

5种植物多糖的部分酸水解特征

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 对5种植物多糖的部分酸水解特征及其水解产物的组成进行研究。方法 分别采用0.05、0.2和0.5 mol/L三氟乙酸(TFA)对5种植物多糖进行部分酸水解, 并研究其水解特征; 结合超高效液相色谱及多元统计的方法对其水解产物的组成进行分析。结果 0.05 mol/L TFA水解后截留液中葡萄糖醛酸(X1GlcUA)量、0.05 mol/L TFA水解后透过液中阿拉伯糖(X2Ara)量、0.2 mol/L和0.5 mol/L TFA水解后截留液中阿拉伯糖(Y1Ara、Z1Ara)量、0.2 mol/L TFA水解后透过液中半乳糖醛酸(Y2GalUA)量为麻黄多糖区别于其他植物多糖的特征水解片段。结论 部分酸水解反应结合色谱分析, 超高效液相色谱联合多元统计的方法, 分析单糖组成及其量的变化, 可以进一步为多糖的质量控制提供有力的依据。

关键词: 植物多糖; 部分酸水解; 多元统计; 麻黄多糖; 三氟乙酸

中图分类号: R284.18 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)09-1101-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.007

Characteristics of partial acid hydrolysis in five plant polysaccharides

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

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

Abstract: Objective To study the characteristics of partial acid hydrolysis in five different plant polysaccharides and the composition of their hydrolytic products. **Methods** Polysaccharides were partially hydrolyzed with trifluoroacetic acid (TFA) at different concentration (0.05, 0.2, and 0.5 mol/L), respectively, and the hydrolytic characteristics were studied by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled with multivariate statistics. **Results** The characteristic structural segments of ephedra polysaccharide were the contents of glucuronic acid in trapped fluid hydrolyzed with 0.05 mol/L TFA (X1GlcUA), arabinose in permeation fluid hydrolyzed with 0.05 mol/L TFA (X2Ara), arabinose in trapped fluid hydrolyzed with 0.2 and 0.5 mol/L TFA (Y1Ara and Z1Ara), and galacturonic acid in the permeation fluid hydrolyzed with 0.2 mol/L TFA (Y2GalUA), which could distinguish other plant polysaccharide samples. **Conclusion** The proposed method is precise and practical for the analysis on monosaccharide composition in Chinese materia medica by UPLC coupled with multivariate statistics and partial acid hydrolytic reaction, which further provides the basis for the quality control of the plant polysaccharides.

Key words: plant polysaccharides; partial acid hydrolysis; multivariate statistics; ephedra polysaccharide; trifluoroacetic acid

近些年来, 从中药中分离出的植物多糖, 由于具有广泛的生物学活性和相对低的毒性, 已经引起了许多专家学者的关注^[1-3]。然而, 因为多糖化学结构的复杂性和较大的相对分子质量, 多糖类药物的质量控制一直以来是一个挑战。多糖的活性与其相对分子质量、化学组成、苷键构型、连接方式和空

间构型有关, 决定这些物理和化学的特征, 可以采用不同程度的部分酸水解反应, 通过多元统计的方法分析单糖组成及其量的变化, 可以进一步为多糖的质量控制提供有力的依据。本实验采用课题组建立的麻黄多糖提取工艺条件^[4], 对5种传统中药(麻黄、牛膝、酸浆、连翘、地榆)进行植物多糖的提

收稿日期: 2012-12-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)课题(2013CB531801); “十二五”国家科技部重大专项课题“重大新药创制”专项课题(2011ZX0910200601); 国家自然科学基金面上项目(81274103, 30973870); 国家博士后科学基金(20110490111); 黑龙江省新世纪优秀人才支持计划; 黑龙江省博士后特别资助支持计划; 黑龙江中医药大学博士创新基金(B201002); 黑龙江中医药大学青年学术带头人支持计划

作者简介: 梁军(1984—), 女, 黑龙江绥芬河人, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事中药、天然药物药效物质基础及其质量控制方法研究。Tel: (0451)82195301 E-mail: lliangjunn@163.com

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

取, 结合部分酸水解和多元统计的方法, 建立 5 种植物多糖部分酸水解特征。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC 系统(美国 Waters 公司); 衍生化试剂 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP; 北京试剂公司), 用甲醇重结晶 2 次; 单糖标准品 [葡萄糖 (Glc)、甘露糖 (Man)、阿拉伯糖 (Ara)、半乳糖 (Gal)、木糖 (Xyl)、鼠李糖 (Rha)、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 99.9%; 水为 Milli-Q 超纯水 (Milipore 公司); 三氟乙酸 (TFA) 购于德国 Merck 公司。

5 种药用植物于 2009 年 5 月购于哈尔滨市药材市场, 经黑龙江中医药大学中药资源教研室王振月教授鉴定为麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、地榆 *Sanguisorba officinalis* L.、连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl、酸浆 *Physalis alkekengi* L. 和牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume。

