

枸杞子多糖柱前衍生 HPLC 指纹图谱分析

蒋梅¹, 谭丽蓉², 黄晓洁¹, 林伟斌², 吴小莉², 魏刚^{1*}
(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 无限极(中国)有限公司, 广东 江门 529156)

[摘要] 目的:建立枸杞子多糖柱前衍生 HPLC 指纹图谱。方法:以三氟乙酸(TFA)水解枸杞子多糖,水解产物加入 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)进行衍生化,采用 HPLC 测定枸杞子多糖中单糖的衍生物。采用 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 6.7)-乙腈(84.5:15.5),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 250 nm,柱温 30 ℃。结果:枸杞子多糖柱前衍生指纹图谱标示出 11 个共有峰,鉴别了 8 个共有峰(*D*-甘露糖,*L*-鼠李糖,*D*-葡萄糖醛酸,*D*-半乳糖醛酸,*D*-葡萄糖,*D*-半乳糖,*D*-木糖,*D*-阿拉伯糖)。10 批枸杞子药材指纹图谱相似度>0.99。结论:该方法简便,分离度高,重复性及稳定性良好,可有效控制枸杞子多糖的质量。

[关键词] 枸杞子; 多糖; 柱前衍生化; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)22-0053-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220053

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.1026.018.html>

[网络出版时间] 2014-10-10 10:26

Pre-column Derivatives HPLC Fingerprint of Lycii Fructus Polysaccharides

JIANG Mei¹, TAN Li-rong², HUANG Xiao-jie¹, LIN Wei-bing², WU Xiao-li², WEI Gang^{1*}
(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Infinitus (China) Company Limited, Jiangmen 529156, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish a pre-column derivation HPLC method for chromatographic fingerprint of Lycii Fructus Polysaccharide. **Method:** Lycii Fructus sample was hydrolyzed with Trifluoroacetic Acid (TFA) and derivated by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). The monosaccharide composition of Lycii Fructus polysaccharide was carried out by reversed-phase technique on a ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column with a mobile phase composed of 0.1 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.7) and acetonitrile in the ratio of 84.5:15.5. The flow rate was set at 0.8 mL·min⁻¹, the wavelength was set at 250 nm, and the column temperature was at 30 ℃. **Result:** There were 12 peaks from the fingerprint and 8 peaks were *D*-Man, *L*-Rha, *D*-GlcUA, *D*-GlcN, *D*-Glc, *D*-Gal, *D*-Xyl, *D*-Ara. The similarity of the 10 batches of Lycium barbarum samples was more than 0.99. **Conclusion:** The HPLC method with pre-column derivatization is appropriate for the analysis of monosaccharide composition of Lycii Fructus polysaccharide and the method is simple, quick and accurate.

[Key words] Lycii Fructus; polysaccharide; pre-column derivatives; monosaccharide; HPLC; fingerprint chromatogram

枸杞子功效滋补肝肾、益精明目,用于虚劳精亏、腰膝酸痛、眩晕耳鸣、阳萎遗精、内热消渴、血虚萎黄、目昏不明^[1]。现代研究表明枸杞子具有促进免疫^[2]、抗衰老^[3]、抗肿瘤^[4]、抗疲劳^[5]、抗辐

[收稿日期] 20140412(001)
[基金项目] 广东省部产学研结合项目(2012B090600025)
[第一作者] 蒋梅,硕士,从事创新中药与指纹图谱分析研究,Tel:020-39358519,E-mail:Jamie125@163.com
[通讯作者] * 魏刚,研究员,博士生导师,从事创新中药与指纹图谱分析研究,Tel:020-39358166,E-mail:weigang021@163.com

射^[6-7]、保肝^[8]、降糖降脂^[9-10]等作用。枸杞子主要含有枸杞多糖^[11]等。枸杞多糖由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖等 6 种单糖^[11-12]组成,是含有多种微量元素和氨基酸的蛋白多糖,具有重要生理活性。多糖中单糖的组成测定是目前探索多糖质量标准,研究多糖结构、性质及构效关系等基本信息的重要手段。随着现代科学仪器及研究手段的发展,通过 PMP 柱前衍生化高效液相色谱法进行组成糖分析,具有分离度高、操作快捷、重复性好等优势^[13]。同时对建立枸杞多糖特定图谱提供了极为方便准确的方法,该特定图谱对控制枸杞多糖的质量具有十分重要的意义。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器,日本岛津),T1000 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂)。

