

HILIC-ELSD 法测定岩藻聚糖硫酸酯中岩藻糖

陈艳萍^{1,2}, 王宇², 曾琪¹, 谭道鹏², 曾令杰^{1*}, 严启新^{2*}

1. 广东药学院 中药学院, 广东 广州 510006

2. 深圳海王药业有限公司, 广东 深圳 518057

摘要: 目的 建立一种简便、高效、准确的测定岩藻聚糖硫酸酯中岩藻糖的方法。方法 采用超声处理(300 W 100%, 20 °C, 20 min); 三氟乙酸(4 mol/mL)水解(110 °C, 2 h); 亲水作用色谱-蒸发光检测(HILIC-ELSD)法检测, Waters XBridge™ Amide (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水-氨水(90:10:0.2), 体积流量 1 mL/min, 柱温 60 °C。结果 岩藻糖的线性范围为 0.100 4~1.004 mg/mL ($r=0.999\ 4$), 平均加样回收率 95.22% ($n=6$, RSD=1.16%)。结论 该方法简便、快速、准确, 为岩藻聚糖硫酸酯的定量分析和质量评价研究提供了依据。

关键词: 亲水作用色谱-蒸发光检测法; 岩藻聚糖硫酸酯; 岩藻糖

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)06-0519-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.009

Determination of fucose in fucoidan by hydrophilic interaction chromatography coupled with evaporative light-scattering detector

CHEN Yan-ping^{1,2}, WANG Yu², ZENG Qi¹, TAN Dao-peng², ZENG Ling-jie¹, YAN Qi-xin²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Shenzhen Neptunus Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518057, China

Abstract: Objective The study aimed at providing an efficient and accurate approach for the determination of fucose in fucoidan. **Methods** After ultrasonic preprocess for 20 min at 20 °C and hydrolysing with trifluoroacetic acid (4 mol/mL, 110 °C) for 2 h, the sample was separated on a Waters XBridge™ Amide (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) column at 60 °C, with acetonitrile-water-ammonia (90:10:0.2) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min, and detected through ELSD. **Results** The experimental results showed that, as for fucose, the linear detection range was 0.100 4 mg/mL —1.004 mg/mL ($r = 0.999\ 4$), the average recoveries and RSD were 95.22%, and 1.16%, respectively ($n=6$). **Conclusion** This method is quick, simple, and accurate, and can be used for the quantitative determination and quality control of fucoidan.

Key words: HILIC-ELSD; fucoidan; fucose

梅花参 *Thelenota ananas* 为棘皮动物门海参纲刺参科梅花参属的动物, 具有补肾壮阳的功效, 岩藻聚糖硫酸酯(fucoidan)是梅花参体壁的重要组成部分, 其主要由岩藻糖及硫酸酯基团组成^[1]。大量研究表明^[1-2], 岩藻聚糖硫酸酯具有抗凝血、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、调节机体免疫等多种生物活性。

多糖类化合物由于极性大, 异构体复杂多变, 理化性质相似, 相对分子质量大, 无紫外吸收等特点, 其分析方法一直是一个难题, 目前, 多糖的含

量测定方法主要有比色法、气相色谱法、高效液相色谱法-柱前衍生化紫外检测法或示差法。比色法只能测定总糖含量且影响因素多, 误差大; 气相色谱法、高效液相色谱法-柱前衍生化紫外检测法或示差法对岩藻聚糖硫酸酯进行分析测定, 必须先经衍生化处理, 步骤繁琐, 引入误差大^[3]。亲水作用色谱(HILIC)是采用极性固定相, 以含高浓度极性有机溶剂和低浓度水溶液为流动相进行分离, 因此 HILIC 适于对极性化合物的分离, 近年来在糖类成分分析发展较快, 蒸发光检测器(ELSD)作为一种通用型

收稿日期: 2014-07-15

基金项目: 中国博士后科学基金(2012M511837)

作者简介: 陈艳萍(1989—)女, 湖南人, 硕士在读, 研究方向为中药质量控制。Tel: 13544242058 E-mail: yanpingapple2009@sina.com

*通信作者 曾令杰, 男, 教授, Tel: (020)39352175 E-mail: zlj334477@yahoo.com.cn

严启新, 男, 研究员, Tel: (0755)26409875 E-mail: yanqixin2005@126.com

检测器最大的优势在于可以测定无紫外吸收的化合物, 稳定性好, 灵敏度高, 无溶剂峰干扰等特点, 弥补紫外检测器和示差折光检测器的不足^[4]。因此, 本研究尝试建立 HILIC-ELSD 法测定岩藻聚糖硫酸酯中岩藻糖的含量的方法, 为岩藻聚糖硫酸酯新药的开发利用及质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), Alltech 2000ES 型蒸发光检测器 (美国奥泰科技有限公司), Allchrom 色谱数据处理工作站, 梅特勒托利多分析天平 (梅特勒托利多公司), KQ 300 DE 型医用数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), FDV-1200 型冷冻干燥机 (日本东京理化公司)。