2 方法与结果

2.1 多糖样品的制备

干燥药材经水浴回流、醇沉、离心、透析并冻干得到 5 种植物总多糖各自冻干品^[4]。

2.2 部分酸水解

将 5 种多糖各称取 3 份, 每份 50 mg, 分别溶于 4 mL 0.05、0.2 和 0.5 mol/L TFA 溶液, 100 °C 水解 1 h。水解液对水透析 (截留 M_w 3 500), 得到低

相对分子质量透过液和高相对分子质量截留液, 除去多余的 TFA 后, 加水复溶, 冷冻干燥, 得到多糖部分酸水解产物。

2.3 样品分析及色谱条件

取多糖部分酸水解产物样品 10 mg 于具塞管中, 溶于 2 mL 2 mol/L TFA 溶液, 沸水浴水解 10 h, 离心分离上清液作为水解样品溶液。用甲醇反复减压回收除去 TFA 调至 pH 值为 7.0, 并以超纯水定容至 2.0 mL, 离心, 得到上清液。采用 PMP 衍生化法^[5-6], 反应产物进行 UPLC 分析。色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 20 mmol/L 甲酸铵水溶液 (A) - 乙睛 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 12%~16% B; 2~5 min, 16%~17% B; 5~5.1 min, 17%~12% B; 5.1~6 min, 12% B。体积流量为 0.4 mL/min, 柱温 40 °C; 检测波长 245 nm; 进样体积 3 μL。

2.4 部分酸水解产物的化学组成分析

通过已建立的单糖标准曲线 (Man: $Y=0.073 2 X+0.087$; Rha: $Y=0.064 7 X-0.029 2$; GlcUA: $Y=0.062 9 X-0.061 3$; GalUA: $Y=0.077 X-0.167 0$; Glc: $Y=0.042 9 X-0.031 6$; Xyl: $Y=0.074 5 X-0.057 4$; Gal: $Y=0.068 2 X-0.039 9$; Ara: $Y=0.072 7 X-0.036 9$) (Y 为分析物与内标物峰面积比值, X 为分析物摩尔浓度)^[5], 计算每种植物多糖低相对分子质量透过液和高相对分子质量截留液的单糖组成, 结果见表 1。

表 1 部分酸水解产物单糖组成

Table 1 Monosaccharide composition of partial acid hydrolytic products

来源	单糖	摩尔百分比 / %					
		0.05 mol/L TFA 截留液 (X1)	0.2 mol/L TFA 截留液 (Y1)	0.5 mol/L TFA 截留液 (Z1)	0.05 mol/L TFA 透过液 (X2)	0.2 mol/L TFA 透过液 (Y2)	0.5 mol/L TFA 透过液 (Z2)
麻黄 多糖	Man	2.68	0.66	1.20	1.22	3.13	3.81
	Rha	8.13	2.24	3.02	5.22	4.36	4.97
	GlcUA	1.93	0.26	0.32	0.61	1.30	1.43
	GalUA	62.62	11.10	18.05	4.40	11.38	19.54
	Glc	4.28	12.27	7.96	10.24	12.25	8.68
	Xyl	3.86	5.11	5.04	4.64	5.58	5.50
	Gal	11.20	10.25	13.32	6.45	10.65	11.11
地榆 多糖	Ara	5.32	58.13	51.12	67.25	51.35	44.94
	Man	3.50	3.86	3.44	1.35	1.68	1.98
	Rha	2.03	2.26	2.33	2.21	1.74	1.74
	GlcUA	0	0	0	0	0	0
	GalUA	37.31	39.06	32.79	4.27	4.29	2.63
	Glc	45.91	47.25	49.16	47.56	57.83	57.60
	Xyl	0	0	0	0	0	0
Gal	5.11	5.17	5.45	4.87	5.93	6.79	

