

DOI 编码 :10.3969/j.issn.1006-6144.2010.01.006

藏药蕨麻多糖水解单糖的毛细管区带电泳分离研究

夏莲^{1,2,3}, 孙志伟^{2,3}, 白新伟¹, 索有瑞², 尤进茂^{*1,2}

(1. 生命有机分析重点实验室, 曲阜师范大学化学与化工学院, 山东曲阜 273165;
2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 为柱前衍生试剂, 探讨了毛细管区带电泳模式下对藏药蕨麻多糖水解液中单糖的分离条件。实验采用 58.5 cm × 50 μm i. d. 毛细管 (有效长度 50 cm), 55 mmol/L 硼酸盐缓冲溶液 (pH = 9.46), 柱温 20 °C, 分离电压 22 kV, 进样 10 s。该法不加任何添加剂, 9 种单糖可高效、快速基线分离, 实现了对藏药蕨麻多糖水解液中单糖的分离和定量分析, 结果令人满意。

关键词:多糖; 蕨麻; 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮; 毛细管区带电泳

中图分类号: O657.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6144(2010)01-0025-05

藏药蕨麻 (*Potentilla anserina* L.) 属青藏高原特有的经济植物, 为蔷薇科委陵菜属植物鹅绒委陵菜之膨大块根, 又叫“人参果”, 属多年生草本植物。蕨麻作为一种具有较高营养价值和医疗保健功能的药食两用植物, 有着广阔的开发应用前景^[1]。现代药理学表明: 蕨麻具有健脾胃、收敛止血、补血益气、生津利痰之功效, 主治脾虚腹泻、贫血及营养不良等症^[2-3]。另有报道蕨麻具有治疗黄疸性及病毒性肝炎的功效^[4-5], 是一种常用藏药及滋补佳品。据文献记载, 蕨麻中含有鞣质、糖类、蛋白质、脂肪酸及委陵菜苷等成分^[6-9], 而对蕨麻多糖的研究相对较少。杨桦等^[10]从蕨麻中分离出多糖, 并测定了总糖含量。陈灵然等^[11]和张霞等^[12]分别进行了蕨麻多糖的药理学活性研究。刘春兰等^[13]用苯酚-硫酸法对蕨麻多糖的单糖组成进行了分析, 但由于方法选择性差, 多数单糖组分无法检出。

毛细管电泳以快速、高效、灵敏度高、所需样品量少等优点被广泛应用^[14-15]。目前, 毛细管电泳对糖的分析主要集中在单糖和寡糖的分离检测。Suzuki 等^[16]提出了一种不同于还原氨化类型的衍生法, 以 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 为衍生试剂, 利用活泼碳 (C-4) 和还原糖的还原端之间的缩合反应进行糖类的测定。赵燕等^[17]以 PMP 作为衍生试剂成功分离了八种单糖, 并将该方法用于中药大黄多糖 (RTP) 的单糖组成及其摩尔比的测定。本文以 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 作柱前衍生剂, 采用水提取乙醇逐级沉淀法从蕨麻中提取多糖组分, 经 Savage 法脱蛋白后的多糖以三氟乙酸水解, 所得单糖用 NMP 标记后, 采用毛细管区带电泳实现了各组分的分离和定量测定, 为蕨麻多糖的开发应用提供了理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

HP-3D 毛细管电泳仪 (美国, Agilent 公司), 配备二极管阵列检测器; 58.5 cm × 50 μm i. d. 毛细管 (有效长度 50 cm, 河北省永年锐沅色谱器件有限公司)。

1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 由本实验室合成^[18]; 单糖标准品 (美国, Sigma 公司); 硼砂 (分析纯, 徐州试剂二厂); 其它试剂均为分析纯; 水为 Milli-Q 超纯水。

蕨麻植物样品购自西宁市药材市场, 经中国科学院西北高原生物研究所藏药中心周昌范研究员鉴定。

收稿日期: 2009-03-13 修回日期: 2009-05-30

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 20075016)

