

柱前衍生 HPLC 分析酸枣仁汤中多糖的单糖组成

刘宇¹, 娄燕¹, 张耀文¹, 王铁杰², 毕开顺¹, 李清^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 深圳市药品检验所, 广东深圳 518057)

[摘要] **目的:** 建立 1-苯基-3-甲基-5-吡唑琳酮 (PMP) 柱前衍生高效液相色谱法分离检测 4 种单糖和 2 种糖醛酸的方法。**方法:** 采用水提醇沉法提取酸枣仁汤中多糖, 中空纤维超滤膜法纯化, 然后用硫酸水解, 1-苯基-3-甲基-5-吡唑琳酮 (PMP) 柱前衍生后, 利用反相高效液相色谱法, 分析单糖的 PMP 衍生物。以单糖 PMP 衍生物的峰面积大小为指标, 分别对衍生化反应中反应时间、PMP 与 NaOH 的用量、中和温度和盐酸用量进行考察, 从而得到较佳的样品衍生化制备条件。并将该方法应用于酸枣仁汤中总多糖 (SDP)、相对分子量 < 10 kDa 多糖 (SDP-1)、相对分子量为 10 ~ 50 kDa 多糖 (SDP-2)、相对分子量 > 50 kDa 多糖 (SDP-3) 的单糖组成分析和含量测定。**结果:** SDP 和 SDP-1 均由 Man-GlcUA-GalUA-Glc-Gal-Ara 组成, 摩尔比分别为 1:0.8:0.7:3.4:3.3:2.1 和 1:0.5:0.3:0.6:0.6:0.4。SDP-2 由 Man-Glc-Gal-Ara 组成, 摩尔比为 1:2.0:0.2:0.3; SDP-3 由 Man-Glc 组成, 摩尔比为 1:5.4。**结论:** 方法准确、灵敏度高, 适用于酸枣仁汤中多糖的单糖组成测定。

[关键词] 酸枣仁汤; 单糖; 多糖; 衍生化; 高效液相

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0121-06

[doi] 10.11653/syjf2013170121

Analysis of Monosaccharide Compositions in Suanzaoren Decoction Polysaccharides by Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography

LIU Yu¹, LOU Yan¹, ZHANG Yao-wen¹, WANG Tie-jie², BI Kai-shun¹, LI Qing^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China)

[Abstract] **Objective:** A method of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization high performance liquid chromatographic was established for analysis of four kinds of monosaccharide and two kinds of galacturonic acid and glucouronic acid. **Method:** The polysaccharides were extracted by hot distilled water, precipitated by alcohol. The product was purified by ultrafiltration and formed monosaccharides by sulfuric acid hydrolysis. The hydrolysate reacted with PMP to produce the PMP derivatives that were analyzed by HPLC. The optimum conditions of derivatization were determined by studying the quantity of PMP and sodium hydroxide, reaction time, reaction temperature and hydrochloric acid consumption during neutralization. Under the optimum mobile phase which was acetonitrile-phosphate buffer (pH 6.8), PMP derivatives can be separated successfully. This method was applied to monosaccharide compositions analysis of SDP, SDP-1, SDP-2, SDP-3. **Result:** The results showed that three polysaccharides (SDP-1, SDP-2, SDP-3) were obtained by ultrafiltration, molecular weights were less than 10, 10-50 kDa and more than 50 kDa respectively. Both SDP and SDP-1 were composed of Man-GlcUA-GalUA-Glc-Gal-Ara in molar ratio of 1:0.8:0.7:3.4:3.3:2.1 and 1:0.5:0.3:0.6:0.6:0.4; SDP-2

[收稿日期] 20130114(011)

[基金项目] 2012 年辽宁省高等学校重要质量控制关键技术创新团队项目(LT2012018)

[第一作者] 刘宇, 硕士, 从事酸枣仁汤多糖的研究, Tel: 024-23986259, E-mail: liuyuamysky@163.com

[通讯作者] * 李清, 博士, 副教授, 从事中药质量控制、中药药代动力学研究, Tel:024-23986259, E-mail: lqyx@hotmail.com

was composed of Man-Glc-Gal-Ara in molar ratio of 1:2.0:0.2:0.3; SDP-3 was composed of Man-Glc in molar ratio of 1:5.4. **Conclusion:** The method is accurate and sensitive, thus suitable for the analysis of monosaccharide composition of Suanzaoren Decoction polysaccharide.

