

# 柱前衍生化高效液相色谱法测定地稔多糖中单糖组成

曾荣香<sup>1\*</sup>, 张清华<sup>2</sup>, 管咏梅<sup>2</sup>, 陈丽华<sup>2</sup>, 温思菁<sup>2</sup>, 卢雪萍<sup>2</sup>

(1. 佛山市中医院, 广东 佛山 528000;

2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**从地稔中提取分离地稔多糖,并对单糖组成进行研究。**方法:**采用水提醇沉法提取地稔粗多糖,再用DEAE纤维素柱色谱进行分离纯化,获得一种水溶性较好的中性多糖和一种酸性多糖,然后采用高效液相柱前衍生法对其单糖组成进行测定。**结果:**地稔中性多糖主要是由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖等5种单糖组成,摩尔比为123:84:27:19:5,另有极少量木糖。地稔酸性多糖单糖组成主要是半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、鼠李糖7种单糖组成,摩尔比为14:10:7:6:4:1:1,另外还有少量的木糖。**结论:**本研究建立了分离及测定地稔多糖组成成分的分析方法,该方法操作简单,方便可行。

**[关键词]** 地稔多糖; 单糖; 衍生化; 高效液相色谱; 等度洗脱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0073-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2015100073

**Analysis of Monosaccharide Composition in Polysaccharides Extract from *Melastoma dodecandrum* by Precolumn Derivatization HPLC** ZENG Rong-xiang<sup>1\*</sup>, ZHANG Qing-hua<sup>2</sup>, GUAN Yong-mei<sup>2</sup>, CHEN Li-hua<sup>2</sup>, WEN Si-jing<sup>2</sup>, LU Xue-ping<sup>2</sup> (1 Department of Pharmacy, Foshan Traditional Chinese Medical Hospital, Foshan 528000, China; 2 Key Laboratory for Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education TCM; Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To extract and separate polysaccharide from *Melastoma dodecandrum* and to analyze the monosaccharide composition. **Method:** The polysaccharide was extracted by the water and precipitated by alcohol, and then separated and purified by DEAE-cellulose column chromatography. Water-soluble neutral polysaccharide and acidic polysaccharide were obtained. The monosaccharide composition of the purified polysaccharides was determined by HPLC method with precolumn derivatization. **Result:** The neutral polysaccharide was consisted of glucose, galactose, mannose, arabinose, and rhamnose, with molar ratio of 123:84:27:19:5, also contained a small amount of xylose. The acidic polysaccharide was consisted of galactose, galacturonic acid, glucose, arabinose, mannose, glucuronic acid, and rhamnose, with molar ratio of 14:10:7:6:4:1:1, also contained a small amount of xylose. **Conclusion:** To develop an analysis method for extracting polysaccharide from *M. dodecandrum* and determining its composition, the method is simple, convenient and feasible.

**[Key words]** *Melastoma dodecandrum* polysaccharides; monosaccharide composition; derivation; HPLC; isocratic elution

地稔根及全草入药,具有解毒消肿、活血止血之效,常用来治疗产后腹痛、血崩、带下、便血、痢疾、痈肿、疮疖。国内对地稔鞣质类化学成分已经有大量的报道,但对地稔多糖的研究较少。多糖是存在于

自然界的醛糖和(或)酮糖通过糖苷键连在一起的多聚物,是一切有生命的有机体必不可缺的成分,具有维持生物机能的作用。实验研究表明<sup>[1]</sup>地稔多糖具有较强的清除自由基作用,并能抑制人红细胞

**[收稿日期]** 20141112(012)

**[基金项目]** 佛山医学科技攻关项目(201208074)

**[通讯作者]** \* 曾荣香, 学士, 副主任中药师, 从事中药制剂研究, Tel:0757-83067752, E-mail:okzrx@163.com

膜脂质过氧化,具有一定的抗衰老、抗溃疡、抗炎症、抗肿瘤、降血糖、降血脂等药理作用。本实验对地稔多糖进行提取、分离纯化,获得一种地稔中性多糖、一种酸性多糖,并对两种多糖进行组成分析,旨在为地稔多糖的药理作用以及临床应用提供数据基础。

