

基于高效凝胶渗透色谱法的银耳多糖质量控制研究

刘 芹^{1,2}, 宁嘉玲^{2,3}, 丁 侃^{1,2*}

1. 中国科学院上海药物研究所 糖化学及糖生物实验室, 上海 201203

2. 中国科学院上海药物研究所 无限极中草药多糖联合实验室, 上海 201203

3. 无限极中国有限公司, 广东 广州 510665

摘要: **目的** 建立银耳多糖质量控制方法。**方法** 采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)法测定银耳多糖相对分子质量及其分布和多糖的量。色谱条件: Shodex Sugar KS-804 (300 mm×8 mm, 7 μm) 和 KS-805 (300 mm×8 mm, 17 μm) 凝胶排斥色谱柱串联做为分离柱, 流动相为水, 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 40 μL, 检测条件为示差检测器。**结果** 银耳多糖峰出现在 14.40~15.30 min, 对应相对分子质量为 $1.26 \times 10^6 \sim 1.39 \times 10^6$ 。在 0.01~2.0 mg/mL 呈良好的线性关系 ($r=0.999$)。银耳多糖质量浓度范围分别为: 1.1~1.5 mg/mL (以透析银耳多糖为对照) 和 0.8~1.1 mg/mL (以蓝色葡聚糖为对照)。多糖检测限和定量限分别为 0.8 μg 和 2 μg。**结论** 所建立的方法简单、快速、准确、重现性好、灵敏度较高, 可作为银耳多糖质量控制的方法。

关键词: 银耳; 银耳多糖; 高效凝胶渗透色谱; 质量控制; 多糖相对分子质量

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1732-04

Quality control of *Tremella fuciformis* polysaccharide by HPGPC

LIU Qin^{1,2}, NING Jia-ling^{2,3}, DING Kan^{1,2}

1. Glycochemistry and Glycobiology Laboratory, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

2. Joint Laboratory for the Research of Chinese Herbal Polysaccharides, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

3. Infinitus (China) Company Co., Ltd., Guangzhou 510665, China

Abstract: Objective To develop a high performance gel permeation chromatography (HPGPC) method for quality control of *Tremella fuciformis* polysaccharide. **Methods** The separations were carried out with two series-wound columns including Shodex Sugar KS-804 (300 mm × 8 mm, 7 μm) and KS-805 (300 mm × 8 mm, 17 μm), water as mobile phase at flow rate 0.8 mL/min, column temperature at 40 °C, injection volume 40 μL, and differential index detector. **Results** *T. fuciformis* polysaccharide peak was located within 14.40—15.30 min and corresponding molecular weight was $1.26 \times 10^6 \sim 1.39 \times 10^6$. The linearity was good during 0.01—2.0 mg/mL ($r=0.999$). The polysaccharide concentration was 1.1—1.5 mg/mL and 0.8—1.1 mg/mL with precipitation of *T. fuciformis* polysaccharide and blue dextran as reference, respectively. LOD and LOQ were 0.8 and 2 μg, respectively. **Conclusion** The method is simple, quick, and accurate, and has good repeatability and high sensitivity, which is fitful for quality control.

Key words: *Tremella fuciformis* Berk.; *Tremella fuciformis* polysaccharide; high performance gel permeation chromatography (HPGPC); quality control; polysaccharide molecular weight

银耳 *Tremella fuciformis* Berk. 又名白木耳、雪耳。银耳属担子菌门, 异隔担子菌纲, 银耳目, 银耳科, 银耳属。银耳既是一种经济价值很高的食用

菌, 又是医学中一种久负盛名的良药^[1]。据《中药大辞典》记载, 银耳具有滋阴、润肺、养胃、生津等功效^[2]。主要用于治疗虚劳咳嗽, 痰中带血和虚

收稿日期: 2011-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870551)

作者简介: 刘 芹(1974—), 女, 四川人, 硕士, 从事糖化学研究。Tel: (021)50806600-3203 E-mail: liuqin@mail.shnc.ac.cn

