

仙人掌多糖的分子量及单糖组成分析

郭燕娇, 何钢, 颜军, 刘续成, 邬晓勇, 易勇, 苟小军

(成都大学药食同源植物资源开发重点实验室, 四川成都 610106)

摘要: 对仙人掌多糖分子量及其单糖组成进行了研究。采用水提醇沉法提取多糖, DEAE-纤维素离子交换层析柱分离纯化, 高效凝胶过滤色谱法 (HPGFC) 测定多糖分子量, 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生化高效液相色谱法 (HPLC) 测定单糖组成。结果表明: 此法最终获得三个多糖组分 OPS-1、OPS-2、OPS-3, 相对分子量分别为 124712、197943、43083。OPS-1 含葡萄糖、木糖、阿拉伯糖, 摩尔比为 1.5:12.9:1.0; OPS-2 含甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖, 摩尔比为 1.0:15.6:1.0:2.4:8.2:41.6:36.3; OPS-3 含鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖, 摩尔比为 1.0:2.4:1.4:1.4。为仙人掌多糖的进一步研究及开发提供了科学依据。

关键词: 仙人掌; 多糖; 分子量; 单糖; 高效液相色谱法

文章编号: 1673-9078(2012)12-1796-1799

The Molecular Weight and Monosaccharide Composition of Polysaccharides from *Opuntia stricta*

GUO Yan-jiao, HE Gang, YAN Jun, LIU Xu-cheng, WU Xiao-yong, YI Yong, GOU Xiao-jun

(The Key Laboratory of Medicinal and Edible Plants Resources Exploitation, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: The molecular weight and monosaccharide composition of *Opuntia* polysaccharide were studied. The crude polysaccharides were extracted from *Opuntia* with hot water and precipitated by alcohol, then purified by ion exchange chromatography on DEAE cellulose column. High performance gel filtration chromatography (HPGFC) and high performance liquid chromatographic (HPLC) method of precolumn-derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) were used for detection of the polysaccharide molecular weight and the monosaccharide composition, respectively. The results of HPLC analysis showed that three main polysaccharides fractions were obtained, named OPS-1, OPS-2, OPS-3, with the molecular weights being of 124712, 197943 and 43083, respectively. The OPS-1 was composed of glucose, xylose, arabinose with the molar ratio of 1.5:12.9:1.0. The OPS-2 was composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, xylose, arabinose with the molar ratio of 1.0:15.6:1.0:2.4:8.2:41.6:36.3. The OPS-3 was composed of rhamnose, glucose, xylose, arabinose with the molar ratio of 1.0:2.4:1.4:1.4. The experiment can be used as a scientific basis for the research of *Opuntia* pharmacology in the future.

Key words: *Opuntia stricta*; polysaccharide; molecular weight; monosaccharide; HPLC

仙人掌(*Opuntia stricta*), 又名龙舌、神仙掌、观音刺。仙人掌的药用历史悠久, 具有行气活血、清热解毒, 治疗汤火伤、蛇伤等功能^[1]。仙人掌多糖 (*Opuntia stricta* Polysaccharides, OPS) 是仙人掌中重要的天然有效成分之一, 具有增强免疫活性, 对预防和治疗包括癌症在内的许多种疾病具有巨大的潜

收稿日期: 2012-07-27

基金项目: 四川省杰出青年学术技术带头人培育计划 (2012JQ0044); 成都大学基金项目 (2010XJZ23)

作者简介: 郭燕娇 (1987-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药食同源植物加工技术

通讯作者: 苟小军 (1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 药食同源植物加工技术

力。由于其多种生物活性和良好的临床效果, 引起了人们极大的关注和研究^[2-3]。

目前, 仙人掌多糖的研究多集中在仙人掌多糖的提取、分离纯化、分子量分布、结构分析、单糖组成及生物活性等方面^[4-9]。多糖的分子结构及分子量大小是影响多糖生物活性的重要因素, 并与多糖分子高级结构的形成相关^[10]。在多糖类药物的分子量测定中, 高效凝胶过滤色谱法 (HPGFC) 由于具有快速、重现性好等优点, 被广泛应用。多糖的单糖组成测定是控制多糖质量标准 and 提供多糖基本信息的最重要环节, 而 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生化 HPLC 测定单糖含量的方法经过了不断地发展和完善^[11]。测定仙人掌多糖的分子量和单糖组成可以为仙人掌多糖

