

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.04.004

## 柱前衍生化高效液相色谱法分析 9 种多糖中的单糖组成<sup>\*</sup>

王媛媛 张 晖 杨俊松 宗智慧

(蚌埠医学院公共课程部,蚌埠 233030)

**摘 要** **目的** 建立 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化-高效液相色谱法(HPLC)对甘草多糖等 9 种多糖的单糖组成成分进行分析。**方法** 9 种多糖样品水解后,利用 PMP 试剂进行柱前衍生化并进行 HPLC 分析,采用 Inertsil ODS-SP C18 色谱柱(260mm×4.6mm,5μm),流动相为 20% 乙腈与 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-三乙胺缓冲溶液(pH=6.9),流速 1.0ml/min,检测波长 254 nm,进样体积 10 μl,柱温 30 ℃。**结果** 建立的方法对多种混合单糖标准品具有良好的分离效果,各单糖在相应的线性范围内线性关系良好,且方法的精密度、稳定性、重现性良好。9 种多糖各由不同的单糖组成,且含量存在一定的差异。**结论** 该方法准确稳定,可以满足 9 种多糖的单糖组成及含量分析。

**关键词** 柱前衍生化;高效液相色谱法;多糖;单糖组成

中图分类号:O657.72 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)08-241-04

## Analysis of the monosaccharide composition of nine polysaccharides by precolumnderivatization procedure-high performance liquid chromatography

WANG Yuanyuan, ZHANG Hui, YANG Junsong, ZONG Zhihui

(Department of Public Courses, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

**Abstract: Objective** To establish a precolumnderivatization procedure with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)-high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of the monosaccharide composition of nine polysaccharides. **Methods** The nine polysaccharides were hydrolyzed, derivatized by PMP and analyzed by HPLC with the Inertsil ODS-SP C18 column(260mm×4.6mm,5μm). The mobile phase was the 20% triethylamine-buffer solution with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=6.9), and the flow rate was 1.0 ml/min. The UV absorbance was detected at a wavelength of 254 nm, and the injection volume was 10 μl with the column temperature 30℃. **Results** The method was successful in the separation of the mixture monosaccharide standards. The calibration line of each monosaccharide had a good relationship. And the precision, stability and reproducibility were also good. The nine polysaccharides were composed of different monosaccharide and the contents had some difference. **Conclusion** The method was accurate and stable for the determination of the monosaccharide composition and content of nine polysaccharides.

**Keywords:** Precolumnderivatization; HPLC; Polysaccharide; Monosaccharide composition

多糖(polysaccharide)是由糖苷键结合而成的糖链,其结构单元是单糖<sup>[1-2]</sup>。多糖的单糖组成是表征其结构的重要参数,不同多糖的单糖组成及含量不同,药理活性存在很大区别<sup>[3-6]</sup>。由于单糖本

身在紫外检测器上无吸收,所以 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化-高效液相色谱法(HPLC)法在单糖组成测定中的优势非常明显<sup>[7-10]</sup>。本文对 PMP 柱前衍生化-HPLC 方法进行优化,建立线性范围宽、精密度好、稳定性好、重现性好的方法对水解后的 9 种多糖的单糖组成及含量进行分析,为进一步探究 PMP 柱前衍生化-

<sup>\*</sup> [基金项目] 安徽省高等学校自然科学研究项目(KJ2016A485);蚌埠医学院自然科学研究项目(BYKY1413ZD, BYKY1435);安徽省大学生创新创业训练计划项目(201510367001)

HPLC 法对其它更多种类多糖的适应性及不同多糖的生物学活性与其结构的关系奠定基础。

## 1 仪器与实验材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪 (LC20AD 型, DAD 检测器, 日本岛津公司); pH 计 (SevenExcellence 型, 梅特勒-托利多公司); 旋涡混合器 (XW-80A 型, 海门市其林贝尔有限公司)。

### 1.2 实验材料

麻黄、甘草、黄芪、川牛膝、黄酒、三七、苍术、淫羊藿、桑寄生多糖 (由实验室采用水提醇沉法制备); D-核糖 (Rib)、D-甘露糖 (Man)、D-木糖 (Xyl)、D-无水葡萄糖 (Glc)、鼠李糖 (Rha)、D-葡萄糖醛酸 (GlcU)、D-半乳糖醛酸 (GalU)、半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ara) 标准品 (中国药品生物制品检定所)。

