

HPLC 分析大蒜多糖中的单糖

马晓丽^a, 孟磊^a, 孙莲^b, 李新霞^a (1.新疆医科大学, a.分析测试中心; b.药学院, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 建立一种反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析大蒜多糖中的单糖组成及摩尔比。方法 大蒜多糖样品经 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸降解为单糖后,经 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化,采用 Shimadzu VP-ODS 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 分离,以乙腈-醋酸铵缓冲溶液(取醋酸铵 7.708 g 加水溶解并稀释至 1 000 mL,用醋酸调 pH 5.5 (22:78)为流动相,流速为 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,在 245 nm 处检测单糖的衍生化产物。结果 大蒜多糖中甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcUA)半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Arab)7 种单糖的摩尔比为 4.31:4.23:4.19:9.13:27.4:4.99:3.81。结论 本方法灵敏度高,结果准确可靠,可用于大蒜多糖的单糖组成测定及质量控制。

关键词: 大蒜多糖; 衍生化; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)07-0585-03

Determination of Monosaccharide Compositions and Contents in Polysaccharide of Garlic by HPLC

MA Xiaoli^a, MENG Lei^a, SUN Lian^b, LI Xinxia^a (a.Instrumental Analysis Center, b.Department of Pharmaceutical Analysis, Xinjiang Medical University, Urumuqi 830054, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a RP-HPLC method for the determination of the monosaccharide compositions and contents in polysaccharide of garlic. **METHODS** The garlic polysaccharide were derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) after hydrolyzed into monosaccharides with $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, monosaccharide derivatives were separated on Shimadzu VP-ODS volum (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitril-Acetate buffer adjusted to pH 5.5 with Acetate (22:78) as mobile phase and UV detection at 245 nm. **RESULTS** The content of monosaccharide compositions were measured in polysaccharide of garlic, molar ratio of mannose, rhamnose, glucuronide, galacturonicacid, glucose, galactose, arabinose was 4.31:4.23:4.19:9.13:27.4:4.99:3.81. **CONCLUSION** The methods is simple, sensitive, accurate and reliable. The method can be applied for the analysis of quality control and monosaccharide composition and molar ratio in polysaccharide of garlic.

KEY WORDS: polysaccharide of garlic; derivation; PMP; RP-HPLC

大蒜(*Allium sativum* L.)营养丰富,历来被视为药食兼用佳品,具有降血脂、预防动脉硬化、防治冠心病、抗肿瘤等作用^[1-2]。多糖是大蒜中的重要成分,近来研究乙醇沉淀法制取的大蒜多糖具有抗氧化、抗病毒、保护心肌、防止心肌纤维化等多种重要的生物活性^[3],虽然大量文献报道了大蒜多糖的提取分离及药理作用,但对于其单糖组成及含量研究报道较少。本试验采用柱前衍生化高效液相色谱法研究大蒜多糖的单糖含量,以期为大蒜资源的开发、利用及质量控制提供基础依据。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); pH 计(上海雷磁); XS205 电子天平

(METTLER TOLEDO)。

葡萄糖(glucose)、甘露糖(mannose)、半乳糖(galactose)、鼠李糖(rhamnose)和阿拉伯糖(arabonose)为分析纯(上海试剂二厂); 葡萄糖醛酸(glucuronic)和半乳糖醛酸(galacturonic acid)为分析纯(Sigma 公司); 大蒜多糖由新疆埃乐欣药业分离纯化。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)(分析纯,上海试剂二厂); 乙腈、甲醇(色谱纯); 硫酸、盐酸、氢氧化钠(分析纯,西安化学试剂厂); 水为去离子水。

1.2 多糖的水解

精确称取大蒜多糖 20.0 mg,置于 10 mL 具塞试管内,加入 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸溶液 2.0 mL,于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中水解 8 h,得水解样品溶液。用 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠水溶液中和至 pH 7.0,并以纯化水稀释到 5.0

基金项目: 新疆医科大学科研创新基金(2007-19)

作者简介: 马晓丽,女,硕士研究生,讲师 Tel:(0991)4365034

E-mail:mx1108@sohu.com

mL, 离心, 吸取上清液, 得多糖水解样品。

1.3 衍生物的制备

1.3.1 单糖对照品混合液的配制 分别精密称取甘露糖 0.001 83 g、半乳糖 0.003 62 g、鼠李糖 0.003 65 g、葡萄糖 0.003 91 g、葡萄糖醛酸 0.003 90 g、半乳糖醛酸 0.004 26 g、阿拉伯糖 0.003 02 g, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

