

瑞香狼毒多糖中单糖组成的毛细管区带电泳分析

孙志伟^{1,4}, 王延宝³, 白新伟², 夏 莲^{1,2,4}, 索有瑞¹, 尤进茂^{*1,2}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 曲阜师范大学生命有机分析重点实验室, 曲阜 273165; 3. 济宁学院化学系, 曲阜 273100; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)和 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)为衍生试剂, 以反相高效液相色谱(RP-HPLC)和毛细管区带电泳(CZE)法对 9 种单糖衍生物进行了分离研究, 对比确定了 NMP 衍生化 CZE 法在植物多糖单糖组成分析中的优越性。以 NMP 为柱前标记试剂, 建立了毛细管区带电泳定量测定 9 种单糖的新方法。方法具有较好的重复性(相对标准偏差 RSD 小于 4.3%), 单糖衍生物检测限为 0.85 ~ 1.6 $\mu\text{mol/L}$, 回收率为 96.4% ~ 104%。已应用于瑞香狼毒多糖样品的单糖组成分析。

关键词: 瑞香狼毒; 单糖组成; 柱前衍生化; 毛细管区带电泳

中图分类号: O657.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2010)06-006-05

近年来, 国内外对植物多糖的研究越来越深入, 发现多糖具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗氧化等多方面的生物活性, 而且低毒甚至无毒。因此, 对多糖的深入研究将为探讨发展多糖类药物治疗奠定理论基础。对单糖的组成分析是控制质量标准 and 提供多糖基本信息的重要环节。植物多糖一般由不同类型的还原性单糖组成, 各单糖具有相似结构。多糖的单糖组成分析需要高效的分离技术, 方可实现系列单糖组成的有效分离。单糖因缺乏常规紫外生色基团, 所以单糖的衍生化是获得高灵敏紫外检测的必要条件。

Honda 等^[1]将 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)用于单糖衍生化并采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)成功测定了食品中单糖的含量, 此后基于 PMP 衍生化的 HPLC 和毛细管电泳(CE)方法得到不断的发展和完善^[2-10]。在作者的前期工作中, 制备并表征了更灵敏的糖类标记试剂 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP), 优化了反应条件, 并对单糖 NMP 衍生物分离和鉴定作了初步研究^[11-13]。本文在 RP-HPLC 和 CZE 两种分离方法

下, 对比了单糖 NMP 衍生物与单糖 PMP 衍生物分离效果。发现 RP-HPLC 法难以实现葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖的同时分离, 应用于植物多糖单糖组成分析具有较大局限性。而以硼酸盐为电泳介质的毛细管区带电泳法(CZE), 可实现包括这 4 种单糖在内的常见单糖标记物的基线分离。本实验以 NMP 为标记试剂, 采用毛细管区带电泳模式建立了定量测定 9 种单糖的方法, 较之相关报道, 该方法具有操作简单、准确、快速、灵敏高等优点。本实验首次将 NMP 衍生化 CZE 法用于瑞香狼毒多糖样品的单糖组成分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-3D 毛细管电泳仪(Agilent 公司), 毛细管总长 58.5 cm, 有效柱长为 50 cm, 内径为 50 μm ; Agilent1100 型高效液相色谱仪(Agilent 公司); Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm \times 200 mm, 5 μm); PHS-3C 精密 pH 计。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP); 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)^[11,12]; 单糖标准品:

* 收稿日期: 2009-08-05; 修订日期: 2009-10-26

基金项目: 中国科学院百人计划(328)项目资助

作者简介: 孙志伟(1981-), 男, 博士研究生; E-mail: sunzhiw@126.com、jmyou6304@163.com

葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、木糖 (Xyl)、甘露糖 (Man)、鼠李糖 (Rha)、葡萄糖醛酸 (GcUA)、半乳糖醛酸 (GalUA)、阿拉伯糖 (Ara)、岩藻糖 (Fuc); 三氟乙酸; 色谱纯乙腈; 硼砂、氨水、NaOH 等均为分析纯。纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 标准溶液的配制

称量各单糖标准品用水溶解, 配成各单糖浓度均为 0.01 mol/L 的标准混合液。称量 NMP 0.112 g, 用乙腈定容至 10 mL 浓度为 0.05 mol/L。称量 PMP 0.087 g, 用乙腈定容至 10 mL 浓度为 0.05 mol/L。

