

表 2 牛膝样品含量测定结果

Tab 2 The content of *Achyranthes bidentata* Bl. test

| 编号 | 衍生前测定含量/% | 衍生后测定含量/% |
|----|-----------|-----------|
| 1  | 0.19      | 0.18      |
| 2  | 0.19      | 0.20      |
| 3  | 0.18      | 0.19      |

4 讨论

本试验成功建立了牛膝中齐墩果酸的柱前衍生化含量测定方法,系统考查了衍生反应条件,确定了供试品的制备方法,以 HPLC 测定,齐墩果酸转化率接近 100%,满足分析测定要求,衍生后紫外吸收由 210 nm 红移至 254 nm,提高了分离选择性和检测灵敏度,大幅度改善了齐墩果酸的检测效果,实现了对样品中干扰物质的分离和齐墩果酸的定量分析。该方法可用于牛膝中齐墩果酸的定量分析,为牛膝药材的质量评价提供依据。

本试验以石油醚为溶剂对牛膝进行脱脂处理,将石油醚脱脂液水解后测定,结果未检测到齐墩果酸,说明脱脂处理中齐墩果酸未损失。本试验分别采用索氏提取法、超声或回流的方法进行提取,并经 HPLC 测定,结果 3 种提取方法效率相近,但由于超声提取更加便捷且杂质较少,所以选择超声作为齐墩果酸的提取方法。

根据衍生化反应机理,本试验选用二氯甲烷为反应溶剂,对硝基苯甲酰氯为衍生化试剂,对

齐墩果酸分子中的羟基进行苯甲酰化。通过实验考查确定了最佳反应条件为:齐墩果酸-对硝基苯甲酰氯=1:20,封口,超声 60 min,静置 2 h,加水超声 60 min,静置 1 d。齐墩果酸分子中得羧基也可与对硝基苯甲酰氯反应生成酸酐,而酸酐不稳定,遇水还原为羧基,故反应完毕后,向衍生化溶液中加水,超声 60 min,静置 1 d,以使酸酐水解。

衍生反应为酰化反应,为防止对硝基苯甲酰氯遇水分解,需无水操作,所以反应容器应充分干燥,反应溶剂需要除水。

REFERENCES

[1] Ch.P (2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005: 49.  
[2] MENG D L, LI X, XIONG Y H, et al. Study on the chemical constituents of *Achyranthes bidentata* Bl. [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2002, 19(1): 27-30.  
[3] WANG G S, ZHOU X P, YANG X H, et al. Study on the acidic triterpenoid saponins of *Achyranthes bidentata* Bl. [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2004, 14(1): 40-42.  
[4] LI J, BI Z M, XIAO Y J, et al. Study on triterpenoid saponins from *Achyranthes bidentata* Bl. [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2007, 42(3): 178-180.  
[5] MENG D L, ZHANG Y, LI N, et al. Isolation and identification of constituents from *Achyranthes bidentata* Bl. [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2008, 25(5): 360-363.

收稿日期: 2009-07-17

柱前衍生化 HPLC 分析蒲公英多糖的单糖组成

高金波, 孙丽娜(佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 目的 合理优化衍生方法测定蒲公英多糖中单糖的组成及摩尔比。方法 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生,用反相高效液相色谱法进行测定。色谱条件为: ZORBAX-C<sub>18</sub> 柱;流动相: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17);流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长: 245 nm;进样量: 20 μL;柱温: 室温。结果 蒲公英多糖由 D-鼠李糖、葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖和 D-阿拉伯糖组成,以不同方法提取的各单糖含量的摩尔比为:水提取法, Rha: Glc: Gal: Ara=0.088: 0.500: 0.190: 0.340;超声提取法, Rha: Glc: Gal: Ara=0.050: 0.350: 0.080: 0.320;酶提取法, Rha: Glc: Gal: Ara=0.270: 0.630: 0.330: 0.460;超声协提取同酶法, Rha: Glc: Gal: Ara=0.078: 0.550: 0.130: 0.170。结论 改进后的衍生化方法和等度洗脱的色谱方法具有操作简单、快速、重复性好等特点,可用于蒲公英多糖中单糖组成和摩尔比的测定。

关键词: 柱前衍生化; 高效液相色谱法; 单糖; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮

中图分类号: R917.10; R917.791

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)01-0053-04

基金项目: 黑龙江省卫生厅科研课题(2007-510)

