

高效液相色谱法分析猪屎豆种子胶多糖中的单糖组成

郭守军, 杨永利, 余建保, 冯心乐, 洪佩琼, 张洁枚

(韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041)

摘要: 建立了一种采用 SUGAR SP-G 0810(Pb 型)糖分析色谱柱, 以纯水为流动相, 利用示差折光检测器的高效液相色谱外标法直接分离分析半乳甘露聚糖胶中单糖组成的方法。木糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖的分离在 20 min 内完成, 检出限分别达到 2.0 μg, 20 μg, 1.0 μg 和 20 μg, 线性范围为 2~10 mg/mL。该方法简便、快速、重现性好, 用于猪屎豆种子胶多糖中单糖组分的测定, 并进行回收率试验, 结果 5 次测定的半乳糖和甘露糖的回收率分别为 95.83% 和 103.68%, RSD 分别为 1.53% 和 1.50%。

关键词: 高效液相色谱法; 半乳甘露聚糖; 猪屎豆; 种子胶; 多糖分类号

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)03-0422-04

Determination of carbohydrates in seed gum of *Crotalaria mucronata* by HPLC

GUO Shou-Jun, YANG Yong-Li, SHE Jian-Bao, FENG Xin-Le, HONG Pei-Qiong, ZHANG Jie-Mei

(Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

Abstract: A new approach by which the free monosaccharides of galactomannan were separated directly and determined by means of high performance liquid chromatography(HPLC)of external standard method on a SUGAR SP-G 0810 column with a differentail refract-meter detector and a mobile phase of pure water. The separation time for xylose(xyl), glucose(glc), galactose(gal)and mannose(man)was within 20 min;and the detection limits were 2.0 μg, 20 μg, 1.0 μg and 20 μg, respectively, while the linear dynamics varied within the range of 2~10 mg/mL. The method is rapid, simple and reproducible and can be used to the determinations of the monosaccharides in seed gum galactomannans of *Crotalaria mucronata*. Moreover, the recovery experiment was also conducted. The results showed that the relative standard deviations(RSD)of six-time determinations to Gal and Man were 1.53% and 1.50% and the recoveries were 95.83% and 103.68%, respectively.

Key words: HPLC; galactomannans; *Crotalaria mucronata*; seed gum; polysaccharide

猪屎豆(*Crotalaria mucronata*)为蝶形花科猪屎豆属半灌木状草本, 别名三圆叶猪屎豆、狗屎豆等, 广泛分布于广东、广西、云南和福建等地。猪屎豆种子是我国南方地区十分常见的一种传统中药, 有清热祛湿, 解毒散结, 消积, 补肝肾, 明目, 固精等

功效(吴修仁, 1997, 1989)。猪屎豆种子胶是从猪屎豆种子中提取出的一种多糖胶, 主要成分是半乳甘露聚糖, 近年来的研究表明, 半乳甘露聚糖胶具有降血糖、降血脂、减肥、抗凝、抗溃疡、抗病毒、免疫调节等作用(Bin-Hafeez 等, 2003; Pandian 等, 2002)。

收稿日期: 2008-12-08 修回日期: 2009-03-24

基金项目: 广东省自然科学基金(06028879)[Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province(06028879)]

作者简介: 郭守军(1965-), 男, 甘肃天水人, 博士, 副研究员, 主要研究领域为天然产物化学, (E-mail) sjguo2006@yahoo.com.cn.

并且不同来源的半乳甘露聚糖胶其活性也不同,而这些影响主要与半乳甘露聚糖胶的半乳糖和甘露糖的摩尔比及精细结构不同有关。

半乳甘露聚糖胶中单糖组分的研究,多采用气相色谱法和薄层色谱法(马文秀等,1999;杨永利等,1995,2006)。由于气相色谱法分析需要对单糖组分进行衍生化,实验中该方法较为繁琐和费时,而高效液相色谱法具有直接、简便和快速等特点,所以已广泛应用于多糖组分的分析中。多糖中半乳糖和甘露糖通常在普通氨基糖分析柱中很难获得满意的分离效果(林勤保等,1998;赵仁邦等,2004),采用柱前衍生化可以改善两种单糖的分离度(Tapie 等,2008;吴彦等,2005,陈克克,2008),但是分析时间会延长,而且增加了柱前衍生化反应的操作。为了探索一种高分离度、快捷、简便的直接分离分析多糖中半乳糖和甘露糖含量的方法,本试验运用 SUGAR SP-G 0810(Pb 型)糖分析色谱柱,利用示差折光检测器的高效液相色谱外标法对猪屎豆种子胶多糖完全水解产物进行了直接分离分析,获得了满意的结果。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器和试剂

