

白花蛇舌草多糖的分离纯化及 PMP 柱前衍生高效液相分析*

钱韵旭¹, 刘 裴², 李 莉³, 李晓蕾¹

(1. 昆明理工大学, 云南昆明 650224; 2. 云南中医学院, 云南昆明 650500; 3. 昆明医学院, 云南昆明 650500)

[摘要] 经热水提取、醇沉、大孔树脂分离、三氯乙酸脱蛋白、 H_2O_2 脱色、透析、DEAE-52 纤维素和 SephadexG-200 凝胶柱层析, 建立了白花蛇舌草多糖的分离纯化方法。制备的 OD I 经紫外扫描及 HPGPC 测试, 证实为单一纯品。OD I 经 PMP 柱前衍生高效液相法测定, 确定其由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖组成。

[关键词] 白花蛇舌草; 多糖; 单糖; 高效液相; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2010)03-0043-04

白花蛇舌草 (*Oldenlandia diffusa* wild) 系茜草科 (Rubiaceae) 耳草属植物, 广泛分布于我国南部, 以干燥全草入药。传统上用于毒蛇咬伤、结肠炎、肠胃溃疡、肝炎、疮痍肿毒、急慢性喉炎等的治疗, 当代发现有明显抗恶性肿瘤之功效。白花蛇舌草含有蒽醌、萜类、多糖、甾醇、微量元素等化学成分, 其中的多糖成分足有效的免疫调节剂, 可明显杀伤肿瘤细胞, 还兼各抗衰老作用^[1]。本研究对白花蛇舌草多糖进行分离纯化, 并利用 PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析了白花蛇舌草所含一种纯多糖的单糖组成。

1 仪器与试剂

主要仪器 DIONEX P680 高效液相色谱仪 (美国戴安公司), UV-2100 紫外可见分光光度计 (尤尼柯 (上海) 仪器有限公司), TSK-CEL G2500PW 多糖专用凝胶柱 (日本 TOSOH 公司), Waters Atlantis dC18 柱 (美国沃特世公司), DEAE-52 纤维素 (Whatman 分装), SephadexG-200 凝胶 (Pharmacia 分装)。

主要试剂三氯乙酸 (TCA) (上海凌峰化学试剂有限公司), D-甘露糖、D-鼠李糖、D-半乳糖、D-阿拉伯糖 (国药集团化学试剂有限公司), D-葡萄糖、D-木糖 (Sigma 公司), 三氟乙酸 (TFA) (上海医药集团), 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) (北京化学试剂厂)。乙腈为色

谱纯, 其他试剂均为分析纯。

白花蛇舌草购自南京药业股份有限公司中药饮片厂。

2 实验方法与结果

2.1 白花蛇舌草粗多糖的提取

取白花蛇舌草 1 000 g, 分别加入 10 倍水提取两次, 每次 3h。合并药液, 浓缩至 300mL, 加 95% 乙醇使含醇量达 80%, 静置 24h, 抽滤, 沉淀依次用无水乙醇、丙醇、乙醚洗涤。加水溶解, 上大孔树脂柱, 用水洗脱, 收集前 5L 洗脱液, 浓缩至 100mL, 石油醚萃取至醚层无色。挥干有机试剂后加入等体积 20% 三氯乙酸 (TCA) 溶液, 静置 4h, 离心, 上清液以氨水调 pH 值至 8, 滴加 30% H_2O_2 至淡黄色, 置 50℃ 水浴 2h, 离心, 上清液倾入透析袋, 以蒸馏水透析 48h, 浓缩, 真空干燥得淡黄色粉末, 经苯酚-硫酸法测定含糖量为 79.35%。

2.2 DEAE-52 (OH⁻) 纤维素柱层析

粗提多糖溶液采用 DEAE-52 (OH⁻) 纤维素柱层析。上样浓度 $15\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样体积 20mL, 柱规格 $3\text{cm} \times 30\text{cm}$, 流速 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 用双蒸水、 $0.1 \sim 0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液梯度洗脱, 分步收集, 每管 3mL, 苯酚-硫酸法跟踪检测多糖含量。以吸光度为纵坐标、收集管数为横坐标绘制洗脱曲线, 出现 I、II、III 和 IV 4 个明显峰形 (见图 1)。

