

铁皮石斛多糖分离纯化及单糖组成测定

宾宇波^{1,2}, 王亚芸^{1,2}, 安欣^{1,2}, 任建武^{1,2,*}

(1.北京林业大学生物科学与技术学院食品科学与工程系, 北京 100083

2.林业食品加工与安全北京市重点实验室(北京林业大学), 北京 100083)

摘要: 将铁皮石斛粗多糖经 DEAE-52 纤维素柱分离得到了四个多糖组分 (DO-1、DO-2、DO-3、DO-4), 并将组分 DO-1 经 Sephadex G-200 柱纯化得到多糖 DOP。采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生化方法进行高效液相色谱分析, 分析结果得出, 多糖 DOP 由 D-甘露糖、L(+)-鼠李糖和 D-葡萄糖三种单糖组成, 通过外标法定量得知 D-甘露糖:L(+)-鼠李糖:D-葡萄糖=1.936:0.856:0.691。测定了多糖 DOP 抗氧化活性, 结果显示其具有良好的清除能力。

关键词: 铁皮石斛, DEAE-cellulose-52 纤维素柱, 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP), 高效液相色谱

Dendrobium polysaccharide purification and determination of monosaccharide composition

BIN Yubo^{1,2}, WANG Yayun^{1,2}, AN Xin^{1,2}, REN Jianwu^{1,2,*}

(1. Department of Food Science and Engineering, College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083

2. Beijing Key Laboratory of Forest Food Processing and Safety, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: Polysaccharides of *Dendrobium* was isolated by DEAE-52 cellulose column and four kinds of polysaccharide (DO-1, DO-2, DO-3, DO-4) were got, then the component DO-1 was purified by Sephadex G-200 column, polysaccharide DOP was got. Using the method of pre-column derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP) for HPLC analysis and the results showed that, polysaccharides DOP is composed of D-mannose, L (+) - rhamnose and D-glucose, and the external standard informed that D-mannose:L(+)-rhamnose:D-glucose = 1.936:0.856:0.691. The antioxidant properties of polysaccharide DOP were determined, and the results showed that the polysaccharide DOP had strong scavenging effects to DPPH radicals.

Key words: *Dendrobium candidum*; DEAE-52 cellulose column; 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP); HPLC

中图分类号: TS201

文献标识码: A

铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 为兰科石斛属多年生附生草本植物, 是一种名贵的中药材, 自古以来就有“药中黄金”之称, 民间称之为“救命仙草”^[1], 主要生长在我国西南和江南各省^[2]。铁皮石斛对热病伤阴、胃阴不足等病症有很好疗效;对慢性萎缩性胃炎以及心脑血管病、防癌抗癌、防老抗衰等方面, 石斛都具有独特、满意的效果^[3-4]。多糖是铁皮石斛中最主要的有效成分^[5], 具有很强的药理活性^[6-7]。分析多糖中单糖的组成为多糖药理活性的研究能够提供一定的研究基础^[8], 为进一步深入探究铁皮石斛具有重要意义。

铁皮石斛多糖的单糖组成的分析是其性质、结构及构效关系研究的一项基本且重要的内容。但是由于单糖的极性比较强, 并且结构相近, 缺乏光学活性, 因此为了改善单糖分离的选择性和提高检测的灵敏度, 很多文献将多糖水解后应用柱前或柱后衍生化色谱法分离和检测^[9-12]。其中 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化高效液相色谱法反应条件较温和, 产物无立体异构, 紫外检测灵敏度较高, 故得到较为广泛的应用^[13-16]。本研究比较了不同反应时间的衍生产物峰面积的大小和不同流动相对分离效果的影响, 建立了 PMP 柱前衍生化高效液相色谱测定单糖的方法, 并首次测定了铁皮石斛多糖通过 DEAE-cellulose-52 纤维素柱的纯水洗脱部分的单糖组成。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