的进一步研究及开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

仙人掌, 成都荷花池中药材专业市场; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP), 上海医药集团; 单糖对照品: D-甘露糖(Man)、D-鼠李糖(Rha)、D-葡萄糖醛酸(GlcUA)、D-(+)-半乳糖醛酸-水(GalUA)、D-葡萄糖(Glc)、D-木糖(Xyl)、D-阿拉伯糖(Ara)、Dextran(葡聚糖)T-10、40、500、2000, 上海医药集团; 乙腈 色谱纯; 其余为分析纯。

高效液相色谱仪 戴安中国有限公司; GL-21M 型高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司; FD-1C-55 型冻干机 北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 仙人掌多糖的提取、分离与纯化

将仙人掌于 70 °C 烘干 2 h, 粉碎, 过 60 目筛。称取仙人掌粉末 100 g, 用 10 倍水 70 °C 条件下提取二次, 合并水提取液, 减压浓缩, 加 4 倍体积 95% 的乙醇后静置过夜, 得沉淀, 用 Sevag 法去蛋白^[12], 经冷冻干燥即得仙人掌粗多糖 (OPS)。精确称取 200 mg OPS 用 DEAE-纤维素柱(1.5 cm×20 cm)分离, 蒸馏水洗脱 70 mL 后, 以 0~2.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 硫酸-苯酚法显色检测^[13], 透析冻干, 备用。

1.2.2 多糖相对分子质量的测定^[14] 采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)。

1.2.2.1 色谱条件

色谱柱: YMC Pack-Diol 200(300 mm×8.0 mm, 5 μm, 200 Å); 流动相: 蒸馏水; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测器: 示差折光检测器; 进样量: 20 μL。

1.2.2.2 相对分子质量的测定

以葡萄糖及系列标准葡聚糖 T-10、T-40、T-500、T-2000 为标准品, 分别用流动相溶解配制成 2 mg/mL 溶液进样, 记录洗脱峰的保留时间。由样品保留时间计算在凝胶柱上的洗脱体积 V_e , 从而获得分配系数 K_{av} 。制作标准曲线, 求得线性回归方程, 进而求得相对分子质量。

1.2.3 对照品溶液的制备及衍生化标记

分别取对照品甘露糖 0.0176 g、鼠李糖 0.0136 g、葡萄糖醛酸 0.0161 g、半乳糖醛酸 0.0159 g、葡萄糖 0.0186 g、木糖 0.0119 g、阿拉伯糖 0.0085 g, 精密称定, 用蒸馏水溶解定容于 10 mL 容量瓶中, 摇匀。取单糖对照品混合溶液 400 μL 与 300 μL 的 0.25 mol/L NaOH 溶液, 混匀, 再加 500 μL 0.25 mol/L 的 PMP

甲醇溶液, 涡旋混匀; 70 °C 水浴反应 90 min 后, 冷却, 加 500 μL 0.3 mol/L 的 HCl 溶液中和, 涡旋 2 min 后, 加 1 mL 氯仿萃取 3 次。将水相用 0.45 μm 微孔膜过滤后 HPLC 进样分析。

1.2.4 多糖的水解及衍生化

分别取 5 mL 仙人掌多糖组分样品(2 mg/mL)于安瓿瓶中, 加 0.1 mL 浓硫酸, 充 N₂ 密封, 120 °C 水解 4 h, NaOH 中和, 离心得上清液。分别取上清液, 按 1.2.3 方法衍生后进行 HPLC 分析。

1.2.5 单糖组成分析

1.2.5.1 色谱条件

WondaSil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 35.0 °C; 流动相: 溶剂 A, 体积分数为 15% 的乙腈 + 50 mmol/L 磷酸缓冲(KH₂PO₄-NaOH, pH 6.9); 溶剂 B: 体积分数为 40% 的乙腈 + 50 mmol/L 磷酸缓冲液(KH₂PO₄-NaOH, pH 6.9), 梯度模式: 时间梯度为 0~12~20~30~35~45 min, 相应体积分数为 15%~15%~23%~23%~15%~15% 的溶剂 B; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm。