岩藻糖对照品 (美国 Sigma 公司, EC NO2194527, 质量分数 $\geq 99.0\%$)。三氟乙酸、乙腈为色谱纯, 实验用水为去离子水, 岩藻聚糖硫酸酯样品为实验室自制 (提取纯化自梅花参, 批号 20130821, 平均重均分子量 341 160, 分布系数 1.98)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters XBridgeTM Amide 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μ m), 流动相为乙腈-水-氨水 (90:10:0.2), 体积流量 1 mL/min, 柱温 60 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。ELSD 参数: 漂移管温度 80 $^{\circ}$ C, 雾化气 (N_2) 体积流量 2 L/min, 撞击器关。岩藻糖对照品和岩藻聚糖硫酸酯样品的色谱图见图 1。

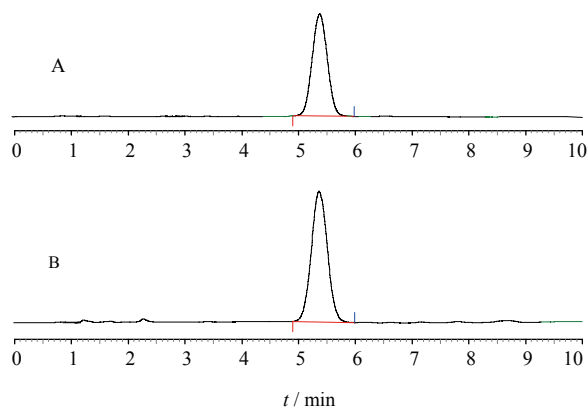


图1 岩藻糖对照品 (A) 和岩藻聚糖硫酸酯样品 (B) 的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of fucose (A) and sample of fucoidan (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取岩藻糖对照品 50.20 mg, 置于 50 mL

量瓶中, 用 75%乙腈-水溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取储备液 1、2、3、5、6、8、10 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加 75%乙腈-水溶液至刻度, 摇匀, 配制成浓度分别为 0.100 4、0.200 8、0.301 2、0.502 0、0.602 4、0.803 2、1.004 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取 500 mg 岩藻聚糖硫酸酯样品用 50 mL 水充分搅拌溶解, 进行超声处理 (超声功率 300 W, 时间为 20 min, 温度 20 $^{\circ}$ C), 结束后, 冷冻干燥, 作为储备样品。

精密称取 10.00 mg 储备样品, 置于安瓿瓶中, 加入 4 mol/mL TFA 4 mL, 溶解并混合均匀, 封口, 于 110 $^{\circ}$ C 恒温油浴中加热反应 2 h, 反应结束后, 用甲醇旋蒸除去 TFA, 用 75%乙腈-水溶液洗出, 转移至 5 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 溶液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后供 HPLC 检测。

2.4 方法学考察

2.4.1 检测限、定量限考察 以 3 倍信噪比 (S/N) 确定岩藻糖的检测限为 0.200 8 μ g, 以 10 倍信噪比 (S/N) 确定岩藻糖的定量限为 0.502 μ g。

2.4.2 线性关系考察 取“2.2”项下岩藻糖对照品溶液分别进样 10 μ L, 以峰面积的对数为纵坐标, 质量浓度 (μ g/mL) 的对数为横坐标作图, 得到岩藻糖的线性回归方程为: $Y=1.756 4 X+2.961 3$ ($r=0.999 4$), 说明岩藻糖质量浓度在 0.100 4~1.004 mg/mL 线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 取“2.2”项下质量浓度为 0.602 4 mg/mL 的对照品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 岩藻糖峰面积的 RSD 值为 0.48%, 表明仪器的精密度较好。

2.4.4 重复性试验 取同一样品按照“2.3”项下方法平行制备 6 份溶液, 进行 HPLC-ELSD 法分析, 计算得岩藻糖的质量分数的 RSD 值为 1.32%。

2.4.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别放置 0、2、4、6、8 h 后进样进行稳定性考察。结果表明在 8 h 内岩藻糖的峰面积未发生明显变化, RSD 值为 2.01%, 则供试品溶液在 8 h 稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称定岩藻糖对照品 18.75 mg, 加入 4 mol/mL TFA 定容至 25 mL, 为储备液; 准确称取供试储备品约 10.00 mg, 6 份, 置于安瓿瓶中, 分别加入 4 mL 储备液, 溶解并混合均匀, 封口, 于 110 $^{\circ}$ C 反应 2 h 后, 用甲醇旋蒸除

