

PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析 杜氏盐藻多糖的单糖组成

戴 军^{1,2}, 朱 松¹, 汤 坚^{1,2}, 王 珺³, 尹鸿萍³, 陈尚卫¹

(1. 江南大学 分析测试中心, 江苏 无锡 214036 2 江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室,
江苏 无锡 214036 3 中国药科大学 生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 建立了柱前 PMP 衍生高效液相色谱法分离检测 8 种中性糖、2 种糖醛酸及 2 种糖胺的方法。筛选出适合 PMP 衍生物分离的色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈, 以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相, 考察了 pH 值和乙腈体积分数对各种糖的 PMP 衍生物的保留及分离的影响, 确定最佳 pH 值为 6.7 最佳乙腈体积分数为 17%; 比较了不同衍生反应时间和萃取除杂前不同量盐酸中和反应产物时糖- PMP 衍生物的峰面积大小变化, 从而得到较佳的样品衍生化条件。应用优化的色谱条件和样品制备方法, 测定了由杜氏盐藻提取纯化的多糖组分 PD4a 和 PD4b 的单糖组成, 其测定结果与高效阴离子交换色谱法的结果基本一致。

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

中图分类号: O657.72 O629.112 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2007)02-0206-05

Analysis of Monosaccharide Compositions in Polysaccharides from *D. Salina* by Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography

DAI Jun^{1,2}, ZHU Song¹, TANG Jian^{1,2}, WANG Min³, YIN Hongping³, CHEN Shangwei¹

(1. Testing & Analysis Center of Southern Yangtze University, Wuxi 214036 China 2. Key Laboratory of
Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China
3. College of Life Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract A simple and sensitive high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of eight kinds of neutral monosaccharides, two kinds of uronic acid and two kinds of glycosamine by pre-column derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) has been developed. The effects of volume ratios of acetonitrile to phosphate buffer and pH of mobile phase on retention and separation of PMP derivatives of the ten monosaccharides were investigated with Eclipse XDB-C₁₈ Column (4.6 mm × 250 mm). The results showed that the optimum volume ratio of acetonitrile to buffer was 17:83 and that the pH was 6.7. The variations of the peak areas of monosaccharides derivatives due to different reaction times and amounts of HCl for neutralization of the reaction systems were compared to obtain better sample preparation conditions. The developed method was successfully applied to the analyses of monosaccharide compositions in the polysaccharide fractions (PD4a and PD4b) from *Duanaliella Salina* (*D. Salina*). The analytical results obtained on the whole agreed with those obtained by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-ampometric detection.

Key words *Duanaliella salina*; Polysaccharides; Monosaccharide; High performance liquid chromatography; Pre-column derivatization; 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone

杜氏盐藻 (*Duanaliella Salina*) 是单细胞、无细胞壁的绿色浮游生物, 人工大规模培养杜氏盐藻主要用于提取 β-胡萝卜素。其提取后的藻渣中存在含量丰富的多糖类物质, 由于具有免疫调节、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性, 其研究开发具有重要意义^[1-2]。而盐藻多糖的单糖组成的分析是其性质、结构及构效关系研究的一项基本且重要的内容。由于单糖极性较强, 结构相近, 且缺乏光学活性, 故为了改善其分离选择性和提高检测灵敏度, 人们常将多糖水解后采用柱前或柱后衍生化色谱法分离和检测^[3-6]。其中 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生化高效液相色谱法反应条件较温和, 产物无立

收稿日期: 2006-10-25 修回日期: 2006-12-25

基金项目: 云南省省校科技合作项目 (2001M AABA 00A 028)

作者简介: 戴 军 (1958-), 男, 江苏盐城人, 副研究员, 硕士; 汤 坚, 联系人, Tel 0510-85863353, E-mail daijpl@163.com.

体异构,紫外检测灵敏度较高,故得到较为广泛的应用^[6-9]。本文针对多糖中可能含有的单糖种类较多的特点,在前人工作的基础上,对该方法进一步进行了较系统深入的优化研究,从多种不同反相柱中筛选出分离选择性较好的 EclipseXDB-C₁₈柱,以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相考察了乙腈比例和 pH 值对 8 种中性糖和 2 种糖醛酸的 PMP 衍生物的保留值及分离效果的影响,比较了不同反应时间的衍生产物峰面积大小和衍生反应后使用不同量盐酸中和体系时的后续萃取效果,并利用优化的方法测定了杜氏盐藻多糖的单糖组成。同时用离子色谱法对其结果进行了验证比较,两方法的分析结果基本一致。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪,包括 G1311A 四元泵, G1315B DAD 检测器, G1313A 自动进样器, G1379A 在线脱气机, G1316A 柱温箱, Agilent1100 化学工作站(美国 Agilent 公司); ICS3000 离子色谱仪(美国 Dionex 公司)。