[Key words] Suanzaoren Decoction; monosaccharide; polysaccharide; derivatization; HPLC

酸枣仁汤出自《金匮要略》^[1],由酸枣仁(54 g)、川芎(18 g)、茯苓(18 g)、知母(18 g)和甘草(9 g)组成,是中医临床首选滋养安神方剂。方中酸枣仁养肝血、安心神为君药;川芎调血养肝,茯苓宁心安神为臣药;知母滋阴降火、清热除烦为佐药;甘草和中缓肝为使药。本方临床使用,主要用于肝血不足、虚火内扰心神所致心烦失眠等症。酸枣仁中的黄酮、皂苷、油脂和生物碱具有镇静催眠作用^[2-16],对其多糖的研究却鲜有报道^[17-28]。课题组前期研究已证实,酸枣仁汤中多糖具有镇静催眠作用,但目前对酸枣仁汤中多糖的单糖组成研究却未见报道。多糖中的单糖组成测定可以提供多糖基本信息,也是控制多糖质量标准的重要环节。本文采用水提醇沉法提取酸枣仁汤多糖,中空纤维超滤膜法纯化,然后用硫酸水解,1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生后,利用反相高效液相色谱法,分析单糖的PMP衍生物,并首次对酸枣仁汤中总多糖(SDP),相对分子量<10 kDa多糖(SDP-1),相对分子量为10~50 kDa多糖(SDP-2),相对分子量>50 kDa多糖(SDP-3)进行单糖组成和含量测定研究,为进一步阐述多糖基本结构信息提供依据。

1 材料

1.1 仪器 L-2000型日立高效液相色谱仪(日本日立公司),Hitachi L-2130泵(日本日立公司),Hitachi L-2400紫外检测器(日本日立公司),D-2000Elite型色谱数据工作站(日本日立公司),BS110S型电子分析天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试剂 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(天津科密欧化学试剂有限公司,纯度99%),磷酸氢二钾(分析纯,汕头市西陇化工厂有限公司),氢氧化钠(分析纯,天津市大茂化学试剂厂),甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司),乙腈(色谱纯,山东禹王实业有限公司),盐酸(分析纯,国药集团化学试剂),硫酸(分析纯,国药集团化学试剂),蒸馏水(自制)。

1.3 对照品 葡萄糖(中国食品药品检定研究院,批号110833-200904,纯度>98%)、甘露糖(中国食品药品检定研究院,批号140651-200602,纯度>98%)、半乳糖(中国食品药品检定研究院,批号

100226-201105,纯度>98%)、半乳糖醛酸(中国食品药品检定研究院,批号111646-200301,纯度>98%)、葡萄糖醛酸(中国食品药品检定研究院,批号140648-200602,纯度>98%)、阿拉伯糖(中国食品药品检定研究院,批号1506-200001,纯度>98%)。

