

亲水作用色谱-质谱法测定麻黄根多糖单糖的组成

梁军, 孙黎明, 夏永刚, 杨炳友, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室,
黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**建立一种亲水相互作用色谱-质谱(HILIC-UPLC-MS/MS)检测分析方法,用于直接检测麻黄根多糖的单糖组成。**方法:**采用ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相A为乙腈-水(95:5),B为乙腈-水(5:95),柱温60℃,梯度洗脱(0~10 min,92%~70%A;10~10.1 min,70%~92%A;10.1~15 min,92%A),进样量2 μL,流速0.2 mL·min⁻¹;质谱采用电喷雾离子源,负离子模式下多反应离子检测。Turbo V离子源参数如下:毛细管电压-4.5 kV,源温度550℃;气帘气和碰撞气压力分别设为30 psi和10 psi;雾化气和气化气压力均为55 psi,碰撞池入口电位和出口电位均为-10 V。**结果:**该方法在12 min内实现8种未衍生单糖成分的完全基线分离,精密度、稳定性和重复性的RSD均<2.1%,各成分的回收率在99.3%~102.5%,RSD在1.5%~2.9%,应用上述建立的方法分别对5批麻黄根多糖进行单糖组成分析,结果显示,麻黄根中检测到5种单糖分别为L-鼠李糖,L-阿拉伯糖,D-甘露糖,D-半乳糖,D-半乳糖醛酸。**结论:**HILIC-UPLC-MS/MS方法灵敏度高、重复性好、快速、准确、样品前处理简单、无需衍生化,可用于植物多糖中单糖及寡糖的快速检测。

[关键词] 麻黄根多糖;亲水相互作用色谱-质谱;单糖组成

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0073-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070073

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1409.072.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 14:09

Analysis of Monosaccharide Compositions of Ephedrae Radix et Rhizoma Polysaccharide Based on UPLC-MS/MS

LIANG Jun, SUN Li-ming, XIA Yong-gang, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an analysis method for direct detection of monosaccharide compositions of Ephedrae Radix et Rhizoma polysaccharide by HILIC-LC-MS/MS. **Method:** The separation was performed on ACQUITY UPLC BEH Amide column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with 95% acetonitrile (A) - 95% water (B) as the mobile phase for gradient elution (0-10 min, 92% -70% A; 10-10.1 min, 70% -92% A; 10.1-15 min, 92% A) at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. The injection volume was 2 μL, and the column temperature was 60℃. In mass spectrometry, electrospray ion source was used; multiple reaction ion monitoring mode (MRM) under the negative ion. Turbo V ion source parameters were common to all analytes, as follows: the capillary voltage was -4.5 kV, and the source temperature was at 550℃. The curtain gas and collision gas setting

[收稿日期] 20160525(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303215, 81274103);全国优秀博士学位论文作者专项(201367)

[第一作者] 梁军,博士,副研究员,从事中药、天然药物药效物质基础及其质量评价研究, Tel:0451-82195301, E-mail: lliangjunn@163.com

[通讯作者] *匡海学,博士,教授,从事中药及复方药效物质基础研究,中药性味理论研究, Tel:0451-82767188, E-mail: hxkuang56@163.com

were 30 psi and 10 psi, respectively. The pressure for nebulization gas and vaporization gas setting were 55 psi. The entrance potential (EP) and collision cell exit (CXP) were all -10 V. **Result:** Eight monosaccharide components were separated clearly within 12 min. The RSD values of precision, stability and reproducibility were all less than 2.1%. The average recoveries were 99.3%-102.5%, with RSD of 1.5%-2.9%. The developed method has been successfully applied to determine the major saccharides in 5 *Ephedra Radix et Rhizoma* polysaccharide samples. It was clear that the predominant composition monosaccharide in *Ephedra Radix et Rhizoma* polysaccharides were Rha, Ara, Man, Gal and GalUA. **Conclusion:** The established method for determination of the eight monosaccharides is stable, reliable, accurate, and reproducible, its sample pre-treatment is simple, without derivatization, and can be used for rapid detection of monosaccharide compositions in plant polysaccharide.