衍生化试剂: 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP), 纯度 99% (美国 Acros Organics 公司); 乙腈, HPLC 级(美国 Tedia 公司); 三氟乙酸, 纯度不低于 99% (国药集团化学试剂有限公司)。

单糖标准品: 葡萄糖(Glc, 99%), 甘露糖(Man, 99%), 半乳糖(Gal, ≥99%) 均购于上海化学试剂公司; 鼠李糖(Rham, ≥99%), 岩藻糖(Fuc, ≥99%), 葡萄糖醛酸(GlcUA, ≥99%), 半乳糖醛酸(GalUA, ≥97%) 均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品; 木糖(Xyl, 98%), 氨基葡萄糖(GlcN, 98%), 氨基半乳糖(GalN, 99%) 均为美国 Acros Organics 公司产品; 核糖(Rib, >99.0%), 阿拉伯糖(Ara, 99%) 均购于厦门星隆达生化试剂有限公司。超纯水; 其它试剂均为分析纯。

杜氏盐藻多糖用内蒙古兰太生物工程公司提供的杜氏盐藻粉提取和纯化制得^[10]。

1.2 混合单糖标样的衍生

分别取 100 μL 的混合单糖标准液(各单糖质量浓度均为 0.36 g/L 左右)与 100 μL 的 0.6 mol/L NaOH 溶液, 置于 1 mL 的具塞试管中混合均匀; 再取 50 μL 的混合液于 5 mL 的具塞试管中, 加 50 μL 0.5 mol/L 的 PMP(0.4355 g/5 mL) 甲醇溶液, 漩涡混匀; 在 70 °C 烘箱中反应 100 min, 取出放置 10 min 冷却至室温; 加 50 μL 0.3 mol/L 的 HCl 中和; 加水至 1 mL, 再加等体积的氯仿, 振摇, 静置, 弃去氯仿相, 如此萃取 3 次。将水相用 0.45 μm 微孔膜过滤后供 HPLC 进样分析。

1.3 样品制备

吸取 100 μL 质量浓度为 4~5 g/L 的多糖样品溶液于 5 mL 的具塞刻度试管中, 加入 100 μL 的 4 mol/L TFA, 充 N₂ 封管, 110 °C 烘箱中水解 2 h^[7,9]; 冷却后打开盖, 加 200 μL 甲醇后用 N₂ 吹干, 如此重复加甲醇并用 N₂ 吹 3 次, 去除 TFA; 加入 50 μL 0.3 mol/L NaOH 溶液充分溶解残渣, 再加 50 μL 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液, 漩涡混匀, 同样在 70 °C 的烘箱中反应 100 min, 冷却后按“1.2”同法中和、萃取, 并用微孔膜过滤。

1.4 色谱条件

1.4.1 液相色谱条件 色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm; 流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐(pH 6.7)缓冲液-乙腈(体积比为 83:17); 柱温: 30 °C; 检测波长: 250 nm; 流速: 1 mL/min; 进样体积: 20 μL。

1.4.2 离子色谱条件 色谱柱: CarboPac PA20 3 mm × 150 mm; 流动相: A 为 H₂O, B 为 250 mmol/L NaOH, C 为 1 mol/L NaAc; 三元梯度洗脱程序: 0~21.0 min, 99.2% A, 0.8% B, 0% C; 21.1~30.0 min, 94.2% A, 0.8% B, 5% C; 30.1~50.0 min, 20% A, 80% B, 0% C。流速: 0.5 mL/min; 积分脉冲安培检测器, 金电极, 四电位波形。进样体积: 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

以 0.1 mol/L 磷酸盐(pH 6.7)缓冲液-乙腈(体积比为 83:17)为流动相, 分别试用 Waters Atlantis

dC₁₈、Waters Symmetry C₁₈、ZORBAX Extend-C₁₈、ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈、Hypersil AA-ODS、Venusil XDP C₁₈ 6 种不同反相柱 (均为 250 mm × 4.6 mm i.d. 5 μm) 进行“1.1”中所述 8 种中性糖和 2 种糖醛酸的分离, 结果表明 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱分离效果较好, 且分析时间较短 (图 1)。

