

柱前衍生 HPLC 法分析椴栲多糖中单糖组成及 PTP1B 抑制活性

哈及尼沙¹, 美丽万·阿不都热依木¹, 李改茹¹, 阿吉艾克拜尔·艾萨²(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 建立柱前衍生反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定椴栲多糖中单糖的组成及摩尔比, 检测椴栲多糖的蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B(PTP1B)抑制活性。**方法** 采用水提醇沉法提取椴栲多糖, 并用 PTP1B 体外模型进行抑制活性测定。椴栲多糖样品经三氟醋酸(TFA)(2 mol·L⁻¹)和硫酸(2 mol·L⁻¹)的混合溶液降解为单糖后, 经 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化, 利用 RP-HPLC 法, 检测单糖的 PMP 衍生物。**结果** 椴栲多糖中含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等单糖, 摩尔比为 0.10 : 0.72 : 1.12 : 4.23 : 4.73。椴栲多糖具有良好的 PTP1B 抑制活性, 其 IC₅₀ 为 2.068 μg·mL⁻¹, 初步推测椴栲多糖具有抗 II 型糖尿病的潜力。**结论** 该方法具有简便、快速、重现性好的特点, 可用于椴栲多糖的单糖组成分析及质量控制。

关键词: 椴栲多糖; 柱前衍生化; 单糖; 反相高效液相色谱; 蛋白酪氨酸磷酸酯酶-1B

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0404-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.021

Analysis of Monosaccharide Compositions and Their PTP1B Inhibitory Activities of *Cydonia oblonga* Mill. Polysaccharides by HPLC Precolumn Derivation

Hajinisha¹, MERIBAN Abdureyim¹, LI Gairu¹, HAJI Akber Aisa²(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011 Xinjiang, China; 2. Xinjiang Technology Institute of Physics and Chemistry, China Academy of Sciences, Urumqi 830011 Xinjiang, China)

Abstract: **Objective** To establish a precolumn derivation RP-HPLC method for the determination of the monosaccharide compositions in *Cydonia oblonga* Mill. polysaccharides, and to test their inhibitory activities of *Cydonia oblonga* Mill. polysaccharides on protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). **Methods** The polysaccharides were extracted by hot distilled water, and precipitated by alcohol. An in vitro screening model was applied to test the PTP1B inhibitory activities. The polysaccharides were derived with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP) after hydrolyzed with 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ and trifluoroacetic acid(TFA), and then the PMP derivatives of monosaccharides were separated by RP-HPLC. **Results** *Cydonia oblonga* Mill. polysaccharides had the monosaccharide compositions of mannose, rhamnose, glucose, galactose, and arabinose with the molar ratio of 0.10, 0.72, 1.12, 4.23, and 4.73, respectively. Moreover, *Cydonia oblonga* Mill. polysaccharides showed certain PTP1B inhibitory activity with IC₅₀ value of 2.068 μg·mL⁻¹. **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and reliable. It can be applied for the analysis of monosaccharide compositions and the quality control of *Cydonia oblonga* Mill. polysaccharides.

Keywords: *Cydonia oblonga* Mill. polysaccharides; Precolumn derivation; Monosaccharides; RP-HPLC; Protein tyrosine phosphatase 1B

椴栲(*Cydonia oblonga* Mill.)为蔷薇科椴栲属落叶 营养价值高, 含有多糖、蛋白质、挥发油、有机酸、灌木或小乔木椴栲的果实^[1], 其芳香味浓, 口味好, 黄酮、维生素、矿物质等多种成分^[2]。具有补脑益