1.2 试药 *D*-葡萄糖(批号 110833-201205),*D*-甘露糖(批号 140651-200602),*D*-半乳糖(批号 100226-201105),*D*-盐酸氨基葡萄糖(批号 140649-200702)对照品,均购自中国食品药品检定研究院;*L*-鼠李糖(批号 121029),*L*-岩藻糖(批号 120927),*D*-葡萄糖醛酸(批号 121009),*D*-半乳糖醛酸(批号 121106),*D*-木糖(批号 121026),*D*-核糖(批号 121012),*D*-阿拉伯糖(批号 121103)对照品,均购自上海融禾医药科技有限公司。PMP(3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉酮)(批号 A1216009,阿拉丁),三氟乙酸(TFA,批号 20120903,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,德国 Merk 公司),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。枸杞子样品均由无限极(中国)有限公司提供,经广州中医药大学魏刚研究员鉴定枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-磷酸盐缓冲液(0.1 mol·L⁻¹, pH 6.7)(15.5:84.5),检测波长 250 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。

2.2 对照品溶液的制备 分别取 *D*-核糖,*D*-阿拉伯糖,*D*-甘露糖,*L*-岩藻糖,*D*-葡萄糖,*D*-葡萄糖醛酸,*D*-半乳糖,*D*-半乳糖醛酸,*D*-盐酸氨基葡萄糖,*L*-鼠李糖,*D*-木糖等对照品适量,精密称定,加水制成单糖混合对照品溶液(各单糖浓度均为 0.45 g·L⁻¹)。精密吸取单糖混合对照品溶液 100 μL 置 5 mL 的安剂瓶中,精密加入 0.6 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 100 μL,

混匀,精密加入 0.5 mol·L⁻¹ PMP 100 μL,在 70 ℃ 条件下反应 60 min。取出,放冷,精密加入 0.3 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液 100 μL,涡旋混匀,转移至 5 mL 离心管中,涡旋混匀。加入三氯甲烷 1 mL,涡旋混匀,离心(3 000 r·min⁻¹)10 min,弃去三氯甲烷层,重复 3 次至三氯甲烷层无颜色,水层即得对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备方法筛选

2.3.1 样品粗多糖溶液制备方法 取本品粉末 3.0 g,精密称定,加入无水乙醇 150 mL,超声提取 60 min,取出,放冷,过滤,滤渣与滤器用热 80% 乙醇洗涤 3 次,每次 10 mL,滤渣连同滤纸置 250 mL 圆底烧瓶中,加水 200 mL,回流提取 1 h。取出,趁热抽滤,弃去上清液,加水 100 mL,回流提取 2 h。取出,趁热抽滤,残渣及烧瓶用热水洗涤 4 次,每次 10 mL,合并滤液与洗液,浓缩至约 10 mL,放冷,转移至 10 mL 量瓶中,加水至刻度,离心(4 500 r·min⁻¹)10 min。精密加入无水乙醇 40 mL(慢加快搅),置 5 ~ 10 ℃ 冰箱中放置 12 h,离心(5 000 r·min⁻¹)10 min,弃去上清液,沉淀加 80% 乙醇洗涤 2 次,每次 10 mL,离心(5 000 r·min⁻¹)10 min,再加无水乙醇洗涤 2 次,每次 10 mL,离心(5 000 r·min⁻¹)10 min,弃去上清液,沉淀加热水溶解,转移至 5 mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得粗多糖溶液。

2.3.2 样品多糖溶液的 TFA 部分酸水解方法 精密吸取 2.3.1 项下样品粗多糖溶液 500 μL,置 5 mL 的安剂瓶中,精密加入 0.4 mol·L⁻¹ 的 TFA 溶液 500 μL,封口后置 110 ℃ 条件下水解,取出,放冷,水浴蒸干,残渣加入甲醇 1 mL 搅拌,蒸干以去除 TFA,重复 3 次,残渣加热水溶解,转移至 1 mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得粗多糖水解溶液。