1.4 药材 酸枣仁、川芎、茯苓、知母、甘草均购自沈阳市同仁堂药房,经沈阳药科大学中药学院贾英副教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 酸枣仁汤多糖的提取 将酸枣仁汤样品干燥、研碎、过40目筛后,按处方配比(炒酸枣仁24 g、茯苓8 g、川芎8 g、知母8 g、甘草4 g)精密称定52 g,置100 mL圆底烧瓶中,置索氏提取器用10倍石油醚(60~65℃)脱脂4 h,残渣取出,用25倍70%的乙醇水浴(85~90℃)回流提取3 h除去皂苷、黄酮等成分,残渣再经过干燥处理,分别加10,8倍体积水浸提两次(60~65℃),每次1 h,合并滤液,抽滤,溶液经旋转蒸发器浓缩(60~65℃)后,加80%乙醇进行醇沉处理得到絮状沉淀,4℃冷藏过夜,3 000 r·min⁻¹离心10 min得到沉淀,室温干燥后,溶于水再进行3次醇沉,得到黄褐色多糖样品(suanzaoren decoction polysaccharides,SDP)。

2.2 酸枣仁汤多糖的分离纯化 将2.1项下处理得到的多糖样品加水溶解,依次用50,10 kDa的超滤膜进行超滤处理。所得截留液分别收集、浓缩、冻干,得到不同相对分子量范围的酸枣仁汤多糖SDP-1,SDP-2,SDP-3。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 取对照品D-甘露糖约12.5 mg,D-葡萄糖醛酸糖约10 mg,D-半乳糖醛酸约10 mg,D-葡萄糖约50 mg,D-半乳糖约50 mg和D-阿拉伯糖约12.5 mg,精密称定,分别置5 mL量瓶中,用水溶解并定容至刻度,作为对照品储备液。分别吸取上述储备液各1 mL,置于10 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得D-甘露糖,D-葡萄糖醛酸,D-半乳糖醛酸,D-葡萄糖,D-半乳糖和D-阿拉伯糖质量浓度分别为250.8,200.0,202.9,1 005,1 002,251.3 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取酸枣仁汤总多糖粉末约 125 mg,SDP-1 约 125 mg,SDP-2 约 125 mg 和 SDP-3 约 125 mg 精密称定,分别置 25 mL 量瓶中,用水溶解并定容至刻度,即得质量浓度分别为 2.50,2.50,2.50,2.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酸枣仁汤多糖溶液。

2.3.3 混合对照品溶液衍生化产物的制备 取混合对照品溶液各 500 μL ,置 10 mL 具塞离心试管中,依次加入 500 μL 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 和 500 μL 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMP,涡旋混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 90 min,取出,置冰水浴中 10 min 终止反应,再加入 500 μL 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液中和,加入氯仿萃取 3 次,每次 2 mL 上层水相用 0.45 μm 滤膜过滤即可进样分析。

2.3.4 样品溶液衍生化产物的制备 分别吸取 1 mL 质量浓度均为 2.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酸枣仁汤总多糖溶液 SDP,SDP-1,SDP-2,SDP-3 样品溶液于 10 mL 具塞离心试管中,加入 100 μL 的 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 水解,涡旋混匀,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 6 h,取出,置冷水浴中 10 min 终止反应,再加入 NaOH 溶液中和至中性,然后按 2.3.3 法进行衍生化反应。

