

沙苑子多糖的提取纯化与结构解析

李思涵, 王君巧*, 聂少平

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 中国-加拿大食品科学与技术联合实验室(南昌), 江西 南昌 330047)

摘要: 通过水提醇沉法制备沙苑子精多糖(记为SACP), 再通过乙醇分级沉淀法分离出纯度较高的主要多糖组分(SACP-25)。采用比色法测定各组分多糖的理化性质, 再应用尺寸排阻色谱-多角度光散射联用仪和离子色谱分别测定多糖的分子质量分布、溶液构象和单糖组成, 结果表明: SACP-25是高纯度的均一多糖组分, 总糖含量为87.40%, 主要由半乳糖(42.92%)和甘露糖(57.08%)组成, 在0.1 mol/L NaNO₃溶液中呈无规则线团链。甲基化分析与核磁共振结果表明, SACP-25的主链由 β -1,4-糖苷键连接的吡喃型甘露糖组成, 末端吡喃型半乳糖通过 α -1,6-糖苷键形成侧链。本研究发现沙苑子可以作为半乳甘露聚糖这一水溶性膳食纤维较好的天然来源, 为多糖结构有序性理论提供数据支撑, 同时也为沙苑子多糖在功能性食品和医药领域的开发和应用提供一定理论依据。

关键词: 沙苑子; 多糖; 半乳甘露聚糖; 化学结构

Isolation, Purification and Structural Characterization of Polysaccharides from *Semen Astragali complanati*

LI Sihan, WANG Junqiao*, NIE Shaoping

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, China-Canada Joint Laboratory of Food Science and Technology (Nanchang), Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Polysaccharides from *Semen Astragali complanati* (SACP) were obtained by hot water extraction followed by ethanol precipitation and separated by fractional precipitation with 20% and 25% ethanol into two fractions: SACP-20 and SACP-25, which was the major one with higher purity. Their physicochemical properties were determined by colorimetric methods, and their molecular mass distribution, conformation in solution and monosaccharide composition were analyzed by size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering (SEC-MALLS) and high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPLC-PAD). Results indicated that SACP-25 was a homogenous polysaccharide with total sugar content of 87.40% and was composed of galactose (42.92%) and mannose (57.08%). Meanwhile, it showed a random coil conformation in 0.1 mol/L NaNO₃. Analysis by methylation combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy revealed that the main chain of SACP-25 was composed of β -1,4-linked-mannopyranose (Manp) with galactopyranose (Galp) side chains attached to C-6 of the Manp residues. This study indicated that *Semen A. complanati* is good natural source of galactomannans as a water-soluble dietary fiber. The results of this study may provide theoretical support for the ordered structure of polysaccharides and also provide a theoretical foundation for the development and application of SACP in the functional food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Semen Astragali complanati*; polysaccharides; galactomannans; chemical structure

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220913-103

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)10-0310-07

引文格式:

李思涵, 王君巧, 聂少平. 沙苑子多糖的提取纯化与结构解析[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 310-316. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220913-103. <http://www.spkx.net.cn>

LI Sihan, WANG Junqiao, NIE Shaoping. Isolation, purification and structural characterization of polysaccharides from *Semen Astragali complanati*[J]. Food Science, 2023, 44(10): 310-316. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220913-103. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-09-13

基金项目: 江西省“揭榜挂帅”关键技术类(首批)项目(2021AASF01005); 江西省生物活性多糖重点实验室项目(2021BCD42016)

第一作者简介: 李思涵(1996—)(ORCID: 0000-0002-7370-0759), 男, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生学。

E-mail: lisihan007@126.com

*通信作者简介: 王君巧(1988—)(ORCID: 0000-0001-5490-6842), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为食品化学与分析技术。E-mail: ncuskwangjunqiao@163.com

沙苑子 (*Semen Astragali complanati*) 为豆科植物扁茎黄芪 (*Astragalus complanatus* R.Br.) 的干燥成熟种子^[1], 主要分布于陕西、华北、东北等地。作为我国传统中药材, 沙苑子被认为具有补肾固精、清泄利尿、益肝明目的功效, 主治肝肾虚弱、虚劳腰痛等。2002年卫生部公布的《关于进一步规范保健食品原料管理的通知》中, 沙苑子被列入可用于保健食品的名单中^[2]。沙苑子含有多种具有生物活性的化学物质, 主要包括脂肪酸、氨基酸、多糖、黄酮类、三萜类^[3]等。有研究表明, 沙苑子有降血压、降血脂、抗肿瘤、抗氧化等作用^[4-7]。

多糖是由10个以上单糖通过糖苷键连接组成的大分子物质。一般从植物组织自然渗出或者从不同植物部位提取的植物胶主要成分是多糖。近些年来, 已有关于植物胶作为一种膳食纤维对促进人体健康特性的研究, 例如维持肠道健康、防止便秘、预防肠癌、提高免疫功能等^[8]。在结构上, 植物胶既有由两种单糖(如半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖等)组成的多糖, 如刺槐豆胶、瓜尔胶、葫芦巴胶、魔芋胶等, 也有由多种单糖组成的复杂杂多糖, 如果胶、阿拉伯胶、亚麻籽胶、罗望子胶、黄蓍胶等^[9]。

