

· 化学与分析 ·

单糖紫外衍生方法的改进与应用

郭怀忠^{1,2,3*}, 李胜男^{1,2}, 吴芳^{1,2}, 杨飞飞^{1,2}, 李玉青¹

(1. 河北大学药学院, 河北保定 071002; 2. 河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北保定 071002; 3. 药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北保定 071002)

[摘要] 目的:建立一种通过在1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)和对氨基苯甲酸(PABA)衍生单糖反应中加入硼砂,以提高单糖衍生效率的方法。方法:实验考察了硼砂的加入对PMP衍生8种常见醛糖和PABA衍生酮糖(以果糖为例)衍生效率的影响,优化了硼砂溶液浓度、温度及时间等衍生条件,采用毛细管区带电泳(CZE)进行方法学考察,并将改进的方法应用于中药南沙参的单糖组成测定。结果:在衍生过程中加入硼砂均可一定程度提高PMP和PABA对单糖的衍生效率,其中以葡萄糖最为显著,可提高约1.2倍。优化的PMP衍生醛糖的条件为:硼砂溶液浓度 $6.86\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,衍生温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,衍生时间30 min。优化的PABA衍生果糖的条件为:硼砂溶液浓度 $20.43\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,衍生温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,衍生时间60 min。在测定南沙参单糖组成时,改进的方法使一些含量较低的、原方法未发现的单糖被检测出来。结论:硼砂的加入可改变单糖构象平衡,链状构象占比增加,从而提高了单糖衍生效率。该方法准确、灵敏、操作简便,可为改善中药糖类成分分析及构效关系研究提供支持。

[关键词] 衍生效率; 硼砂; 醛糖; 果糖; 毛细管区带电泳

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0032-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020032

Improvement and Application of An Ultraviolet Derivative Method for Monosaccharides

GUO Huai-zhong^{1,2,3*}, LI Sheng-nan^{1,2}, WU Fang^{1,2}, YANG Fei-fei^{1,2}, LI Yu-qing¹

(1. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Baoding 071002, China; 3. Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis (Hebei University), Ministry of Education, Baoding, 071002, China)

[Abstract] **Objective:** A monosaccharide derivative method with improved efficiency was developed through the addition of borax in the process of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) and *p*-aminobenzoic acid (PABA) derivatization. **Method:** The effect of borax on the derivative efficiency of 8 common aldoses with PMP, and ketose (fructose) with PABA was investigated. Derivative conditions such as the concentration of borax solution, temperature and time were optimized by capillary zone electrophoresis (CZE) method. The improved method was applied to the determination of monosaccharide composition of Adenophorae Radix polysaccharide. **Result:** The results showed that the addition of borax could enhance both the PMP and PABA derivative efficiencies during the monosaccharide derivatization, and the most significant improved efficiency belonged to glucose, which could be increased roughly 1.2-fold. The optimized conditions of aldoses derivatization with PMP were as follows: the concentration of borax solution was $6.86\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, the temperature was $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the time was 30 min; the optimized conditions of ketose derivatization with PABA were as follows: the concentration of borax solution was $20.43\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, the temperature was $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the time was 60 min. The application of the improved method to the determination of monosaccharide composition of Adenophorae Radix polysaccharide showed monosaccharide with

[收稿日期] 20160910(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21575033);河北省自然科学基金项目(H2016201221)

[通讯作者] * 郭怀忠,博士,教授,硕士生导师,从事中药质量控制及药效学研究, Tel:0312-5971107, E-mail:ghuazh@aliyun.com