收稿日期: 2013-02-28

作者简介: 哈及尼沙, 女, 副教授, 研究方向: 药用植物研究。Email: ajinsa@sina.com。

心、健脾胃、健胃消食、降压、降脂、降糖、止咳、止泻等功效^[3]，是一种天然的药食两用植物。多糖是槭椴中的主要成分之一，现代研究表明，多糖具有免疫调节、抗病毒、抗肿瘤、降血脂、降血糖、抗疲劳以及预防老年白内障和糖尿病引起的视网膜病变的并发症等活性^[4]。蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B)是胰岛素信号转导关键的负调控子，抑制 PTP1B 的作用已成为一种新的治疗胰岛素抵抗 (IR)、II 型糖尿病(T2DM)和肥胖的方法^[5]。国内外尚无有关槭椴多糖单糖组成及生物活性有关的研究报道。本文采用柱前衍生化高效液相色谱法对槭椴多糖进行单糖组成和含量测定研究，并采用 PTP1B 体外模型首次对槭椴多糖进行降血糖的活性筛选研究，为今后槭椴多糖的开发利用及质量控制提供基础依据。

1 仪器与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪(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，美国安捷伦科技有限公司；pH 计，上海雷磁仪器厂；XS205 电子天平，Mettler Toledo 仪器有限公司；Buchi R-210 型旋转蒸发仪，瑞士 BUCHI 公司；EZ-DRY 冷冻干燥机，美国 Filter 公司；HH-4 型智能数显恒温水浴锅，巩义市予华仪器有限责任公司；SpectraMax MD5 型酶标仪，美国 Molecular Devices 公司；DZF-6020 型真空干燥箱，上海一恒科技有限公司。

1- 苯基 -3- 甲基 -5- 吡唑啉酮(PMP，批号：20070525)、三氟乙酸 (TFA，批号：F20080801，分析纯)，国药集团化学试剂有限公司；对照品 D- 葡萄糖、D- 甘露糖、D- 半乳糖、L- 鼠李糖、D- 木糖和 D- 阿拉伯糖均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司，批号分别为 F20081022，F20081128，F20081224，F20080925，F20081026，F20080925；对 - 硝基苯基磷酸二钠 (PNPP)，SIGMA 公司；乙腈，色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司；水为去离子水；其他试剂均为分析纯。

槭椴，2011 年 10 月采自新疆阿图什市上阿图什乡，经中科院新疆生态与地理研究所植物分类研究室沈观冕研究员鉴定为蔷薇科槭椴属槭椴(*Cydonia oblonga* Mill.)的果实。槭椴多糖由本实验室自制。

2 方法与结果

2.1 槭椴多糖的提取 将自然晾干的槭椴粉碎，过 80 目筛。精密称取 20 g，用氯仿：甲醇(1：1 和 1：

10，V/V) 回流提取 2 次，每次 2 h；挥干溶剂，药渣加入 90 % 乙醇 200 mL，回流提取 2 次，每次 2 h，过滤，滤渣挥干溶剂，加 400 mL 蒸馏水回流提取 3 次，每次 2 h，合并提取液，真空减压浓缩至 50 mL，用氯仿：正丁醇(4：1，V/V)混合液除蛋白，反复进行至无蛋白层，移去蛋白层。清液再加入 95 % 乙醇置于冰箱中 4 ℃ 过夜，析出多糖沉淀，离心(1000 r·min⁻¹，5 min)，多糖沉淀依次用乙醇、丙酮和乙醚各洗 2 次，45 ℃ 真空干燥 2 h 后，即得槭椴多糖。

2.2 酶活性分析 槭椴多糖用适量 DMSO 溶解，取 1 μL 加入缓冲液反应体系中(pH 7.3，20 mmol·L⁻¹ HEPES，1 mmol·L⁻¹ EDTA，100 mmol·L⁻¹ NaCl，1 mmol·L⁻¹ DTT，50 mmol·L⁻¹ 柠檬酸)至 100 μL，加入底物 pNPP 20 μL，加入 PTP1B 蛋白溶液 1 μL，开始反应，37 ℃ 保温 30 min 后，加入 3 mol·L⁻¹ NaOH 10 μL 终止反应。用酶标仪在 405 nm 测定吸光度(OD)值，以钒酸钠作为阳性对照，以不加 PTP1B 为空白对照，计算抑制率。结果发现槭椴多糖在 500 μg·mL⁻¹ 工作浓度下抑制率达到 90 %，IC₅₀ 为 2.068 μg·mL⁻¹。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 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，木糖 0.003 54 g，阿拉伯糖 0.003 02 g，置 10 mL 容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，摇匀，即得对照品混合溶液。

