

柱前衍生化 - 高效液相色谱法测定蒙古黄芪多糖中单糖的组成

陈虎虎^{1,2}, 孙 静³, 杨金颖¹, 龚苏晓², 张铁军^{2*}

1. 江苏豪森药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津医科大学, 天津 300070

摘要: 目的 测定蒙古黄芪多糖中的单糖组成。方法 蒙古黄芪多糖样品用三氟乙酸溶液水解成单糖, 用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生化, 采用 HPLC 法于 245 nm 波长处检测各单糖。结果 蒙古黄芪多糖由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖组成, 物质的量比分别为 0.02 : 0.05 : 0.17 : 1 : 0.18。结论 此方法简单、快速、重复性好, 可用于蒙古黄芪多糖中单糖组成分析。

关键词: 蒙古黄芪多糖; 柱前衍生化; 单糖组成; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2012)05 - 0468 - 03

Determination of monosaccharide compositions in *Astragalus mongholicus* var. *mongholicus* polysaccharides by pre-column derivatization-HPLC

CHEN Hu-hu^{1,2}, SUN Jing³, YANG Jin-ying¹, GONG Su-xiao², ZHANG Tie-jun²

1. Jiangsu Hansoh Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract Objective To determine the monosaccharide compositions in *Astragalus mongholicus* var. *mongholicus* polysaccharides (AMMP). **Methods** AMMP samples were first hydrolyzed with trifluoroacetic acid, and then derivatized with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). Monosaccharide was determined by HPLC at detective wavelength of 245 nm. **Results** AMMP composed of mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, and arabinose with molar ratio 0.02 : 0.05 : 0.17 : 1 : 0.18. **Conclusion** The method is simple, fast, and reproducible, and could be used for the analysis of monosaccharide compositions in AMMP.

Key words: *Astragalus mongholicus* var. *mongholicus* polysaccharides (AMMP); pre-column derivatization; monosaccharide compositions; HPLC

蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 是膜荚黄芪的变种, 在我国主产于内蒙古、山西。蒙古黄芪作为著名的滋补中药材, 历代本草均有记载, 但是 20 世纪 70 年代后野生资源逐年减少, 已被列为《国家重点保护野生药用动植物名录》三类保护植物。在蒙古黄芪的质量研究方面, 《中国药典》2010 年版一部仅对黄芪中黄酮和皂苷类的代表成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷进行了研究, 而近年的研究发现蒙古黄芪茎叶中同样含有黄芪皂苷、黄酮和多糖类有效

成分^[1-3]。多糖是蒙古黄芪的主要生物活性成分之一, 其单糖组成分析尚未见报道。一般来说, 多糖所具有的药理活性往往与其单糖组成是密切相关的, 同时由于多糖和单糖都不具有紫外吸收, 无法直接对其进行测定。因此, 本实验对黄芪多糖进行水解, 采用柱前衍生化 - 高效液相色谱法分析其单糖组成, 希望能够使蒙古黄芪的系列产物达到整合资源、综合利用。

1 材料与仪器

蒙古黄芪产自甘肃, 于 2010 年 3 月购于天津市

收稿日期: 2012-06-04

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划资助项目 (2011BAI07B01)

作者简介: 陈虎虎 (1985—), 男, 江苏豪森医药研究院有限公司研究人员。E-mail: chenrongfei124@163.com

*通讯作者 张铁军, 研究员。Tel: (022)23006848 E-mail: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

中药材饮片厂,批号 1005098;葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、木糖、阿拉伯糖对照品均为分析纯试剂(天津市光复精细化工研究所);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、硫酸、盐酸、氢氧化钠均为分析纯;乙腈、甲醇均为色谱纯。

戴安液相色谱仪,包括 P680 四元液相梯度泵、ASI—100 自动进样器、CO—201 柱温箱、DionexUVD170U 检测器、Chromleon 色谱工作站;PHS—3C 酸度计(上海雷磁公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Welch 公司);流动相:磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8) - 乙腈(83:17);柱温 35 °C;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 245 nm。

