

高效毛细管区带电泳法分析南瓜多糖的单糖组成

赵燕¹, 杨兴斌², 李晓晔¹, 孙晓莉¹, 刘鹏¹, 张生勇^{*1} (1. 第四军医大学化学教研室, 西安 710032; 2. 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062)

摘要:目的 测定南瓜多糖的单糖组成及摩尔比。方法 以 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 为单糖的柱前衍生生化试剂, 用毛细管区带电泳 (CZE) 法测定南瓜多糖的单糖组成。电泳缓冲液为 pH 10.8 的 150 mmol·L⁻¹ 硼砂水溶液; 熔融石英毛细管柱 (58.5 cm × 75 μm) 的有效长度为 48.5 cm; 分离电压 10 kV; 柱温 25℃; 3.45 kPa 压力进样, 进样时间 5 s; 二极管阵列检测器检测。结果 各单糖的检测限均低于 10 μg·mL⁻¹。南瓜多糖由木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖醛酸组成, 其摩尔比为 1.33:3.12:7.33:1.0:3.67:6.06。结论 该方法具有简单、快速、高效等优点, 可用于南瓜多糖的单糖组成测定及质量控制。

关键词: 南瓜多糖; 衍生化; 单糖组成; 毛细管电泳

中图分类号: R917.791.5 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)04-0323-04

Monosaccharide composition analysis of pumpkin polysaccharides by capillary zone electrophoresis

作者简介: 赵燕 (1974 -), 女, 陕西米脂人, 汉族, 第四军医大学化学教研室讲师, 在读博士研究生, 主要从事药物分析研究工作。Tel: (029) 84774473 - 808; E-mail: yanzhao@fmmu.edu.cn

通讯作者: 张生勇 (1939 -), 男, 陕西武功人, 汉族, 博士生导师。

ZHAO Yan¹, YANG Xing-bin², LI Xiao-ye¹, SUN Xiao-li¹, Liu Peng¹, ZHANG Sheng-yong¹ (1. Department of Chemistry, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate monosaccharide composition and the molar ratio of pumpkin polysaccharides. **METHODS** The monosaccharides as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatives were separated by capillary zone electrophoresis (CZE). The best condition was achieved with a fused silica capillary tube (58.5 × 75 μm, effective length of 48.5 cm), 150 mmol·L⁻¹ sodium tetraborate buffer (pH 10.8), a constant voltage of 10 kV at 25°C and 0.5 psi pressure injection for 5 second. **RESULTS** The lowest detection limits of the monosaccharides were below 10 μg·mL⁻¹. Pumpkin polysaccharides consisted of xylose, arabinose, glucose, mannose, galactose, glucuronic acid with the molar ratio of 1.33:3.12:7.33:1.00:3.67:6.06. **CONCLUSION** This method is simple, rapid and sensitive. The method can be applied for the analysis of quality control and monosaccharide composition in pumpkin polysaccharides.

KEY WORDS: pumpkin polysaccharides; derivatization; monosaccharide composition; capillary zone electrophoresis

南瓜多糖为南瓜中一类含量较高的活性组分,具有明显的降血糖作用,可望发展成为一种高效、低毒的降血糖药物^[1]。而多糖的质量控制是多糖药物研发中急需发展的技术,其中,多糖的单糖组成测定是多糖质控的主要指标,而目前报道的有关南瓜多糖中单糖组成的分析方法,多为薄层色谱法,该方法存在检测的灵敏度不高、分离效果差等问题。

高效毛细管电泳法是近年发展起来的一种具有高效、灵敏和低耗的分析方法,已引起药物分析界的广泛重视。本实验首次采用高效毛细管电泳法测定了南瓜多糖中的单糖组成,为南瓜多糖的质量控制提供了一种快速、简便的新方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE™ MDQ型毛细管电泳仪(Beckman公司,美国),配有二极管阵列检测器,石英毛细管柱(58.5 cm × 75 μm,有效长度 48.5 cm, Beckman公司);数据采集和谱图处理采用 Beckman System Gold 软件(Beckman公司)。320-SpH计(METTLER TOLEDO公司)。

