

毛细管电泳法分析藏红花植物细胞多糖中单糖组成

马海宁, 华玉娟, 屠春燕*, 袁丽红, 韦 萍

(南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 以对甲氧基苯胺为衍生试剂, 采用毛细管电泳法分析了藏红花植物细胞多糖中的单糖组成。对衍生条件进行了优化, 并对毛细管分离条件进行了系统的研究。衍生反应在醋酸含量 9.5% (v/v)、80 °C 下反应 2 h 的衍生生产率最大, 衍生产物紫外检测波长 234 nm。在优化的毛细管电泳分离条件(未涂层熔融石英毛细管柱(60 cm(有效长度 50 cm) × 50 μm), 柱温 25 °C, 电压 20 kV, 使用 350 mmol/L 硼酸电解液(pH 10.21), 压力(3.447 5 kPa) 进样 5 s)下, 基线分离了 11 种结构相近的醛糖(来苏糖、木糖、核糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、纤维二糖、麦芽糖、乳糖)、酮糖(果糖)的衍生产物。应用该方法定量检测了藏红花植物细胞多糖水解物中糖的成分, 各糖的回收率为 94.3% ~ 105.4%, 相对标准偏差为 3.3% ~ 4.6%。

关键词: 毛细管电泳; 对甲氧基苯胺; 柱前衍生; 单糖; 酮糖; 多糖; 藏红花

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)03-0304-05

Analysis of monosaccharides in the saffron corm glycoconjugate by capillary electrophoresis

MA Haining, HUA Yujuan, TU Chunyan*, YUAN Lihong, WEI Ping

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering,
Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: The monosaccharides in the saffron corm glycoconjugate were separated by capillary electrophoresis (CE) coupled with pre-column derivatization. 4-Methoxyaniline was used as derivatization reagent. The derivatization and CE separation conditions were investigated. The ultraviolet detection wavelength was 234 nm. The maximum yield of this derivatization reaction was obtained under the presence of 9.5% (v/v) acetic acid at 80 °C for 2 h. An uncoated fused-silica capillary of 50 μm i. d. and 50/60 cm length (effective length/total length) was employed, and a pressure injection (3.447 5 kPa, 5 s) was applied. The baseline separation of 11 monosaccharides and disaccharides (lyxose, xylose, ribose, glucose, mannose, galactose, rhamnose, cellobiose, maltose, lactose, fructose) was reached at 25 °C, 20 kV of separation voltage and with 350 mmol/L boric acid (pH 10.21) as running buffer. The developed method has been successfully applied to quantitatively determine the components of saffron corm glycoconjugate, and the results showed that the recovery of each monosaccharide was in the range of 94.3% - 105.4%, the relative standard deviation was 3.3% - 4.6%.

Key words: capillary electrophoresis (CE); 4-methoxyaniline; pre-column derivatization; monosaccharides; ketoses; glycoconjugate; saffron

藏红花是鸢尾科番红花属的一种多年生花卉, 它可以作为食物香料以及纺织品的染料^[1]。在传统医学上, 藏红花也有多种用途, 如治疗呼吸道感染和血液疾病^[2]。近年研究表明, 藏红花的柱头提取物蛋白聚糖具有抑癌、抗氧化和调节免疫等功

能^[3], 其中单糖成分大致包含鼠李糖、岩藻糖、半乳糖、葡萄糖等^[4]。南京工业大学植物细胞实验室体外培养了藏红花柱头植物细胞, 该细胞接种于 MS (Murashige and Skoog) 固体培养基进行液体培养后, 分离提取得到了蛋白聚糖。

* 通讯联系人: 屠春燕, 硕士, 研究员, 主要研究方向为仪器分析。E-mail: tcy7341@126.com.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB724700)。

收稿日期: 2011-11-09

糖类化合物由于缺少发色团而无法直接检测,需要进行柱前衍生。目前应用较多的衍生剂为还原胺类,如对氨基苯甲酸乙酯^[5-7]、对氨基苯甲

酸^[8,9]、8-氨基苊-1,3,6-三磺酸^[10-12]、1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮^[13,14]、 α -萘胺^[15]等,其衍生机理(以葡萄糖为例)见图1。

