

柱前衍生化-HPLC 法分析麻黄多糖 ESP-B1 的单糖组成

梁 军, 夏永刚, 杨炳友, 王秋红, 匡海学*

黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 建立了柱前 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (PMP) 衍生 HPLC 法分离检测 6 种中性糖、2 种糖醛酸的方法, 对麻黄纯多糖 ESP-B1 的单糖组成进行分析。方法 麻黄热提总多糖经各种离子交换和凝胶柱色谱分离得到 1 个麻黄纯多糖 ESP-B1, 经 H₂SO₄ 水解后, 用 PMP 柱前衍生, KH₂PO₄-NaOH 缓冲液 (pH 6.8) -乙腈 (84:16) 等度洗脱, 高效液相 250 nm 紫外检测。结果 麻黄纯多糖 ESP-B1 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 4 种单糖组成, 其物质的量比为 3.5:2.2:1.0:93.3。结论 该衍生化方法以及优化的高效液相色谱法具有简单、快速、重现性好等特点, 可用于麻黄多糖中单糖组成的测定。

关键词: 麻黄; 麻黄多糖; 衍生化; 单糖; HPLC

中图分类号: R286.02; R284.1 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)10-1985-04

Analysis of monosaccharide compositions of ESP-B1 from *Ephedrae Herba* by HPLC pre-column derivatization

LIANG Jun, XIA Yong-gang, YANG Bing-you, WANG Qiu-hong, KUANG Hai-xue

Heilongjiang Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Bases, Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Key words: *Ephedrae Herba*; ephedra polysaccharide; derivatization; monosaccharide; HPLC

麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *E. intermedia* Schrenk et C. A. Mey. 或木贼麻黄 *E. equisetina* Bunge 的干燥草质茎, 为《中国药典》2010 年版一部收载品种, 具发汗解表、宣肺平喘和利尿消肿等功效。麻黄中含有生物碱、黄酮、挥发油、有机酸和多糖等多种成分^[1-2]。本课题组通过小鼠碳廓清、迟发型超敏反应、小鼠溶血素和小鼠脾细胞增殖等体内药理学实验, 证实麻黄多糖具有明显的免疫抑制作用^[3], 为麻黄多糖的进一步研究奠定了基础。

在多糖的研究中, 单糖组成的分析是其性质、结构及构效关系研究的一项基本且重要的内容^[3-11]。GC 法分离单糖易出现异构化色谱峰; 高效毛细管电泳法, 仪器价格昂贵, 一般实验室不具备条件。故本实验采用柱前 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮

(PMP) 衍生-HPLC 法对麻黄纯多糖 ESP-B1 的单糖成分进行分析, 这种方法具有分离效率高、分析时间短、产物无立体异构、分析成本低等特点, 对深层次开发麻黄多糖具有重要意义。

1 仪器与材料

Shimadzu HPLC—2010 高效液相色谱仪 (岛津公司, 日本); 数据采集和谱图处理采用 CLACC-VP 工作站 (岛津公司)。

实验原料购于山西大同药材公司, 经黑龙江中医药大学中药资源学教研室王振月教授鉴定为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎, 符合《中国药典》2010 年版一部相关质量标准, 样品标本保存于黑龙江中医药大学药学院 (标本号 20061210); 弱阴、阳性阴离子交换树脂 FPA90CI、IRC-84 (Amberlite Co.); 离子交换纤维素 DEAE

收稿日期: 2011-01-22

基金项目: “十二五” 国家科技部重大专项课题“重大新药创制”专项课题 (2011ZX09102-006-01); 国家自然科学基金面上项目 (30973870); 国家博士后科学基金 (20110490111); 黑龙江省博士后基金 (LBH-Z10019); 黑龙江中医药大学博士创新基金 (B201002)

作者简介: 梁 军 (1984—), 女, 黑龙江绥芬河人, 研究实习员, 硕士, 主要从事中药质量控制方法研究。

Tel: (0451)82195301 E-mail: lliangjunn@163.com

*通讯作者 匡海学 Tel: (0451)82193001 E-mail: hxkuang@hotmail.com

Cellulose DE-52 (Whatman International Ltd.); 丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-100 (Pharmacia Co.); 衍生化试剂 PMP (北京化学试剂公司), 用甲醇重结晶两次; 单糖对照品: 阿拉伯糖 (Ara)、葡萄糖 (Glc)、甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal)、鼠李糖 (Rha)、木糖 (Xyl)、葡萄糖醛酸 (GlcUA)、半乳糖醛酸 (GalUA) 均为美国 Sigma 公司产品, 质量分数均大于 99%; 水为 Milli-Q 超纯水 (Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 麻黄纯多糖 ESP-B1 的分离

