

· 药剂与工艺 ·

一种判定多糖中是否有糖醛酸残基的简易新方法

刘翠平,董 群,方积年*

(中国科学院上海生命科学研究院上海药物研究所,上海 200031)

摘 要:目的 建立一种判定多糖中是否有糖醛酸残基的简便可靠的方法。方法 采用 TLC分析了含糖醛酸的多糖还原前后的样品以及标准葡聚糖分别酸水解 2和 4h的产物,以探讨传统 TLC方法是否可靠。并将含糖醛酸的多糖及中性多糖完全酸水解产物进行 TLC检测,糖醛酸标准品为对照,以苯胺-邻苯二甲酸显色检测糖醛酸,此外,考察了其灵敏度,并与已有的方法比较。结果 传统方法中的荧光斑点系由 $\text{CF}_3\text{COOCH}_3$ 以及反应过程中其他副产物产生的,并非糖醛酸产生。新法可检测出 $0.5\mu\text{g}$ 的糖醛酸,无假阳性结果。结论 传统方法缺乏必要的理论依据,容易误导结构研究。以糖醛酸标准品为对照,对多糖样品完全酸水解产物进行薄层层析后,采用苯胺-邻苯二甲酸显色能可靠地判定糖醛酸的有无。

关键词: 糖醛酸;多糖;方法学研究

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)05-0404-04

New simple method to detect uronic acids in polysaccharides

LIU Cui-ping, DONG Qun, FANG Ji-nian

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract **Object** To develop a simple and reliable method to detect the presence of uronic acids in polysaccharides. **Methods** Uronic acid containing polysaccharides and standard glucons were subjected to acid hydrosis for 2 h and 4 h respectively. Samples of the products, before and after hydrolysis were analyzed by TLC using standard uronic acid as the control and aminobenzen-alizaric acid as the chromogenic agent, to compare the sensitivities in the detection of uronic acid used in the present conventional analysis.

Results The fluorescent spots used as criterion in traditional TLC method were not shown by uronic acids, but by $\text{CF}_3\text{COOCH}_3$ and other by-products in reaction. $0.5\mu\text{g}$ of uronic acid could be detected with our method, without false positive reaction. **Conclusion** The traditional TLC method seemed to lack theoretical background and may mislead structural study. The present method is more reliable to detect uronic acids in polysaccharides by analyzing the complete hydrolytic products of polysaccharides using TLC with standard uronic acids as control and aminobenzene-alizaric acid as chromogenic agent.

Key words uronic acid; polysaccharides; methodology studies

对从天然植物中得到的多糖,在结构研究中尤其对糖组成分析,确定其中是否含有糖醛酸残基具有极为重要的意义。过去许多实验室沿袭的判定方法是:将多糖样品以 2mol/L CF_3COOH 溶液于 110°C 水解 2h后,减压浓缩蒸干,加 MeOH 处理,减压蒸干,重复以上操作 4~5次以除尽 CF_3COOH ,加入适量 H_2O 使溶解,再将该溶液进行薄层层析后置紫外灯下观察,以有无荧光滞后 ($R_f < R_{f(\text{c})}$) 斑点来确定是否含有糖醛酸。该法应用广泛,不仅在多糖组成分析中,而且在糖醛酸还原后

确定是否将糖醛酸还原完全时也要用到。我们在实验过程中发现该法缺乏必要的理论依据,容易误导结构研究。为此,我们对此法进行了深入探讨,并提出了一种简便的判定多糖中是否有糖醛酸的新方法。

1 仪器与试剂

Sartorius 分析天平, ZD-2型自动电位滴定计, 三用紫外分析仪, 722光栅分光光度计, 纤维素板为 Merck 出品;葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖为 Fluka 产品; Dextran T-71及 T-700为 Pharmacia 产品; CF_3COOH 与 N -cyclohexyl- N' -

* 收稿日期: 2000-09-30

作者简介: 刘翠平 (1973-), 女, 湖北天门市人。1995年毕业于湖北中医学院药学系, 学士; 1998年毕业于河南中医学院中药系, 硕士; 现为中科院上海药物研究所博士生, 师从方积年教授从事天然活性多糖的研究。

