

# 枸杞提取物中糖的组成分析

周恒斌<sup>1</sup>, 刘雪蕊<sup>2</sup>, 张东星<sup>2</sup>, 李赫宇<sup>2</sup>, 於洪建<sup>2</sup>, 晏仁义<sup>2\*</sup>

(1. 浙江尖峰药业有限公司, 浙江 金华 321000; 2. 天津益倍元天然产物技术有限公司, 天津 300457)

**摘要:**采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-one, PMP)衍生, 通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对枸杞提取物样本中单糖组成进行分析, 为枸杞提取物的质量分析提供依据。自制 7 份枸杞多糖提取物均含有阿拉伯糖、木糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、鼠李糖及半乳糖醛酸; 2 份市售枸杞提取物几乎只有葡萄糖, 和糊精的分析结果基本一致。自制枸杞多糖的总糖含量在 32.09%~43.72% 之间, 酸性糖含量在 47.31%~57.38% 之间; 2 份市售枸杞提取物多糖含量均大于 90%, 而酸性糖含量显著低于自制枸杞多糖。通过分析单糖组成、酸性糖含量能为市售枸杞提取物及相关食品和功能食品的质量控制提供依据。

**关键词:**枸杞; 多糖; 单糖; 提取物; 高效液相色谱

## Analysis of Saccharide Composition in the Extract of Wolfberry

ZHOU Heng-bin<sup>1</sup>, LIU Xue-rui<sup>2</sup>, ZHANG Dong-xing<sup>2</sup>, LI He-yu<sup>2</sup>, YU Hong-jian<sup>2</sup>, YAN Ren-yi<sup>2\*</sup>

(1. Zhejiang Jianfeng Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 321000, Zhejiang, China; 2. Tianjin Ubasio-Ingredient Natural Products Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography (HPLC) method of pre-column derivatization with 1-phenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-one (PMP) had been established for analysis of monosaccharide in extract of wolfberry. The analysis results showed that in seven homemade extract of wolfberry polysaccharide (WP) contained arabinose, xylose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, and galacturonic acid. In 2 commercial WP only contained glucose which consistent with that of dextrin. The content of sugar in homemade WP was between 32.09% and 43.72%, and acidic polysaccharide was between 47.31% and 57.38%. However, in the 2 commercial WP samples (>90%) the content was significantly higher than homemade WP, acidic polysaccharide significantly lower than that of homemade WP. By monosaccharide composition analysis and determine the content of acidic polysaccharide in WP, it could provide basis for quality control of commercial WP and its related food and functional food.

**Key words:** wolfberry; polysaccharide; monosaccharide; extract; high performance liquid chromatography (HPLC)

引文格式:

周恒斌, 刘雪蕊, 张东星, 等. 枸杞提取物中糖的组成分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(24): 161-168

ZHOU Hengbin, LIU Xuerui, ZHANG Dongxing, et al. Analysis of Saccharide Composition in the Extract of Wolfberry[J]. Food Research and Development, 2018, 39(24): 161-168

枸杞, 又名枸杞子、红耳坠, 是茄科植物枸杞的成熟果实, 其味甘、性平、归肝、肾经, 具有益精明目、养阴

作者简介: 周恒斌(1986—), 男(汉), 工程师, 本科, 主要从事新药研发工作。

\* 通信作者: 晏仁义(1982—), 男(汉), 副研究员, 博士, 主要从事植物成分创新运用工作。

润肺、补虚益精等功效<sup>[1]</sup>。枸杞是一种药食同源的物质, 营养较为丰富, 主要含有枸杞多糖、类胡萝卜素、甜菜碱等功效成分<sup>[2-4]</sup>。现代研究表明, 枸杞多糖具有重要的生理活性, 已被证实由阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖 6 种中性糖及半乳糖醛酸等酸性糖组成<sup>[5-7]</sup>, 具有免疫调节、神经保护、抗氧化、抗衰老、

保肝护肝、调节血脂、降血糖等功效<sup>[8-10]</sup>。

随着现代人保健意识的增强,枸杞作为药食两用原料市场知名度高、消费量也大。据统计在已批准的15 000余个保健食品中含枸杞或者枸杞多糖的有1 400多个,出现频次位居第一位。以枸杞为核心原料的茶、膏滋、固体饮料类普通食品层出不穷。《中国药典》以枸杞多糖和甜菜碱含量作为指标控制枸杞的质量。关于枸杞多糖提取物没有统一的检测标准<sup>[11]</sup>,目前,一般用苯酚-硫酸法测定多糖或者总糖的含量,由于枸杞本身糖含量较高,黏度较大,生产过程中不易干燥,商家可能会添加糊精类成分,而该方法不能区分是否添加糊精,导致添加糊精越多多糖含量越高,产品质量越差的逆循环。关于糖的定性定量分析,常采用比色法<sup>[12]</sup>、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[13-14]</sup>、气相色谱(gas chromatography, GC)<sup>[15]</sup>等方法。本研究采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-one, PMP)衍生 HPLC 分析法,比较实验室自制和市售枸杞提取物单糖组成,测定酸性糖含量等。为枸杞提取物的质量分析提供依据。同时,也为枸杞或者其提取物为核心原料的食品和保健食品的质量控制提供了参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

