

高效凝胶过滤色谱法测定沙漠嘎多糖 的重均相对分子质量

董 焱, 史新元, 乔延江*
(北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立以高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)测定沙漠嘎多糖重均相对分子质量的方法。方法: 通过将沙漠嘎多糖分离、柱层析纯化, 获得沙漠嘎多糖 S1, 采用 HPGFC 法测定重均相对分子质量。色谱条件: Asahipak GS 色谱柱 GS-320 7E(250 mm × 7.5 mmID, 9 μm) 与 GS-620 7G(500 mm × 7.5 mm ID, 9 μm) 串联使用; 流动相: 0.003 mol·L⁻¹ 乙酸钠; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 示差折光检测器(RID)。结果: 沙漠嘎多糖重均相对分子质量的回归方程为: $\lg(M_w) = 10.167 - 0.287t_R$ ($r = -0.976$), 线性范围为: 10 000~500 000 Da, 测得沙漠嘎多糖 S1 重均相对分子质量约为 8.5×10^4 Da。结论: 为沙漠嘎多糖重均相对分子质量测定提供了简便、实用的分析方法。

[关键词] 沙漠嘎多糖; 高效凝胶过滤色谱法; 重均相对分子质量

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0011-02

沙漠嘎为菊科植物差把嘎蒿 (*Artemisia halodendron* Turcz. ex Bess), 别名盐蒿、沙蒿等, 在我国多分布于内蒙古、辽宁等地。味辛性温, 具有止咳平喘、祛痰、解表祛湿的功效, 多用于慢性气管炎、哮

喘、风寒感冒、风湿关节痛等症^[1]。目前文献主要是对其种子中的黄酮类成分进行了研究^[2-4], 多糖的研究尚属空白。本研究对沙漠嘎多糖进行了分离纯化, 获得 10 个组分, 以沙漠嘎多糖 S1 为例, 采用 HPGFC 法^[5], 以示差折光检测器检测, 建立沙漠嘎多糖重均相对分子质量测定的分析方法。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪(DGU-14A 脱气机, LC-10ADVP 并联泵, SIL-10AD 自动进样器, RID-10A 检测器), 标准葡聚糖 Dextran T10, T40, T70,

[收稿日期] 2008-10-23

[基金项目] 北京市重点实验室清热解毒中药有效成分发现的方法学研究(JD100260652)

[通讯作者] * 乔延江, Tel: (010) 84738661; E-mail: yjqiao@263.com

T110, T500 (Pharmacia, 瑞典); 娃哈哈纯净水; 苯酚 (重蒸)、浓硫酸、三氯甲烷、正丁醇、无水乙醇、无水乙酸钠均为分析纯; 沙漠嘎多糖自制。

2 实验方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Shodex (Asahipak GS 系列) 色谱柱, GS-320 7E (250 mm × 7.5 mm ID, 9 μm) 与 GS-620 7G (500 mm × 7.5 mm ID, 9 μm) 串联使用。预柱: GS-2G 7B (保护柱, 50 mm × 7.5 mm ID, 9 μm); 柱温 35 °C; 流动相: 0.003 mol·L⁻¹ 乙酸钠; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱压: 4.5 MPa。

2.2 标准品溶液的制备 取葡聚糖系列标准品适量, 精密称定, 加 0.003 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶解并定容至刻度, 振荡混匀, 制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的标准溶液。

2.3 供试样品的制备 称取 1 g 沙漠嘎粗多糖, 加水 30 mL 溶解, 进行 Deae-52 纤维素柱层析, 以 0.01 mol·L⁻¹ 氯化钠溶液洗脱, 每份收集 10 mL, 苯酚硫酸法显色检测, 收集含糖流分, 浓缩后, 再进行 Sepharose CL-6b 柱层析, 收集主要的含糖流分, 透析浓缩后, 冷冻干燥得沙漠嘎多糖 S1, 精密称取该多糖, 以 0.003 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶解, 制得 1.0 mg·mL⁻¹ 样品溶液, 取该溶液 50 μL 进样, 经 HPGFC-RID 检测为单一峰。(t_R = 18.237 min)

