

柱前衍生化高效液相色谱分析云南松松塔多糖的单糖组成

张海珠, 史志婷, 王莹, 刘熙, 周萍*

(大理大学 药学与化学学院, 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的:测定云南松松塔多糖中单糖组成及含量。方法:采用三氟乙酸(TFA)水解松塔多糖,1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)衍生化水解单糖产物,用高效液相色谱法测定松塔多糖的单糖组成;采用正交试验考察水解条件,比较了不同衍生反应时间和加入不同量NaOH时单糖衍生物的峰面积大小变化,从而确定最佳水解条件和最佳衍生化条件。结果:松塔多糖由甘露糖(Man),鼠李糖(Rham),葡萄糖醛酸(GlcUA),半乳糖醛酸(GalUA),葡萄糖(Glc),半乳糖(Gal),木糖(Xyl),阿拉伯糖(Arab),岩藻糖(Fuc)组成,其含量比为1.10:0.04:0.63:0.14:1.00:1.11:1.80:0.60:0.09。最优水解条件为TFA浓度 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,水解温度 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$,水解时间6h。衍生化过程中加入 $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH,衍生时间为40min。结论:该方法简单、快速、灵敏,为云南松松塔多糖中单糖的测定提供了一种可靠方法。

[关键词] 松塔多糖; 高效液相色谱法; 柱前衍生化; 正交试验

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0030-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240030

Analysis of Monosaccharide Compositions in Polysaccharides from *Pinus yunnanensis* Cone by Pre-column Derivatization HPLC ZHANG Hai-zhu, SHI Zhi-ting, WANG Ying, LIU Xi, ZHOU Ping* (College of Pharmacy and Chemistry, Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the monosaccharide compositions and their contents in polysaccharides from *Pinus yunnanensis* cone. **Method:** Trifluoroacetic acid was used to hydrolyze polysaccharide from *P. yunnanensis* cone and PMP derivatization was used to hydrolyze monosaccharide products. The monosaccharide compositions in polysaccharide from *P. yunnanensis* cone were determined by HPLC. Orthogonal test was conducted to investigate the hydrolyzing conditions design; changes in size of the peak area of monosaccharide derivants derived from different reaction time and the amount of NaOH were compared to determine the optimum hydrolysis condition and the best derivatization condition. **Result:** The polysaccharides from *P. yunnanensis* cone were composed of mannose (Man), rhamnose (Rham), glucuronic acid (GlcUA), galacturonic acid (GalUA), glucose (Glc) and galactose (Gal), xylose (Xyl), arabian sugar (Arab), and fucose (Fuc), with content ratios of 1.10:0.04:0.63:0.14:1.00:1.11:1.80:0.60:0.09. The optimal hydrolysis condition: concentration of TFA $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, hydrolysis temperature $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, hydrolysis time 6 h. The optimal derivatization condition: add $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH in derivatization process, with a derivatization period of 40 min. **Conclusion:** The method is quick, simple with high sensitivity. It is a reliable method for the determination of the monosaccharide compositions in polysaccharides from *P. yunnanensis*.

[Key words] polysaccharides of *Pinus yunnanensis* cone; HPLC; pre-column derivatization; orthogonal test

《本草纲目》记载了松塔具有祛痰、止咳平喘、祛风、润肠、安神等功效。松塔含有多种具有药理活

[收稿日期] 20150306(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81450053;81260632);云南省教育厅科学研究基金重点项目(2014Z132)

[第一作者] 张海珠, 硕士, 副教授, 从事中药及天然药物质量控制研究, Tel:0872-2257417, E-mail: hzningjing@163.com

[通讯作者] *周萍, 硕士, 教授, 从事药物代谢研究, Tel:0872-2257417, E-mail: zhouping725@126.com

性的成分,作为药物可以治疗风湿病,还具有抗感染、抗菌、抗病毒等功效。课题组前期研究发现云南松塔提取物具有抗 HIV 的活性^[1],该提取物无毒^[2],并测定了云南松塔的多糖含量^[3],但对其多糖中单糖含量和组成未见报道,松塔多糖的单糖组成是分析其物质基础和构效关系的一项重要内容。因此,本研究参照文献[4-8],选取 1-苯基-3 甲基-5-吡啶啉酮(PMP)作为柱前衍生化试剂,通过对水解条件和衍生化条件的考察以及色谱条件的选取,建立云南松塔多糖中单糖的测定方法,并分析其组成和含量,为下一步研究提供依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(包括 G1313A ALS 自动进样器,G1315A/B DAD 检测器,美国 Agilent 公司)。