* 通讯联系人: 方积年研究员 Tel (021) 64311833601 Fax (021) 64370269 E-mail jnfang@mail.shcnc.ac.cn

[2-(*N*-methylmorpholino)-ethyl] carbodiimid-4 (以下简称 CMC), 均为 Merck-Schuchardt 产品; 间羟基联苯为 Aldrich 产品; 含糖醛酸的多糖样品 CPB-0.5 E55 及 J 为本实验室制备。其他试剂均为国产 AR 级

2 实验方法

2.1 样品处理: 将含有糖醛酸的多糖样品 CPB-0.5 及 E55 各 15 mg, 按文献^[1]方法以 CMC 还原 3 次后, 对水透析, 冷冻干燥。取冷冻干燥后的样品各 2 mg, 加入 2 mol/L CF_3COOH 溶液 3 mL, 封管后, 110°C 水解 2 h。水解液于 40°C 减压浓缩蒸干, 加入 MeOH 处理, 减压蒸干, 重复 4~5 次以除尽 CF_3COOH 。再加入 0.2 mL H_2O 使溶解, 所得产物分别依次命名为 RCPB-2 和 RE55-2, 供试。

另取 3 次还原糖醛酸后的多糖样品 CPB-0.5 及 E55 各 2 mg, 按上述条件水解 4 h, 其余操作同上, 所得水解产物的水溶液分别依次命名为 RCPB-4 和 RE55-4, 供试。

取葡萄糖 Dextran T-71 T-700 各两份, 每份 2 mg, 另取两只洁净的试管, 不加任何样品, 向以上 8 只试管中加入 2 mol/L CF_3COOH 溶液 3 mL, 封管后, 一份于 100°C 水解 2 h, 另一份水解 4 h, 其余操作同上, 所得产物分别依次命名为 Glc-2, Glc-4, T71-2, T71-4, T700-2, T700-4, Contr-2 和 Contr-4, 供试。

取 CPB-0.5 E55 及 J 各 2 mg, 按上述条件水

解 4 h, 其余操作同上, 所得水解产物的水溶液分别依次命名为 CPB-4 E55-4 和 J-4h, 供试。

2.2 薄层检测: 取以上样品 RE55-2 RE55-4 RCPB-2 和 RCPB-4 各 $5\mu\text{L}$, 点样于同一张纤维素板上, 以葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸为对照进行薄层层析, 展开剂为乙酸乙酯-吡啶-醋酸-水 (5:5:1:3) 展开后, 挥干溶剂, 置紫外灯下 ($254\text{ nm} + 365\text{ nm}$) 观察 (图 1-1), 然后用苯胺-邻苯二甲酸显色^[2] (图 1-2)。

另取 CPB-4 E55-4 各 $5\mu\text{L}$, 点样于纤维素板上, 以 CMC 和 CF_3COOH 为对照, 按上述条件层析, 展开后, 挥干溶剂, 置紫外灯下观察。

另取 Glc-2 Glc-4 T71-2 T71-4 T700-2 T700-4 各 $5\mu\text{L}$, Contr-2 和 Contr-4 各 $10\mu\text{L}$, 以标准葡萄糖为对照进行薄层层析, 条件同上。展开后, 挥干溶剂, 置紫外灯下观察 (图 1-3)。

另取 T700-4 CPB-4 E55-4 和 J-4 各 $5\mu\text{L}$, 点样于纤维素板上, 以葡萄糖醛酸-半乳糖醛酸为对照进行薄层层析。层析条件同上。展开后, 挥干溶剂后用苯胺-邻苯二甲酸显色 (图 1-4)。

2.3 糖醛酸薄层检测限的考察: 称取干燥至恒重的葡萄糖醛酸 5.432 mg 及半乳糖醛酸 6.664 mg, 加入少量 H_2O 使溶解, 定容至 5 mL。分别取该溶液 2, 1 和 0.5 μL 点样于纤维素板上, 按上述条件薄层层析后, 挥干溶剂, 用苯胺-邻苯二甲酸显色 (图 1-5)。