1.2.5.2 单糖物质的量比测定

分别取单糖对照品溶液配制成一系列不同浓度的混合标样, 按 1.2.3 方法衍生化, 并在 1.2.5.1 色谱条件下进样分析, 记录峰面积。采用组分单糖峰面积及回归方程计算得仙人掌多糖各单糖质量浓度。质量浓度与物质的量之比得各单糖物质的量浓度, 各单糖物质的量浓度之比即为物质的量比。

2 结果与分析

2.1 仙人掌多糖的提取、分离与纯化

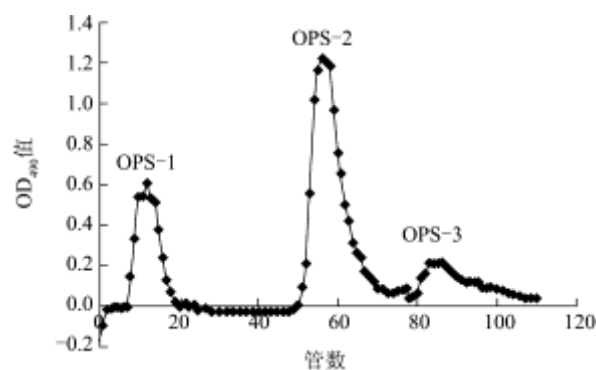


图 1 仙人掌多糖 DEAE-纤维素柱层析的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of Opuntia polysaccharide on DEAE cellulose column

采用 1.2.1 节方法提取、分离, Sevag 法除蛋白, 60 °C 烘干得到仙人掌多糖(OPS), 得率为 5.46%。DEAE-纤维素柱分离结果见图 1。分别合并 8~17 管、51~69 管、81~95 管, 透析冻干得仙人掌多糖 3 个组

分：OPS-1、OPS-2、OPS-3。OPS-1 由蒸馏水洗脱，初步判断为中性多糖。OPS-2 和 OPS-3 为 NaCl 溶液梯度洗脱，为酸性多糖成分。

2.2 多糖相对分子质量测定

不同相对分子质量的标准葡聚糖 HPGFC 分析结果如下：Glc、T-10、T-40、T-500、T-2000 的分子量分别为 198、10000、40000、500000、2000000，相应的保留时间分别为 13.007、11.200、9.033、7.307、7.223。

线性回归方程为 $y = -5.7239x + 12.913$ ($r = 0.9732$)。将仙人掌多糖样品在相同色谱条件下进样分析，OPS-1、OPS-2 和 OPS-3 的洗脱峰形对称，保留时间分别为 7.947 min、7.593 min 和 9.487 min，如图 2~4。

