

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)05-0067-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.05.014



基于柱前衍生化高效液相色谱指纹图谱分析西藏木瓜多糖的单糖组成*

武苏莹^{1,2,3}, 吕倩倩^{1,2,3}, 袁志兵^{1,2,3}, 谢和兵^{1,2,3,4,Δ}, 李 佳⁵

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230013; 2. 江苏省南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 江苏神猴医药研究有限公司, 江苏 南通 226133; 4. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 857000; 5. 山东中医药大学, 山东 济南 250000)

摘要:目的 建立西藏木瓜多糖的柱前衍生化高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并测定其单糖含量。方法 采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)对样品进行柱前衍生化,色谱柱为Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(82:18, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为250 nm,柱温为30℃,进样量为20 μL。建立8批不同产地西藏木瓜多糖的HPLC指纹图谱,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)评价指纹图谱的相似度,并测定指认出的主要单糖成分的含量。结果 8批西藏木瓜多糖的HPLC指纹图谱中共识别出10个共有峰,并指认出其中8个共有峰,指纹图谱的相似度均不小于0.95。*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖醛酸、*D*-无水葡萄糖、半乳糖、*D*-木糖的质量浓度分别在0.421~4.210 μg/mL、0.048~0.476 μg/mL、0.728~7.279 μg/mL、3.468~34.675 μg/mL、2.764~27.644 μg/mL、1.383~13.829 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 5, n = 6$);检测限分别为1.62, 2.13, 3.98, 5.73, 3.43, 3.59 ng/mL,定量限分别为4.98, 7.28, 12.69, 19.11, 9.62, 10.32 ng/mL;稳定性、重复性试验结果的RSD均小于4.0%($n = 6$);加样回收率分别为97.35%, 93.17%, 100.99%, 98.63%, 99.33%, 98.53%, RSD分别为1.13%, 2.03%, 2.64%, 2.49%, 2.37%, 1.97%($n = 6$)。样品中上述6种成分的含量分别为6.36~6.92 mg/g、0.67~0.69 mg/g、6.86~12.18 mg/g、42.68~50.69 mg/g、18.71~21.93 mg/g、12.04~15.81 mg/g。结论 所建立的西藏木瓜多糖柱前衍生化HPLC指纹图谱和单糖含量测定方法稳定,结果准确,可用于西藏木瓜多糖的单糖组分分析。

关键词: 西藏木瓜; 多糖; 柱前衍生化; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 单糖; 含量测定

Analysis of Monosaccharide Components of Chaenomeles Thibetica Polysaccharides Based on Pre - Column Derivatization HPLC Fingerprint Method

WU Suying^{1,2,3}, LYU Qianqian^{1,2,3}, YUAN Zhibing^{1,2,3}, XIE Hebing^{1,2,3,4}, LI Jia⁵

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230013; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong, Jiangsu, China 226133; 3. Jiangsu God Monkey Pharmaceutical Research Co., Ltd., Nantong, Jiangsu, China 226133; 4. Tibet God Monkey Pharmaceutical Co., Ltd., Rikaze, Xizang, China 857000; 5. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, China 250000)

Abstract: Objective To establish the pre - column derivatization - high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints

*基金项目: 国家自然科学基金[81470247]; 西藏日喀则市科技计划“揭榜挂帅”项目[日科发2022-26]。

第一作者: 武苏莹, 女, 硕士研究生在读, 研究方向为中药药剂学, (电子信箱)949524666@qq.com。

Δ通信作者: 谢和兵, 男, 博士研究生, 高级工程师, 研究方向为高原医学及传统藏药的产业化开发, (电子信箱)76445044@qq.com。

中国现代中药, 2020, 22(8): 1381-1392.

[3] 旷湘楠, 朱 娜, 刘时乔. 麦冬化学成分研究[J]. 中国药业, 2018, 27(2): 19-22.

[4] 梁渝陵. 麦冬与混用品麦冬的鉴别[J]. 中国药业, 2000, 9(6): 21.

[5] 简美玲, 李 荷, 毛润乾. 麦冬种质资源的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(5): 549-551.

[6] 莫建霞. 常用商品麦冬类药材的比较鉴别[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1074-1076.

[7] 胡 亮, 周 明, 王银红, 等. 基于安全监管的玄麦甘桔制剂中麦冬投料真实性的考察[J]. 华西药学杂志, 2023, 38(6): 700-704.

[8] 李丽莉, 吕轶峰, 宁崇良, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定天王补心丸中山麦冬[J]. 化学分析计量, 2023, 32(10): 72-76.