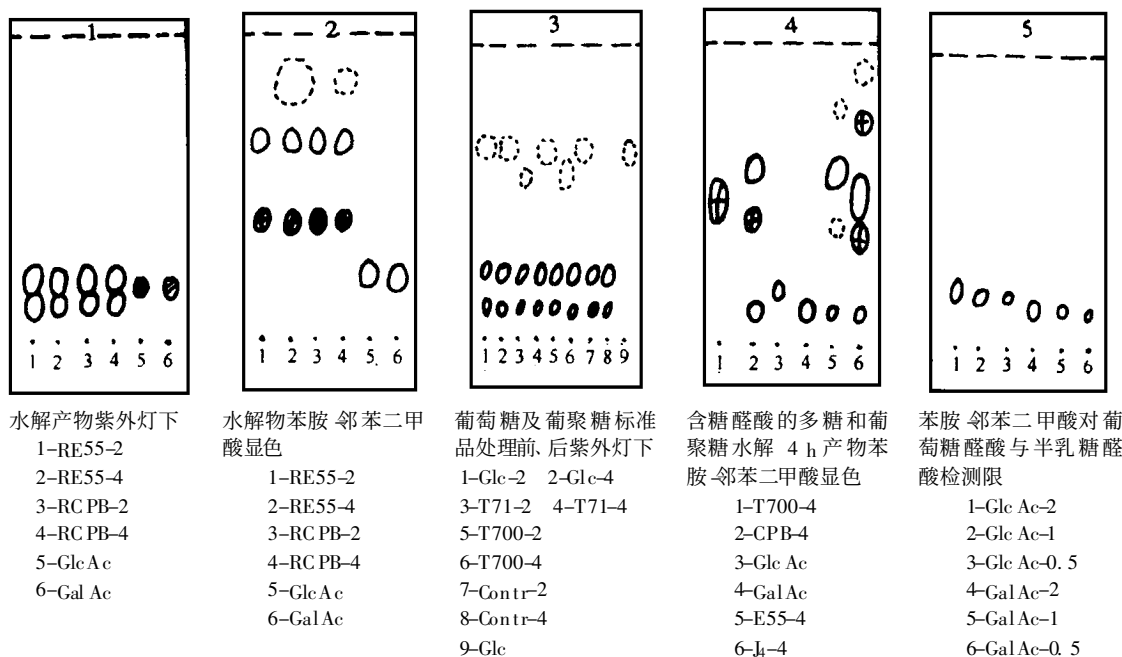


图 1 样品薄层检测结果

2.4 对间羟基联苯法检测糖醛酸检测限的考察: 参照文献^[3]方法,以 0.5, 1, 2, 3, 4 μ g 对以上葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸溶液考察。为考察该法是否受中性糖残基的干扰,每个样品中加入等体积的葡萄糖和阿拉伯糖的混合溶液(称取 4.3 mg 葡萄糖和 6.6 mg 阿拉伯糖,加入少量水使溶解,定容至 5 mL),并以

相应体积的葡萄糖和阿拉伯糖的混合溶液为空白对照,加水稀释至 0.2 mL,加入 1.2 mL 硫酸 硼砂溶液,冰浴冷却,再于沸水加热 5 min,然后冰浴冷却,加入 20 μ L 间羟基联苯溶液,肉眼观察溶液的颜色变化,每个梯度及相应空白样品平行操作两次,结果见表 1

表 1 间羟基联苯法检测灵敏度

加样量 (μ L)	0.5	0.5	1	1	2	2	3	3	4	4
Glc- Ara	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色	无色
Glc- Ara+ GlcAc	无色	无色	淡红	淡红	品红	品红	品红	品红	品红	品红
Glc- Ara+ GalAc	无色	无色	淡红	淡红	品红	品红	品红	品红	品红	品红