## 1 材料

UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津),1260系列高效液相色谱仪(美国安捷伦),KQ3200E型超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司)。

DEAE-Cellulose 52(Whatman进口分装),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP,国药集团化学试剂有限公司);L-阿拉伯糖(批号1506-200001),半乳糖(批号100226-201105),鼠李糖(批号111683-200401),D-甘露糖(批号140651-200602),D-无水葡萄糖(批号110833-201205),葡萄糖醛酸(批号140648-200602),半乳糖醛酸(批号111646-200301)对照品均购自中国食品药品检定研究院;乙腈色谱纯,其他试剂均分分析纯。

地稔药材购于广州至信药业有限公司,经广东食品药品职业学院中药学院段启教授鉴定为野牡丹科地稔 *Melastoma dodecandrum* 的干燥全草。

## 2 方法与结果

### 2.1 粗多糖的提取、分离纯化

**2.1.1 地稔多糖的提取** 称取地稔适量,用95%乙醇浸泡脱脂3次(每次10h)后过滤,残渣用索氏提取器95%乙醇提取,滤去母液,残渣自然干燥。将干燥的地稔原药材残渣用沸水提取2次,每次1h,将每次的提取液合并,过滤,减压浓缩至原溶液的1/5,加入4倍量的95%的乙醇静置9h,离心,取沉淀250mg,用蒸馏水25mL溶解,加入等量的三氯乙酸-正丁醇(1:5)混合液于混和振荡器上混合均匀,4℃下静置0.5h,离心去除沉淀,得上清液。将得到的上清液对流动水透析2d,透析液浓缩至1/3体积,加入于浓缩液4倍的95%乙醇,在常温下静置9h,离心收集沉淀,依次用丙酮、无水乙醇洗涤数次后,加适量蒸馏水溶解,用冷冻干燥法进行脱水,得地稔粗多糖。

**2.1.2 粗多糖的分离纯化**<sup>[2,4]</sup> 称取地稔粗多糖适量溶于5mL双蒸水中,离心(10000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min)。将粗多糖溶液缓缓加入DEAE-纤维素52离子交换柱(2cm×30cm)上,依次用双蒸水、不同浓度NaCl溶液进行梯度洗脱,平均流速0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 10 min收集1管。用苯酚-硫酸法跟踪检测各管多糖含量,然后收集洗脱组分,得到一种水溶较

好的中性多糖和一种酸性多糖。

### 2.2 多糖的测定

**2.2.1 色谱条件** Phenomenex. OOG-4435-E0 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相0.01 mol磷酸缓冲盐(pH 6.7)-乙腈(83:17),柱温30℃,流速1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长254 nm,进样量20 μL。

**2.2.2 单糖衍生物的制备** 称取葡萄糖、木糖、核糖、甘露糖、半乳糖、半乳糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖适量配制成2 g·L<sup>-1</sup>的对照品溶液,分别从中吸取0.3 mL置于10 mL的具塞玻璃试管中,依次加入0.3 mol·L<sup>-1</sup>的PMP甲醇溶液0.3 mL, 0.3 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH溶液0.3 mL,然后涡旋混合2 min,完毕后,在70℃条件下反应60 min,冷却至室温,加入0.3 mol·L<sup>-1</sup>的HCl 0.3 mL进行中和并再加入5 mL三氯甲烷涡旋混匀2 min,静置5 min,弃去下层液。从“加入5 mL三氯甲烷”起再重复操作2次,即得单糖衍生物。