2.3.3 PMP 衍生化方法 精密吸取 2.3.2 项下的粗多糖水解溶液 200 μL 置 5 mL 的安剂瓶中,精密加入 0.6 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 200 μL,混匀,精密加入 0.5 mol·L⁻¹ PMP 200 μL,在 70 ℃ 条件下衍生反应[14-15]。取出,放冷,精密加入 0.3 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液 400 μL,涡旋混匀。移至 5 mL 离心管中,涡旋混匀。加入三氯甲烷 1 mL,涡旋混匀,离心(3 000 r·min⁻¹)10 min,弃去三氯甲烷层,重复 3 次至三氯甲烷层无颜色,水层即得供试品溶液。

2.3.4 样品多糖溶液的 TFA 酸水解时间的筛选 按 2.3.2 项下方法试验,水解时间分别考察 3, 4, 5, 6, 7, 8 h,所得粗多糖水解溶液按 2.3.3 项下方法试验,衍生时间为 60 min。精密吸取所得供试品溶液各 30 μL,按 2.1 项下色谱条件进样分析。以供试

品溶液所得 HPLC 图谱主要共有特征峰的峰面积和作为衡量指标,不同水解时间试验结果见图 1。由图 1 可见随着水解时间的延长,主要共有特征峰的峰面积和随之升高,水解时间达到 5 h 水解基本完全,5~7 h 共有峰面积和基本不变,当水解时间超过 7 h,随着多糖趋于完全水解,曲线略有下降,因此,确定水解时间 6 h。

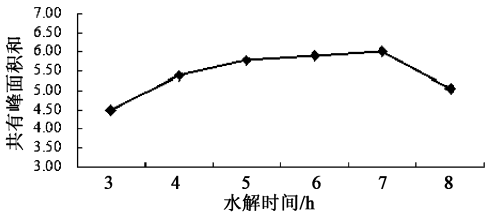


图 1 不同水解时间对枸杞子多糖 PMP-HPLC 指纹图谱共有峰面积和的变化趋势

2.3.5 PMP 衍生时间的筛选 按 2.3.2 项下方法试验,取水解时间为 6 h 所得的粗多糖水解溶液按 2.3.3 项下方法试验,衍生时间分别考察 50,60,70,80,90 min,精密吸取所得供试品溶液各 30 μL ,按 2.1 项下色谱条件进样分析。以供试品溶液所得 HPLC 图谱主要共有特征峰的峰面积和作为衡量指标,结果见图 2。衍生时间为 60 min 多糖趋于反应完全,确定衍生时间 60 min。

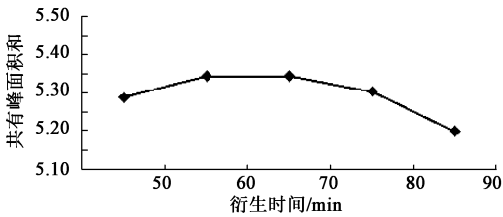


图 2 不同衍生时间对枸杞子多糖 PMP-HPLC 指纹图谱共有峰面积和的变化趋势

2.3.6 供试品溶液制备方法的确定 精密吸取 2.3.1 项下样品粗多糖溶液 500 μL ,置 5 mL 的安剂瓶中,精密加入 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TFA 溶液 500 μL ,封口后置 110 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水解 6 h,取出,放冷,水浴蒸干,残渣加入甲醇 1 mL 搅拌,蒸干以去除 TFA,如此重复至少 3 次,残渣加热水溶解,转移至 2 mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得粗多糖水解溶液。精密吸取粗多糖水解溶液 200 μL 置 5 mL 的安剂瓶中,精密加入 0.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 200 μL ,混匀,精密加入 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMP 200 μL ,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下衍生反应 60 min。取出,放冷,精密加入 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 400 μL ,涡旋混匀。移至 5 mL 离心管中,涡旋混匀。加入三氯甲烷

1 mL,涡旋混匀,离心(3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min,弃去三氯甲烷层,重复 3 次至三氯甲烷层无颜色,水层即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

