

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.13.020

高效分子排阻色谱法测定滇黄精多糖的分子量*

顾健¹, 吴伟¹, 沈志冲¹, 刘江云^{2△}

(1. 江苏省南通卫生高等职业技术学校, 江苏 南通 226007; 2. 苏州大学医学部药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要:目的 建立测定滇黄精多糖分子量的高效分子排阻色谱法。方法 色谱柱采用 TSK G3000 PWXL 凝胶柱(300 mm × 7.8 mm, 10 μm), 配有 Shodex RI-101 型示差检测器, 检测波长为 210 nm, 流动相为纯水, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。结果 葡聚糖对照品重均分子量(M_w)的线性范围为 $10.0 \times 10^3 \sim 200 \times 10^3$ 。滇黄精多糖组分 PK-F1 和 PK-F2 中多糖主峰 P1 的保留时间(t_R)为 10.55 min, M_w 为 145 850; 多糖主峰 P2 的 t_R 为 12.78 min, M_w 为 24 565。滇黄精多糖组分 PK-F3 多糖主峰 P3 的 t_R 为 16.91 min, M_w 为 907。**结论** 该方法简易、准确、可靠, 可为滇黄精的质量控制提供参考。

关键词: 高效分子排阻色谱法; 滇黄精; 多糖; 分子量

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)13-0072-03

Determination of Molecular Weight of *Polygonatum Kingianum* Polysaccharide by HPSEC

GU Jian¹, WU Wei¹, SHEN Zhichong¹, LIU Jiangyun²

(1. Nantong Health College of Jiangsu Province, Nantong, Jiangsu, China 226007; 2. School of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China 215123)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance size exclusion chromatography(HPSEC) method for the determination of the molecular weight of *Polygonatum kingianum* polysaccharide. **Methods** The TSK G3000 PWXL gel column(300 mm × 7.8 mm, 10 μm) was adopted with Shodex RI-101 differential detector, the detection wavelength was 210 nm, the mobile phase was pure water, the flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The molecular weight linear range of dextran was from 10.0×10^3 to 200×10^3 . In PK-F1 and PK-F2 *Polygonatum kingianum* polysaccharide, the retention time(t_R) of main peak P1 was 10.55 min and the molecular weight was 145 850, the t_R of main peak P2 was 12.78 min and the molecular weight was 24 565. In PK-F3 *Polygonatum kingianum* polysaccharide, the t_R of main peak P3 was 16.91 min and the molecular weight was 907. **Conclusion** The method is accurate and reliable, which can provide a reference for the quality control of *Polygonatum kingianum*.

Key words: HPSEC; *Polygonatum kingianum*; polysaccharide; molecular weight

黄精收载于 2020 年版《中国药典(一部)》, 为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 的干燥根茎^[1], 始载于《神农本草经》, 具有补气养阴、润肺益肾功效。汉代《名医别录》记载, 黄精为药食同源中药。黄精对免疫功能低下、恶性肿瘤、抑郁症、糖尿病、老年痴呆等都有一定的辅助治疗作用。其主要功效成分黄精多糖^[2-6]为由葡萄糖单元为主构成的高分子聚合物, 结构组成特征可为质量分析提供基础^[7-9]。滇黄精为云南的道地药材, 个大, 多糖含量高, 市场占有率最高^[10-12]。本研究中建立了测定滇黄精中黄精多糖分子量的高效分子排阻色谱(HPSEC)法, 为滇黄精的质量评价提供依据^[13-14]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

司), 配有 Shodex RI-101 型示差检测器(日本岛津公司)和 EC2000 GPC 软件(大连依利特分析仪器有限公司); LE204E 型分析天平(瑞士 Mettler 公司, 精度为 0.000 1 g); TC6K 型电子天平(双杰兄弟集团, 精度为 0.1 g)。

1.2 试剂

滇黄精药材采自云南普洱, 经苏州大学陆叶副教授鉴定为滇黄精 *Polygonatum kingianum* coll. et Hemsl. 的根茎。葡聚糖包括 T2000, T200, T110, T70, T40, T20, T10, 重均分子量(M_w)见表 1, 购自默克试剂公司; 葡萄糖(分析纯, 上海国药集团化学试剂公司); 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验^[15]

色谱柱: TSK G3000 PWXL 型凝胶柱(300 mm × 7.8 mm, 10 μm), 配有 Shodex RI-101 型示差检测器; 检测波长:

*基金项目: 江苏省科技厅现代农业项目[BE2018322]; 江苏省第十四批“六大人才高峰”项目[SWYY-167]。

第一作者: 顾健, 女, 硕士, 讲师, 研究方向为天然药物学, (电子信箱) gujian2015@126.com。

△通信作者: 刘江云, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为天然药物化学, (电子信箱) liujiangyun@suda.edu.cn。

210 nm;流动相:纯水;流速:0.5 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。在此色谱条件下,测得葡聚糖 2 000 的保留时间(t_R)为 9.43 min,葡萄糖的 t_R 为 19.16 min。葡聚糖对照品 T200~T10 和黄精多糖样品的 t_R 值均在 9.43~19.16 min 范围内。