**2.2.3 混合对照品衍生物的制备**<sup>[5-9]</sup> 分别称取葡萄糖、葡萄糖醛酸、甘露糖、半乳糖、半乳糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖对照品5 mg置于10 mL的量瓶中混合,加水溶解,并稀释至刻度,从中取出0.3 mL置于10 mL的具塞玻璃试管中,按照制备单糖衍生物的方法制备,自上述“置10具塞玻璃试管,加0.3 mol·L<sup>-1</sup> NaOH溶液0.3 mL”起操作,所得水相即为混合对照品衍生物。

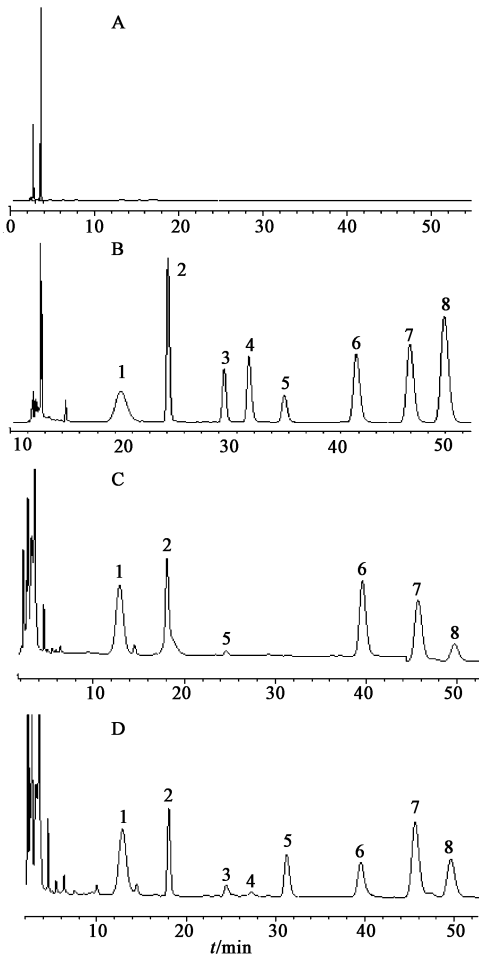
**2.2.4 地稔多糖衍生化样品的制备** 分别称取适量的地稔中性多糖、酸性多糖,加入浓度为1 mol·L<sup>-1</sup>的硫酸5 mL,置于沸水浴中水解8 h,冷却至室温,用2 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH溶液中和至pH 7,冷冻离心(10000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min),取上清液,即得地稔多糖水解液。分别吸取水解液0.3 mL,按对照品衍生物制备方法,自上述“置10 mL具塞玻璃管,加0.3 mol·L<sup>-1</sup> NaOH溶液0.3 mL”起操作,所得水相即为地稔多糖衍生物。

**2.2.5 空白样品的制备** 取水1 mL,按供地稔多糖衍生化样品的制备方法进行操作,即得空白样品溶液。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性** 取混合单糖衍生物、地稔中性多糖衍生物、地稔酸性多糖衍生物、空白样品,在2.2.1项的色谱条件下进样20 μL,记录色谱图,色谱图显示中性多糖衍生物样品出现的5个主峰、地稔酸性多糖衍生物样品7个主峰与单糖对照品衍生物溶液主峰的保留时间一致,空白溶液在甘露糖衍生物、

鼠李糖衍生物、半乳糖醛酸衍生物、葡萄糖衍生物、半乳糖衍生物、阿拉伯糖衍生物主峰位置没有其他杂质峰,说明 PMP 衍生法不干扰单糖成分的测定。见图 1。



A. 空白样品;B. 单糖对照品;C. 中性多糖;D. 酸性多糖;1. PMP;2. 甘露糖;3. 鼠李糖;4. 葡萄糖醛酸;5. 半乳糖醛酸;6. 葡萄糖;7. 半乳糖;8. 阿拉伯糖

图 1 地稔多糖 PMP 衍生物 HPLC

Fig.1 HPLC separation of the PMP derivatives of Polysaccharide from *Melastoma dodecandrum*