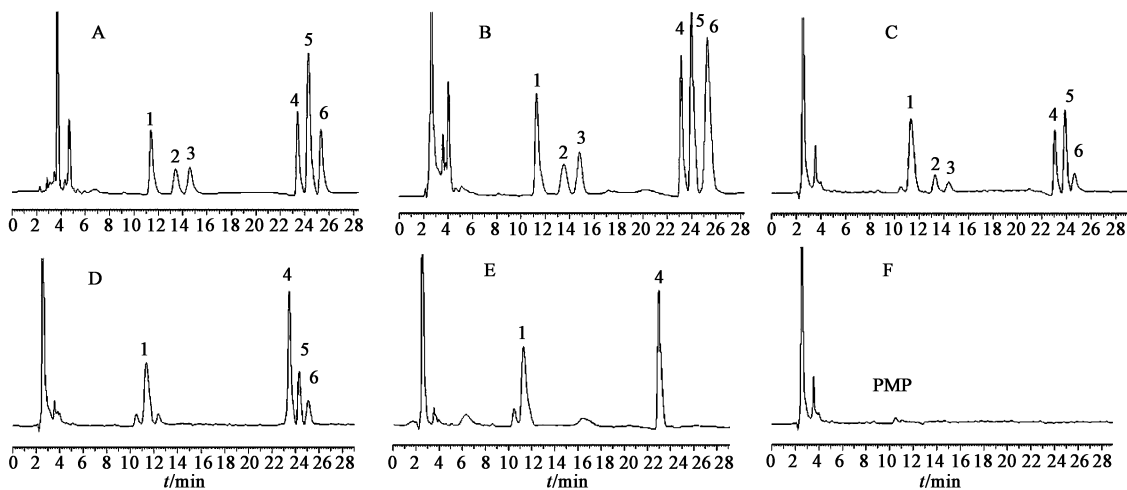
2.4 色谱条件 Kromasil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm ,大连中汇达公司),流动相乙腈(A),磷酸盐缓冲液(pH 6.8)(B),梯度洗脱(0 ~

10 min, 20% A;11 ~ 15 min, 20% ~ 10% A;16 ~ 18 min, 10% ~ 25% A;19 ~ 23 min, 25% ~ 15% A;24 ~ 25 min, 15% A;26 ~ 30 min, 15% ~ 20% A),流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 254 nm,进样量 20 μL 。

2.5 方法学考察

2.5.1 系统适用性试验 按 2.4 项下条件分别取混合单糖对照品,SDP,SDP-1,SDP-2,SDP-3 各自的衍生物以及 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMP 各 20 μL 进样分析,结果表明 PMP,*D*-甘露糖,*D*-葡萄糖醛酸,*D*-半乳糖醛酸,*D*-葡萄糖,*D*-半乳糖,*D*-阿拉伯糖的保留时间分别为 10.38, 11.41, 13.30, 14.69, 23.22, 24.53, 25.702 min。4 种单糖和 2 种糖醛酸的色谱峰分离度均 >1.5 ,各色谱峰理论塔板数 $>5\ 000$,拖尾因子在 0.95 ~ 1.05。色谱图见图 1。

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 1.50 mL,分别置 2 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得一系列不同质量浓度的混合对照品溶液,按 2.3.3 项下衍生化产物的制备方法进行衍生化,2.4 项下色谱条件测定,记录色谱图和峰面积。以各成分峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。各成分的回归方程、相关系数见表 1。



A. 对照品;B. 样品 SDP;C. 样品 SDP-1;D. 样品 SDP-2;E. 样品 SDP-3;F. 阴性对照 PMP;

1. *D*-甘露糖(Man);2. *D*-葡萄糖醛酸(GlcUA);3. *D*-半乳糖醛酸(GalUA);4. *D*-葡萄糖(Glc);5. *D*-半乳糖(Gal);6. *D*-阿拉伯糖(Ara)

图 1 酸枣仁汤中多糖的单糖组成 HPLC

2.5.3 精密度试验 取同一混合对照品溶液 500 μL (*D*-甘露糖质量浓度 0.125 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *D*-葡萄糖醛酸质量浓度 0.100 0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *D*-半乳糖醛酸质量浓度为 0.101 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *D*-葡萄糖质量浓度为 0.502 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *D*-半乳糖质量浓度 0.501 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 *D*-阿拉伯糖质量浓度 0.125 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),按 2.3.3 项下衍生

化产物的制备方法进行衍生化,按 2.4 项下色谱条件连续进样 6 次,记录 *D*-甘露糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、和 *D*-阿拉伯糖峰面积并计算 RSD,结果表明 RSD 分别为 1.5%, 2.6%, 2.5%, 1.2%, 2.2%, 表明仪器精密度良好。

