

高效液相法测定黄芪中性多糖的单糖组成

许杜娟^{1*}, 夏 泉¹, 刘 钢², 王培培²

(1. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 安徽 合肥 230022; 2. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032)

[摘要] 目的: 采用高效液相法测定黄芪中性多糖的单糖组成。方法: 正交设计优选三氟乙酸水解黄芪中性多糖的条件; 水解产物直接采用高效液相-视差检测器(HPLC-RID)检测或经 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生化后高效液相-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)检测两种方法, 以 6 种单糖为对照, 测定水解产物中单糖的组成。结果: 黄芪中性多糖的三氟乙酸完全酸水解最佳条件为采用 1M TFA, 水解温度 100 ℃, 水解时间 5 h; 两种高效液相色谱法测得水解产物中的单糖均为葡萄糖。结论: 采用三氟乙酸完全酸水解条件和高效液相色谱法测定单糖的方法简便易行, 可用于黄芪中性多糖的单糖组成研究。

[关键词] 黄芪中性多糖; 高效液相色谱法; 单糖组成

[中图分类号] R248.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)09-0004-03

Analysis of Monosaccharide Composition in Astragalus Neutral Polysaccharides by High Performance liquid Chromatography

XU Dujuan^{1*}, XIA Quan¹, LIU Gang², WANG Pei-pei²

(1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022, China;

2. School of Pharmacy, Anhui Medical University Hefei 230032, China)

[Abstract] **Objective:** To analyse monosaccharide composition in astragalus neutral polysaccharides(ANP) by high performance liquid chromatography(HPLC). **Method:** Orthogonal design was used to optimize the hydrolytic condition of ANP by trifluoroacetic acid(TFA), the monosacchride composition in hydrolysate was assayed directly by HPLC-RID method or HPLC-DAD method after precolumnr-derivation with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) with six monosaccharides as control. **Result:** The optimum hydrolyzation procedure of ANP was configured with 1M TFA hydrolyzing 5 hours at 100 ℃. The results of two HPLC methods showed that the ANP consisted of glucose. **Conclusion:** The optimum hydrolyzation procedure and HPLC methods are simple and convenient and could be applied to analysis of the monosaccharide composition in ANP.

[Key words] astragalus neutral polysaccharides; HPLC; monosaccharide composition

多糖(polysaccharide)是一类结构复杂的天然大分子的化合物。为了解黄芪多糖的结构,本研究采用三氟乙酸(TFA)完全酸水解和高效液相色谱法分析多糖水解产物中的单糖组成,为进一步确定其结

构提供实验基础。

1 仪器与试剂

Agilent HP1100 高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器和示差检测器, Agilent ChemStation 色谱工作站; 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂); ZK-82B 型真空干燥箱(上海市试验仪器总厂); TGL-16H 高速离心机(珠海黑马仪器有限公司); SB3200 超声振荡器(必能信超声有限公司); AL204 电子分析天平(上海梅特勒-托利多公司); XW-80A 涡旋振荡器(上海医科大学仪器厂)。

[收稿日期] 2008-04-07

[基金项目] 安徽省科技厅(070413076); 安徽省教育厅(KJ2007B149)

[通讯作者] * 许杜娟, Tel: (0551) 2922442; E-mail: xudujuan6365@yahoo.com.cn

黄芪药材饮片购自国投药业安徽有限公司,经安徽中医学院药用植物学教研室刘守金教授鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge 的干燥根。单糖对照阿拉伯糖(Ara)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gala)、果糖(Fruc)、岩藻糖(Fuc)和甘露糖(Man)均购自Sigma公司。三氟乙酸(TFA)、1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)、氢氧化钠、盐酸、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠均为分析级,乙腈为色谱级,水为重蒸馏水。

2 实验方法与结果

2.1 黄芪中性多糖的制备 取黄芪饮片适量,加 8 倍量水煮沸提取 3 次,每次 1 h,合并提取液并浓缩,浓缩液于不断搅拌状态下加乙醇至醇浓度为 70%,静置过夜,分离沉淀。沉淀依次用无水乙醇及丙酮适量洗涤,60 °C 减压干燥得棕黄色黄芪粗多糖粉末。取黄芪粗多糖适量加水溶解后离心,上清液采用 Sevag 法处理 10 次以去除其中的蛋白质成分^[1],双氧水脱色处理^[2]后置透析袋中对流水透析 24 h,透析后的多糖水溶液乙醇沉淀,干燥后得白色黄芪多糖粉末。 α -萘芬与苯酚-硫酸化学反应显示为多糖,琼脂糖凝胶电泳法测定结果表明其为中性多糖^[3]。

2.2 黄芪中性多糖的 TFA 完全酸水解条件研究 三氟乙酸水解因素和水平表见表 1,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计的实验方法。