1.3 多糖样品提取、水解和衍生化

称取研细、干燥的狼毒根 20.0 g, 加去离子水 200 mL 于 90 °C 超声波浸提 1 h, 抽滤, 取上层清液减压浓缩。加 3 倍体积的 95 % 乙醇, 静置 24 h, 高速离心得沉淀物, 加水溶解, 经 Sevag 法去蛋白后用 40 %、60 % 和 80 % 的乙醇逐级沉淀, 得到 3 种不同级分的多糖, 分别定义为 PS40, PS60 和 PS80。分别称取狼毒多糖样品各 0.02 g, 加 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 2 mL, 封口后于 110 °C 水解 2 h, 放冷后氮气吹干, 加 2 mL 水溶解并定容至 5 mL。

向 2 mL 安瓿瓶中依次加入 200 μL 0.05 mol/L 的衍生试剂溶液和 20 μL 多糖水解液、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 乙腈水溶液 (体积比为 4 : 1) 超声溶解备用。

1.4 色谱条件

1.4.1 HPLC 条件 色谱柱 Hypersil ODS 2 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm)。流动相: A 相为 50 mmol/L NH₄H₂PO₄ 水溶液; B 相为 60 % 乙腈。流速: 1 mL/min 梯度洗脱程序: (1) PMP 标记的单糖: 0 min, 100 % A; 50 min, 60 % A; (2) NMP 标记的单糖: 0 min, 30 % A; 50 min, 60 % A。柱温 30 °C。检测波长 250 nm。

1.4.2 CZE 条件 (1) PMP 标记的单糖: 以 40 mmol/L 的硼酸缓冲液 (pH 9.50), 在 20 °C, 22 kV 下, 5 kPa 压力进样, 进样 10 s, 245 nm 检测。(2) NMP 标记的单糖: 以 50 mmol/L 的硼酸缓冲液 (pH 9.50), 在 20 °C, 22 kV 下, 5 kPa 压力进样, 进样 10 s, 254 nm 检测。每次进样之前, 分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、超纯水和硼砂溶液冲洗毛细管柱 2 min。

2 结果与讨论

2.1 RP-HPLC 法分离单糖 PMP 衍生物和 NMP 衍生物

对 Xyl、Ara、Glc 和 Gal 等 9 种单糖混合液分别用 PMP 和 NMP 衍生化后, 进行 RP-PLC 分离。优化了流动相组成, pH 和梯度洗脱程序等分离条件。在各自优化液相色谱条件下的色谱分离见图 1。图 1a 为采用 PMP 衍生化后的 9 种单糖的色谱分离, 基本实现 8 种单糖的基线分离, 其中 Ara 和 Xyl 共洗脱, 与文献结果相一致^[2,7]。图 1b 为采用 NMP 衍生化后的 9 种单糖的色谱分离, 亦可基本获得 8 种单糖的基线分离。Ara 和 Xyl 能够实现近基线分离, 而 Glc 和 Gal 共洗脱。RP-PLC 柱对这两个物质对 PMP 或 NMP 衍生物分离选择性的差异, 可能源于生色基团的不同导致与固定相作用的差异所致, 其中作用机制有待进一步研究。实验中分别试用 Hypersil GOLD、Hypersil BDS-C₁₈、Hypersil ODS2、SinoChrom ODS-BP、ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 和 Spherisorb C₁₈ 6 种不同的反相柱 (均为 250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 对 Ara, Xyl, Glc 和 Gal 4 种单糖衍生物进行了分离研究, 得到同样的分离

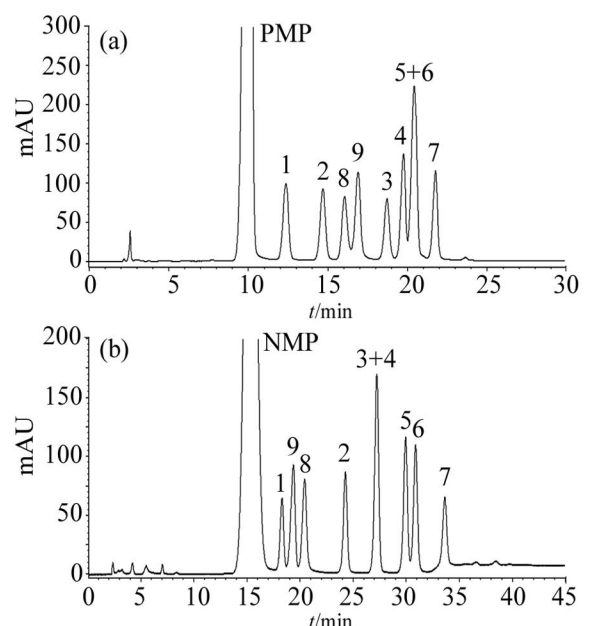


图 1 单糖标准品混合液高效液相色谱分离图

Fig. 1 HPLC separation chromatograms of saccharide derivatives

(a) PMP 标记; (b) NMP 标记

1 - Man; 2 - Rha; 3 - Glc; 4 - 半乳糖; 5 - Ara; 6 - Xyl; 7 - Fuc; 8 - GcUA; 9 - GalUA