2.2 流动相 pH 及乙腈体积分数对分离的影响

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 是一重要的影响因素, 文献选用的 pH 大多为 5~6 左右^[6, 8, 10]。本文先用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0)-乙腈作流动相, 考察了乙腈比例对上述 8 种中性糖和 2 种糖醛酸在 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱上的保留值及分离效果的影响, 结果显示: 乙腈的体积分数为 17% 时分离较好。实验进一步考察了缓冲液的 pH 对各种糖的保留值及分离效果的影响。结果表明: pH 为 6.7 左右时分离效果最佳, 分析时间较短, 出峰间距较均匀。图 1 显示在该最佳条件下两种糖胺也可与这 8 种中性糖和 2 种糖醛酸同时分离 (两组混标色谱图显示于同一坐标中)。本文方法不需梯度洗脱即可同时实现 12 种单糖-PMP 衍生物的分离, 比文献中的分离效果好, 且同时分离的单糖较多。

2.3 衍生化反应时间的选择

文献中的衍生化反应时间大多为 30 min^[6-7, 9], 个别选用 2 h^[8]。本文在其它条件 (如“1.2”所述) 相同情况下, 将上述 8 种中性糖和 2 种糖醛酸的混合标样分别采用不同反应时间 (30、50、70、100 和 120 min) 进行衍生化, 考察衍生化产物的峰面积大小变化, 结果表明: 反应时间为 100 min 时各种糖的 PMP 衍生产物的峰面积均为最大值, 70 min 次之; 100 min 时各种糖的 PMP 衍生产物总的峰面积比 30 min 大 30% 左右, 故衍生化反应时间选为 100 min。

2.4 酸度对萃取效果的影响

衍生反应完成后, 为去除过量的衍生化试剂, 需用氯仿萃取。由于如图 2 所示的 PMP-醛糖衍生产物的化学结构中含有碱性基团 (在较高 pH 值时不解离, 因而易被氯仿萃取而损失), 故在萃取前中和反应体系中的碱所用的盐酸量对糖的 PMP 衍生物在萃取过程中的定量回收或损失应有一定的影响。若中和不够, pH 较高, 糖的 PMP 衍生物在氯仿中有一定的溶解度, 在萃取中的损失较显著^[7]。因此文献中有使用等当量的盐酸中和反应液中的氢氧化钠^[6], 也有使用过量的盐酸中和并使 pH 为酸性 (pH 3~4^[7] 或 4~5^[8], 即相当于本法中使用 57 μL 或 62 μL 的 HCl 中和)。本文考察比较了不同体积 (50、57、62、67 μL) 的 HCl (0.3 mol/L) 中和后的萃取效果, 结果表明, 使用等当量的盐酸 (50 μL) 中和即可, 此时大多数单糖-PMP 衍生物的峰面积较大, 且 10 种糖衍生物的总的峰面积最大。此现象说明 pH 值太低也会增大单糖-PMP 衍生物的损失, 这可能是因为在酸性条件下, 衍生产物不太稳定。

2.5 检测线性及检出限

将 8 种中性糖和 2 种糖醛酸配制成一系列不同浓度的混合标样, 分别按“1.2”衍生化, 并在“1.4”所述条件下进样检测, 以测得的各种糖的峰面积对相应浓度作工作曲线, 结果见表 1。以 3 倍信噪比计得这 10 种单糖的检出限为 0.081~0.271 nmol (表 1)。由此可见, 本方法的检测线性很好, 线性范围较宽, 检测灵敏度较高。

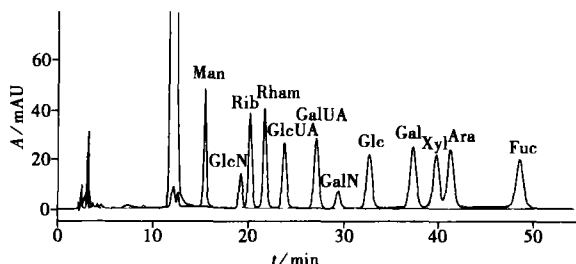


图 1 12 种单糖-PMP 衍生物的色谱分离图
Fig. 1 Chromatograms of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatives of twelve kinds of monosaccharides

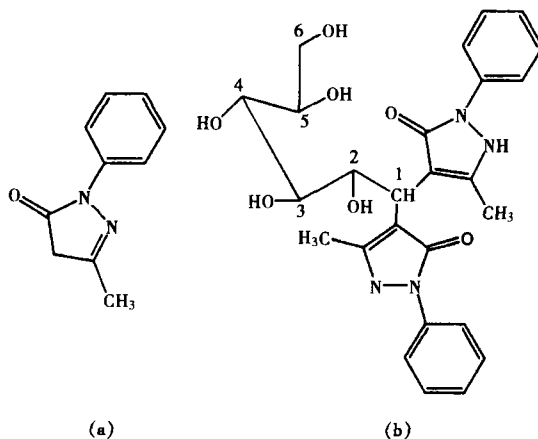


图 2 PMP (a) 与 PMP-Glc 衍生物 (b) 的结构式
Fig. 2 Structures of PMP (a) and PMP-glucose derivatives (b)