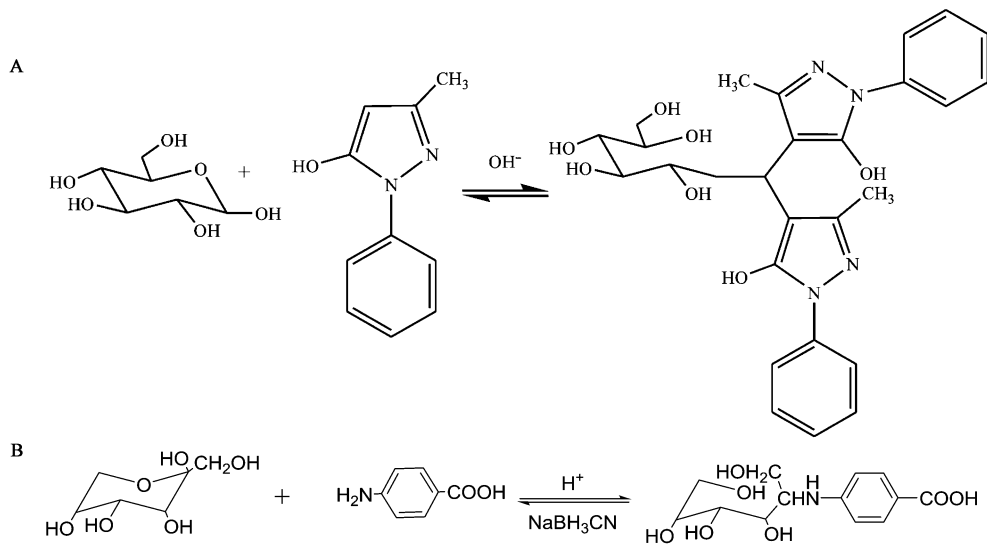
lower content could be detected by the improved method while the original one failed. **Conclusion:** Therefore, it is an useful approach to improve the monosaccharide derivative efficiency and detection sensitivity by adding the borax to change the balance of conformations of monosaccharide, which makes the proportion of chain structure increased. The method is accurate, sensitive and simple, and provides technical support for the monosaccharide composition analysis and the evaluation of structure-activity relationship of polysaccharide from traditional Chinese medicines.

[**Key words**] derivative efficiency; borax; aldose; fructose; capillary zone electrophoresis

现代糖生物学研究发现, 中药多糖在抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老和免疫调节等方面具有重要的生物活性^[1-3]。但由于糖类物质紫外吸收弱, 传统采用的示差折光检测器检测灵敏度较低, 且响应易受环境温度影响。为了提高糖类成分分析的灵敏度和重复性, 当前常利用具强紫外吸收的化合物对糖类成分进行衍生, 利用紫外检测对糖类进行分析。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP) 和对氨基苯甲酸 (*p*-aminobenzoic acid, PABA) 是当前糖类成分常见的紫外衍生试剂, 反应示意图 1^[4-8], 两者进行单糖衍生时, 均系与

链状单糖端基的醛基或酮基进行反应, 而糖类在常态下大多以不含醛基或酮基的环状构象存在, 导致其衍生效率不理想, 并会使一些含量较低的糖类无法被检测出来, 仍有很大优化空间。基于硼砂与单糖有较强的络合作用, 反应示意图 2^[9], 本实验在常规 PMP 和 PABA 衍生反应中加入硼砂, 希望通过影响单糖的异构化平衡, 提高溶液中链状单糖存在的比例或减缓链状单糖转化为环状单糖的速度, 提高链状单糖的生存时间, 进而提高衍生效率和检测灵敏度。并将改进的衍生方法应用于南沙参多糖的单糖组成的毛细管区带电泳 (capillary zone electrophoresis, CZE) 分析。



A. 葡萄糖与 PMP; B. 果糖与 PABA

图 1 衍生反应示意

Fig. 1 Derivative reaction

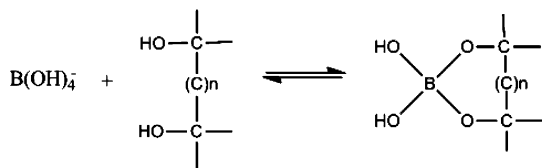


图 2 硼酸根与糖的络合反应式

Fig. 2 Complexation reaction between borate ion and carbohydrate

1 材料

CL1020 型高效毛细管电泳仪 (北京彩陆科学仪

器有限公司), HW2000 色谱工作站, 未涂层熔融毛细管柱 (河北永年锐洋色谱器件有限公司), PHS-3C 型酸度计 (上海理达仪器厂), TG16-W 型微量高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), AG204 型分析天平 (瑞士 Mettler Toledo)。

