

HPSEC-ELSD 法测定固元胶囊中多糖的分子量及其分布

陈琴鸣, 刘 斌, 陈卫平

(丽水市食品药品检验所, 浙江 丽水 323000)

关键词: HPSEC-ELSD; 固元胶囊; 多糖; 分子量; 分子量分布

摘要: **目的:** 建立 HPSEC-ELSD 法测定固元胶囊(黄芪粗多糖、人参芦头)中多糖分子量及其分布的方法。**方法:** 将 Shodex Ohpak SB-805/804/803 凝胶色谱柱串联使用; 流动相: 水, 流速: 0.4 mL/min; ELSD 撞击器: 开, 漂移管温度: 50 °C, 进样体积: 30 μ L。**结果:** 标准曲线的线性范围为 $1.8 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^6$, $R^2 = 0.9972$; 重复进样: $RSD = 0.08\%$ ($n = 5$)。**结论:** 该方法稳定, 重现性好, 但是相比于 HPSEC-RID, 其结果有差异。

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2011)01-0079-03

Determination of molecular weight and molecular weight distribution of polysaccharide in Guyuan Capsule by HPSEC-ELSD

CHEN Qin-ming, LIU Bin, CHEN Wei-ping

(Lishui Municipal Institute for Food and Drug Control, Lishui 323000, China)

KEY WORDS: HPSEC-ELSD; Guyuan Capsule; polysaccharide; molecular weight; molecular weight distribution

ABSTRACT: **AIM:** To establish a method for determining the molecular weight and molecular weight distribution of polysaccharides in Guyuan Capsule (raw astraglan and Rhizomes of Ginseng) by HPSEC-ELSD. **METHODS:** The Shodex Ohpak SB-805/804/803 columns were used in series. The pure water was used as mobile phase. The flow rate was set at 0.4 mL/min. The impactor of the ELSD was made open and the temperature of the drift tube in ELSD was set at 50 °C. The sample size was 30 μ L. **RESULTS:** The standard curve was linear over the range of $1.8 \times 10^2 - 2.0 \times 10^6$, $R^2 = 0.9972$, sampling repeatedly for 5 times, $RSD = 0.08\%$. **CONCLUSION:** The method is steady with perfect reproducibility, but as compared with HPSEC-RID, this result is different.

固元胶囊是浙江维康药业有限公司研制的一种免疫调节剂, 用于化疗或放疗引起的免疫功能和造血功能障碍, 该制剂由黄芪粗多糖和人参芦头组成, 黄芪粗多糖是发挥免疫调节作用的主成分^[1], 其中分子量及其分布影响多糖功效的发挥, 是控制多糖质量的重要指标, 但是在固元胶囊的原质量标准中仅通过测定多糖总量来控制原料和成品的质量, 没有分子量及其分布、单糖组成等测定项目, 不能有效地控制固元胶囊的质量。

测定多糖分子量及其分布的方法很多, 有端基分析法, 气相渗透法, 拉乌尔法, 膜渗透压法, 凝胶渗透色谱法等^[1], 其中高效分子排阻色谱法 (High Performance Size Exclusion Chromatography, HPSEC) 具有设备和操作简单、分辨率高、分离效率高、重复

性好等优点, 为目前测定多糖分子量及其分布最常用的方法^[1]。用 HPSEC 测量多糖分子量及其分布的常用检测器有示差折光检测器 (RID) 和蒸发光散射检测器 (ELSD), 目前 RID 用的较多, 而采用 ELSD 测定分子量的文献报道很少, 本实验以 HPSEC-ELSD 法对固元胶囊中多糖分子量及其分布进行测定, 并初步分析 HPSEC-ELSD 与 HPSEC-RID 法测定多糖分子量及其分布所得结果的差异。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), Alltech-2000ES 型蒸发光散射检测器 (ELSD), 示差折光检测器 (RID), CP225D 型电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司), RE-52AA 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), TDL-40C 型离心机

收稿日期: 2010-07-22

作者简介: 陈琴鸣 (1966 -), 男, 硕士, 主任药师, 研究方向: 药品检验与质量管理。Tel: (0578) 2126848 E-mail: cqm60224@126.com

(上海安亭科技有限公司), Shodex Ohpak SB-802/803/804 色谱柱(日本昭和电工), GPC 分析软件。

1.2 试药 葡聚糖对照品(由 Sigma 公司提供), 纯净水(哇哈哈), 无水乙醇, 丙酮, 盐酸, 三氯醋酸(以上试剂均为分析纯), 氮气(含量 99.9%), 固元胶囊(批号: 20080101、20070202, 由浙江维康药业提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: 802/803/804 凝胶色谱柱三柱串联, 流动相: 水, 流速: 0.4 mL/min, ELSD 检测器条件: 漂移管温度: 50 °C, 氮气流速: 2.8 mL/min, 撞击器: 开。