课题组前期研究发现了多糖结构的相对有序性, 即: 在某种程度上, 绝大部分多糖的结构具有一定特征, 可被归属到某一类特征结构的聚合物, 例如葡聚糖、阿拉伯木聚糖、果胶等^[10]。因此, 归类多糖特征结构时, 其物质来源可能可以作为归属的关键因素之一, 即同一来源的天然产物多糖结构可能存在极高的相似性规律。基于此, 结合先前报道可知, 刺槐、瓜儿豆、田菁、葫芦巴、决明子等豆科植物种子类来源的原料中均发现了线状的半乳甘露聚糖胶^[11-13]。其中, 瓜尔豆胶、刺槐豆胶、葫芦巴胶等已作为食品添加剂应用于食品工业, 并作为增稠剂、乳化剂或稳定剂等改善食品品质, 是较为经济而又广泛使用的多糖类亲水胶体之一。

因此, 本实验旨在探索作为豆科植物种子来源的沙苑子中是否存在具有功能性的半乳甘露聚糖胶。首先通过水提醇沉法制备出水溶性沙苑子多糖, 然后采用乙醇分级沉淀法对沙苑子多糖进行分级纯化, 阐明其理化性质、分子量及单糖组成, 同时采用甲基化分析、尺寸排阻色谱-多角度光散射(size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering, SEC-MALLS)联用仪、核磁共振谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)详细解析多糖溶液构象和精细结构。这将有助于对多糖结构规律性理论的深入认识, 并且为天然产物来源多糖的技术研究和产品开发提供新方向, 同时也为沙苑子多糖的活性和结构关系的研究提供一定理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

沙苑子购于陕西省渭南市。

透析袋(截留分子量8 000~14 000 Da) 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖(Glc)、阿拉伯糖(Ara)、果糖(Fru)、鼠李糖(Rha)、半乳糖(Gal)、岩藻糖(Fuc)、葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖醛酸(GalA)、重水、硼氢化钠 美国西格玛奥德里奇公司; 木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(99.7%超干溶剂) 北京百灵威科技有限公司; 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、氯化钠 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; NaNO₃ 国药集团化学试剂有限公司; 95%食用乙醇、无水乙醇、硫酸、氯仿、二氯甲烷、正丁醇、吡啶、苯酚、碘甲烷、无水碳酸钠、冰醋酸、乙酸酐等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

e2695高效液相色谱仪 美国Waters公司; Dawn Heleos-II十八角度静态激光光散射仪 美国Wyatt公司; Dionex ICS 6000离子色谱仪、LYNX 4000高速离心机 美国Thermo Fisher Scientific公司; 7890-7000A气相色谱-质谱联用仪 美国安捷伦科技有限公司; Ascend™ 400 NMR仪 美国Bruker公司; FreeZone 12L立式冻干机 美国Labconco公司; SpectraMax 190全波长酶标仪 美国Molecular Devices公司; EYELA N-1300旋转蒸发仪 日本东京理化器械株式会社; DL-5C离心机 上海安亭科学仪器厂; HH-4恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; XS205电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 沙苑子多糖提取与纯化

采用水提醇沉法^[14]进行多糖提取。称取100 g沙苑子磨粉, 按照1:10(g/mL)的比例在80%乙醇溶液中浸泡12 h, 4 000 r/min离心15 min获得沙苑子残渣。挥干残渣中的乙醇, 重复操作2次。然后按照料液比1:10(g/mL), 95℃热水提取2 h, 收集上清液, 重复提取1次, 合并2次提取液。减压浓缩至合适体积后缓慢加入95%乙醇溶液, 使溶液最终乙醇体积分数为80%, 静置过夜。4 000 r/min离心15 min后收集沉淀, 将沉淀复溶于500 mL纯水, 放入透析袋中自来水流动透析2 d, 蒸馏水透析1 d。将透析后的多糖溶液经过减压浓缩后, 冷冻干燥, 即获得粗多糖。粗多糖采用Sevag法脱除蛋白后得到精多糖, 命名为SACP。

采用乙醇分级沉淀法对SACP进行分离纯化。SACP复溶于水, 缓慢加入乙醇使整个体系乙醇体积分数为

20%，醇沉静置过夜，12 000×g、4℃超高速冷冻离心15 min后获得沉淀，冷冻干燥得到20% SACP醇沉组分，命名为SACP-20。继续往上清液中继续加入乙醇，至最终乙醇体积分数达25%，得到的沉淀为25% SACP醇沉组分，命名为SACP-25。

1.3.2 中性糖、糖醛酸、蛋白质含量测定

以Glc为标准品，采用苯酚-硫酸法^[15]测定多糖的中性糖含量。以GlcA为标准品，采用硫酸-吡唑法^[16]测定多糖的糖醛酸含量。以牛血清白蛋白为标准，采用BCA法^[17]测定多糖的蛋白质含量。

