

## 丹皮多糖 2b 主要成分的相对分子质量的测定

刘长安, 赵帆平, 沈业寿\*, 戴玲

(安徽大学生命科学学院 糖复合物与糖工程实验室, 安徽 合肥 230039)

**摘要:**目的 测定丹皮多糖 2b (PSM<sub>2b</sub>) 主要成分的相对分子质量, 为建立对照品的标准提供依据。方法 PSM<sub>2b</sub> 经 Sepharose 4B 柱分离, 冷冻干燥后得到丹皮多糖的两个成分 PSM<sub>2b-A</sub> 和 PSM<sub>2b-B</sub>, 采用 HPLC 法检测均一性和相对分子质量; 并分别以 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液和超纯水作为流动相进行比较。结果 PSM<sub>2b-A</sub> 为均一性的糖蛋白, 是 PSM<sub>2b</sub> 的主要成分。流动相为 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液时, 其相对分子质量为  $3.5962 \times 10^5$ , 分散度指数 (*D*) 为 4.15。流动相为超纯水时, 其相对分子质量为  $4.7585 \times 10^5$ , 分散度指数为 1.03。结论 采用 HPLC 法测定丹皮多糖主要成分的相对分子质量时, 不同流动相测定的结果有差异, 流动相采用超纯水比 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液更为适合。

**关键词:** 丹皮多糖 2b; 高效液相色谱; 相对分子质量

**中图分类号:** R284.1; R286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2005)10-1477-03

### Determination of relative molecular weight in polysaccharide-2b of moutan (PSM<sub>2b</sub>)

LIU Chang-an, ZHAO Zhi-ping, SHEN Ye-shou, DAI Ling

(Laboratory of Glycoconjugates and Glycotechnology, School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the relative molecular weight ( $M_r$ ) of polysaccharide-2b of moutan (PSM<sub>2b</sub>) to establish the standard of reference substance. **Methods** PSM<sub>2b</sub> was separated by a Sepharose 4B column and then PSM<sub>2b-A</sub> and PSM<sub>2b-B</sub> were obtained after cryodesiccation. Then HPLC was used to determine their  $M_r$ . Ultrapure water was used as mobile phase to compare with 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. **Results** PSM<sub>2b-A</sub> was pure. The  $M_r$  and polydispersity (*D*) of PSM<sub>2b-A</sub> obtained by use of dextran as standard were  $3.5962 \times 10^5$  and 4.15 in 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution phase, respectively, and in ultrapure water phase the  $M_r$  and *D* were  $4.7585 \times 10^5$  and 1.03, respectively. **Conclusion** Different results are detected by different mobile phases in determination of  $M_r$  and *D* of PSM<sub>2b-A</sub> by HPLC. And the ultrapure water as mobile phase is more suitable than 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.

**Key words:** polysaccharide of moutan (PSM<sub>2b</sub>); HPLC; relative molecular weight ( $M_r$ )

丹皮为芍药科牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 具有清热凉血、活血祛瘀的功效, 常见于降糖复方中。以丹皮为原料制取的丹皮多糖 2b (polysaccharides-2b of moutan, PSM<sub>2b</sub>) 系降血糖活性有效部位, 具有明显降低葡萄糖和四氧嘧啶诱发的鼠高血糖, 降低糖化血红蛋白, 升高 SOD 和载脂蛋白 A<sub>1</sub> 水平, 改善氢化可的松琥珀酸钠诱导的胰岛素抵抗, 可降低 II 型糖尿病大鼠空腹血糖, 改善葡萄糖耐量异常及血脂异常, 提高肝细胞膜低亲和力, 胰岛素受体最大结合容量及胰岛素敏感性指数等作用<sup>[1,2]</sup>。本研究对 PSM<sub>2b</sub> 进一步的分离并测定其主要成分的相对分子质量  $M_r$  及其分布, 为开发降血糖药物, 建立其对照品标准提供依据。

