References:

[1] Yang X L, Xie C X, Xu H B, *et al*. Preparation of nano *Concha Haliotidis* [P]. CN: 01106679.2, 2001-04-30.

[2] Xie C X, Yang X L, Xu H B, *et al*. Preparation of nano Reagler [P]. CN: 00116045.1, 2000-09-25.

[3] Xu H B, Xie C X, Yang X L, *et al*. Preparation of nano magnet [P]. CN: 01106680.6, 2001-04-30.

[4] Wang X B, Xi R G, Li Z L, *et al*. Preparation of nanoparticles Realgar powders [J]. *Pham J Chin PLA* (解放军药学学报). 2002, 18 (3): 129-134.

[5] Yang S Z. Effect of *Astragalus membranaceus* on natural killer cell activity and induction of α-and γ-interferon in patients with coxsackie B virus [J]. *Chin Med J* (中医杂志), 1990, 103: 304-308.

[6] Liang S W. *Quantitative Analysis of Chinese Traditional Medical Preparation* (中药制剂的定量分析) [M]. Beijing: Chinese Traditional Medical Press, 1997.

高效毛细管电泳法测定玉米花粉多糖中单糖的组成

耿 越，王建波，刘靓雯，张明伟，刘书明

（山东师范大学生命科学学院，山东 济南 250014）

摘 要：目的 采用高效毛细管电泳法测定玉米花粉多糖中单糖的组成。**方法** 玉米花粉多糖水解后，经 α-萘胺衍生化，高效毛细管电泳分析。电泳条件：缓冲液为 75 mmol/L 硼砂溶液（pH 9.5）；柱温 22 ℃；电压 16 kV；检测波长 200 nm；气压进样，进样时间 5 s。**结果** 玉米花粉多糖主要是由葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖 3 种单糖组成。**结论** 高效毛细管电泳可用于测定多糖中单糖的组成。

关键词：玉米花粉；多糖；高效毛细管电泳

中图分类号：R286.02 **文献标识码：**B **文章编号：**0253-2670(2005)08-1164-03

Determination of monosaccharide composition of maize pollen polysaccharides by HPCE

GENG Yue, WANG Jian-bo, LIU Jing-wen, ZHANG Ming-wei, LIU Shu-ming

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Key words: maize pollen; polysaccharides; high performance capillary electrophoresis (HPCE)

玉米花粉多糖具有多种免疫增强活性，对肺泡及人胸腔内的巨噬细胞有明显的激活作用[1~3]，并能明显抑制小鼠 S_{180} 肿瘤细胞的生长[3,4]。

高效毛细管电泳（HPCE）技术具有样品用量少、时间短、灵敏度高、分离效果明显的特点，在糖类物质的检测方面具有独特的优势。由于单糖在水溶液中解离能力极差，在强碱条件下才能带上电荷。使用含硼砂的缓冲液会让单糖在较低的 pH 条件下带上足够的负电荷。不同的单糖在相同介质条件下与硼砂的络合物具有有效淌度的差异，足以被毛细管电泳分开。单糖的紫外吸收很弱，采用 α-萘胺为衍生试剂使其带上可被检测的基团[5]。本实验采用此法测定了三氯醋酸法去蛋白的玉米花粉多糖中的单糖组成，并将结果与 Sevag 法去蛋白的玉米花粉多糖中的单糖组成进行比较。

1 仪器与试剂

电泳装置为 Beckman P/ACE 5000，操作软件为 Beckman P/ACE Station 1.0，毛细管柱（57 cm×50 μm，有效长度 50 cm）（河北永年光导纤维厂）。

半乳糖、木糖、甘露糖对照品（进口分装），葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖对照品（国产分析试剂）；玉米花粉购于济南蜂产品专卖店；试剂均为分析纯，水为双蒸水。

电泳条件：缓冲液为 75 mmol/L 硼砂溶液（pH 9.5）；柱温 22 ℃；电压 16 kV；检测波长 200 nm；气压进样，进样时间 5 s；清洗液 0.1 mol/L HCl 溶液、0.1 mol/L NaOH 溶液、重蒸水。