表 1 黄芪 TFA 完全酸水解正交设计因素与水平表

	酸浓度(M)	水解温度(°C)	水解时间(h)
1	1	80	2
2	2	100	5
3	4	120	10

精密称取黄芪中性多糖约 5 mg,置 8 mL 具塞试管中,分别加入不同浓度的三氟乙酸 2 mL,充氮后加塞密闭。按照正交设计表分别于不同的条件下水解,至规定时间后取出试管,水解液中加入适量甲醇,置热水浴上用氮气吹干,反复 3 次,以挥去残留的三氟乙酸,残渣定量加 1 mL 蒸馏水溶解,离心后取上清液备用。

2.3 HPLC-RID 法测定水解产物的单糖^[4]

2.3.1 色谱条件 流动相为乙腈:水 = 80:20,流速 1.0 mL·min⁻¹。Hypersil NH₂ 基色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),柱温 30 °C,示差检测器温度为 35 °C,进样量 10 μ L。

2.3.2 系统适用性参数 配制浓度为 2 mg·mL⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液,重复进样 5 次,每次 10 μ L,计算

方法的精密度。结果表明,该方法测得葡萄糖对照品保留时间的 RSD = 0.088%,峰面积的 RSD = 0.528%,理论塔板数不低于 3 000。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取标准单糖 Ara, Glu, Gala, Fruc, Fuc 和 Man 各 4 mg 置同一 2 mL 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液。另分别配置浓度为 2 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液,用水分别稀释至浓度为 20, 50, 200, 400 和 1 000 μ g·mL⁻¹ 浓度的对照品溶液,按 2.3.1 项下方法分别进样 10 μ L 进行测定,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。其中葡萄糖对照品的浓度范围为(19.7~1 970) μ g·mL⁻¹,回归方程为 $Y = 7.5 \times 10^3 X + 1.2 \times 10^3$, $r = 0.999 9$,说明葡萄糖在此浓度范围内线性关系良好。

2.3.4 水解产物的测定 分别将混合单糖对照品溶液和黄芪中性多糖的 TFA 水解产物进样 10 μ L 测定。根据混合单糖对照品溶液中的色谱峰保留时间,判断水解产物中单糖的种类,同时根据标准曲线计算水解液中单糖的含量,见图 1、图 2。结果表明,黄芪中性多糖水解产物中的单糖为葡萄糖。

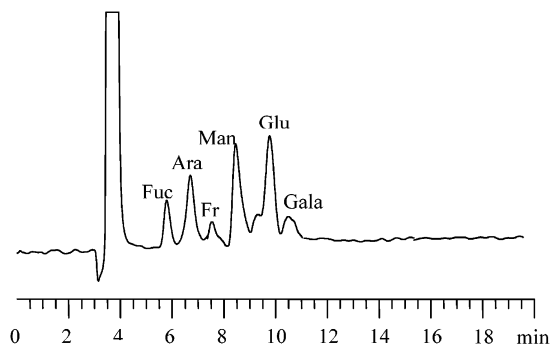


图 1 6 种混合单糖的 HPLC 图谱

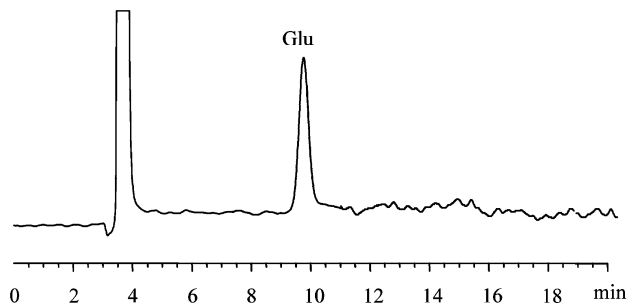


图 2 黄芪中性多糖水解产物的 HPLC 图谱

2.4 HPLC-DAD 法测定水解产物的单糖^[5]

2.4.1 混合单糖对照品及黄芪中性多糖水解产物的衍生化反应 精密称取标准单糖 Ara, Man, Glu, Gala, Fuc 和 Fruc 各 3 mg,置同一试管中,加入 0.3 M 的 NaOH 溶液 5 mL 振荡溶解,取溶解后的溶液 100

μL, 加入 0.5 M 的 PMP 甲醇溶液 50 μL, 70 °C 水浴中反应 30 min 后冷却至室温, 加 0.3 M 的盐酸 100 μL 中和, 中和后的溶液放入真空干燥箱中, 于 100 °C 下真空干燥。烘干后的物质用 1 mL 的水及 1 mL 的氯仿溶解, 充分振荡后离心, 离心后用注射器仔细抽出下层氯仿层, 剩余水层再加 1 mL 氯仿振荡混合, 重复以上过程 3 次。最终将水层用 0.45 μm 滤膜过滤后, 置冰箱中保存备用。取黄芪中性多糖水解液 500 μL, 氮气吹干, 残留物依照混合单糖的方法进行衍生化处理。

2.4.2 色谱条件 流动相为乙腈: 水 = 23: 77, 流速 1.0 mL·min⁻¹。色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 检测器波长 245 nm, 进样量 20 μL。