单糖对照品:甘露糖(Mannose,批号 AA0416LA115,上海源叶生物科技有限公司),半乳糖(Gal,批号 100326-201105),半乳糖醛酸(GalUA,批号 11646-200301),阿拉伯糖(Arab,批号 1506-200001),鼠李糖(Rham,批号 11683-200401),葡萄糖醛酸(GlcUA,批号 140648-200602)均购自中国食品药品检定研究院;木糖(Xyl),葡萄糖(Glc,批号 GZDD-0114),岩藻糖(Fuc,批号 GZDD-0233)均购于贵州迪大生物科技有限责任公司,纯度均 >99%;PMP,三氟乙酸(TFA),磷酸二氢钠,磷酸氢二钠均系国药集团试剂有限公司产品。乙腈为色谱纯,水为市售娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

云南松塔样品采自云南省大理市巍山县,由大理学院药用植物学教研室周浓副教授鉴定为云南松 *Pinus yunnanensis* 的球果。

2 方法与结果

2.1 混合单糖对照品的衍生 分别精密称取各单糖对照品 4 mg 置 2 mL 量瓶中,加水溶解混匀,定容得 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合单糖对照品储备液,进一步稀释成 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。精密量取稀释后的混合对照品溶液 200 μL ,加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 100 μL ,混匀,加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP 甲醇溶液 100 μL ,涡旋混匀 30 s。 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴反应 40 min,取出室温放置 10 min,再加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 100 μL 中和。精密加入三氯甲烷 400 μL ,涡旋 3 min,离心 5 min,小心弃去有机层(下层),重复 3 次。取上清液定容至 1 mL,即得。混合单糖对照品衍生物的 HPLC 色谱见图 1。

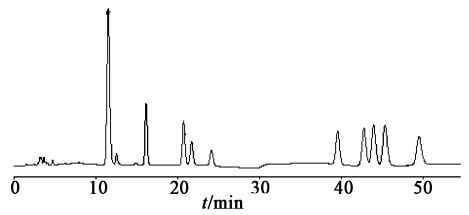


图 1 混合对照品的单糖衍生物的 HPLC

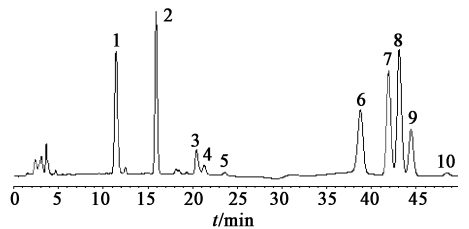
Fig. 1 Hybrid reference substance of monosaccharide derivatives of HPLC

2.2 云南松塔多糖样品

2.2.1 松塔多糖的提取 将松塔粗粉 10 kg 用 85% 乙醇 4 000 mL 浸泡提取 2 次,每次浸泡 24 h。过滤,向残渣中加 1% NaOH 浸泡提取 1 次,过滤得到碱性提取液。用乙酸调所得碱性提取液的 pH 至 5,浓缩、过滤,去除沉淀。滤液加 5 倍量乙醇,得沉淀,制成冻干粉备用。

2.2.2 多糖的水解 精密称取松塔多糖 0.400 g 置于 2 mL 量瓶中,溶解并定容。精密吸取 100 μL 置于安瓿瓶中,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TFA 2 mL, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水解 6 h,冷却至室温,以 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调 pH 7.0,以纯化水稀释并定容至 5 mL,过滤,取续滤液待衍生化。

2.2.3 样品的衍生化 将水解后的松塔多糖按 2.1 项下的方法进行衍生化处理。云南松塔多糖衍生物的 HPLC 色谱见图 2。



1. PMP; 2. Man; 3. Rham; 4. GlcUA; 5. GalUA; 6. GLC; 7. Gal; 8. Xyl; 9. Arab; 10. Fuc

图 2 云南松塔多糖的单糖衍生物的 HPLC

Fig. 2 Polysaccharides of *Pinus yunnanensis* of monosaccharide derivatives of HPLC

2.3 HPLC 色谱条件 Phenomenex Gemini 5u C_{18} 110A 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈- $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 6.7)(19:81),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 250 nm,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 10 μL 。