1.3.3 单糖组成测定

完全酸水解：准确称取样品于具塞试管中，在冰浴条件下缓缓加入0.5 mL 12 mol/L H₂SO₄溶液，磁力搅拌30 min，加入2.5 mL超纯水，磁力搅拌均匀后转移至100℃油浴中水解2 h。水解完成后稀释至一定倍数，过0.22 μm滤膜进样分析。

色谱条件参考刘晓莹等^[18]的方法：Dionex ICS-6000离子交换色谱，使用脉冲安培检测器；色谱柱选择CarboPacTM PA20 (3 mm×30 mm)保护柱和CarboPacTM PA20分析柱 (3 mm×150 mm)；柱温30℃；检测器温度35℃；进样量10 μL；流动相：A为250 mmol/L NaOH溶液，B为H₂O，C为1 mol/L NaOAc溶液；洗脱程序如表1所示。

表1 离子交换色谱梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure for high performance anion-exchange chromatography

时间/min	流动相体积分数/%		
	A 250 mmol/L NaOH溶液	B H ₂ O	C 1 mol/L NaOAc溶液
0.0	0.8	99.2	0
20.0	0.8	99.2	0
20.1	0.8	94.2	5
30.0	0.8	79.2	20
30.1	80	20	0
50.0	80	20	0
50.1	0.8	99.2	0
55.0	0.8	99.2	0

1.3.4 SACP分子质量与溶液构象分析

采用SEC-MALLS-Vis-RI测定SACP分子质量分布及其溶液构象^[19]。利用多角度激光散射器、黏度检测器和示差检测器，色谱柱为OHpak SB-806 HQ (300 mm×8.0 mm)与OHpak SB-804 HQ (300 mm×8.0 mm)串联；流动相为0.1 mol/L NaNO₃溶液；柱温箱和检测器温度为35℃；进样量100 μL；流速0.6 mL/min；采样时间80 min。将多糖样品用流动相溶解，配成1.0 mg/mL溶液，过0.45 μm滤膜后进样检测，使用ASTRA 6.1软件采集和分析数据。

1.3.5 甲基化分析

甲基化方法参考Pettolino等^[20]的方法。称取干燥的

多糖样品于离心管中，加入约1 mL无水DMSO，溶解后加入NaOH粉末，室温下搅拌3 h。冰浴下缓慢加入碘甲烷，反应结束后加水中止反应，二氯甲烷萃取。干燥后加入4 mol/L TFA溶液100℃水解6 h。将所得水解产物硼氰化钠还原，乙酸酐衍生，得到部分甲基化糖醇乙酸酯衍生物 (partially methylated alditol acetates, PMAA)，过0.22 μm有机滤膜进气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 分析。

GC-MS条件：SP-2330色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.2 μm)；载气为He；进样体积1 μL；升温程序：160~210℃，升温速率2℃/min；210~240℃，升温速率5℃/min；离子化模式为电子电离源，离子化电势为70 kV。

1.3.6 NMR分析

称取SACP-25约50 mg，溶于重水后，冻干，重复3次，最后溶解到重水后进样检测。采用Bruker AscendTM 400 NMR仪采集样品的1D、2D NMR波谱，包括¹H和¹³C NMR波谱、同核化学位移相关谱 (correlation spectroscopy, COSY)、异核单量子相关谱 (heteronuclear single quantum correlation, HSQC)、异核多键相关谱 (heteronuclear multiple bond connectivity, HMBC)、总相关谱 (total correlated spectroscopy, TOCSY) 和奥氏核效应相关谱 (nuclear overhauser effect spectroscopy, NOESY) 谱图，测试温度为298 K。

1.4 数据处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 或 \bar{x} 表示，采用SPSS 25.0、OriginPro 2019软件进行数据统计分析与作图，采用Chromeleon 7.0软件分析色谱图，采用ASTRA 6.1软件分析分子质量分布与溶液构象数据，采用MestReNova 12.0软件分析核磁共振图。

2 结果与分析

2.1 沙苑子多糖的基本理化性质及其得率

对沙苑子精多糖及其分级组分的基本理化性质进行分析，如表2所示，SACP得率为5.96% (基于原料干质量计算)，经过乙醇分级沉淀后，SACP-20和SACP-25的得率分别为6.66%和53.74% (基于SACP质量计算)。分别测定SACP、SACP-20和SACP-25的总糖、糖醛酸和蛋白质含量，如表2所示，SACP的总糖和糖醛酸含量分别为80.81%和3.47%，还含有6.17%蛋白质。经过醇沉后，SACP-20总糖含量降低 (56.20%)，而SACP-25总糖含量升高 (87.40%)，且SACP-25不含蛋白质。因此，通过简单的两步醇沉，可以快速得到糖含量更高的沙苑子多糖。

表2 SACP、SACP-20、SACP-25的得率与理化性质分析 (n=3)
Table 2 Yield and physicochemical properties of SACP, SACP-20 and SACP-25 (n=3)