2 方法与结果

2.1 衍生试剂的配制：称取 α-萘胺 143 mg 和 $NaBH_3CN$ 35 mg，溶于 450 μL 无水甲醇中，再加入 41 μL 冰醋酸，即得。

2.2 单糖对照品溶液的制备：取各种单糖用重蒸水配成质量浓度为 20 mg/mL 的水溶液。各取 1 mL 制成单糖对照品混合液。

收稿日期：2004-11-27

基金项目：山东省自然科学基金资助项目（Y2002D11）

作者简介：耿 越（1965—），男，山东淄博人，博士，教授，1999 年毕业于同济大学，获博士学位，主要从事天然产物研究。

Tel: (0531) 86180196 E-mail: gengy@sdnu.edu.cn

2.3 多糖供试品溶液的制备：玉米花粉 500 g 加入 1 000 mL 去离子水浸泡过夜，组织捣碎机捣碎，然后加入约 8 000 mL 水，煎煮 3 h，重复 3 次。合并浸提液进行减压浓缩，用 3 倍体积 95%乙醇沉淀，离心，取沉淀，用三氯醋酸法去蛋白，再经 3 倍体积乙醇沉淀，得到多糖粗品。多糖粗品加水溶解后，依次用终体积分数为 20%、40%、60%、80%乙醇沉淀，得出 4 种组分，再用无水乙醇、丙酮、乙醚脱水干燥，得粗多糖，分别命名为 PMA (4.15 g)，PMB (3.77 g)，PMC (5.98 g)，PMD (4.75 g)。4 种组分按原比例混合得到 PPM。

所有多糖经过紫外-可见全波长扫描，均不含有蛋白、核酸。PMA、PMC 分别经 Sepharose CL-6B 柱色谱分离，得到两种纯化多糖 PMA Ⅱ、PMC Ⅳ。

取各种玉米花粉多糖 20 mg (PMA Ⅱ、PMC Ⅳ为 5 mg)，加入 1 mL、1 mol/L H_2SO_4，溶解后放入安瓿管中封管，100 ℃恒温水解 8 h，冷却后用碳酸钡完全中和，放置过夜，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，待衍生。各取多糖的水解液、单糖对照品混合液、单糖溶液 200 μL 于安瓿管中，分别加 40 μL 衍生试剂，封管，80 ℃恒温 2 h 衍生化。然后各加入 1 mL 三氯甲烷和重蒸水，反复离心萃取 3 次，取上层水相滤过，定容至 5 mL，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取滤液作为供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备：将衍生化的单糖对照品混合液精确稀释 2、4、8、16 倍，得到质量浓度分别为 133.33、66.67、33.33、16.67、8.33 μg/mL 的溶液，测定回归方程，以质量浓度对峰面积进行回归，得回归方程，线性范围为 8.33～133.33 μg/mL，回归方程为鼠李糖：$Y=15\ 204.75+1\ 688.99\ X$，$r=0.988\ 5$；木糖：$Y=26\ 053.12+2\ 710.28\ X$，$r=0.987\ 0$；葡萄糖：$Y=9\ 510.17+1\ 404.93\ X$，$r=0.996\ 7$；甘露糖：$Y=5\ 351.83+666.14\ X$，$r=0.993\ 7$；阿拉伯糖：$Y=44\ 930.37+4\ 563.69\ X$，$r=0.985\ 7$；半乳糖：$Y=24\ 358.79+2\ 808.19\ X$，$r=0.992\ 2$。