2.4 线性关系考察 取混合对照品储备液,分别配制成质量浓度为 0.005,0.01,0.02,0.05,0.1,0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液,按 2.1 项下方法进行衍生化处

理,分别进样 10 μL 进行测定。以进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线。9 种单糖的回归方程见表 1。

表 1 9 种单糖的标准曲线

Table 1 Nine kinds of monosaccharide standard curve

单糖	标准曲线	线性范围/ μg	r
Man	$Y = 7\ 441.6X - 60.893$	0.051 2 ~ 2.048 1	0.999 4
Rham	$Y = 5\ 231.1X - 11.471$	0.050 4 ~ 2.017 9	0.999 3
GlcUA	$Y = 5\ 245.2X - 19.069$	0.050 1 ~ 2.003 5	0.999 5
GalUA	$Y = 5\ 326.7X - 7.240$	0.050 2 ~ 2.009 1	0.999 0
Glc	$Y = 5\ 547.9X - 36.735$	0.050 0 ~ 2.001 3	0.999 3
Gal	$Y = 7\ 801.4X - 89.092$	0.050 1 ~ 2.004 2	0.999 5
Xyl	$Y = 8\ 907.1X - 99.921$	0.050 2 ~ 2.011 2	0.999 3
Arab	$Y = 9\ 277.0X - 46.711$	0.050 3 ~ 2.010 6	0.999 4
Fuc	$Y = 6\ 456.7X - 47.807$	0.050 2 ~ 2.008 6	0.999 3

2.5 精密度 将衍生化后的松塔多糖样品溶液连续进样 6 次,9 种单糖含量 RSD 均 $< 3\%$,表明精密度符合要求,结果见表 2。

表 2 9 种单糖方法学考察

Table 2 Nine kinds monosa-ccharide results of methodology %

单糖	精密度 RSD	重复性 RSD	稳定性 RSD
Man	0.3	1.4	0.4
Rham	1.6	2.4	2.6
GlcUA	1.0	1.9	2.7
GalUA	1.9	2.1	1.8
Glc	0.4	2.1	0.3
Gal	0.2	1.1	0.3
Xyl	0.3	1.5	0.5
Arab	0.3	0.9	0.2
Fuc	0.7	1.8	1.0

2.6 重复性 精密称取等量 6 份松塔多糖样品,经过水解后按 2.1 项下衍生化后进样,各单糖含量的 RSD $< 3\%$,表明重复性符合要求,结果见表 2。

2.7 稳定性 将衍生化后的松塔多糖样品溶液在 0,2,4,6,8,12 h 分别进样,各单糖含量的 RSD $< 3\%$,表明衍生化样品在 12 h 内稳定,结果见表 2。

2.8 加样回收率 精密称取松塔多糖样品 0.2 g,各加入 9 种单糖对照品适量,按 2.2.2 和 2.1 项下方法进行水解和衍生化后进样测定,计算各单糖的加样回收率及 RSD,结果见表 3。

2.9 云南松松塔多糖的单糖组成 由 HPLC 分析

表 3 9 种单糖的加样回收率 ($n = 6$)

Table 3 Recovery rate of nine kinds of monosaccharide sample ($n = 6$)

单糖	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率/%	RSD /%
Man	4.000	4.09	8.131	101.0	0.7
Rham	0.130	1.98	1.936	91.2	2.9
GlcUA	2.280	3.92	6.063	96.5	2.6
GalUA	4.900	4.10	8.889	97.3	2.5
Glc	3.629	4.03	7.591	98.3	1.8
Gal	4.039	4.07	8.117	100.2	1.0
Xyl	6.533	4.11	10.668	100.6	0.9
Arab	2.186	2.12	4.327	101.0	0.5
Fuc	0.340	2.04	2.376	99.8	1.2

和进样量计算结果可知,云南松松塔多糖由 Man, Rham, GlcUA, GalUA, Glc, Gal, Xyl, Arab, Fuc 9 种单糖组成,组成比为 1.10:0.04:0.63:0.14:1.00:1.11:1.80:0.60:0.09。

3 结论与讨论

3.1 云南松松塔多糖的 TFA 部分水解条件对 PMP-HPLC 分析的影响 影响云南松松塔多糖部分酸水解的水解程度及后续 PMP-HPLC 分析的因素很多,如水解温度、水解时间及 TFA 浓度。针对这些因素,我们选定共有特征峰的峰面积和作为试验指标,采用三因素三水平的正交试验确定松塔多糖部分酸水解的最佳反应条件,结果见表 4,5。