木糖(xylose)、葡萄糖醛酸(glucuronic)和半乳糖醛酸(galacturonic acid,分析纯, Sigma公司);葡萄糖(glucose)、阿拉伯糖(arabinose)、甘露糖(mannose)、半乳糖(galactose)、鼠李糖(rhamnose)(分析纯,上海试剂二厂);三氟乙酸(CF₃COOH, Merck公司);硫酸(H₂SO₄,西安化学试剂厂);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP,北京化学试剂厂),其他试剂均为分析纯。实验用水为 MillQ 去离子水。

标准溶液的配制:精密称定内标甘露糖 250.0 mg,置于 10 mL 的量瓶中,定容。精密称定各标准单糖对照品 25.0 mg 置于 25 mL 的量瓶中,各加内标 1 mL,定容,得浓度为 1 000.0 μg·mL⁻¹的单糖对照品水溶液(含内标 1 000.0 μg·mL⁻¹)。逐级稀释后分别得 250.0, 125.0, 80.0, 40.0, 20.0 μg·mL⁻¹的 5 个浓度系列标准溶液。

1.2 南瓜多糖的提取与纯化

参考文献^[2],并做适当改进。取南瓜干品,无水乙醇回流脱脂 2 次,每次 3 h。倾出乙醇液,药渣自然吹干后用蒸馏水常压回流水提 3 次,每次 3 h。合并水提液,并减压浓缩,无

水乙醇沉淀得粗多糖。取多糖粗提取物,用适量蒸馏水溶解,并用透析袋进行透析,然后用 Sevag 法除蛋白,紫外检测无蛋白与核酸吸收后,减压浓缩,冷冻干燥,得到南瓜多糖样品。样品保存于真空干燥器中。

1.3 南瓜多糖的水解

取 20.0 mg 南瓜多糖于安瓿管中,加 3 mg 甘露糖(内标),加入 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液 2.0 mL,充 N₂封管后,在 110°C 油浴中水解 4 h。水解完后用 NaOH 溶液中和至 pH 7.0,并以去离子水稀释到 3.0 mL,离心,取上清液,得多糖水解释样品。

1.4 单糖衍生化方法

取各浓度单糖标准溶液 50 μL 或多糖水解释液 100 μL 于具塞离心试管中。分别加入 0.3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 50 μL 和 0.5 mol·L⁻¹ PMP 甲醇溶液 60 μL,混匀后置于 70°C 水浴反应 30 min,取出。冷却到室温后,加入 0.3 mol·L⁻¹ HCl 溶液中和。加入去离子水 0.5 mL,然后加入 1 mL 氯仿涡旋萃取,离心分层,小心用注射器吸去下层有机层,上层为水相,水相再重复萃取 2 次,得 PMP 衍生化样品。吸取样品 400 μL,脱气,进样进行 CZE 分析。

1.5 电泳条件

毛细管在每次使用前用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液、Milli-Q 超纯水冲洗各 2 min,再用电泳缓冲液冲洗平衡 5 min。每变换一次电泳缓冲液,均用缓冲液平衡至电流平稳(10 min)后才能进样测量。柱温 25°C;工作电压 10 kV;进样量 5 s(3.45 kPa 气压进样);缓冲溶液:150 mmol·L⁻¹ 的硼砂溶液(pH = 10.8)。样品及缓冲液均在 4°C 储存,在使用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,且临用前超声脱气处理。

1.6 单糖摩尔比的计算方法

以各单糖与内标的质量比 $X(W_i/W_s)$ 与峰面积比 $Y(A_i/A_s)$ 作线性关系图,求出各直线的斜率,即定量校正因子 $f_{i/s}$ 。

$$f_{i/s} = (W_i/W_s) / (A_i/A_s)$$

式中 A_i 、 A_s 分别为单糖和内标甘露糖的峰面积; W_i 、 W_s 分别为单糖和内标甘露糖的质量。在样品溶液中,以甘露糖

为内标, 得到各单糖的峰面积与内标的峰面积比, 乘以 $f_{i/s}$ / M_{ri} (M_{ri} 为各单糖相对于内标的分子质量), 所得的值相互之比即为摩尔比。对对照品及样品试液, 分别平行做 3 份, 每份测 3 次, 取平均值。

2 结果

2.1 电泳条件优化结果

电泳缓冲液对分离的影响: 实验结果表明, 缓冲液的酸度和浓度对分离具有明显的影响。8 种单糖对照品 PMP 衍生物的分度随硼砂缓冲液 pH 值增加而提高, 但当 pH 值过高时, 电流增加过高, 基线噪音增加, 各峰的保留时间都增加, 且出现拖尾现象, 分离度却下降, 即在缓冲液 pH 10.8 时, 得到较理想的 CZE 分离效果; 同时, 增加缓冲液中硼砂浓度, 分离度提高, 但单糖的出峰时间亦有所延长, 且电流增加较明显, 影响重现性, 而在本实验条件下, 硼砂浓度为 $150\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时分离效果最为理想。