麻黄干燥草质茎粗粉 1.0 kg, 首先采用 95% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 3 h, 进行脱脂处理, 药渣自然干燥, 然后对药渣进行冷水和热水分级提取。冷水提取后的药渣用蒸馏水煎煮 3 次, 每次 3 h, 冷却后滤过、合并水煎液, 减压回收, 冷冻干燥得麻黄热提总多糖 (crude polysaccharide B, PB)。

将 PB 首先经过 Amberlite FPA90-Cl⁻ (50 cm × 5 cm) + Amberlite IRC-84 (50 cm × 5 cm) 阴阳离子串联树脂柱脱色脱蛋白并且进行粗分, 然后经过 DEAE Cellulose DE-52 (75 cm × 5 cm) 离子交换柱色谱, 而后经过 Sephacryl S-100 (75 cm × 1.6 cm) 凝胶色谱柱进一步分离纯化, 以蒸馏水为洗脱液, 体积流量 0.5 mL/min, 流出液 5 mL/管, 苯酚-硫酸法检测, 以洗脱管数-吸光度值绘制洗脱曲线 (图 1), 合并相同峰位的流份, 冷冻干燥, 得到的组分称为麻黄纯多糖 B1 (*E. sinica* polysaccharide B1, ESP-B1), 相对分子质量为 6.15×10^3 。经高效凝胶色谱法检查质量分数, 其为化学均一性多糖。

2.2 对照品溶液的制备

取各种单糖 (Ara、Glc、Man、Gal、Rha、Xyl、GlcUA、GalUA) 对照品用双蒸水配成 2 mmol/L 的

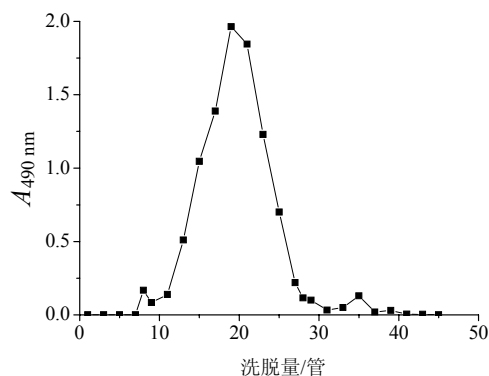


图 1 ESP-B1 经 Sephacryl S-100 凝胶柱洗脱曲线
Fig. 1 Elution profile of ESP-B1 by Sephacryl S-100 gel column

水溶液, 制成混合单糖对照品溶液。同时将每一种单糖配制成 2 mmol/L 单糖对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

按文献方法^[3-4], 称取 20 mg 麻黄多糖 ESP-B1 置于具塞试管中, 加入 2 mol/L 硫酸溶液 2.0 mL, 封管后于 110 °C 水解 6 h, 得水解样品溶液。用 4 mol/L 氢氧化钠水溶液中和至 pH 值为 7.0, 并以纯化水稀释到 5.0 mL, 离心, 取上清液待衍生化。

衍生化步骤^[5]: 将单糖对照品、混合单糖对照品溶液及麻黄多糖 ESP-B1 水解样品液各取 200 μL 分别置于 1.5 mL 离心管中, 然后向离心管中依次加入 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 100 μL 和 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 100 μL, 混匀后置于 70 °C 水浴中加热反应 30 min, 取出室温放置 10 min; 再加入 0.3 mol/L 盐酸溶液 100 μL 中和, 混匀后用等体积乙酸异戊酯萃取, 振摇, 离心 10 min, 小心弃去有机层, 再用乙酸异戊酯萃取 1 次, 再加等体积的氯仿, 振摇, 离心 10 min, 弃去氯仿相得到上层。将水相定容至 1.0 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜后供 HPLC 进样分析。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Capcell pak C₁₈ UG 120 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐 (KH₂PO₄-NaOH, pH 6.8) 缓冲液-乙腈 (84 : 16), 柱温 30 °C, 检测波长 250 nm, 体积流量 0.8 mL/min, 进样体积 10 μL。

2.5 多糖样品中的单糖组成分析和计算方法

计算方法: 按式 (1)、(2) 计算其中两种单糖间的校正因子 $f_{1/2}$ 和样品中这两种单糖的比例 $R_{1/2}$ 。

$$f_{1/2} = (A_2/m_2)/(A_1/m_1) \quad (1)$$

A_1 、 A_2 分别为混合对照品溶液中单糖 1、2 的峰面积, m_1 、 m_2 分别为混合对照品溶液中单糖 1、2 的量

$$R_{1/2} = f_{1/2} \times (A'_1/A'_2) \quad (2)$$

A'_1 、 A'_2 分别为样品中单糖 1、2 的峰面积

在单糖组成分析中, 由于只需求得单糖间的物质的量比, 并不需要确定各单糖的具体质量。所以, 本实验采用上述的数据处理方法, 而不是先求出样品中各单糖的具体质量, 再求出各单糖的物质的量比值^[6]。由于衍生化操作中包含 3 次萃取步骤, 需要用内标法来消除误差。然而, 自然界中的大多数多糖都同时含有常见的 8 种单糖, 为了使建立的方法具有广泛的应用价值, 在样品分析中, 没有利用内标, 在求 f 和 R 值时, 可以认为分子和分母同时除以内标峰面积, 这种方法同样起到了消除误差的

