

高效液相色谱法测定龙眼肉多糖的单糖组成*

Analysis of Monosaccharide Composition in Polysaccharide of Arillus Longan by High Performance Liquid Chromatography

黄岛平, 陈秋虹, 陈建红, 徐 慧

HUANG Dao-ping, CHEN Qiu-hong, CHEN Jian-hong, XU Hui

(广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:为了研究分析龙眼肉多糖的单糖组成, 采用水提醇沉法提取龙眼肉多糖, 用三氟乙酸水解多糖成单糖, 经衍生化试剂 1-苯基-3-甲基-吡唑啉酮(PMP)衍生化后, 利用高效液相色谱法(HPLC)分析单糖的 PMP 衍生物。结果表明, 龙眼肉多糖由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖 7 种单糖组成。龙眼肉多糖是一种酸性杂多糖, 其中以葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸为主。

关键词:高效液相色谱法 单糖 组成 多糖 龙眼肉

中图分类号:O657.72 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2010)03-0234-03

Abstract: The monosaccharide composition of polysaccharides from Arillus Longan was Analyzed. The polysaccharides was extracted by hot distilled water, precipitated by alcohol, and formed monosaccharides by TFA hydridzation. The hydrolysate reacted with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) to produce the PMP derivatives that were analyzed by HPLC. The Polysaccharides from Arillus Longan was comprised mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose and xylose arabanose. The polysaccharides from Arillus Longan was an acid heteropolysaccharide. Scientific data of polysaccharides from Arillus Longan for further development and research is provided.

Key words: high performance liquid chromatography, monosaccharide, composition, polysaccharides, Arillus Longan

龙眼又名桂圆, 益智, 属无患子科龙眼属植物果实, 是我国南方特产水果, 亦是广西特产。龙眼肉是药食两用滋补佳品, 被卫生部列为“既是食品又是药品的物品名单”中。龙眼鲜食质地爽脆、口味清甜、营养丰富; 经晒干或烘干得到的龙眼肉是一味传统中药, 性甘、温、可补益心脾、养血安神, 用于治疗气血不足、心悸怔忡、健忘失眠、血虚萎黄等症^[1]。龙眼肉主要含有多糖、葡萄糖、栲精、栲素、丹宁、五环三萜类、脑苷脂成分, 龙眼三萜 A 和龙眼三萜 B, 38 种挥发成分及维生素 B₁、B₂、P、C, 具有良好的营养保健

价值^[2]。多糖具有抗肿瘤、抗炎、抗凝血、抗病毒、抗衰老、抗辐射、降血脂和调节机体免疫等药效^[3~6]。由于多糖的活性与它的结构有重复关系, 目前有关龙眼多糖的单糖组成研究尚未见报道。因此, 本研究从龙眼肉中提取分离水溶性多糖, 随后采用高效液相色谱技术分析龙眼肉多糖的单糖组成, 为进一步开发利用龙眼产品提供了科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:全自动高效液相色谱系统配紫外检测器(美国 waters 公司出品); C18 烷基键合柱, 匀浆机, 超速冷冻离心机, 电热鼓风干燥箱, 数显双列六孔水浴锅 KQ5200, 电子天平等。试剂: 三氟乙酸(TFA), 分析纯; 1-苯基-3-甲基-吡唑啉酮(PMP), 分析纯;

收稿日期: 2010-04-30

作者简介: 黄岛平(1965-), 男, 高级工程师, 主要从事色谱分析、化学分析和天然产物的研究与开发工作。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0815009-2-5)资助。

磷酸二氢钾,分析纯;氢氧化钠,分析纯;甲醇,色谱纯;乙腈,色谱纯;甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、半乳糖醛酸(GlaUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara),Sigma 试剂。龙眼为市售石硤龙眼品种。

1.2 龙眼肉多糖的制备

取新鲜龙眼果肉,加水以 1 : 1 的比例混合,用匀浆机打成浆,后离心(8000r/min)8min,所得上清液加 4 倍量无水乙醇,待形成的混悬液自然沉降完全后,弃去上清液,反复醇沉 2 次,下层沉淀物离心(8000r/min) 8min,粗多糖在离心管底部,倾出上清液,将离心管置于 60℃ 烘箱内干燥至干,即为龙眼肉多糖。

1.3 龙眼肉多糖的水解

精确称取龙眼肉多糖 50.0mg 于安瓿中,加入 0.6mol/L TFA 5ml,抽真空封管,置于 102℃ 烘箱内水解 6h,冷却至室温,转移到 10ml 容量瓶中,用 1mol/L NaOH 溶液中和至 pH 值 7.0,蒸馏水定容至刻度,离心取上清液用于 PMP 衍生化。

