

## 五倍子多糖相对分子质量和单糖组成的测定

龚力民, 刘伟, 卓海燕, 张红刚, 李森, 何琴, 林丽美\*, 李顺祥\*  
(湖南中医药大学, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:研究五倍子多糖精细组分的相对分子质量、单糖组成。方法:五倍子多糖经提取纯化后得到GCP-1, GCP-2和GCP-3 3种精细组分。用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)分析其相对分子质量;采用三氟乙酸(TFA)水解和1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)柱前衍生化的高效液相色谱(HPLC)分析其单糖组成。结果:HPGPC试验结果显示,GCP-1, GCP-2, GCP-3的相对分子质量分别为 $182.2.1 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ;单糖组成试验表明,GCP-2和GCP-3的单糖组成类型基本一致,主要为半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸等。结论:用HPGPC和PMP柱前衍生法测得五倍子多糖精细组分的相对分子质量和单糖组成,方法简便可行,可用于五倍子多糖的研究。

**[关键词]** 五倍子多糖; 相对分子质量; 单糖组成; 高效凝胶渗透色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0034-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240034

### Molecular Weight and Monosaccharide Components in Polysaccharides from *Galla Chinensis*

GONG Li-min, LIU Wei, ZHUO Hai-yan, ZHANG Hong-gang, LI Sen, HE Qin, LIN Li-mei\*, LI Shun-xiang\*  
(School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the relative molecular weight and monosaccharide components in polysaccharides from *Galla Chinensis* (GCP). **Method:** Three fine compositions, GCP-1, GCP-2 and GCP-3 were obtained after extracting and purification of GCP. High performance gel permeation chromatography (HPGPC) was used to analyze the average molecular weight; high performance liquid chromatography (HPLC) of trifluoroacetic acid (TFA) hydrolysis and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization was used to analyze its monosaccharide components. **Result:** According to HPGPC, the molecule weights were 182,  $2.1 \times 10^4$  and  $6 \times 10^4$ , respectively for GCP-1, GCP-2 and GCP-3. The test of monosaccharide components showed that monosaccharide components of GCP-2 and GCP-3 were basically the same, mainly as galactose, galacturonic acid and glucuronic acid, etc. **Conclusion:** The two methods of HPGPC and PMP pre-column derivatization to determine the fine compositions of GCP are simple and convenient and could be applied to analysis of the molecular weight and monosaccharide composition in GCP.

**[Key words]** polysaccharides from *Galla Chinensis*; relative molecular weight; monosaccharide components; HPGPC

五倍子别名文蛤、百虫仓、木附子等<sup>[1]</sup>。作为传统中药始载于《开宝本草》,宋代《太平广记》、《图经本草》以及明代《本草纲目》中也有五倍子及其用

途的记载<sup>[2]</sup>。五倍子由于具有敛肺降火、涩肠止泻、敛汗止血等多种功效,逐渐受到研究者的重视。在糖类生物化学日趋成熟的今天,多糖功能和

**[收稿日期]** 20150615(003)

**[基金项目]** 湖南省“十二五”药学重点学科支持实验室开放研究项目(科函[2015]9号-2);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2013173);长沙市科技局课题(K1301005-31);国家中医药管理局“药用物理学”重点学科;湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目(ZYFT201310)

**[第一作者]** 龚力民, 硕士, 讲师, 从事中药资源与质量研究, Tel:0731-88458234, E-mail:5065451@qq.com

**[通讯作者]** \*林丽美, 博士, 副教授, 硕导, 从事中药药效物质基础及质量标准化研究, Tel:0731-88458232, E-mail:lizasmile@163.com;

\*李顺祥, 博士, 二级教授, 博导, 从事中药化学与资源研究, Tel:0731-88459421, E-mail:lishunxg@yahoo.com.cn

结构方面的研究进展十分迅速。多糖在抗凝血、抗炎、降血糖、抗肿瘤、抗病毒、免疫、抗衰老等各方面表现出卓越的生物活性作用。目前关于五倍子多糖方面的研究非常少见。笔者采用水提法得到五倍子多糖,并通过 HPGPC, HPLC 对五倍子多糖精细组分的相对分子质量、单糖组成等进行了研究,对进一步探讨五倍子多糖的药理作用,以及五倍子的综合开发利用具有重要的意义。

### 1 仪器与试剂

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), LC-2010 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), LGJ-12 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。药材五倍子采自于湖南省张家界市永定区大坪镇余家山,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* 叶上的虫瘿。

