

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

邹一可, 张明月, 王彩云, 王东*

(辽宁中医药大学研究生院, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:分离纯化白茅根多糖,建立白茅根多糖相对分子质量的测定方法,并通过高效液相色谱法测定其单糖组成和摩尔比。方法:通过多次醇沉的方法对白茅根多糖进行分离纯化,得到白茅根多糖 IC1;采用高效液相色谱法,以右旋糖酐为标样,绘制多糖分子量的标准曲线,测定白茅根多糖 IC1 的相对分子质量;通过酸水解,使 IC1 水解成单糖,分析这些单糖的组成及其摩尔比。结果:经测定,白茅根多糖 IC1 的相对分子质量为 8 292. 2;白茅根多糖 IC1 由鼠李糖,木糖,果糖,甘露糖,葡萄糖 5 种单糖组成,其摩尔比为 1:11. 45:1. 26:1. 02:59. 23。结论:多次醇沉的方法对白茅根多糖进行分离,效果良好,操作简便。高效液相法测定白茅根多糖分子质量及单糖组成灵敏度高,重复性好。

[关键词] 白茅根;多糖;分离纯化;高效液相色谱法;相对分子质量;单糖组成;摩尔比

[中图分类号] R284. 1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0080-03

Determination of Molecular Weight and Analysis of Monosaccharide Composition in Isolation of Polysaccharide from Imperata Cylindrica

ZOU Yi-ke, ZHANG Ming-yue, WANG Cai-yun, WANG Dong*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To study on isolation the polysaccharide from Imperata cylindrica and to establish a method for the determination of the molecular weight of the polysaccharides in Imperata cylindrica, and to measure its composition and mole ratio through HPLC. **Method:** The polysaccharide in Imperata cylindrica was Isolated and

[收稿日期] 20110809(007)

[基金项目] 国家科技部重大创制候选药物项目(2009ZX09103-354)

[第一作者] 邹一可, 硕士, 从事中药制剂分析, Tel:15042401012, E-mail:zouyike_3399@163.com

[通讯作者] *王东, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础和质量标准研究, Tel:13842099959, E-mail:wedtem@163.com

Kromasil C₁₈ 柱未能使本文中所检测的 5 个成分均达到基线分离,快速分离柱 Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱能较好的分离本品中上述 5 个成分。在本文所确定的检测条件下,所测定的 5 个成分与相邻色谱峰的分度度 > 1. 5。

本文采用 PDA 检测器对样品中所检测的 5 个成分进行了峰纯度验证,结果表明在本文所确定的检测条件下,样品中所测定的 5 个成分不含其他干扰成分。

针对所采用的色谱条件考察了不同柱温、不同流速、不同进样量和不同仪器,结果表明本文所采用的色谱条件耐用性良好。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:61, 70.
- [2] 杨孝容,向清祥,熊俊如,等. HPLC 测定柏子养心丸中五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(11):1558.
- [3] 冯华,张超云,邹孔强. HPLC 色谱法测定枣仁安神片中五味子醇甲的含量[J]. 中医药导报,2009,15(1):82.
- [4] 杨孝容,向清祥,陈稼轩. 高效液相色谱法测定五味子和含五味子的制剂中五味子乙素及多种活性成分时流动相体系的选择[J]. 色谱,2009,3:313.
- [5] 张延妮,岳宣峰,王喆之. 反相高效液相色谱同时测定五味子中五味子醇甲、五味子酯甲和五味子乙素的含量[J]. 分析科学学报,2007,23(1):41.

[责任编辑 蔡仲德]

purified through the way of the staged alcohol deposition. Dextran was used as standard sample to draw the molecular weight standard curve, and the molecular weight of Imperata cylindrica polysaccharides was determined by HPLC, the polysaccharide was hydrolyzed by acid to analyze monosaccharide composition and the mole ratio by HPLC. **Result:** The molecular weight of Imperata cylindrica polysaccharide was 8 292. 2. According to HPLC IC1 was composed of Rhamnose, Xylose, Fructose, Mannose and Glucose, the mole ratio of these monosaccharides was 1: 11. 45: 1. 26: 1. 02: 59. 23. **Conclusion:** This method is simple accurate and sensitive.