表 1 单糖线性方程

单糖	线性方程	线性范围/ μg	r
甘露糖	$Y = 3.512 \times 10^4 X + 2.074 \times 10^5$	0.125 4 ~ 3.761	0.999 0
半乳糖醛酸	$Y = 2.899 \times 10^4 X + 3.735 \times 10^3$	0.100 0 ~ 3.000	0.999 2
葡萄糖醛酸	$Y = 3.423 \times 10^4 X + 9.11 \times 10^4$	0.101 5 ~ 3.045	0.999 4
半乳糖	$Y = 8.26 \times 10^3 X + 5.643 \times 10^5$	0.502 0 ~ 15.08	0.999 2
葡萄糖	$Y = 2.001 \times 10^4 X + 5.239 \times 10^5$	0.501 0 ~ 15.04	0.999 0
阿拉伯糖	$Y = 4.434 \times 10^4 X - 3.002 \times 10^5$	0.125 7 ~ 3.770	0.999 6

2.5.4 重复性试验 取 SDP-1 供试品溶液 6 份,各 500 μL ,按 2.3.4 项下方法平行制备供试品溶液,按 2.4 项下条件连续进样 6 次,记录 *D*-甘露糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、和 *D*-阿拉伯糖含量并计算 RSD,结果表明 RSD 分别为 2.7% ,2.2% ,2.3% ,3.0% ,3.0% ,2.0% ,表明重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取 SDP-1 供试品溶液 500 μL ,按 2.3.4 项下方法衍生化,在 0,2,4,6,8,12 h,按 2.4 项下条件进样分析,记录 *D*-甘露糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、和 *D*-阿拉伯糖的峰面积并计算 RSD,结果表明 RSD 分别为 2.5% ,2.6% ,2.7% ,3.0% ,1.5% ,2.3% ,表明供试品溶液的衍生化溶液在 12 h 内稳定。

2.5.6 回收率试验 取已知浓度 SDP-1 供试品溶液 9 份,各 250 μL ,按高(150%)、中(100%)、低(50%)3 个浓度分别精密加入混合对照品溶液适量,制备每一质量浓度的溶液各 3 份,按 2.4 项下色谱条件进样分析。*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、和 *D*-阿拉伯糖平均回收率分别为 98.7% (RSD 1.2%) ,98.7% (RSD 1.0%) ,97.8% (RSD 1.3%) ,98.3% (RSD 1.1%) ,97.8% (RSD 1.3%) ,96.4% (RSD 0.8%) 。结果见表 2。

表 2 酸枣仁汤中各单糖加样回收率试验

单糖组成	原含量	加样量	测得量	回收率	平均回	RSD
	/ mg	/ mg	/ mg	/ $\%$	收率/ $\%$	/ $\%$
Man	26.11	13.00	38.9	98.5	98.7	1.2
	26.31	13.00	38.81	96.2		
	26.50	13.00	39.40	99.2		
	26.63	26.01	52.84	100.8		
	26.41	26.01	52.12	98.8		
	26.25	26.01	52.06	99.2		
	26.36	39.00	64.76	98.5		
	26.45	39.00	64.75	98.2		
	26.43	39.00	65.13	99.2		
	GlcUA	12.65	6.31	18.86		
12.70		6.31	18.90	99.4		
12.52		6.31	18.73	97.9		