表 1 方法的检测线性及检出限

Table 1 Calibration curves and detection limits of ten monosaccharides

Sugar	Regression equation	Correlation coefficient		Linear range		Detection limit	
		R^2		$c/(mmol/L)$		$n/mmol$	
Man	$Y = 373.81X + 2.0651$	0.9999		0.0104~8.33		0.081	
Rib	$Y = 371.06X - 5.5432$	0.9998		0.0117~9.38		0.12	
Rham	$Y = 373.4X + 5.0464$	0.9998		0.0114~9.09		0.17	
GlcUA	$Y = 342.33X - 21.728$	0.9983		0.00964~7.72		0.20	
GaUA	$Y = 406.76X - 12.711$	0.9996		0.0101~8.06		0.20	
Glc	$Y = 336.34X - 6.5353$	0.9998		0.0102~8.15		0.13	
Gal	$Y = 406.73X - 7.0665$	0.9998		0.0103~8.21		0.16	
Xyl	$Y = 312.22X - 10.084$	0.9995		0.0124~9.91		0.27	
Ara	$Y = 389.78X - 6.5008$	0.9999		0.0122~9.76		0.14	
Fuc	$Y = 375.58X - 3.0272$	0.9998		0.0114~9.08		0.10	

Y: peak area; X: sugar concentration (mmol/L)

2.6 杜氏盐藻多糖的单糖组成测定

按“1.3”中的水解和衍生化方法及“1.4”中的色谱条件测定了纯化后的两个主要盐藻活性多糖级分^[10]的单糖组成, 其结果和色谱分离图谱见表 2 和图 3。PD4a 和 PD4b 的各糖组分峰的定性除据保留时间和 DAD 紫外光谱图外, 还用液相色谱-质谱联用分析给予验证 (LC-MS 分析内容另文发表)。在 PD4a 图谱中, 分别靠近核糖 (Rib) 和葡萄糖 (Glc) 峰前均有一小峰, 两者保留时间分别与葡萄糖胺和半乳糖胺标样的 PMP 衍生物保留时间很接近, 但用 LC-MS 分析证实这两峰均不是糖胺。为了以不同方法验证本文方法的定量结果, 同时用离子色谱法^[11]也测定了这两个多糖级分水解后的单糖组成, 其结果与 PMP 柱前衍生化法基本一致 (见表 2)。

表 2 杜氏盐藻多糖级分 PD4a 和 PD4b 的单糖组成 (摩尔分数 $x\%$, $n=3$)

Table 2 Monosaccharide compositions of two polysaccharide fractions (PD4a and PD4b) from *D. salina* (mol fraction $x\%$, $n=3$)

Fraction	Method	Man		Rib		Rham		GlcUA		GaUA	
		Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$
PD4a	PM P	1.57	3.54	1.32	3.17	2.36	3.22	0.78	5.22	1.64	4.80
	IC	1.55	2.72	1.33	3.24	2.87	3.98	0.81	4.87	1.70	4.32
PD4b	PM P	0.87	4.87	68.11	2.92	0.75	3.04	0.00	/	0.00	/
	IC	0.83	3.79	67.96	2.65	0.69	4.02	0.00	/	0.00	/

Fraction	Method	Glc		Gal		Xyl		Ara		Fuc	
		Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$	Average	RSD $s_r\%$
PD4a	PM P	5.18	3.31	31.53	3.24	24.36	2.93	26.96	3.29	4.30	2.87
	IC	5.54	2.16	32.06	2.57	22.38	2.84	26.92	3.05	4.84	3.19
PD4b	PM P	8.21	2.07	7.81	2.22	6.84	3.16	6.47	3.73	0.94	3.45
	IC	8.17	2.13	7.89	2.30	6.88	2.29	6.54	3.97	1.04	3.06