[**Key words**] *Imperata cylindrica*; polysaccharide; isolation and purification; HPLC; molecular weight; monosaccharide composition; mole ratio

白茅根为禾本科植物白茅的根茎^[1]。始载于《神农本草经》，味甘，性寒，具有凉血止血、清热利尿之功。用于治疗吐血、淋病、小便不利、水肿和黄疸等^[2]。前期实验表明白茅根粗多糖的水提液有明显的免疫调节作用，因此，利用现代科学技术和方法进行白茅根多糖的系统研究，是一项有重要学术意义和应用前景的工作。本文通过多次醇沉法对白茅根多糖进行分离纯化，高效液相色谱法测定其分子质量及其单糖组成和摩尔比。

1 材料

1.1 仪器 RE52CS-1 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), 101 型电热鼓风干燥箱, 1/10 万电子分析天平, 恒温水浴锅, 无油静音空气泵(天津市华生分析仪器), 日本岛津高效液相色谱系统(LC-6ATvp 输液泵, SEDEX 75 蒸发光散射检测器, 柱温箱, N2000 工作站)。

1.2 试剂 白茅根药材经辽宁中医药大学药学院王冰教授鉴定本品为禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. 的干燥根茎。右旋糖酐标准样品(Dextran), 生化纯, (中国药品生物制品检定所) 相对分子质量分别为 180, 2 500, 4 600, 7 100, 10 000, 21 400, 41 100, 84 400, 133 800, 2 000 000。D-葡萄糖(分析纯), D-甘露糖(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20080521), D-鼠李糖(国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20080508), D-半乳糖(国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20080721), D-木糖(国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20080417), D-果糖(国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20080307), L-阿拉伯糖(Sigma), L-树胶醛糖(生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20070926)。其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白茅根多糖的分离 称取白茅根药材 500 g, 95% 乙醇脱脂, 静置 24 h, 过滤, 滤渣晾干, 滤渣加 10 倍量水于沸水浴中提 3 h, 放至室温离心除去淀

粉沉淀, 上清液 50 °C 减压浓缩, 80% 乙醇进行醇沉, 放置 8 h, 离心, 过滤, 晾干, 得到棕色白茅根总多糖固体^[3]。将其溶解并反复进行醇沉操作, 直至得到白色固体, 达到初步分离的目的, 经 HPLC 分析为单一多糖, 命名为 IC1, 见图 1。

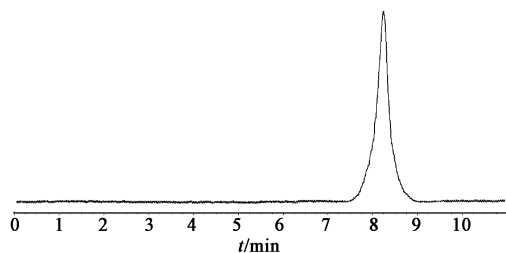


图1 白茅根标准单糖

2.2 HPLC 法测定 IC1 的相对分子质量^[4-5]

2.2.1 色谱条件 PL aquagel-OHMIXED (7.5 mm × 300 mm, 8 μm) 色谱柱, 柱温 25 °C, 流动相为纯净水, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 蒸发光散射检测器。

2.2.2 待测样品溶液的制备 精密称取 50 mg 白茅根多糖 IC1, 于 10 mL 量瓶中, 加纯净水约 5 mL, 超声处理 10 min, 用纯净水稀释至刻度, 配制成 5 g · L⁻¹ 的溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为待测样品溶液。

2.2.3 右旋糖酐标准曲线的制备 精密称取右旋糖酐标样(D₁ ~ D₈), 用纯净水配成 5 g · L⁻¹ 的溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为对照品溶液。分别进样 20 μL, 测得保留时间, 见表 1。以保留时间为横坐标, 分子质量对数值为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程 $Y = -1.312 X + 14.735$ ($r = 0.997$)。结果表明, 葡聚糖相对分子质量在 2 500 ~ 133 800 具有良好线性。

2.2.4 白茅根多糖 IC1 分子量测定 将 2.2.2 项下待测样品溶液, 在上述色谱条件下进样, 计算出分子质量, 白茅根多糖平均相对分子质量 8 292. 2, RSD 0. 925% ($n = 6$)。