**2.3.2 标准曲线的绘制** 精确吸取 2.2.3 项下制得的混合对照品衍生物 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10 mL 置于 100 mL 的量瓶中, 双蒸水定容, 配成一系列不同浓度单糖混合衍生物, 在 2.2.1 项色谱条件下进样 20  $\mu$ L, 记录色谱图, 根据峰面积与对照品的浓度进行线性回归, 结果见表 1。

**2.3.3 精密度** 将混合对照品衍生化溶液, 分别进样 20  $\mu$ L, 连续进样 6 次, 计算 7 个对照品峰面积, 结果甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积 RSD 分别为 1.7%, 1.2%, 0.9%, 1.0%, 1.7%, 1.4%, 1.8%。相同的

表 1 7 种单糖的线性范围

Table 1 Linear range of seven monosaccharides

单糖	相关系数	标准曲线	线性范围/ $\mu$ g
甘露糖	0.999 8	$Y = 168.77X + 9.09$	0.406 ~ 40.608
鼠李糖	0.999 9	$Y = 120.30X + 5.85$	0.404 ~ 40.400
葡萄糖醛酸	0.999 8	$Y = 86.14X - 1.74$	0.417 ~ 40.170
半乳糖醛酸	0.999 9	$Y = 73.24X + 2.01$	0.416 ~ 41.560
葡萄糖	0.999 8	$Y = 104.45X + 3.66$	0.428 ~ 42.840
半乳糖	0.999 6	$Y = 157.76X + 15.29$	0.416 ~ 41.600
阿拉伯糖	0.999 8	$Y = 198.30X + 3.03$	0.402 ~ 40.240

对照品连续进样 2 d, 计算 7 个对照品峰面积 RSD 分别为 1.0%, 0.8%, 1.5%, 0.2%, 0.9%, 0.2%, 0.7%。结果表明仪器精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 分别取同一批地稔样品制备的中性多糖、酸性多糖按 2.2.4 项下方法衍生化后在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别进样, 记录峰面积, 结果地稔中性多糖中的甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积 RSD 分别为 1.1%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.8%。地稔酸性多糖中的甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积 RSD 分别为 1.9%, 0.8%, 1.0%, 1.6%, 1.0%, 0.5%, 1.1%。

**2.3.5 重复性试验** 分别精密称取 6 份中性多糖、酸性多糖样品按 2.2.4 项下方法衍生化后进样, 6 份中性多糖样品中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.7%, 0.5%, 0.9%, 0.9%。地稔酸性多糖样品中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.3%, 1.0%, 1.2%, 0.7%, 0.3%, 0.9%。

**2.3.6 回收率试验** 分别称取同一批地稔样品制备的中性多糖、酸性多糖样品 6 份, 各加入适量的单糖对照溶液, 按照 2.2.4 项方法衍生化后进行测定, 计算其回收率, 结果见表 2, 3。

**2.3.7 结果分析** 将混合单糖对照品图谱与 4 种多糖的图谱对照, 可以确定地稔中性多糖主要是由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖等 5 种单糖组成, 另有极少量的木糖, 根据标准曲线可以计算出各单糖之间的摩尔比为 123: 84: 27: 19: 5; 地稔酸性多糖主要是由半乳糖、甘露糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、阿拉伯糖、鼠李糖等 7 种单糖组成, 摩尔比为 14: 10: 7: 6: 4: 1: 1, 另外还有少量的木糖。

表 2 地稔中性多糖加样回收率 (n=6)

Table 2 Recovery of neutral polysaccharide from *Melastoma dodecandrum* (n=6)

成分	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	RSD /%
甘露糖	88.92	90	175.21	95.88	1.0
鼠李糖	15.05	15	30.63	103.87	0.9
葡萄糖	406.08	400	808.43	100.59	0.4
半乳糖	278.31	280	548.77	96.59	0.8
阿拉伯糖	52.73	52	105.42	101.32	0.7

表 3 地稔酸性多糖加样回收率 (n=6)