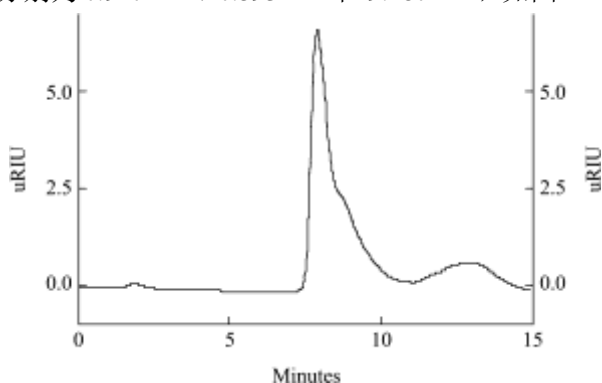


图 2 OPS-1 的 HPGFC 图

Fig.2 HPGFC chromatogram of OPS-1

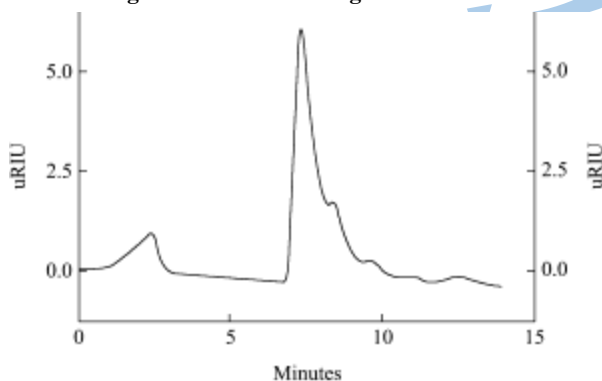


图 3 OPS-2 的 HPGFC 图

Fig.3 HPGFC chromatogram of OPS-2

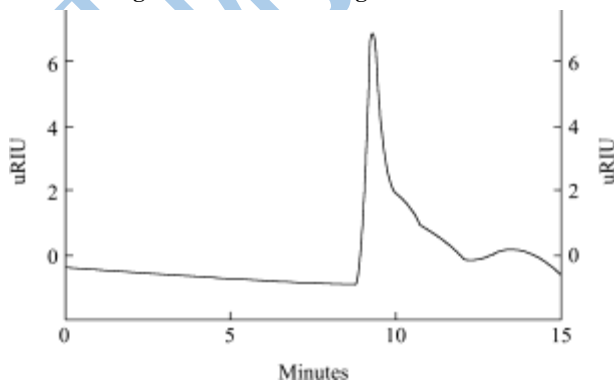


图 4 OPS-3 的 HPGFC 图

Fig.4 HPGFC chromatogram of OPS-3

通过线性回归方程可求得仙人掌多糖组分 OPS-1、OPS-2 和 OPS-3 的相对分子质量(M_w)分别为 124712、197943 和 43083。

2.3 单糖组成分析

2.3.1 对照品 PMP 衍生物的分离

5 种单糖和 2 种糖醛酸标准品按 1.2.3 节衍生化，并在 1.2.5.1 节所述色谱条件下进样检测，结果见图 5。甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖和阿拉伯糖得到了良好的分离。

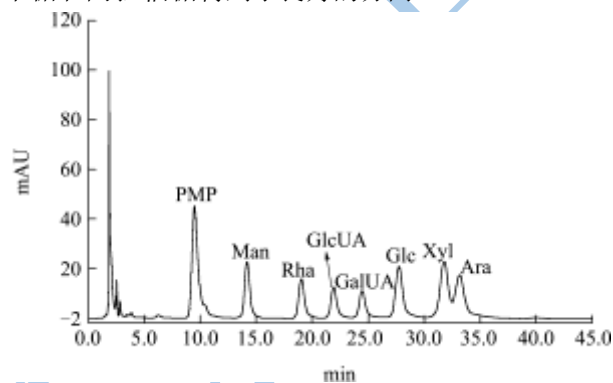


图 5 混合标准单糖 PMP 衍生物的 HPLC 图

Fig.5 HPLC chromatogram of the PMP derivatives of mixed monosaccharide standards

2.3.2 线性关系

将 5 种单糖和 2 种糖醛酸配制成一系列不同质量浓度的混合标样，衍生化后进行色谱分析。以测得的各种糖的峰面积对相应质量浓度进行线性回归得各单糖标准曲线、相关系数及线性范围见表 1。

表 1 单糖和糖醛酸的标准曲线

| 单糖 | 线性范围/(mg/mL) | 标准曲线 | 相关系数 r |
|-------|--------------|------------------------|----------|
| 甘露糖 | 0.0018~0.880 | $y = 817.5x - 4.227$ | 0.9999 |
| 鼠李糖 | 0.0014~0.680 | $y = 547.63x - 2.3967$ | 0.9999 |
| 葡萄糖醛酸 | 0.0161~8.050 | $y = 75.659x - 4.1727$ | 0.9998 |
| 半乳糖醛酸 | 0.0016~0.795 | $y = 732.04x - 3.7756$ | 0.9997 |
| 葡萄糖 | 0.0019~0.930 | $y = 559.69x - 3.7291$ | 0.9998 |
| 木糖 | 0.0012~0.595 | $y = 818.91x - 3.3774$ | 0.9999 |
| 阿拉伯糖 | 0.0009~0.425 | $y = 923.74x - 3.0493$ | 0.9997 |