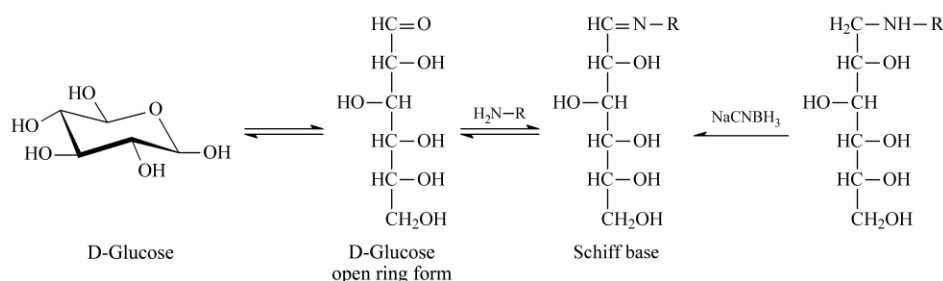


图1 还原氨类衍生剂衍生糖类化合物的反应机理(以葡萄糖为例)

Fig. 1 Derivatization of an aldose (with D-glucose as an example) with reductive ammonia

尽管这类化合物的衍生方法较为成熟,但仍然存在一些缺点,如对果糖等酮糖衍生效果不甚理想^[16,17],或衍生化后处理复杂(如需萃取)^[15]等。本研究拟寻找一种新的衍生试剂,既能简化衍生操作又能同时提高对酮糖的衍生化效率,并可用于藏红花植物细胞多糖中单糖组成的定量测定。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

P/ACE MDQ 高效毛细管电泳仪(美国 Beckman-Coulter 有限公司)。对甲氧基苯胺、纤维二糖、D-甘露糖、D-来苏糖、D-半乳糖、A-L-鼠李糖、果糖、乳糖、麦芽糖(分析纯)(国药集团化学有限公司),D-葡萄糖(中国医药上海化学试剂公司),D-木糖(中国慧兴生化试剂有限公司),D-核糖(Sigma 公司);上述试剂除果糖为生化试剂级试剂外,其他均为分析纯级试剂。其余所用试剂均为国产分析纯试剂。藏红花植物细胞多糖由南京工业大学植物细胞实验室提供。

1.2 单糖对照品的衍生化方法

准确称取各单糖对照品适量,用去离子水溶解,配制成浓度约为 60 mmol/L 的贮备液。精密量取 0.5 mL 混合糖贮备液于具塞磨口试管内,依次加入氰基硼氢化钠水溶液(238 mmol/L) 1 mL、对甲氧基苯胺的甲醇溶液(新鲜配制,600 mmol/L,内含 9.5% 乙酸) 0.5 mL,密封之后立即放入 80 °C 水浴锅中反应 2 h。待反应结束后转移至容量瓶中,加硼砂溶液(25 mmol/L) 配合反应,然后用该硼砂溶液定容至 10 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤后待用。

1.3 样品水解及衍生化

将藏红花细胞悬浮培养液离心,取其中 100 mL 离心液并加入 3 倍体积的无水乙醇,沉淀 12 h,然后

于 3500 r/min 速率下离心 15 min;离心沉淀物依次用 75% 乙醇洗涤两次、丙酮洗涤两次,用蒸馏水复溶,再用 Sevage 法除去蛋白质,得藏红花提取植物多糖。

精密称取藏红花提取植物多糖适量置于安瓿瓶中,加入 2 mL 5 mol/L 三氟乙酸,封口后置于 100 °C 烘箱中水解 2 h,冷却至室温,离心除去残渣,减压浓缩至干;用去离子水洗涤,于 55 °C 下减压浓缩至干;重复洗涤 5 次,除去残留的三氟乙酸;用去离子水定容至 1 mL,然后按 1.2 节方法进行衍生。

1.4 毛细管电泳条件

未涂层熔硅毛细管柱(河北永年光导纤维厂,内径 50 μm,总长 60 cm,有效长度 50 cm),分离电解液为 350 mmol/L 硼酸(用 2 mol/L NaOH 调节 pH 为 10.21);压力进样(3.447 5 kPa, 5 s),分离电压 20 kV,柱温 25 °C,检测波长 234 nm。毛细管在使用前依次用 0.1 mol/L NaOH、去离子水、电解液各冲洗 10 min。每次进样之间用电解液冲洗 5 min。