枸杞子:产地为宁夏、山东等地(7个样本,编号M1~M7, M7为青枸杞);枸杞提取物:市售;D-葡萄糖、D-半乳糖、L-鼠李糖、D-甘露糖、D-半乳糖醛酸、L-阿拉伯糖、D-木糖、乙腈(色谱纯):国药集团化学试剂有限公司;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP):上海市试剂一厂;浓硫酸、三氯甲烷、氢氧化钠、盐酸、苯酚:均为分析纯;水为天津益倍元天然产物技术有限公司自制超纯水。

### 1.2 仪器与设备

SHIMADZU LC-2030 3D 高效液相色谱仪(配备二极管阵列检测器):日本岛津公司;752N 紫外可见分光光度计:上海仪电分析仪器有限公司;十万分之一分析天平:瑞士 Mettler-Toledo 公司;TD2 4-WS 离心机:湖南湘仪仪器有限公司;DK-98-II 电热恒温水浴锅:天津特斯特仪器有限公司;DZF-6020 真空干燥箱:上海博迅仪器有限公司;Milli-Q 超纯水系统:密理博中国有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 枸杞单糖、多糖的提取

将枸杞子烘干,剪碎,称取 10 g 枸杞子加入 80% 的乙醇 150 mL 回流 1 h,趁热过滤,提取 3 次,合并提

取液减压浓缩,置于 60 °C 真空干燥箱中干燥,得到枸杞中的单糖和寡糖部位。将上述滤渣加入 150 mL 水,加热回流 2 h,趁热过滤,减压浓缩,加入 4 倍体积的乙醇(终浓度 80%)醇沉,4 °C 静置过夜,离心取沉淀,置于 60 °C 真空干燥箱内干燥,得枸杞粗多糖部位<sup>[16-18]</sup>。

#### 1.3.2 糖组成分析

糖组成分析的步骤包括水解、PMP 衍生化、HPLC 分析等步骤,参照文献的方法进行试验<sup>[19-20]</sup>。

##### 1.3.2.1 水解

准确称取烘干后的样品 10 mg,加水溶解,配置成浓度为 10 mg/mL 的溶液(市售枸杞提取物配置成 5 mg/mL),吸取 100  $\mu$ L 溶液于试管中,加入 70  $\mu$ L 的 2.5 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,110 °C 烘箱中水解 2 h,取出冷却后,加入 70  $\mu$ L 的 5 mol/L 的 NaOH,漩涡混匀中和(未酸水解的样品不经硫酸处理,取溶液,直接进行衍生化处理)。

##### 1.3.2.2 PMP 衍生化

上述水解液加入 200  $\mu$ L 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液与 100  $\mu$ L 0.3 mol/L NaOH 溶液,漩涡混匀,于 70 °C 恒温水浴锅中反应 60 min,取出放置 10 min 冷却置室温,加入 100  $\mu$ L 0.3 mol/L HCl 中和,加入纯水 1 mL,再加氯仿 2 mL,重复萃取 3 次,取水相,过 0.22  $\mu$ m 微孔过滤膜,得供试液。

##### 1.3.2.3 HPLC 分析

经 PMP 衍生化处理好的样品,过 0.22  $\mu$ m 滤膜,按下述色谱条件进行分析:色谱柱为 ODS-3(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 mL TEA、100 mL 乙腈、900 mL 高纯水混合液(pH 7.5),梯度洗脱程序为 0~4 min, 94% B; 4 min~5 min, 94%~88% B; 5 min~50 min, 88% B; 流速 1 mL/min,柱温 30 °C,进样体积 5  $\mu$ L,检测波长 250 nm。

#### 1.3.3 多糖含量测定

精确称取干燥至恒重的葡萄糖 100 mg 于 100 mL 容量瓶中,配置成 1 mg/mL 溶液,准确吸取 5 mL 于 50 mL 容量瓶中,得 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别吸取 0.02、0.04、0.05、0.06、0.08 mL 的 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液于试管中,用蒸馏水补足 1 mL,各加入 6% 的苯酚 1.0 mL,再迅速加入 5 mL 浓硫酸,漩涡混匀,40 °C 水浴加热 30 min,冷却,用分光光度计于 490 nm 下测定吸光值。枸杞样品分别配置成 0.1 mg/mL 溶液按此法测定糖含量。(市售枸杞提取物先用水溶解,80%乙醇沉淀过夜,收集沉淀,真空干燥后再测定糖含量)<sup>[21-22]</sup>。