[**Key words**] *Ephedrae Radix et Rhizoma* polysaccharide; HILIC-UPLC-MS/MS; monosaccharide composition

麻黄是具有重要生态价值、药用价值和经济价值的药用植物,因而被誉为“黄金植物”^[1]。麻黄功效发汗,而麻黄根为止汗,二者具有同源异效的作用^[2]。麻黄根中的化学成分十分复杂,国内外研究结果表明,麻黄根中主要含有生物碱类、黄酮类、酯类、有机酸类、多糖类等化学成分^[3]。具有降血压、止汗、抗肿瘤和抗炎等作用^[4-5]。本课题组前期研究发现麻黄多糖具有显著的免疫抑制作用,为麻黄苦寒性味的物质基础^[6]。但对麻黄根多糖的研究鲜有报道,有待进一步开发。

中药多糖化学结构复杂,多糖的质量评价一直是困扰其发展的一个瓶颈问题。对多糖的分析有 HPLC-FLD, HPLC-UV, CE-UV, GC-MS 等方法^[7-10], 均需要柱前衍生。亲水作用液相色谱 (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) 是一种适用于分析强极性和强亲水化合物的液相色谱分析方法,非常适合糖类化合物等极性较大的化合物的分析^[11-13]。

本文利用 HILIC-UPLC 联合质谱检测分析方法拟建立一种对多种单糖完全基线分离的简单、快速、准确、灵敏度高、重复性好、无需柱前衍生的高通量样品分析方法;同时以麻黄根多糖作为研究对象,对其进行全水解、控制性水解,检测水解产物,为中药多糖质量控制提供新的研究思路和方法。

1 材料

ACQUITY 型 UPLC 系统(美国 Waters 公司), 联合 API 4000 Qtrap 型质谱检测器(美国 AB Sciex 公司)。单糖对照品:*L*-鼠李糖(批号 R3875, Rha), *D*-核糖(批号 078K0668, Rib), *L*-阿拉伯糖(批号 E003256, Ara), *N*-乙酰基-*D*-(+)-葡糖胺(批号 A8625, GlcNAc), *D*-甘露糖(批号 M4125, Man), *D*-果糖(批号 NIST14F, Fru), *D*-半乳糖(批号 A2795,

Gal) 和 *D*-半乳糖醛酸(批号 48280, GalUA) 均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品,纯度均供含量测定用;甲酸铵,乙酸铵,三乙胺和氨水均购于美国 Sigma 公司;质谱级乙腈(美国 Dikama 公司), Milli-Q 超纯水,三氟乙酸(TFA) 购于美国 Germany Merck 公司;其他试剂均为分析纯。

麻黄根经黑龙江中医药大学中药资源教研室王振月教授鉴定为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* (S1 ~ S3 样品于 2008 年购自山西大同), 中麻黄 *E. intermedia* (S4 ~ S5 样品于 2014 年购自山西大同) 的干燥根及根茎,保存于黑龙江中医药大学中药化学教研室。

2 方法与结果

2.1 质谱条件的优化 碳水化合物可以在正离子模式和负离子模式下检测。本实验中,负离子模式的信号干扰较正离子模式低,而且在负离子模式下所有待分析物的母离子响应强度更高,因此采用负离子模式下多反应监测(MRM)对分析物进行监测。经 MRM 优化去簇电压(DP)和碰撞能(CE)。各单糖均有一个相似的 MS/MS 碎片离子 m/z 59,可能为糖环的裂解离子,具体裂解途径见图 1。

Turbo V 离子源参数:毛细管电压 -4.5 kV,源温度 550 °C;气帘气 30 psi,碰撞气压力 10 psi;雾化气和气化气压力均为 55 psi,碰撞电池入口电位和出口电位均为 -10 V;去簇电压和碰撞能优化结果见表 1。

2.2 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相 A 为乙腈-水(95:5), B 为乙腈-水(5:95),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 92% ~ 70% A; 10 ~ 10.1 min, 70% ~ 92% A; 10.1 ~ 15 min, 92% A);柱温 60 °C,进样量 2 μL,流速 0.2 mL·min⁻¹;空白、单糖混合对照品和麻黄根多糖样品色谱见图 2。