2 结果与讨论

2.1 衍生条件优化

2.1.1 衍生反应 pH 的选择

糖类衍生反应需在弱酸条件下进行;反应液 pH 过低,会导致氰基硼氢化钠生成 HCN。试验考察了加入不同量(5%、5.5%、7.5%、9.5%、10%(v/v)) 乙酸调节反应液的 pH 值,测定衍生产物的峰面积,发现加入 9.5% 的乙酸时衍生产物的峰面积略微高于其他,因此确定加入 9.5% 的乙酸控制反应液的 pH。

2.1.2 衍生试剂用量的优化

考察了衍生试剂和糖的物质的量比为 1~20 时糖的衍生反应效率,结果见图 2。当其比值大于 5 之后醛糖及二糖衍生产物的峰面积趋于稳定,而酮

糖衍生物的峰面积要在比值达到 15 后才趋于稳定。考虑到建立方法的目的及对后续分离的影响,选取两者的物质的量比为 15。

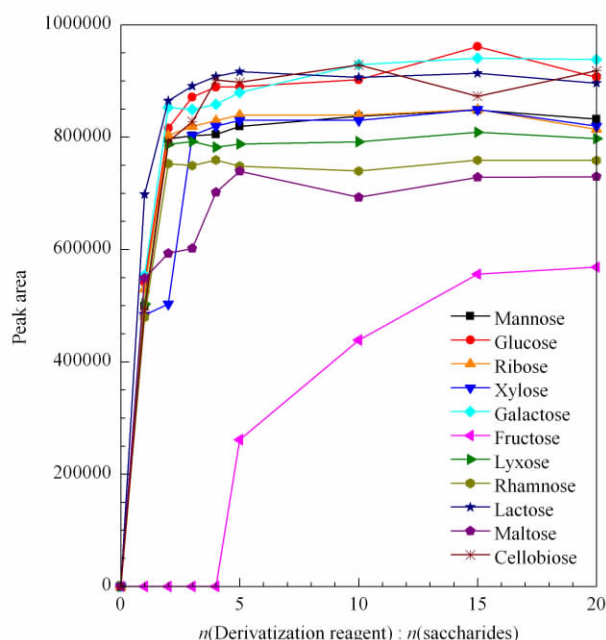


图 2 衍生试剂的加入量对糖衍生反应的影响
Fig. 2 Relationships between reagent amount and peak area of saccharides

2.1.3 衍生反应温度的选择

选取葡萄糖及果糖分别作为醛糖和酮糖代表进行试验。在 40 ~ 100 °C 范围内考察了衍生反应温度对糖类衍生效率的影响。结果发现,随着温度的升高,糖类衍生物的峰面积持续上升,但温度过高会引起溶剂挥发,从而增加实验难度及产物稳定性,因此确定在 80 °C 下进行衍生反应。

2.1.4 衍生反应时间的选择

选择葡萄糖及果糖为代表,在 15 min 到 6 h 时间内考察衍生产物峰面积的变化。试验结果表明,葡萄糖在反应 1 h 时其衍生物的峰面积达到最大,随着反应时间延长,其峰面积略有下降;而果糖在反应 2 h 时其衍生物的峰面积达到最大值。为了兼顾醛糖和酮糖的测定,选择衍生反应 2 h。

2.1.5 不同衍生试剂衍生效率的比较

使用对甲氧基苯胺(按 1.2 节方法)和对氨基苯甲酸乙酯(按最优的衍生条件^[16])对果糖进行衍生,结果(见图 3)表明,采用本研究所使用的衍生试剂(对甲氧基苯胺)所得果糖衍生物的峰面积远大于使用对氨基苯甲酸乙酯作衍生试剂时的峰面积(约大 4 倍)。

2.2 毛细管电泳分离条件的优化

2.2.1 电解液种类的选择

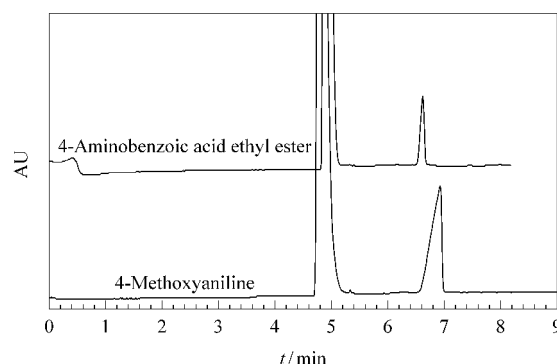


图 3 不同衍生试剂对果糖衍生效果的比较

Fig. 3 Comparison of the ketose derivatized with different reagents

Separation conditions: running buffer, 350 mmol/L sodium tetraborate; voltage, 25 kV; temperature, 25 °C.