2.2 标准曲线的制备 精密称取多糖对照品(D2000、D1400、D670、D410、D270、D50)各 10 mg, 分别置于 10 mL 的量瓶中, 加水制成 1 mg/mL 的溶液作为对照品溶液; 照 2.1 项下的色谱条件, 精密量取上述溶液各 30 μ L 注入色谱仪, 记录色谱图, 采用 GPC 软件, 以洗脱体积对分子量的对数进行曲线拟合, 回归方程为: $Y = -0.0996X + 10.465$, $R^2 = 0.9982$ 。

2.3 多糖的提取与精制 将固元胶囊的内容物研细混匀, 称取 10 g 加水 200 mL 微热使溶解, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加水 200 mL 重复操作, 合并上清液, 加 30% 的 H_2O_2 溶液 60 mL 于 50 °C 的水浴保温 3 h, 至溶液变为淡黄色半透明溶液后, 置水浴中边搅拌边缓慢加入等体积的 10% 的三氯醋酸, 于冰箱内过夜, 3 500 r/min 离心 6 min, 取上清液, 置于旋转蒸发仪上浓缩至约 50 mL, 缓缓加入 5 倍体积的无水乙醇, 放置冰箱过夜, 经 4 号砂芯漏斗过滤, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤 3 次, 真空干燥 5 h, 得白色固元多糖粉末(GYJN I)。

2.4 样品溶液的稳定性考察

2.4.1 样品溶液的制备 精密称取上述精制多糖约 50 mg, 置于 50 mL 的量瓶中, 加水溶解制成 1.0 mg/mL 的溶液, 用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4.2 稳定性和重复性考察 按 2.1 项下的色谱条件, 在 0 h 时重复测定 5 次, 结果表明保留时间和色谱峰理论板数的重复性良好(见表 1)。同时在隔 24 h、36 h 后, 重复测定 3 次, 结果分别为 50.448 ($RSD = 0.07$, $n = 3$)、50.447 ($RSD = 0.04$, $n = 3$), 3 次的平均值为 50.437, RSD 为 0.07%, 结果表明溶液稳定性良好。

表 1 供试品溶液的重复性考察结果

理论板数	t_R /min	$RSD/\%$
36 034	50.387	0.08
35 987	50.495	
36 013	50.406	
36 210	50.417	
36 049	50.421	

2.5 样品溶液的测定 取固元胶囊两批, 按 2.3 项下的方法精制, 按 2.4.1 项下的方法制备溶液, 按 2.1 项下的色谱条件测定, 均得 A、B、C 3 个色谱峰, 色谱图见图 1, 根据 2.2 项下制作的标准曲线, 用 GPC 软件计算多糖的数均分子量(M_n)、重均分子量(M_w)、Z 均分子量(M_z)、黏均分子量(M_v)和多分散系数(D), 结果见表 2。

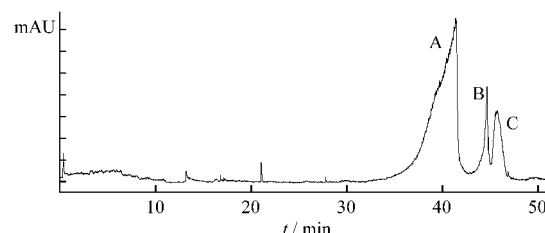


图 1 固元多糖粉末的 HPSEC-ELSD 色谱图
(批号: 20080101)

表 2 固元多糖粉末各组分 HPSEC-ELSD 测定分子量及其分布结果

批号	组分	M_n	M_w	M_z	D	归一化百分含量/%
20080101 ($n = 5$)	A	1.32×10^6	1.44×10^6	1.70×10^6	1.11	76.73
	B	1.16×10^6	1.16×10^6	1.16×10^6	1	9.75
	C	8.74×10^5	8.79×10^5	8.86×10^5	1	13.51
20070202 ($n = 5$)	A	1.56×10^6	1.68×10^6	1.80×10^6	1.11	78.24
	B	1.05×10^6	1.06×10^6	1.06×10^6	1	10.54
	C	7.79×10^5	7.83×10^5	7.87×10^5	1	11.21

2.6 用 RID 作为检测器的样品测定

2.6.1 标准曲线的制备 取 D50、D270、D410、D670、D1400 各 10 mg, 分别置于 10 mL 的量瓶中,

加水制成 1 mg/mL 的溶液作为对照品溶液, 照 2.1 项下的色谱条件, 将流动相改为磷酸盐缓冲液(pH 7.8~8.0), 检测器改为 RID, 精密量取上述对照品

溶液各 30 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,用 GPC 软件处理,以洗脱体积对分子量进行曲线拟合,回归方程为: $Y = -0.1404X + 12.673$ $R^2 = 0.9987$ 。