3 结果与讨论

从图 1-1、-2可以看出,葡萄糖醛酸及半乳糖醛酸这两种糖醛酸无论在紫外灯下还是苯胺-邻苯二甲酸显色后的行为均与图中所示的荧光斑点大相径庭。如果传统 TLC 检测方法是正确的,那么,经过糖醛酸还原 3 次的 CPB-0.5 及 E55 酸水解 4 h 后的样品显色后,在 R_f 值相应于荧光斑点处应显示出糖醛酸应有的红棕色斑点,而由图可看出并非如此,说明该荧光斑点并不是由糖醛酸产生的。理论上讲,糖醛酸结构中并没有共轭系统,在其羰基附近也没有什么发色团或助色团,因此是不可能产生荧光的,这可以由紫外灯下观测的结果(图 1-1)得到证实。因此,传统的检测方法以 R_f 值小于葡萄糖处出现荧光滞后斑点来确认多糖样品中含有糖醛酸,这缺乏足够的理论依据。因为即便是在水解 2 h 条件下,糖醛酸与相连的中性或酸性糖残基也未被水解,那么该寡糖片段也不可能产生荧光。

为进一步阐明该荧光斑点为何物,将 E55-4 和 CPB-4 点样于同一张纤维素板上,并以 CMC 和 CF₃COOH 为对照,层析结果表明 CMC 在紫外灯下无荧光,而 CF₃COOH 虽有荧光,但在该层析条件下位于原点,说明该荧光斑点并非 CMC 和 CF₃COOH 产生。将葡萄糖、Dextran T-71、T-700 分别水解 2、4 h,并制备空白样品各 1 份,层析后紫外灯下观察,发现 8 个样品均在 R_f 值小于葡萄糖处出现相同的荧光斑点,唯有未经以上水解及 MeOH 处理的葡萄糖水溶液层析后未出现荧光斑点(图 1-3),由此说明该荧光斑点系减压浓缩过程中加 MeOH 处理时产生的 CF₃COOCH₃及其他反应副产物产生的。因此,如果按传统方法判定糖醛酸的存在与否,那么在点样量较大时 CF₃COOCH₃及其他反应副产物产生的荧光斑点很容易干扰结果,误导结构研究。

本实验研究发现含糖醛酸的多糖样品在 2 mol/L CF₃COOH 溶液中于 110℃ 水解 4 h 后薄层层析,采用苯胺-邻苯二甲酸显色可检测糖醛酸是否存在,不受其中中性糖残基的干扰,对不含糖醛酸的多糖样品不会出现假阳性结果(图 1-4),其检测灵敏度 0.5 μ g(图 1-5)。

间羟基联苯法是一种常用的多糖中糖醛酸含量测定方法,该法较吡啶法^[5]受中性糖残基的干扰更小。我们发现该法在 1 μ g/0.2 mL 时对两种糖醛酸都有响应,呈现肉眼可观察到的品红色(表 1)。

通过 IR 或 ¹³CNMR 测定,也可判定糖醛酸的存在与否。含糖醛酸的多糖样品 IR 谱中 1700~1750 cm⁻¹ 范围内会产生吸收,¹³CNMR 谱中在低场 176 附近会有羰基碳的特征吸收。但是,若多糖中糖醛酸残基含量较少时,在 IR 谱中 1700~1750 cm⁻¹ 范围内的吸收峰往往会被掩盖,而 ¹³CNMR 光谱测定需要消耗大量纯度较高的样品,花费也很高。相比之下,薄层检测不失为一种简便易行的方法。

综上所述,我们推荐的判定方法如下:取多糖样品 4 mg,加入 2 mol/L CF₃COOH 溶液 3~5 mL,于 110℃ 封管水解 4 h 后,40℃ 减压浓缩蒸干,加入 MeOH 处理,减压蒸干,重复以上操作 4~5 次以除尽 CF₃COOH,加入 0.2 mL H₂O 使溶解,取 5 μ L 点样进行薄层层析,以糖醛酸标准品为对照。展开剂为乙酸乙酯-吡啶-醋酸-水(5:5:1:3),显色剂为苯胺-邻苯二甲酸,105℃ 加热 5~10 min,若含糖醛酸残基,则在 R_f 值相近于糖醛酸标准品处应显示红棕色斑点。如果为确保检测出含量很少的糖醛酸,可以适当增加点样量。

参考文献:

[1] Taylor R L, Conrad H E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups [J]. Biochemistry, 1972, 11(8): 1383-1388.
[2] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版

- 社, 1999.
- [3] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. Anal Biochem, 1973, 54: 484-489.