去 TFA, 用 75%乙腈-水溶液洗出, 转移至 10 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 制备加样供试品液; 按照“2.1”项下的色谱条件分别对加样供试品液进行分析, 计算加样回收率, 结果平均加样回收率为 95.22%, RSD 值为 1.16%。

2.4.7 样品的测定 按照“2.3 项”下的样品处理溶液 3 份, 按上述色谱条件分别进样 10 μ L, 按随行标准曲线计算样品中岩藻糖的质量分数, 结果分别为 32.15%、31.95%、33.15%。

3 讨论

3.1 HPLC-ELSD 法的选择

本研究比较了半胱氨酸-硫酸法、高效液相色谱法-柱前衍生化紫外检测法、HPLC-ELSD 法测定岩藻糖含量的对比实验。半胱氨酸-硫酸法、高效液相色谱法-柱前衍生化紫外检测法均参照文献^[5-6]。结果表明, 半胱氨酸-硫酸法、高效液相色谱法-柱前衍生化紫外检测法衍生化过程繁琐, 重复性差, 本研究采用 HPLC-ELSD 法测定岩藻聚糖硫酸酯中岩藻糖含量, 方法稳定、准确、重复性好。

3.2 色谱条件的优化

根据文献报道^[7-8], 流动相的组成及其挥发性是限制 ELSD 应用的主要因素, 且柱温的改变, 能极大的改善单糖峰形。因此, 本实验主要考察了不同流动相: 乙腈-水 (75:25)、乙腈-水 (85:15); 乙腈-水-TFA (85:15:0.1)、乙腈-水-氨水 (85:15:0.2)、乙腈-水-氨水 (90:10:0.2), 不同柱温 (30、40、50、60 $^{\circ}$ C) 对实验结果的影响。结果表明, 在碱性条件下, 且增大乙腈的比例, 样品的峰宽变窄, 有利于样品中岩藻糖与其他杂质的分离。随着柱温的升高, 色谱峰的保留时间变短, 峰宽变窄。因此选择最佳流动相为乙腈-水-氨水 (90:10:0.2), 最佳柱温为 60 $^{\circ}$ C。

3.3 超声预处理促进酸水解

多糖因含有大量羟基和一些其他极性基团, 易产生分子内和分子间的氢键而形成晶体结构, 使多糖分子具有一定的刚性, 影响多糖的水解, 同时酸水解也存在酸在糖聚合物中渗透慢, 高温水解易造成糖组分破坏、酸解液颜色深等问题^[9]。为了改进酸水解的效果, 本研究采用超声预处理岩藻聚糖硫

酸酯样品后再进行水解, 且对水解条件进行了优化, 结果表明, 超声后的样品在 4 mol/mL TFA 的浓度下反应 2 h 后可水解完全。同时, 超声酸水解比未超声酸水解方法测定的岩藻糖含量高 10%左右, 可能是超声波产生的能量能够破坏或减弱糖分子间和分子内的氢键, 使其颗粒表面及内部结晶结构受到破坏, 作用力减弱, 从而能够更有效地催化水解多糖。

经过与文献报道的常规试验方法的比较, 并对其中主要影响因素深入考察后, 本实验建立的超声酸水解预处理后, 进行 HILIC-ELSD 法测定岩藻糖含量, 简便快速, 结果准确, 重复性好。该测定方法的建立为岩藻聚糖硫酸酯在研究与工艺应用时的快速定量分析和质量评价研究提供了有力的参考。

参考文献

- [1] Yu L, Xue C G, Chang Y G, *et al.* Structure elucidation of fucoidan composed of a novel tetrafucose repeating unit from sea cucumber *Thelenota ananas* [J]. *Food Chem*, 2014(146): 113-119.
- [2] Kalimuthu S, Panchanathan M, Jayachandran V, *et al.* Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanisms in cancer [J]. *Biol Macromol*, 2013, (60): 366-374.
- [3] 刘 舒, 汪秋宽. 三种褐藻中岩藻聚糖硫酸酯的纯化及结构分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学. 2013.
- [4] Slimstad R, Vågen I M. Thermal stability of glucose and other sugar aldoses in normal phase high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, (1118): 281-284.
- [5] YBZ00902003-2008 褐藻多糖硫酸酯 [S]. 2008.
- [6] 王泽文, 冷凯良, 孙伟红, 等. 柱前衍生高效液相色谱法分析海带岩藻聚糖的单糖及糖醛酸组成 [J]. *分析科学学报*, 2011, 27(1): 26-30.
- [7] 姚尚辰, 马仕洪. 蒸发光散射检测器及其在 2005 版中国药典抗生素品种中的应用 [J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(12): 712-720.
- [8] Karlsson G, Winge S, Sandberg H. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 2(1092): 246-249.
- [9] 李 娜, 肖凯军, 王兆梅. 超声和离子液预处理促进高结晶多糖水解的研究 [D]. 广州: 华南理工大学. 2012.