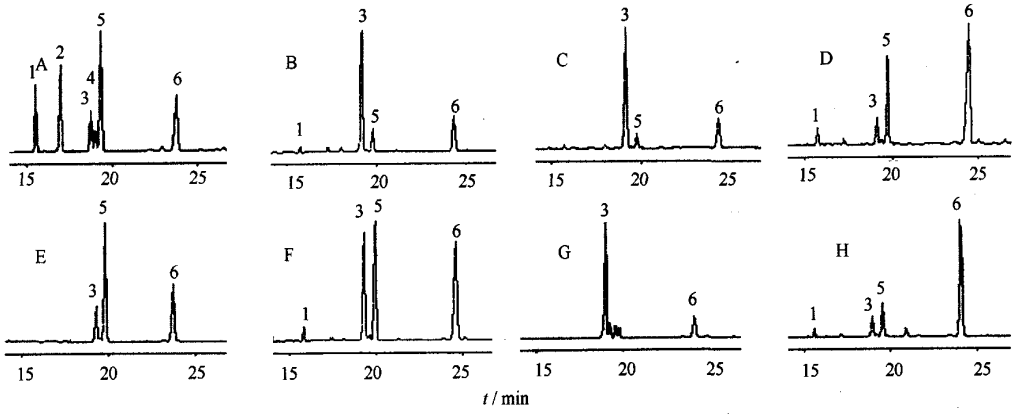
2.5 测定：测定单糖对照品混合液的电泳图谱，然后逐一加入 1 种单糖，根据峰面积的变化，确定对应的单糖。根据出峰时间，通过 P/ACE Station 1.0 软件进行比较对照，确定各种多糖的单糖组成，结果见表 1，图谱见图 1。

表 1 多糖中单糖的峰面积百分数

Table 1 Percentage of peak area of different monosaccharides in polysaccharides

多糖	ω/%					
	鼠李糖	木糖	葡萄糖	甘露糖	阿拉伯糖	半乳糖
PMA	微量	微量	67.346	无	10.330	22.324
PMB	微量	无	71.223	无	6.811	21.966
PMC	3.499	微量	7.038	无	27.354	61.334
PMD	微量	无	13.384	无	54.552	32.064
PPM	1.873	无	27.738	无	32.773	37.616
PMA Ⅱ	无	无	83.579	微量	微量	16.421
PMC Ⅳ	1.538	微量	6.588	无	13.641	78.233

2.6 多糖中各单糖组成：根据多糖中单糖峰面积计算多糖中单糖的物质的量的比值，结果 PMA 中 Glu：Ara：Gal 为 7.58：0.04：1，PMB 中 Glu：Ara：Gal 为 7.22：0.08：1，PMC 中 Rha：Glu：Ara：Gal 为 0.40：1：1.42：4.53，PMD 中 Glu：



1-鼠李糖 2-木糖 3-葡萄糖 4-甘露糖 5-阿拉伯糠 6-半乳糖

1-Rha 2-Xyl 3-Glu 4-Man 5-Ara 6-Gal

图 1 单糖对照品混合液(A)、PMA (B)、PMB (C)、PMC (D)、PMD (E)、PPM (F)、PMA Ⅱ (G)和 PMC Ⅳ (H)的高效毛细管电泳图

Fig. 1 HPCE chromatograms of monosaccharide mixed reference substances (A), PMA (B), PMB (C), PMC (D), PMD (E), PPM (F), PMA Ⅱ (G), and PMC Ⅳ (H)

Ara：Gal 为 1：1.50：1.19，PPM 中 Rha：Glu：Ara：Gal 为 0.05：2.54：1：1.67，PMA Ⅱ 中 Glu：Gal 为 13.51：1，PMC Ⅳ 中 Glu：Ara：Gal 为 1：0.49：7.22。可见，玉米花粉多糖主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖组成，并含有微量的鼠李糖、木糖，但各组分之间又有明显的差异。

3 讨论

将这一结果与 Sevag 法去蛋白的玉米花粉多糖中的单糖成分[6]进行比较，发现不同的去蛋白方法对不同组分中的单糖组成有一定的影响，每种多糖中单糖都有一定的变化，但变化不大。如 PMA 用 Sevag 法去蛋白的多糖中单糖的峰面积比是 Glu：Ara：Gal 为 80.247：7.822：11.930；三氯醋酸法去蛋白的多糖中单糖的峰面积比是 Glu：Ara：Gal 为 67.346：10.330：22.324。

目前多糖中单糖组成的分析主要采用纸色谱、液相色谱、气相色谱，样品用量大，条件严格。本实验采用 HPCE 检测玉米花粉多糖中单糖组成，操作简单，精度高，可以成为一种测定多糖中单糖组成的一种方法。

References:

[1] Liu J X, Zhang Y L, Wang K F, *et al*. The activation effect of maize pollen polysaccharides on alveolar macrophages of rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1999, 15 (6): 509-511.