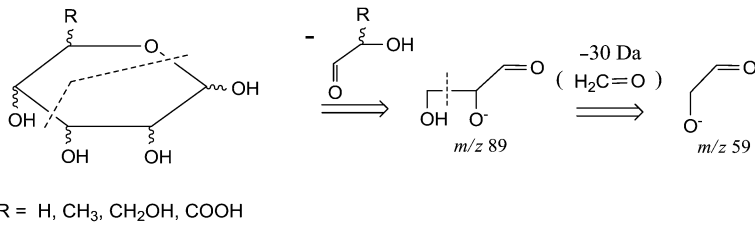


图 1 负离子模式下单糖的裂解途径

Fig. 1 A possible fragmentation pathway for aldoses and uronic acids in negative mode

表 1 负离子模式下各种单糖和内标的质谱检测参数

Table 1 Negative MS parameters used for analysis of saccharides and internal standards (IS)

单糖	相对分子质量/Da	t_R /min	母离子 $[M - H]^-$ (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能/V
Rha	164.2	3.08	162.9	58.6	-65.5	-18.0
Rib	150.1	3.18	149.0	58.9	-45.6	-15.2
Ara	150.1	4.29	149.0	58.9	-45.6	-15.2
GlcNAc	221.2	5.24	220.2	59.0	-67.5	-26.1
Fru	180.2	5.25	179.0	59.0	-20.5	-24.0
Man	180.2	6.16	179.0	59.0	-20.5	-24.0
Gal	180.2	6.79	179.0	59.0	-20.5	-24.0
GalUA	194.1	10.84	192.9	59.1	-66.1	-29.8
肌醇	180.2	10.09	178.9	86.8	-81.0	-23.8

2.3 对照品溶液的制备 取各种单糖对照品 (Rha, Rib, Ara, GlcNAc, Man, Fru, Gal, GalUA) 适量, 精密称定, 分别用 50% 乙腈水溶液配制成标准单糖对照品储备液, 肌醇 (内标) 同样用 50% 乙腈水溶液配制, 将 8 种单糖对照品储备液混合在一起用初始流动相稀释成 8 个质量浓度 ($0.039 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 在每个质量浓度的溶液中加入内标溶液使内标质量浓度均为 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。0.22 μm 微孔滤膜滤过, 并保存在 $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。

2.4 麻黄根多糖的制备 取干燥的麻黄根药材寸断 100 g, 至 2 000 mL 圆底烧瓶中, 加 10 倍量的蒸馏水, 在一定温度下水浴回流提取一定时间, 冷却至室温。过滤得滤液和滤渣, 再向滤渣中加入等量的蒸馏水, 重复上述操作 1 次。最后合并滤液, 在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度下减压浓缩。浓缩液在不断搅拌下, 加入 3 倍量的 95% 乙醇使乙醇体积分数为 75%, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下静置 24 h 后, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min; 收集沉淀, 用无水乙醇洗涤, 再在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min; 收集沉淀, 水复溶后在透析袋 (3 000 Da) 中透析, 流水透析 48 h, 蒸馏水透析 24 h。透析液离心除去不溶物后, 收集上清多糖溶液, 进行冷冻干燥得到麻黄根多糖冻干品。

2.5 供试品溶液的制备 取上述得到的麻黄根多糖样品 10 mg, 置于磨口反应瓶中, 加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