[9] 郭明里, 张加余, 王 冰, 等. 川麦冬高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业, 2017, 26(4): 1-5.

[10] 吕轶峰, 覃丽娜, 白桂昌, 等. 石斛夜光丸中麦冬掺伪情况考察[J]. 中国药师, 2022, 25(3): 550-554.

[11] 周 恒, 曹依敏, 陈 铭, 等. UHPLC-MS/MS法测定坤宝丸中麦冬及其掺伪品的4种特征成分[J]. 中成药, 2022, 44(6): 1929-1933.

[12] 殷世宁, 陈安珍, 王友兰, 等. 基于液相色谱-串联质谱法的养阴清肺丸中麦冬投料情况研究[J]. 中国药事, 2023, 37(1): 76-86.

[13] 杨瑞山, 陶 玲, 赖月月, 等. 市售麦冬药材等级现状及质量分析研究[J]. 中药材, 2018, 41(7): 1672-1677.

[14] 范明明, 张嘉裕, 张湘龙, 等. 麦冬的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(4): 130-134.

[15] 王 峰, 何 轶, 于健东, 等. 牛黄清胃丸中麦冬掺伪情况研究[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(16): 1332-1335.

(收稿日期: 2024-01-17; 修回日期: 2024-09-02)

of *Chaenomeles thibetica* polysaccharides (CTP), and to determine the content of the monosaccharide components. **Methods** The sample was pre-derivatized by the 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP), the chromatographic column was Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L phosphate buffer (pH 6.7) - acetonitrile (82:18, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. HPLC fingerprints of eight batches of CTP from different production area were established. The similarity of fingerprints was evaluated by the Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine (Version 2012), and the content of the main identified monosaccharide composition was determined. **Results** Ten common peaks were identified in the HPLC fingerprints of eight batches of CTP, and eight common peaks were identified. The similarity of the fingerprints was not lower than 0.95. The linear ranges of *D*-mannose, *D*-glucuronic acid, *D*-galacturonic acid, *D*-anhydrous glucose, galactose, and *D*-xylose were 0.421 - 4.210 μg/mL, 0.048 - 0.476 μg/mL, 0.728 - 7.279 μg/mL, 3.468 - 34.675 μg/mL, 2.764 - 27.644 μg/mL, and 1.383 - 13.829 μg/mL, respectively ($r \geq 0.999$, $n = 6$). The limits of detection (LOD) were 1.62, 2.13, 3.98, 5.73, 3.43, and 3.59 ng/mL, respectively; the limits of quantification (LOQ) were 4.98, 7.28, 12.69, 19.11, 9.62, and 10.32 ng/mL, respectively; The *RSDs* of stability and repeatability test results were lower than 4.0% ($n = 6$). The recovery rates of the above six components were 97.35%, 93.17%, 100.99%, 98.63%, 99.33%, and 98.53%, with *RSDs* of 1.13%, 2.03%, 2.64%, 2.49%, 2.37%, and 1.97%, respectively ($n = 6$). The contents of the above six components in samples were 6.36 - 6.92 mg/g, 0.67 - 0.69 mg/g, 6.86 - 12.18 mg/g, 42.68 - 50.69 mg/g, 18.71 - 21.93 mg/g, and 12.04 - 15.81 mg/g, respectively. **Conclusion** The established pre-column derivatization HPLC fingerprints and monosaccharide content determination method of CTP are stable and accurate, which can be used for the monosaccharide component analysis of CTP.

Key words: *Chaenomeles thibetica* polysaccharide; pre-column derivatization; HPLC; fingerprints; monosaccharide; content determination

西藏木瓜 *Chaenomeles thibetica* Yu 主产于西藏、四川西部,具有平肝舒筋、和胃化湿、健胃功效,藏医将其果实用作木瓜(藏药名赛亚)入药^[1-2],是我国特有名贵药食两用药材^[3],主要含有多糖类、多酚类、黄酮类、有机酸类、三萜类等化学成分^[4]。西藏木瓜的质量标准收载于《中国藏药(第一卷)》,仅有性状、显微、理化等鉴别方法^[5]。目前,对于西藏木瓜的质量研究集中于有机酸、黄酮等成分^[2,6-7],对多糖的研究尚未见报道。多糖又称聚糖,是指由大量单糖通过糖苷键所形成的高分子化合物。多糖作为重要的天然物质,是西藏木瓜的重要活性物质^[4,8]。研究表明,多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化等药理学活性^[9-14],故可作为西藏木瓜药材的质量标志物。中药指纹图谱可全面控制中药的质量^[15-16],故本研究中建立了西藏木瓜多糖的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,分析其单糖组成,并测定主要单糖含量,为西藏木瓜的质量控制及其开发利用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