作者简介: 高金波, 女, 教授 Tel: (0454)6557559 E-mail: gaojinbo2001@163.com

# Analysis on Monosaccharide Composition of Taraxacum Polysaccharides by Pre-column Derivatization HPLC

GAO Jinbo, SUN Lina(College of Chemistry and Pharmacy of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To optimize the derivative method reasonably and detect monosaccharide components and molar ratio of taraxacum polysaccharides. **METHODS** Pre-column derivative reagent was 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP), monosaccharide composition and molar ratio of taraxacum polysaccharides were detected by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Chromatographic conditions: ZORBAX-C<sub>18</sub> column; mobile phase: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH 6.7)-acetonitrile (83 : 17); velocity: 1 mL·min<sup>-1</sup>; detection wavelength: 245 nm; injection volume: 20 μL; column temperature: room temperature. **RESULTS** Taraxacum polysaccharides was composed of D-rhamnose, glucose, D-galactose D-xylose, D-Arabinose. The molar ratio of taraxacum polysaccharides which was extracted by different means was as follows: water extraction method, Rha : Glc : Gal : Ara=0.088 : 0.500 : 0.190 : 0.340; ultrasonic extraction method, Rha : Glc : Gal : Ara=0.050 : 0.350 : 0.080 : 0.320; cellulose extraction method, Rha : Glc : Gal : Ara=0.270 : 0.630 : 0.330 : 0.460; synergistic ultrasonic extraction and cellulose extraction, Rha : Glc : Gal : Ara=0.078 : 0.550 : 0.130 : 0.170. **CONCLUSION** The improved derivative method and the chromatographic conditions of isocratic elution were simple, rapid and with a good reproducibility, and can be used to detect monosaccharide components and molar ratio of taraxacum polysaccharides.

**KEY WORDS:** pre-column derivatization; HPLC; monosaccharide; 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone

蒲公英为菊科蒲公英属多年生草本植物, 现有的研究表明蒲公英的化学成分不仅有挥发油、黄酮类、三萜类、香豆精类和倍半萜内酯类, 而且富含甾醇、棕榈酸和多糖<sup>[1]</sup>。近年来, 蒲公英的化学成分和药理作用已得到深入研究, 但是关于蒲公英多糖的单糖组成却鲜有报道, 而多糖的单糖组成分析是进行多糖质量控制和获取多糖基本信息的重要环节。本试验采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生, 通过对衍生条件的合理优化, 进行高效液相色谱法测定单糖的组成; 在测定中对高效液相色谱法也进行了适当简化, 改变以往的梯度洗脱<sup>[2-5]</sup>, 而采用等度洗脱方法, 测定了 4 种提取方法得到的多糖中单糖的摩尔比。

## 1 材料

蒲公英根(河北省安国市京兴药业有限责任公司, 由佳木斯大学药学院生药学教研室刘娟教授鉴定为蒲公英根); Agilent 1100 化学工作站(美国 Agilent 公司); 三氟乙酸(TFA, 纯度≥99%)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, 在使用之前用色谱甲醇重新结晶 2 次)、葡萄糖(Glc, ≥99%)、D-鼠李糖(Rha, ≥99%)、D-半乳糖(Gal, ≥99%)D-木糖(Xyl, ≥99%)、D-阿拉伯糖(Ara, ≥99%)均购于国药集团化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈(色谱纯)购于天津市光复精细化工研究所; 其它实验试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 多糖的提取方法

蒲公英根经粉碎后用石油醚、80%的乙醇回流脱脂, 脱去低聚糖后的溶液于 50 °C 热风干燥后称取 10 g 用各种方法进行提取, 提取液浓缩至总体积的 1/3, 然后用 Sevage 法除去蛋白, 再经过大孔吸附树脂进行脱色, 95%的乙醇沉淀, 低温干燥后得到蒲公英多糖粗品。