### 1 仪器和试剂

Ultrospec3100 紫外-可见光扫描仪, 瑞典 Pharmacia Biotech; Alpha-2 冷冻干燥机, 德国 Christ; Waters 高效液相色谱系统: 515 HPLC Pump, 410 Refractive Index Detector, UltrahydroGel™ 500 柱 (300 mm × 7.85 mm), Millennium<sup>32</sup> software (版本 3.05.01); Milli-Q plus 超纯水仪, 美国 Millipore; 标准葡聚糖 Dextran T 系列为 Pharmacia 产品: T-500 ( $M_r$  450 000)、T-100 ( $M_r$  110 000)、T-70 ( $M_r$  68 000)、T-40 ( $M_r$  44 000)、T-10 ( $M_r$  11 000); Sepharose 4B, 瑞典 Pharmacia 产品; PSM<sub>2b</sub>, 安徽大学生命科学学院糖复合物与糖工程实验室提供; 其他试剂均为国产分

收稿日期: 2004-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30240066); 安徽省“十五”重大科技专项基金资助项目 (01803011); 安徽省自然科学基金资助项目 (03043301)

作者简介: 刘长安 (1980—), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 主要从事多糖类的生物化学、分子生物学研究及天然药物开发。

E-mail: liuca\_8009@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 沈业寿 Tel: (0551) 5107574 E-mail: shysh@ahu.edu.cn

析纯。

2 方法和结果

2.1 PSM<sub>2b</sub>的分离纯化及其主要成分的制备:将 PSM<sub>2b</sub>用蒸馏水配制成 20 mg/mL 溶液。取 1 mL 上 Sepharose 4B 柱(96 cm×2 cm),水洗脱,体积流量为 12 mL/h。苯酚-硫酸显色,在 490 nm 波长下比色检测洗脱液。合并各洗脱峰液,冷冻干燥得两种成分,分别命名为 PSM<sub>2b-A</sub>和 PSM<sub>2b-B</sub>。洗脱曲线见图 1。可见,PSM<sub>2b</sub>经 Sepharose 4B 柱分离后有两个洗脱峰,分别冷冻干燥后其平均得率:PSM<sub>2b-A</sub>为 29.13%,PSM<sub>2b-B</sub>为 13.78%。

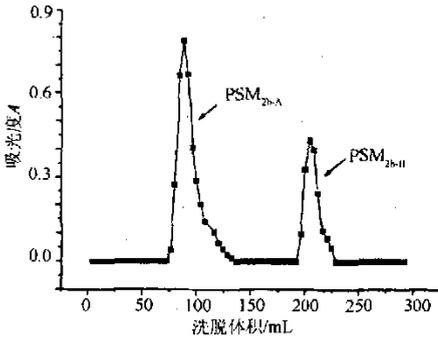


图 1 PSM<sub>2b</sub>经过 Sepharose 4B 柱分离的洗脱曲线  
Fig. 1 Elution curve of PSM<sub>2b</sub> separated by Sepharose 4B column

2.2 色谱条件及相对分子质量标准曲线的制作:采用 HPLC 法,先用标准葡聚糖 Dextran T 系列标准品制作相对分子质量标准曲线,然后根据样品在相同色谱条件下的保留时间(*t<sub>R</sub>*),从标准曲线上求出样品的相对分子质量。

色谱条件:流动相分别为 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液<sup>[3]</sup>和超纯水。以 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液为流动相时体积流量为 1.0 mL/min,以超纯水为流动相时体积流量为 0.6 mL/min。柱温为(30±0.1) °C,进样量为 10 μL。示差折光检测。

将 5 个标准葡聚糖用流动相溶解配成 5 mg/mL 溶液并用 0.22 μm 滤膜滤过。分别取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图和保留时间 *t<sub>R</sub>*。以 *t<sub>R</sub>* 为横坐标,lg *M<sub>r</sub>* 为纵坐标作图,得到相对分子质量标准曲线图和回归方程。各标准葡聚糖在两种流动相中的保留时间(*t<sub>R</sub>*)见表 1。以 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液为流动相得回归方程为 lg *M<sub>r</sub>* = 10.123 5 - 0.698 5 *t<sub>R</sub>*, *r* = 0.998 9;以超纯水为流动相得回归方程 lg *M<sub>r</sub>* = 7.600 7 - 0.225 8 *t<sub>R</sub>*, *r* = 0.996 5。表明在本实验的两种流动相条件下,标准葡聚糖相对分子质量在 1×10<sup>4</sup>~5×10<sup>5</sup> 时,其保留时间与其相对分子质量对数