Table 3 Recovery of acidic polysaccharide from *Melastoma dodecandrum* (n=6)

成分	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	RSD /%
甘露糖	82.93	80	161.42	98.11	0.9
鼠李糖	17.78	18	35.32	97.44	1.0
葡萄糖醛酸	23.01	23	47.13	104.87	0.6
半乳糖醛酸	223.92	220	448.72	102.18	1.2
葡萄糖	151.27	150	304.23	101.97	1.4
半乳糖	307.40	300	603.45	98.68	0.5
阿拉伯糖	108.57	105	209.78	96.39	1.1

### 3 结论与讨论

**3.1 分离纯化** 本实验采用 DEAE 纤维素 52 对地稔多糖分离纯化效果是切实可行的,分离出一种地稔中性多糖和一种地稔酸性多糖,经测定最大上样量为柱色谱体积的 10% 左右。

**3.2 色谱条件选择** 本实验比较乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.01 mol 磷酸缓 (pH 6.7)、乙腈-0.01 mol 缓冲盐 (pH 6.7) 4 种流动相系统,最后发现乙腈-0.01 mol 磷酸缓冲盐 (pH 6.7) 能较好分离地稔多糖中各单糖。

**3.3 衍生化条件选择** PMP 与糖类物质衍生时反应条件温和,操作简单,产物无立体异构,紫外检测灵敏度较高。实验中发现 PMP 与多糖水解液体积按 1:1 时,PMP 的浓度应不大于 0.3 mol·L<sup>-1</sup>,否则衍生化的时候 PMP 容易析出,进而影响多糖组成

分析。

**3.4 PMP 衍生法与其他方法比较** 测定多糖中单糖的组成方法有多种,其中高效阴离子交换色谱安培检测法虽不需要样品衍生化,操作简单灵敏度高,但使用较高 pH 溶液淋洗,需要专用设备,价格较昂贵柱后收集操作困难。气相色谱法测定快速灵敏度高衍生化反应操作非常麻烦且容易产生异构体,误差较大。本实验所采用的 PMP 柱前衍生法,分离速度快、分辨率高、分离效果好、重复性好且操作起来比较方便,适合于糖类物质的单糖组成分析。

#### [参考文献]

- [1] 张超,姚惠珍,徐兰琴,等.地稔多糖 MD1 清除活性氧自由基及对人红细胞膜脂质过氧化作用影响的研究[J].广州医学院学报,2002,30(4):18.
- [2] 王蕾,于荣敏,张辉,等.人工培养蛹虫草多糖的分离纯化及其结构的初步研究[J].中国生化药物杂志,2003,24(1):23-24.
- [3] 戚勃,杨贤庆,赵永强,等.改良 DEAE-纤维素法制备龙须菜琼胶糖研究[J].食品科学,2009,30(24):118-121.
- [4] 李敏晶,毛婕昕,付荣香,等.DEAE-纤维素分离提纯海带硫酸多糖的研究[J].广东化工,2010,9(37):30-31.
- [5] 凌云,王玉峰,王莹,等.虫草多糖中单糖组成的柱前衍生化 HPLC 分析[J].中国医药工业杂志,2008,39(12):924-926.
- [6] 周卫军,徐继华,钱一帆,等.灵芝孢子多糖两纯组分的单糖组成研究[J].中国新药杂志,2007,16(8):622-623.
- [7] 宝炉丹,徐国防,马郑,等.柱前衍生化 HPLC 分析白花蛇舌草多糖中单糖组成[J].中成药,2008,30(3):406-408.
- [8] 郭怀忠,陈春英,赵焕荣,等.毛细管区带电泳法测定黄精和玉竹多糖的含量及其单糖组成[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):54-57.
- [9] 马耀宏,郑岚,杨俊慧,等.柱前衍生化 HPLC 法分析真菌多糖的单糖组成[J].食品科技,2012,37(12):254-259.

[责任编辑 顾雪竹]