多糖组分	得率	总糖含量	糖醛酸含量	蛋白质含量
SACP	5.96 ^a	80.81±3.33	3.47±0.05	6.17±0.59
SACP-20	6.66 ^b	56.20±3.38	1.67±0.16	6.15±0.42
SACP-25	53.74 ^c	87.40±2.63	1.06±0.05	nd

注: a. SACP得率/%=SACP质量/原料质量×100; b. SACP-20得率/%=SACP-20质量/SACP质量×100; c. SACP-25得率/%=SACP-25质量/SACP质量×100. nd.未检测到,下同。总糖标准曲线为 $y=0.5116x+0.0519$, $R^2=0.9989$; 糖醛酸标准曲线为 $y=0.5569x+0.0421$, $R^2=0.9993$; 蛋白质标准曲线为 $y=0.7106x+0.106$, $R^2=0.9978$ 。

2.2 沙苑子多糖的单糖组成分析

采用带脉冲安培检测器的离子色谱分别对SACP、SACP-20与SACP-25单糖组成进行分析,如表3所示,SACP中除了Gal和Man外,还含有少量Ara、Xyl、Glc以及GlcA。经过乙醇分级沉淀后,SACP-20和SACP-25中Xyl、Ara、GlcA等单糖含量明显减少,Man含量增加。尽管三者的主要单糖种类都是Gal和Man,但Gal和Man含量比不同,分别为1:1.03(SACP)、1:1.17(SACP-20)、1:1.33(SACP-25)。SACP-20与SACP-25单糖组成类似,但在SACP-20中仍能检测到微量的Ara和Glc,而SACP-25仅含有Gal和Man,含量分别为42.92%和57.08%,表明沙苑子中主要的多糖成分可能是一种半乳甘露聚糖,同时也表明通过简单的两步醇沉就能分离得到纯度较高的半乳甘露聚糖。目前,一些商业化食品胶^[21],如刺槐豆胶、塔拉胶、瓜尔豆胶和葫芦巴胶,其Gal与Man含量比分别约为1:4、1:3、1:2和1:1,不同来源的半乳甘露聚糖根据其性质具有不同功能特性。后续需对沙苑子多糖SACP-25进行精细结构表征。

表3 SACP、SACP-20、SACP-25多糖的单糖组成测定结果
Table 3 Monosaccharide composition of SACP, SACP-20 and SACP-25

多糖组分	质量分数/%					
	Ara	Gal	Man	Xyl	Glc	GlcA
SACP	3.30±0.10	45.57±0.19	47.08±0.40	1.76±0.09	0.29±0.11	1.99±0.66
SACP-20	trace	45.98±2.78	54.02±2.78	nd	trace	nd
SACP-25	nd	42.92±0.07	57.08±0.07	nd	nd	nd

注: trace表示质量分数低于0.1%。

2.3 SACP-25的SEC-MALLS分析

结合理化性质分析和单糖组成分析结果,选择对SACP-25进行详细的结构分析。首先,采用SEC-MALLS表征多糖的分子质量、特性黏度($[\eta]$)、回旋半径(R_g)、流体力学半径(R_h)等参数^[22]。图1为SACP-25在SEC-MALLS-Vis-RI的黏度信号、激光信号和示差信号的洗脱图,显示该样品是单一的色谱峰。SACP-25的数均分子质量(m_n)、重均分子质量(m_w)、z均分子质量(m_z)分别为 7.190×10^5 、 1.121×10^6 、 1.650×10^6 Da。张汇^[23]的报道中提到,相较于凝胶渗透色谱法需要使用

葡聚糖作标准曲线间接计算出分子质量大小,MALLS能够更准确地表征大分子的绝对分子质量。多糖在溶液中的分子质量表现为分布在一定范围内,SACP的多分散指数(m_w/m_n)为1.559,表明其作为聚合物具有较宽的质量分布。

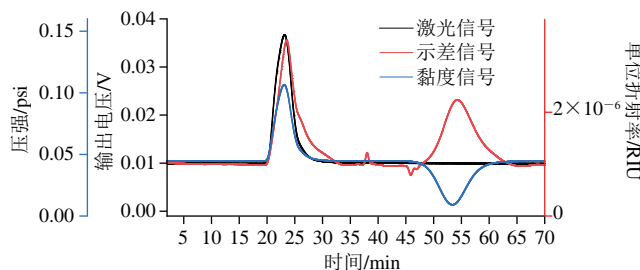


图1 SACP-25在0.1 mol/L NaNO₃溶液中的SEC-MALLS色谱图
Fig. 1 SEC-MALLS chromatogram of SACP-25 in 0.1 mol/L NaNO₃ solution

其次,借助黏度、光散射等信号探讨其在0.1 mol/L NaNO₃溶液中的构象特征。Mark-Houwink方程描述了 m_w 与 $[\eta]$ 的关系^[8]:

$$[\eta] = Km_w^\alpha \quad (1)$$

式中: K 与 α 均被称为Mark-Houwink参数,是与分子质量无关的常数,其数值取决于聚合物的类型、溶剂和测量过程中的温度等^[24],且均与多糖分子在溶液中的构象相关。如图2所示,以 $\lg m_w$ 为横坐标, $\lg [\eta]$ 为纵坐标进行线性拟合,根据拟合线性方程的结果 $\alpha = 0.5687$,表明该多糖在0.1 mol/L NaNO₃溶液中呈柔性的无规线团状。