1.3.2 单糖对照品混合液的衍生 精密吸取单糖对照品混合液 50 μ L, 于具塞试管中, 分别加入 0.3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 50 μ L 和 0.5 mol·L⁻¹ PMP 甲醇溶液 50 μ L, 涡旋混合 30 s, 置于 70 °C 水浴反应 30 min, 取出, 冷却至室温, 加入 0.3 mol·L⁻¹ 盐酸 50 μ L 进行中和, 加入去离子水 100 μ L 稀释混匀, 然后加入 1 mL 氯仿涡旋混匀 30 s, 静置 5 min, 小心用注射器吸取下层有机相, 上层水相再重复萃取 2 次, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 进样分析。

1.3.3 多糖水解样品的衍生 将水解后的大蒜多糖按“1.3.2”项下方法进行衍生化处理。

1.4 色谱条件

色谱柱: 岛津 VP-ODS 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-醋酸铵缓冲溶液(取醋酸铵 7.708 g 加水溶解并稀释至 1 000 mL, 用醋酸调 pH 5.5)(22: 78)。柱温: 25 °C, 流速: 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长: 245 nm; 进样量: 10 μ L。

2 结果

2.1 线性关系考察

取适量对照品混合液按“1.3.2”方法进行衍生, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 用过滤水 1: 1 稀释, 分别进样 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 μ L, 记录色谱图, 以紫外测定的峰面积为纵坐标, 以相应单糖的进样浓度为横坐标进行线性回归。结果表明单糖混合对照品在 0.187 5~0.500 0 mmol·L⁻¹ 内、甘露糖在 0.093 7~0.250 0 mmol·L⁻¹ 与峰面积积分值呈良好的线性关系, 结果见表 1, 图 1。

表 1 7 种单糖的标准曲线

Tab 1 Calibration curves of seven standers

单糖	相关系数 <i>r</i>	标准曲线	线性范围 /mmol·L ⁻¹
甘露糖	0.998 6	$Y=544.30X-1337.2$	0.093 7~0.250 0
鼠李糖	0.998 8	$Y=743.58X-1825.9$	0.187 5~0.500 0
葡萄糖醛酸	0.998 8	$Y=1179.30X-3080.0$	0.187 5~0.500 0
半乳糖醛酸	0.999 1	$Y=1069.20X-2589.2$	0.187 5~0.500 0
葡萄糖	0.998 8	$Y=788.39X-1970.1$	0.187 5~0.500 0
半乳糖	0.998 9	$Y=906.99X-2249.2$	0.187 5~0.500 0
阿拉伯糖	0.998 9	$Y=905.77X-2230.1$	0.187 5~0.500 0

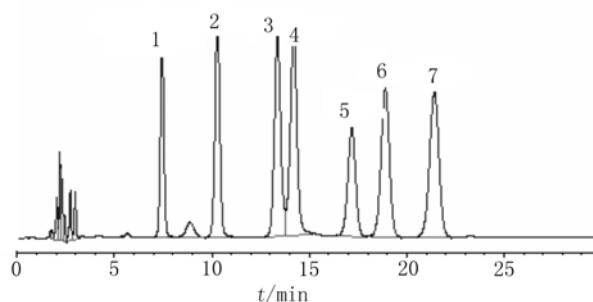


图 1 混合单糖标准品的 HPLC 图

1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-葡萄糖醛酸; 4-半乳糖醛酸; 5-葡萄糖; 6-半乳糖; 7-阿拉伯糖

Fig 1 HPLC of mixed monosaccharide

1- mannose; 2- rhamnose; 3- glucuronic; 4- galacturonic acid; 5- glucose; 6- galactose; 7- arabinose

2.2 仪器精密度和重复性考察

精密量取混合单糖对照品衍生物 10 μ L, 连续 5 次重复进样分析。甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的仪器精密密度(RSD)分别为 2.6%、2.9%、2.9%、2.6%、1.8%、2.2%、2.6%。

取适量大蒜多糖水解样品, 按“1.3.2”方法进行衍生, 按“1.4”色谱条件, 重复测定该样品溶液 6 次。甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的精密密度(RSD)分别为 1.55%、1.22%、1.98%、1.86%、1.01%、1.23%、0.99%。

从上述数据可以看出, 方法的仪器精密度和重复性良好。

2.3 加样回收率

取已知含量的多糖水解样品, 定量加入单糖混合对照品, 按“1.3.2”项下方法进行衍生化, 重复测定 6 次, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率测定结果(*n*=6)

Tab 2 Detemination of the recovery test(*n*=6)