续表 2

单糖组成	原含量	加样量	测得量	回收率	平均回	RSD
	/ mg	/ mg	/ mg	/ $\%$	收率/ $\%$	/ $\%$
GalUA	12.13	12.60	24.63	99.2	97.8	1.3
	12.9	12.60	25.10	96.9		
	13.05	12.60	25.25	96.9		
	12.71	18.81	31.22	98.5		
	13.03	18.81	31.44	98.0		
	12.64	18.81	31.35	99.4		
	8.81	4.42	13.13	97.7		
	8.40	4.42	12.72	97.4		
	8.52	4.42	12.84	97.9		
	8.61	8.80	17.21	98.2		
	8.42	8.80	17.22	100.3		
	8.81	8.80	17.41	97.7		
	8.52	13.20	21.32	96.5		
	8.71	13.20	21.71	98.3		
Glc	8.92	13.20	21.61	96.0	98.3	1.1
	14.33	7.21	21.43	98.6		
	14.44	7.21	21.44	96.6		
	14.32	7.21	21.52	99.5		
	14.21	14.40	28.31	97.9		
	14.32	14.40	28.52	98.4		
	14.61	14.40	29.01	99.6		
	14.34	21.61	35.45	97.5		
	14.53	21.61	36.14	99.4		
	14.62	21.61	35.63	97.2		
Gal	16.34	8.20	24.24	96.3	97.8	1.3
	16.22	8.20	24.12	96.5		
	16.32	8.20	24.32	97.3		
	16.22	16.41	32.33	98.0		
	16.61	16.41	32.52	97.0		
	16.33	16.41	32.34	97.7		
	16.34	24.60	40.54	98.4		
	16.80	24.60	41.00	98.6		
	16.31	24.60	41.01	100.5		
	Ara	18.42	9.21	27.43		
18.00		9.21	26.90	96.6		
19.41		9.21	28.32	96.6		
18.55		18.50	36.45	96.9		
18.94		18.50	36.64	95.8		
18.12		18.50	36.02	96.9		
18.71		27.71	45.02	95.1		
18.52		27.71	45.03	95.8		
18.54		27.71	45.05	95.8		

2.6 样品含量测定 按 2.3.2 项下方法操作,制备供试品溶液,按 2.4 项下条件进样分析,记录色谱峰面积,外标一点法计算酸枣仁汤中糖分的组成和含量。结果分别见表 3,4。

表 3 酸枣仁汤中 SDP, SDP-1, SDP-2, SDP-3 的单糖组成

多糖	单糖组成	摩尔比
SDP	Man-GlcUA-GalUA-Glc-Gal-Ara	1:0.8:0.7:3.4:3.4:2.1
SDP-1	Man-GlcUA-GalUA-Glc-Gal-Ara	1:0.5:0.3:0.6:0.6:0.4
SDP-2	Man-Glc-Gal-Ara	1:2.0:0.2:0.3
SDP-3	Man-Glc	1:5.4

表 4 样品多糖中各单糖的含量测定 ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

组成	SDP	SDP-1	SDP-2	SDP-3
甘露糖	92.3	52.33	74.33	54.33
半乳糖醛酸	71.56	25.43	-	-
葡萄糖醛酸	66.50	17.33	-	-
半乳糖	309.8	29.10	146.5	293.1
葡萄糖	310.1	32.57	15.37	-
阿拉伯糖	195.4	185.0	22.47	-

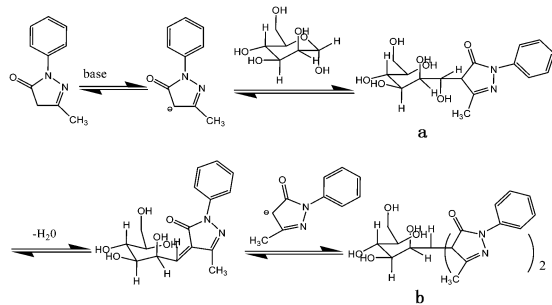
3 讨论

缓冲液 pH 对糖衍生物的分离有重要影响,实验进一步考察了醋酸缓冲液 (pH 5.4) 和磷酸缓冲液 (pH 6.8) 对各种糖衍生物的保留值及分离效果的影响。结果表明,采用 pH 为 6.8 的磷酸缓冲液时分离效果最佳,分析时间较短,出峰间距较均匀。