2.3.2 供试品溶液 精确称取槭椴多糖 20 mg，置于 10 mL 具塞试管内，加入 2 mol·L⁻¹ TFA 和硫酸的混合溶液 2 mL，摇匀，密封，并保持在 110 ℃ 油浴中加热水解 8 h。反应混合物冷却至室温后，1000 r·min⁻¹ 离心 5 min，收集上清液，用 0.3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液中和至 pH 值 7.0，得槭椴多糖水解样品。

2.3.3 衍生化产物的制备 取单糖对照品混合液和供试品溶液各 50 μL，于具塞试管中，分别加入 0.3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠和 0.5 mol·L⁻¹ PMP 甲醇溶液各 50 μL，涡旋混合 30 s，置于 70 ℃ 水浴反应 30 min，取出，冷却至室温，加入 50 μL，0.3 mol·L⁻¹ 盐酸进行中和，加入去离子水 100 μL 稀释混匀，然后加入 1 mL 氯仿涡旋混匀 30 s，静置 5 min，小心用注射器弃去有机层，水相再重复萃取 2 次，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，用于 HPLC 进样分析。

2.4 色谱条件 色谱柱：Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6

mm, 5 μm), 以乙腈 -0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (KH₂PO₄-NaOH, pH6.9)(20 : 80, V/V) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 250 nm; 柱温: 28 ℃; 进样量: 20 μL。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取对照品混合溶液, 按 2.3.3 项下方法衍生化处理后, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 用过滤水 1 : 1 稀释, 按 2.4 色谱条件分别进样 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 μL 测定。以测定的峰面积(Y)为纵坐标, 以相应单糖的进样浓度(X)为横坐标进行线性回归得各单糖标准曲线、相关系数及线性范围, 见表 1。

表 1 6 种单糖标准品的标准曲线(n=5)

Table 1 Calibration curves for six monosaccharide standards					
单糖	保留时间 /min	线性回归方程	r ²	线性范围 / × 10 ⁻⁶ mmol·L ⁻¹	
甘露糖(Man)	20.165	Y=812.8X+32.80	0.9997	0.29~7.14	
鼠李糖(Rha)	26.308	Y=747.2X+14.72	0.9996	0.29~7.14	
葡萄糖(Glc)	37.890	Y=797.7X-13.56	0.9999	0.29~7.14	
半乳糖(Gal)	42.734	Y=904.7X-36.30	0.9999	0.29~7.14	
木糖(Xyl)	43.390	Y=908.5X+30.76	0.9998	0.29~7.14	
阿拉伯糖(Ara)	45.942	Y=1018X-48.19	0.9996	0.29~7.14	

由表 1 可知, 各单糖浓度与峰面积积分值呈很好的线性关系, 适用的浓度范围在 0.29~7.14 × 10⁻⁶ mmol·L⁻¹ 之间, r² ≥ 0.9996, 适合 HPLC 系统分析。

2.5.2 精密度试验 精密吸取对照品混合溶液, 按 2.3.3 项下方法进行衍生, 按 2.4 色谱条件, 连续重复测定 5 次, 甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖标准单糖峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.37 %、0.42 %、0.55 %、0.40 %、0.26 %、和 0.28 %。结果表明, 方法的日内精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取槭楂多糖水解样品, 按 2.3.3 项下方法进行衍生, 按 2.4 色谱条件, 在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别进样, 记录峰面积。甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 1.25 %、2.34 %、2.56 %、3.78 %、2.85 %, 表明样品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.5.4 重复性试验 取槭楂多糖水解样品, 按 2.3.3 项下方法进行衍生, 按 2.4 色谱条件, 重复测定 6 次。甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 0.88 %、1.54 %、0.74 %、1.49 %、1.29 %。结果表明, 该方法的重复性良好。