* 通讯作者: 尤进茂, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事荧光试剂的开发及应用。

1.2 标准溶液的配制

准确称取葡萄糖、半乳糖、甘露糖标准品各 0.0180 g,阿拉伯糖、木糖各 0.0150 g,鼠李糖、岩藻糖各 0.0164 g,葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸各 0.0212 g,用水溶解并定容至 10 mL,得到各单糖浓度均为 0.01 mol/L 的标准混合液。准确称取 NMP 0.112 g,用乙腈定容至 10 mL,其浓度为 0.05 mol/L。

1.3 蕨麻多糖的提取

取干燥、研细的蕨麻根粉 20 g,加 200 mL 去离子水,90 °C 下超声提取 1 h,抽滤,取上清液减压浓缩至刚好有固体颗粒析出,加 3 倍体积的 95% 的乙醇,静置 24 h,离心得沉淀物。所得沉淀物用 60 mL 水溶解后,用氯仿-正丁醇(体积比 4:1)萃取三次(脱蛋白);上清液加 60 mL 乙醇放置 24 h,离心沉淀,所得沉淀物 70 °C 烘干,得 50% 乙醇沉淀的蕨麻粗多糖(P50) 170.67 mg;离心后的上清液补加 80 mL 乙醇,放置 24 h 后离心沉淀,沉淀物 70 °C 烘干,得 70% 乙醇沉淀的蕨麻粗多糖(P70) 18.07 mg;继续在所得的上清液中加 400 mL 乙醇,放置 24 h 后离心沉淀,所得沉淀物 70 °C 烘干,得 90% 乙醇沉淀的蕨麻粗多糖(P90) 9.33 mg。

分别取上述三种蕨麻粗多糖 5 mg,加 2 mol/L 的三氟乙酸 1 mL,封口后于 110 °C 下水解 8 h,放冷后 N₂ 吹干,用水溶解并定容至 1 mL 备用。

1.4 单糖的衍生

向 2 mL 安瓿瓶中加入 200 μL NMP 乙腈溶液、20 μL 单糖标准品混合液、20 μL 17% 氨水,封口后于 70 °C 水浴中反应 35 min,取出放冷后用氮气吹干,加 2 mL 乙腈-水(体积比为 4:1)溶解后进样分析。衍生化反应见图 1(以甘露糖为代表单糖)。

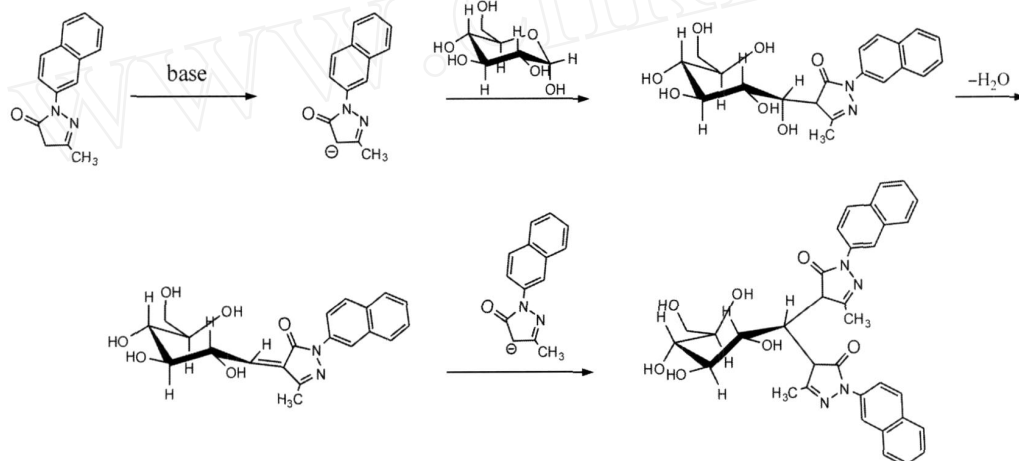


图 1 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)与还原性单糖衍生反应示意图

Fig. 1 Derivatization scheme of 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) with reductive saccharides

1.5 分析方法

以不同浓度的硼砂缓冲溶液,在不同 pH、电压和温度下,采用二极管阵列检测(DAD)分别对糖类衍生物进行测定。实验前对缓冲溶液进行超声脱气 5 min,每次进样之前,分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、超纯水、硼酸盐缓冲液冲洗毛细管柱 5 min,更换缓冲液时,需要分别冲洗 10 min。