#### 1.3.4 酸性糖含量测定

精密称取 100 mg 半乳糖醛酸于 100 mL 容量瓶

中,用少量蒸馏水溶解,加入 0.5 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液,蒸馏水定容至 100 mL,摇匀,配置成浓度为 1 mg/mL 的半乳糖醛酸溶液。分别吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的半乳糖醛酸标准溶液于 50 mL 容量瓶中,定容,分别配置成浓度为 20、40、60、80、100 mg/L 的溶液。各吸取上述溶液 1 mL,分别加入 0.25 mL 吡唑乙醇溶液,产生白色絮状物,不断摇动试管,快速加入浓硫酸 5 mL,摇匀。立刻将试管放入 85 °C 水浴锅中水浴 20 min,取出后放入冷水中迅速冷却。1.5 小时内用分光光度计在 525 nm 下测定吸光值,以半乳糖醛酸浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线<sup>[23]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 枸杞多糖部位的糖组成分析

实验室自制枸杞多糖均含有 L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、L-鼠李糖、D-甘露糖、D-木糖和 D-半乳糖醛酸,其中,成熟枸杞样本 M1~M5 中 L-阿拉伯糖与 D-半乳糖所占比例较大;而样本 M6(与其他 5 种红枸杞相比果实较硬,推测成熟度低)和样本 M7(青枸杞)中 D-半乳糖醛酸所占比例较大,推测可能是未成熟枸杞中的果胶含量较高,随着果实的成熟度增加,果胶会不断分解,故青枸杞中半乳糖醛酸含量高于成熟后的红枸杞。结果见图 1~图 4。