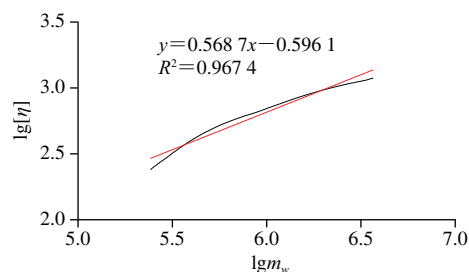


图2 SACP-25的 $[\eta]$ 对 m_w 的双对数曲线
Fig. 2 Double logarithmic plot of molecular mass versus intrinsic viscosity for SACP-25

此外, R_g 和 R_h 与多糖分子链在溶液中的形态有关,且 R_g 和 R_h 与 m_w 的函数关系常用幂函数描述,如式(2)、(3)所示:

$$R_g = Km_w^{v_g} \quad (2)$$

$$R_h = Km_w^{v_h} \quad (3)$$

式中: K 、 v_g 与 v_h 均为与分子结构相关的特征参数。如图3、4所示,通过对 $\lg R_g$ 和 $\lg R_h$ 对 $\lg m_w$ 线性拟合,得到

的拟合曲线 R^2 分别是0.991 0和0.995 3, 呈现良好的线性关系; 由拟合结果可知, v_g 和 v_h 分别为0.483 1和0.514 9, 表示SACP-25为无规线团链, 与使用Mark-Houwink方程分析结果一致。

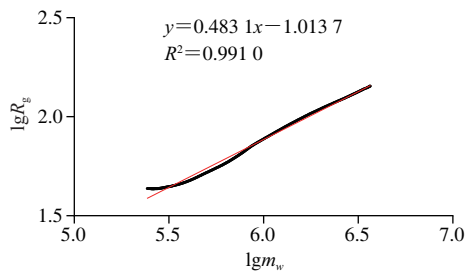


图3 SACP-25的 R_g 对 m_n 的双对数曲线

Fig. 3 Double logarithmic plot of molecular mass versus radius of gyration for SACP-25

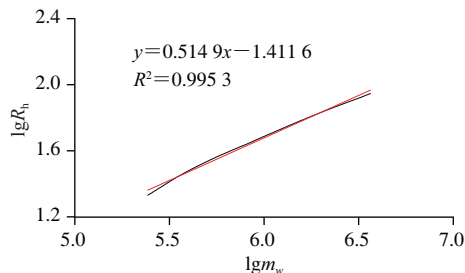


图4 SACP-25的 R_h 对 m_n 的双对数曲线

Fig. 4 Double logarithmic plot of molecular mass versus hydrodynamic radius for SACP-25

2.4 SACP-25的甲基化分析

为了确定SACP-25的糖苷键类型, 将多糖甲基化后, 再通过水解和衍生获得PMAA产物, 在GC-MS中检测分析, 结果如表4所示。SACP-25中主要由3种类型的糖苷键组成, 包括 $\rightarrow 4,6$ -Manp-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 4$)-Manp-(1 \rightarrow 和Galp-(1 \rightarrow), 其相对含量分别为32.02%、27.67%、32.76%, 推测SACP-25主链主要是由1,4-连接的Manp组成, 支链为Galp, 这与豆科植物种子部位来源, 如刺槐豆、瓜尔豆、刺云实和葫芦巴中提取的多糖结构相似^[10-12]。此外, SACP-25中还含有极少量的 $\rightarrow 4$ -Galp-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 6$)-Galp-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 3,4,6$ -Manp-(1 \rightarrow)。根据支化度=(末端糖残基含量+支链糖残基含量)/(末端糖残基含量+支链糖残基含量+线性糖残基含量), 计算得其支化度为0.687 5, 且末端糖残基与支链糖残基比例接近1:1。半乳甘露聚糖是一种中性多糖, 不同半乳甘露聚糖的支化度不同, 也会影响到它们的性质^[25], 例如Gal侧链可能会影响分子的缔合, 从而增加多糖的溶解度。有文献表明, 半乳甘露聚糖如决明子胶的分支并非规则的与主链相

连, 而是以一种随机的形式连接^[26]。为了确定糖残基的连接顺序和异头碳构型, 对SACP-25进行NMR分析。

表4 SACP-25的甲基化分析结果
Table 4 Methylation analysis of SACP-25

序号	保留时间/min	糖苷键类型	m/z	相对含量/%
1	14.6	T-Manp	71, 87, 102, 113, 118, 129, 145, 161, 162, 205	2.42
2	16.5	T-Galp	59, 71, 87, 102, 118, 118, 129, 145, 161, 162, 205	32.76
3	21.4	1,4-Manp	59, 71, 87, 99, 102, 118, 129, 131, 142, 157, 162, 173, 203	27.67
4	23.1	1,4-Galp	59, 71, 87, 99, 101, 118, 129, 143, 173	0.65
5	24.9	1,6-Galp	59, 71, 87, 99, 102, 118, 129, 143, 159, 162, 173, 189	2.93
6	27.6	1,4,6-Manp	59, 85, 102, 118, 127, 142, 159, 162, 187, 201, 231, 261	32.02
7	30.0	1,3,4,6-Manp	59, 87, 97, 118, 139, 160, 171, 187, 259	1.55