试验对比了磷酸盐及硼酸两种常用电解液,结果发现使用磷酸盐电解液目标物的迁移时间过长、出峰拖尾并且糖类分离度较硼酸小,因此选择硼酸作为电解液进行分离条件的优化。

2.2.2 检测波长的选择

为了获得最佳的检测灵敏度,本实验以果糖为例,对糖类衍生产物进行全波长扫描,确定衍生物的最大吸收波长在 234 nm 处,因此选用 234 nm 作为检测波长。

2.2.3 电解液 pH 的选择

试验选取 200 mmol/L 硼酸作为初始电解液,从酸性(初始 pH 4.87)到碱性(pH 12.00)来考察 pH 对 6 种单糖分离的影响。结果(见图 4)表明,酸性条件下由于电渗流过小不利于分离;碱性条件下随着 pH 的增大各组分的分离得到改善。考虑到电解液的缓冲范围,最终选择 pH 为 10.21。

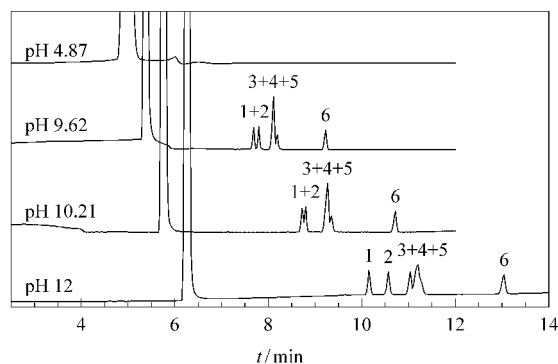


图 4 电解液 pH 对糖衍生产物分离的影响

Fig. 4 Effects of running buffer pH on resolution of saccharides

Separation conditions: running buffer, 200 mmol/L sodium tetraborate; other conditions, the same as in Fig. 3.

1. xylose; 2. ribose; 3. glucose; 4. mannose; 5. fructose; 6. galactose.

2.2.4 电解液浓度的选择

为了改善各组分间的分离,在 250 ~ 450 mmol/L 硼酸盐浓度范围内考察其对分离度及迁移时间的影响。从图 5 可以看出,随着硼酸盐浓度的增大,组分的整体迁移时间变化不大而分离度增加明显,但硼酸盐浓度大于 350 mmol/L 时迁移时间明显增长,并且峰形变宽。实验选用 350 mmol/L 硼酸盐作为分离电解液。

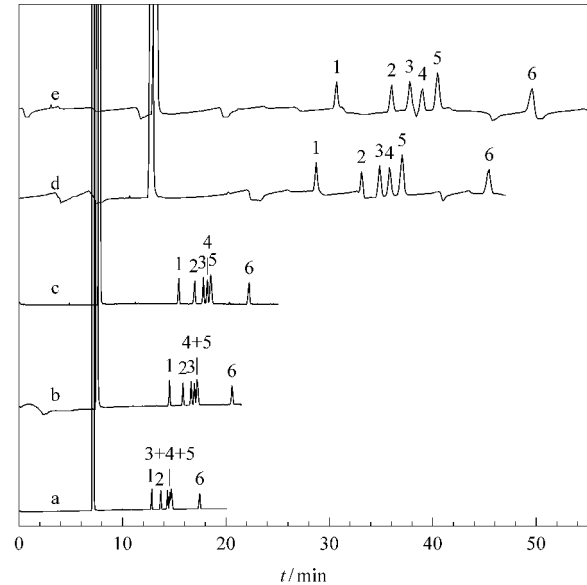


图 5 电解液浓度对糖组分分离的影响
Fig. 5 Effects of concentration of running buffer on resolution of saccharides

Concentrations of running buffer (mmol/L): a. 250; b. 300; c. 350; d. 400; e. 450.
1. xylose; 2. ribose; 3. glucose; 4. mannose; 5. fructose; 6. galactose.

