

HPLC-ELSD 法测定落叶松多糖中 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖

王 畅¹, 於洪建^{2*}, 吴 巍²

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津尖峰天然产物研究开发有限公司, 天津 300457

摘 要:目的 建立 HPLC-ELSD 法测定落叶松多糖中 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖。方法 色谱柱为 Prevail Carbohydrate ES(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 80%乙腈-0.5%乙酸铵水溶液(90:10), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温室温, 进样量 20 μL; 检测器漂移管温度为 100 °C, 载气体积流量为 2.5 L/min。结果 *L*-阿拉伯糖、*D*-半乳糖分别在 2.004 5~20.449 5 μg ($R^2=0.990\ 5$)、2.041 0~20.410 2 μg ($R^2=0.995\ 3$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.68% (RSD 为 1.51%)、99.65% (RSD 为 1.63%)。结论 本法重现性好, 稳定可靠, 可作为落叶松多糖的质量控制方法。

关键词: 落叶松多糖; *L*-阿拉伯糖; *D*-半乳糖; 高效液相色谱-蒸发光散射检测

中图分类号: R286.01

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2012)02-0117-03

Determination of *L*-arabinose and *D*-galactose in polysaccharide of *Larix gmelini* by HPLC-ELSD

WANG Chang¹, YU Hong-jian², WU Wei²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Jianfeng Natural Products R&D Co. Ltd., Tianjin, 300457, China

Abstract: Objective To establish a method for HPLC-ELSD determination of *L*-arabinose and *D*-galactose in polysaccharide of *Larix gmelini*. **Methods** The condition for HPLC-ELSD was Prevail Carbohydrate ES column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with 80% acetonitrile-0.5% ammonium acetate solution (90:10) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was room temperature and the detector drift tube temperature was 100 °C. The carrier gas flow velocity was 2.5 L/min, and the injection volume was 20 μL. **Results** The *L*-arabinose and *D*-galactose showed good linear relationship in the range of 2.004 495—20.449 5 μg ($R^2 = 0.990\ 5$) and 2.041 0—20.410 2 μg ($R^2 = 0.995\ 3$), respectively; The average recoveries were 99.68% (RSD=1.51%) and 99.65% (RSD=1.63%). **Conclusion** The method is reproducible, reliable, and can be used for the quality control for polysaccharide of *L.gmelini*.

Key words: polysaccharide of *Larix gmelini*(Rupr.) Rupr.; *L*-arabinose; *D*-galactose; HPLC-ELSD

落叶松 *Larix gmelini* (Rupr.) Rupr. 为松科落叶松属的落叶乔木, 是我国东北地区主要三大针叶用材林树种之一, 但是近年来落叶松木材木屑作为森林资源的一部分, 在林区加工厂的残留量很大, 浪费了林业资源^[1]。随着对落叶松木屑的深入研究, 发现其中蕴藏着巨大的开发潜能, 如用于医药行业的落叶松多糖。落叶松多糖中主要是阿拉伯糖基半乳聚糖, 该多糖是一种高度分枝的水溶性多糖^[2], 主链由 1→3 连接的 β-*D*-吡喃型半乳糖基构成, 每

个主链半乳糖基 C-6 上有两个或一个 1→6 链接的 β-*D*-吡喃型半乳糖基和 3(2)-*O*-α-*L*-呋喃型阿拉伯糖基-*L*-呋喃型阿拉伯糖, 在酸性条件下水解, 产物主要是 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖^[3]。*L*-阿拉伯糖在抑制蔗糖的代谢与吸收, 降低血清中三酰甘油, 提高高密度脂蛋白胆固醇, 改善肠道微生态、增殖肠道有益菌, 改变骨骼肌比例、改善胰岛素抵抗, 稳定血压, 减少脂肪堆积等方面具有独特的功能特点^[4], *D*-半乳糖是构成脑神经系统中脑苷脂的成分, 与婴