- [4] Galambos J T. The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars [J]. Anal Biochem, 1967, 19: 119-132.

HPLC法测定不同干燥方法的贯叶连翘中黄酮类化合物的含量

钱秋霞¹, 丛晓东^{2*}

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038; 2. 山东省天然药物工程技术研究中心, 山东 烟台 264003)

摘要: 目的 研究 HPLC 测定条件, 并测定不同干燥方法贯叶连翘中黄酮类化合物芦丁、金丝桃苷的含量。方法 色谱柱: Discovery C₁₈ (5 μ m, 25 cm $\times$ 4.6 mm); 流动相: 水-乙腈-磷酸 (825: 175: 1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 365 nm。结果 60 $^{\circ}$ C 烘干 4 h 贯叶连翘中芦丁和金丝桃苷的含量最高, 总含量可达到 1.677%。芦丁的线性范围为 0.107~2.675 μ g, 平均回收率为 99.32%, $RSD=1.007\%$, 金丝桃苷的线性范围为 0.107~2.675 μ g, 平均回收率为 99.54%, $RSD=3.591\%$ 。结论 该方法分析简便、灵敏、迅速、准确。

关键词: HPLC; 贯叶连翘; 芦丁; 金丝桃苷

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)05-0407-03

Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* processed by different methods of drying by HPLC

QIAN Qiu-xia¹, CONG Xiao-dong²

(1. College of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210038, China; 2. Shandong Engineering Research Center of Natural Drugs, Yantai Shandong 264003, China)

Abstract Object To develop a method for the determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* L. processed by different drying methods to provide a basis for the processing of the natural herbs. **Methods** The chromatographic conditions were Discovery C₁₈ column (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 25 cm), detection wavelength 365 nm; mobile phase: water: acetonitrile: phosphoric acid (825: 175: 1); flow rate 1.0 mL/min. **Results** The contents of rutin and hyperin were at their maximum when dried at 60 $^{\circ}$ C for 4 h. Rutin had a good linearity in the range of 0.107~2.675 μ g, average recovery rate 99.32%, $RSD=1.007\%$, and hyperin in the range of 0.107~2.675 μ g, average recovery rate 99.54%, $RSD=3.591\%$. **Conclusion** Temperature is the main factor influencing the content of flavonoids. The HPLC determination was shown to be rapid, reliable and simple, and may be used for the quality control of *H. perforatum*.

Key words HPLC; *Hypericum perforatum* L; rutin; hyperin

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 是藤黄科金丝桃属植物, 含有多具生物活性的化学成分, 其中主要是苯并二萜酮类化合物、金丝桃素和伪金丝桃素; 多种黄酮类化合物, 如芦丁、槲皮素和金丝桃苷; 间苯三酚类化合物如贯叶金丝桃素和加贯叶金丝桃素 (拟) 以及挥发油和 xanthone 类化合物等。

对贯叶连翘的质量分析多有报道, 大多以金丝桃素为质量指标, 而金丝桃素含量很低, 尚不能反映药材质量。本文以黄酮类化合物芦丁 (rutin)、金

丝桃苷 (hyperin) 为质量指标, 建立了同时测定芦丁、金丝桃苷的 HPLC 含量测定方法, 该方法快速简便, 稳定性和重现性好, 可用于药材的质量控制。并测定了不同干燥方法贯叶连翘中黄酮类化合物的含量, 探讨了温度对贯叶连翘中黄酮类化合物的影响, 为药材的加工、炮制提供一定的理论依据。

1 仪器与试剂

色谱仪: Spectra SYSTEM P1000 高效液相色谱仪, Spectra 100 紫外可见光检测器; 色谱工作站:

* 收稿日期: 2000-11-29

作者简介: 钱秋霞, 女, 1996年毕业于南京中医药大学, 现为中国药科大学 98级研究生, 专业生药学, 研究方向为天然药物分析及质量标准化研究。