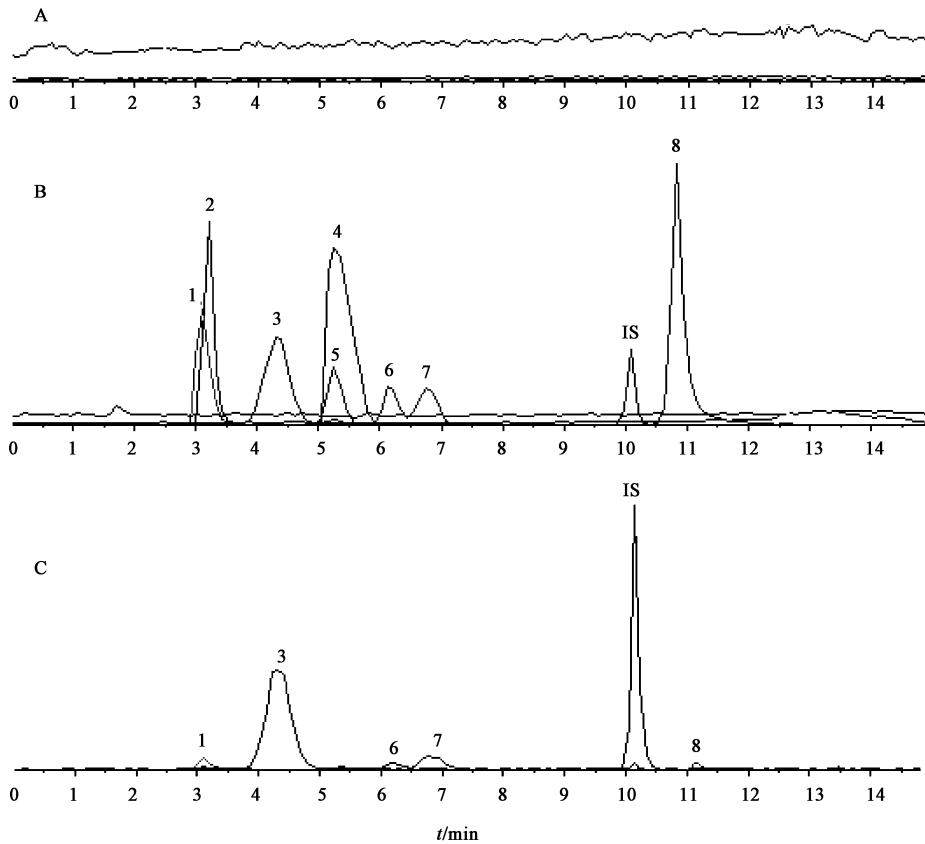
TFA 2 mL 溶解, 充分振荡使其完全溶解后, 密塞, $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 水解 3 h^[14]。反应液减压浓缩蒸干, 加入适量甲醇, 重复蒸干多次, 除去其中残留的 TFA (无酸味)。所得水解样品用去离子 1.0 mL 水溶解, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液转移到 2.0 mL 量瓶中, 去离子水定容, UPLC 进行前稀释 1 000 倍。

2.6 线性关系考察 在最优条件下, 将 2.3 项下制备的 8 个不同质量浓度的混合单糖对照品溶液分别以进样质量浓度为横坐标 $X (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$, 以分析物与内标物峰面积比为纵坐标 Y 进行线性回归, 线性范围在 $0.078 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别以信噪比 S/N 为 10 和 3 作为标准, 测得各单糖的定量限 (LOQ) 及检测限 (LOD)^[15]。线性回归方程、相关系数、最低定量限及最低检测限见表 2。

2.7 精密度试验 日内精密度: 分别精密吸取 3 个不同质量浓度的混合单糖对照品溶液, 日内重复进样 6 次测定峰面积, 代入标准曲线计算出浓度, 结果 $RSD < 3.0\%$, 说明该方法精密度良好。

日间精密度: 分别精密吸取 3 个不同质量浓度的混合单糖对照品溶液, 连续 3 d 进样, 每个质量浓度重复进样 6 次, 测定峰面积, 代入标准曲线计算出浓度, 结果 $RSD < 3.8\%$, 说明该方法精密度良好。

2.8 重复性试验 精密称取同一批麻黄根 (S2) 样品 9 份, 按 2.5 项下方法制备得供试品溶液, 包括



1. Rha; 2. Rib; 3. Ara; 4. GlcNAc; 5. Fru; 6. Man; 7. Gal; 8. GalUA; IS. 肌醇

图 2 空白 (A), 单糖对照品 (B) 和麻黄根多糖样品 (C) HILIC

Fig. 2 HILIC of blank chromatogram (A), total ion chromatogram of carbohydrates (B) and sample chromatogram (C)