* 收稿日期: 2010-03-01 修回日期: 2010-05-17

作者简介: 钱韵旭 (1977~), 女, 云南会泽人, 讲师, 硕士, 研究方向: 药物制剂、中药药理学。

2.3 SephadexG-200 凝胶柱层析

将含糖主峰 I 合并收集, 浓缩后上 SephadexG-200 凝胶柱, 层析条件为: 上样浓度 $10\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样体积 15mL , 层析柱规格 $2\text{cm} \times 30\text{cm}$, 用 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液洗脱, 流速 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 苯酚-硫酸法跟踪检测多糖含量, 洗脱曲线如图 2。收集含糖主峰, 真空浓缩后用醇沉法沉淀多糖, 冷冻干燥得多糖纯品 OD I。

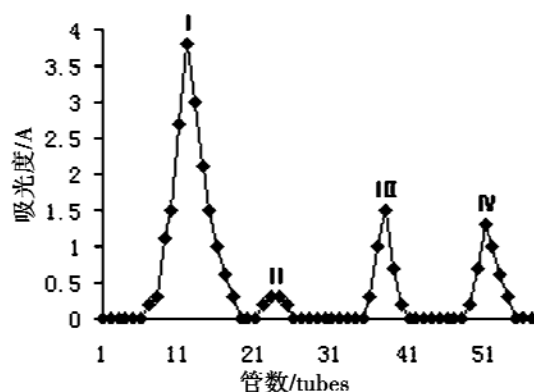


图 1 DEAE-52 梯度洗脱图谱

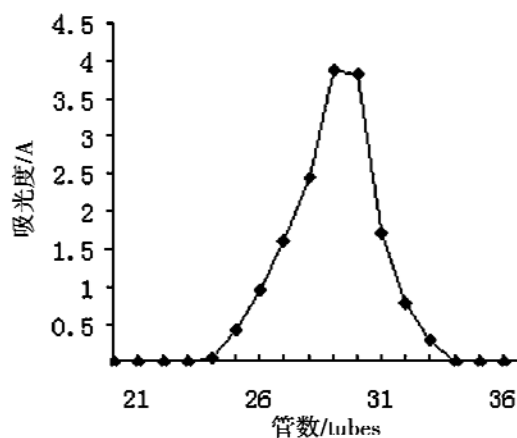


图 2 Sephadex G200 柱多糖洗脱曲线

2.4 多糖纯度鉴定

2.4.1 核酸与蛋白质杂质的鉴定

将 OD I 配制成 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 在 $200 \sim 400\text{nm}$ 范围内进行紫外吸收扫描, 所得图谱见图 3。由图 3 可知, OD I 在 260nm 和 280nm 处未出现特征吸收峰, 证明 OD I 中不含核酸与蛋白质。

2.4.2 HPGPC 测试

将 OD I 配制成 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 利用高效凝胶渗透色谱法测试。色谱条件: TSK-GEL G2500PW 多糖专用凝胶柱, 进样量 $20\mu\text{L}$, 流动相

为纯水, 流速 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25°C 。经过 HPGPC 检测, OD I 呈现单一对称峰 (见图 4), 表明 OD I 为较纯且单一的组方。

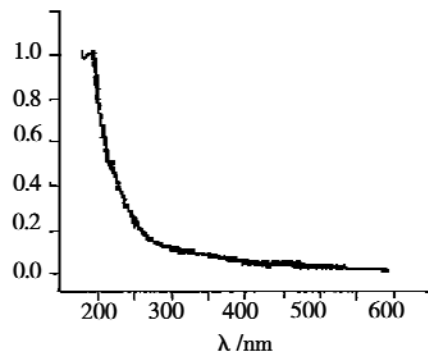


图 3 OD I 紫外吸收光谱

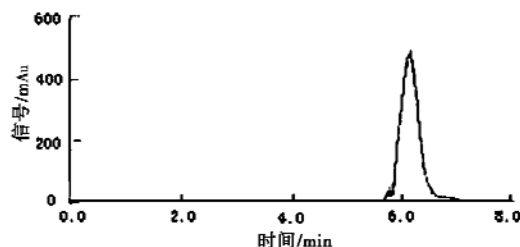


图 4 HPGPC 检测 OD I 纯度

2.5 分析 OD I 单糖组成

2.5.1 单糖混合溶液的制备

TLC 预实验提示白花蛇舌草粗多糖含 D-甘露糖、D-鼠李糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖, 故配制以上单糖标准品混合溶液 (各单糖质量浓度均在 $0.36\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右)。吸取单糖混合液 $100\mu\text{L}$ 与 $0.6\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 $100\mu\text{L}$, 置 5mL 具塞离心管, 再加入 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 甲醇溶液 $200\mu\text{L}$, 涡旋混匀。 70°C 水浴反应 50min , 冷却至室温 10min 后加 $0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液 $200\mu\text{L}$ 中和。加水 $900\mu\text{L}$, 混匀, 加入氯仿 1.5mL , 涡旋 3min , 静置, 弃氯仿相, 依法萃取 3 次。水相经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后进样。