均呈良好线性关系。

表 1 各标准葡聚糖的 HPLC 保留时间

Table 1 HPLC retention time of standard dextran

标准品	<i>t<sub>R</sub></i> /min	
	0.7% 硫酸钠	水
T500	6.433	10.098
T100	7.233	12.325
T70	7.533	21.724
T40	7.883	13.742
T10	8.717	15.510

2.3 PSM<sub>2b-A</sub>和 PSM<sub>2b-B</sub>的均一性及相对分子质量测定:称取 6 个批号的 PSM<sub>2b-A</sub>和 PSM<sub>2b-B</sub>适量,分别用两种流动相溶解,配成 1 mg/mL 的溶液。取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图和保留时间。重均分子量(*M<sub>w</sub>*)和数均分子量(*M<sub>n</sub>*),分散度指数(*D*)由 GPC 软件按下式计算:

$$M_w = \frac{\sum (RI_i \times M_i)}{\sum RI_i}$$

$$M_n = \frac{\sum RI_i}{\sum (RI_i / M_i)}$$

$$D = M_w / M_n$$

式中 RI 为保留时间 *i* 的峰高;*M<sub>i</sub>* 为保留时间 *i* 的相对分子质量,可由标准曲线查得。

PSM<sub>2b-A</sub>和 PSM<sub>2b-B</sub>在两种流动相中的 HPLC 分析结果见图 2 和图 3。PSM<sub>2b-A</sub>6 次上样的平均保留时间在水作流动相为 7.229 min,在 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作流动相为 8.604 min。PSM<sub>2b-B</sub>6 次上样的平均保留时间在水作流动相为 9.403 min,在 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作流动相为 16.391 min。测得的 *M<sub>r</sub>*、*M<sub>n</sub>*、*M<sub>peak</sub>*(峰尖相对分子质量)及 *D* 值见表 2。

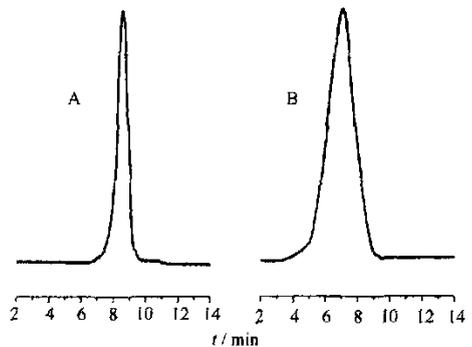


图 2 超纯水(A)和 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(B)为流动相的 PSM<sub>2b-A</sub>的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of PSM<sub>2b-A</sub> eluted by ultrapure water (A) and 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B)

3 讨论

PSM<sub>2b-A</sub>经两种不同流动相洗脱,都呈单一对称峰型。可认为其为均一性成分。PSM<sub>2b-B</sub>以 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液作流动相时,呈一峰型,而以超纯水作

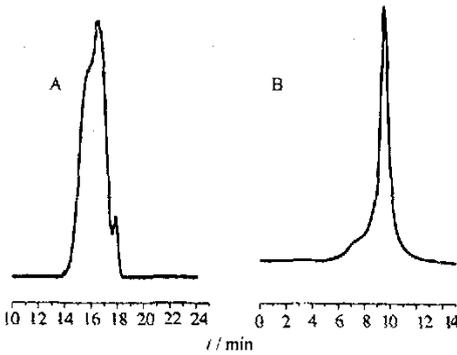


图 3 超纯水(A)和 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(B)为流动相的 PSM<sub>2b-B</sub> 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of PSM<sub>2b-B</sub> eluted by ultrapure water (A) and 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(B)

表 2 PSM<sub>2b-A</sub> 和 PSM<sub>2b-B</sub> 的相对分子质量、数均分子质量、峰尖相对分子质量及分散度指数

Table 2  $M_r$ ,  $M_n$ ,  $M_{peak}$ , and  $D$  of PSM<sub>2b-A</sub> and PSM<sub>2b-B</sub>