D-木糖 (保定市化工二厂提供, 纯度 $\geq 99.0\%$); *D*-阿拉伯糖 (纯度 $\geq 99.0\%$), *D*-甘露糖 (纯度 $\geq 99.5\%$), *D*-半乳糖 (纯度 $\geq 99.0\%$), *D*-半

乳糖醛酸(纯度 $\geq 99.0\%$)均购自北京索莱宝科技有限公司;无水葡萄糖(天津市科密欧化学试剂有限公司,纯度 $\geq 99.0\%$),*L*-鼠李糖(合肥博美生物科技有限责任公司,纯度 $\geq 98.0\%$),*D*-葡萄糖醛酸(Sigma 公司,纯度 $\geq 99.0\%$),*D*-果糖(Amresco 公司,纯度 $\geq 99.0\%$),PMP(日照力德士化工有限公司,纯度 $\geq 99.0\%$),氰基硼氢化钠(NaBH_3CN ,阿拉丁试剂有限公司,纯度 $\geq 95.0\%$),硫脲(天津市福晨化学试剂厂,纯度 $\geq 99.0\%$);对氨基苯甲酸(PABA)、硼砂、硫酸、盐酸、氢氧化钠、冰乙酸等试剂均为分析纯,乙醇(医用规格),水为蒸馏水。

南沙参药材购自保定崇德大药房、龙海大药房、瑞草堂、同仁堂、万宝堂 5 家药店,共 5 批(分别编号为 A,B,C,D,E),所用药材均经保定市药品检验所田桂敏副主任药师鉴定为桔梗科植物轮叶沙参 *Adenophora tetraphylla* 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 试液的配制 内标溶液:精密称取硫脲 0.23 g,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,即得 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标溶液。

PMP 衍生试剂:精密称取 PMP 0.87 g,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMP 甲醇溶液。

PABA 衍生试剂:精密称取 PABA 0.7 g,氰基硼氢化钠 0.1 g,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 PABA 的甲醇溶液。

醛糖对照品混合贮备溶液:精密称取木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸单糖对照品各 0.01 g,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,即得各单糖质量浓度为 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单糖对照品混合贮备溶液。

果糖对照品溶液:精密称取果糖对照品 0.5 g,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,即得果糖质量浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的果糖对照品溶液。

2.2 电泳条件 PMP 衍生醛糖:未涂层弹性石英毛细管柱($50 \mu\text{m}\times 49 \text{ cm}$,有效长度 40 cm),运行缓冲溶液为 $45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂溶液(pH 10.1, $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节),检测波长 245 nm,电压 12 kV,进样量 $8 \text{ cm}\times 4 \text{ s}$ 。

PABA 衍生果糖:未涂层弹性石英毛细管柱($50 \mu\text{m}\times 50 \text{ cm}$,有效长度 41 cm),运行缓冲溶液为 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂溶液(pH 10.5, $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化

钠溶液调节),检测波长 303 nm,电压 15 kV,进样量 $10 \text{ cm}\times 2 \text{ s}$ 。

2.3 加入硼砂的 PMP 衍生醛糖操作 精密量取醛糖对照品混合贮备溶液 $70 \mu\text{L}$,依次精密加入一定浓度的硼砂溶液 $70 \mu\text{L}$,内标溶液 $70 \mu\text{L}$, $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 $100 \mu\text{L}$ 及 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMP 甲醇溶液 $100 \mu\text{L}$,于 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热 30 min。取出,冷却至室温后,用 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 $100 \mu\text{L}$ 中和,三氯甲烷萃取除去过量 PMP, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min。取上层溶液进行 CZE 分析。