柱温和电压对分离的影响: 分离电压是毛细管电泳的一项重要参数, 本实验分别考察 25 20 15 10 5kV 等不同 CZE 电压条件对样品分离的影响。结果表明, 随着电压降低, 电流减小, 分离度逐渐提高。但当电压降低为 5kV 时, 各糖的保留时间过长, 且 CZE 峰出现拖尾现象, 而电压为 10kV, 电流稳定, 分离效果良好; 同时柱温考察结果表明, 25°C 柱温较为理想, 大于或小于此温度, 8 种单糖对照品的 CZE 峰不能达到完全基线分离。

通过单糖对照品 PMP 衍生物 CZE 分离条件的优化, 本实验选择硼砂缓冲液浓度 $150\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 10.8 电压 10kV, 柱温 25°C 的 CZE 分离体系, 能得到较理想的分离效果, 见图 1。

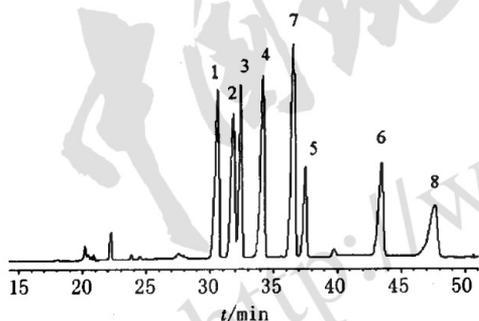


图 1 单糖对照品 PMP 衍生物的 CZE 图

Fig 1 CZE separation of PMP derivatives of monosaccharide standards

1. 木糖 (xylose); 2 阿拉伯糖 (arabinose); 3 葡萄糖 (glucose); 4 鼠李糖 (rhamnose); 5 半乳糖 (galactose); 6 葡萄糖醛酸 (glucuronic); 7. 甘露糖 (mannose); 8 半乳糖醛酸 (galacturonic acid)

2.2 多糖水解条件的优化

不同酸水解介质的考察: 分别取 200mg 南瓜多糖于三支安瓿管中, 加入 30mg 甘露糖, 加入 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CF_3COOH , H_2SO_4 以及 CF_3COOH 与 H_2SO_4 的混合酸各 2mL , 充 N_2 封管后, 在 110°C 油浴中水解 4h 对其水解样品的 PMP 衍生物进行 CZE 分析。结果表明, 在此水解条件下, H_2SO_4 、 CF_3COOH 及其混合酸对南瓜多糖样品的水解结果无显著性

影响。因此, 本实验选用价廉且不易挥发的 H_2SO_4 作为南瓜多糖的水解介质。

不同水解时间的考察: 分别取 200mg 南瓜多糖于四支安瓿管中, 加入 30mg 甘露糖, 加入 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液 2mL 后, 充 N_2 封管, 在 110°C 条件下分别水解 $2\ 4\ 6\ 10\text{h}$ 并对其水解样品的 PMP 衍生物进行 CZE 分析。结果表明, 水解 2h 的样品因水解不完全, 水解样中可能含有寡糖等中间产物, 所以无法达到有效分离、分析的目的。而对于水解 $4\ 6\ 10\text{h}$ 的样品, 考察了各单糖与内标甘露糖面积比的一致性, 结果其精密度 (RSD, $n = 3$) 均小于 3% , 说明南瓜多糖水解 $4\ 6\ 10\text{h}$ 后已水解完全, 故本实验选择该多糖的水解时间为 4h 。

2.3 检测限与定量校正因子 $f_{i/s}$

以信噪比 S/N 为 3:1 作为标准, 测得各单糖的检测限均在 $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下 (表 1); 在 $20 \sim 250\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 各单糖的定量校正因子 $f_{i/s}$ 值和精密度实验结果见表 1。