LC-6A 高效液相色谱、岛津 RI-10A 示差折光检测器,色谱柱(Shodex)SUGAR SP-G 0810(300 mm×4.6 mm i. d., 10 μ m, Pb 型);7725i 手动进样器,CTO-10AS 柱温箱,CBM-20A 在线控制器,LC-solution 分析软件,各单糖标样均为 Sigma 试剂,三氟乙酸为分析纯。

1.2 猪屎豆种子胶多糖的提取与纯化

1.2.1 猪屎豆种子胶的制备 种子泡涨,手工剥离内胚乳,内胚乳烘干、粉碎,过 100 目筛,得猪屎豆种子胶粉。

1.2.2 猪屎豆种子胶多糖的分离提纯 称取 5 g 猪屎豆胶粉溶于 700 mL 蒸馏水中,搅拌 3 h,离心沉降分离,沉淀部分用水洗涤 2 次,每次用水 200 mL,搅拌 1 h 离心分离。合并清液,在搅拌下慢慢加入 6.5 mL 斐林试剂析出铜络合物,静置 1 h,倾出上清液,用水洗涤 3 次,离心分离得络合物,向络合物中加 4 $^{\circ}$ C 75 mL 蒸馏水,再滴加 0.5 mol/L 的 HCl 使之全部溶解。加入 700 mL 乙醇,所得絮状物分别用乙醇、丙酮、乙醚各洗涤三次,冷冻干燥得洁白多糖粉。

1.3 色谱方法

1.3.1 样品的预处理 精确称取猪屎豆种子胶多糖 10 mg 于 10 mL 安培瓶中,精密加入 3 mL 浓度为 2 mol/mL 的三氟乙酸,充入氮气后封管,于 100 $^{\circ}$ C 水解 3 h,冷冻干燥,残留物再加入 3 mL 浓度为 2 mol/mL 的三氟乙酸,条件同上重复水解一次,冷冻干燥得水解后产物,五氧化二磷真空干燥器干燥至恒重,去离子水溶解,过 0.45 nm 膜后定容至 10 mL 后进行色谱分析。

1.3.2 混合标准单糖溶液的配制 精确称取半乳糖、木糖、葡萄糖和甘露糖标样各 10 mg,混合后按“1.3.1”方法处理,得到混合标准单糖溶液,过 0.45 nm 膜后定容至 10 mL 后进行色谱分析。

1.3.3 色谱条件 用 SP-G 0810 色谱柱和示差折光检测器,流动相:H₂O;流速:1.0 mL/min;柱温:80 $^{\circ}$ C;进样体积:20 μ L,与标准样对照,按保留时间和峰面积分别进行定性、定量分析。

2 结果与amp;讨论

2.1 色谱条件的选择——流速、柱温和洗脱剂对色谱分离的影响

SP-G 0810(Pb 型)为有机聚合物的离子络合物糖分离柱,对柱压要求较为严格,一般流速使用不能超过 1.0 mL/min,若流速选择在 0.5~1.0 mL/min 范围内,分析结果显示,各单糖均能得到较好的分离,但选择较小的流速,则分离时间会延长,所以本试验选择流速 1.0 mL/min。

SP-G 0810 糖分离柱的使用温度最高为 95 $^{\circ}$ C,如果柱温低于 60 $^{\circ}$ C,单糖常会出现异构体的双峰,80 $^{\circ}$ C 是最为适宜的柱温选择。

该色谱柱使用的洗脱剂是纯水,但有时为了改善分离度,可以在洗脱溶剂加入小于 20%(v/v)的极性有机溶剂,如甲醇或乙腈。本试验在尝试分别加入浓度为 10%甲醇和 10%乙腈后,色谱分离效果改观不大,所以采用纯水。

由图 1 可知,四种标准单糖按出峰时间先后顺序依次为:D-葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖和 D-甘露糖。图 2 是猪屎豆种子胶多糖酸水解产物的高效液相色谱图,两个色谱峰(峰 1 和峰 2)的保留时间分别为 10.902 min 和 12.271 min,对比标准单糖的保留时间可知,猪屎豆种子胶多糖由半乳糖和甘露糖组成,外标法定量得到其单糖摩尔比是半乳糖:甘露

糖=1:2.417,其单糖组成不同于其它豆科种子胚乳胶多糖(马文秀等,1999;蒋建新等,2000;杨永利等,1995,2006)。

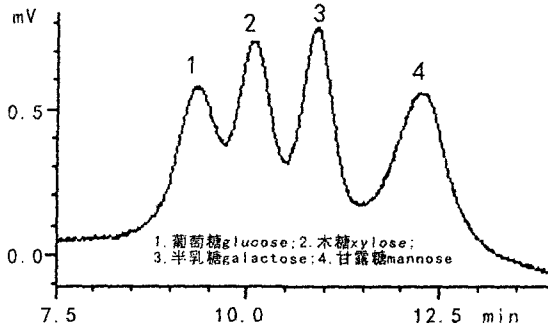


图 1 标准单糖的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC of the standard monosaccharides