1.4 标准品(单糖)和样品衍生物的制备

PMP 在使用前用色谱纯甲醇重结晶 2 次。衍生化方法参考文献[6]Rha、GlaUA、Glc、Gal、Xyl、Ara 7 种单糖标准样品分别配制成各 5.0mg/ml 贮备液,由上述 7 种单糖标准样品溶液各吸取 1.0ml 混合而配成各 0.5mg/ml 的混合标准溶液。吸取混合标准溶液和 1.3 制备得到的样品溶液 0.2ml,置于不同的试管中,依次加入 0.2ml 0.5mol/L 的 PMP 甲醇溶液和 0.2ml 0.3mol/L NaOH 溶液混匀,70℃ 水浴加热 30min,并不时振摇,取出在室温下冷却 10min,用 0.3ml 0.2mol/L HCl 中和,加入 5.0ml 氯仿萃取,充分振荡。上层为水相,加水补充至 2ml,混匀,过 0.45μm 膜。

1.5 色谱条件

采用 waters2996PAD 色谱系统,色谱柱 Symmetry shield TM RP18 (4.6mm × 250mm, 5μm)。检测波长 250nm,柱温为室温,流动相:磷酸缓冲溶液(0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液,pH 值 6.8)和乙腈,流速 1.0ml/min,梯度模式:时间梯度 0min → 5min → 10min → 30min → 35min,相应的磷酸缓冲溶液浓度:83% → 82% → 81% → 80% → 83%。

2 结果与分析

2.1 水解条件选择

多糖需要在酸性条件发生水解。根据文献[6]在

温度为 102℃,水解时间 8h 考察 TFA 不同浓度(0.5mol/L、0.6mol/L、0.8mol/L、1mol/L)的结果是,TFA 浓度为 0.6mol/L 条件下,水解完成,单糖衍生物的含量最高而且峰形和分离度较好,所以选择 0.6mol/L TFA 作为龙眼肉多糖水解的最佳酸浓度。值得一提的是水解温度在 110℃ 时可以缩短水解时间,但是容易发生裂管,操作难度大。

2.2 色谱条件选择

根据文献[6],采用磷酸缓冲溶液(0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液,pH 值 6.8)和乙腈作为流动相,在一定比例下出峰顺序按 Man、Rha、GlaUA、Glc、Gal、Xyl、Ara,而 Gal、Xyl、Ara,3 种单糖难分离,比较试验磷酸二氢钾溶液 85%、82%、80% 等梯度条件下和梯度模式条件下分离,峰形和分离度最好是 83% → 82% → 81% → 80% → 83% 梯度模式,时间梯度 0 min → 5 min → 10 min → 30 min → 35 min。HPLC 色谱图见图 1 和图 2。

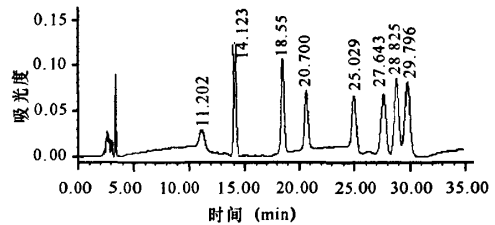


图 1 7 种混合单糖标准品 HPLC 色谱

PMP(11.2min)Man(14.1min)、Rha(18.6min)、GlaUA(20.7min)、Glc(25.0min)、Gal(27.6min)、Xyl(28.8min)、Ara(29.8min)

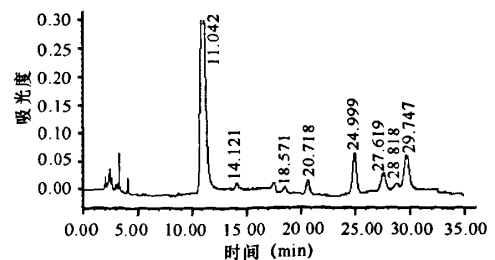


图 2 龙眼肉多糖 HPLC 色谱

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系

精确称取各标准单糖并配成 0.5mg/ml 的溶液,用时稀释为 5 个不同浓度的单糖溶液,制备 PMP 衍生物,在 1.5 所述的 HPLC 分析方法进行测定,以峰面积(Y)对标准品进样量 X(μg)进行线性回归,得到单糖衍生物的相关系数与回归方程见表 1。表 1 结果显示,7 种单糖相关系数大于 0.9988,甘

露糖在 22.1~442 μg 范围、鼠李糖在 31.7~634 μg 范围、半乳糖醛酸在 52.1~521 μg 范围、葡萄糖在 58.8~588 μg 范围、半乳糖在 55.3~553 μg 范围、木糖在 28.8~577 μg 范围、阿拉伯糖在 57.9~579 μg 范围有十分良好的线性关系。