2.5 SACP-25的NMR分析

根据单糖和甲基化分析结果, 初步推测SACP-25是一种半乳甘露聚糖。通过对SACP-25的1D与2D NMR谱图分析, 结合已报道的半乳甘露聚糖的NMR谱图进行分析比较^[26-29], 各主要残基的化学位移最终归属结果如表5所示。

表5 SACP-25的主要糖残基 ^1H 和 ^{13}C 化学位移归属
Table 5 ^1H and ^{13}C chemical shift assignments of SACP-25

序号	糖残基	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
A	1 $\rightarrow 4$)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	4.70/100.24	4.06/69.69	3.73/71.27	3.74/77.04	3.48/75.04	3.82/61.21
B	1 $\rightarrow 4,6$)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	4.70/100.00	4.06/69.69	3.73/71.27	3.74/77.04	3.69/73.19	3.90/66.40
C	α -D-Galp-(1 \rightarrow	4.94/98.72	3.74/68.53	3.88/69.81	3.91/69.26	3.82/71.18	3.67/61.21

^1H NMR的谱图(图5)中, T- α -Galp的异头氢信号比较明显, 化学位移为4.94, 其余的异头氢信号与溶剂峰信号重叠, 而氢信号化学位移还与样品的温度相关。冯蕾^[30]的研究中, 在323 K温度下糖残基各异头峰能够分开。但是, 在 ^{13}C NMR谱图(图6)中的异头碳区域, 可以较清晰地分辨出98.72、100.00、100.24这3个信号, 并且结合HSQC谱图(图7), 能明显地分辨3组不同的异头信号, 分别是4.7/100.24、4.7/100、4.94/98.72, 对应命名为残基A、残基B和残基C。结合COSY谱图(图8), 找到残基C的H-2信号的化学位移为3.74, H-3的信号为3.88, 依次类推将H-4至H-6的偶合信号的化学位移归类, 分别是3.82和3.67。再根据HSQC谱图, 获得与糖残基上的碳原子相连的氢原子化学位移, 获得H-2/C-2、H-3/C-3、H-4/C-4、H-5/C-5、H-6/C-6的偶合信号分别是3.74/68.53、3.88/69.81、3.91/69.26、3.82/71.18、3.67/61.21, 推断残基C为T- α -Galp。同样的, 通过COSY谱图和HSQC谱图, 结合文献[31-32]对糖残基A和B的H-2/C-2、H-3/C-3、H-4/C-4、H-5/C-5、H-6/C-6的化学位移进行归属, 糖残基A分别为4.06/69.69、3.73/71.27、3.74/77.04、3.48/75.04、3.82/61.21, 而糖残基B为4.06/69.69、3.73/71.27、3.74/77.04、3.69/73.19、3.90/66.40。

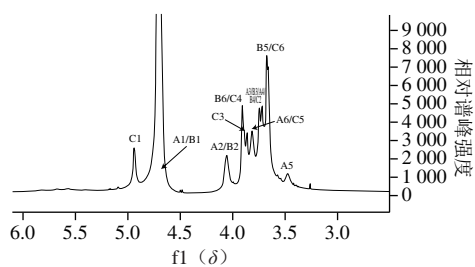


图5 SACP-25的¹H NMR谱图 (298 K)

Fig. 5 ¹H NMR spectrum of SACP-25 (at 298 K)

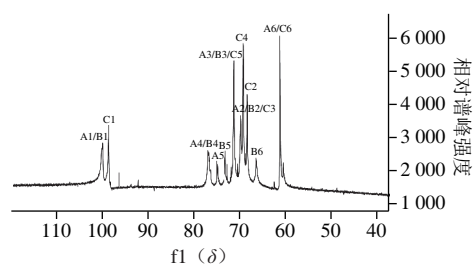


图6 SACP-25的¹³C NMR谱图 (298 K)

Fig. 6 ¹³C NMR spectrum of SACP-25 (at 298 K)

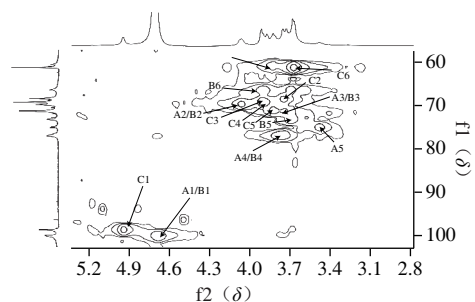


图7 SACP-25的HSQC NMR谱图 (298 K)

Fig. 7 HSQC NMR spectrum of SACP-25 (at 298 K)