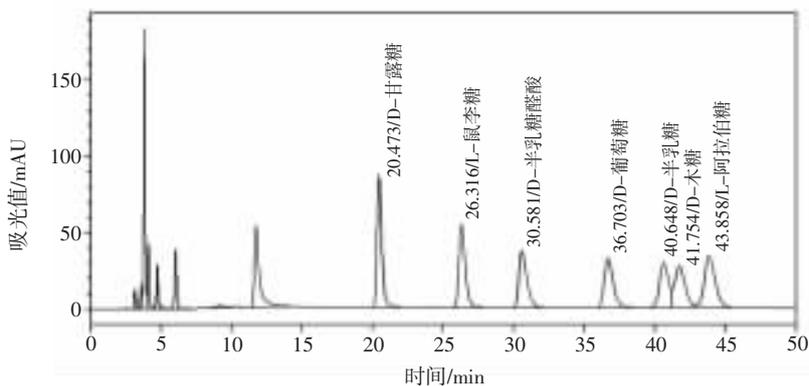


图 1 7 种混合标准糖溶液的液相色谱图

Fig.1 The HPLC chromatogram of 7 standard sugars

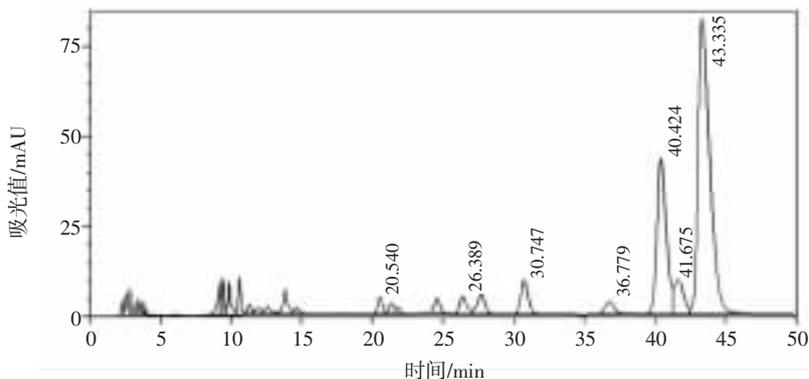


图 2 成熟枸杞样本多糖组成液相色谱图

Fig.2 The HPLC chromatogram of polysaccharide from mature wolfberry

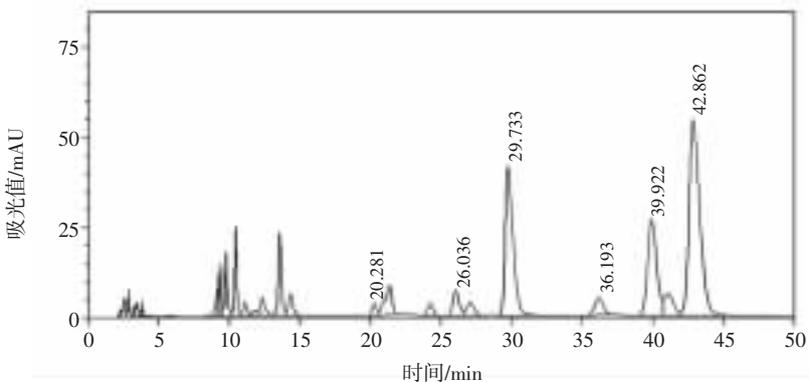


图 3 样品 M6 多糖组成液相色谱图

Fig.3 The HPLC chromatogram of polysaccharide from sample M6

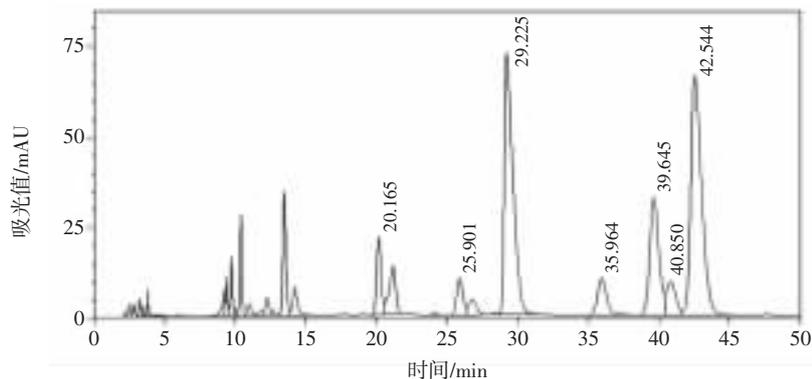


图4 样品 M7 多糖组成液相色谱图

Fig.4 The HPLC chromatogram of polysaccharide from sample M7

## 2.2 单糖和寡糖部位的糖组成分析

处理方法按 1.2.3,每个样品分别按照酸水解后再衍生和不进行酸水解直接衍生处理制作两个样本。成熟的枸杞(M1~M5)游离单糖主要为葡萄糖和甘露糖,两者的比例约为 10:1;水解和不水解相比葡萄糖和甘露糖比例关系基本没变化。未成熟样本(M6 和 M7)游离单糖主要也为葡萄糖和甘露糖,但是和成熟样本比

峰面积小,并且葡萄糖和甘露糖的峰面积之间的比值也小;经酸水解后,葡萄糖的比例显著提高,推测未成熟枸杞中含有较多的寡糖,见图 5~图 8。

## 2.3 市售枸杞提取物的分析

3 份市售枸杞提取物(市售 1~市售 3)分别酸水解和未酸水解进行糖组成分析,发现两份枸杞提取物酸水解和未酸水解的色谱图和糊精相应图谱基本一致。

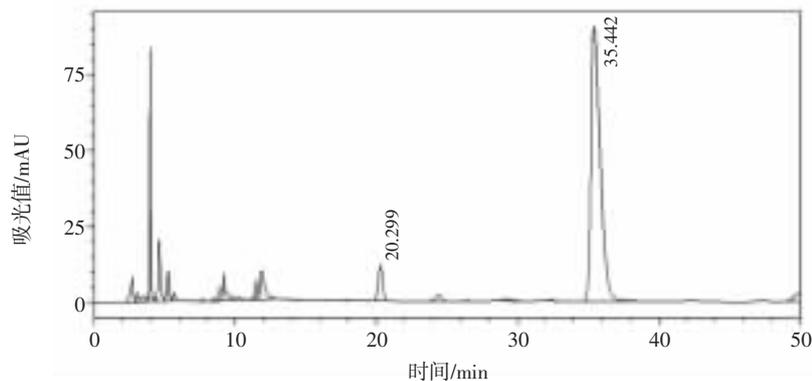


图5 成熟枸杞样品单糖和寡糖部位液相色谱图(未酸水解)

Fig.5 The HPLC chromatogram of mono- and oligosaccharides from mature wolfberry (no acid hydrolysis)