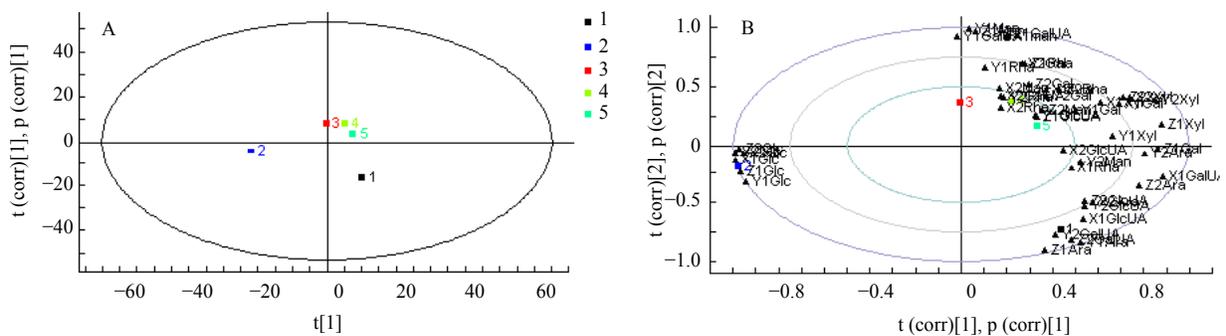
续表 1

来源	单糖	摩尔百分比 / %					
		0.05 mol/L TFA 截留液 (X1)	0.2 mol/L TFA 截留液 (Y1)	0.5 mol/L TFA 截留液 (Z1)	0.05 mol/L TFA 透过液 (X2)	0.2 mol/L TFA 透过液 (Y2)	0.5 mol/L TFA 透过液 (Z2)
连翘 多糖	Ara	6.07	2.56	6.72	39.84	28.41	29.23
	Man	8.45	8.30	8.35	1.67	2.84	4.73
	Rha	8.63	8.34	7.27	12.80	12.85	16.56
	GlcUA	0	0	0	0	0	0
	GalUA	49.52	53.00	56.91	6.80	6.26	4.97
	Glc	11.04	10.17	9.51	23.42	23.56	18.42
	Xyl	5.85	5.53	4.98	4.68	6.20	7.22
	Gal	10.82	8.79	7.99	17.26	17.09	19.23
酸浆 多糖	Ara	5.70	5.90	5.03	33.40	31.25	28.92
	Man	7.41	8.07	7.30	5.61	2.85	5.64
	Rha	3.80	4.39	5.10	4.65	4.72	4.81
	GlcUA	0.97	1.11	1.29	1.08	0.89	1.07
	GalUA	48.26	54.27	59.96	3.91	4.24	3.74
	Glc	7.29	6.45	5.59	13.56	15.29	15.59
	Xyl	5.38	4.70	3.96	8.50	8.26	8.76
	Gal	16.68	18.00	14.79	21.17	13.21	21.36
牛膝 多糖	Ara	10.19	3.03	2.01	41.54	50.57	39.01
	Man	5.57	6.21	5.27	0.97	1.62	1.52
	Rha	3.13	2.86	3.51	2.16	2.38	20.69
	GlcUA	0	0	0	0	0	0
	GalUA	62.22	64.05	62.65	5.89	3.98	3.38
	Glc	4.27	4.09	5.21	0	19.23	19.75
	Xyl	1.86	1.55	7.58	12.80	5.24	3.73
	Gal	9.44	7.04	11.87	6.03	6.93	6.08
Ara	13.48	14.21	3.94	72.14	60.63	44.86	

2.5 主成分分析

以不同程度酸水解后透过液和截留液中单糖组成摩尔百分比为变量，采用 Ezinfo 软件建立的主成分分析二维得分图和载荷图，得到图 1-A、B。通过图 1-B 能直观地辨别出麻黄多糖区别其他植物多糖的特征水解片段，即 0.05 mol/L TFA 水解后

截留液中 GlcUA 量 (X1GlcUA)、0.05 mol/L TFA 水解后透过液中 Ara 量 (X2Ara)、0.2 mol/L 和 0.5 mol/L TFA 水解后截留液中 Ara 量 (Y1Ara、Z1Ara)、0.2 mol/L TFA 水解后透过液中 GalUA 量 (Y2GalUA) 为麻黄多糖区别其他植物多糖的特征水解片段。



1-麻黄多糖 2-地榆多糖 3-连翘多糖 4-酸浆多糖 5-牛膝多糖 A-主成分分析得分图 B-主成分分析载荷图
 1-ephedra polysaccharide 2-burnet polysaccharide 3-forsythia polysaccharide 4-physalis polysaccharide
 5-twotooth achyranthes root polysaccharide A-scores plot from PCA B-loading plot from PCA

图 1 5 种植物多糖的模式识别图

Fig. 1 Pattern recognition plots of five plant polysaccharides

3 讨论

部分酸水解可用于多糖的糖苷键的选择性水解。呋喃糖、吡喃糖以及脱氧糖和糖醛酸水解难易程度不同。采用不同程度的部分酸水解反应,通过分析单糖组成及其量的变化,可以进一步为多糖的质量控制提供有力的依据。本研究分别采用 0.05、0.2、0.5 mol/L TFA 对 5 种植物多糖进行水解,不同浓度酸水解得到高相对分子质量截留液和低相对分子质量透过液的单糖组成摩尔百分比。不同植物多糖酸水解后透过液和截留液单糖组成种类变化,无明显规律可循,因此无法特征各传统中药多糖组群,进而采用主成分分析方法,以不同程度酸水解后透过液和截留液单糖组成摩尔百分比为变量,去寻找区分各传统中药多糖组群特征性的水解片段。

参考文献

[1] 王 蓉, 吴剑波. 多糖生物活性的研究进展 [J]. 国外

医药: 抗生素分册, 2001, 22(3): 97-100.

- [2] 吴雄志, 陈 丹, 艾 青, 等. 多糖抗肿瘤机理研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(12): 67-70.
- [3] 李 循, 孔繁智, 朱婉萍. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展 [J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(2): 113-116.
- [4] Xia Y G, Kuang H X, Yang B Y, *et al.* Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box-Behnken statistical design and its anti-complement activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 84(1): 282-291.
- [5] Kuang H X, Xia Y G, Liang J, *et al.* Fast classification and compositional analysis of polysaccharides from TCMs by ultra-performance liquid chromatography coupled with multivariate analysis [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 84(4): 1258-1266.
- [6] 梁 军, 夏永刚, 杨炳友, 等. 柱前衍生化-HPLC 法分析麻黄多糖 ESP-B1 的单糖组成 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1985-1988.