铁皮石斛 购于浙江瑞心源生物科技有限公司, 60℃烘干后, 粉碎, 过 50 目筛备用; DEAE-cellulose-52 填料 Whatman 公司; Sephadex G-200 填料 Pharmacia 公司; 石油醚, 无水乙醇, 苯酚, 浓硫酸, D-半乳糖, D-半乳糖醛酸, D-葡萄糖 Sigma 公司; D-阿拉伯糖, L(+)-鼠李糖 Fluka 公司; D-木糖 上海伯奥生物科技有限公司; D-

基金项目: 北京市园林绿化局计划项目 项目编号: Y1HH200900304

作者简介: 宾宇波(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮运。

* 通讯作者: 任建武, 男, 教授, 北京林业大学生物科学与技术学院

甘露糖 上海试剂二厂；1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP) 纯度 99%，美国 Acros Organics 公司。

MNMF-1818 型谷物粉碎机 湖北碧山机械有限公司；旋转蒸发器 上海沪西分析仪器厂有限公司；722 型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司；Agilent 1100 高效液相色谱仪 包括 G1311A 四元泵，G1315B DAD 检测器，G1313A 自动进样器，G1379A 在线脱气机，G1316A 柱温箱，Agilent1100 化学工作站，美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 铁皮石斛多糖提取工艺 称取 2g 石斛粉末→石油醚脱脂，料液比 1:5(g/mL)，1h，两次→80%乙醇溶液 100mL 回流脱单糖(料液比 1:5，2h，两次)→80% 乙醇洗涤残渣 →100mL 蒸馏水 60℃水提，2h，两次→合并两次提取液上清液→Sevag 法除蛋白→80% 乙醇溶液沉淀→乙醇清洗沉淀→冷冻干燥沉淀→石斛粗多糖粉末。

1.2.2 铁皮石斛粗多糖的分离纯化 将冻干的粗多糖粉末用蒸馏水溶解配置成 1g/10mL 的粗多糖溶液，离心后取上清液过 0.45μm 滤膜，取 0.5mL 进 DEAE-52 纤维素柱(1.5cm×60cm)进行分离，先以蒸馏水洗脱，然后以 0.1~0.8mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱，洗脱流速为 0.3mL/min，以 3mL 每管收集洗脱液，用苯酚-硫酸法于 490nm 处测定每管洗脱液的吸光值，根据测定出的吸光值绘制洗脱曲线，合并主要洗脱峰的洗脱液，将其浓缩装入透析袋(截流分子量为 7000)，在流水和蒸馏水中分别透析 48、24h，醇沉，冻干得到 4 个组分(DO-1、DO-2、DO-3、DO-4)，将组分 DO-1 用 Sephadex G-200 柱(2.5cm×80cm)进一步纯化，得到 DOP 纯多糖组分。

1.2.3 混合单糖标样的衍生 分别取 100μL 的混合单糖标准液(各单糖质量浓度均为 0.36g/L 左右)与 100μL 的 0.6mol/L NaOH 溶液，置于 1mL 的具塞试管中混合均匀，再从中吸取 50μL 的混合液于 5mL 的具塞试管中，加 50μL 0.5mol/L 的 PMP(0.4355g/5mL)甲醇溶液，漩涡混匀；在 70℃烘箱中反应 30、50、70、100、120min；取出放置 10min 冷却至室温，加 100μL 0.3mol/L 的 HCl 中和；加水至 1mL，再加等体积的氯仿，振荡，静置，弃去氯仿相，如此萃取 3 次。将水相用 0.45μm 微孔膜过滤后供 HPLC 进样分析。

1.2.4 样品的制备 称取 20mg 多糖 DOP 置于试管中，加入 2mol/L H₂SO₄ 3mL，封管，100℃水解 8h，然后用 BaCO₃ 中和，离心取上清液，得到多糖水解液。吸取水解液 100μL 和 100μL 的 0.6mol/L NaOH 溶液，置于 1mL 的具塞试管中混合均匀，再取 50μL 的混合液于 5mL 的具塞试管中，加 50μL 0.5mol/L 的 PMP(0.4355g/5mL)甲醇溶液，漩涡混匀，在 70℃烘箱中反应 40min，反应后，按照 1.2.3 中方法进行冷却、中和、萃取，过 0.45μm 微孔膜过滤后供 HPLC 进样分析。