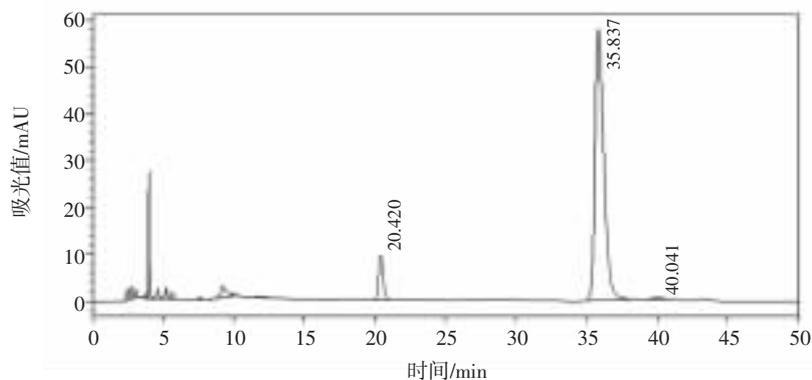


图6 成熟枸杞样品单糖和寡糖部位液相色谱图(酸水解)

Fig.6 The HPLC chromatogram of mono- and oligosaccharides from mature wolfberry (acid hydrolysis)

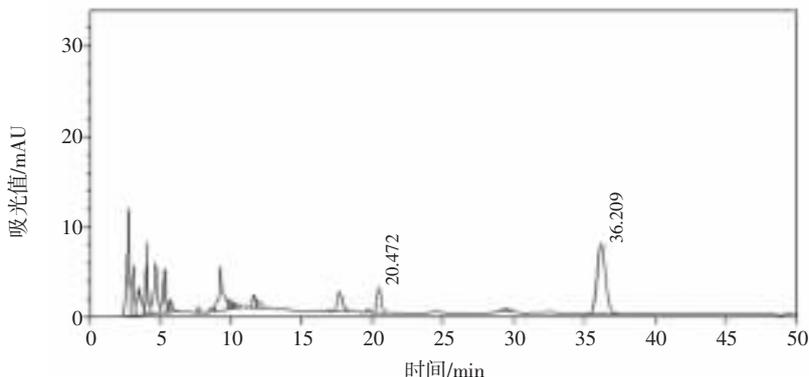


图7 未成熟枸杞样品单糖和寡糖部位液相色谱图(未酸水解)

Fig.7 The HPLC chromatogram of mono- and oligosaccharides from immature wolfberry (no acid hydrolysis)

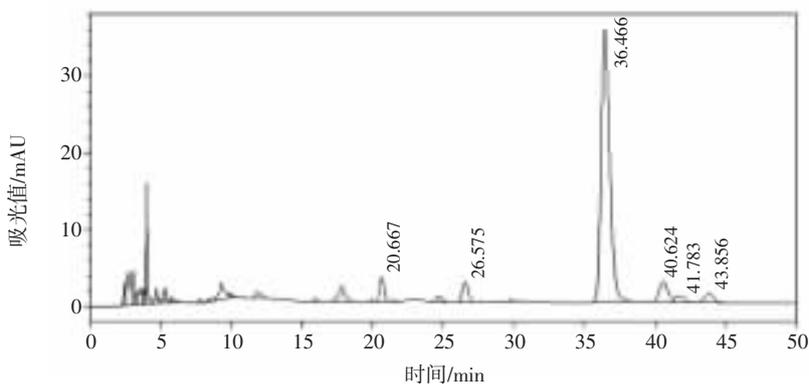


图8 未成熟枸杞样品单糖和寡糖部位液相色谱图(酸水解)

Fig.8 The HPLC chromatogram of mono- and oligosaccharides from immature wolfberry (acid hydrolysis)

判断枸杞提取物中添加了大量糊精。另外一份枸杞提取物在未酸水解条件下基没看到糖的色谱峰,而在水解条件下的糖色谱峰和实验室自制枸杞多糖的色谱峰基本一致,因此推测该样本为经过醇沉淀处理过的真枸杞多糖提取物。见图9~图11。

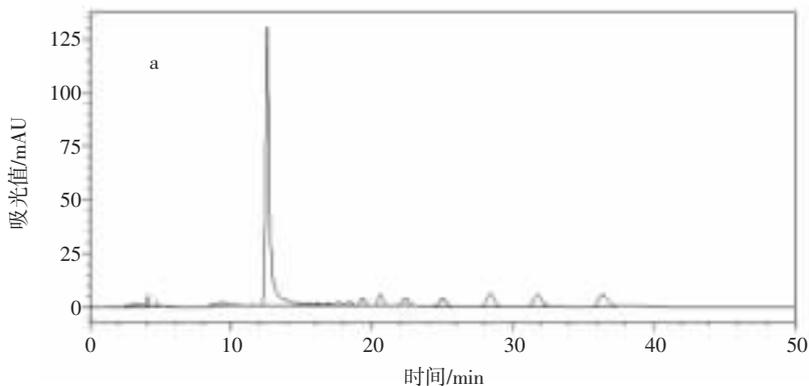
2.4 多糖含量测定结果

采用苯酚-硫酸法,分别测定了10份样本的多糖含量(实验室自制7份样本,市售3份样本),结果见表1。

实验室自制的枸杞多糖的含量(包括成熟枸杞与青枸杞)在32.09%~43.72%之间,而枸杞提取物的含量较高,在95%~98.04%。

2.5 枸杞多糖的酸性糖含量测定

采用吡啶-硫酸法分别测定了10个样本中酸性糖的含量,结果见表1,枸杞多糖中半乳糖醛酸的含量在47.31~57.38%,枸杞多糖是一种酸性杂多糖。M6和M7酸性多糖的含量稍微偏高,与HPLC分析中半乳糖醛酸峰面积较大结果一致。