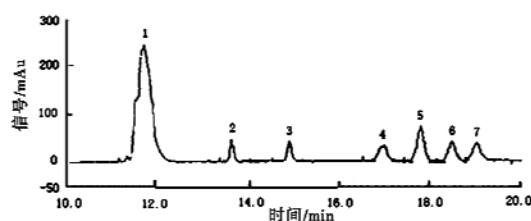
2.5.2 样品溶液的制备

准确称取 OD I 10mg 加入水解管中, 再加入 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 (TFA) 4mL , 充氮气封管, 110°C 水解 2h , 冷却, 真空浓缩至干, 加入甲醇 2mL , 并用氮气吹干, 重复 3~4 次, 以除去 TFA, 最后加 2mL 水定容。吸取 $100\mu\text{L}$, 按 2.5.1 同法生

成衍生物。

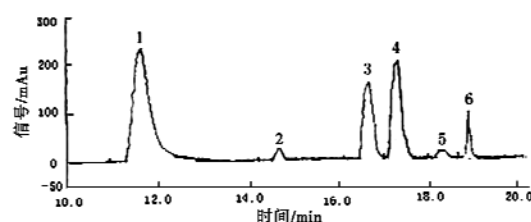
2.5.3 衍生液的 HPLC 分析

色谱条件: Waters Atlantis dC18 柱, 进样量 $20\mu\text{L}$, 流动相为 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$, pH 6.9) - 乙腈, 时间梯度为 $0\text{min}\rightarrow 10\text{min}\rightarrow 30\text{min}$, 相应浓度梯度为 $0\rightarrow 15\%\rightarrow 30\%$ (V/V), 流速 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 25°C , 检测波长 250nm 。图5为混合标准单糖的PMP衍生物的HPLC图, 六个单糖均达到基线分离, 分离效果良好, PMP峰未掩盖单糖峰。图6是OD I PMP衍生物HPLC图, 对照图5与图6可知, OD I是由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖组成的杂多糖。根据标准单糖的称重和峰面积之比, 采用单点外标法求得OD I中单糖的组成为: 鼠李糖: 葡萄糖: 半乳糖: 木糖: 阿拉伯糖 = 7: 34: 43: 5: 11。



1. PMP; 2. 甘露糖; 3. 鼠李糖; 4. 葡萄糖;
5. 半乳糖; 6. 木糖; 7. 阿拉伯糖

图5 混合单糖-PMP衍生物的色谱分离图



1. PMP; 2. 鼠李糖; 3. 葡萄糖; 4. 半乳糖;
5. 木糖; 6. 阿拉伯糖

图6 OD I水解后的PMP衍生物色谱分离图

3 讨论

3.1 多糖纯化中脱蛋白、脱色方法的选择

多糖常规脱蛋白的方法有: Sevage法、氯化钠法、氯化钙法、盐酸法、三氯乙酸法(TCA法)等。TCA法对白花蛇舌草粗多糖所含蛋白质脱除率高, 多糖损失少, 还能同时除去大量色素, 故确定其为纯化工艺的脱蛋白方法^[2]。过氧化氢的脱色原理是在受热和光照条件下产生初生态氧而破坏

有色物质, 对白花蛇舌草结合型与游离型色素均有明显脱色效果, 但在实验过程中要特别注意控制用量、温度、时间、pH值等反应条件^[3]。

3.2 PMP柱前衍生实验条件的选择

3.2.1 PMP试剂的选择

由于单糖极性较强, 结构相近, 不具有发色基团, 故为分析多糖中的单糖组成, 常采用多糖水解液柱前或柱后衍生化的方法, 以达到提高检测灵敏度、改善分离选择性的目的。可用于单糖衍生化的试剂很多, 如PMP、苯甲酸、对氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸酯、对甲氧基苯胺、2-氨基吡啶、6-氨基喹啉等, 其中PMP柱前衍生化反应条件较温和, 无需酸催化, 产物无立体异构, 在 250nm 处有强吸收, 可弥补糖类物质在紫外区无吸收的缺陷, 故选用PMP试剂。

3.2.2 衍生化反应时间的选择

文献^[4-5]报导PMP衍生化反应时间多为 $30\sim 100\text{min}$ 。本研究考察单糖混合溶液采用 30min 、 50min 、 70min 和 100min 的衍生化反应时间, 结果表明: 反应 50min 时, 各种单糖PMP衍生物的峰面积均为最大, 故衍生化反应时间选择为 50min 。