## 2 方法与结果

### 2.1 9 种多糖样品的水解预处理

称取干燥的麻黄、甘草、黄芪、川牛膝、黄酒、三七、苍术、淫羊藿、桑寄生多糖样品各 60 mg, 于 4 ml 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  溶液中溶解, 110 °C 加热水解 2 h。用 4 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值在 7.0 左右, 用纯水稀释到总体积为 10 ml, 离心, 取上清液, 等待下一步衍生化操作。

### 2.2 9 种多糖样品及单糖混合标准品的柱前衍生化处理

量取各水解后的多糖样品 100  $\mu$ l, 加 200  $\mu$ l 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液, 200  $\mu$ l 0.5 mol/L 的 PMP 溶液, 70 °C 水浴加热 100 min, 静置冷却 10 min。加入 0.3 mol/L 的 HCl 溶液 200  $\mu$ l 中和, 加纯水至 1 ml, 加 1 ml 三氯甲烷溶液萃取, 振荡、离心, 弃有机相, 重复萃取操作 3 次。水相补水至 2 ml, 过滤, 进行 HPLC 分析。

称取各单糖标准品 5 mg, 混合, 用纯水稀释至 5 ml。量取混合单糖标准品 100  $\mu$ l, 进行衍生化操作, 进行 HPLC 分析。

### 2.3 色谱分离操作条件的选择

**2.3.1 流动相配比的确定** 配制  $KH_2PO_4$  缓冲溶液 (20 mmol/L), 调节 pH = 6.6, 分别控制流动相中乙腈的比例为 17%, 18%, 19%, 20%, 21%。取 10  $\mu$ l 进样, 分析色谱出峰情况。见图 1。

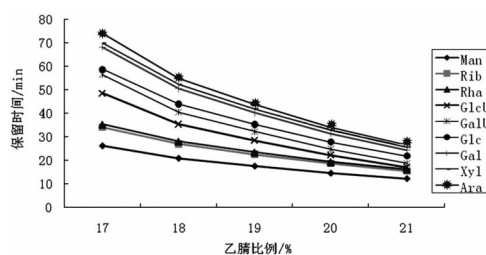


图 1 乙腈比例对各单糖分离效果的影响

结果表明, 随着流动相中乙腈比例的降低, 各色谱峰间的分离度提高, 但乙腈比例过低时, 分析时间太长。结合各色谱峰的分离程度及样品分析时间, 选取 20% 作为最优乙腈比例。

**2.3.2 流动相 pH 的确定** 配制 20 mmol/L 的  $KH_2PO_4$  缓冲溶液, 分别调节 pH = 6.3, 6.5, 6.7, 6.9, 7.1, 固定流动相中乙腈比例为 20%, 取 10  $\mu$ l 进样, 分析色谱出峰情况。见图 2。

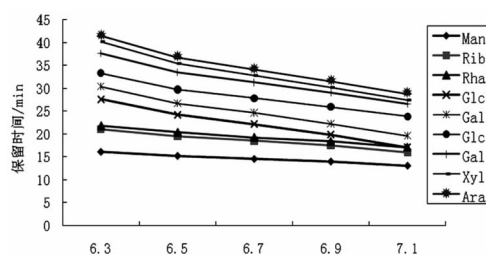
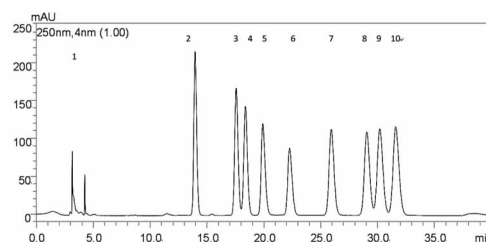


图 2 流动相 pH 值对各单糖分离效果的影响

结果表明, 随着流动相 pH 值的降低, 各色谱峰间的分离度提高, 分析时间增大。结合各色谱峰的分离程度及样品分析时间, 选取 pH = 6.9 作为最优流动相比比例。

**2.3.3 混合单糖标准品的分离** 色谱条件: 色谱柱为 Inertsil ODS-SP C18 柱 (260mm  $\times$  4.6mm, 5  $\mu$ m), 流动相为 20% 乙腈- $KH_2PO_4$  三乙胺缓冲溶液, pH = 6.9, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C, 进样体积 10  $\mu$ l。取混合单糖标准品溶液进行 HPLC 分析 (图 3)。图 3 表明建立的以上方法对混合单糖标准品具有良好的分离效果。



注: 1, PMP; 2, Man; 3, Rib; 4, Rha; 5, GlcU; 6, GalU; 7, Glc; 8, Gal; 9, Xyl; 10, Ara