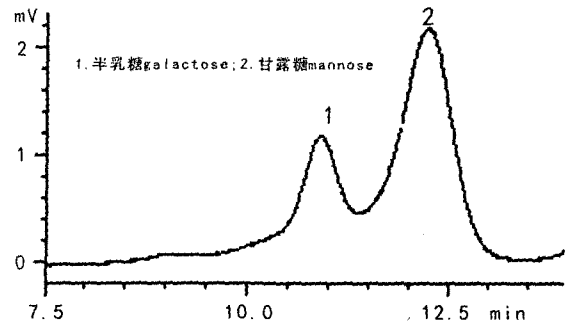


图 2 猪屎豆种子胶多糖的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC of the polysaccharide in *Crotalaria mucronata* seed gum

此外由图 1 和图 2 可知,与其它普通的碳水化合物氨基糖分析柱比较(林勤保等,1998;赵仁邦等,

表 1 各单糖的回归方程、相关系数、最低检测限和线性范围

Table 1 The regression equation, correlation coefficient, limit of detection, linear range of monosaccharide

单糖 Monosaccharide	相关系数 R^2 ($n=5$)	标准曲线(10 ⁻⁶) Standard curve	最低检测限(μg) Limit of detection	线性范围(mg/mL) Linear range
Xyl	0.9985	$Y=5.6x-9515.57$	2.0	2-10
Glc	0.9992	$Y=5.2x+2188.99$	20	2-10
Gal	0.9974	$Y=5.1x-218.90$	1.0	2-10
Man	0.9995	$Y=5.1x-8236.30$	20	2-10

表 2 单糖的回收率及保留时间

Table 2 The recovery and retention time of monosaccharides

组份 Component	保留时间 Retention time (min)		样品含量 Sample content (mg/mL)	添加量 Added (mg/mL)	测定值 Found (mg/mL)	回收率 Recovery (%)
	标样 Standard sample	猪屎豆胶 <i>Crotalaria mucronata</i> seed gum				
Xyl	9.313			0.880	0.868	98.64
Glc	10.086			0.900	0.875	97.22
Gal	10.902	10.908	0.253	0.730	0.942	95.83
Man	12.271	12.234	0.612	0.750	1.410	103.68

2004), 铅型有机聚合物的离子络合物糖分离柱 SP-G 0810 对半乳糖和甘露糖的分离效果显著提高, 分离度可达到 97%~100%, 接近基线分离。

2.2 线性关系和最低检测限量的考察

分别吸取“1.3.2”中的混合标准单糖溶液 200 μL , 400 μL , 600 μL , 800 μL , 1 000 μL 于 1 mL 容量瓶中, 分别定容到 1 mL, 在选定色谱条件下进样 20 μL , 测定峰面积。以单糖标准品峰面积(Y)对相应浓度(x, mg/mL)进行线性回归分析, 求出各单糖标准品的直线回归方程, 结果见表 1。再将标糖溶液逐级稀释, 依次进样, 计算所对应的标准溶液的质量浓度以确定最低检测限(LOD)。由表 1 可知, 在线性范围 2~10 mg/mL 内, 各单糖与其峰面积有良好

的线性关系。当信噪比(S/N)为 3 时, 四种单糖的检出限在 1.0~20 μg 之间。

2.3 精密度试验

考察实验方法的精密度: 按照“1.3.1”平行制备测定单糖含量的样品各 5 份, 连续进样, 测量峰面积值, 计算各单糖的 RSD($n=5$), 葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖的 RSD 分别为 1.43%, 0.83%, 1.53% 和 1.50%, 说明各单糖的精密度良好。

2.4 回收率试验

精确称取 4 种标准单糖配成 1.0 mL 溶液, 依次量取 0.1 mL 分别加入到猪屎豆种子胶多糖样品 10 mg 中, 干燥, 按“1.3.1”方法处理后, 过 0.45 μm 膜后定容至 10 mL, 测定加样回收率, 结果见表 2。

半乳糖和甘露糖的回收率分别为在 95.83% 和 103.68%，由结果可知回收率较好，方法可行。

3 结论

建立了高效液相色谱法直接测定半乳甘露聚糖中单糖组份的方法。多糖酸水解后的单糖组分不需要衍生化，可直接进行 HPLC 分析，在 SP-G 0810 糖分析柱上得到了良好的分离。相对标准偏差 0.83%~1.53%，回收率 95%~104%。保留时间定性可知，猪屎豆种子胶多糖由半乳糖和甘露糖组成，外标法定量得到其单糖组成的摩尔比是半乳糖：甘露糖=1：2.417，该结果为猪屎豆种子胶多糖的精细结构研究提供科学依据。此方法简便快速，可以在 20 min 内完成。精密度高，结果准确可靠。为半乳甘露聚糖中单糖组成的分析提供了一种好方法。