表 4 TFA 部分酸水解正交试验分析

Table 4 Orthogonal experiment results of TFA acid hydrolysis

试验号	TFA 浓度 / $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	水解温度 / $^{\circ}\text{C}$	水解时间 /h	共有特征峰峰面积和
1	0.5	90	4	18 268
2	0.5	100	4	24 878
3	0.5	110	8	20 338
4	1	90	6	21 327
5	1	100	8	22 741
6	1	110	4	22 502
7	2	90	8	20 728
8	2	100	4	24 161
9	2	110	6	19 288

由直观分析可知,水解温度影响最大,其次是 TFA 浓度,水解时间的影响最小。本次正交试验得到的理论上的最佳工艺为 TFA 浓度 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,水解温度 $100\ ^{\circ}\text{C}$ 和水解时间 6 h。

表 5 正交试验方差分析

Table 5 Anova table of orthogonal

方差来源	SS	F	P
TFA 浓度	1 747 788	0.163	>0.05
水解温度	25 297 997	2.352	>0.05
水解时间	491 312	0.046	>0.05
误差	10 754 342		

注： $F_{0.05(2,2)} = 19$ 。

3.2 衍生化条件的选择

3.2.1 NaOH 浓度的影响 9 个单糖用不同浓度 NaOH 衍生。与 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 衍生相比,采用 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 衍生,9 个单糖的衍生物峰面积之和最大,故选择加入 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH。

3.2.2 反应时间 考察了衍生化时间的影响,70 °C 水浴下分别衍生 20,30,40,50,60 min,结果得到随着衍生化时间的延长,单糖峰面积之和随之升高,当衍生化时间超过 40 min,单糖峰含量基本不变,故选择 40 min 为水解时间。

本实验所建立的 PMP 柱前衍生化高效液相色谱分析法分析云南松松塔单糖组成的方法准确稳定,灵敏度高,分离度好,确定了云南松松塔多糖主要含有木糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、阿拉伯糖 6 种单糖,含有少量半乳糖醛酸、岩藻糖、鼠李糖。本实验还对 TFA 水解条件和 PMP 衍生化方法进行了探索,得到最优水解条件 TFA 浓度 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,水解温度 100 °C,水解时间 6 h;最佳衍生化过程为 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH,衍生 40 min。课题组前期研究发现云南松松塔提取物具有良好的抗

HIV 活性和增强免疫活性,其活性大小与其所含的单糖成分之间是否具有一定的关系还要进一步研究。

通过本次实验,为云南松松塔的充分利用提供了一定的依据,同时也为其研究利用提供一定的参考价值,有利于松塔研究的进一步发展,使其变废为宝。

[参考文献]

- [1] 刘光明,吕永俊,李好枝,等. 云南松松塔中抗 HIV 活性成分的研究出报[J]. 大理学院学报,2009,8(2): 69-71.
- [2] 周萍,林樊,刘洁,等. 云南松松塔木质素——糖复合物中糖含量测定[J]. 时珍国医国药,2011,22(8): 1820-1821.
- [3] 史志婷,刘熙,张海珠. 云南松松塔抗 HIV-1 活性提取物急性毒性实验研究[J]. 大理学院学报,2014,13(8):4-6.
- [4] 饶金华,刘文英,江佳峪. 柱前衍生化高效液相色谱法分析淫羊藿多糖中单糖的组成[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):366-367.
- [5] 颜军,侯贤灯,徐开来. 柱前衍生 HPLC 分析银耳多糖的单糖组成[J]. 中国测试,2011,37(1):44-46.
- [6] 孟磊,常军民,孙莲,等. 柱前衍生-HPLC 分析天山花楸多糖中的单糖组成[J]. 食品科学,2009,30(24): 324-326.
- [7] 李国梁,索有瑞,史俊友,等. 柴达木枸杞多糖单糖组成的柱前衍生方法及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2009,35(12):39-42.
- [8] 林雪,贾敬芬,黄琳娟,等. RP-HPLC 用于芦荟多糖的单糖组成研究[J]. 食品科学,2006,27(4):192-195.

[责任编辑 顾雪竹]