1.2.5 标准曲线的制备 取 D-葡萄糖、L(+)-鼠李糖、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖分别配成 1、2、3、4、5mg/10mL 的标准溶液，按照 1.2.3 中的方法对标准液进行衍生化，冷却、中和、萃取后，过 0.45μm 微孔膜过滤后供 HPLC 进样分析，应用 Agilent 1100 化学工作站制作标准曲线。

1.2.6 色谱条件 色谱柱：Agilent TC-C18 (250mm×4.6mm，5μm)；流动相：乙腈-磷酸盐缓冲液(0.05mol/L，pH6.9) (体积比为 17:83)、乙腈-超纯水(体积比为 17:83)；柱温：30℃；流速：1mL/min；检测波长：250nm；进样体积：10μL。

1.2.7 多糖 DOP 溶液清除 DPPH 自由基能力的测定 称取多糖 DOP 样品配制成不同浓度的溶液，取不同浓度的溶液 2mL 和 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 自由基甲醇溶液 2mL，加入同一具塞试管中，摇匀，在室温避光反应 30 min 后于 515 nm 处测其吸光度，并用 VC 溶液作为阳性对照，计算多糖 DOP 对 DPPH 自由基的清除率^[17]，公式如下：

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

式中： A_0 为对照组吸光度， A_i 为样品组吸光度， A_j 为空白组吸光度，i、j 分别表示不同的实验组。

2 结果与讨论

2.1 粗多糖的分离和纯化

粗多糖经过 DEAE-52 纤维素柱分离后，得到了 4 个组分，分别为 DO-1、DO-2、DO-3 和 DO-4，如图 1 所示。DO-1 为纯水洗脱下来的中性多糖部分，占据了石斛粗多糖的主要部分，其他 3 个组分分别为 0.1、0.2、0.4mol/L 的 NaCl 溶液洗脱下来的部分。将 DO-1 部分再经过 Sephadex G-200 柱纯化，得到 DOP 纯多糖，经透析、浓缩、醇沉、冷冻干燥得到纯的多糖粉末。

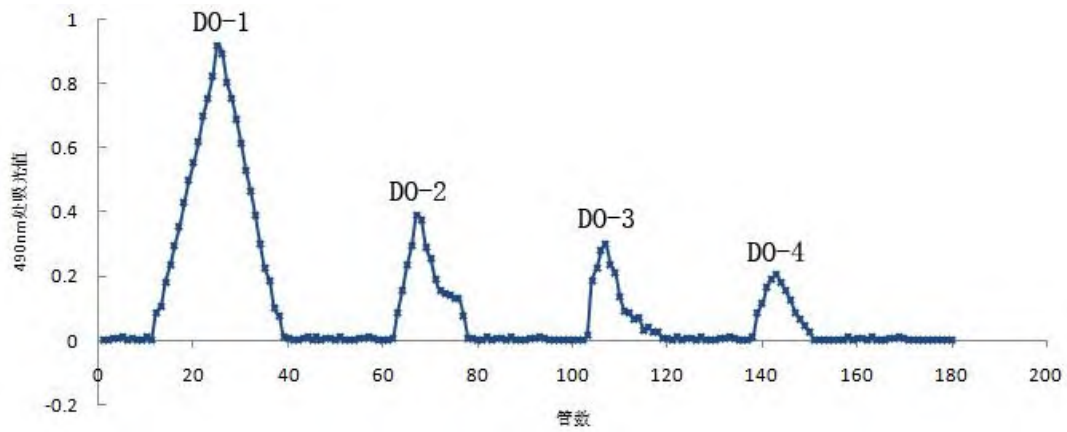


图 1 石斛多糖洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of *Dendrobium candidum* polysaccharide