表 1 各单糖的定量校正因子 $f_{i/s}$ 和精密度实验结果

Tab 1 Experimental results of $f_{i/s}$ and precision of each monosaccharide

Monosaccharide	$f_{i/s}$	Correlation coefficient	Within-day (%)	Day-to-day (%)
Xylose	1.12	0.9991	4.8	5.0
Arabinose	1.30	0.9989	2.9	3.1
Glucose	1.61	0.9986	3.8	4.5
Rhamnose	1.62	0.9986	3.4	3.9
Galactose	3.22	0.9930	4.4	4.7
Glucuronic	1.48	0.9988	4.1	4.0
Galacturonic acid	2.23	0.9945	3.3	3.6

2.4 加样回收率与精密度的测定

以葡萄糖为例, 测定了加样回收率。分别精密量取已知高、中、低不同浓度的多糖水解液, 加入 $800\mu\text{g}$ 的葡萄糖标准溶液, PMP 衍生化后进样分析并计算, 葡萄糖的平均回收率的结果见表 2。

表 2 南瓜多糖样品组成单糖的回收率和精密度的测定结果

Tab 2 Determination of the recovery and precision of component monosaccharides in pumpkin polysaccharides

Monosaccharide	Detected sample (μg)	Added (μg)	Measured (μg)	Recovery (%)
Glucose	30.5	80.0	109.7	98.2
	100.7	80.0	182.5	102.2
	210.0	200.0	408.6	99.3

2.5 样品的 CZE 分析结果

南瓜多糖水解样品和内标的 PMP 衍生物 CZE 分离谱图见图 2。通过谱图分析和单糖摩尔比的计算可知, 南瓜多糖由木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖醛酸 6 种单糖组成, 其摩尔比为 1.33:3.12:7.33:1.0:3.67:6.06。其中, 葡萄糖与葡萄糖醛酸含量较高。

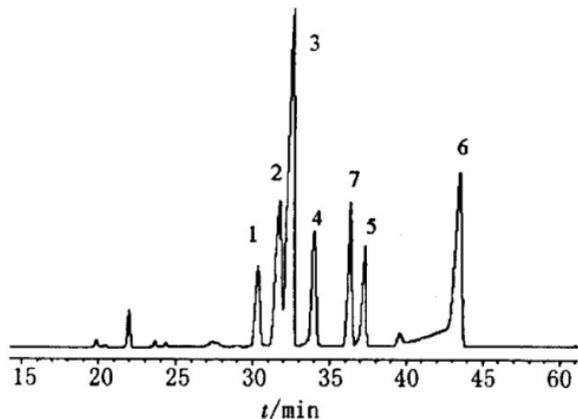


图 2 南瓜多糖水解样品 PMP 衍生物的 CZE 图 (加内标)

Fig 2 CZE separation of PMP derivatives of mannose and acid hydrolysates of pumpkin polysaccharides

1 木糖 (xylose); 2 阿拉伯糖 (arabonose); 3 葡萄糖 (glucose); 4 鼠李糖 (rhamnose); 5 半乳糖 (galactose); 6 葡萄糖醛酸 (glucuronic); 7 甘露糖 (mannose); 8 半乳糖醛酸 (galacturonic acid)

3 讨论

除了糖醛酸外,其他中性糖的电离能力非常弱,它们的 PMP 衍生物电离能力也非常弱,但单糖属于多羟基化合物,能和硼酸根形成带负电荷的络离子,可以选用硼砂液为电泳

缓冲液。在本实验条件下,各单糖硼酸阴离子络合物具有不同的淌度,可达到有效分离,该分离体系适于南瓜多糖水解产物的分离。单糖的紫外吸收很弱,在进行紫外检测前需要进行衍生化^[3]。衍生化试剂 PMP 是一种酸性化合物,可与还原糖的醛基反应,产生强烈的紫外吸收,是近年来发展的单糖衍生化新方法。本实验研究结果表明, PMP 柱前衍生化 CZE 分析南瓜多糖的方法具有简单、快速、进样量小、异构峰少等优点,可用于南瓜多糖的单糖组成测定和质量控制,并可望进一步推广应用于其他多糖类药物的分析。

参考文献

- [1] 张拥军,王兰州,姚惠源. 南瓜中降血糖活性成分的提取及其功能性质的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(6): 32
- [2] 孔庆胜,王彦英,蒋滢. 南瓜多糖的分离、纯化及其降血脂作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(3): 130
- [3] Honda S, Akao E, Suzuki S, *et al*. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. Anal Biochem, 1989, 180: 351-357.

收稿日期: 2005-02-22