### 2 方法与结果

**2.1 五倍子粗多糖提取与纯化<sup>[3]</sup>** 取五倍子 100 g,加入适量水浸泡 2 h,超声振荡提取 1 h,离心。滤液于 60 °C 水浴减压浓缩至 100 mL,加入 3 倍量的 95% 乙醇进行醇沉,4 °C 静置过夜,离心取沉淀,Sevag 法除蛋白,复醇沉,沉淀经无水乙醇、丙酮、乙醚反复洗涤,干燥得到五倍子粗多糖。再经过 DEAE-52 纤维素柱和交联葡聚糖凝胶 G-75 进一步色谱纯化,收集水洗脱成分,0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱成分和 0.3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱成分,透析,冷冻干燥后分别命名为 GCP-1, GCP-2 和 GCP-3。

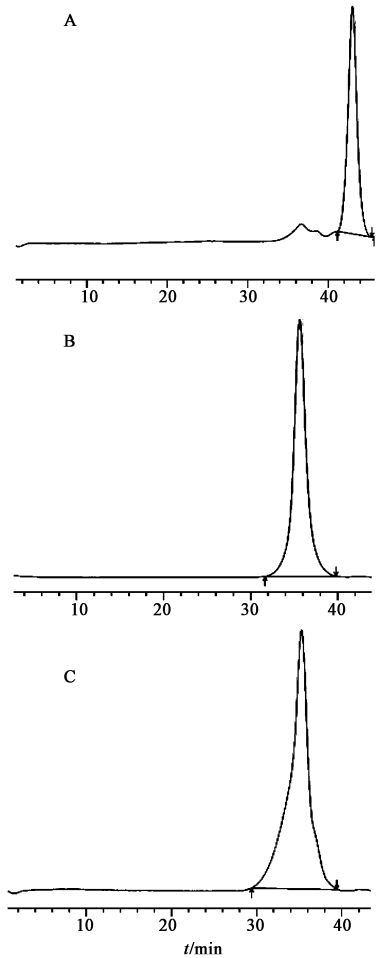
**2.2 五倍子多糖精细组分的相对分子质量<sup>[4-5]</sup>**

**2.2.1 HPGPC 色谱条件** Shodex SB 802, 805 凝胶色谱柱串联(7.8 mm×300 mm),流动相 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> 溶液,柱温 30 °C,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 50 μL。

**2.2.2 HPGPC 校正曲线的建立** 分别取相对分子质量为 8.05×10<sup>5</sup>, 3.93×10<sup>5</sup>, 2.1×10<sup>5</sup>, 4.88×10<sup>4</sup>, 2.17×10<sup>4</sup>, 6×10<sup>3</sup>, 0.18×10<sup>3</sup> 的系列葡聚糖对照品,用流动相溶解制成约 2 mol·L<sup>-1</sup> 的溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进行 HPGPC 分析。以对照品的出峰时间为横坐标,相对分子质量对数为纵坐标,得到出峰时间与相对分子质量对数值之间的相对分子质量校正曲线  $Y=0.002X^3-0.219X^2+7.574X-78.612$  ( $r=0.9976$ )。

**2.2.3 样品分析** 取 GCP-1, GCP-2 和 GCP-3 各适量,用流动相溶解制成 2 mol·L<sup>-1</sup> 的溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进行 HPGPC 分析。根据样品的出峰时间在校正曲线上求得多糖峰的平均重均

相对分子质量。HPGPC 见图 1。



A. GCP-1; B. GCP-2; C. GCP-3

图 1 五倍子多糖的 HPGPC

Fig. 1 HPGPC chromatogram of polysaccharides from *Galla Chinensis*

**2.2.4 五倍子多糖的 HPGPC 分析** GCP-1, GCP-2, GCP-3 3 种组分的出峰时间分别是 43.045, 35.62, 35.276 min,由标准曲线计算得到其相对分子质量分别为 182, 2.1×10<sup>4</sup>, 6×10<sup>4</sup>。由此推断, GCP-1 应为相对分子质量较小的寡糖类成分,在多糖试验中不予研究。GCP-2, GCP-3 为相对分子质量较大的多糖,且纯度 >90%。

### 2.3 五倍子多糖精细组分的单糖组成

**2.3.1 多糖的衍生水解<sup>[6-8]</sup>** 分别精密称定 GCP-2, GCP-3, 配成约 5 g·L<sup>-1</sup> 的溶液,精密量取 1 mL 置安瓿瓶中,加三氟乙酸 1 mL 封管,100 °C 水解 2 h。反应液转移至圆底烧瓶内,加入甲醇 10 mL,减压浓缩,浓缩至近干时再加入少量甲醇,反复多次,最后 1 次旋蒸至干。样品低温烘干后,残渣精密加水 1 mL 溶解,量取 50 μL,置 10 mL 离心管中,加 0.6