2.2 衍生化时间及流动相的选择

绝大多数文献上, 选用了 70℃作为反应温度, 但是对于反应的时间执不同的意见, 本文设置了 30、50、70、100 和 120min 五个时间做为单糖的衍生化时间, 以峰面积作为考察对象, 以葡萄糖衍生化为例, 不同的衍生化反应时间, 最终测得的峰面积如图 2 所示。最后实验结论证明: 在反应时间为 100min 时, 单糖衍生化物的峰面积最大, 70min 次之, 120min 时, 单糖衍生化物峰面积下降较为明显,故衍生化时间选择为 100min。

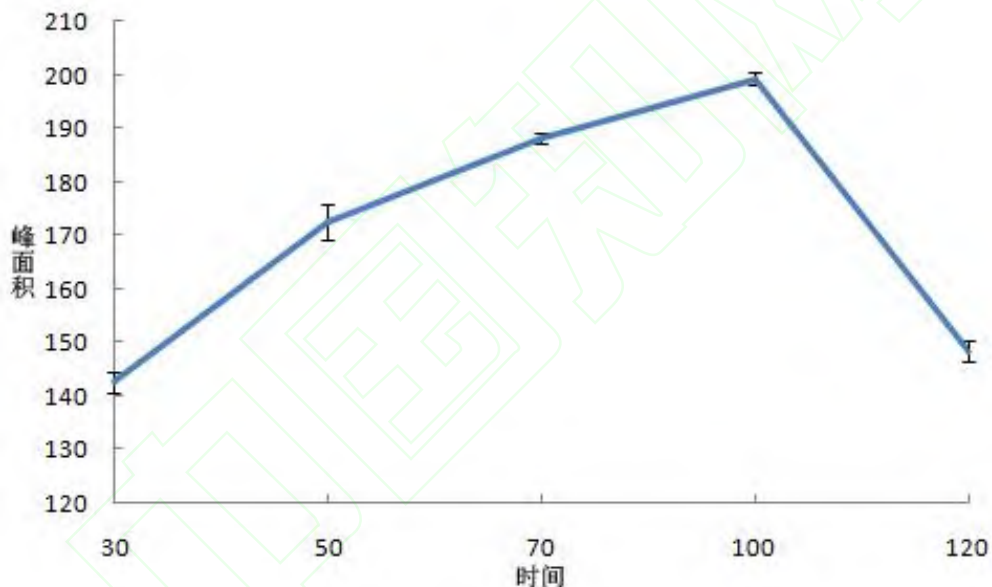
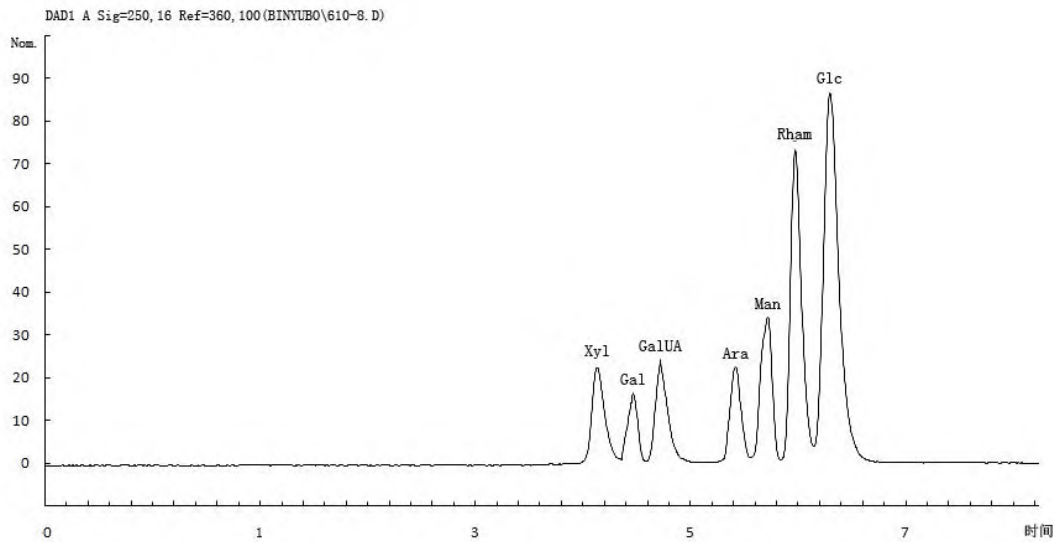