图 3 单糖混合标准品 PMP-衍生物的色谱图

2.4 色谱方法学验证

2.4.1 线性关系试验 取经衍生化处理的单糖混合标准溶液,按“2.3.3”项下的方法分别进样 2、4、6、8、10、12  $\mu\text{l}$ ,以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,结果表明,各单糖在线性范围内的线性相关系数  $r$  均 $\geq 0.9999$ ,该方法线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取经衍生化处理的单糖混合标准溶液,按“2.3.3”项下的方法重复进样 6 次。结果表明,各单糖峰面积的 RSD 值均 $\geq 0.71\%$ ,该方法精密度良好。

2.4.3 重现性试验 取水解并经衍生化处理的甘草多糖溶液,按“2.3.3”项下的方法重复进样 6

次。结果表明,甘草多糖中各单糖峰面积的 RSD 均 $\leq 1.68\%$ ,该方法重现性良好。

2.4.4 稳定性试验 取水解并经衍生化处理的甘草多糖溶液,分别按“2.3.3”项下的方法于 0、2、4、6、8、10、12h 进样。结果表明,甘草多糖中各单糖峰面积的 RSD 均 $\leq 3.39\%$ ,该方法稳定性良好。

2.5 样品的测定

取经衍生化处理的 9 种多糖样品溶液进行 HPLC 分析。对各多糖样品的色谱峰进行定性,确定单糖组成,利用单糖混合标准品制定的标准曲线计算各样品中单糖的含量( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),结果见表 1。

表 1 9 种多糖样品的单糖组成及含量分析/ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

| 样品名称  | Man  | Rib | Rha  | GlcU | GalU | Glc  | Gal  | Xyl  | Ara  |
|-------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| 麻黄多糖  | 8550 | —   | 8200 | 6610 | 2410 | 1480 | 1660 | 2120 | 3350 |
| 甘草多糖  | 7650 | —   | 8250 | 7510 | 2050 | 2150 | 1920 | 1680 | 3750 |
| 黄芪多糖  | 6410 | —   | —    | —    | 1430 | 2890 | 1270 | —    | 2500 |
| 川牛膝多糖 | 6570 | —   | 5330 | —    | 1710 | 1600 | 940  | —    | 1930 |
| 黄酒多糖  | —    | —   | —    | —    | —    | 2890 | —    | —    | —    |
| 三七多糖  | 6660 | —   | 6200 | —    | 2040 | 3240 | 1970 | —    | 2740 |
| 苍术多糖  | 7610 | —   | 6120 | —    | 1780 | 1450 | 1090 | —    | 3270 |
| 淫羊藿多糖 | 7670 | —   | 7070 | —    | 1390 | 1560 | 1750 | 1820 | 2480 |
| 桑寄生多糖 | 6600 | —   | 5700 | —    | 1800 | 1450 | 1420 | 1740 | 2570 |

注:“—”表示样品中不含此种单糖。

3 讨论

利用高效液相色谱法分析多糖的单糖组成及含量时一般多采用蒸发光散射检测器(ELSD)或示差折光检测器(RID),但 ELSD 灵敏度低、基线噪音大,且柱温对结果的影响较大、测定过程中易发生单糖的转化,RID 灵敏度低、无法进行梯度洗脱,使二者在多糖的单糖组成测定中具有很大的局限性。而紫外检测器(UVD)具有灵敏度高、线性范围宽、稳定性好等特点,是高效液相色谱法分析中应用最广泛的检测器,同时柱前衍生化方法可以使本身无发色团的单糖产生相应的紫外吸收,解决紫外检测器不匹配问题,扩大其应用范围,所以柱前衍生化-HPLC(UVD)方法在多糖的单糖组成测定中具有显著的优势。

色谱分析条件优化实验结果表明,流动相的配

比及 pH 值对各混合单糖的分离效果具有较大影响,最优流动相比比例为 20% 乙腈- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  三乙胺缓冲溶液,最优流动相  $\text{pH} = 6.9$ 。建立的 PMP 柱前衍生化-HPLC 法对混合单糖标准品具有较好的分离效果,各种单糖在相应的线性范围内线性关系良好( $r \geq 0.9999$ ),方法的精密度、稳定性、重现性良好。9 种多糖样品的主要由 Man、Rha、GlcU、GalU、Glc、Gal、Xyl、Ara 或其中的部分单糖组成,且含量存在一定的差异。此外,本实验方法简便可行,初步推测其亦可应用于其它更多种类多糖的单糖组成及含量分析,具体对其它哪些多糖具有适应性是需要进一步探究的问题。

参考文献:

[1] 季宇彬. 中药多糖的化学与药理[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:3-20.