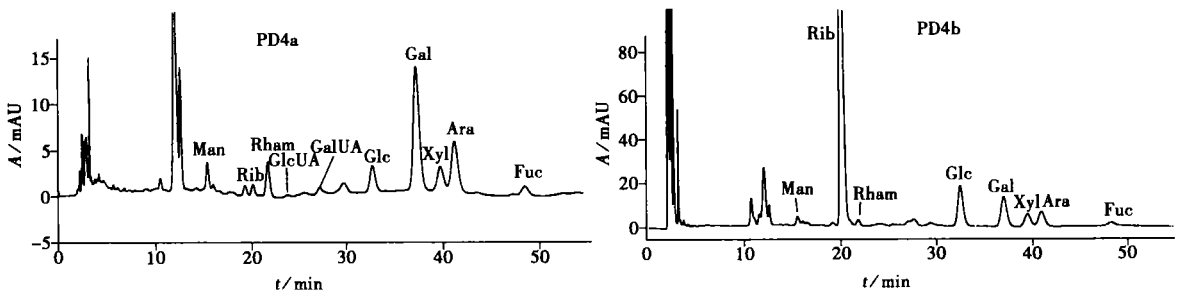


图 3 杜氏盐藻多糖级分 PD4a 和 PD4b 水解样品的 PMP 衍生化产物的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of PMP derivatives of acid hydrolyzates of two polysaccharide fractions (PD4a and PD4b) from *D. salina*

3 结 论

本文建立的 PMP 柱前衍生化高效液相色谱分析单糖的方法准确可靠, 灵敏度较高, 可同时分离检

测的单糖数量较多, 取样量少, 且分离效果较理想。本法尤其适用于微量多糖样品的单糖组成测定。

由本法测定的杜氏盐藻活性多糖级分的结果显示, PD4a中主要含有半乳糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖及盐藻糖 5 种中性糖, 还含有少量糖醛酸; 另一种多糖级分 PD4b中主要含有核糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖及木糖 5 种中性糖, 不含糖醛酸。

致谢: 戴安中国有限公司北京应用研究中心的梁立娜博士和上海农科院食用菌研究所的刘艳芳工程师对本文的离子色谱分析实验给予热心帮助, 谨表衷心谢意!

参考文献:

- [1] 丁 新, 李玲凤. 关于盐藻多糖的研究 [J]. 海湖盐与化工, 1996, 24(6): 4- 6
- [2] FABREGAS J GARCIA D, FERNANDEZ- ALONSO M. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae [J]. Antiviral Res 1999, 44 (1): 67- 73
- [3] HONDA S. Post-column derivatization for chromatographic analysis of carbohydrates [J]. J Chromatogr A, 1996, 720: 183- 199.
- [4] ENGLYST H N, QUIGLEY M E, HUDSON G J. Determination of dietary fibre as NSP with GLC, HPLC or spectrophotometric measurement of constituent sugars [J]. Analyst 1994, 119: 1497- 1509
- [5] MEYER A, RABA C, FISCHER K. Ion-pair RP-HPLC Determination of sugars, amino sugars and uronic acids after derivatization with *p*-aminobenzoic acid [J]. Anal Chem, 2001, 73: 2377- 2382
- [6] 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: 351- 357.
- [7] STRYDOM D J. Chromatographic separation of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-derivatized neutral, acidic and basic alloses [J]. J Chromatogr A, 1994, 678: 17- 23
- [8] FU D, O'NEILL R A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoprotein by high-performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1995, 227: 377- 384
- [9] 马定远, 陈 君, 李 萍, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成 [J]. 分析化学, 2002, 30(6): 702- 705.
- [10] 戴 军, 尹鸿萍, 陈尚卫, 等. 杜氏盐藻多糖的高效体积排阻色谱保留特性及其分析方法的研究 [J]. 色谱, 2006, 24(6): 560- 565
- [11] QUIGLEY M E, ENGLYST H N. Determination of the uronic acid constituents of non-starch polysaccharides by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection [J]. Analyst 1994, 119: 1511- 1518

(上接第 205 页)

- [12] ALAEE M, SERGEANT D B, KONOMO M G, et al. A gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (GC/HRMS) method for determination of polybrominated diphenyl ethers in fish [J]. Chemosphere, 2001, 44: 1489- 1495
- [13] de BOER J. First worldwide interlaboratory study on polybrominated diphenyl ethers [J]. Organohalogen Comp 2000, 45: 118- 121.
- [14] MARSH G, HU J, JAKOBSSON E, et al. Synthesis and characterization of 32 polybrominated diphenyl ethers [J]. Environ Sci Technol 1999, 33: 3033- 3037.
- [15] 张建清, 李敬光, 吴永宁, 等. 同位素稀释的气相色谱/高分辨质谱联用测定食品中二噁英和共平面多氯联苯 [J]. 分析化学, 2005, 33(3): 296- 300
- [16] ELJARRAT E, de LA CALA, BARCELÓ D. Potential chlorinated and brominated interferences on the polybrominated diphenyl ether determinations by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2003, 1008: 181- 192