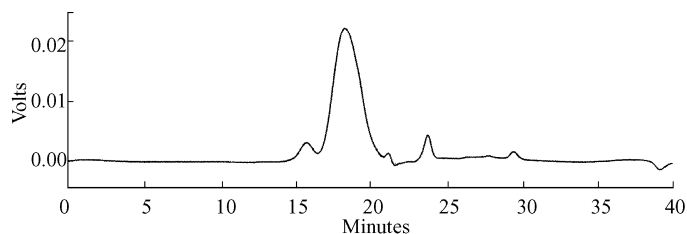


图 1 样品 S1 凝胶色谱图

2.4 线性关系考察 分别取 Dextran T10, T40, T70, T110, T500 标准品溶液 50 μL 进样, 色谱峰保留时间为 t_R 分别为 21.74, 19.44, 17.97, 17.55, 16.19 min。以色谱峰的保留时间对其 M_w 的对数值进行回归, 回归方程为: lg(M_w) = 10.167 - 0.287t_R, r = -0.976。M_w 的线性范围为 10 000~500 000 Da。

2.5 精密度和稳定性试验 取 Dextran T70 的标准品溶液连续进样, 记录色谱峰保留时间, 计算相对标准偏差 RSD = 0.06% (n = 5), 表明仪器精密度良好; 取同一供试品溶液日内每隔 2 h 进样一次, 日内 RSD = 0.08% (n = 6)。实验结果显示标准品溶液 12 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 取“2.3”项下制备的沙漠嘎多糖样品, 配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的溶液, 按上述色谱条件

进行分析, 每次进样 50 μL, 结果样品的 RSD = 0.10% (n = 5), 表明方法的重复性良好。

2.7 样品测定 精密量取标准品溶液 (Dextran T70) 和样品溶液各 50 μL, 结果色谱峰保留时间 t_R = 18.25 min (n = 3), 代入回归方程计算得沙漠嘎多糖重均相对分子质量为 M_w = 8.5 × 10⁴ Da。

3 讨论

针对多糖类成分无紫外吸收, 又无专属性很好的显色剂的特点, 有研究表明多角度激光光散射 (malls) 检测器和示差检测器与凝胶排阻色谱 (SEC) 联用能增加分子量测定的准确性^[6], 本研究采用示差折光检测器对沙漠嘎多糖的 M_w 进行测定。结果表明, Dextran T70 在 12 h 内稳定性的 RSD 为 0.08%, 样品溶液的重现性 RSD 为 0.10%, 表明示差折光检测器的检测结果稳定性较好, 下一步研究可采用多角度激光光散射和示差检测器联合使用, 增加检测的准确性。

在流动相选择的过程中, 由于对照品和样品是多糖类成分, 极性较大, 故采用缓冲盐溶液作为流动相。试验确定 0.003 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶液洗脱, 各峰分离较好。

在供试品溶液制备过程中, 考察了硼砂缓冲液和氯化钠溶液柱层析洗脱, 结果表明, 氯化钠溶液洗脱效果较好, 且配制简单, 操作方便, 处理容易, 故选用氯化钠溶液洗脱。

本研究建立了高效凝胶过滤色谱法分析沙漠嘎多糖 M_w 的方法, 该法简便、重复性好, 为进一步研究其生物活性和开发利用沙漠嘎药材奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 朱亚民. 内蒙古植物药志[M]. 第三卷, 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1993: 184-185.
- [2] 王延年, 艾路, 乔延江. 中药沙漠嘎化学成分的分选与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3): 3-4.
- [3] 王延年, 魏宁漪, 乔延江. 不同产地沙漠嘎种子挥发油化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 473-475.
- [4] 张媛媛, 乔延江. HPLC 法测定沙漠嘎种子中两种二氢黄酮的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(1): 58-60.
- [5] 徐从立, 陈海生, 谭兴起, 等. HPGFC-ELSD 法测定商陆多糖的重均相对分子质量[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(1): 116-117.
- [6] 仲宣惟, 黄清泉, 奚廷斐. 多角度激光光散射检测器和示差折光检测器联用测定壳聚糖分子量及分子量分布[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1258-1260.