**2.1.1 水提取法** 通过正交实验确定水提取法的最佳条件为: 料水比为 1 : 30, 提取温度为 80 °C, 提取时间为 3 h, 提取次数 2 次。

**2.1.2 超声波提取法** 由单因素实验和正交实验确定超声波提取的最佳工艺条件为: 超声功率 60 W, 料液比 1 : 40, 超声处理的时间 30 min, 提取温度为 60 °C。

**2.1.3 酶提取法** 通过单因素实验和正交实验确定酶提取法的最佳提取工艺为: 纤维素酶用量为 0.1%, 酶解温度为 60 °C, 酶解时间为 40 min, 溶液 pH 值为 4。

**2.1.4 超声波协同酶提取法** 超声波协同酶提取法是在超声波提取的基础上添加纤维素酶, 以料液比 1 : 40 为固定条件, 进行正交实验, 得到提取的最佳工艺为: 提取温度为 50 °C, pH 值为 5.0, 所加的酶量为底物的 3%, 提取时间为 25 min。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83 : 17); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 245 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。

## 2.3 混合标准单糖的衍生

分别精密称取葡萄糖 0.039 6 g、D-半乳糖 0.036 3 g、D-木糖和 D-阿拉伯糖各 0.030 0 g、D-鼠李糖 0.036 4 g，溶于 10 mL 的氨水中，取该溶液 100  $\mu$ L 与 100  $\mu$ L 的 PMP/甲醇溶液(0.5 mol·L<sup>-1</sup>) 混合，在 70  $^{\circ}$ C 下反应 30 min，取出后冷却至室温，用 1 mL 的氯仿萃取，充分振荡后除去有机相，重复 3 次。水溶液经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤，用水稀释一定倍数后，进行 HPLC 分析。

## 2.4 蒲公英多糖的衍生

**2.4.1 蒲公英多糖的水解** 准确称取水提取法、超声波提取法、酶提取法、超声波协同酶法提取的蒲公英多糖样品 5 mg，加入 2 mol·L<sup>-1</sup> TFA 溶液 1 mL 封管，110  $^{\circ}$ C 水解 2 h，得到多糖的水解样品溶液。

**2.4.2 蒲公英多糖水解液的衍生** 取多糖水解液 100  $\mu$ L，按“2.3”项下方法进行衍生化处理。

## 2.5 标准曲线的制备

取衍生后的混合标准溶液 1, 4, 6, 8, 10, 20  $\mu$ L 分别进行 HPLC 分析。以各种单糖的物质的量为横坐标，以各种单糖峰面积的积分值为纵坐标，绘制标准曲线。结果见表 1。

表 1 各种标准单糖的标准曲线

Tab 1 Standard curve of standard monosaccharide

| 单糖     | 标准曲线                  | 相关系数    | 线性范围/mmol        |
|--------|-----------------------|---------|------------------|
| 葡萄糖    | $Y=91\ 167X-121.22$   | 0.997 9 | 0.007 02~0.035 1 |
| D-鼠李糖  | $Y=83\ 291X-2.634\ 6$ | 0.996 8 | 0.001 39~0.015 2 |
| D-半乳糖  | $Y=68\ 207X-16.580$   | 0.996 7 | 0.001 72~0.017 2 |
| D-木糖   | $Y=86\ 055X-1.142\ 2$ | 0.996 5 | 0.001 73~0.017 3 |
| D-阿拉伯糖 | $Y=115\ 542X-368.21$  | 0.998 2 | 0.006 62~0.033 1 |

## 2.6 仪器精密度试验

取标准单糖混合液，重复进样 5 次，记录峰面积。得到 D-鼠李糖、葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为：1.21%，2.49%，3.10%，2.65%，2.65%，表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

多糖水解液衍生化后的溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 进样，记录峰面积。得到 D-鼠李糖、葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为：4.91%，1.61%，2.09%，3.21%，2.56%，表明样品在 12 h 内稳定。

## 2.8 重复性试验

取蒲公英根多糖 6 份，依照前面的衍生化和

色谱条件，然后取 6 份溶液分别进样 6 次，计算各单糖峰面积的 RSD。得到 D-鼠李糖、葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为：2.71%，3.97%，3.84%，4.35%，3.41%。

## 2.9 回收率试验

取葡萄糖、D-鼠李糖、D-半乳糖、D-木糖和 D-阿拉伯糖各约 40mg，溶解 10.00 mL 氨水中，取 100  $\mu$ L 6 份，以 1 份为空白，其余 5 份分别加不同量的蒲公英多糖水解液，按“2.3”项下方法进行衍生后进样，记录峰面积，计算平均回收率。结果见表 2。

表 2 单糖的回收率(n=5)