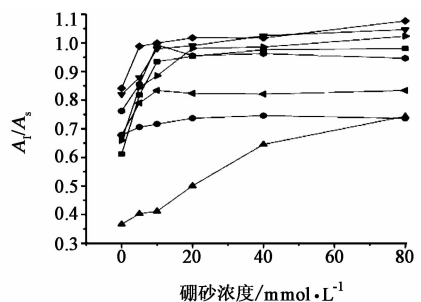
2.4 加入硼砂的 PABA 衍生果糖操作 精密量取果糖对照品溶液 $20 \mu\text{L}$,依次精密加入一定浓度的硼砂溶液 $30 \mu\text{L}$,内标溶液 $85 \mu\text{L}$,PABA 的甲醇溶液 $100 \mu\text{L}$,于 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中反应 60 min。取出,冷却至室温后, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min。取上层溶液进行 CZE 分析。

2.5 样品南沙参多糖的提取、全降解、衍生及测定

精密称取南沙参多糖粉末^[10] 20 mg,加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液 2 mL,密封, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴降解 3 h,冷却至室温,用 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和,移至 10 mL 量瓶中,加水定容,摇匀。按改进方法进行 PMP 衍生及 CZE 分析。

2.6 改进衍生方法的优化

2.6.1 硼砂浓度对 PMP 醛糖衍生效率的影响 按 2.3 项下操作,记录各醛糖峰面积,以不同硼砂溶液的浓度为自变量,醛糖的峰面积和内标峰面积的比值(A_1/A_5)为因变量绘制曲线,结果见图 3。



—■—木糖;—●—阿拉伯糖;—▲—葡萄糖;—▼—鼠李糖;—◆—甘露糖;—◀—半乳糖;—▶—葡萄糖醛酸;—|—半乳糖醛酸

图 3 6 种不同硼砂浓度对 8 种醛糖 PMP 衍生效率影响的趋势
Fig. 3 Trend diagram of derivative efficiencies of eight PMP-aldoses using six borax solutions with different concentrations

由图 3 可知,随着硼砂浓度的增加,各单糖的 PMP 衍生效率在起始阶段增加迅速,随后均在加入硼砂溶液浓度约为 $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (即溶液中硼砂终

浓度为 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 衍生效率趋于稳定。

2.6.2 硼砂浓度对 PABA 果糖衍生效率的影响

按 2.4 项下操作, 记录果糖峰面积, 以不同的硼砂浓度为自变量, 果糖的峰面积和内标峰面积的比值 (A_1/A_5) 为因变量绘制曲线, 结果见图 4。

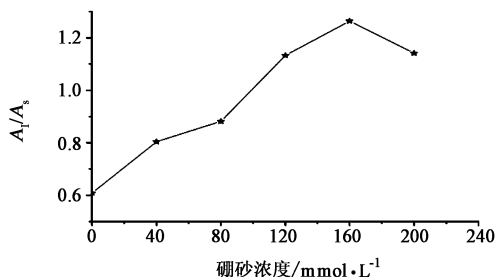


图 4 6 种不同硼砂浓度对果糖 PABA 衍生效率影响的趋势

Fig. 4 Trend diagram of derivative efficiencies of PABA-fructose using six borax solutions with different concentrations

由图 4 可知, 加入硼砂浓度约为 $160 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (即溶液中硼砂终浓度为 $20.43 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, PABA 衍生效率达到最大。

2.6.3 衍生条件的优化 通过预试验得知除硼砂浓度外, 衍生过程中的温度和时间对衍生效率亦有影响, 经过确定衍生影响因素的大致范围, 最终选取了 A (硼砂浓度), B (衍生温度) 以及 C (时间) 作为考察因素, 对 PMP 衍生醛糖 (左列数据) 和 PABA 衍生果糖 (右列数据) 按照 $L_9(3^4)$ 进行三因素三水平正交试验, 见表 1, 以单糖峰面积之和 (A_1) 与内标峰面积 (A_5) 之比为指标对衍生效率进行评价和选择。

表 1 衍生化条件因素与水平表

Table 1 Factors and levels of derivative conditions

水平	A 硼砂浓度 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	B 衍生温度 / $^{\circ}\text{C}$	C 衍生时间 / min
1	30/140	60/60	20/50
2	40/160	70/70	30/60
3	50/180	80/80	40/70