由图 2 衍生化反应可知 1 mol 单糖与 2 mol 的 PMP 结合,为使衍生化反应完全进行,可增加衍生化试剂的用量。本实验取 500 μL 的混合单糖标准液,加 500 μL 0.50 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMP 甲醇溶液,控制 PMP 的用量为混合单糖总量的 60 倍;随后考察了 0.50 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液用量,体积分别为 250, 500, 750 μL ,结果表明,NaOH 溶液用量为 500 μL 时各种单糖的 PMP 衍生产物的峰面积均为最大值,故确定 NaOH 溶液加入量为 500 μL 。

在其他条件(如 2.3.3 所述)相同的情况下,对衍生化反应时间进行了考察,分别为 30, 60, 90, 120 min。结果表明,反应时间为 90 min 时,各种单糖的 PMP 衍生产物的峰面积均为最大值,故衍生化反应时间选为 90 min。

在衍生反应完成后,应对反应体系中的碱进行中和,中和温度对衍生化产物的产率有较大影响,本实验分别考察了静置冷却至室温和用冷水浴冷却 10 min 两个温度条件。实验结果表明,采用中和温



a. 部分衍生产物; b. 完全衍生产物

度为冷水浴冷却 10 min,各种单糖的 PMP 衍生产物的峰面积均稳定。文献一般采用冷却至室温,但是本研究发现冷却至室温会使 b 物质(完全衍生产物)产率降低,转化成 a 物质(部分衍生产物)。因此,确定中和温度为冷水浴 0 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 10 min。

考察了衍生化反应温度,分别采用 50, 60, 70, 80, 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件,然后按 2.4 项下条件进样分析,记录峰面积,结果表明在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下进行衍生化反应时,所得各单糖峰面积最大,因此选择 70 $^{\circ}\text{C}$ 为衍生化反应温度。

在衍生化反应中加入过量的 PMP,衍生反应完成后,需要用氯仿萃取去除过量的 PMP。取供试品溶液各 500 μL ,按 2.3.4 项下进行衍生化,加入氯仿进行萃取,每次 2 mL,考察萃取次数分别为 1, 2, 3 次,按 2.4 项下条件进行测定,记录峰面积,结果表明当萃取 3 次后即可去掉 99.0% 的 PMP,故确定萃取次数为 3 次。

由图 2 可知,单糖的 PMP 衍生产物(b)的化学结构中含有碱性基团,pH 对单糖的 PMP 衍生产物解离程度有影响。pH > 7 不利于单糖 PMP 衍生物的解离,在氯仿中有一定溶解度,萃取后会增大单糖衍生物的损失。pH 太低 (< 4),在酸性条件下衍生产物不太稳定,会转化生成部分衍生化产物(a),从而增大单糖衍生物的损失。比较了不同体积(250, 500, 750 μL) 的 0.30 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 中和后的萃取效果,结果表明使用 500 μL 的盐酸中和时各种单糖的 PMP 衍生产物的峰面积均为最大值,故确定 HCl 溶液加入量为 500 μL 。

GC 衍生化法是目前测定单糖组成最常用的方法,但测定过程中会使单糖异构化,转化为三甲基硅醚衍生物,从而产生多个峰,定性定量不准确。与 GC^[18-19] 法相比, HPLC^[20-21] 法分析单糖时没有挥发性限制的问题,同时 HPLC 法的多种分离模式可满足不同单糖的分离分析。在众多的衍生化方法中,

1-苯基-3-甲基-5-吡啶琳酮(PMP)柱前衍生化高效液相色谱法因其反应条件温和、产物无立体异构、紫外检测灵敏度高优点,从而得到较为广泛的应用。本实验采用 PMP 柱前衍生 HPLC 法分析酸枣仁汤中多糖的单糖的组成,该方法准确,灵敏度高。

[参考文献]

[1] 张仲景. 金匱要略方论[M]. 北京:人民卫生出版社, 1972;21.

[2] 陈百泉,杜钢军,许启泰,等. 酸枣仁皂苷的镇静催眠作用[J]. 中药材,2002,25(6):429.