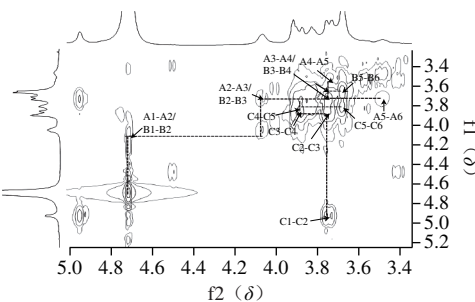


图8 SACP-25的COSY NMR谱图 (298 K)

Fig. 8 COSY NMR spectrum of SACP-25 (at 298 K)

HMBC谱图可以检测碳原子与氢原子的远程偶合信号, 通过C-H的偶合信号确定糖残基的连接顺序; NOESY谱图则是特定糖残基的质子与和它相连的另一个糖残基的质子的核交叉弛豫信号, 用于推断多糖的连接序列信息。通过对HMBC谱(图9)的分析, 可以明显看

到残基C的H-1与残基B的C-6的偶合信号, 为4.94/66.4, 残基C的C-1与残基B的H-6偶合信号为3.90/98.72; 残基A与残基B的H-1与C-4的偶合信号为4.70/77.04。此外, NOESY谱(图10)也明显提示了残基C与残基B的H-6有偶合, 验证了糖残基的连接方式为 α -Galp-(1 \rightarrow 4,6)- β -Manp-(1 \rightarrow)。由此推断其结构重复单元, 如图11所示, SACP-25的主链连接方式为吡喃型Man通过 β -1,4-糖苷键连接, 分支为 α -T-Galp通过C-6与主链Manp残基相连。

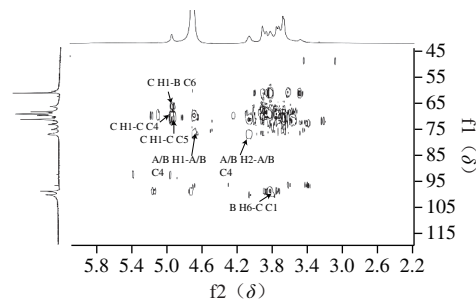


图9 SACP-25的HMBC NMR谱图 (298 K)

Fig. 9 HMBC NMR spectrum of SACP-25 (at 298 K)

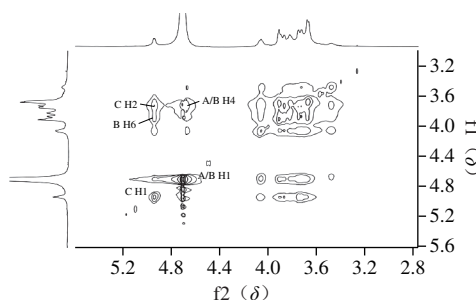


图10 SACP-25的NOESY NMR谱图 (298 K)

Fig. 10 NOESY NMR spectrum of SACP-25 (at 298 K)