效果, 均无法实现四者的同时分离。

2.2 CZE 法分离单糖 PMP 衍生物和 NMP 衍生物

在 pH 8~10 的条件下, 缓冲液中的 $B(OH)_4^-$ 能与糖形成带电络合物, 因此硼酸盐成为毛细管电泳法分离糖类化合物的首选缓冲体系。本实验在硼酸盐缓冲体系下, 分别优化了 PMP 和 NMP 对单糖标记物的电泳分离条件, 包括硼酸盐浓度、pH、柱温和电压等。实验考察了硼酸盐浓度在 30~80 mmol/L 范围内对糖类衍生物分离的影响。结果显示, 随硼酸盐浓度的改变对整体组分的分离度变化不明显, 但对于分离度最小的 Ara 与 Xyl 来说, 在硼酸盐浓度小于一定值时分离度变差 (PMP 标记物 < 40 mmol/L; NMP 标记物 < 50 mmol/L)。硼酸盐浓度高于此值时, 分离度无较大改善, 仅分析时间有所增长。溶液 pH 的变化会引起溶质所带电荷的改变, 从而影响溶质的迁移行为, 同时 pH 的改变还伴随着电渗流的变化, 所以 pH 对分离的影响较为复杂。对所选缓冲液 pH 考察确定其最佳的 pH 范围为 9.40~9.60。在 10~30 之间, 比较了不同温度下糖类的分离情况。结果发现, 温度变化对单糖类衍生物的分离影响不大, 实验选择 20 作为毛细管的分离温度。分离电压对迁移时间影响较大, 但对分离度的贡献相对有限, 选用分离电压 22 kV 时分析时间相对较短。

采用上述优化条件, 5 kPa 压力进样 10 s, 对糖类衍生物的电泳分离见图 2。结果显示, CZE 法可实现 9 种 PMP 或 NMP 标记单糖的快速基线分离, 可以弥补 HPLC 法难以同时分离 Gc 和 Gal 及 Ara 和 Xyl 两个物质对的缺陷。各单糖浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的标准品混合液分别采用 PMP 和 NMP 标记后经 CE 分离, 紫外检测, 将各单糖 NMP 衍生物与相应 PMP 衍生物进行强度对比, 各单糖峰面积之比 $A_{\text{NMP}}/A_{\text{PMP}} = 1.4 \sim 2.3$ 。表明 NMP 标记法具有更高的灵敏度。

2.3 NMP 衍生化 CE 法测定单糖组成的线性、精密度、检测限和回收率

将单糖混合液梯度稀释配制 6 个不同浓度的标准溶液, 以 NMP 为衍生试剂, 按 1.3 所述的方法衍生化后进行 CZE 分析。以单糖的浓度 X 与峰面积 Y 作图, 得回归方程与相关系数 (见表 1)。各单糖的检出限 ($S/N = 3$) 均小于 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 。

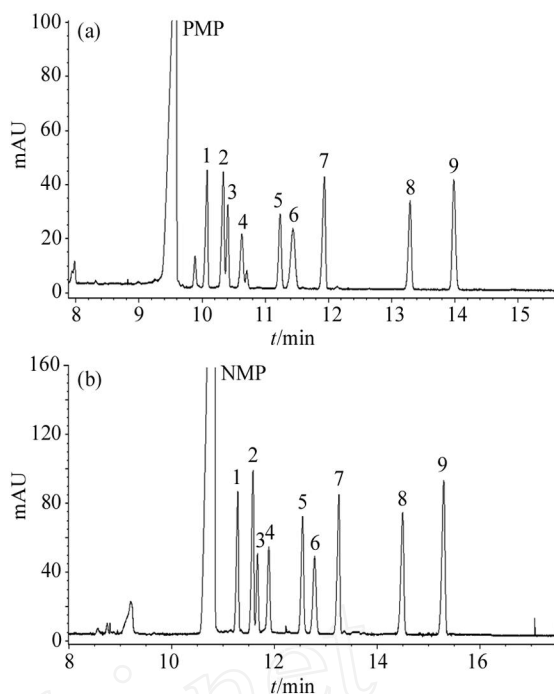


图 2 单糖标准品混合液毛细管区带电泳分离图

Fig. 2 CZE separation electropherograms of saccharide derivatives

(a) PMP 标记; (b) NMP 标记

1 - Xyl; 2 - Ara; 3 - Gc; 4 - Rha; 5 - Man; 6 - Fuc; 7 - Gal; 8 - GcUA; 9 - GalUA