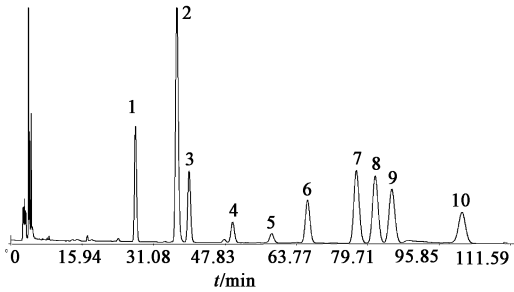
2.4.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液 30 μL ,连续进样 6 次,结果所测的指纹图谱与所得的共有模式的相似度均 >0.99 ,表明精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 30 μL ,分别在 0,3,6,12,18,24 h 进样,结果所测的指纹图谱与所得的共有模式的相似度均 >0.99 ,表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好,符合指纹图谱研究要求。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品,依法制备 6 份供试品溶液并进样分析,结果所测的指纹图谱与所得的共有模式的相似度均 >0.99 ,表明重复性良好,符合指纹图谱研究。

2.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.1 混合单糖对照品分析 精密吸取 2.2 项下混合单糖对照品溶液 30 μL ,按 2.1 项下色谱条件进样分析得到色谱图(见图 3),除氨基葡萄糖、核糖重叠外,其他 9 个成分能获得较好的分离效果。



1. 甘露糖; 2. 氨基葡萄糖 + D-核糖; 3. L-鼠李糖; 4. D-葡萄糖醛酸; 5. D-半乳糖醛酸; 6. D-葡萄糖; 7. D-半乳糖; 8. 木糖; 9. 阿拉伯糖; 10. L-岩藻糖

图 3 11 种单糖 PMP 衍生物的 HPLC

2.5.2 共有峰的确定及参照峰的选择 按 2.3.6 项下方法制备 10 批样品的供试品溶液,按 2.1 项的色谱条件进样分析,结果不同批次样品均具有基本一致的特征峰,标示出 12 个共有峰。经对照品保留时间定位及色谱峰紫外光谱分析,鉴别了 8 个共有峰。选择峰 10(D-半乳糖)为参照峰(S),分别计算各共有峰的平均相对保留时间与相对峰面积,结果见表 1。

2.5.3 相似度分析 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版),以均值法生成指纹图谱共有模式,10 批样品重叠图及共有模式图谱见图 4,5。以共有模式为对照分析样品

表 1 枸杞子多糖柱前衍生 HPLC 指纹图谱

峰号	相对保留时间 ($\bar{x} \pm s$)	相对峰面积 ($\bar{x} \pm s$)	成分
1	0.314 ± 0.001 6	0.023 ± 0.011 8	
2	0.366 ± 0.004 9	0.032 ± 0.005 6	D-甘露糖
3	0.400 ± 0.002 5	0.116 ± 0.017 9	
4	0.433 ± 0.001 4	0.342 ± 0.068 4	
5	0.487 ± 0.005 3	0.030 ± 0.013 4	
6	0.523 ± 0.007 3	0.183 ± 0.032 9	L-鼠李糖
7	0.644 ± 0.002 2	0.088 ± 0.008 8	D-葡萄糖醛酸
8	0.757 ± 0.002 5	0.228 ± 0.080 0	D-半乳糖醛酸
9	0.865 ± 0.002 7	0.118 ± 0.011 7	D-葡萄糖
10	1.000	1.000	D-半乳糖
11	1.050 ± 0.006 5	0.193 ± 0.036 9	D-木糖
12	1.104 ± 0.001 9	2.270 ± 0.163 4	D-阿拉伯糖

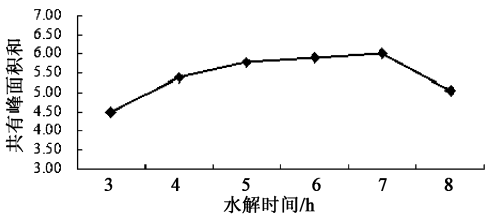
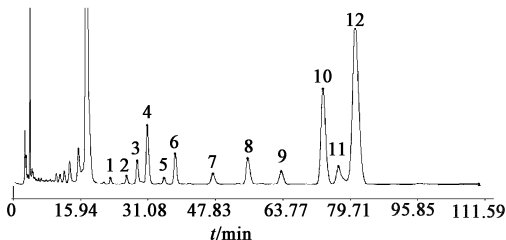