图 2 不同反应时间峰面积变化曲线

Fig.2 The curve of the peak area change with different reaction time

在流动相的选择方面, 大多数文献选择了用乙腈-磷酸盐缓冲液或乙腈-醋酸盐作为流动相, 但是, 盐对于整个液相色谱仪和柱子有着很严重的影响, 一般情况下, 尽量不选择盐作为流动相, 因此, 本文选择了乙腈-磷酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH 6.9) (体积比为 17:83) 和乙腈-超纯水 (体积比为 17:83) 作为本次实验的流动相, 对比两种不同流动相对分离效果的影响, 结果表明: 乙腈-超纯水 (体积比为 17:83) 作为流动相同样也能让 7 种单糖的衍生化物得到很好的分离, 并没有出现拖尾和峰型不好看等现象 (图 3), 只是在出峰时间上比乙腈-磷酸盐缓冲液

(0.05mol/L, pH 6.9) 作为流动相时稍晚, 但并不影响实验结果。因此, 在保证实验结果完好的前提下, 选择对仪器和柱子不产生损害性影响的乙腈-超纯水 (体积比为 17:83) 作为流动相比较适宜。



注：从左到右依次为：木糖、半乳糖、半乳糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖。

图3 7种单糖-PMP衍生化物质色谱分离图

Fig.3 The chromatograms of seven kinds of monosaccharide-PMP compounds

2.3 DOP 多糖中单糖成分色谱分析

图4为DOP多糖水解、衍生化后，高效液相色谱分析的图，从图4中，可以看到一共得到了3个峰，通过与图3混合标样的比较，可以知道这3个峰分别是D-甘露糖、L(+)-鼠李糖和D-葡萄糖，D-甘露糖占主要部分。图5为外标法制作的这3种单糖的标准曲线图（从左到右依次为D-葡萄糖、L(+)-鼠李糖和D-甘露糖的标准曲线），其中D-甘露糖的线性方程为 $y = 81.79x + 25.66$ ， $R^2 = 0.998$ ；L(+)-鼠李糖的线性方程为 $y = 140.4x - 49.26$ ， $R^2 = 0.996$ ；D-葡萄糖的线性方程为 $y = 77.30x + 17.13$ ， $R^2 = 0.994$ 。通过外标法定量，可以得到DOP多糖中D-甘露糖:L(+)-鼠李糖:D-葡萄糖=1.936:0.856:0.691。