*通讯作者 丁 侃 Tel: (021)50806928 E-mail: Kding@mail.shnc.ac.cn

热口渴。文献报道银耳中含有丰富的银耳多糖,具有增强机体的免疫功能、抗氧化作用、促进蛋白质和核酸合成、降低游离胆固醇、抗心肌细胞凋亡等功效^[3-6]。除了在临床上和其他中药配伍用于疾病治疗外,银耳还具有诸如作为增强免疫功能的健康食品开发的潜在市场价值,现在市场上出现了不少银耳多糖的开发产品。但随着产地、品种、采收季节的不同,银耳多糖的量及相对分子质量有一定差异,这对银耳相关产品质量是一个挑战。为了保证产品质量,本实验对银耳多糖质量控制进行了研究。

本实验采用高效凝胶渗透色谱(high performance gel permeation chromatography, HPGPC)法^[7-8]对银耳多糖相对分子质量分布及多糖量的测定进行了研究,并对其准确性、精密性、稳定性和专属性等方法学进行了研究,提供了一种便捷、有效的银耳多糖质量控制方法。

1 仪器与材料

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, Agilent Chemstation 控制系统及 GPC 数据处理软件(美国 Agilent 公司), N-1100D-WD 真空旋转蒸发仪(日本 Eyela 公司), Shimadzu-9A 气相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司)。相对分子质量分别为 7.88×10^5 、 4.04×10^5 、 2.12×10^5 、 1.12×10^5 、 4.73×10^4 、 1.18×10^4 的普鲁兰多糖对照品(美国 Polymer Laboratories 公司), 蓝色葡聚糖(相对分子质量 2.0×10^6 , 美国 Sigma 公司); 其他试剂均为分析纯。银耳产于福建古田, 经上海中医药大学王峥涛教授鉴定为银耳 *Tremella fuciformis* Berk.。

银耳多糖样品由中国科学院上海药物研究所糖化学及糖生物实验室提供小试样品(批号 TP1、TP2、TP3)及无限极中国有限公司提供中试样品(批号 LJJ1-1、LJJ1-2、LJJ2-0)。制备方法: 银耳药材水煎煮提取 2 次(第 1 次 50 倍水 2 h、第 2 次 40 倍水 1 h), 提取液合并浓缩至固形物的量在 2.5%~3%, 以 3 倍体积的 90%乙醇沉淀 2 h 后, 4 000 r/min 离心 10 min, 所得沉淀用 95%乙醇洗涤 1 次后 80 °C 烘干得银耳多糖粗品。

2 方法与结果

2.1 银耳多糖糖醛酸的测定^[9]及流动相的选择

分别取标准半乳糖醛酸($100 \mu\text{g/mL}$) 0、0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 mL 于带塞试管中, 用蒸馏水补加到 0.40 mL, 在冰浴中加入硫酸硼砂溶液, 室

温下摇匀, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 5 min, 然后在冰水中冷却, 加入 0.15%间羟基联苯(含 0.5% NaOH) $40 \mu\text{L}$ 。混匀后, 放置 20 min, 在 520 nm 处测定吸光度值, 另取样品同法测定, 并由此选择流动相。根据糖醛酸的量和吸光度值的关系绘制标准曲线。结果糖醛酸在 $8 \sim 40 \mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系, 回归方程 $Y=0.0307X-0.0331$ ($r=0.9964$)。由此计算所得银耳多糖中糖醛酸的量为 7.7%。

由于银耳多糖为糖醛酸的量较低的酸性多糖, 所以流动相采用 0.2 mol/L NaCl 溶液。考察了 0.5~1.0 mL/min 体积流量的色谱情况, 结果表明体积流量为 0.8 mL/min 下效果最为合适。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

Shodex Sugar KS-804 柱($300 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$)和 KS-805 柱($300 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$, $17 \mu\text{m}$)凝胶排斥色谱柱串联作为分离柱, 流动相为 0.2 mol/L NaCl 溶液(当测定样品为蓝色葡聚糖时, 由于其在 0.2 mol/L NaCl 溶液中不能出峰, 流动相换为水), 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $40 \mu\text{L}$, 检测条件为示差检测器(以流动相做参比液)。在上述色谱条件下, 理论塔板数按乙二醇计算不低于 6 000。色谱图见图 1。