Tab 2 Recovery of monosaccharide (n=5)

|      | 加标量      | 加样量      | 测得量      | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD/% |
|------|----------|----------|----------|--------|---------|-------|
| 鼠李糖  | 0.038 76 | 0.025 87 | 0.064 58 | 99.87  | 96.8    | 2.73  |
|      | 0.038 76 | 0.025 87 | 0.063 21 | 96.34  |         |       |
|      | 0.038 76 | 0.051 74 | 0.087 79 | 93.01  |         |       |
|      | 0.038 76 | 0.038 81 | 0.076 07 | 96.13  |         |       |
| 葡萄糖  | 0.040 25 | 0.182 40 | 0.220 10 | 93.67  | 98.2    | 3.60  |
|      | 0.040 25 | 0.182 40 | 0.221 80 | 97.89  |         |       |
|      | 0.040 25 | 0.364 80 | 0.405 10 | 100.12 |         |       |
|      | 0.040 25 | 0.273 70 | 0.312 60 | 96.65  |         |       |
|      | 0.040 25 | 0.273 70 | 0.315 10 | 102.86 |         |       |
| 乳糖   | 0.039 68 | 0.043 12 | 0.081 89 | 97.71  | 96.2    | 2.89  |
|      | 0.039 68 | 0.043 12 | 0.081 92 | 97.79  |         |       |
|      | 0.039 68 | 0.086 23 | 0.125 30 | 98.47  |         |       |
|      | 0.039 68 | 0.086 23 | 0.122 60 | 91.66  |         |       |
|      | 0.039 68 | 0.064 68 | 0.102 50 | 95.31  |         |       |
| 木糖   | 0.041 02 | 0.004 38 | 0.043 48 | 95.32  | 95.8    | 2.30  |
|      | 0.041 02 | 0.004 38 | 0.043 04 | 94.25  |         |       |
|      | 0.041 02 | 0.008 76 | 0.047 17 | 93.64  |         |       |
|      | 0.041 02 | 0.006 57 | 0.046 94 | 98.42  |         |       |
|      | 0.041 02 | 0.006 57 | 0.046 73 | 97.90  |         |       |
| 阿拉伯糖 | 0.038 64 | 0.056 38 | 0.093 62 | 96.38  | 97.5    | 1.98  |
|      | 0.038 64 | 0.056 38 | 0.093 66 | 96.48  |         |       |
|      | 0.038 64 | 0.112 70 | 0.151 70 | 100.93 |         |       |
|      | 0.038 64 | 0.112 70 | 0.150 40 | 97.57  |         |       |
|      | 0.038 64 | 0.084 59 | 0.121 80 | 96.30  |         |       |

## 2.10 蒲公英多糖样品的分析

将混合单糖标准品的图谱与蒲公英粗多糖的图谱进行对照，可以确定蒲公英粗多糖都含有 D-鼠李糖、葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖 5 种中性单糖，由于 D-木糖在粗多糖中的含量

甚少,无法准确计算。其余 4 种单糖的摩尔比如下:水提取法, Rha : Glc : Gal : Ara=0.088 : 0.500 : 0.190 : 0.340; 超声提取法, Rha : Glc : Gal : Ara=0.050 : 0.350 : 0.080 : 0.320; 酶提取法, Rha : Glc : Gal : Ara=0.270 : 0.630 : 0.330 : 0.460; 超声协提取同酶法, Rha : Glc : Gal : Ara=0.078 : 0.550 : 0.130 : 0.170。

### 3 讨论

#### 3.1 单糖标准品 PMP 衍生物的 HPLC 分离

为实现蒲公英粗多糖各组成单糖的高效分离,本试验对蒲公英粗多糖可能含有的 Glc、Rha、Gal、Xyl、Ara 5 种标准单糖 PMP 衍生物的高效液相色谱分离条件进行了优化,结果表明,磷酸盐缓冲液( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ )的 pH 为 6.7,采用等度洗脱的分离模式能够使 5 种单糖衍生物得到较理想的分离。

#### 3.2 衍生方法与处理过程的优化

已报道的方法中<sup>[3,6-9]</sup>,多采用以 NaOH 溶液(低温、密闭保存)作介质,取样品溶于该溶液,然后取该溶液与 PMP/甲醇溶液混合,在 70℃ 下反应 30 min。冷却至室温后,加入与 NaOH 溶液相同量的 HCl 进行中和,真空干燥至干,用水及氯仿溶解充分震荡后除去有机相,重复 3 次。水相溶液经离心后,用水稀释,进行 HPLC 分析,见图 1。