[2] Jin L Q, Liu J X, Wang K F, *et al*. The activation effect of maize pollen polysaccharides on human thoracic cavity macrophages [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2000, 16 (8): 726-729.

[3] Geng Y, Wang K F, Zhang Y L. Immunological effects of polysaccharides from bee pollen of maize [J]. *Acta Zoo Sin* (动物学报), 2001, 47: 250-254.

[4] Wang K F, Zou C Z, Lu M. Studies on the polysaccharides of maize pollen inhibiting effect to the proliferation of Sarcoma 180 cells [J]. *J Bee* (蜜蜂杂志), 2001 (2): 3-4.

[5] Geng Y, Wang N B, Li H Y, *et al*. Composition analysis of polysaccharides from pollen by capillary electrophoresis [J]. *Shandong Sci* (山东科学), 2001, 14 (4): 10-13.

[6] Wang J B, Lin L X, Geng Y, *et al*. Monosaccharides composition analysis of polysaccharides from maize pollen [J]. *J Shandong Normal Univ* (山东师范大学学报), 2004, 19 (3): 69-71.

HPLC 法测定返魂草及其注射剂中绿原酸

王继彦[1]，李丽静[1]，张莲珠[2]

(1. 长春中医学院药学院，吉林 长春 130117；2. 吉林天药科技股份有限公司，吉林 长春 130012)

返魂草注射剂是以返魂草 *Senecio cannabifolius* Less 为原料提取制成的单味中药冻干粉针制剂，具清热解毒、宣肺化痰等功效，本院内临床用于治疗肺热症(病毒和细菌性肺炎)和肺心症的治疗。笔者在新药开发研制过程中，从抗病毒活性较强的水溶性部分中分得已知活性成分绿原酸(chlorogenic acid)和咖啡酸(caffeic acid)。为了有效的控制原料及成品质量，本实验选定绿原酸为定量指标，建立了高效液相色谱测定方法。

1 仪器与材料

日本岛津 LC—10AT 高效液相色谱，SPD—10A UV-VIS 检测器，WDL—95 色谱工作站。甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯。绿原酸对照品购自中国药品生物制品检定所，批号 0753-9607。返魂草药材购自吉林省敦化县，由长春中医学院药学院张亚芝教授鉴定为菊科植物麻叶千里光(返魂草)*S. cannabifolius* Less. 的干燥地上部分。返魂草注射剂由长春中医学院附属医院新药研究中心提供。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件：色谱柱为 Shim-Pack CLC-ODS 分析柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇-0.05%三氟乙酸(26：74)；体积流量：1.0 mL/min；检测波长：327 nm；进样量：20 μL。

2.2 对照品溶液的制备：精密称取经减压干燥(50 ℃)至恒重的绿原酸对照品 10 mg，置 100 mL 量瓶中，加 50%甲醇稀释至刻度，摇匀，即得(临用现配，避光、低温)。

2.3 药材供试品溶液的制备：取返魂草药材粉末约 1 g，精密称定，置 50 mL 具塞锥形瓶中，加 50%甲醇 30 mL，于避光处放置 12 h，超声处理 30 min，滤

收稿日期：2004-11-26

基金项目：国家中医药管理局科研基金资助项目(97Z009)

作者简介：王继彦(1953—)，男，长春市人，博士，副研究员，主要从事天然药物化学和中药新药开发研究。

Tel：(0431) 6172211 E-mail：jiyanwang126@126.com