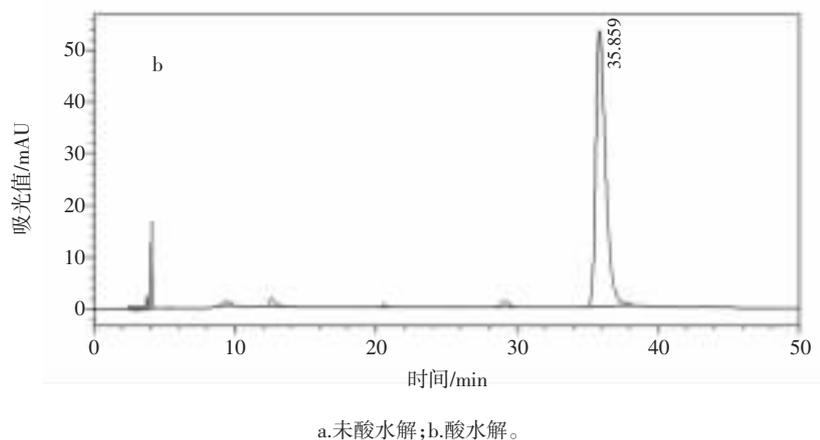


图9 枸杞提取物(市售1)的液相色谱图

Fig.9 The HPLC chromatogram of wolfberry polysaccharide extract ( commercial sample 1 )

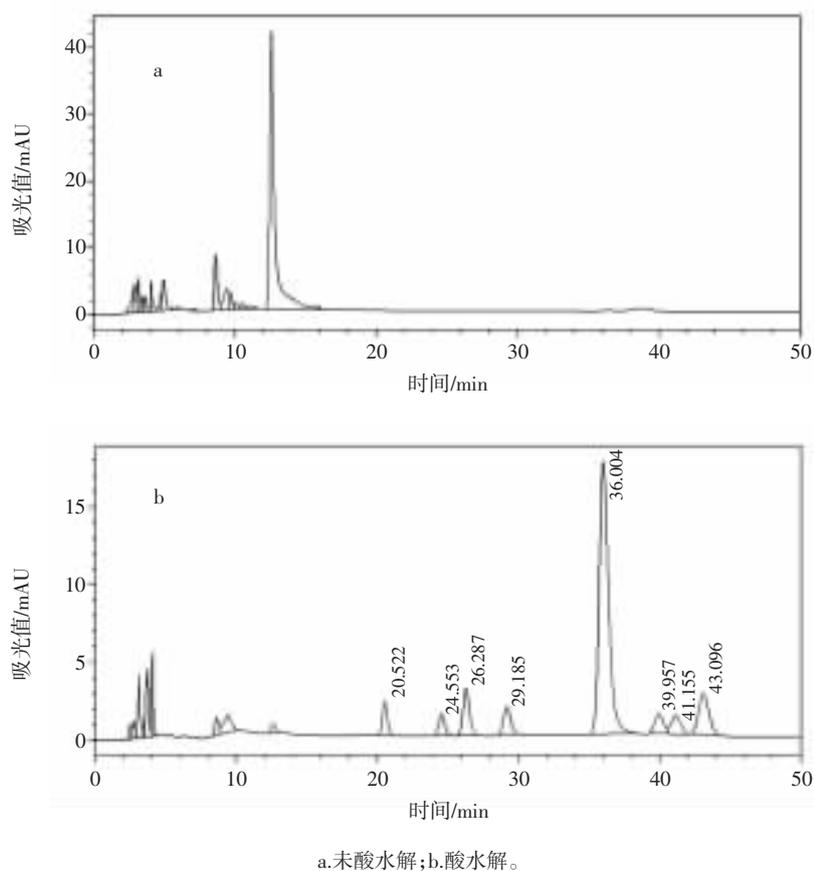


图10 枸杞提取物(市售3)的液相色谱图

Fig.10 The HPLC chromatogram of wolfberry polysaccharide extract ( commercial sample 3 )