2.3 方法学验证

2.3.1 衍生反应的重复性

分别在 8 支试管中加入同一浓度的糖混合液,并按 1.2 节方法进行衍生、1.4 节方法进行测定,各组峰面积的相对标准偏差(RSD)为来苏糖 2.3%,木糖 4.4%,麦芽糖 4.8%,纤维二糖 4.82%,核糖 3.92%,乳糖 4.56%,鼠李糖 3.91%,葡萄糖 4.54%,甘露糖 3.7%,果糖 4.22%,半乳糖 2.88%,均小于 5%,证明此衍生方法的重复性良好。

2.3.2 衍生产物的稳定性

将一份衍生样品避光密封保存,分别放置 0.5、1、2、4、8、16、24、48 及 60 h 后取样测定,结果显示放置 48 h 内各个衍生产物的峰面积、峰形、分离度、迁移时间均保持良好,其峰面积的 RSD 分别为来苏糖 0.35%,木糖 1.24%,麦芽糖 0.03%,纤维二糖 0.95%,

核糖 1.12%,乳糖 1.45%,鼠李糖 0.37%,葡萄糖 0.65%,甘露糖 0.89%,果糖 1.76%,半乳糖 1.32%。

2.3.3 回归方程、线性范围、相关系数与检出限

由于藏红花植物细胞多糖在经过除蛋白、水解等前处理之后为单纯的糖类,并且本衍生化反应只与样品中的糖类物质反应,所以直接将 8 种单糖、3 种二糖标准贮备液稀释成 6 个不同浓度的混合溶液,按 1.2 节方法衍生,1.4 节方法测定,以响应峰面积 y 为纵坐标,糖浓度 x (mmol/L) 为横坐标做回归方程,结果见表 1。同样将糖标准贮备液稀释、衍生、分析,得检出限(信噪比(S/N)为 3)。

表 1 糖的线性回归方程、相关系数(r^2)、线性范围和检出限(LOD)

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients (r^2), linear ranges and detection limits (LOD) of saccharides

Saccharide	Linear regression equation	r^2	Linear range/(mmol/L)	LOD ($S/N=3$) / ($\mu\text{mol/L}$)
Lyxose	$y=2.459x+1.491$	0.9995	0.0031-61.87	0.10
Xylose	$y=2.645x+0.290$	0.9991	0.0030-60.23	0.15
Maltose	$y=2.388x-1.584$	0.9992	0.0030-60.64	0.15
Cellobiose	$y=2.962x-3.927$	0.9996	0.0030-60.48	0.17
Ribose	$y=2.465x-0.243$	0.9999	0.0033-60.82	0.13
Lactose	$y=3.510x-0.159$	0.9998	0.0037-60.40	0.15
Rhamnose	$y=3.053x-0.282$	0.9998	0.0030-60.73	0.17
Glucose	$y=2.391x+0.458$	0.9999	0.0030-60.62	0.17
Mannose	$y=4.331x-0.729$	0.9991	0.0038-60.48	0.17
Fructose	$y=1.250x+0.137$	0.9992	0.0050-20.04	0.67
Galactose	$y=1.502x+0.264$	0.9998	0.0030-60.38	0.13

y : peak area of the saccharide derivative; x : concentration of the saccharide, mmol/L.

2.4 藏红花提取植物多糖组分的分析

2.4.1 藏红花植物多糖的定性检测

藏红花植物多糖按 1.3 节方法水解,1.2 节方法衍生,1.4 节方法测定,结果见图 6。实验表明藏红花多糖水解后包含核糖、葡萄糖、果糖和半乳糖 4 种单糖。

2.4.2 藏红花植物多糖的定量检测

应用建立的方法测定藏红花植物细胞多糖中所含的单糖,结果见表 2。在其中添加高(60 mmol/L,果糖为 20 mmol/L)、中(30 mmol/L,果糖为 5 mmol/L)、低(0.28 mmol/L) 3 个水平的所含单糖标准品,测定加标回收率,结果见表 2。取藏红花植物细胞多糖水解液 5 份,按 1.2 节及 1.4 节方法进行衍生和测定,得到各组峰面积的 RSD 分别为:核糖 4.1%,葡萄糖 4.6%,果糖 4.3%,半乳糖 3.3%。

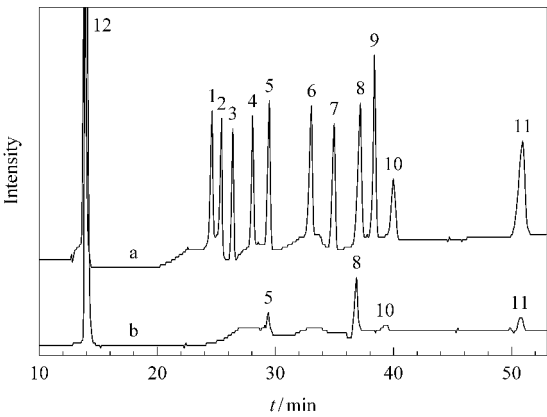


图 6 (a)糖标准和(b)藏红花植物多糖的衍生产物的毛细管电泳谱图

Fig. 6 Chromatograms of derivatives of (a) saccharide standard hydrolysates and (b) saffron corm glycoconjugate hydrolysates by capillary electrophoresis

Separation conditions: running buffer ,350 mmol/L sodium tetrabo-
rate; voltage ,25 kV; temperature ,25 ℃.