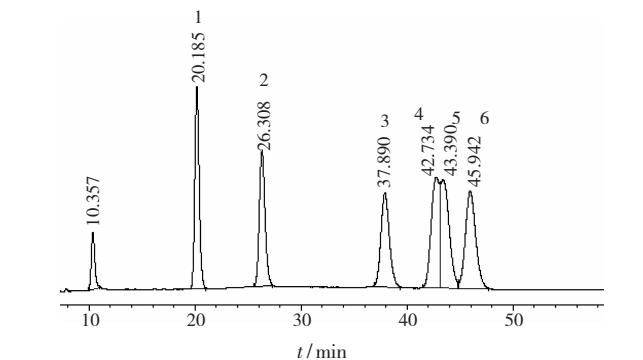
2.6 槭楂多糖样品分析 分别取对照品混合液和供试

品溶液, 按 2.3.2 和 2.3.3 项下方法处理后, 按 2.4 色谱条件测定, 结果见表 2, 对照品与样品色谱图见图 1 和图 2。

表 2 槭楂多糖的组成测定结果

Table 2 Analytical results of component monosaccharides of *Cydonia oblonga* Mill. polysaccharides

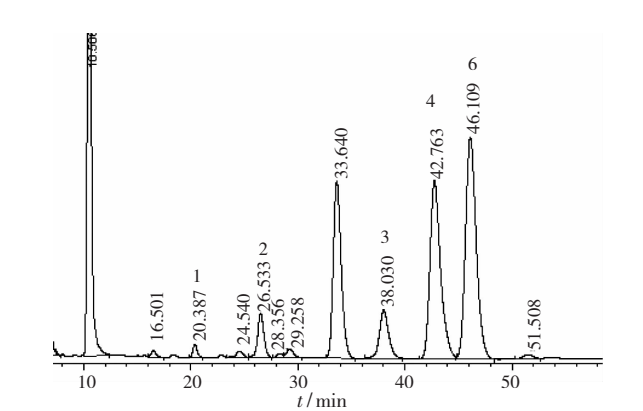
峰	单糖	保留时间 /min	摩尔比	峰面积	含量 /%
1	甘露糖(Man)	20.387	0.10	116.11	0.50
2	鼠李糖(Rha)	26.533	0.72	551.3	2.34
3	葡萄糖(Glc)	38.030	1.12	882.03	3.79
4	半乳糖(Gal)	42.763	4.23	3786.71	16.22
5	木糖(Xyl)	-	-	-	-
6	阿拉伯糖(Ara)	46.109	4.73	4772.54	20.44



