

高效凝胶渗透色谱法测定枸杞多糖的相对分子质量

易剑平¹, 叶 晓^{1,2}, 钟儒刚¹

(1. 北京工业大学, 北京 100022; 2. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100000)

近年来, 多糖由于其具有免疫、抗肿瘤、抗病毒等多方面的生物活性与功能, 已越来越受到广大的科研工作者的重视。由于多糖的药效是与其结构、纯度和相对分子质量密切相关的^[1], 故准确而快速地测定多糖相对分子质量及其分布是一项重要工作。高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 由于其迅速、正确和重现性好等优点, 被越来越广泛地应用于测定大分子的相对分子质量及其分布。

1 材料

美国 Waters 2696 型凝胶渗透色谱仪; 2414 型示差检测器; Waters 柱恒温箱; Ultrahydrogel 100 (300 mm × 7.8 mm)、Ultrahydrogel 250 (300 mm × 7.8 mm)、Ultrahydrogel 1000 (300 mm × 7.8 mm) 三柱串联加保护柱; Empower 色谱工作站; Millipore 超纯水离子交换器制备高纯水 (0.45 μm 醋酸纤维素膜滤过)。

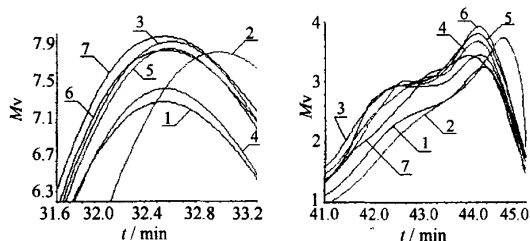
枸杞多糖 (LBP) 为购自广西桂林实力天然食品有限公司的枸杞粗多糖, 经氯仿-正丁醇 (4:1) 去除游离蛋白, 离心去除不溶物, 以 4 倍体积的无水乙醇沉淀、干燥后的产物; Pullulan 标样采用 Pharmacia 公司产品; 其他实验试剂均为 AR 级。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相的选择^[5,6]: 由于 LBP 属于水溶性物质, 在 HP GPC 分析中存在着非体积排除效应, 且测定水溶性高分子化合物相对分子质量时常发生吸附。可以添加少量低分子电解质抑制聚电解质的电离, 使流动相离子强度达到一定浓度, 以使保留体积趋于恒定; 而且当离子浓度低时, 溶质分子之间的电荷排斥力使分子发生膨胀, 从而使溶质较早地从凝胶中洗出。提高离子强度, 不仅抑制分子膨胀, 而且减少样品在柱上的吸附。为此本实验选择了水、0.1 mol/L Na₂SO₄、0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2 mol/L NaNO₃ 作为流动相淋洗标样 Dextran-T70 和 LBP, 见图 1。Dextran-T70 在以上流动相中的色谱峰形状相似, 在不同浓度的 NaNO₃ 和水淋洗下的

出峰时间及保留时间是基本一致的。在 0.1 mol/L Na₂SO₄ 中, Dextran-T70 的出峰时间往后推移约 0.5 min。枸杞多糖在以上流动相中的趋势与 Dextran-T70 类似。可以认为, 改变流动相离子强度, 不会明显影响 Dextran-T70 和 LBP 的色谱行为。为延长色谱柱的使用寿命, 在基本不影响测定效果的情况下, 本实验采用水为流动相。



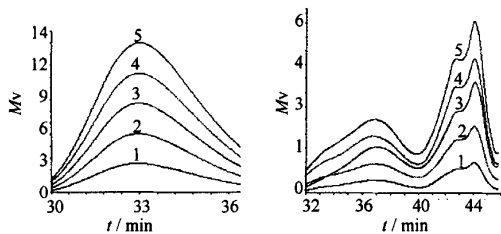
1-H₂O 2-0.1 mol/L Na₂SO₄ 3-0.012 5 mol/L NaNO₃
4-0.025 mol/L NaNO₃ 5-0.05 mol/L NaNO₃
6-0.1 mol/L NaNO₃ 7-0.2 mol/L NaNO₃

图 1 流动相对高效凝胶色谱图的影响

Fig. 1 Influence of eluent on HPGPC

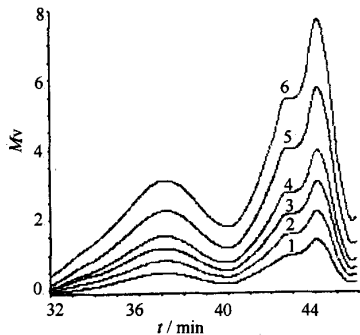
2.1.2 样品质量浓度和进样体积的选择: 一般认为, 高效凝胶色谱柱的内径较细, 流动相体积流量较高, 如果注入过量的样品, 则可能发生“过载”现象。一旦“过载”, 将导致色谱峰加宽, 分离能力显著降低, 保留体积后移。图 2 为在相同进样体积 50 μL, 流动相为水时, Dextran-T70 和 LBP 不同进样质量浓度时的高效凝胶色谱图。其中 0.50% LBP 溶液为 1.250 g LBP 于 250 mL 量瓶中定容配制而成, 并以此溶液依次配制其他质量浓度的溶液。可见, Dextran-T70 和 LBP 溶液随着进样质量浓度的增加, 出峰时间基本保持不变, 但峰顶位置略往后移。