### 3 结论

本文采用PMP衍生化后经HPLC分析糖的组成,7种自制枸杞多糖中均含有L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、L-鼠李糖、D-甘露糖、D-木糖6种中性单糖及酸性糖D-半乳糖醛酸,与文献报道一致<sup>[3]</sup>。未成熟枸杞多糖中D-半乳糖醛酸的占比增大,酸性糖含量增

加。成熟枸杞中单糖和寡糖部位主要为游离的葡萄糖和甘露糖,寡糖含量很少。未成熟枸杞中游离糖也为葡萄糖和甘露糖;游离糖含量少,寡糖含量较多。

枸杞属于浆果类物质,提取液比较黏稠,不易干燥,吸湿性大。工业生产过程中会添加糊精类物质改善性能。3份样本中,从游离糖、单糖组成以及酸性糖

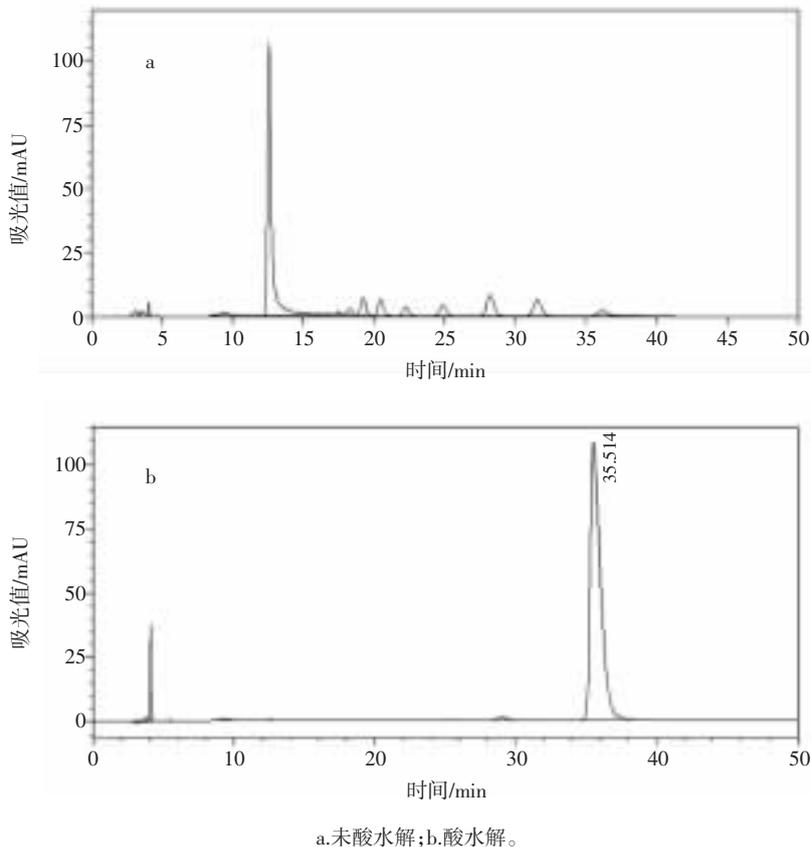


图 11 糊精液相色谱图

Fig.11 The HPLC chromatogram of dextrin

表 1 多糖和酸性糖含量测定结果

Table 1 Determination results of polysaccharide and acid polysaccharide

样本	糖含量/%	酸性糖/%
M1	37.52	49.28
M2	32.09	49.89
M3	33.83	47.31
M4	32.67	48.20
M5	43.72	51.71
M6	33.60	57.38
M7	37.29	56.82
市售 1	98.04	19.80
市售 2	95.78	20.88
市售 3	25.62	48.31
糊精(98%)	未检测	17.67

含量和糊精是否一致 3 个角度分析,含枸杞的成分很少几乎全是糊精。只有一份与实验室制备枸杞多糖的成分较一致,并且未检测到游离糖的添加,推测是真正的枸杞多糖。多糖含量和酸性糖含量的角度也能反映出产品的品质,如两份疑似添加糊精的样品多糖含

量都大于 90%,而真正枸杞多糖含量在 32%~43%;相反,酸性糖含量在添加糊精后显著降低。

目前市场上对枸杞多糖类产品的控制主要是测定多糖含量,甚至只测定总糖含量。这样会产生一种添加糊精越多多糖含量越高,品质越高的恶性循环。本结果为枸杞提取物的质量控制提供了思路。通过 PMP 分析单糖组成,通过制定合理的多糖含量以及酸性糖含量控制枸杞提取物产品的控制。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典 (一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 249  
 [2] 房想. 不同采收期枸杞多糖含量及单糖组成的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2016  
 [3] 王益民, 张珂, 许飞华, 等. 不同品种枸杞子营养成分分析及评价[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 34-38  
 [4] LQ Zhao, ZQ Qiu, B Narasimhamoorthy, et al. Development of a rapid, high-throughput method for quantification of zeaxanthin in Chinese wolfberry using HPLC-DAD[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 47(3): 51-57  
 [5] 张芳, 郭盛, 钱大玮, 等. 枸杞多糖的提取纯化与分子结构研究