2 结果与讨论

2.1 NMP 与 PMP 紫外吸收

将 NMP 与 PMP 分别溶解在乙腈(ACN)、甲醇(MeOH)、乙醇(EtOH)和四氢呋喃(THF)中(浓度均为 1.0×10^{-5} mol/L),在相同实验条件下测得的 NMP 与 PMP 的最大紫外吸收和摩尔吸光系数见表 1。NMP 是在 PMP 的基础上用萘基取代苯基后的产物,萘基取代后的 NMP 分子共轭体系加强,243 nm 波长处的摩尔吸光系数明显增加,检测灵敏度更高。

2.2 衍生化条件的选择

NMP 与糖的衍生随溶剂不同衍生化产率有显著差异。实验中分别选取 ACN、MeOH、THF、N,N-

表 1 NMP 和 PMP 的最大紫外吸收波长和摩尔吸光系数

Table 1 The maximum absorption wavelength and molar absorbance coefficients of NMP and PMP

Solvent	NMP		PMP	
	Absorbance	Molar absorptivity ($\times 10^{-4}$)	Absorbance	Molar absorptivity ($\times 10^{-4}$)
Acetonitrile	0.419 (214 nm)	4.19	0.219 (243 nm)	2.19
	0.558 (243 nm)	5.58		
Methanol	0.309 (214 nm)	3.09	0.128 (243 nm)	1.28
	0.330 (243 nm)	3.30		
Ethanol	0.385 (214 nm)	3.85	0.114 (249 nm)	1.14
	0.409 (243 nm)	4.09		
Tetrahydrofuran	0.515 (243 nm)	5.15	0.166 (247 nm)	1.66

二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)作溶剂,对衍生产率进行了考察。结果表明,在 DMF、DMSO 和 ACN 中的衍生产率基本相同,均高于在 MeOH 和 THF 中的衍生产率。考虑到衍生液的后续处理,实验中选用 ACN 作溶剂。NMP 与糖的衍生化随碱性催化剂的不同,导致不同的衍生产率。林雪等^[19]改进了 PMP 与单糖的衍生反应,用氨水代替 NaOH 作碱性催化剂,得到了满意的结果。本实验采用 17% 氨水作为催化剂,可得到与 NaOH 作催化剂相同的效果,且反应产物可直接用氮气吹干,从而简化了衍生液的后续处理。衍生化产率随温度升高而提高,超过 70 后衍生产率随之降低,实验中选择衍生化温度为 70,衍生化时间 35 min。对衍生试剂用量的考察结果表明,衍生试剂对总糖用量的摩尔数比达 5 倍以上衍生产率恒定,实验选取衍生试剂用量为总糖量的 5 倍。

2.3 毛细管电泳分离条件优化

本研究考察了碳酸盐缓冲体系、磷酸盐缓冲体系和硼酸盐缓冲体系后,发现硼酸盐缓冲体系对糖类生物物的分离效果最好。缓冲溶液浓度的改变会造成电导的变化,从而引起峰形的前伸和拖尾,所以,选择合适的硼酸盐浓度对提高分离效果具有很重要的作用。实验在固定其它条件的前提下考察了硼酸盐浓度在 40~65 mmol/L 范围内对糖类衍生物分离的影响,发现硼酸盐浓度为 55 mmol/L 时分离效率较高,迁移时间较短。

溶液 pH 的改变会影响溶质的迁移行为和引起电渗流的变化^[20],从而影响分离。考察了不同 pH 的缓冲溶液对分离的影响,发现 pH=9.46 时分离效率最高,分离时间最短,分离度较高。温度和电压对糖类分离影响较小,为了防止温度过高或电压较高引起温度过高产生较大的焦耳热影响分离效果,实验选择温度为 20,电压 22 kV。单糖标准品衍生物物的分离度、迁移时间、理论塔板数和选择性见表 2

表 2 单糖衍生物物的分离参数

Table 2 Separation parameters of carbohydrates derivatives

Carbohydrates	Migration time (min)	<i>N</i>	<i>Rs</i>	
Xyl	11.456	3.53×10^5	1.53	1.01
Ara	11.785	3.11×10^5	3.95	1.03
Glc	11.885	3.66×10^5	1.27	1.01
Rha	11.985	2.62×10^5	1.85	1.01
Man	12.845	2.85×10^5	7.19	1.06
Fuc	13.037	1.75×10^5	1.77	1.02
Gal	13.520	3.06×10^5	4.31	1.04
GlcUA	14.818	3.24×10^5	2.45	1.02
GalUA	15.704	2.92×10^5	8.02	1.06