2.6.2 供试品溶液的制备及测定法 取 2.5 项下的方法精制的多糖 2.0 mg,加 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液 0.5 mL 使溶胀,研磨溶解,用 0.5 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 约为 7.5,加水 2.0 mL,摇匀滤过,精密取续滤液 30 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,采用 GPC 软件计算分子量,结果见表 3 和图 2。

表 3 固元多糖粉末各组分 HPSEC-RID 测定分子量及其分布结果表

样品	Mn	Mw	Mz	D
20080101	4.66×10^3	1.70×10^4	4.89×10^4	3.71
20070202	5.24×10^3	1.87×10^4	5.02×10^4	3.56

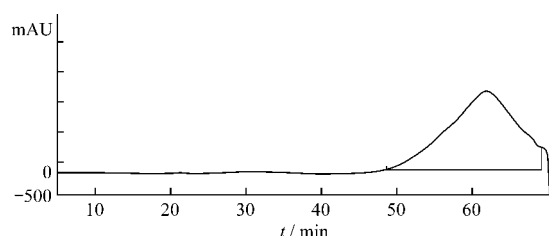


图 2 固元多糖粉末的 HPSEC-RID 色谱图
(批号:20080101)

3 结果与讨论

3.1 固元胶囊多糖的提取纯化 多糖的制备纯化需经过提取、脱色、去蛋白、纯化等较复杂的步骤,不同的方法对分析结果有一定的影响^[1]。经比较,采用水提取,过 H_2O_2 脱色,三氯醋酸去蛋白等方法,制备的固元多糖沉淀形状、色泽好,经 UV、多糖含量测定等检查,去蛋白效果好,多糖提取效率也高,方法稳定、重复性好,易于实验室质量控制操作。

3.2 HPSEC-ELSD 法测定条件的选择

3.2.1 色谱柱 固元胶囊多糖的组成主要为黄芪多糖,分子量分布范围为万到十万级^[1],而采用 HPSEC-ELSD 方法试验发现其分子量的测定值超过百万,因此笔者采用 804/803/802 三柱串联分析,希望达到一次性分析百万及其以下数量级的分子量分布的目的。

3.2.2 流动相与流速 HPSEC 测定分子量多采用盐或缓冲溶液等离子强度较大的溶液作为流动相,

以增加多糖的溶解度,减小黏度,并维持多糖的分子形状。但在采用 ELSD 检测器的色谱系统中如果使用盐溶液做流动相,本底吸收将会特别高,实验中曾采用醋酸铵溶液作流动相,结果无法检测,只能改用纯水作为流动相。由于凝胶色谱柱对压力敏感,实验中选用 0.4 mL/min 的流速,将柱压控制在合适的范围内。

3.3 HPSEC-ELSD 与 HPSEC-RID 比较 HPSEC 为目前最常用的分析多糖分子量与分子量分布以及检测多糖纯度的方法,其检测器多数采用 RID,但随着近年来 ELSD 的不断普及,其用于多糖分析的也不断增多^[1]。《中国药典》2000 年版在多糖的分子量分布的测定法中规定用 RID,而在 2005 年版及 2010 版中均不作规定。本试验结果表明,固元多糖用 ELSD 检测均为 3 个色谱峰,而用 RID 检测仅为一个峰(图 1 和图 2),ELSD 的分离效果比 RID 要好,但两者分子量测定结果有一定的差异,ELSD 的结果明显比 RID 高,这可能与所用流动相及测定原理不同有关,ELSD 仅用水作流动相,多糖分子间因氢键、静电等作用易发生缔合而成聚集态,保留值减小^[1],具体差异尚待进一步分析研究。但多糖分子量本身为一相对概念,不同方法测定结果存在差异。

本实验采用的 HPSEC-ELSD 法具有稳定性、重复性好,灵敏度高,可用于固元胶囊中多糖的分子量测定和纯度检查。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理局标准(试行) YBZ04242005 [S].
- [2] 丁 黎. 药物色谱分析 [M]. 北京:人民卫生出版社,2008.
- [3] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规程 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:114.
- [4] 温燕梅. 黄芪的化学成分研究进展 [J]. 中成药,2006,28(6):879-883.
- [5] 刘 敏,陈琴鸣. 多糖的制备技术及分析方法的研究现状 [J]. 中国药师,2009,(8):1142-1144.
- [6] 陈琴鸣,刘文英. HPLC-ELSD 在中药糖类分析中的应用 [J]. 中草药,2008,39(6):955.
- [7] 戴 军,尹鸿萍,陈尚卫,等. 杜氏盐藻多糖的高效体积排阻色谱的保留特性及其分析方法的研究 [J]. 色谱,2006,24(6):560-565.