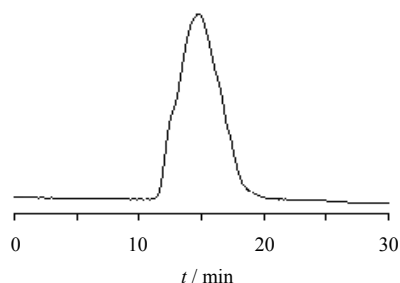


图1 银耳多糖 HPGPC 图谱

Fig. 1 HPGPC chromatogram of *T. fuciformis* polysaccharides

2.3 银耳多糖相对分子质量及其分布的测定^[10]

2.3.1 普鲁兰多糖对照品溶液的制备 称取 6 个已知相对分子质量的多糖对照品, 重均相对分子质量(M_w)分别为 2.0×10^6 、 7.88×10^5 、 4.04×10^5 、 2.12×10^5 、 4.73×10^4 、 1.12×10^5 , 用水溶解, 制成 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 称取 1 mg 样品, 精密称定, 用 1.0 mL 流动相充分溶解, 沸水浴加热 10 min, 以 9 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清液, 即得。

2.3.3 相对分子质量标准曲线的绘制 分别取不同相对分子质量的对照品溶液在上述色谱条件下测定,以保留时间为横坐标,相对分子质量对数值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = -0.2291X + 9.4533$ ($r = 0.9986$),结果表明相对分子质量在 $4.73 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^6$ 线性关系良好。

2.4 线性关系考察

分别采用制作步骤相同而纯度较高的透析后银耳多糖和商品化的蓝色葡聚糖作为对照品,制作标准曲线。

精密称取 10 mg 对照品,加水配制成 2.0 mg/mL, 9 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,再进一步稀释为 1.0、0.5、0.25、0.10、0.05、0.01 mg/mL,即得对照品溶液,在上述色谱条件下测定。以透析后银耳多糖和商品化的蓝色葡聚糖为对照品,质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程,透析后银耳多糖 $Y = 303945X + 2392.9$ ($r = 0.9991$),蓝色葡聚糖 $Y = 418162X - 694.05$ ($r = 1.0000$),结果表明透析后的银耳多糖和商品化蓝色葡聚糖均在 0.01~2.0 mg/mL 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取同一样品(批号 TP1)溶液,连续进样 6 次,测定峰面积和相对保留时间,如此连续测定 3 d。同一天所得的 RSD 为日内精密度,3 d 保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.27%、0.5%(第 1 天),0.33%、1.76%(第 2 天),0.08%、0.92%(第 3 天)。在 3 d 分别测定的 18 组数据用于评价日间精密度,保留时间和峰面积的 RSD 分别为 1.28%、1.46%。

2.6 重现性试验

取同一份银耳多糖样品(批号 TP1)5 份,分别精密称定,平行配制 2 mg/mL 银耳多糖溶液进行测定,计算得主要色谱峰保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.22%、6.11%。

2.7 稳定性试验

取同一份银耳多糖样品(批号 TP1),分别于 0、1、2、12、14、16、17、38、48 h 检测银耳多糖,结果银耳多糖色谱峰的峰面积和保留时间 RSD 分别为 2.7%、1.21%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.8 回收率试验

采用标准加入法计算回收率以测定方法准确度。分别配制 1.6、2.0、2.4 mg/mL 银耳多糖供试品溶液,每个质量浓度各平行配制 3 份,向其中加

入定量的银耳多糖,进行 HPGPC 测定,计算银耳多糖的回收率。结果平均回收率为 100.4%,RSD 为 1.2%。

2.9 检测限和定量限

配制一系列质量浓度的对照品溶液进行测定,以信噪比为 3:1 时的质量浓度为检测限:20 $\mu\text{g/mL}$,进样量 40 μL ,绝对检测限为 0.8 μg 。以信噪比为 10:1 相应的浓度确定为定量限:50 $\mu\text{g/mL}$,进样量 40 μL ,绝对定量限为 2 μg ,3 次测定峰面积的 RSD 为 0.40%。

2.10 专属性考察

配制 1.2 mg/mL 银耳多糖溶液,分别向其中准确加入 4 mg/mL 的透析后的银耳多糖 100、200、300 μL 。结果表明 16 min 处的峰高随着透析银耳多糖的加入而成比例增加,因此该方法在一定范围内对银耳多糖有专属性。

2.11 样品的测定

分别取不同批次产出的小试和中试产品各 3 批,精密称定,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,记录色谱图,根据银耳多糖保留时间和标准曲线,由 GPC 软件计算出多糖的相对分子质量及其分布,结果见表 1。根据多糖峰面积计算出样品中多糖的量,结果见表 2。