2.4 重现性、线性回归方程和检出限

在相同毛细管电泳分离条件下,对 100 $\mu\text{mol/L}$ 糖类衍生物进行 6 次平行分析,保留时间和峰面积重复性见表 2,迁移时间相对标准偏差(RSD)小于 0.48%,峰面积的 RSD 小于 4.8%。

在最优化条件下,在 250~5 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内,依据峰面积对单糖浓度进行线性回归,所得各单糖衍

生物的线性回归方程、相关系数和检出限见表 3。各单糖衍生物的线性相关系数在 0.9980 ~ 0.9998 之间,检出限($S/N = 3$)在 0.85 ~ 2.19 $\mu\text{mol/L}$ 之间。

表 3 单糖衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限及保留时间和峰面积的重现性($n = 6$)

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and repeatabilities for peak area and retention time of saccharide derivatives($n = 6$)

Carbohydrates	Regression equation *	Correlation coefficient	RSD (%)		Detection limits ($\mu\text{mol/L}$)
			migration time	peak area	
Xyl	$Y = 1.906X - 0.257$	0.9996	0.48	4.8	0.89
Ara	$Y = 2.046X + 0.425$	0.9997	0.48	4.6	0.85
Glc	$Y = 1.419X + 0.788$	0.9991	0.46	3.4	1.26
Rha	$Y = 1.540X - 1.634$	0.9980	0.44	3.5	1.49
Man	$Y = 1.732X - 1.765$	0.9989	0.44	3.8	1.34
Fuc	$Y = 1.872X - 0.305$	0.9995	0.46	4.3	1.60
Gal	$Y = 2.231X - 0.301$	0.9998	0.47	3.2	1.02
GlcUA	$Y = 1.273X - 1.890$	0.9998	0.48	4.2	2.19
GalUA	$Y = 2.157X - 3.327$	0.9996	0.45	3.3	1.44

* Y: peak area, X: concentration of monosaccharide, $\mu\text{mol/L}$.

2.5 回收率

在蕨麻多糖水解液中分别加入 10 μL 浓度为 1.0×10^{-2} mol/L 的单糖标准溶液,按照上述方法进行衍生,重复 3 次所得的各单糖的回收率在 94.83% ~ 104.8%。

2.6 样品测定

取 1.3 节中多糖水解液 40 μL 于 2 mL 安培瓶中,依次加入 NMP 溶液 150 μL ,17%氨水 30 μL ,封口后于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴衍生 35 min,冷却后 N_2 吹干后,加水 100 μL 和乙腈 400 μL 溶解后进样分析。蕨麻多糖水解单糖电泳分离见图 2。经多次测量得单糖含量见表 4。

表 4 蕨麻逐级沉淀多糖中各单糖含量

Table 4 The monosaccharide contents of *potentilla anserina L.* polysaccharides obtained by gradually precipitation

Mono-saccharide	Content of each mono-saccharides obtained by the hydrolysis of polysaccharide from the root of <i>Potentilla anserina L.</i> plant		
	P50($\mu\text{g}/\text{mg}$)	P70($\mu\text{g}/\text{mg}$)	P90($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Xyl	3.945	2.610	2.490
Ara	77.445	28.485	7.110
Glc	17.568	26.514	9.522
Rha	17.646	15.793	5.281
Man	3.942	3.114	3.420
Fuc	2.165	1.738	0
Gal	65.268	19.980	8.820
GlcUA	13.037	9.254	6.528
GalUA	33.484	53.835	0
Total	234.500	161.323	43.171

3 结论

采用 NMP 作为柱前衍生试剂,通过对衍生化条件和毛细管区带电泳分离条件的优化,建立了灵敏、快速测定单糖的方法。实验表明,藏药蕨麻中含有九种单糖,其中以阿拉伯糖(Ara)、半乳糖(Gal)和半乳糖醛酸(GlcUA)含量最高,葡萄糖(Glc)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcUA)含量居中,木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)含量相对较低,该方法可作为藏药蕨麻中单糖组成测定的常规方法。本方法在藏药蕨麻多糖测定中的成功应用,将为丰富植物资源的多糖药物组成分析和质量控制提供新的研究方法。

