

HPCE 法分析百合多糖的单糖组成

高现朝^{1*}, 马宏伟²

(1. 河南省登封市食品药品检验所, 河南 登封 452470; 2. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003)

[摘要] 目的: 采用高效毛细管电泳法分析百合多糖的单糖组成。方法: 酸水解百合多糖, 以 α 萘胺为衍生试剂, 增强单糖在紫外区的吸收, $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼砂溶液 (pH9.5) 为缓冲液, 对所生成的单糖进行电泳分离; 以各单糖作对照, 峰增益法结合出峰时间比照, 确定百合多糖的单糖组成。结果: 百合多糖主要由葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、半乳糖组成。结论: 高效毛细管电泳法用于多糖的组成分析, 精度高, 操作方便。

[关键词] 高效毛细管电泳; 百合多糖; 峰增益法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0027-02

高效毛细管电泳(HPCE)技术具有样品用量少、时间短、灵敏度高、分离效果明显的特点, 在糖类物质的检测方面具有独特的优势。由于单糖在水溶液中解离能力极差, 在强碱条件下才能带上电荷。使用含硼砂的缓冲液会让单糖在较低的 pH 条件下带上足够的负电荷。不同的单糖在相同介质条件下与硼砂的络合物具有有效淌度的差异, 足以被毛细管电泳分开。单糖的紫外吸收很弱, 采用 α 萘胺为衍生试剂能够使其带上可被检测的基团^[1]。本实验采用 HPCE 技术分析了百合多糖的单糖组成。

1 仪器与试剂

Agilent CE 毛细管电泳仪, ChemStation 工作软件, 毛细管柱 $60 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$, (有效长度 53 cm), 河北永年光导纤维厂。

半乳糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖对照品, 购于南京康华医药科技实业中心, 试剂均为分析纯, 水为纯净水。

电泳条件: 缓冲液为 $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液 (pH9.5); 柱温 $22 \text{ }^\circ\text{C}$; 电压 16 kV ; 检测波长 200 nm , 压力进样, 压力 50 mbar , 进样时间 5 s ; 清洗液 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液、重蒸水。

2 方法与结果

2.1 衍生试剂的配制 称取 α 萘胺 143 mg 和 NaBH_3CN 35 mg , 溶于 $450 \mu\text{L}$ 无水甲醇中, 再加入 41

μL 冰醋酸, 即得。

2.2 单糖对照品溶液的制备 取各种单糖用重蒸水配成质量浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液。各取 1 mL 制成单糖对照品混合液。

2.3 样品溶液的制备 取百合多糖 20 mg , 加入 1 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 , 溶解后放入安瓿管中封管, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水解 8 h , 冷却后用碳酸钡完全中和, 放置过夜, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清液, 待衍生。各取多糖的水解液、单糖对照品混合液、单糖溶液 $200 \mu\text{L}$ 于安瓿管中, 分别加 $40 \mu\text{L}$ 衍生试剂, 封管, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温 2 h 衍生。然后各加入 1 mL 三氯甲烷和纯净水, 反复离心萃取 3 次, 分取上层水相, 滤过, 定容至 5 mL , 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取滤液作为供试品溶液。

百合多糖水溶液经过紫外一可见全波长扫描, 不含有蛋白质、核酸。

2.4 测定 测定单糖对照品混合液电泳图谱, 然后逐一加入 1 种单糖, 根据峰面积的变化, 确定对应的单糖。根据出峰时间及峰增益情况, 确定百合多糖的单糖组成, 结果见图 1~7。每个样品进样 3 次。由图谱可知, 百合多糖主要由鼠李糖、木糖、葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖组成。HPCE 用于多糖的组成分析, 精度高, 操作方便。

3 讨论

毛细管电泳分析操作中, 图谱质量和出峰时间的稳定性是影响其在中药分析中应用的主要问题, 经过大量实验, 我们发现样品的处理情况可显著影响毛细管电泳的图谱质量和出峰时间的稳定: 中药