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 50  $\mu\text{L}$ ,混匀,再加 PMP 甲醇溶液 100  $\mu\text{L}$ ,混匀,60  $^{\circ}\text{C}$  水浴放置 100 min;冷却至室温,加 0.3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸 100  $\mu\text{L}$  中和,加水至 2 mL,混匀,再加等体积的三氯甲烷,涡旋均匀,离心,弃去三氯甲烷,重复 3 次。取水相过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,即得供试品溶液。

**2.3.2 单糖对照品的衍生水解** 取 105  $^{\circ}\text{C}$  干燥至恒重的甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释制成分别含 0.9  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,精密量取 25  $\mu\text{L}$ ,按 2.3.1 项下方法处理进行衍生。

**2.3.3 色谱条件** ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17),流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 250 nm,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.3.4 五倍子多糖精细组分的 HPLC 分析** GCP-2, GCP-3 经柱前衍生水解后用 HPLC 分析,其单糖组

成见图 2,与对照品图谱进行比较,表明 GCP-2 和 GCP-3 的单糖组成类型基本一致,主要为半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖。

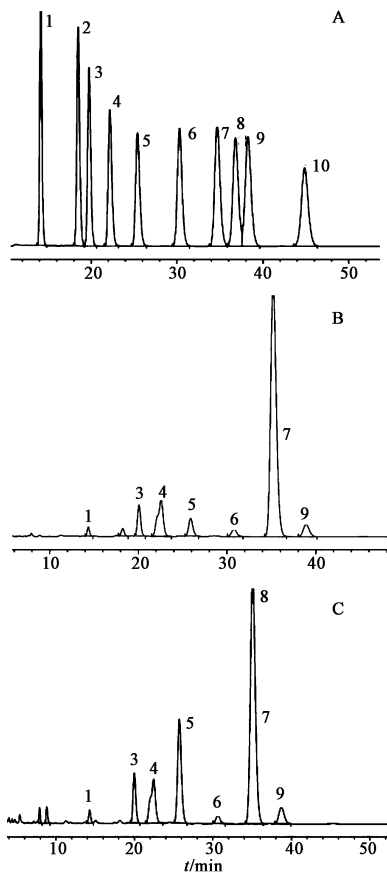
### 3 讨论

HPGPC 试验中,测得 GCP-1, GCP-2, GCP-3 3 种组分的相对分子质量分别为 182,  $2.1 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ 。色谱结果表明, GCP-1 可能为分子量较小的寡糖类。单糖组成试验表明, GCP-2 和 GCP-3 的单糖组成类型基本一致,主要为半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸等,且各峰的峰面积大小也较为相似,推断这两种成分可能有进一步关联,可采用更精密的仪器和手段进行分析论证。

为了以不同方法验证本方法的结果,笔者同时采用盐酸水解醋酐衍生法对已除蛋白的五倍子粗多糖进行了 GC-MS 分析<sup>[9]</sup>,初步确定单糖组成为葡萄糖、阿拉伯糖和肌醇。其结果与 PMP 柱前衍生法基本一致。这为后续的推测化学结构,进行进一步的研究与开发奠定了实验基础。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:62.
- [2] 李秀萍, 李春远, 渠桂荣, 等. 五倍子的研究概况[J]. 中医药学报, 2002, 30(3):72-74.
- [3] 陈占科, 王淑美, 高珊, 等. 制何首乌多糖的脱蛋白研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):41-43.
- [4] Rodriguez H J, Vanderwieles A J. Molecular weight determination of commercial heparin sodium USP and its sterile solutions [J]. J Pharm Sci, 1979, 68(5):588-591.
- [5] 许杜娟, 夏泉, 刘钢, 等. 高效液相法测定黄芪中性多糖的单糖组成[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(9):4-6.
- [6] 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.
- [7] Daotian F, Roger A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1995, 227(7):377-384.
- [8] 马定远, 陈君, 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, 2002, 30(6):702-705.
- [9] 姚丹, 王宏军, 杨嘉玉, 等. 毛细管 GC 法测定南五味子多糖的单糖组成[J]. 中国药房, 2012, 23(23):2158-2160.



A. 对照品; B. GCP-2; C. GCP-3; 1. 甘露糖; 2. 核糖; 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. 木糖; 9. 阿拉伯糖; 10. 岩藻糖

图2 五倍子多糖的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatogram of polysaccharide from *Galla chinensis*

[责任编辑 顾雪竹]