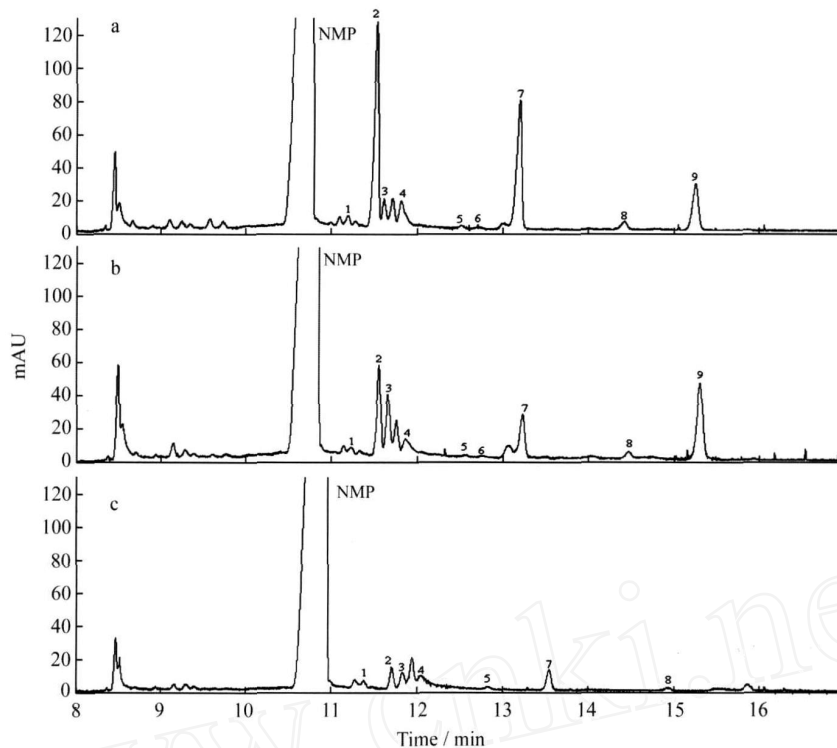


图2 蕨麻多糖水解单糖的毛细管区带电泳分离图

Fig. 2 Chromatograms of saccharides from *Potentilla anserina* L. sample by capillary zone electrophoresis
a: P50, b: P70, c: P90.

参考文献:

- [1] Qinghai Institute of Biology(青海生物研究所); Tongren Longwu dispensary(同仁县隆务诊疗所). Qinghai Altiplano Medicament Illustrated Handbook(青海高原药物图鉴) [M]. Xining(西宁): Qinghai People's Press(青海人民出版社), 1972: 56.
- [2] WU Zheng-yi(吴征镒). Xinhua Herbal Scheme(新华本草纲要) [M]. Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1990: 106.
- [3] CHEN Hui-qing(陈惠清), ZHANG Rui-xian(张瑞贤), HUANG Lu-qi(黄璐琦), WANG Min(王敏). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志) [J], 2000, 25(5): 311.
- [4] ZHAO Y-L, CAI G-M, HONG X, SHAN L-M, XIAO X-H. Journal of Phytomedicine [J], 2008, 15: 253.
- [5] ZHANG Xin-quan(张新全), ZHAO Yan-ling(赵艳玲), SHAN Li-mei(山丽梅), WEI Zhen-man(魏振满), CAI Guang-ming(蔡光明). Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army(解放军药学报) [J], 2004, 20(4): 259.
- [6] CHU Liang(褚良), WANG Li-bo(王立波), ZHANG Zhe(张哲), GAO Hui-yuan(高慧媛), HUANG Jian(黄健), SUN Bo-hang(孙博航), WU Li-jun(吴立军). Modern Chinese Medicine(中国现代中药) [J], 2008, 10(3): 10.
- [7] HONG Xia(洪霞), CAI Guang-ming(蔡光明), XIAO Xiao-he(肖小河). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药) [J], 2006, 37(2): 165.
- [8] PI Li(皮立), HU Feng-zu(胡凤祖). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药) [J], 2007, 38(11): 1625.
- [9] WEI Wei(韦薇), CHEN Feng(陈锋), SHEN Ai-hua(沈爱华). Modern Medicine Journal of China(中国现代医药杂志) [J], 2008, 10(1): 131.
- [10] YANG Hua(杨桦), JIA Xu(贾旭), YI Hong(易红). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药) [J], 2001, 32(1): 29.
- [11] CHEN Ling-ran(陈灵然), WANG Qin(王琴). Chinese Journal of Veterinary Science and Technology(中国兽医科技) [J], 2004, 34(4): 59.
- [12] ZHANG Xia(张霞), HU Ting-jun(胡庭俊), ZHENG Rong-liang(郑荣梁), CHENG Fu-sheng(程富胜), CHEN Ling-ran(陈灵然), MENG Ji-cheng(孟聚诚), GAO Fang(高芳), LIU Ying(刘英). Animal Husbandry & Veterinary Medicine(畜牧与兽医) [J], 2006, 38(12): 42.