[收稿日期] 2009-04-20

[通讯作者] * 高现朝, Tel: (0371) 62810659; E-mail: gichb@sohu.com

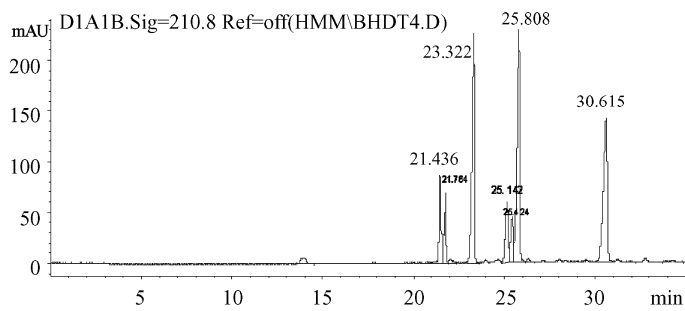


图 1 单糖混标的 HPCE 图谱

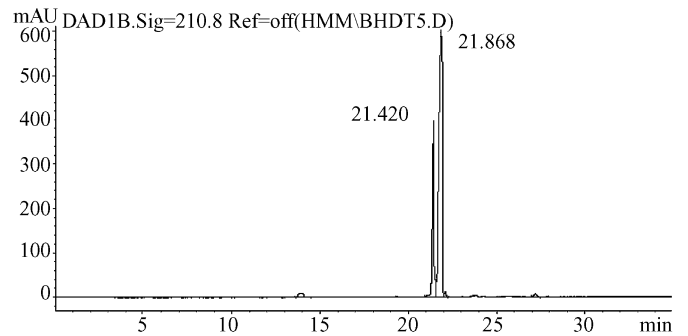


图 5 鼠李糖的 HPCE 图谱

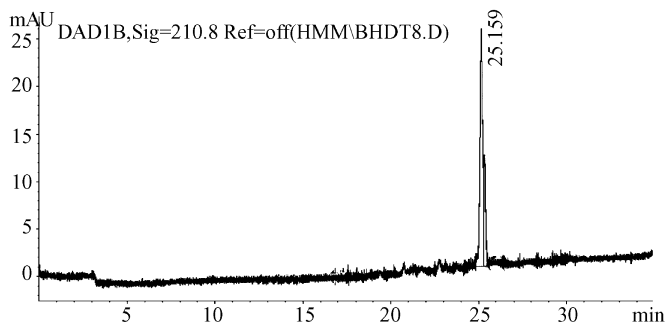


图 2 甘露糖的 HPCE 图谱

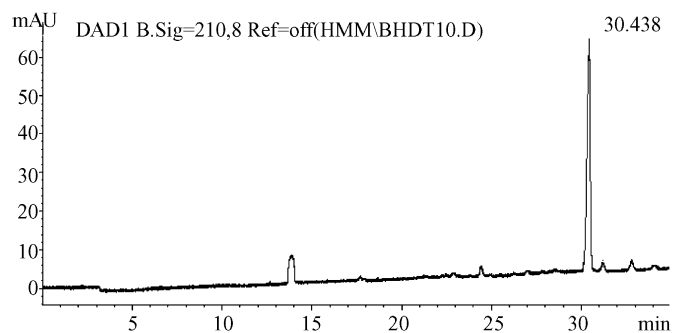


图 6 半乳糖的 HPCE 图谱

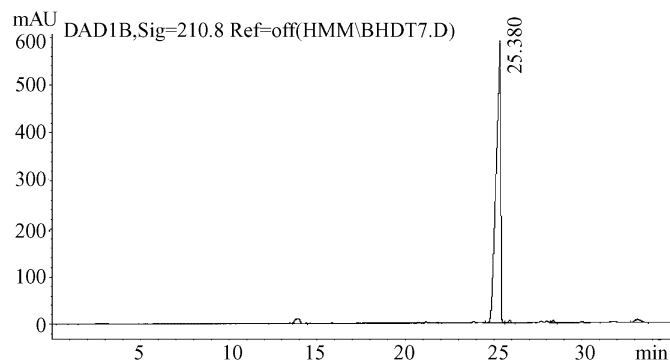


图 3 葡萄糖的 HPCE 图谱

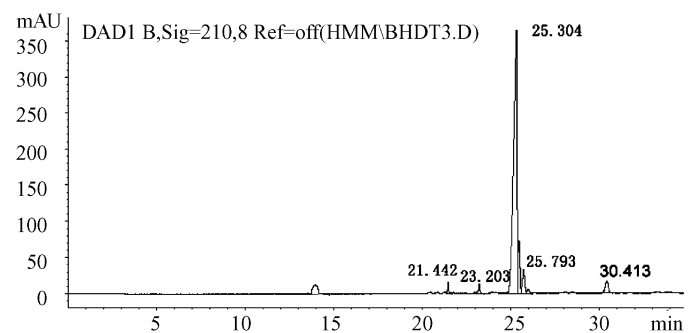


图 7 百合多糖的 HPCE 图谱

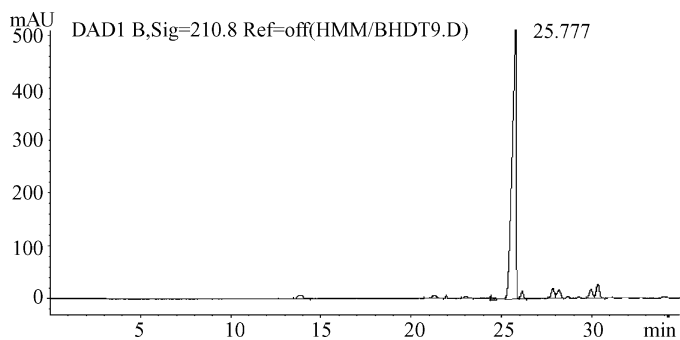


图 4 阿拉伯糖的 HPCE 图谱

样品水提液的图谱质量优于醇提液的图谱质量;水溶性有效部位的图谱质量优于整体提取物的图谱质量;每次进样前用buffer冲洗毛细管柱,有助于保持出峰时间的稳定性。通过定量分析,尚可以得到组成单糖的比例。

[参考文献]

- [1] 刘 婷,周光明. 多糖的提取和分析方法[J]. 化工时刊, 2008, 22(3): 66-70.
- [2] 季宇彬,陈学军,汲晨峰,等. 芦笋多糖提取-单糖组分分析及定量测定[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1159-1161.
- [3] 张海英,凌建亚,吕 鹏,等. 毛细管区带电泳定性分析蒙山九州虫草菌丝体和发酵液多糖水解液组分[J]. 复旦学报(医学版), 2007, 34(3): 446-448.