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

图 1 单糖标准品的 HPLC 图

Figure 1 HPLC analysis of six standard monosaccharides



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

图 2 槭楂多糖中单糖的 HPLC 分析

Figure 2 HPLC of polysaccharide hydrolysate derivatives

3 讨论

3.1 槭楂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^[6]; 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^[7]; 文献^[8]首次将 1- 苯基 -3- 甲基 -5- 吡唑啉酮 (PMP) 用于糖类物质的衍生。PMP 是还原性糖的最好衍生生化试剂之一, 分析时不产生异构峰, 可与还原糖的醛基反应, 且在 250 nm 处有强烈的紫外吸收, 是近年来发展的单糖衍生化新方法。本研究所用的多糖提取方法和衍生化方法均参考此法, 结合灵敏度、选择性等方面的问题, 通过 PMP 柱前衍生化 HPLC 法, 使糖类物质带上发色基团, 用紫外检测器和 C₁₈ 柱分离分析椴栎多糖的单糖组成, 分析了椴栎多糖中单糖含量, 结果表明方法准确, 重复性好, 能够满足含量测定的要求。按照 2.4 色谱条件检测, 对比混合单糖标准品衍生化后的 HPLC 图谱(图 1)与椴栎多糖水解液衍生化后的 HPLC 图谱(图 2)进行分析, 从标准品的色谱图看, 色谱峰 4 (半乳糖) 与 5 (木糖) 分离度低, 需要色谱条件进一步优化。根据色谱峰峰位即保留时间确定椴栎多糖中含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等 5 种中性单糖, 没有发现木糖。其中, 甘露糖的含量最少, 半乳糖和阿拉伯糖的含量较高, 分别为 16.62 % 和 20.44 %。椴栎多糖色谱图(图 2)中还有保留时间分别为 16.501, 24.540, 29.258, 33.640 和 51.508 min 的糖成分, 待进一步研究确定。根据分析和计算方法, 采用校正因子计算单糖组成比例, 求得椴栎多糖中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖之间的摩尔比为 0.10 : 0.72 : 1.12 : 4.23 : 4.73。PMP 柱前衍生高效液相色谱法简单, 快速, 便捷, 稳定, 可应用于椴栎多糖的单糖组成分析。

3.2 椴栎多糖对 PTP1B 的抑制活性 取椴栎多糖,

按照 2.2 项下方法进行体外 PTP1B 抑制活性测试, 结果发现椴栎多糖在 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 工作浓度下抑制率达到 90 %, IC₅₀ 为 2.068 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。表明椴栎多糖具有较强的 PTP1B 抑制活性。PTP1B 抑制活性已被提议作为治疗 II 型糖尿病和肥胖的治疗, 因此, 椴栎多糖具有预防或治疗糖尿病潜力, 有待更深入地研究。本文为今后椴栎多糖的开发利用及进一步开发新型调节血糖的药物提供科学依据。

参考文献:

- [1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志 (第二卷第二分册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1995: 287.
- [2] 帕丽达·阿不力孜, 阿孜古丽·依明, 买吾丽旦. 新疆椴栎果实化学成分初步研究(一)[J]. 中国民族民间医药, 2009, 12: 7-8.
- [3] 尼米吐拉·艾白都拉, 买买提江·马合木提, 木塔力甫·艾力. 维吾尔医常用药材 (维吾尔文)[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2005: 133.
- [4] 谭仁祥. 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 363.
- [5] 张敬芳, 吴勇, 欧阳静萍, 等. 胰岛素信号转导调节分子 PTP1B 及其抑制剂研究的进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2006, 14 (3): 235-236.
- [6] Leherfeld J. Structural studies of the D-glucomannan isolated from Aloe Vahombe[J]. Anal Biochem, 1981, 115(2): 410-418.
- [7] 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.
- [8] 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.

(编辑: 宋威)

不同产地北沙参中重金属含量的测定

叶国华, 张钦德, 许一平, 吕方军(山东中医药高等专科学校, 山东 烟台 264199)

摘要: 目的 测定北沙参中重金属及有害元素含量, 比较不同产地北沙参中的铜、铅、砷、镉、汞 5 种元素的含量。**方法** 采用火焰原子吸收法测定铜, 采用石墨炉原子吸收法测定铅、镉, 采用原子荧光光谱法测定砷、汞, 并根据标准曲线计算其含量。**结果** 北沙参药材中铜、砷、汞含量均低于国家限量标准, 安国地区北沙参药材中铅、镉含量高于国家限量标准。**结论** 建立的方法为科学制定中药材北沙参中重金属限量标准, 提高北

收稿日期: 2013-03-12

作者简介: 叶国华, 女, 副教授, 研究方向: 中药分析与质量控制的教学与科研。Email: yeguohua_sd@126.com。

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2009-259)。