2.4.3 系统适用性参数 取经过衍生化反应的混合单糖对照品溶液, 按 2.4.2 项下方法重复进样 5 次, 每次 20 μL, 计算方法的精密度。结果表明, 该方法 6 种单糖对照品衍生化物的保留时间 RSD 值均 < 0.21%, 峰面积的 RSD 值均 < 0.53%, 理论塔板数不低于 5 000。

2.4.4 水解产物的测定 分别取衍生化后的混合单糖对照品溶液和黄芪中性多糖 TFA 完全酸水解溶液, 照本方法的色谱条件进行测定, 混合单糖和黄芪中性多糖水解产物的衍生化 HPLC 色谱图见图 3、图 4。结果可见, 黄芪中性单糖水解产物中含有葡萄糖。

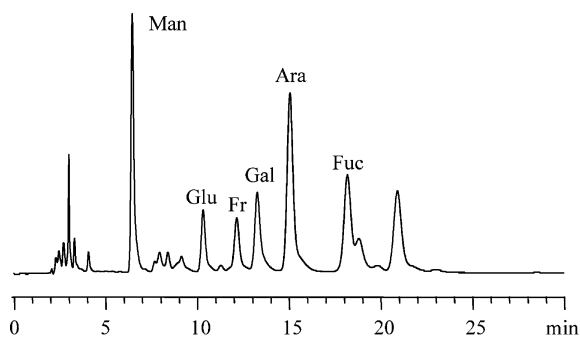


图 3 6 种混合单糖衍生物的 HPLC 图

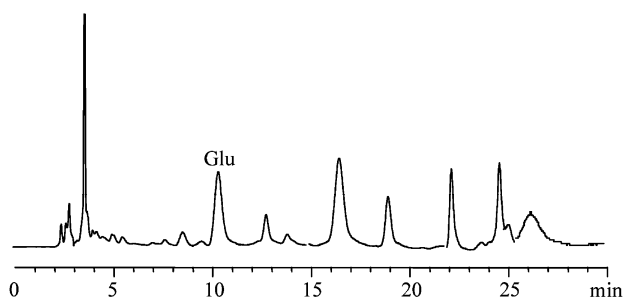


图 4 黄芪中性多糖衍生化水解产物 HPLC 图

2.5 TFA 最佳酸水解条件的统计分析 以水解产物中单糖的含量为指标, 采用 SPSS12.0 统计软件包中正交设计工具软件分析测定结果, 优选 TFA 的最佳酸水解条件。结果表明, 3 种因素 (酸浓度、水解温度和水解时间) 的水平间均有显著性差异 ($P < 0.05$), Post Hoc Tests 析因分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 的统计结果表明, TFA 最佳酸水解条件为: 5 mg 黄芪多糖加入 2 mL 浓度为 1 M 的 TFA 溶液, 100 °C 水解 5 h。另取黄芪中性多糖样品 3 份, 采用此最佳水解条件进行验证试验, 结果表明 3 份样品完全酸水解液中单糖含量的 RSD = 0.36%。

3 讨论

采用单向方差分析将 TFA 水解方法与常用的硫酸水解方法进行比较, 结果发现两种方法水解产物中单糖含量有显著性差异 ($P < 0.05$), 采用 TFA 方法要明显高于硫酸水解方法。采用 TFA 水解仅需在水解产物中加入一定量的甲醇以挥发残留的酸, 无需其他步骤, 因此在样品制备过程中单糖组分损失很小, 提高了方法的精密度。

本研究根据单糖在紫外波长范围内无吸收的特点, 在高效液相色谱系统中使用 NH₂ 色谱柱进行分离和示差检测器检测, 可得到较为理想的分离效果和测定结果; 对于未配置示差检测器的高效液相色谱系统, 则提供了一种简单的衍生化处理方法, 使用普通的 C₁₈ 色谱柱在紫外波长范围内测定多糖水解产物中单糖组分, 为分析多糖的单糖组成提供了可供选择的检测方法。

黄芪多糖的单糖组分, 本研究结果表明黄芪多糖主要由葡萄糖组成。

[参考文献]

- [1] 夏泉, 刘钢, 葛朝亮, 等. Sevag 法去除黄芪粗多糖中蛋白质成分的研究[J]. 安徽医药, 2007, 11(12): 1069-1071.
- [2] 李文芳, 向昌国, 罗庆华, 等. 南瓜藤蔓中多糖脱色工艺的研究及其含量变化[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 442-445.
- [3] 刘晓河, 梁惠花. 平菇中性多糖和酸性多糖的分离、纯化和鉴定[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2007, 23(3): 21-22.
- [4] 杜子民, 王晓燕, 柳卫莉, 等. 高效液相色谱法分析生漆多糖中的单糖组成[J]. 色谱, 1998, 16(2): 173-175.
- [5] 徐瑾, 张凌怡, 张庆合, 等. 单糖的柱前衍生化高效液相色谱及胶束电动毛细管色谱分析的对比研究[J]. 色谱, 2003, 21(4): 363-366.