正交试验结果表明, 上述 3 因素对 9 种单糖衍生效率的影响顺序为: 衍生温度 > 硼砂浓度 > 衍生时间, PMP 衍生单糖最优组合为 $A_3B_2C_2$, 即取醛糖对照品混合溶液 $70 \mu\text{L}$, 加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液, 使溶液中硼砂终浓度为 $6.86 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 70°C 水浴中衍生 30 min, 其中葡萄糖衍生效率提高最为明显, 约 1.2 倍; PABA 衍生果糖最优组合为 $A_2B_2C_2$, 即取果糖对照品溶液 $20 \mu\text{L}$, 加入 $160 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液, 使溶液中硼砂终浓度为 $20.43 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,

70°C 水浴中衍生 60 min, 衍生效率提高约 1.1 倍。

2.7 南沙参多糖单糖组成分析

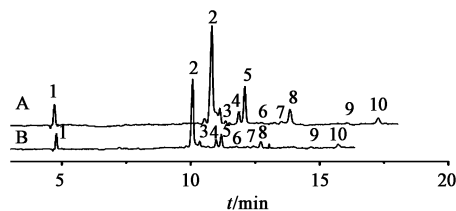
2.7.1 线性范围 分别精密量取单糖混合贮备溶液若干毫升制备系列浓度单糖对照品混合溶液, 以优化后的衍生条件衍生后按 2.2 项下的电泳条件分别进样分析, 以溶液浓度为横坐标, 相应的峰面积比值 (单糖/内标) 为纵坐标绘制标准曲线。结果表明, 8 种醛糖在 $0.02 \sim 0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 均线性关系良好, 相关系数 $r > 0.9983$ 。

2.7.2 精密度、重复性试验 取 2.7.1 项下第 1, 3 和 5 个浓度溶液制成低、中、高 3 个浓度衍生样品, 连续进样 3 次, 计算各单糖峰面积与内标比值的 RSD 考察精密度。结果显示, RSD 1.1% ~ 3.6%, 表明该方法的精密度良好。

取同批南沙参多糖粉末 5 份, 降解、衍生后进样测定各单糖的峰面积, 计算其与内标比值的 RSD 为 1.4% ~ 3.9%, 表明该方法重复性良好。

2.7.3 加样回收率试验 以葡萄糖和半乳糖为代表进行加样回收率试验。精密称取 9 份同一批次单糖量已知的南沙参多糖粉末各 20 mg, 分别加入单糖质量分数为 80%, 100% 和 120% 的各单糖对照品, 每个浓度平行 3 份, 降解后按优化的衍生条件衍生并进行 CZE 分析。计算葡萄糖和半乳糖的平均回收率分别在 94.9% ~ 97.5% 和 92.7% ~ 95.0%, RSD 在 1.0% ~ 4.0%, 结果表明本方法的回收率良好。

2.8 样品分析 取分别来自 5 家药店的 5 批南沙参, 按 2.6.3 项下优化的方法进行处理, 并与原方法 (未加硼砂, 以等量水代替) 进行比较, CZE 代表性谱图见图 5。



1. 硫脲; 2. PMP; 3. 木糖; 4. 阿拉伯糖; 5. 葡萄糖; 6. 鼠李糖; 7. 甘露糖; 8. 半乳糖; 9. 葡萄糖醛酸; 10. 半乳糖醛酸

图 5 原方法 (A) 与改进方法 (B) 测得的原南沙参多糖降解单糖的代表性 CZE 谱

Fig. 5 Representative CZE electropherograms of monosaccharides from degradation of 5 batches Adenophorae Radix polysaccharides derived by original method (A) and improved (B)