收稿日期: 2011-12-19

作者简介: 王 畅 (1986—), 女, 湖南人, 硕士研究生, 主要从事天然产物有效成分的提取、分离研究。Tel: (022)66237090-8039

E-mail:wangchang5200@163.com

*通讯作者 於洪建

儿出生后脑的迅速生长有密切关系。本实验以落叶松多糖为研究对象,运用高温水提法结合水提醇沉法提取落叶松多糖,用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)检测器联用^[5-6],对水解产物进行检测和分析,建立了同时测定落叶松多糖在酸性条件下水解产物 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖的方法。

1 仪器与试剂

LC-10A 型高效液相色谱仪(岛津公司);Alltech 2000ES ELSD 检测器(Alltech 公司);*D*-半乳糖(质量分数≥99%) 和 *L*-阿拉伯糖(质量分数≥99%) 对照品(Sigma 公司);落叶松多糖(天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,批号分别为 20110919、20111112、20111205);乙腈为色谱纯(天津市康科德科技有限公司);水为超纯水;浓硫酸(北京化工厂);载气为空气。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Prevail Carbohydrate ES (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 80%乙腈-0.5%乙酸铵水溶液(90:10),体积流量 1.0 mL/min,柱温室温,进样量 20 μL;检测器漂移管温度为 100 ℃,载气体积流量为 2.5 L/min。色谱图见图 1。

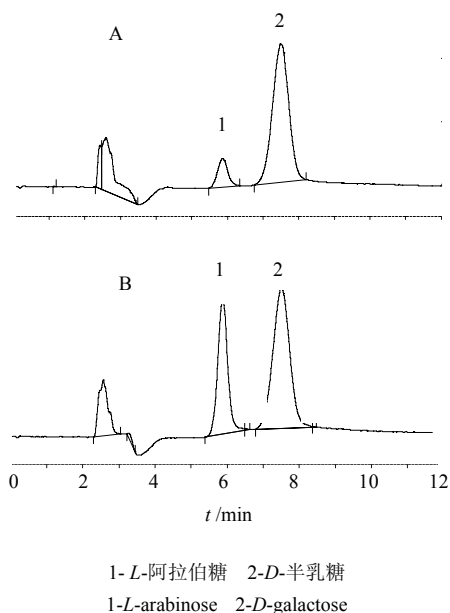


图 1 混合对照品(A)和酸水解落叶松多糖样品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and acid hydrolysis of polysaccharide in *L. gmelini* sample (B)

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取 *L*-阿拉伯糖对照品 51.12 mg、*D*-半乳糖对照品 51.03 mg,置 50 mL 量瓶中,加水溶解,制成含 *L*-阿拉伯糖 1.012 2 mg/mL、*D*-半乳糖 1.010 2 mg/mL 混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

对多种影响多糖水解的条件进行考察,确定最佳水解条件为准确称取 200 mg 落叶松多糖样品于量瓶中,加 1 mol/L 硫酸 10 mL,封口,100 ℃下水解 6 h,加入碳酸钡中和至中性,用 4 号砂芯坩埚滤过,用水洗涤 5 次,滤液定容至 100 mL,再取 5 mL 置 10 mL 量瓶中,超纯水加至刻度,即得。

2.4 线性关系考察

制备质量浓度分别为 0.102、0.204、0.307、0.409、0.511、0.818、1.022 mg/mL *L*-阿拉伯糖对照品溶液和 0.102、0.204、0.306、0.408、0.510、0.816、1.020 mg/mL *D*-半乳糖对照品溶液,分别进样 20 μL,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,相应的进样质量为横坐标,进行线性回归,得回归方程。*L*-阿拉伯糖: $Y=9.9 \times 10^6 X - 8.4 \times 10^5$ ($R^2=0.9905$), *D*-半乳糖: $Y=1.5 \times 10^7 X - 3.0 \times 10^5$ ($R^2=0.9953$)。表明 *L*-阿拉伯糖在 2.004 5~20.449 5 μg、*D*-半乳糖在 2.041 0~20.410 2 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验