成分	样品含量 / μ g	加入量 / μ g	测定值 / μ g	平均回收率/%	RSD /%
甘露糖	104.6	112.5	217.21	100.10	1.8
鼠李糖	199.96	225.0	422.87	99.07	3.2
葡萄糖醛酸	218.1	243.75	461.41	99.82	2.1
半乳糖醛酸	246.4	262.5	512.84	101.50	2.4
葡萄糖	351.6	243.75	588.87	97.32	2.9
半乳糖	201.0	225.0	427.58	100.70	2.7
阿拉伯糖	162.0	187.5	348.96	99.71	2.7

2.4 多糖样品分析

精确称取大蒜多糖按“1.2”, “1.3.2”项下方法进行衍生化, 进样测定。结果见图 2。将混合单糖标准品图谱与大蒜多糖的图谱对照, 采用校正因子

计算单糖组成比例,样品可不加内标进行衍生化 HPLC 分析。根据分析和计算方法,求得大蒜多糖中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖七种单糖的摩尔比为 4.31 : 4.23 : 4.19 : 9.13 : 27.4 : 4.99 : 3.81。

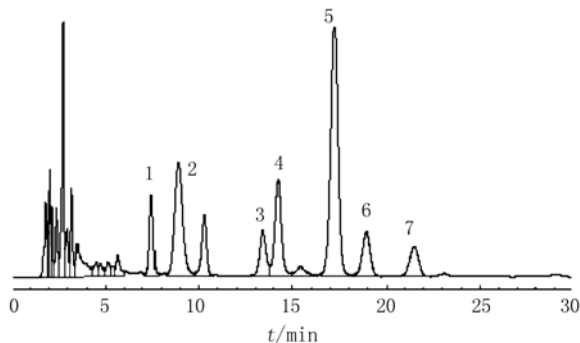


图 2 大蒜多糖水解样品的 HPLC 图

1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-葡萄糖醛酸; 4-半乳糖醛酸; 5-葡萄糖; 6-半乳糖; 7-阿拉伯糖

Fig 2 HPLC of polysaccharide hydrolysate derivatives

1- mannose; 2- rhamnose; 3- glucuronic; 4- galacturonic acid; 5- glucose; 6- galactose; 7- arabinose

3 讨论

3.1 衍生化反应

Honda 等^[4]首次将具有强紫外吸收的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)用于糖类物质的衍生。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。本实验没有对衍生化中和后的水相进行干燥,结果无影响。

3.2 大蒜多糖的液相色谱分析

由于糖类物质不具有发色基团,对分离后的物质进行直接紫外检测比较困难,气相色谱法分离单糖繁琐费时,易出现色谱峰异构化裂分^[5],使用糖分析柱和氨基键合相柱利用高效液相色谱法测定单糖价格昂贵,分析成本高^[6];结合灵敏度、选择性等方面的问题,本实验采用衍生化方法使糖类物质带

上发色基团,用高效液相色谱 C₁₈ 色谱柱-紫外检测器相结合来进行糖类物质的研究。通过对色谱条件的优化直接分析了大蒜多糖中单糖含量,结果表明方法准确,重复性好,能够满足含量测定的要求。

3.3 流动相的选择

考察了不同比例流动相(醋酸-醋酸铵缓冲溶液(pH 5.5):乙腈=70:30、72:28、78:22、80:20 时)对保留时间及分离度的影响,结果发现醋酸-醋酸铵缓冲溶液(pH 5.5):乙腈=70:30 时,保留时间较短,葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸的分离度不好;醋酸-醋酸铵缓冲溶液(pH 5.5):乙腈=80:20 时,PMP 的峰与甘露糖的峰分不开,且保留时间长,选择醋酸-醋酸铵缓冲溶液(pH 5.5):乙腈=78:22 为流动相时,7 种单糖的保留时间在 25 min 之内,分离效果最好。故本文选择醋酸-醋酸铵缓冲溶液(pH 5.5):乙腈=78:22 为流动相。

REFERENCES

- [1] DAS N N, DAS A, MUKHERJEE A K. Structure of the D-galactan isolated from garlic (*Allium sativum*)bulbs [J]. *Carbohydr Res*, 1977, 56(2): 337-349.
- [2] DAS N N, DAS A. Structure of the D-fructan isolated from garlic (*Allium sativum*)bulbs[J]. *Carbohydr Res*, 1977, 56(2): 337-349.
- [3] BAUMGARTNER S, PRAZNIK W, et al. Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.)[J]. *Carbohydr Res*, 2000, 328(2): 177-183.
- [4] 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.
- [5] LEHRFELD J. Structural studies of the D glucomannan isolated from Aloe Vahombe [J]. *Anal Biochem*, 1981, 115(2): 410-418.
- [6] FU D, O'Neill R A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1995, 227(2): 377-384.

收稿日期: 2008-09-17