2.3.3 仙人掌多糖的 PMP 衍生物分析

分别取 5 mL 仙人掌多糖组分 OPS-1、OPS-2 和 OPS-3 样品，按 1.6.4 节方法水解并衍生后，进行 HPLC 分析，结果见图 6~8。

根据混合标准单糖 PMP 衍生物的色谱图(图 5)中的色谱峰保留时间，来判断多糖水解产物中单糖的种类。由图 6 可知，OPS-1 由葡萄糖、木糖、阿拉伯糖组成；由图 7 可知，OPS-2 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖组

成; 由图 8 可知, OPS-3 由鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖组成。

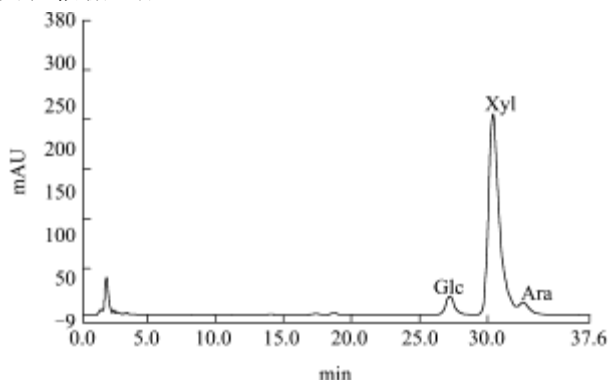


图 6 OPS-1 水解产物的 PMP 衍生物的 HPLC 图

Fig.6 HPLC chromatogram of the PMP derivatives of PPS-1-hydrolyzate

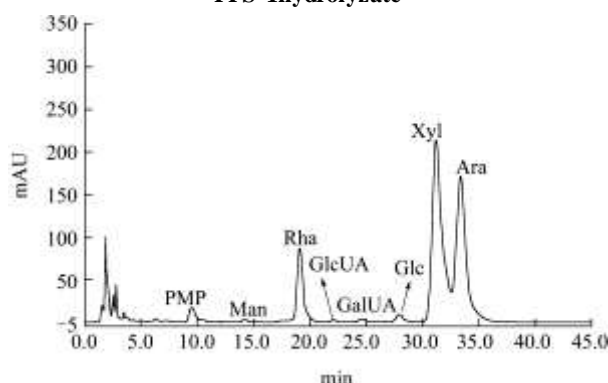


图 7 OPS-2 水解产物的 PMP 衍生物的 HPLC 图

Fig.7 HPLC chromatogram of the PMP derivatives of PPS-2 hydrolyzate

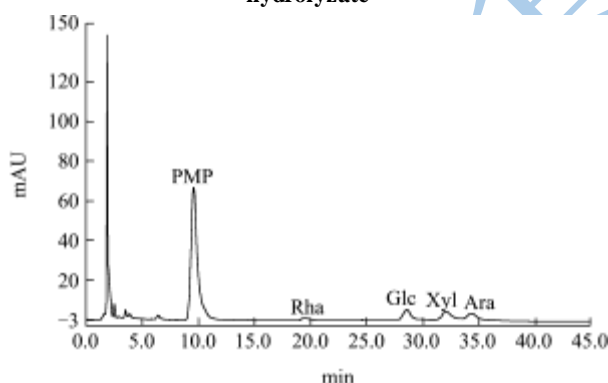


图 8 OPS-3 水解产物的 PMP 衍生物的 HPLC 图

Fig.8 HPLC chromatogram of the PMP derivatives of PPS-3-hydrolyzate

2.3.4 仙人掌多糖中单糖物质的量比测定

由峰面积及标准曲线回归方程计算得各单糖质量浓度, 各单糖质量浓度与物质的量之比得各单糖物质的量浓度, 各单糖物质的量浓度之比即摩尔比, 结果见表 3。

表 2 仙人掌多糖中单糖组成及摩尔比

Table 2 The monosaccharide composition and molar ratio of

| Opuntia polysaccharide | | |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 多糖 | 单糖组成 | 摩尔比 |
| OPS-1 | 葡萄糖-木糖-阿拉伯糖 | 1.5:12.9:1.0 |
| OPS-2 | 甘露糖-鼠李糖-葡萄糖醛酸-半乳糖醛酸-葡萄糖-木糖-阿拉伯糖 | 1.0:15.6:1.0:2.4:8.2:41.6:36.3 |
| OPS-3 | 鼠李糖-葡萄糖-木糖-阿拉伯糖 | 1.0:2.4:1.4:1.4 |