在最优化条件下, 对 100 $\mu\text{mol/L}$ 单糖标准品衍生液的迁移时间和峰面积重现性进行了考察 ($n = 6$)。各单糖峰面积相对标准偏差分别小于 3.5%, 在连续的 3 个工作日内峰面积相对标准偏差分别小于 4.1%。对于实际样品测定结果, 日内精密度和日间精密度分别小于 3.8% 和 4.3%。

在已测含量的多糖样品中, 分别加入各单糖对照品, 进行回收率实验, 各单糖回收率在 96.4%~104% 之间。实验表明所建立的方法快速、准确。可作为植物多糖中单糖组成的常规分析方法。

2.4 样品的分离测定

在最优化条件下对 3 种狼毒多糖样品水解后的单糖组成分析见图 3 和表 2。不同级分的狼毒多糖样品中单糖的组成差别较大。狼毒多糖 PS40 由 Gc、Gal、Xyl、Ara、Rha、Man、GalUA、GcUA 和 Fuc 组成, 摩尔比为 6.5 11.67 1.5 5.67 1.17 1 1.5 0.67; 狼毒多糖 PS60 主要由 Gc、Gal、Xyl、Ara、Rha、Man、GalUA 和 GcUA 组成, 摩尔比为

表 1 9 种糖的标准曲线和检测限

Tab. 1 Calibration curves and limits of detection for 9 saccharides

单糖	线性方程*	相关系数	线性范围 / (μmol/L)	检测限 / (μmol/L)
Xyl	$Y = 1.90591 - 0.25684$	0.9996	100 ~ 5	0.89
Ara	$Y = 2.0458 + 0.42542$	0.9997	100 ~ 5	0.85
Gc	$Y = 1.41938 + 0.78782$	0.9991	100 ~ 10	1.26
Rha	$Y = 1.54032 - 1.63403$	0.9980	100 ~ 10	1.49
Man	$Y = 1.73246 - 1.76493$	0.9989	100 ~ 10	1.34
Fuc	$Y = 1.87222 - 0.30456$	0.9995	100 ~ 10	1.60
Gal	$Y = 2.23051 - 0.30982$	0.9998	100 ~ 5	1.02
GcUA	$Y = 1.27261 - 1.89004$	0.9998	100 ~ 5	1.47
GalUA	$Y = 2.15725 - 3.32697$	0.9997	100 ~ 5	1.44

Y - 峰面积; / (μmol/L)

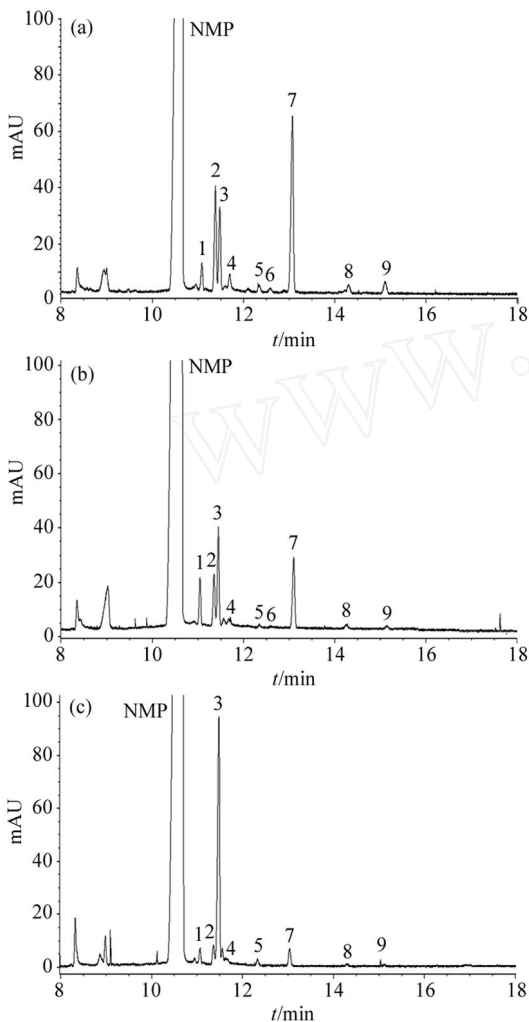


图 3 狼毒多糖的毛细管区带电泳分离图

Fig. 3 CZE separation electropherograms of saccharide derivatives from *Stellera chamaejasma* L.