取批号 20111112 样品的酸水解溶液,每次进样 20 μL 进行分析,重复进样 5 次,记录峰面积。计算得 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖的质量分数的 RSD 分别为 2.3%、1.8%。

2.6 重现性试验

精密称取批号 20111112 样品 5 份,制备供试品溶液,进样、测定,结果 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖的质量分数的 RSD 分别为 1.3%、2.0%。

2.7 稳定性试验

取批号 20111112 样品的酸水解溶液,在上述色谱条件下,分别于 0、2、4、8、10、12 h 进样测定,结果 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖的质量分数的 RSD 分别为 2.7%、1.5%。

2.8 回收率试验

取批号 20111112 落叶松多糖样品约 200 mg,精密称定,分别准确加入 *L*-阿拉伯糖对照品 8.51、10.65、12.77 mg。再取批号 20111112 落叶松多糖样品约 50 mg,依次加入 *D*-半乳糖对照品 16.84、21.04、25.25 mg,制备供试品试液,各进样 3 次,

每次 20 μL，计算得 *L*-阿拉伯糖、*D*-半乳糖的加样回收率分别为 99.68%、99.65%，RSD 分别为 1.51%、1.63% ($n=9$)。

2.9 样品测定

取落叶松多糖 3 批，每批平行 2 份，分别制备供试品溶液，进样，测定，计算得样品中 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖，结果见表 1。

表 1 落叶松多糖中 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖的测定结果
Table 1s Determination of *L*-arabinose and *D*-galactose in polysaccharide of *L. gmelini*

批 号	<i>L</i> -阿拉伯糖/%	<i>D</i> -半乳糖/%
20110919	10.77	83.48
20111112	10.64	84.18
20111205	10.60	84.16

3 讨论

在实际操作中参考有关文献报道^[7]，首先选择了乙腈－水（65：35）作为流动相进行尝试，但此方法的分离效果不佳。经过不断尝试，最终采用 80% 乙腈－0.5% 乙酸铵水溶液（90：10）作为流动相，结果显示，此法保留时间合适，分离度较好，防止了拖尾现象，峰型也比较理想，同时落叶松多糖中阿拉伯糖和半乳糖的比例为 1：6.5，符合文献[1]中提到的比例。

本实验建立的高效液相色谱－蒸发光散射联用法测定落叶松多糖中 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖的方法，稳定性和重现性好，可作为落叶松多糖中 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖测定的参考方法。

参考文献

- [1] 杨秀云. 落叶松木屑中药用阿拉伯半乳聚糖的最佳提取工艺与纯化方法研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2002.
- [2] 李民栋. 兴安落叶松木屑阿拉伯半乳聚糖的制备及其化学成分组成的研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 1986(4): 59-64.
- [3] 蒋杏芬, 李民栋. 兴安落叶松阿拉伯糖基半乳聚糖化学结构的研究 [J]. 纤维素科学与技术, 1996, 4(1): 27-33.
- [4] 邱 泼, 丁继程, 白福来. *L*-阿拉伯糖的研究进展及应用现状 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 160-163.
- [5] 杨 俊, 刘江生, 蔡继宝, 等. 高效液相色谱－蒸发光散射检测法测定烟草中的水溶性糖 [J]. 分析化学, 2005, 33(11): 1596-1598.
- [6] 莫海涛, 李永库, 潘发用, 等. 高效液相色谱－激光蒸发光散射检测法测定低蔗糖食品中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖含量 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 186-187.
- [7] 曲 枫, 依明·尕哈甫, 郑丽英, 等. 高效液相色谱－蒸发光散射检测法测定大枣多糖中阿拉伯糖和 *D*-半乳糖 [J]. 现代仪器, 2010, 16(2): 58-60.