* Extraction, purification and structure analysis of polysaccharides from *Pomegranate* peel [J]. Chem Biol Eng, 2018, 35(11): 38–43.
- [22] 刘玉明, 钱甜甜, 何颖, 等. 方格星虫多糖中糖醛酸的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1100–1101.
LIU YM, QIAN TT, HE Y, *et al.* Determination of uronic acid in polysaccharides from *Sipunculus nudus* Linnaeu [J]. J Shizhen Chin Med, 2012, 23(5): 1100–1101.
- [23] 朱明月, 全文科, 杜红娜, 等. 天然植物人参中糖醛酸含量测定方法的建立[J]. 今日畜牧兽医, 2021, 37(1): 5–7.
ZHU MY, TONG WK, DU HN, *et al.* Establishment of a method for determination of uronic acid in ginseng [J]. J Today Anim Husb Vet Med, 2021, 37(1): 5–7.
- [24] 王宁. 杏鲍菇多糖的分离纯化及其抗氧化和抗肿瘤的功能研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2015.
WANG N. Isolation and purification of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its antioxidant and antitumor functions [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2015.
- [25] 崔云. 甘薯渣多糖提取纯化、结构鉴定及功能研究[D]. 太原: 山西大学, 2021.
CUI Y. Study on the structure and function of polysaccharides extracted and purified from sweet potato residue [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [26] 梁结桦, 杜冰. 蒸汽爆破茯苓多糖提取工艺优化[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(12): 73–77.
LIANG JH, DU B. Optimization of extraction process of polysaccharide from *Poria cocos* by steam explosion [J]. J Cere Oil, 2021, 34(12): 73–77.
- [27] ZHANG R, MA CJ, WEI YL, *et al.* Isolation, purification, structural characteristics, pharmacological activities, and combined action of *Hedyotis diffusa* polysaccharides: A review [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 119–131.
- [28] 王思琪, 胡彦波, 翟丽媛, 等. 豆渣可溶性多糖的分离纯化及结构解析[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 52–57.
WANG SQ, HU YB, ZHAI LY, *et al.* Separation, purification and structure analysis of soluble acidic polysaccharide from soybean dregs [J]. J Food Sci, 2021, 42(10): 52–57.
- [29] KOZARSKI M, KLAUS A, NIKŠIĆ M, *et al.* Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* [J]. J Food Comp, 2012, 26(1–2): 144–153.
- [30] 张文晋, 王升, 黄璐琦, 等. 中药多糖质量评控方法探析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3489.
ZHANG WJ, WANG S, HUANG LQ, *et al.* Quality evaluation and control methods of polysaccharides from traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(14): 3489.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



米合热尼沙·阿木热江, 硕士研究生,
主要研究方向为天然药物研究与开发。
E-mail: 1826009247@qq.com



胡 晟, 硕士研究生, 主要研究方向
为天然活性成分的药理学作用研究。
E-mail: hush98@126.com



海力茜·陶尔大洪, 教授, 博士生导师,
主要研究方向为天然药物研究与开发。
E-mail: hailiqian2471@sina.com



杨 飞, 博士, 研究员, 主要研究方向
为天然药物分析研究。
E-mail: 279533257@qq.com