- [2] 张忠华,高维平.植物多糖分析检测研究进展[J].吉林化工学院学报,2014,31(7):33-37. DOI:10.3969/j.issn.1007-2853.2014.07.009.
- [3] Li X,Wang L. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 83: 270-276. DOI:10.1016/j.ijbiomac. 2015. 11. 060.
- [4] Siu KC,Xu L,Chen X, et al. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharides isolated from alkaline extract of wild *Armillaria ostoyae* mushrooms[J]. Carbohydr Polym, 2016, 137: 739-746. DOI:10.1016/j.carbpol. 2015. 05. 061.
- [5] He N,Yang X,Jiao Y, et al. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 978-989. DOI: 10.1016/j.foodchem. 2012. 02. 018.
- [6] Zhang Q,Xu Y,Zou S, et al. Novel functional polysaccharides from *Radix Polygoni Multiflori* water extracted residue: Preliminary characterization and immunomodulatory activity [J]. Carbohydr Polym, 2016, 137: 625-631. DOI:10.1016/j.carbpol. 2015. 11. 023.
- [7] Wu X,Jiang W,Lu J, et al. Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry [J]. Food Chem, 2014, 145: 976-983. DOI:10.1016/j.foodchem. 2013. 09. 019.
- [8] 李卫燕,李萍,曹蔚.柱前衍生化高效液相色谱法测定当归酸性多糖单糖组成的新方法[J]. 科学技术与工程, 2015, 15(10): 151-154. DOI: 10.3969/j.issn.1671-1815. 2015. 10. 030.
- [9] 陈志辉,谭丽容,罗明,等.香菇多糖柱前衍生化高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 医药导报, 2015, 34(5): 649-654. DOI:10.3870/ydyb. 2015. 05. 022.
- [10] 冯学珍,陈颖,伍善广.石莼多糖的单糖组成成分分析[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 91-94.

(收稿日期 2016-01-18)

(上接第 240 页)

- [4] Yenilmez E,Baaran E,Yazan Y. Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro-in vivo evaluation for topical application [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(2): 807-811. DOI: 10.1016/j.carbpol. 2010. 07. 002.
- [5] Wei W, Ma G H, Wang L Y, et al. Hollow quaternized chitosan microspheres increase the therapeutic effect of orally administered insulin [J]. Acta Biomater, 2010, 6(1): 205-209. DOI:10.1016/j.actbio. 2009. 06. 005.
- [6] Park J H, Saravanakumar G, Kim K, et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(1): 28-41. DOI:10.1016/j.addr. 2009. 10. 003.
- [7] Hamman J H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems [J]. Marine Drugs, 2010(4): 1305.
- [8] Patel H A, Shah S, Shah D O, et al. Sustained release of venlafaxine from venlafaxine-montmorillonite-polyvinylpyrrolidone composites [J]. Applied Clay Science, 2011, 51(1): 126-130. DOI:10.1016/j.clay. 2010. 11. 013.
- [9] Chen Y, Zhou A, Liu B, et al. Tramadol hydrochloride/montmorillonite composite: Preparation and controlled drug release [J]. Applied Clay Science, 2010, 49(3): 108-112. DOI:10.1016/j.clay. 2010. 04. 011.
- [10] Hua S, Yang H, Wang W, et al. Controlled release of ofloxacin from chitosan-montmorillonite hydrogel [J]. Applied Clay Science, 2010, 50(1): 112-117. DOI:10.1016/j.clay. 2010. 07. 012.
- [11] Nanda R, Sasmal A, Nayak P L. Preparation and characterization of chitosan-poly(lactide) composites blended with Cloisite 30B for control release of the anticancer drug paclitaxel [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 988-994. DOI:10.1016/j.carbpol. 2010. 09. 009.
- [12] Kevadiya B D, Joshi G V, Patel H A, et al. Montmorillonite-alginate nanocomposites as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of vitamin B1 and vitamin B6 [J]. J Biomater Appl, 2010, 25(2): 161-177. DOI:10.1177/0885328209344003.
- [13] 钱勇,蒋彩云,高倩.温度及 pH 敏感的水凝胶微球合成及其药物缓释研究[J]. 化工时刊, 2011, 25(1): 1-6. DOI:10.3969/j.issn.1002-154X. 2011. 01. 001.
- [14] 杨凤,赵伟,张欠.阿司匹林-蒙脱土-壳聚糖缓释微球的制备及其体外释放性能[J]. 功能高分子学报, 2010(1): 29-34.

(收稿日期 2016-03-26)