参考文献：

吴修仁. 1997. 潮汕生物资源志略[M]. 广州：中山大学出版社：116

吴修仁. 1989. 广东药用植物简编[M]. 广州：广东高等教育出版社：188

Bin-Hafeez B, Haque R, Parvez S, et al. 2003. Immunomodulatory effect of fenugreek extract in mice[J]. *International Immunopharmacology*, (3):257-263

Chen KK(陈克克). 2008. Analysis of monosaccharide composition in polysaccharide from the root of *Lycopus lucidus* by HPLC(高效液相色谱法分析地瓜儿多糖的单糖组成)[J]. *Food Sci and Tech* (食品科技), 33(11):262-266

Jiang JX(蒋建新), Zhu LW(朱莉伟), Xu JS. 2000. Studies on gum from seeds of *Gleditsia heterophylla* Bunge(野皂荚豆胶的

研究)[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*(林产化学与工业), 20(4):59-62

Lin QB(林勤保), Gao DW(高大维), Yu SJ(于淑娟), et al. 1998. Study on monosaccharide composition of polysaccharides from chinese red dates by HPLC(大枣多糖的单糖组成的高效液相色谱法研究)[J]. *J Zhengzhou Grain Coll*(郑州粮食学院学报), 19(3):57-60

Ma WX(马文秀), Luo QY(罗庆云), Shang ZX(尚征贤), et al. 1999. Study on polysaccharides in Tara seed(塔拉豆多糖研究)[J]. *Chemistry and Industry of Forest Product*(林产化学与工业), 19(4):29-34

Pandian RS, Anuradha CV. 2002. Viswanathan P., Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenumgraecum*) on experimental gastric ulcer in rats[J]. *J Ethnopharmacology*, 81:393-397

Tapie N, Malhiac C, Hucher M. 2008. Grisel. Determination of galactose and mannose residues in natural galactomannans using a fast and efficient high-performance liquid chromatography/UV detection[J]. *J Chromatography A*, 1181:45-50

Wu Y(吴彦), Zhou SB(周守标), Wan A(王安). 2005. Analysis and comparison of polysacchride content in *Lycoris*(石蒜属植物多糖组成的分析比较研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(3):264-268

Yang YL(杨永利), Bai YH(白玉华), Li KM(李孔民). 1995. Aanalysis of the monosaccharides in *Sophora* bean gum(槐豆胶单糖组分分析)[J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai*(南开大学学报), 28(3):104-106

Yang YL(杨永利), Guo SJ(郭守军), Luo JD(罗军德), et al. 2006. Analysis of polysaccharide composition of *Sophora alopecuroides* seed by GC and TLC(苦豆子胶多糖组分气相色谱与薄层色谱分析)[J]. *Food Res Development* (食品研究与开发), 27(11):159-162

Zhao RB(赵仁邦), Liu MJ(刘孟军), Ge W(葛微), et al. 2004. Determination of carbohydrates in Chinese Jujube by using HPLC(高效液相色谱法测定枣中的糖类物质)[J]. *Food Sci* (食品科学), 25(8):138-142



(上接第 428 页 Continue from page 428)

Lai PH(赖普辉), Tian GH(田光辉), Gao YN(高艳妮). 2008. GC-MS analysis of the composition of petroleum extraction from stem of *Panax japonicus*(钮子茎中石油醚提取物成分的 GC-MS 分析)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 36(23):10026-10027, 10231

Li F(李昉), Zhong HM(钟惠民), Wang XJ(王现杰). 2006. Chemical study of *Tetraena mongolica*(四合木的化学成分研究)[J]. *Nat Pro Res Develop*(天然产物研究与开发), 18:948-950

Li B(刘兵), Gao WF(高雯芳), Liu Q(刘强). 2008. Separation and bio-active identification of the nematocidal substances from *Tetraena mongolica* extract (四合木甲醇提取物中杀线虫物质

的分离与活性鉴定)[J]. *J Tianjin Normal Univ: Nat Sci Edi*(天津师范大学学报·自然理学科学版), 28(1):12-15

Wang YW(王亚维), Zhang GZ(张国洲), Xu HH(徐汉虹). 2000. Affection of β -sitosterol etal on the esterase activity of the insect mid-gut(β -谷甾醇等化合物对昆虫中肠酯酶活力的影响)[J]. *J Hubei Agric Coll*(青海大学学报), 18(5):7-9

Zhang GZ(张国洲), Wang YW(王亚维), Xu HH(徐汉虹). 2000. Affection of β -sitosterol etc. on the protein content in haemolymph of insects(β -谷甾醇等化合物对昆虫血淋巴蛋白质含量的影响)[J]. *J Hubei Agric Coll*(湖北农学院学报), 3:3