表 1 各标样的保留时间

右旋糖酐	t/min	相对分子质量对数
D ₁	8.648	3.398
D ₂	8.432	3.663
D ₃	8.240	3.851
D ₄	8.190	4.000
D ₅	7.982	4.330
D ₆	7.748	4.614
D ₇	7.3432	4.926
D ₈	7.332	5.126

2.3 HPLC 法测定白茅根多糖 IC1 的单糖组成^[6]

2.3.1 色谱条件 COSMOSIL PACKED COLUMN Sugar-D 色谱柱,流动相乙腈-水(90:10),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,柱压 2.7 MPa,检测器为蒸发光散射检测器。

2.3.2 白茅根多糖 IC1 的水解 取适量白茅根多糖 IC1 固体,置于具塞锥形瓶中,加入 2 mol·L⁻¹ 硫酸 40 mL,于 100 ℃ 水浴锅中酸水解 5 h,取出晾至室温,用碳酸钡调至中性,加热除去碳酸,离心除去硫酸钡沉淀,将滤液浓缩,备用。

2.3.3 单糖对照品溶液的制备 精密称取葡萄糖,果糖、木糖、鼠李糖、甘露糖各 50 mg 于 10 mL 量瓶中,加纯净水约 5 mL,超声处理 10 min,用纯净水稀释至刻度,配制成 5 g·L⁻¹ 的溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为对照品溶液。

2.3.4 实验方法 将 2.3.2 项下待测样品溶液和 2.2.3 项下对照品溶液,分别精密吸取 10 μL,在上述色谱条件下进样,测得 5 种单糖保留时间分别为鼠李糖 8.540 min,木糖 12.382 min,果糖 15.782 min,甘露糖 20.398 min,葡萄糖 25.232 min,见图 2。

经对照,白茅根多糖 IC1 由鼠李糖,木糖,果糖,甘露糖,葡萄糖 5 种单糖组成。其摩尔比为 1:11.45:1.26:1.02:59.23。

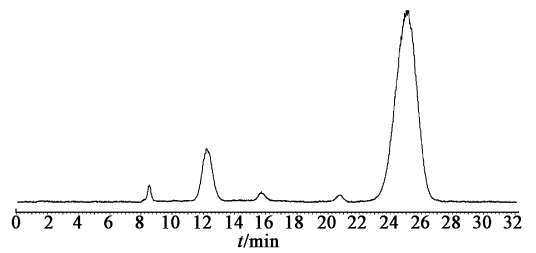


图 2 白茅根水解后单糖组成

3 讨论

通过预实验发现采用多次醇沉的方法对白茅根多糖进行分离和纯化,效果良好,经 HPLC 检验为单一多糖,该方法较 DEAE 纤维素离子交换色谱法和凝胶色谱法简便,大大简化了实验。采用尺寸排阻色谱(SEC)又称为凝胶渗透色谱(GPC)测定多糖的相对分子质量,以混合物组分的分子大小进行分离,在选择色谱检测器的时候,多糖在紫外检测器中几乎无吸收峰,而蒸发光检测器用于挥发性低于流动相的任何样品组分,能有效地将各组分分离,故选择蒸发光检测器。白茅根多糖 IC1 由 5 种单糖组成,其中鼠李糖,果糖,甘露糖含量较小,木糖和葡萄糖含量较高。

[参考文献]

[1] 全红,周涛,方东海,等.白茅根的研究概况[J].中医药学报,1999(1):60.
 [2] 王进.白茅根的药理研究及临床新用[J].中国医药指南,2007,S1:44.
 [3] 李瑞,沈鸿.翻白草多糖提取工艺的研究[J].时珍国医国药,2006,17(12):2525.
 [4] 鲁萍,任莉,许爱华,等.HPLC 测定银杏外种皮多糖的分子质量及含量[J].中国中药杂志,2005,30(22):1749.
 [5] 任莉,许爱华,鲁萍,等.HPLC 法比较 2 种银杏外种皮多糖的相对分子质量及含量[J].中国新药杂志,2005,14(8):1027.
 [6] 许杜鹏,夏泉,刘刚,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.

[责任编辑 蔡仲德]