表 1 7 种单糖的标准曲线和线性范围

单糖	标准曲线	相关系数	线性范围 (μg)
甘露糖(Man)	$Y = 6.842X - 19$	0.9998	22.1~442
鼠李糖(Rha)	$Y = 7.323X - 60$	0.9990	31.7~634
半乳糖醛酸(GalUA)	$Y = 6.973X - 46$	0.9995	52.1~521
葡萄糖(Glc)	$Y = 5.281X - 50$	0.9992	58.8~588
半乳糖(Gal)	$Y = 7.788X - 72$	0.9993	55.3~553
木糖(Xyl)	$Y = 9.894X - 86$	0.9988	28.8~577
阿拉伯糖(Ara)	$Y = 9.605X - 101$	0.9996	57.9~579

2.3.2 精密度实验

精密进样混糖标准品 10 μl , 连续重复进样 6 次, 测定各单糖衍生物峰面积, 其精密度 ($RSD, n = 6$) 分别为 Man 0.42%、Rha 0.40%、GlaUA 0.58%、Glc 0.85%、Gal 0.66%、Xyl 0.60%、Ara 0.55%, 表明该方法的精密度良好。

2.3.3 重复性实验

取龙眼肉多糖样品 5 份, 按照样品处理方法制备, 测定其各单糖衍生物峰面积, 计算各单糖 RSD 分别为 Man 1.18%、Rha 1.26%、GlaUA 1.32%、Glc 1.22%、Gal 1.65%、Xyl 1.36%、Ara 1.85%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性实验

取配置好的供试品溶液, 分别在制备后 0h、2h、4h、6h、8h、12h 进样时按 1.5 色谱条件进行测定单糖衍生物峰面积, RSD 依次为 Man 0.50%、Rha 0.92%、GlaUA 0.94%、Glc 0.75%、Gal 1.05%、Xyl 1.10%、Ara 0.98%, 表明在室温下样品溶液在 12h 内稳定。

2.3.5 加样回收试验

称取 5 份已知各单糖含量的龙眼肉多糖样品, 分别加入 7 种单糖对照品, 按供试品溶液制备方法制备成加样供试品溶液, 测定含量和计算平均回收率的结果(表 2)显示回收率较好, 表明该方法可行。

2.3.6 龙眼肉多糖的单糖组成测定

由 HPLC 分析结果(表 3)可知, 龙眼肉多糖由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖 7 种单糖组成。龙眼肉多糖是一种酸性杂多糖, 其中以葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸为主。

表 2 7 种单糖加样回收试验及相对标准偏差 ($n=5$)

单糖	加标量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
甘露糖(Man)	0.232	0.229	98.71	1.68
鼠李糖(Rha)	0.349	0.350	100.29	1.88
半乳糖醛酸(GalUA)	0.870	0.868	99.77	3.15
葡萄糖(Glc)	3.528	3.426	97.411	1.74
半乳糖(Gal)	1.106	1.117	100.99	3.23
木糖(Xyl)	0.346	0.341	98.55	2.05
阿拉伯糖(Ara)	2.027	2.012	99.26	1.88

表 3 龙眼肉多糖的单糖组成测定结果

单糖	含量 (%)	含量 (mmol/100g)	摩尔比
甘露糖(Man)	0.36	1.998	1.000
鼠李糖(Rha)	0.54	3.289	1.646
半乳糖醛酸(GalUA)	1.37	7.057	3.532
葡萄糖(Glc)	5.75	31.94	15.99
半乳糖(Gal)	18.9	10.50	5.255
木糖(Xyl)	0.54	3.597	1.800
阿拉伯糖(Ara)	3.29	21.91	10.97

3 结论

本研究通过 PMP 柱前衍生化高效液相色谱法, 实现在普通实验室常用紫外检测器和 C18 柱分离分析龙眼肉多糖的单糖组成, 体现了高效液相色谱法的分辨率高、分离速度快、分效果好、分离模式多样等优点。本方法简单灵敏, 操作方便快速, 为发展龙眼肉多糖以及其他多糖的在线定性定量 HPLC 方法奠定基础, 为进一步开发利用龙眼产品提供了科学依据。在龙眼肉多糖样品色谱图中还存在未知峰, 是否是其他类型的单糖还有待探讨。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 65.
- [2] Okuyama E, Ebihara H, Takeuchi H, et al. Adenosine, the anxiolytic-like principle of the Arillus of Euphoria longana[J]. Planta Medica, 1999, 65(2): 115.
- [3] 宁书年, 张桂. 生物多糖类物质对人体的作用[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 613-614.
- [4] 陈月月, 李雪静, 王宏芳, 等. 松茸多糖抗辐射功能的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 989-990.
- [5] 黄永春, 杨锋, 谢清芳, 等. 火棘水溶性多糖 PP-A₂ 理化性质研究[J]. 食品科技, 2007(6): 116-119.
- [6] 杨兴斌, 赵燕, 周四元, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成[J]. 分析化学研究简报, 2005(9): 1287-1290.

(责任编辑: 邓大玉)