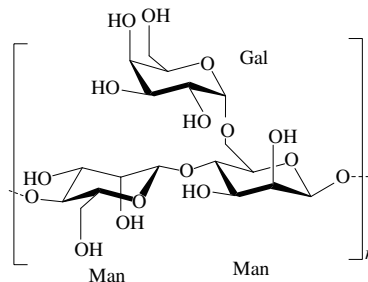


图11 SACP-25的化学结构图

Fig. 11 Chemical structure of SACP-25

3 结论

以植物沙苑子为研究对象, 采用水提醇沉法提取沙苑子粗多糖、Sevag法去除蛋白、分级醇沉纯化多糖组分。进行理化性质和单糖组成分析确认。通过两步

醇沉,先用20%乙醇沉淀,继而采用25%乙醇沉淀,得到纯度较高的沙苑子半乳甘露聚糖SACP-25,其中Gal和Man质量分数分别为42.92%和57.08%。采用SEC-MALLS-Vis-RI、对SACP-25的分子质量、溶液构象进行分析,结果显示SACP-25的 m_n 为 7.190×10^5 Da, m_w 为 1.121×10^6 Da, m_z 为 1.650×10^6 Da,在0.1 mol/L NaNO_3 溶液中呈无规线团状。通过甲基化与核磁谱图分析,确定该多糖的主链为线性 $\rightarrow 4$ - β -Manp-(1 \rightarrow ,分支 α -Galp-(1 \rightarrow 通过糖苷键连接在甘露糖主链的C-6上。本研究通过对沙苑子多糖的分离提取与结构表征,丰富了多糖结构研究,为开发不同来源食用胶类的提供一定的理论依据。由于植物细胞多糖具有复杂性,沙苑子粗多糖的部分组分并未完全阐明,需要借助其他分离纯化手段后对其结构进行表征;另外,沙苑子多糖的生物活性研究极少,需对其结构与活性的关系进一步探索阐明。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 183.
- [2] 莫小春, 胡德辉, 张强, 等. 沙苑子总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 广州化工, 2022, 50(7): 45-49.
- [3] XU M Y, GUO R X, ZHANG X, et al. Chemical constituents from seeds of *Astragali complanati*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(7): 1459-1466. DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20180115.012.
- [4] 张秋菊, 张建军, 贾德贤, 等. 沙苑子提取物降脂作用实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(5): 323-325.
- [5] ZHANG Q, FAN X, ZHANG Z, et al. Antioxidant for phenolic extracts from *Semen Astragali complanati*[J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24(7): 955-958. DOI:10.16333/j.1001-6880.2012.07.029.
- [6] 白勇, 孙安盛, 吴芹, 沙苑子总黄酮和百草酸的体内抗肿瘤作用[J]. 中成药, 2014, 36(4): 684-689.
- [7] 金晓辉. 沙苑子多糖的分离纯化与理化性质研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2008: 28-37.
- [8] HAMDANI A M, WANI I A, BHAT N A. Sources, structure, properties and health benefits of plant gums: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 46-61. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.103.
- [9] CUI S W. Food carbohydrates[M]. Boca Raton: CRC Press, 2005: 267-311.
- [10] WANG Y X, YIN J Y, ZHANG T, et al. Utilizing relative ordered structure theory to guide polysaccharide purification for structural characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 115: 1-3. DOI:10.1016/j.foodhyd.2021.106603.
- [11] BUCKERIDGE M S, DIETRICH S M C, DE LIMA D U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds[J]. Developments in Crop Science, 2000, 26: 283-316. DOI:10.1016/S0378-519X(00)80015-X.
- [12] SRIVASTAVA M, KAPOOR V P. Seed galactomannans: an overview[J]. Chemistry & Biodiversity, 2005, 2(3): 295-317. DOI:10.1002/cbdv.200590013.
- [13] THOMBARE N, JHA U, MISHRA S, et al. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 88: 361-372. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001.
- [14] YAO Y, ZHU Y, REN G. Immunoregulatory activities of polysaccharides from mung bean[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 139: 61-66. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.12.001.
- [15] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28: 350-356. DOI:10.1021/ac60111a017.
- [16] BLUMENKRANTZ N, ASBOE-HANSEN G. New method for quantitative determination of uronic acids[J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54: 484-489. DOI:10.1016/0003-2697(73)90377-1.
- [17] LI L, WU R, YAN G, et al. A novel method to isolate protein N-terminal peptides from proteome samples using sulfhydryl tagging and gold-nanoparticle-based depletion[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(2): 441-448. DOI:10.1007/s00216-015-9136-x.
- [18] 刘晓莹, 马璐瑶, 王力基, 等. 高效阴离子色谱-脉冲安培法优化阿拉伯木聚糖单糖组成分析[J]. 分析化学, 2017, 45(3): 416-422. DOI:10.11895/j.issn.0253-3820.160685.
- [19] LIU Y, ZHANG J, TANG Q, et al. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 968-974. DOI:10.1016/j.carbpol.2013.10.024.
- [20] PETTOLINO F A, WALSHC, FINCHER B, et al. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls[J]. Nature Protocols, 2012, 7(9): 1590-1607. DOI:10.1038/nprot.2012.081.
- [21] PRAJAPATI V D, JANI G K, MORADIYA N G, et al. Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60: 83-92. DOI:10.1038/nprot.2012.081.
- [22] CHEN L, ZHANG B, CHEN J, et al. Cell wall structure of mushroom sclerotium (*Pleurotus tuber-regium*): part 2. Fine structure of a novel alkali-soluble hyper-branched cell wall polysaccharide[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38: 48-55. DOI:10.1016/j.foodhyd.2013.11.004.
- [23] 张汇. 黑灵芝多糖的结构鉴定与溶液构象[D]. 南昌: 南昌大学, 2015: 83-85.
- [24] WEINHOLD M X, THÖMING J. On conformational analysis of chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(4): 1237-1243. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.01.011.
- [25] PRAJAPATI V D, JANI G K, MORADIYAN G, et al. Locust bean gum: a versatile biopolymer[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 94(2): 814-821. DOI:10.1016/j.carbpol.2013.01.086.
- [26] ALBUQUERQUE P B S, BARROS W, SANTOS G R C, et al. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 104: 127-134. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.01.010.
- [27] SHANG M, ZHANG X, DONG Q, et al. Isolation and structural characterization of the water-extractable polysaccharides from *Cassia obtusifolia* seeds[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(2): 827-832. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.06.007.
- [28] BUSCH V M, KOLENDER A A, SANTAGAOITA P R, et al. Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: physicochemical characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 51: 495-502. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.04.035.
- [29] IVONE G, FANY R, CARMEN L O, et al. Characterization of the galactomannans from *Parkinsonia aculeata* seeds and their application on affinity chromatography[J]. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2006, 16(2): 99-103. DOI:10.1590/S0104-14282006000200008.
- [30] 冯蕾. 决明子水溶性多糖的精细结构、构象特征及其流变行为研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017: 48-54.
- [31] MUSCHIN T, YOSHIDA T. Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 1893-1898. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.08.059.
- [32] GUO R, AI L, CAO N, et al. Physicochemical properties and structural characterization of a galactomannan from *Sophora alopecuroides* L. seeds[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 140: 451-460. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.12.058.