2.2 样品与溶液制备

滇黄精多糖样品:取滇黄精药材 500 g,用蒸馏水 5 L 回流提取 1.5 h,残渣同法回流 1 次,合并提取液,缓慢添加乙醇至终浓度 50%,静置过夜,过滤,60 ℃干燥得黄精多糖组分 PK-F1 43.6 g;滤液继续添加乙醇至终浓度 75%,同法静置,过滤,干燥得组分 PK-F2 31.2 g;滤液浓缩至 250 mL,同法添加乙醇至终浓度 90%,静置,过滤,干燥得组分 PK-F3 16.8 g。

对照品溶液:分别取 1.2 项下葡聚糖各 25 mg,置 5 mL 容量瓶中,加水加热溶解,定容,即得。

供试品溶液:分别取上述 PK-F1,PK-F2,PK-F3 样品各 25 mg,精密称定,置 5 mL 容量瓶中,加水加热溶解,定容,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察:吸取 2.2 项下系列葡聚糖对照品溶液进样检测,记录色谱峰的 t_R 。以葡聚糖的 t_R 为横坐标、 M_w 的对数值($\lg M_w$)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $\lg M_w = -0.346 9 t_R + 8.823 7$ ($R^2 = 0.995 5$),表明该条件下线性符合要求。详见表 1。

表 1 葡聚糖对照品线性关系考察结果

Tab. 1 Results of linear relation test of dextran reference

项目	T200	T110	T70	T40	T20	T10
$M_w (\times 10^3)$	200.0	155.2	69.9	41.3	21.4	10.0
$\lg M_w$	5.301	5.191	4.844	4.616	4.330	4.000
t_R (min)	10.24	10.50	11.31	12.09	13.06	13.89

精密度试验:吸取 2.2 项下葡聚糖 T110 对照品溶液 20 μL,进样 6 次,记录色谱峰的 t_R 。结果葡聚糖

T110 的平均 t_R 为 10.50 min, RSD 为 0.84% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:吸取 PK-F1 供试品溶液适量,于室温下 0,2,4,6,8,10,12 h 时进样分析,记录样品的 t_R 。结果 PK-F1 供试品溶液的平均 t_R 为 10.47 min, RSD 为 1.42% ($n=6$),表明方法稳定性良好。

重复性试验:取 PK-F1 供试品适量,精密称定,共 6 份,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录样品的 t_R 。结果 PK-F1 的平均 t_R 为 10.51 min, RSD 为 0.86% ($n=6$),表明方法重复性良好。

检测限确定:按葡萄糖的 3 倍基线噪音值计算,按 2.1 项下色谱条件测定。结果检测限为 0.021 μg/mL。

2.4 样品含量测定

吸取 2.2 项下供试品溶液适量,注入液相色谱仪,测定 t_R ,计算分子量。结果见图 1。PK-F1 和 PK-F2 的主峰相似,其中, P1 的 t_R 为 10.55 min, M_w 为 145 850; P2 的 t_R 为 12.78 min, M_w 为 24 565。PK-F3 中 P3 的 t_R 为 16.91 min, M_w 为 907。

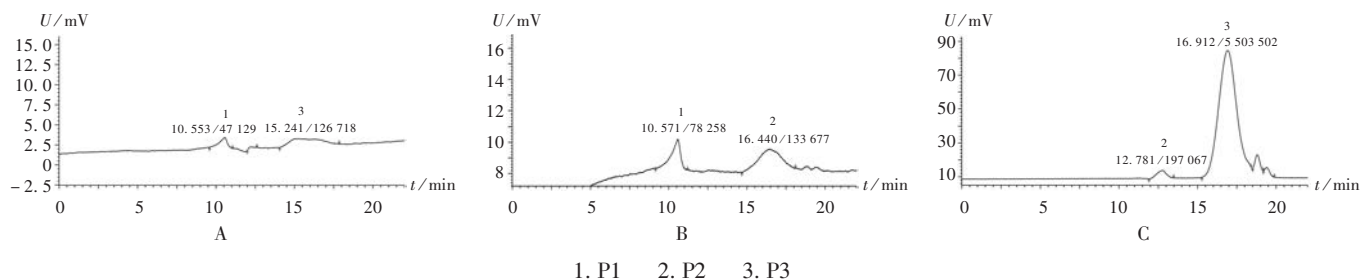
3 讨论

黄精多糖为黄精的主要有效成分,现知已有结构为葡萄糖单元为主的多糖聚合物,其结构复杂,类型多样,对其质量分析方法有待深入研究。分子量是多糖重要的特征性参数,本研究中采用系列分子量的葡聚糖为对照,分别测定了 3 个滇黄精多糖醇沉物样品的 M_w ,由 2.4 项下样品含量测定可知,PK-F1 的 M_w 为 14 5850,未见相关文献报道,其结构需做进一步分析。

黄精多糖作为滇黄精的主要有效成分,为滇黄精质量评定的重要指标。本试验中通过 HPSEC 法,测定了滇黄精多糖的分子量,为进一步探讨其结构提供了参考。本方法简易快速,准确度高,重复性好,为滇黄精分子量测定的有效方法。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:



A. PK-F1 供试品溶液 B. PK-F2 供试品溶液 C. PK-F3 供试品溶液

图 1 高效分子排阻色谱图

1. P1 2. P2 3. P3

A. PK-F1 test solution B. PK-F2 test solution C. PK-F3 test solution

Fig. 1 HPSEC chromatograms