- 进展及产业化开发现状与前景分析[J]. 中草药, 2017, 48(3): 424-432
- [6] N He, X Yang, Y Jiao, et al. Characterisation of antioxidant and anti-proliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 978-989
- [7] 朱彩平, 张声华. 枸杞多糖的提取及其组成的气相色谱分析[J]. 现代食品科技, 2009, 25(11): 1327-1328
- [8] 李英杰, 齐春会, 张永祥. 枸杞多糖免疫调节剂作用机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(10): 882-886
- [9] YS Ho, MS Yu, XF Yang, et al. Neuroprotective effects of polysaccharides from wolfberry, the fruits of *Lycium barbarum*, against homocysteine-induced toxicity in rat cortical neurons[J]. Journal of Alzheimers Disease, 2010, 19(3): 813-827
- [10] 高春燕, 田呈瑞. 枸杞多糖体外抗氧化特性研究[J]. 粮食与油脂, 2005(7): 28-29
- [11] 刘源才, 孙细珍, 许银, 等. 枸杞多糖组成及含量测定方法的改进[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 292-295
- [12] 杨勇杰, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 苯酚硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. 中成药, 2005, 27(6): 706-708
- [13] J Dai, Y Wu, SW Chen, et al. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 629-635
- [14] 孙晓燕, 蔡昌利, 徐丽莉. 多糖含量测定方法的比较[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(3): 58-62
- [15] 田丽梅, 王旻. 枸杞多糖的提取分离和其组成研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1603-1607
- [16] 高洪霞, 刘军海, 李广录. 枸杞多糖提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 60-62
- [17] 鲁小静, 冯艳波, 陈晓瑞, 等. 响应面法优化黑果枸杞多糖的提取工艺研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(6): 79-83
- [18] 吕凤娇, 吴洪, 高平章. 枸杞多糖提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 2075-2076
- [19] 陈彦杰, 褚银玲, 韩超轶, 等. 高效液相色谱法测定魔芋精粉中葡甘聚糖的含量[J]. 中国当代医药, 2016, 23(36): 125-128
- [20] 万强, 吴学昊, 范华均, 等. HPLC 衍生化法分析决明子多糖水解产物中单糖组分及其多糖组成特征的研究[J]. 分析测试学报, 2014, 33(11): 1231-1236
- [21] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 苯酚-硫酸法测定野木瓜中多糖含量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 276-279
- [22] 王宏洁, 李鹏跃, 刘婷, 等. 苯酚-硫酸法测定清开灵注射液中总多糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 3-5
- [23] 周鸿立, 刘世娟, 常丹. 玉米须多糖中糖醛酸的含量测定[J]. 食品工业, 2014, 35(10): 262-264

收稿日期:2018-04-05

## 欢迎订阅 2019 年《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是由天津市食品研究所有限公司和天津市食品工业生产促进中心主办, 国内外公开发行的食品专业科技期刊, 1980 年创刊, 半月刊, 采用国际流行开本大 16 开。其专业突出, 内容丰富, 印刷精美, 是一本既有基础理论研究, 又包括实用技术的刊物。本刊已被“万方数据库”、“中文科技期刊数据库”、《乌利希期刊指南》、美国《化学文摘》、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、英国《食品科技文摘》(FSTA)等知名媒体收录, 并被列入“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、RCCSE 中国核心学术期刊(A)。主要栏目有: 基础研究、应用技术、检测分析、生物工程、专题论述、食品机械等。

本刊国内统一刊号 CN 12-1231/TS; 国际刊号 ISSN 1005-6521; 邮发代号: 6-197。全国各地邮局及本编辑部均可订阅。从本编辑部订阅全年刊物享八折优惠。2019 年定价: 30 元/册, 全年 720 元。

本编辑部常年办理邮购, 订阅办法如下:

(1) 邮局汇款。地址: 天津市静海县静海经济开发区南区科技路 9 号; 收款人: 《食品研究与开发》编辑部; 邮政编码: 301600。

(2) 银行汇款。开户银行: 工商银行静海支行

账号: 0302095119300204171; 单位: 天津市食品研究所有限公司。

《食品研究与开发》编辑部

www.tjfrad.com.cn

E-mail: tjfood@vip.163.com

电话(传真): 022-59525671