本试验尝试了用氨水作介质对单糖进行 PMP 衍生,衍生化后无需对反应后的溶液进行中和,直接用氯仿萃取,用水稀释后进行 HPLC 分析,见图 2。这样既简化了实验步骤、缩短样品的处理时间,又避免了干燥后的衍生物由于难溶而引起的误差,使得定量更加准确。

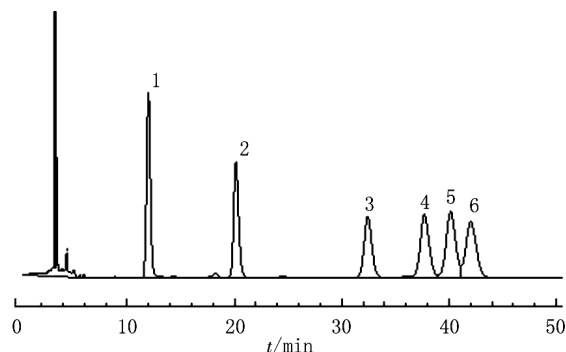


图 1 单糖标准品 PMP 衍生物干燥过程图

1-PMP; 2-Rha; 3-Glc; 4-Gal; 5-Xyl; 6-Ara

Fig 1 Chromatogram of dry PMP derivatives of monosaccharide standard

1-PMP; 2-Rha; 3-Glc; 4-Gal; 5-Xyl; 6-Ara

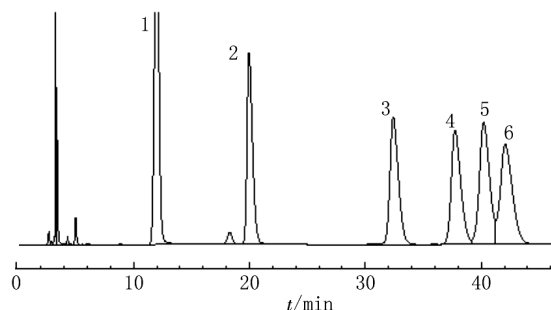


图 2 单糖标准品 PMP 衍生物无干燥过程图

1-PMP; 2-Rha; 3-Glc; 4-Gal; 5-Xyl; 6-Ara

Fig 2 Chromatogram of PMP derivatives without drying of monosaccharides standard

1-PMP; 2-Rha; 3-Glc; 4-Gal; 5-Xyl; 6-Ara

图 1 中各单糖的响应值都较小,而图 2 中各单糖的响应值都较大,这说明经过干燥过程单糖的损失较多,未经干燥过程单糖的损失相对较少。这也说明优化的实验条件不但可缩短时间,而且还可减少损失。

### REFERENCES

- [1] TUO H S. Immunity Chinese Pharmacy (免疫中药学) [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999: 188-191.
- [2] DAI J, ZHU S, TANG J, et al. PMP pre-column derivatization high performance liquid chromatography analysis of Dunaliella salina monosaccharide composition of polysaccharide [J]. J Instrum Anal (分析测试学报), 2007, 26(2): 206-210.
- [3] MA D Y, CHEN J, LI P, et al. Pre-column derivatization high performance liquid chromatography analysis of the monosaccharide composition of polysaccharides [J]. Anal Chem (分析化学), 2002, 30(6): 702-705.
- [4] HAO G T, DAI J, CHEN S W, et al. Prunella polysaccharide separation, purification and structural analysis [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2007, 19(4): 591-594.
- [5] RAO J H, LIU W Y, JIANG J Y. Pre-column derivatization high performance liquid chromatography analysis of epimedium polysaccharide in the composition of monosaccharide [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2007, 18(2): 366-367.
- [6] XU J, ZHANG L Y, LI T, et al. Comparison of high performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography for monosaccharide analysis by precolumn derivatization [J]. Chromatogram, 2003, 21(4): 363-366.
- [7] SUZUKI S, TANAKA R, TAKADA K. Analysis of sialo-N-glycans in glycoproteins as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2001, 910(2): 319-329.
- [8] 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(2): 351-357.
- [9] SHEN X D, PERREAUL H. Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1998, 811(1): 47-59.

收稿日期: 2009-07-14