2.2 多糖的提取与精制^[4-5]

取蒙古黄芪药材适量,加 10 倍量水加热提取 2 次,每次 1.5 h,减压浓缩至密度约 1.10 g/mL,放凉至室温,加药用乙醇至乙醇体积分数为 60%,静置 12 h,离心,沉淀用 4 倍量 80%乙醇回流脱色 0.5 h 后,鼓风干燥,得到黄芪粗多糖。Sevag 法对粗多糖进行脱蛋白^[6],其溶液在 260~280 nm 波长扫描无吸收峰出现,冻干,即得精制多糖。

2.3 多糖的水解

称取两份精制多糖,各 50 mg,分别置于 10 mL

具塞试管内,加入 2 mol/L 三氟乙酸 2 mL,于 97 °C 水浴水解 8 h,水解液用 4 mol/L 氢氧化钠溶液中和至中性,离心,取清液,即得。

2.4 单糖对照品的衍生化^[7-8]

分别精密称取甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、木糖和阿拉伯糖对照品 5.4、4.5、4.2、4.9、4.7、4.6、4.8 mg,置于 20 mL 量瓶中加水溶解,并加至刻度,即得混合对照品溶液。取该溶液 100 μL 与 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 50 μL 及 0.3 mol/L NaOH 溶液 50 μL 混合,充分振摇,水浴条件下反应 30 min。冷却至室温,加入 0.3 mol/L HCl 50 μL 进行中和,加入 1 mL 氯仿萃取,离心,弃去有机层,重复萃取 3 次,得上层水液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,备用。

2.5 样品的衍生化

精密吸取多糖水解液 100 μL 按照“2.4”项下方法处理后,即得。

2.6 专属性试验

在拟定的色谱条件下,分别取对照品溶液和供试品溶液进样测定,结果在供试品色谱图中,各色谱峰得到良好的分离,无干扰。

2.7 线性关系考察

精密吸取混合单糖对照品溶液 100 μL,衍生化处理,分别进样 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 μL,测定峰面积。用峰面积对各单糖的质量浓度回归,得标准曲线,其回归方程见表 1。

表 1 单糖的标准曲线方程

Table 1 Calibration curve equations for monosaccharides

单糖	回归方程	r	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
甘露糖	$Y=998.12 X+11.45$	0.999 6	5.4~59.4
鼠李糖	$Y=532.17 X+24.39$	0.999 3	4.5~49.5
葡萄糖醛酸	$Y=1 208.00 X-24.88$	0.999 2	4.2~46.2
半乳糖醛酸	$Y=985.95 X-69.91$	0.999 7	4.9~53.9
葡萄糖	$Y=375.06 X+2.38$	0.999 5	4.7~51.7
木糖	$Y=981.50 X-57.67$	0.999 1	4.6~50.6
阿拉伯糖	$Y=1 218.00 X-30.97$	0.999 8	4.8~52.8

2.8 精密度试验

取单糖混合对照品溶液,衍生化处理,连续进样 6 次,记录各吸收峰面积,分别以峰面积计算其 RSD 值,结果甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖 RSD 值分别为

0.80%、1.52%、0.94%、0.78%、1.15%、0.97%、1.07%。

2.9 重复性试验

精密称取蒙古黄芪多糖 6 份,每份约 50 mg,衍生化处理,分别进行测定,计算得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖的峰面积 RSD 值分

别为 0.75%、1.22%、0.96%、0.87%、1.10%。

2.10 稳定性试验

取蒙古黄芪多糖水解衍生化后的溶液，分别在 0、2、4、8、12 h 进样，记录峰面积，结果甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 值分别为 1.40%、0.65%、0.98%、1.47%、1.15%，结果表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.11 回收率试验