作用。建立的标准曲线提供的是线性范围。

2.6 标准曲线的制备及检测限的测定

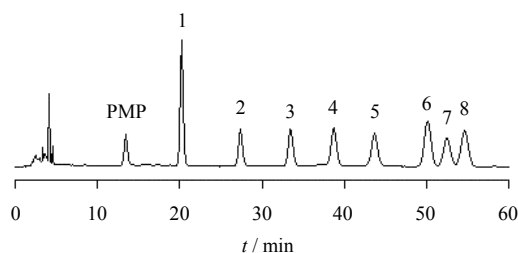
将 PMP 衍生的单糖不断稀释，由高浓度到低浓度依次进样分析，直到检测不到信号为止，依据峰面积对单糖浓度的变化进行线性回归，线性范围

为 6.25~400 μmol/L，分别以信噪比 S/N 10:1 和 3:1 作为标准，测得各单糖的最低定量限 (LOQ) 及最低检测限 (LOD)。线性回归方程、相关系数 (r)、LOQ 及 LOD 考察结果见表 1，标准单糖衍生化色谱图见图 2。

表 1 单糖的线性方程、相关系数、LOQ、LOD 的考察

Table 1 Linear regression equation, r , LOQ, and LOD in different monosaccharides

单糖	保留时间/min	线性回归方程	r^2	LOQ/(μmol·L ⁻¹)	LOD/(μmol·L ⁻¹)
Man	20.03	$Y=9\ 782.2 X-4\ 557.9$	0.999 2	4.48	1.28
Rha	27.45	$Y=6\ 383.1 X-18\ 595$	0.999 7	5.32	1.52
GlcUA	33.56	$Y=9\ 630.0 X-159\ 332$	0.999 1	3.40	0.97
GalUA	38.87	$Y=11\ 364.0 X-267\ 755$	0.998 2	4.45	1.27
Glc	43.85	$Y=4\ 851.9 X-165\ 648$	0.999 0	5.71	1.63
Xyl	50.04	$Y=10\ 749.0 X-224\ 980$	0.999 5	6.13	1.75
Gal	52.62	$Y=11\ 453.0 X-70\ 488$	0.998 3	5.08	1.45
Ara	54.86	$Y=13\ 194.0 X-337\ 285$	0.998 7	6.06	1.73



1-Man 2-Rha 3-GlcUA 4-GalUA 5-Glc 6-Xyl 7-Gal 8-Ara

图 2 8 种单糖对照品的 PMP 衍生化 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of PMP derivatization of eight monosaccharides reference substances

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 精密吸取混合单糖衍生样品溶液，日内重复进样 5 次，测得日内 8 种单糖保留时间和峰面积的 RSD，作为日内精密度。连续 3 d 重复进样 3 次，测得日间 8 种单糖保留时间和峰面积的 RSD，作为日间精密度。结果见表 2，表明仪器精密度较好。

2.7.2 重现性试验 分别精密量取麻黄多糖水解液样品 ESP-B1 6 份，分别经衍生后按照色谱条件进样分析，测得麻黄多糖样品 ESP-B1 中所含单糖保留时间的 RSD 值均小于 1.36%；峰面积的 RSD 值均小于 3.92%。说明该方法重现性良好。

2.7.3 稳定性试验 取麻黄多糖样品 ESP-B1 衍生化后样品溶液，在 0、2、4、8、16、24 h 分别按上述条件测定，结果其所含单糖保留时间的 RSD 值均

表 2 保留时间和峰面积的精密度

Table 2 Precision of retention time and peak area

单糖	日内 RSD/% ($n=5$)		日间 RSD/% ($n=3$)	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
Man	0.8	1.4	2.3	1.3
Rha	0.6	0.9	2.9	1.6
GlcUA	1.0	1.6	1.7	2.5
GalUA	0.6	2.9	2.2	3.4
Glc	1.0	1.3	3.6	3.5
Xyl	0.5	3.7	3.2	2.2
Gal	1.1	2.3	2.4	4.4
Ara	0.8	1.8	1.5	3.3