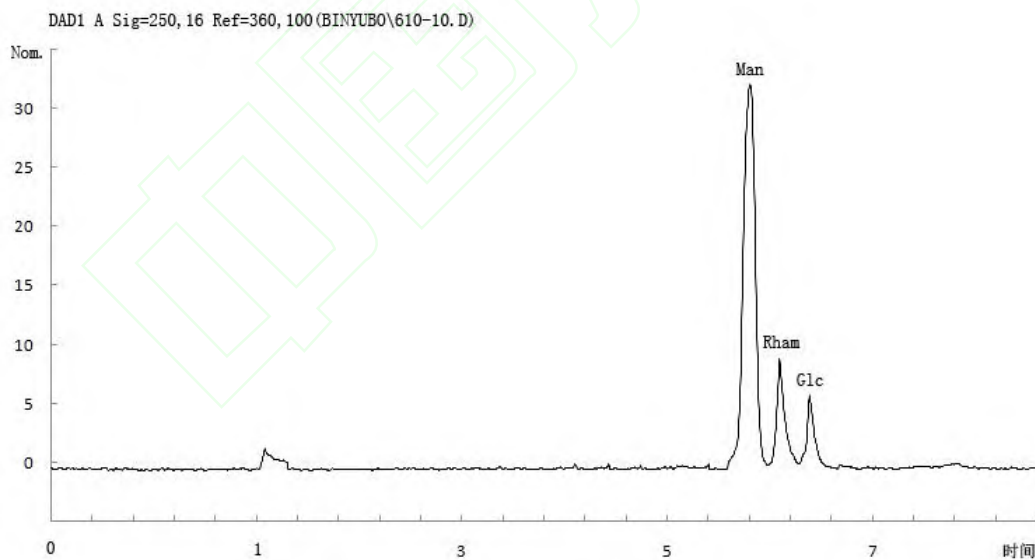
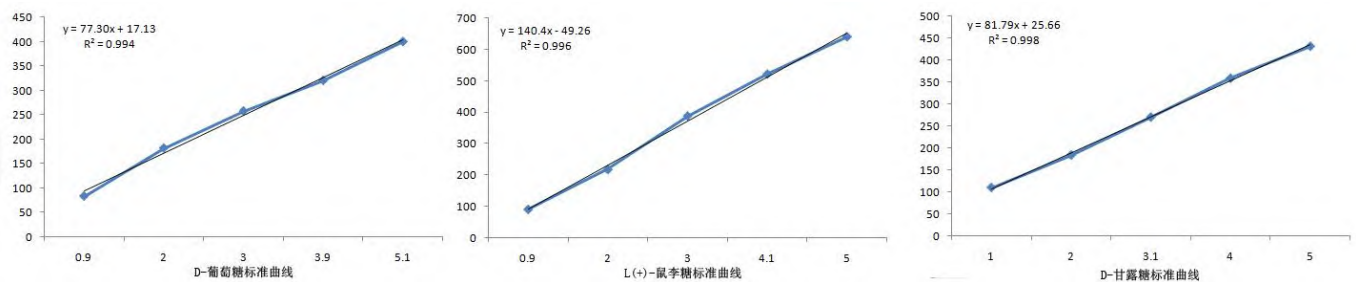


图4 DOP多糖水解后衍生物色谱分离图

Fig.4 Chromatograms of PMP derivatives of acid hydrolyzates of polysaccharide DOP



注：从左到右分别为葡萄糖、鼠李糖和甘露糖的标准曲线图

图 5 D-葡萄糖、L(+)-鼠李糖和 D-甘露糖的标准曲线

Fig.5 The standard curve of D-mannose L(+)-rhamnose D-glucose

2.4 多糖 DOP 清除 DPPH 自由基能力的测定

由图 6 可以看出多糖 DOP 和 Vc 都有着比较强的清除 DPPH 自由基能力, 并且随着浓度的增加, 其清除率也随着增强, 相较而言, Vc 比多糖 DOP 有着更强的清除能力, 在浓度达到 0.3mg/mL 时, 多糖 DOP 的清除率达到了 50% 以上, 说明其能够比较有效的清除 DPPH 自由, 具有较强生理活性。

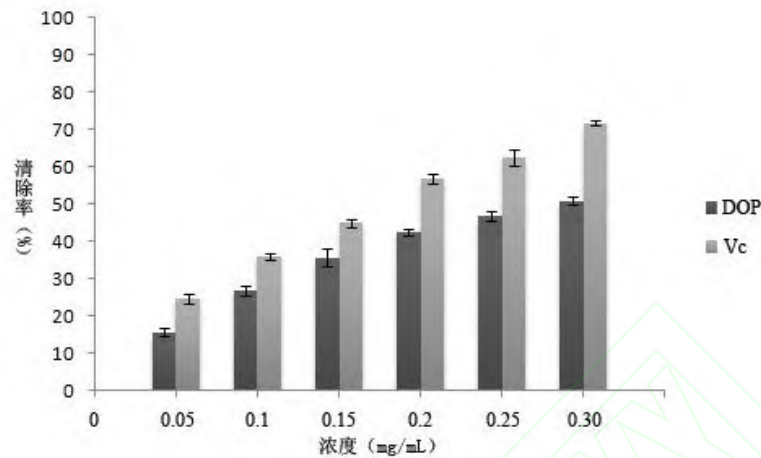


图 6. 多糖 DOP 和 Vc 清除自由基能力的比较

Fig. 6 Comparison of DPPH radical scavenging activity on polysaccharide DOP with vitamin C