1. lyxose; 2. xylose; 3. maltose; 4. cellobiose; 5. ribose; 6. lac-
tose; 7. rhamnose; 8. glucose; 9. mannose; 10. fructose; 11. ga-
lactose; 12. derivatization reagent.

表 2 藏红花植物细胞多糖的分析结果
Table 2 Analysis results of saffron corm glycoconjugate

Saccharide	Content/(g/g)	Recovery range* /%
Ribose	0.113	95.8 – 103.7
Glucose	0.807	99.3 – 105.4
Fructose	0.00043	98.7 – 110.8
Galactose	0.018	92.7 – 98.6

* Spiked levels: 0.28 ,30 and 60 mmol/L for ribose , glucose and
galactose , 0.28 ,5 and 20 mmol/L for fructose.

3 结论

本文使用柱前衍生毛细管电泳法分离了包含酮糖在内的 11 种结构类似的单糖、二糖 ,并应用该方法分析了藏红花植物细胞多糖中的单糖组成。该方

法适用于分析糖组分复杂的体系。本方法对糖类组分分离度较好 ,可继续增加糖类种类从而进行更加复杂的糖类成分分析。

参考文献:

[1] Li X R. China Food (李祥睿. 中国食品) ,2005(20) : 48
[2] Chen Q ,Gu R Y ,Zhou D. Liaoning Journal of Traditional Chi-
nese Medicine (陈琼 ,顾任樾 ,周端. 辽宁中医杂志) ,1997 ,
24(8) : 372
[3] Abdullaev F I. Exp Biol Med ,2002 ,227: 20
[4] Julio E ,Inmaculada R ,Jose A ,et al. Biochim Biophys Acta ,
1999 ,1426: 217
[5] Anne-Laurence D ,Céline E ,Aude M ,et al. Carbohydr Polym ,
2007 ,68: 1
[6] Momenbeik F ,Khorasani J H. Acta Chromatogr ,2006 ,16: 58
[7] Santos S M ,Duarte A C ,Esteves V I. Talanta ,2007 ,72: 165
[8] Hao G T ,Chen S W ,Zhu S ,et al. Chinese Journal of Chromatog-
raphy (郝桂堂 ,陈尚卫 ,朱松 ,等. 色谱) ,2007 ,25(1) : 75
[9] Satoru K ,Rika I ,Kazuaki K. J Chromatogr A ,2006 ,1113: 332
[10] Gerd-Jan C ,Mirjam A K ,Henk A S ,et al. Electrophoresis ,
2008 ,29: 2101
[11] Mirjam A K ,Walter H H ,Edwin J ,et al. J Chromatogr A ,
2006 ,1137: 119
[12] Simone A ,Henk A S ,Bert K ,et al. J Agric Food Chem ,2010 ,
58: 2787
[13] Ling Y ,Wang Y F ,Wang Y ,et al. Chinese Journal of Pharma-
ceuticals (凌云 ,王玉峰 ,王莹 ,等. 中国医药工业杂志) ,
2008 ,39(12) : 924
[14] Guo H Z ,Jiang W Y ,Du Z H ,et al. Chinese Journal of Chro-
matography (郭怀忠 ,姜文月 ,杜智昊 ,等. 色谱) ,2011 ,29
(3) : 254
[15] Zhang H Y ,Ling J Y ,Lü P ,et al. Fudan University Journal:
Medicine Science (张海英 ,凌建亚 ,吕鹏 ,等. 复旦学报: 医
学版) ,2007 ,34(3) : 446
[16] John S ,Immanuel A ,Thomas R ,et al. Carbohydr Res ,2004 ,
339: 2037
[17] Susumu H ,Shigeo S ,Atsushi T. J Pharm Biomed Anal ,2003 ,
30: 1689