- [13] LIU Chun-lan(刘春兰), LEI Mei-kang(雷美康), DENG Yi-hong(邓义红), LI Zhuan-xiu(李转秀), ZENG Ming(曾明). Journal of the Central University for Nationalities (Natural Sciences Edition) (中央民族大学学报, 自然科学版) [J], 2007, **16**(1): 16.
- [14] LIU Ting(刘 婷), JIANG Jin-dou(姜金斗), LIU Ning(刘 宁). Journal of Analytical Science(分析科学学报) [J], 2008, **24**(1): 37.
- [15] LI Wei(李 伟), CAI Jin-ling(柴金玲), ALIMJAN Abaydulla(阿里木江·艾拜都拉), GU Xue-xin(谷学新). Journal of Analytical Science(分析科学学报) [J], 2006, **22**(1): 68.
- [16] Suzuki S, Tanaka R, Takada K. J. Chromatogr. A [J], 2001, **910**(2): 319.
- [17] ZHAO Yan(赵 燕), LIU Li(刘 莉), YANG Xing-Bin(杨兴斌), LI Xiao-ye(李晓晔), LIU Wen-min(柳文敏), ZHANG Sheng-yong(张生勇). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2006, **34**(2): 255.
- [18] SUN Zhi-wei(孙志伟), LIU Ling-jun(刘凌君), HU Bao-jun(户宝军), SHENG Xiao(盛 筱), WANG Xiao-yan(王小艳), SUO You-rui(索有瑞), YOU Jin-mao(尤进茂). Chinese Journal of Chromatography(色谱) [J], 2008, **26**(2): 200.
- [19] LIN Xue(林 雪), WANG Zhong-Fu(王仲孚), HUANG Lin-juan(黄琳娟), BAI Quan(白 泉), JIA Jing-fen(贾敬芬). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(8): 1456.
- [20] YUAN Wei(袁 炜), LV Jian-de(吕建德), FU Xiao-yun(傅小芸). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2000, **28**(6): 749.

Separation of Derivatized Carbohydrates of *Potentilla anserina* L. by Capillary Zone Electrophoresis

XIA Lian^{1,2,3}, SUN Zhi-wei^{1,3}, BAI Xin-wei², SUO You-rui¹, YOU Jin-mao^{*1,2}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001;

2. Key Laboratory of Life-Organic Analysis of Shan dong Province, College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: A simple and rapid method was developed for the separation of derivatized carbohydrates of *Potentilla anserina* L. using 1-naphthyl-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) as derivatization reagent by capillary zone electrophoresis. The detection was performed with diode array at 254 nm. A 58.5 cm × 50 μm i. d. (50 cm effective length) untreated fused-silica capillary was used. The optimum conditions are as follows: 55 mmol/L borate buffer (pH = 9.46), voltage 22 kV, column temperature at 20 and detection at 254 nm. The samples were atmospherically introduced with an injection time of 10 s. The results indicate that 9 NMP-derivatized carbohydrates achieve baseline resolution within 16 min under the proposed conditions. The *Potentilla anserina* L. sample was also analyzed under the optimum conditions.

Key words: Polysacchrides; *Potentilla anserina* L.; 1-Naphthyl-3-methyl-5-pyrazolone (NMP); Capillary zone electrophoresis