从图 5 可以看出, 改进的 PMP 衍生方法能够提高单糖的 PMP 衍生效率, 但不同单糖衍生效率的提

高程度有所不同,通过对对照品的平行测定和计算,改进的方法与原方法测得的多糖各单糖摩尔比理论上不会改变,测定结果也证实了这一点,见图 6。

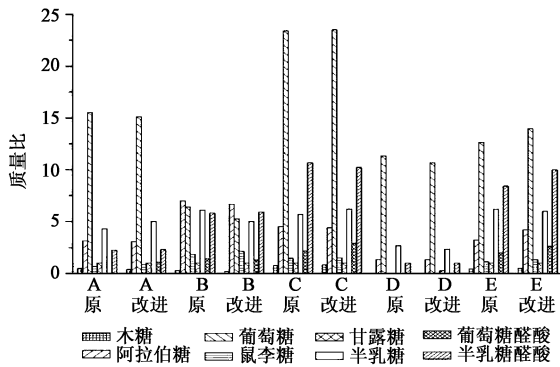


图 6 改进方法与原方法测得的 5 批南沙参多糖的单糖组成及相对摩尔比

Fig. 6 Monosaccharide composition and relative molar ratio of 5 batches Adenophorae Radix polysaccharide derived by improved and original method.

另外,在优化后的衍生条件下进行单糖衍生,信噪比明显提高,使一些含量较低的单糖被检测出来。例如同仁堂南沙参采用原方法未从样品中检测到甘露糖,但新方法可检出。可见,改进的衍生方法可以提高单糖的衍生效率和检测灵敏度。

3 讨论

改进方法的单糖衍生效率之所以提高,是由于 PMP 在衍生反应中与链状单糖的醛基进行反应, PAPB 与链状果糖的羰基进行反应,而硼砂在水中解离生成的硼酸根负离子起到了固定糖链的作用,从而影响了单糖的异构化平衡,提高了溶液中链状单糖存在的比例或生存时间,有利于衍生反应的进行,最终表现为衍生效率和检测灵敏度的提高。曾尝试以 2, 4-二硝基苯肼为衍生试剂,对甲醛、丙酮等与链状单糖有相似端基结构的化合物进行衍生,衍生效果较好。进一步将相对分子质量和空间结构调整相近,但不易缩合成环状半缩醛结构的木酮糖与常见单糖(葡萄糖、果糖)比较,前者衍生效率明显优于后者,证明了改变单糖构象平衡是提高衍生

效率的途径之一。本实验为进一步改善糖类衍生效率或探求新的糖类衍生策略提供了新思路。

[参考文献]

[1] GUO L, XIE J H, RUAN Y Y, et al. Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum* [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(10):1175-1182.

[2] LI F, CUI S H, ZHA X Q, et al. Structure and bioactivity of a polysaccharide extracted from protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense* [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 72:664-672.

[3] Ferreira ICFR, Heleno S A, Reis F S, et al. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities [J]. Phytochemistry, 2015, 114:38-55.

[4] 郝桂堂,陈尚卫,朱松,等. 对氨基苯甲酸衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖及糖醛酸组成 [J]. 色谱, 2007, 25(1):75-79.

[5] 孙志伟,刘凌君,户宝军,等. 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡啶啉衍生试剂的制备及其在高效液相色谱-质谱法测定糖类化合物中的应用 [J]. 色谱, 2008, 26(2):200-205.

[6] 赵燕,杨兴斌,李晓晔,等. 高效毛细管区带电泳法分析南瓜多糖的单糖组成 [J]. 中国现代应用药学, 2006, 23(4):323-326

[7] 张海珠,史志婷,王莹,等. 柱前衍生化高效液相色谱分析云南松塔多糖的单糖组成 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24):30-33.

[8] 林雪,王仲孚,黄琳娟,等. 改进的 PMP 柱前衍生化方法用于单糖的组成分析 [J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(8):1456-1458.

[9] 张利,陈蓁蓁,王燕,等. 糖类物质的毛细管电泳分析 [J]. 化学研究与应用, 2003, 15(5):607-611.

[10] ZHANG X Q, CHEN J Y, MAO M X, et al. Extraction optimization of the polysaccharide from *Adenophorae Radix* by central composite design [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 67(3):318-322.

[责任编辑 顾雪竹]