3 结论

3.1 经离子交换柱分离, 从仙人掌中获得三个多糖组分 OPS-1、OPS-2、OPS-3。根据 DEAE-纤维素的性质、洗脱液的性质及洗脱体积, 可判断 OPS-1 为中性多糖组分, OPS-2 和 OPS-3 为酸性多糖组分。其相对分子量分别为 124712、197943、43083。这与文献[4,5,6]的研究不同, 造成这种区别的主要原因在对仙人掌多糖进行分离纯化及分子量测定的研究中, 采用的仙人掌来源不同、多糖提取分离的条件不同、纯化的柱料不同, 所以得到的多糖组分的个数与分子量也不同。

3.2 采用 PMP 柱前衍生化 HPLC 法分析仙人掌多糖的单糖组成。OPS-1 由葡萄糖、木糖、阿拉伯糖组成, 摩尔比为 1.5:12.9:1.0; OPS-2 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖组成, 摩尔比为 1.0:15.6:1.0:2.4:8.2:41.6:36.3; OPS-3 由鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖组成, 摩尔比为 1.0:2.4:1.4:1.4。文献[8]采用衍生化气相色谱对分离得到的多糖的单糖组成进行了研究。但由于衍生化气相色谱测定单糖的最大问题是糖的异构化。由于单糖的异构化, 糖的衍生物进行气相色谱测定时, 常使一个单糖产生多个峰, 给定性带来一定困难, 并且定量也不准确。这也是文献[8]没有确定单糖比例的主要原因。采用 PMP 衍生化 HPLC 法分析单糖组成, 最大的优点是灵敏度高、没有副产物且 5 种单糖和两种糖醛酸的衍生物分离度良好(见图 2)。进而计算出了各单糖的摩尔比, 为仙人掌多糖的高级结构的确定及进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 王者悦.中国药膳大辞典[Z].大连出版社,1992
- [2] 卫巍,李雪华.多糖的研究进展[J].国外医学医药分册,2005,32(3):179-184
- [3] 曾富华,赵龙岩,饶力群.仙人掌多糖的研究进展与开发利用进展[J].中国生化药物杂志.2011,32(5):411-414
- [4] 蔡为荣,顾小红,汤坚.仙人掌多糖的提取及其结构初步研究[J].2007,23(4):68-71

- [5] 林爱琴,方幼兰,林曦.仙人掌多糖的分离纯化与化学结构分析[J].食品科学与开发,2008,29(9):109-112
- [6] 金鑫,赖凤英.仙人掌多糖的提取、分离纯化及 GPC 法测定其分子量[J].现代食品科技,2006,22(2):138-149
- [7] 马定远,陈军,李萍,等.柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成[J].分析化学研究报,2002,30(6):702-705
- [8] 尤玉如,袁海娜,刘士旺,等.仙人掌多糖中单糖组成的气相色谱分析[J].中国食品学报,2007,7(6):136-140
- [9] Weirong CAI, Liangliang XIE, Pengfei TAO, et al. Structural Analysis and Anticoagulant Activity of Polysaccharides from *Opuntia milpa alta* [J]. Agriculture Science & Technology, 2012, 13(2): 255-260, 264
- [10] Zhang LN, Li XL, Xu XJ, et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(8): 1515-1521
- [11] 杨兴斌,赵燕,周四元,等.柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成[J].分析化学研究简报,2005,33(9): 1287-1290
- [12] 史德芳,杨洋,孙晓雪,等.仙人掌多糖提取过程中三种脱蛋白方法的比较研究[J].现代食品科技,2006,22(4):93-95
- [13] 徐光域,颜军,郭晓强,等.硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J].食品科学,2005,26(8):342-346