3.2.3 pH值对萃取效果的影响

PMP-醛糖衍生物的化学结构中含有碱性基团, pH值较高时不易解离, 可被氯仿萃取(为去除过量PMP, 需用氯仿萃取)而产生损失, 故在萃取前应加入盐酸中和反应系统中的NaOH。文献中^[6-7]多使用等量或者过量的HCl来中和, 本实验比较了 $0.3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl不同用量(100 , 150 , 200 , 250 , $300\mu\text{L}$)的效应, 结果表明: $150\sim 250\mu\text{L}$ 范围内对萃取效果影响不大, 使用 $200\mu\text{L}$ 等当量HCl中和时, 大多数单糖-PMP衍生物的峰面积较大, 因而选择等当量中和。

3.3 高效液相色谱条件的选择

以磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相反相分离PMP-醛糖衍生物时, 缓冲液的pH值是一重要影响因素。本研究前期选用 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(pH6.0)-乙腈作流动相, 确定了时间梯度为 $0\text{min}\rightarrow 10\text{min}\rightarrow 30\text{min}$, 相应浓度梯度为 $0\rightarrow 15\%\rightarrow 30\%$ (V/V)的梯度洗脱程序。再考察缓冲液pH值对各单糖保留时间及分离效果的影响, 结果显示: $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(pH6.9)时分离效果好, 保留时间适中, 出峰间距较均匀。

[参考文献]

- [1] 钱韵旭, 赵浩如, 高展. 白花蛇舌草提取物的体外抗肿瘤活性 [J]. 江苏药学与临床研究, 2004, 12 (4): 36-38.
- [2] 李瑞, 赵浩如, 陈乃林. 白花蛇舌草多糖除蛋白的方法研究 [J]. 江苏中医药, 2003, 24 (10): 56-57.
- [3] 姚文华, 尹卓容. 大枣多糖脱色的工业化试验 [J]. 食品工业, 2006, 5: 41-43.
- [4] 宝炉丹, 徐国防, 马郑, 等. 柱前衍生化 HPLC 分析白花蛇舌草多糖中单糖组成 [J]. 中成药, 2008, 30 (3): 406-408.
- [5] 凌云, 王玉峰, 王莹, 等. 虫草多糖中单糖组成的柱前衍生化 HPLC 分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39 (12): 924-926, 929.
- [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, 2005, 33 (9): 1287-1290.
- [7] 吴建元, 肖玉玲, 孙曼春, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析茯苓多糖的单糖组成 [J]. 医药导报, 2009, 28 (9): 1213-1214.

(编辑: 迟 越)

Isolation and Purification of Polysaccharide from *Hedyotis Difusa* Willd and Analysis on its Composition by Pre-column Derivatization HPLC

QIAN Yun-xu¹, LIU Pei², LI Li³, LI Xiao-lei¹

- (1. Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650224, China;
2. Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500, China;
3. Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[ABSTRACT] A method of preparation of polysaccharide from *Oldenlandia diffusa* wild was identified, using hot water extract method, ethanol precipitation, removing the proteins by TCA reagent, decoloring with hydrogen peroxide and dialyzing by distilled water. After that, one of polysaccharides was isolated and purified through DEAE-52 and Sephadex G-200 chromatography, which was named OD I. The purity of OD I was examined by UV and HPLC. The composition of monosaccharides of OD I was mannose, glucose, galactose, xylose and arabinose which was determined by HPLC with pre-column derivatization.

[KEY WORDS] *oldenlandia diffusa* wild; polysaccharide; monosaccharide; high performance liquid chromatography; PMP

(上接第 42 页)

Xinnao Shutong Soft Capsule Dissolution Test

ZHOU Mei-huan¹, ZHANG Dong-fang², CHEN Miao³, ZHU Zheng²

- (1. Shenyang North-East Drug Store Chain, Shenyang, 110023, China;
2. College of Pharmaceutical Science, China Medical University, Shenyang, 110001, China;
3. Supply and Marketing Company, North East Pharmaceutical Group, Shenyang, 110003, China)

[ABSTRACT] Objective: To evaluate Xinnao Shutong Soft Capsule dissolution. Methods: The dissolution of Xinnao Shutong Soft Capsule was determined by No. 2 method in China Pharmacopoeia (2005). Total flavone was determined by colorimetry. Results: 3 batches of dissolutions is respectively 87.0%, (RSD% = 0.3%, $n = 6$), 89.4% (RSD% = 0.8%, $n = 6$), 88.8% (RSD% = 1%, $n = 6$). Conclusion: No. 2 method in China Pharmacopoeia can be used to determine the dissolution of Xinnao Shutong Soft Capsule.

[KEY WORDS] xinnao shutong soft capsule; flavone; dissolution