3 讨论

实验过程中,先考察了银耳多糖糖醛酸的量为 7.7%,确定其为糖醛酸质量分数较低的酸性多糖。为了消除多糖对色谱柱的吸附作用,最初确定采用 0.2 mol/L NaCl 溶液为流动相,体积流量为

表 1 银耳多糖相对分子质量及其分布情况

Table 1 Molecular weight and distribution of *T. fuciformis* polysaccharides

批号	$M_n/(\times 10^5)$	$M_w/(\times 10^5)$	$M_{10}/(\times 10^5)$	$M_{90}/(\times 10^5)$	D
TP1	7.93	12.65	2.57	11.35	1.59
TP2	8.46	12.84	2.84	11.79	1.52
TP3	10.28	13.87	3.46	12.28	1.35
LJJ1-1	9.15	13.72	2.47	12.03	1.50
LJJ1-2	9.21	13.31	2.75	11.52	1.44
LJJ2-0	9.35	13.53	2.87	10.91	1.45

M_n 为数均相对分子质量, M_w 为重均相对分子质量, D 为分布系数 (M_w/M_n), M_{10} 为 10% 处分布的相对分子质量, M_{90} 为 90% 处分布的相对分子质量

M_n is number average molecular weight, M_w is weight average molecular weight, D is polydispersity (M_w/M_n), M_{10} is molecular weight at 10% mass distribution, M_{90} is molecular weight at 90% mass distribution

表 2 银耳多糖样品测定结果 (n=3)
Table 2 Determination of *T. fuciformis*
polysaccharides (n = 3)

批 号	银耳多糖/(mg·mL ⁻¹)	
	透析银耳多糖为对照品	蓝色葡聚糖为对照品
TP1	1.495	1.094
TP2	1.371	1.004
TP3	1.361	0.997
LJJ1-1	1.269	0.930
LJJ1-2	1.167	0.856
LJJ2-0	1.326	0.971

0.8 mL/min。在此条件下, 银耳多糖的保留时间为 15.6 min, 而相对分子质量为 7.88×10^5 对照品的保留时间为 16.8 min, 样品峰保留时间位于相对分子质量线性范围之外。因此需要再加入 2.0×10^6 的蓝色葡聚糖作为对照品。但是蓝色葡聚糖在 0.2 mol/L NaCl 流动相中不出峰, 因此只能改用水为流动相。由于银耳多糖糖醛酸的量较低, 且样品和对照品均采用水为流动相, 并且柱温由常用的 25 ℃ 提高到 40 ℃ 以减小样品在色谱柱上的吸附, 从而较大程度地消除误差。

综上所述, 经简单预处理, 经过凝胶排斥色谱柱分离, 在示差折光检测器下检测, 定量测定线性良好。方法重现性好, 准确度高, 较灵敏且具有一

定的专属性, 可作为银耳多糖质量控制的快速检测方法。

参考文献

[1] 杨 萍, 张 震. 银耳的功能性及发展前景 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7): 179-180.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994.

[3] 徐文清, 沈 秀, 周则卫, 等. 银耳多糖对放射和化学损伤小鼠造血功能的保护作用 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1057-1058.

[4] 胡庭俊, 梁纪兰, 程富胜, 等. 银耳多糖对小鼠脾脏淋巴细胞蛋白激酶 C 活性的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 81-84.

[5] 暴悦梅, 陈仁绍. 银耳多糖的保健作用及应用前景 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(10): 137-138.

[6] 曲 丹, 张 浩, 冯晓慧, 等. 银耳多糖对心肌细胞及在体心肌的抗凋亡作用 [J]. 中华临床营养杂志, 2009, 17(4): 215-219.

[7] 金 鑫, 赖凤英. GPC 法测定仙人掌多糖相对分子质量以及 HPLC-ELSD 法测定其单糖组成 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 23-25.

[8] 易剑平, 叶 晓, 钟儒刚. 高效凝胶渗透色谱法测定枸杞多糖的相对分子质量 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 214-215.

[9] 姜瑞芝, 陈英红, 杨勇杰, 等. 银耳多糖中糖醛酸含量的测定 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 991-993.

[10] 中国药典 [S]. 二部. 2010.