3 结论

本实验采用传统的水提醇沉提取多糖的工艺, 得到脱除蛋白质的铁皮石斛多糖, 并通过 DEAE-52 柱分离得到了 4 种多糖组分, 通过 Sephadex G-200 柱纯化得到了纯的铁皮石斛多糖组分 DOP, 建立了 PMP 柱前衍生化高效液相色谱分析单糖的方法, 该方法灵敏度高且准确可靠, 测得多糖 DOP 中含有甘露糖、鼠李糖和葡萄糖 3 种单糖, 并且通过清除 DPPH 自由基试验, 得出其具有良好的清除能力, 说明多糖 DOP 具有良好的抗氧化活性。

参考文献

- [1] 盛家荣,李志华,易艳波. 铁皮石斛多糖的研究进展[J]. 广西科学院学报,2011,27(4):338-340.
- [2] 李玲, 邓晓兰, 赵兴兵, 等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 肿瘤药学, 2011, 1(2): 90-94.
- [3] 柳莲芳. 铁皮石斛的最新研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(11):6426-6428.
- [4] Fu K C , Lian S C , Feng D Q , et al . Application and exploit of *Dendrobium candidum*[J]. Chin Tradit Herb Drugs ,1999 (9) :708-711.
- [5] 陈超琴,蒋丽华,赵黎明. 石斛多糖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012,33(2):442-445.
- [6] 吕圭源,陈素红,张丽丹, 等. 铁皮石斛对小鼠慢性酒精性肝损伤模型血清 2 种转氨酶及胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(6) : 192-193.
- [7] 鲍素华,查学强,郝杰, 等. 不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009,70 (21) :123-127.
- [8] Xiao L,Ng TB, Feng YB, et al. *Dendrobium candidum* extract increases the expression of aquaporin-5 in labial glands from patients with Sjogren's syndrome[J]. Phytomedicine,2011,18:194-198.
- [9] XIA Linjing, LIU Xiaofei, REN Fazheng, et al. Partial characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from the stem of *Dendrobium officinale* in vitro[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4: 294-301.
- [10] LIU Xiaofei, ZHU Jun, REN Fazheng, et al. Orally administered *Dendrobium officinale* and its polysaccharides enhance immune functions in BALB/c mice[J]. Nat Prod Commun, 2011, 6(6): 867-870.
- [11] XU Jun, GUAN Jia, LI Shaoping, et al. Comparison of polysaccharides from different *Dendrobium* using saccharide mapping[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 55: 977-983.
- [12] Wang B. Chemical characterization and Ameliorating effect of polysaccharide from Chinese jujube on intestine oxidative injury by ischemia and reperfusion[J]. Int J Biol Macromol, 2011,48(3):368-391.
- [13] Li J W, Shan L, Liu Y F, et al. Screening of a functional polysaccharide from *Zizyhus Jujuba* cv. Jinsixiaozao and its

- property[J]. *IntJ Biol Macromol*, 2011,49(3):255-259.
- [14] 戴军, 朱松, 汤坚, 等. PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成 [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(2):206-210.
- [15] HUYNH N D, BAO H, OCHIAI Y, et al. Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes*[J]. *Bioresource Technology*, 2010,101(15): 6248-6255..
- [16] 戴军, 尹鸿萍, 陈尚卫, 等. 杜氏盐藻多糖的高效体积排阻色谱保留特性及其分析方法的研究 [J]. *色谱*, 2006,24(6):560-565.
- [17] 陆艳丽, 管毓相, 方玉梅, 等. 千里光黄酮类化合物清除 DPPH 自由基的作用[J]. *食品科技*, 2010,35(3):197-199.