表 2 8 种单糖的线性回归方程、线性范围, LOD 及 LOQ

Table 2 Summarization of calibration results, LOD and LOQ values

单糖	线性回归方程	线性范围 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	r	LODs/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LOQs / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Rha	$Y = 0.2455X + 0.0497$	0.078 ~ 10.00	0.9955	9.8	29.3
Rib	$Y = 0.2324X + 0.0424$	0.078 ~ 10.00	0.9989	4.9	14.5
Ara	$Y = 0.1890X + 0.0355$	0.16 ~ 10.00	0.9958	4.9	14.5
GlcNAc	$Y = 0.4534X + 0.0375$	0.078 ~ 10.00	0.9992	4.9	14.5
Fru	$Y = 0.0994X + 0.0329$	0.078 ~ 10.00	0.9986	4.9	14.5
Man	$Y = 0.0700X + 0.0058$	0.078 ~ 10.00	0.9995	9.8	29.3
Gal	$Y = 0.0803X + 0.0144$	0.16 ~ 10.00	0.9996	9.8	29.3
GalUA	$Y = 0.4349X - 0.0119$	0.078 ~ 10.00	0.9986	4.9	14.5

高、中、低 3 个不同的质量浓度, 重复 3 次测定峰面积, 计算含量, 结果麻黄根多糖样品中含有的 5 种单糖 Rha, Ara, Man, Gal 和 GalUA, 其平均摩尔比为 4.02:26.91:1.58:11.40:1.00, RSD 均 < 2.1%, 说明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 取麻黄根多糖酸水解样品溶液, 在 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 分别按上述条件测定, 测定之前样品均保存在 4 °C 冰箱里备用, 结果其所含单

糖的水溶液稳定性较好 (RSD < 3.2%)。

2.10 加样回收率试验 精密称取已知单糖含量的麻黄根多糖样品, 加入等量的 Rha, Ara, Man, Gal 和 GalUA 共 5 个单糖, 平行制备 6 份, 按 2.4, 2.5 项下制备方法经酸水解制得供试品溶液, 测定并计算各成分的加样回收率以及 RSD。结果见表 3。

2.11 样品含量测定 利用上述建立的分析方法,

表 3 5 种单糖成分加样回收率试验

Table 3 5 kinds of ingredients and recovery test

成分	称样量/mg	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
Rha	6.657	0.541	0.540	1.088	101.3	99.7	2.0
	6.655	0.546	0.540	1.095	101.7		
	6.654	0.539	0.540	1.085	101.1		
	6.656	0.542	0.540	1.077	99.1		
	6.655	0.535	0.540	1.065	98.1		
	6.654	0.544	0.540	1.067	96.9		
Ara	6.657	3.344	3.350	6.795	103.0	100.6	1.7
	6.655	3.352	3.350	6.763	101.8		
	6.654	3.330	3.350	6.696	100.5		
	6.656	3.359	3.350	6.718	100.3		
	6.655	3.325	3.350	6.673	99.9		
	6.654	3.362	3.350	6.651	98.2		
Man	6.657	0.236	0.235	0.469	99.1	99.3	2.7
	6.655	0.245	0.235	0.475	97.9		
	6.654	0.230	0.235	0.465	100.0		
	6.656	0.241	0.235	0.469	97.0		
	6.655	0.238	0.235	0.483	104.3		
	6.654	0.246	0.235	0.475	97.4		
Gal	6.657	1.698	1.695	3.385	99.5	100.3	1.5
	6.655	1.705	1.695	3.405	100.3		
	6.654	1.685	1.695	3.413	101.9		
	6.656	1.710	1.695	3.376	98.3		
	6.655	1.683	1.695	3.372	99.6		
	6.654	1.680	1.695	3.413	102.2		
GalUA	6.657	0.161	0.165	0.335	105.5	102.5	2.9
	6.655	0.165	0.165	0.330	100.0		
	6.654	0.176	0.165	0.345	102.4		
	6.656	0.175	0.165	0.344	102.4		
	6.655	0.156	0.165	0.319	98.8		
	6.654	0.152	0.165	0.327	106.1		

对 5 批不同产地麻黄根粗多糖样品的酸水解产物进行分析,通过外标法计算其所含单糖的含量后折算为单糖摩尔比^[16],结果见表 4。

3 讨论

考察了不同 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)和 ACQUITY UPLC

表 4 不同批次麻黄根粗多糖样品中单糖摩尔比

Table 4 Measurement results of marker compounds in Ephedrae Radix et Rhizoma polysaccharide