流动相	PSM <sub>2b-A</sub>				PSM <sub>2b-B</sub>			
	$M_r$ ( $\times 10^3$ )	$M_n$ ( $\times 10^3$ )	$M_{peak}$ ( $\times 10^3$ )	$D$	$M_r$ ( $\times 10^3$ )	$M_n$ ( $\times 10^3$ )	$M_{peak}$ ( $\times 10^3$ )	$D$
超纯水	475.85	461.82	463.01	1.03	9.56	8.12	7.97	1.18
0.7% Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	359.62	86.57	150.70	4.15	5.00	1.47	3.61	3.40

流动相时,并不是单一峰型,故 PSM<sub>2b-B</sub> 的均一性尚不能确定。从分离纯化的得率看,PSM<sub>2b-A</sub> 约为 PSM<sub>2b-B</sub> 的 2.1 倍,故将 PSM<sub>2b-A</sub> 看作是 PSM<sub>2b</sub> 的主要成分。

HPLC 法测定 PSM<sub>2b-A</sub> 的相对分子质量时,在不同流动相中的色谱图有所差别。PSM<sub>2b-A</sub> 在水相中的峰型对称且峰型较窄,分散度指数接近 1。但以 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液作流动相时,峰型虽较对称,但谱峰较宽,分散度指数较大。同时,在测定 PSM<sub>2b-B</sub> 时,在超纯水作流动相时,能分出杂质峰,而以 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液作为流动相时不能分离出杂质峰。从实验结果来看,采用超纯水作为流动相比用稀盐溶液更适合。

PSM<sub>2b-A</sub> 为含蛋白质的酸性多糖<sup>[5]</sup>。有报道认为,酸性多糖在稀浓度的盐溶液中其构象相对紧密,在水溶液中相对舒展<sup>[6]</sup>,故通常采用稀盐溶液作流动相来测定其相对分子质量。同时国家药典<sup>[3]</sup>中测

定右旋糖酐时采用 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液作为流动相。但是本实验发现与此不同。推测 PSM<sub>2b-A</sub> 在水溶液中可能呈现一种有规则的空间结构,而在稀盐溶液中,由于离子的作用,干扰了次级键的形成,使其构象相对舒展,分散度增加。此外,我们还用相同离子强度的 PBS、NaCl、PBS+NaCl 溶液作为流动相进行了测定,结果和以 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液作流动相时相近。由于多糖的结构和构象的差异,采用 HPLC 测定其均一性和相对分子质量时,流动相的选择应有不同。

PSM<sub>2b-A</sub> 的相对分子质量测定时,以超纯水作为流动相比用 0.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液作流动相测得的  $M_r$ 、 $M_n$  及  $M_{peak}$  要大。可能是由于所采用的标准品是中性多糖的原因。有研究表明,以中性多糖(如 dextran)和酸性多糖(如肝素)分别作为标准品测得同一酸性多糖相对分子质量,前者比后者大得多<sup>[7]</sup>。

有关选用不同对照品测定丹皮多糖 2b 主要成分 PSM<sub>2b-A</sub> 相对分子质量及其降血糖生理活性等研究工作正在进行中。

References:

- [1] Wang Q M, Zhao Z P, Shen Y S, et al. Effect of polysaccharides-2b from Mudan cortex on type 2 diabetes mellitus rats and its mechanism [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2002, 18 (4): 456-459.
- [2] Hong H, Wang Q M, Zhao Z P, et al. Studies on antidiabetic effects of Moutan polysaccharide-2b in type 2 diabetes rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38 (4): 255.
- [3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [4] Zhao Z P, Shen Y S, Ge S F, et al. Study on isolation and hypoglycemic activity of polysaccharide of Mudan cortex (PSM) of *Paeonia suffruticosa* Andr [J]. *J Anhui Univ: Nat Sci* (安徽大学学报:自然科学版), 1999, 23 (2): 90-93.
- [5] Gan C J, Lin Q. High performance gel chromatographic behaviour of sodium alginate and determination of its molecular weight parameters [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1997, 15 (2): 147-149.
- [6] Chen Y, Shen Y S, Zhao Z P, et al. Purification and physicochemical properties of polysaccharides PSM<sub>2b</sub> from Moutan cortex of *Paeonia suffruticosa* Andr [J]. *Acta Laser Bio Sin* (激光生物学报), 2004, 13 (3): 237-241.
- [7] Lü Z H, Yu G L, Zhao X, et al. The influence of standards on HPGPC determining the molecular weight of a polysaccharide [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2002, 11 (3): 220-221.