[3] 郭胜民,范晓雯,何建伟,等. 酸枣仁总黄酮的中枢抑制作用[J]. 中药材,1998,21(11):578.

[4] 郭胜民,范晓雯,何建伟,等. 酸枣仁总皂甙的中枢抑制作用[J]. 西北医学杂志,1996,(8)11:166.

[5] Woo Siekwo. The Structure of Spinosin (2-O-glucosyl swertisin) from *Zizyphus vulgaris* var. *spinosa* [J]. *Phytochemis*, 1979,18(2):353.

[6] 李会军,李萍,余国奠,等. 酸枣的研究进展及开发前景[J]. 中国野生植物资源,1999, 18(3):17.

[7] 赵启铎,舒乐新,王颖,等. 酸枣仁油对行为绝望小鼠模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(18):190.

[8] 乔卫. 酸枣仁镇静催眠有效成分的研究[D]. 天津:天津医科大,2002.

[9] 石世德,周民伟,李建军,等. 安可梦口服液镇静催眠作用的实验研究[J]. 广东药学院学报,2004, 20(6):654.

[10] 霍艳双,陈晓辉,李康,等. 北五味子的镇静、催眠作用[J]. 沈阳药科大学学报,2005, 22(2):126.

[11] Peng W H. Anxiolytic effect of seed of *Zizyphus jujuba* in mouse models of anxiety [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000,72(3):435.

[12] Zhao Xin, Cui Xiang Yu. Tetrandrine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid from Chinese herb Radix, augmented the hypnotic effect of pentobarbital through serotonergic system [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 506(2):101.

[13] H Roger Lijnen, Kathleen, Freson, Marc F Hoylaerts, et al. Effect of VPAC1 Blockade on adipose tissue formation and composition in mouse models of nutritionally induced obesity [J]. *J Obes*, 2010; 2010 pii:359527.

[14] E Nogueira, V S Vassilieff. Hypnotic, anticonvulsant

and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis*. Involvement of GABA A-system [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 70(3):275.

[15] 马进杰,刘萍,马百平,等. 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(3):206.

[16] 李兰芳,张魁,吴树勋,等. 酸枣仁中多糖含量的测定[J]. 河北中药, 1996, 18(4):20.

[17] 马宝瑕,陈新,邓军娥,等. 中药多糖研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2003, 23(6):42.

[18] 张艳萍,俞远志,张虹,等. 气相色谱分析生地黄多糖的单糖组成及其含量[J]. 中国中药杂志,2009, 34(4):419.

[19] 张威,何红波,张明,等. 糖脂乙酰酯衍生气相色谱法测定土壤水解陆单糖[J]. 土壤通报, 2008, 39(4):913.

[20] 颜军,郭晓强,邹晓勇,等. 非衍生化 HPLC 法分析银耳多糖中单糖组成的初步研究[J]. 食品科学,2007, 28(7):446.

[21] Meyer A, Raba C, Fischer K, et al. Ion-pair RP-HPLC determination of sugars, amino sugars, and uronic acids after derivatization with P-aminobenzoic acid [J]. *Anal Chem*, 2001 (73):2377.

[22] 颜军,郭晓强,李晓光,等. TLC 快速分析多糖的单糖组成[J]. 食品科学,2006, 27(12):603.

[23] 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.

[24] 张明月,邹一可,王彩云,等. 女贞子多糖的提取工艺及单糖组成[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(3):87.

[25] 涂艳艳. HPLC-DAD-ELSD 测定酸枣仁分散片中 4 种成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(22):152.

[26] 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.

[27] 刘刚,王辉,周建,等. 柱前衍生化毛细管气相色谱法分析松茸多糖的单糖组成[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(3):87.

[28] 邹一可,张明月,王彩云,等. 白茅根多糖 IC1 的分离及其相对分子质量和单糖组成的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):62.

[责任编辑 顾雪竹]