No.	Rha	Ara	Man	Gal	GalUA
S1	2.99	72.49	7.38	15.44	1.69
S2	8.88	59.98	3.53	25.38	2.23
S3	9.62	71.76	6.54	8.51	3.57
S4	3.64	62.37	7.46	25.26	1.27
S5	12.53	38.86	12.20	34.21	2.20

HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);不同流动相添加剂及比例(0.1% 氨水,0.1% 三乙胺,8 mmol·L⁻¹ 甲酸铵,8 mmol·L⁻¹ 乙酸铵);不同质谱扫描时间(200,500,800,1 000 ms);不同柱温(35,45,60,65 ℃)及流速(0.1,0.13,0.17,0.2,0.3 mL·min⁻¹),最终选择本文的条件,通过方法学考察保证了该方法的稳定性、重复性及结果的准确可靠。

本实验建立了一种能同时快速准确分离8种单糖的新方法,该方法采用亲水作用液相色谱柱对糖类化合物进行分析,联合UPLC-MS作为新的色谱分离检测模式,该方法与UPLC-UV,UPLC-FLD和GC-MS等传统方法相比,具有专属性强、前处理简单、准确可靠、灵敏度高、重复好、快速高效且无需衍生化等优点。应用上述建立的方法分别对5批麻黄根多糖进行单糖组成分析。结果显示,麻黄根中检测到5种单糖分别为Rha,Ara,Man,Gal,GalUA。不同批次的麻黄根多糖的单糖摩尔比存在差异,这说明药材的种属差异和储存条件都是影响药材所含成分差异的主要因素。

[参考文献]

[1] 张勇. 黄金植物—麻黄[J]. 林业科技, 2001, 26(6): 34.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 300.
[3] 岳乐乐,王隶书,程东岩,等. 中药麻黄根的研究概述[J]. 中国药师,2015,18(8):1383-1386,1393.
[4] 吴和珍,陆毅,艾伦强,等. 麻黄根化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(11): 144-147.
[5] 梅全喜. 现代中药药理与临床应用手册[M]. 北京: 中国中医药出版社,2008:1002.
[6] KUANG H X, XIA Y G, YANG B Y, et al. Screening and comparison of the immunosuppressive activities of

polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf [J]. Carbohydr Polym, 2011, 83(2): 787-795.
[7] 赵宏,柴桂芳,王秋红,等. 一种车前子多糖的分离纯化及单糖组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014, 20(19):97-100.
[8] 梁军,王迪,夏永刚,等. 麻黄根多糖中单糖组成的GC-MS分析[J]. 中医药学报,2014,42(4):17-18.
[9] 梁军,夏永刚,杨炳友,等. 柱前衍生化-HPLC法分析麻黄多糖 ESP-B1 的单糖组成[J]. 中草药,2011,42(10):1985-1988.
[10] 周桂芬,庞敏霞,陈素红,等. 铁皮石斛茎、叶多糖含量及多糖部位柱前衍生化-高效液相色谱指纹图谱比较研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(5):795-802.
[11] 韩冰冰,王翠翠,李新军,等. 强极性化合物DMC及其杂质的HILIC分离方法研究[J]. 华东师范大学学报:自然科学版, 2011(6):132-138.
[12] YAO X, ZHOU G, TANG Y, et al. HILIC-UPLC-MS/MS combined with hierarchical clustering analysis to rapidly analyze and evaluate nucleobases and nucleosides in *Ginkgo biloba*, leaves [J]. Drug Test Anal, 2014, 7(2):150-157.
[13] 朱太雷,郭盛,唐志书,等. 亲水作用色谱串联质谱法分析三七药材中游离氨基酸类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(5):48-53.
[14] 伍善广,冯学珍,陈颖,等. 柱前衍生高效液相法测定杏鲍菇多糖的单糖组成[J]. 食品工业,2014,35(5):245-247.
[15] 袁忠海,吴道澄,赵燕,等. 高效液相色谱法测定魔芋精粉中葡甘露聚糖的含量及其单糖组成[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7):621-624.
[16] 冯健,王秋红,匡海学,等. 麻黄总多糖可见分光光度法定量方法考察及HPLC-ELSD法测定均多糖ESP-B4含量[J]. 中医药学报, 2013, 41(5):10-13.

[责任编辑 顾雪竹]