精密称取 9 份蒙古黄芪多糖样品，每份 50 mg，分别加入混合单糖对照品溶液适量，水解衍生化处理后，配成低、中、高 3 个质量浓度的溶液，进行测定，计算得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖的平均回收率分别为 98.16%、98.45%、99.14%、99.46%、100.68%，RSD 值分别为 0.95%、0.78%、0.85%、1.02%、1.24%。

2.12 样品分析

将单糖混合对照品图谱与蒙古黄芪多糖色谱图谱进行对照，可以确定蒙古黄芪多糖由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、阿拉伯糖 4 种中性单糖和半乳糖醛酸 1 种酸性单糖组成，另外在蒙古黄芪多糖水解产物中发现 2 个未知峰，尚不能用常用的单糖对照品进行确定，需经进一步的分析确定。色谱图见图 1。

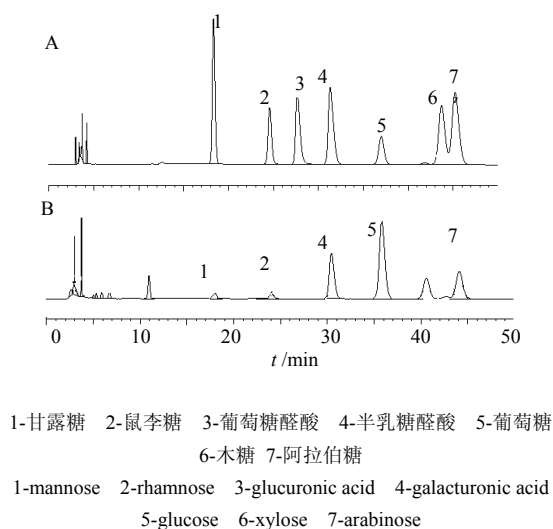


图 1 单糖对照品 (A) 和蒙古黄芪多糖样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of monosaccharide reference substances (A) and AMPP (B)

采用校正因子法对单糖组成进行计算，结果蒙古黄芪多糖中甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖的物质的量比分别为 0.02 : 0.05 : 0.17 : 1 : 0.18。

3 讨论

对多糖的单糖组成进行分析将有助于更全面掌握其结构及其药理作用，但由于多糖类物质不具有发色基团，不能直接利用紫外检测^[9]。本实验采用衍生化方法使蒙古黄芪多糖样品水解后的单糖带上发色基团，使紫外检测信号增强，大大提高检测灵敏度。

本实验建立的 PMP 柱前衍生化 - 高效液相色谱分析蒙古黄芪中单糖组成的方法准确可靠，灵敏度较高，取样量少，且分离效果较理想。实现了在普通实验室常用紫外检测器和 C₁₈ 柱分离分析蒙古黄芪多糖的单糖组成，并可望推广用于其他多糖的单糖组成测定。

参考文献

- [1] 齐宗韵. 黄芪化学成分的研究概况 [J]. 中草药, 1987, 18(5): 41-43.
- [2] Johnson J R, Robinson B L, Ali S F, *et al.* Dopamine toxicity following long term exposure to low doses of 3-nitropropionic acid (3-NPA) in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2000, 116(1/2): 113-118.
- [3] 罗舟, 苏明智, 颜鸣, 等. 蒙古黄芪的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 458-462.
- [4] 江蔚新, 于翔宇, 石慎华, 等. 黄芪茎中有效成分提取方法的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2004, 20(3): 272-274.
- [5] 黄东杰, 翟翠云. 黄芪多糖的提取方法综述 [J]. 企业科技与发展, 2008(22): 74-76.
- [6] 赵海运, 王庆奎, 邢克智, 等. 黄芪多糖除蛋白质方法与条件优化 [J]. 天津农学院学报, 2009, 16(4): 5-8.
- [7] 付海宁, 赵峡, 杨海, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定多糖类兽药中单糖组分方法的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(6): 9-12.
- [8] 杨兴斌, 赵燕, 周四元, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成 [J]. 分析化学, 2005, 33(9): 1287-1290.
- [9] 戴红, 张宗才, 张新申, 等. 芦荟多糖及其分离分析 [J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 5-7.