图 4 10 批枸杞子多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱重叠谱



2. D-甘露糖; 6. L-鼠李糖; 7. D-葡萄糖醛酸; 8. D-半乳糖醛酸;
9. D-葡萄糖; 10. D-半乳糖; 11. D-木糖; 12. D-阿拉伯糖

图 5 10 批枸杞子多糖酸水解柱前衍生指纹图谱共有模式

相似度,10 批样品的相似度均 > 0.99,提示样品多糖组成较稳定。

3 讨论

通过对枸杞子多糖进行 TFA 酸水解时间的考察、PMP 衍生时间考察,以共有特征峰的峰面积和作为评价指标,得到最优水解及衍生条件为水解时间 6 h 与衍生时间 60 min。通过枸杞子多糖 PMP-HPLC 分析,鉴别了 8 个已知单糖衍生物,分别为 D-甘露糖,L-鼠李糖,D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖、D-木糖、D-阿拉伯糖,其中以 D-阿拉伯糖最高,其次为 D-半乳糖、D-木糖、D-半乳糖醛酸。与文献报道^[15]的枸杞多糖中单糖阿拉伯糖含量最高的结果是一致的。

枸杞子多糖样品的相似度评价结果显示,10 批

枸杞多糖 PMP-HPLC 指纹图谱相似度非常高,提示枸杞子多糖的质量很稳定。方法学考察表明该指纹分析方法稳定可靠,重复性好,可作为枸杞子质量控制指标的参考依据之一。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:232.

[2] 齐春会,黄琳娟,张永祥,等. 枸杞糖缀合物及糖链的化学结构与免疫活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2001,15(3):185.

[3] 李晶,欧琴,张涛,等. 杞多糖对 D-半乳糖致衰老模型大鼠肝脏 DNA 修复酶 8-羟基鸟嘌呤糖苷酶表达的影响[J]. 中国临床康复,2006,10(7):102.

[4] 张鸣号,王秀玉,王秀梅,等. 枸杞多糖对小鼠移植性肝癌抑制作用的实验研究[J]. 中草药,2012,43(6):1142.

[5] 龚梦鹃,谢媛媛,邹忠杰. 枸杞对阴虚小鼠的抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):171.

[6] 于雷,王剑锋,刘丽波,等. 枸杞抗辐射损伤作用[J]. 中国公共卫生,2007,23(10):1158.

[7] 罗琼,闫俊,崔晓燕,等. 枸杞多糖对辐照大鼠生殖系统损伤拮抗作用[J]. 中国公共卫生,2011,27(10):1358.

[8] 季丽萍,许继安,郭成吉. 枸杞对耐力训练大鼠肝细胞超微结构及抗氧化能力的影响[J]. 生物医学工程学杂志,2011,28(3):501.

[9] 赵蕊,李青旺,张冰梅. 枸杞多糖 4a 改善糖尿病大鼠胰岛抵抗作用的研究[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(9):37.

[10] 张民,肖军霞,施春雷,等. 枸杞多糖 4a 对下丘脑损伤性肥胖小鼠减肥作用的探讨[J]. 营养学报,2003,25(2):196.

[11] 欧阳华学,黎源倩,肖全伟. 高效液相色谱法同时测定枸杞中单糖和低聚糖的含量[J]. 四川大学学报:医学版,2007,38(6):1040.

[12] 田丽梅,王旻. 枸杞多糖的提取分离和其组成研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(19):1603.

[13] 郭琦,孙润广,郭国赞,等. 枸杞多糖分离纯化及其结构光谱分析与显微学观察[J]. 中草药,2012,43(4):645.

[14] 马定远,陈军,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]. 分析化学研究简报,2002,30(6):702.

[15] 何晋浙,胡飞华,孙培龙,等. 枸杞多糖结构及其单糖组分的分析研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(5):48.

[责任编辑 顾雪竹]