(a) PS40; (b) PS60; (c) PS80

1 - Xyl; 2 - Ara; 3 - Gc; 4 - Rha; 5 - Man; 6 - Fuc; 7 - Gal;
8 - GcUA; 9 - GalUA

表 2 瑞香狼毒多糖的单糖组成测定结果

Tab. 2 Analysis results of monosaccharide components of *stellera chamaejasma* L. polysaccharide

单糖	含量/(mmol/g)*		
	PS40	PS60	PS80
Xyl	0.09	0.16	0.05
Ara	0.34	0.18	0.07
Gc	0.39	0.44	1.30
Rha	0.07	0.05	0.07
Man	0.06	0.03	0.05
Fuc	0.04	NQ	ND
Gal	0.70	0.27	0.07
GcUA	0.09	0.08	NQ
GalUA	0.06	0.02	NQ

* 5 次测定平均结果

14.67 9 5.33 6 1.67 1 2.67 0.67; 狼毒多糖 PS80 主要由 Gc、Gal、Xyl、Ara、Rha 和 Man 组成, 摩尔比为 26 1.4 1 1.4 1.4 1。该结果显示狼毒多糖系以 Gc、Gal、Ara 和 Xyl 为主的杂多糖组成。

参考文献

- [1] Honda S, Akao E, Suzuki S *et al.* Anal Biochem, 1989, 180: 351
- [2] Strydom D J. J Chromatogr A, 1994, 678: 17
- [3] 王仲孚, 张英, 林雪等. 化学学报, 2007, 65(23): 2761
- [4] 马定远, 陈军, 李平等. 分析化学, 2002, 30(6): 702
- [5] Zhang L, Xu J, Zhang M *et al.* J Chromatogr B, 2003, 793: 159
- [6] Fu D, O'Neill RA. Anal Biochem, 1995, 227: 377
- [7] 杨兴斌, 赵燕, 周四元等. 分析化学, 2005, 33(9):

- 1287
- [8] 赵 燕, 刘 莉, 杨兴斌等. 分析化学, 2006, 34(2): 255
- [9] Yang X, Zhao Y, Lv Y. J Agric Food Chem, 2007, 55: 4684
- [10] Lv Y, Yang X B, Zhao Y *et al.* Food Chem, 2009, 112: 742
- [11] 孙志伟, 刘凌君, 户宝军等. 色谱, 2008, 26(2): 200
- [12] 盛 筱, 丁晨旭, 刘凌君等. 分析化学, 2008, 36(3): 280
- [13] 孙学军, 孙志伟, 户宝军等. 分析化学, 2008, 36(10): 1309

Analysis of monosaccharides in *Stellera chamaejasma* L. by capillary zone electrophoresis

SUN Zhi-wei^{1,4}, WANG Yan-bao³, BAI Xin-wei², XIA Lian^{1,2,4}, SUO You-rui¹ and YOU Jir-mao^{*1,2} (1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. The Key Laboratory of Life-organic Analysis, Qufu Normal University, Qufu 273165; 3. The Department of Chemistry, Jining University, Qufu 273100; 4. The Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049), Fenxi Shiyanshi, 2010, 29(6): 6~10

Abstract: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) and capillary zone electrophoretic (CZE) methods are compared for the determination of mono-saccharides using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) and 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) as derivatization reagents. In comparison with HPLC, the CE method is cheaper and faster (16 min) and the separation is more efficient. The optimum operating conditions are set in 50 mmol/L borate buffer (pH 9.50) at a voltage of 22 kV and a column temperature of 20 with 10 s injection at atmospheric pressure and detection at 254 nm, respectively. CE method, in conjunction with a zone mode, offers a complete baseline resolution for quantitative analysis of nine labeled mono-saccharide derivatives using NMP as a derivatization reagent. Good reproducibilities are obtained with RSD < 4.3%, and the limits of detection are in the range of 0.85 ~ 1.6 $\mu\text{mol/L}$. The proposed method is more efficient and sensitive compared with previously reported method. The mono-saccharides extracted from the root of *Stellera chamaejasma* L. plant were also determined under the proposed conditions.

Key words: *Stellera chamaejasma* L.; Monosaccharide composition; Derivatization; Capillary zone electrophoresis