Dextran-T70 和 LBP 的进样体积与进样质量浓度的高效凝胶色谱图的趋势大致相似, 图 3 为 0.30% LBP 溶液, 流动相为水时, 进样体积分别为 20、30、40、50、70、90 μL 下的色谱图。由于高效凝胶色谱柱的负载量较低, 因此, 为了保证较好地分离样品, 本实验采用 0.30% 的样品质量浓度和 50 μL 的进样体积进行样品的测定。



1-0.10% 2-0.20% 3-0.30% 4-0.40% 5-0.50%

图 2 样品质量浓度对高效凝胶色谱图的影响
Fig. 2 Influence of concentration on HPGPC



1-20 μ L 2-30 μ L 3-40 μ L 4-50 μ L 5-70 Ml 6-90 μ L

图 3 进样体积对高效凝胶色谱图的影响
Fig. 3 Influence of volume on HPGPC

2.2 标准曲线的绘制:取相对分子质量1 000、5 900、11 800、22 800、47 300、112 000、212 000、404 000的 Pullulan 标样,加流动相水配成1 mg/mL的溶液作为标准溶液。分别取50 μ L进样,采用Empower 软件绘制标准曲线,得其回归方程: $\lg M=25.0-1.38 t_R+0.033 t_R^2-0.000 296 t_R^3$ (t_R 为保留时间), $r=0.999 8$ 。

2.3 LBP 相对分子质量的测定:根据 HPGPC 校正曲线及枸杞多糖凝胶色谱图计算 LBP 各组分的平均相对分子质量。由于无 LBP 标样,故从标样与待测样结构相似原则出发,选择了 Pullulan 标样。表 1 为同 1 批样品的测定结果,表 2 为同一 LBP 样品在不同时间测定的数据。结果表明,本实验所用 HPGPC 系统具有较好的重现性。

3 讨论

本实验研究了流动相、进样质量浓度、进样体积和重现性等因素对高效凝胶渗透色谱测定结果的影响,比较了流动相、进样质量浓度和进样体积对标样 Dextran-T70和LBP影响的差异,并考虑流动相对

表 1 LBP 的相对分子质量

Table 1 Relative molecular weight of LBP			
No.	Mn	Mw	Mw/Mn
1	3 666	23 802	6.492
2	3 572	25 995	7.277
3	3 438	24 185	7.035
4	3 496	23 846	6.821
5	3 548	24.832	6.999
$\bar{x}$	3 544	24 532	6.925
RSD	2.41	3.73	4.21%

表 2 LBP 相对分子质量的重现性

Table 2 Repetition of relative molecular weight of LBP			
No.	Mn	Mw	Mw/Mn
1	3 423	24 002	7.001
2	3 572	25 995	7.277
3	3 583	26 224	7.319
4	3 427	24.087	7.029
5	3 430	24 184	7.050
6	3 613	25 790	7.138
$\bar{x}$	3 508	25 047	7.137
RSD	2.57%	4.22%	1.86%

色谱柱使用寿命的影响,确定了 LBP 相对分子质量 HPGPC 较适宜的测定条件。在以水为流动相,体积流量 0.6 mL/min,0.30%进样质量浓度下进样体积为 50 μ L 时能简便、快速地测定 LBP 相对分子质量,且重现性较好,测得其相对分子质量为 24 532。国内也有文献报道用 LC-MS 法测得 LBP 的相对分子质量为 22 700 左右,这与本实验的结果相近。

References:

[1] Wang C Y, Guan H S. Advances of researches on antiviral activities of polysaccharides (I) [J]. *Chin J Biotech Adv* (生物工程进展), 2000, 20 (1): 17-20.
[2] Qi C H, Zhang Y X, Zhao X N, et al. Immunoactivity of the crude polysaccharides from the fruit of *Lycium barbarum* L. [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15 (3): 180-184.
[3] Hu Q H, Zhao C, Wang X Q, et al. Radioprotection of *Lycium barbarum* polysaccharide on irradiated chmice [J]. *Chin J Radiolog Med Protection* (中华放射医学与防护杂志), 1993, 13 (5): 314-317.
[4] Zhang X, Xie X C. The experiment research of the anti-oxidation on *Lycium barbarum* polysaccharide [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18 (2): 110-112.
[5] Li J, Zuo X J. Determination of molecular weight and relative content of the components of polysaccharide krestin with aqueous gel permeation chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1999, 8: 942-944.
[6] 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.