小于 1.20%，峰面积的 RSD 均小于 3.83%。可见衍生化样品溶液在 24 h 内是稳定的。

2.8 衍生化多糖样品的分析

对麻黄多糖 ESP-B1 样品进行分离分析(图 3)，通过谱图分析和标准曲线计算其所含单糖的物质的量比为 Man-Glc-Gal-Ara 3.5:2.2:1.0:93.3，此结果与毛细管电泳色谱方法测定的结果基本一致^[3]。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

分别试用 Capcell pak C₁₈ UG 120(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，Capcell pak C₁₈ MG II (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，Waters symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，Hypersil ODS2 (200 mm×4.6 mm, 5 μm)

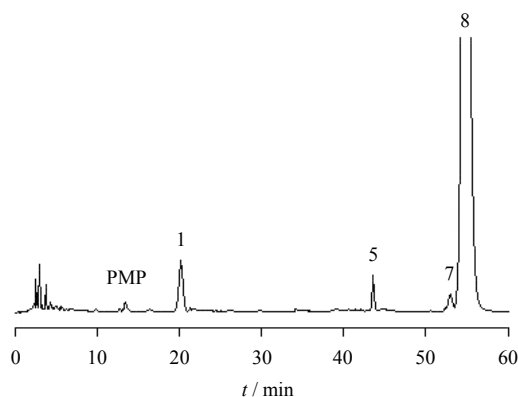


图3 麻黄多糖 ESP-B1 的衍生化色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of PMP derivatization for ESP-B1

和 Diamonsil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm) 5 种不同反相柱, 按照上述色谱条件进行分离, 结果表明 Capcell pak C₁₈ UG 120 色谱柱分离效果较好。

3.2 缓冲液及其浓度的选择

分别考察了不同的缓冲液, 结果表明: 在乙酸铵缓冲液作流动相时, 甘露糖和 PMP 不能达到基线分离; 在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液作流动相时, 半乳糖、木糖和阿拉伯糖不能达到基线分离, 经过梯度优化后, 无明显改善; 在 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液作流动相时, 各单糖组份得到较好的分离, 且各种单糖峰型均较对称。

3.3 色谱模式的选择

在 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液作流动相时, 梯度模式下, 半乳糖、木糖和阿拉伯糖分离效果不好; 在等度的条件下可使各单糖组份得到较好的分离, 且各种单糖峰型均较对称。结果表明在本单糖体系中, 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液等度模式优于梯度模式。

3.4 单糖分析方法的选择

多糖中单糖组成分析的方法包括气相色谱法、高效毛细管电泳色谱法和液相色谱法, 气相色谱法分离单糖繁琐费时, 易出现色谱峰异构化裂分; 高效毛细管电泳色谱法, 仪器价格昂贵, 分析成本高; 本实验室采用价格较低的 C₁₈ 色谱柱, 紫外检测器, 通过对色谱条件的优化, 可同时分离测定 6 种中性单糖, 2 种酸性单糖。本方法不仅可提供麻黄纯多

糖 ESP-B1 的单糖组成的基本信息, 且可推广应用到其他多糖组成的分析。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [3] Kuang H X, Xia Y G, Yang B Y, *et al.* Screening and comparison of the immunosuppressive activities of polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 83(2): 787-795.
- [4] Andersen K E, Bjerregaard C, Møller P, *et al.* High performance capillary electrophoresis with indirect UV detection for determination of α -galactosides in leguminosae and brassicaceae [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(22): 6391-6397.
- [5] 刘娟, 屈效源. 块菌多糖的相对分子质量测定和单糖组成分析 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1380-1384.
- [6] Xia Y G, Wang Q H, Liang J, *et al.* Development and application of a rapid and efficient CZE method coupled with correction factors for determination of monosaccharide composition of acidic hetero-polysaccharides from *Ephedra sinica* [J]. *Phytochem Anal*, 2011, 22(2): 103-111.
- [7] 马定远, 陈君, 李萍, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成 [J]. 分析化学, 2002, 30(6): 702-705.
- [8] Xu D J, Xia Q, Wang J J, *et al.* Molecular weight and monosaccharide composition of *Astragalus* polysaccharides [J]. *Molecules*, 2008, 13(10): 2408-2415.
- [9] 徐继华, 刘文英, 屠旦来. 吴茱萸多糖的分离和组成研究 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 573-576.
- [10] Fan Y J, He X J, Zhou S D, *et al.* Composition analysis and antioxidant activity of polysaccharide from *Dendrobium denneanum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45(2): 169-173.
- [11] Yang Y F, Feng J Q, Xu H Y, *et al.* Influence of different extraction and purification methods on astragalus polysaccharides and pharmacological evaluation [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 54-61.