20B型高效万能粉碎机(常州市强迪干燥设备有限公司); Synergy-UV型纯水仪(德国 Merck Millipore 公司); HH-6型数显恒温水浴锅、SHZ-DC(Ⅲ)型循环水式多用真空泵(上海力辰邦西仪器科技有限公司); XSR205DU/AC型分析天平(美国 Mettler Toledo 公司,精度为十万分之一); DHG-9030 A型鼓风干燥箱, JA10003N型电子天平(精度为千分之一),均购自上海精

其仪器有限公司; DHG-9030A型电热鼓风干燥箱、XH-C型漩涡混合器(常州中捷实验仪器制造有限公司); PHS-3C型雷磁酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司); Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); R214型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); DWXH-10/20型低温冷却循环器(上海科兴仪器有限公司)。

1.2 试药

D-甘露糖对照品(批号为140651-201805,纯度为100.0%), *D*-葡萄糖醛酸对照品(批号为140648-202005,纯度为99.1%), *D*-半乳糖醛酸对照品(批号为111646-201702,纯度为95.1%), *D*-无水葡萄糖对照品(批号为110833-202109,纯度为99.9%), 半乳糖对照品(批号为100226-201807,纯度为100.0%), *D*-木糖对照品(批号为111508-201605,纯度为99.9%), 鼠李糖对照品(批号为111683-201502), 阿拉伯糖对照品(批号为111506-200202), 均购自中国食品药品检定研究院; 苯酚(分析纯,批号为202201110), 浓硫酸(分析纯,批号为20221118), 三氯甲烷(分析纯,批号为20220901), 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP,化学纯,批号为20220316), 磷酸二氢钾(分析纯,批号为20211109), 氢氧化钠(NaOH,分析纯,批号为20220930), 甲醇(色谱纯,批号为20221213), 乙腈(色谱纯,批号为2030316), 均购自国药集团化学试剂有限公司; 盐酸(分析纯,上海泰坦科技股份有限公司,批号为P2141688); 三氟乙酸(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司,批号为C14896618); 试验用水为超纯水; 8批

西藏木瓜药材采自西藏木瓜主要产地,经江苏神猴医药研究有限公司中药中国合格评定国家认可委员会(CNAS)检测实验室鉴定为正品,药材样品信息见表1。

表1 西藏木瓜药材样品信息

Tab.1 Sample information of <i>Chaenomeles thibetica</i>			
编号	产地	经纬度	海拔(m)
S1-S2	西藏昌都芒康县	东经98°31'32",北纬29°30'59"	3 417
S3-S4	西藏拉萨罗布林卡	东经91°6'30",北纬29°39'39"	3 645
S5-S6	西藏林芝墨脱县	东经95°7'16",北纬29°4'59"	2 067
S7-S8	西藏林芝波密县	东经95°5'12",北纬30°6'10"	1 967

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(82:18, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:250 nm;柱温:30℃;进样量:20 μL。在此色谱条件下,衍生化处理的供试品溶液色谱中,与混合对照品溶液对应单糖的色谱峰保留时间一致,且阴性对照无干扰。色谱图见图1。

2.2 溶液制备

分别取D-甘露糖、鼠李糖、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-无水葡萄糖、半乳糖、D-木糖、阿拉伯糖对照品各适量,精密称定,分别置10 mL容量瓶中,加水溶解并定容,配制成质量浓度分别为1.012,1.003,1.001,1.012,3.012,2.011,1.005,2.000 mg/mL的各单糖对照品母液,各取0.5 mL,置同一10 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,即得混合对照品溶液。

取西藏木瓜鲜果,置沸水中烫至外皮呈灰白色,对半纵剖,晒干。取晒干后的西藏木瓜药材样品,粉碎,过20目筛,按料液比1:10(m/V)加入95%乙醇,60℃水浴回流2次,每次1 h,滤过,弃滤液,滤渣置60℃鼓风干

燥箱烘干后,按料液比1:15(m/V)加入蒸馏水,90℃水浴提取2次,每次1 h,滤过,合并滤液,并减压浓缩至每1 mL相当于西藏木瓜样品0.2 g,继续加入95%乙醇至乙醇体积分数为80%,4℃下静置12 h,离心(转速为4 000 r/min)10 min,弃上清液,沉淀用无水乙醇、丙酮交替洗涤至洗液呈无色,40℃鼓风干燥30 min,即得精制西藏木瓜多糖。取精制西藏木瓜多糖0.2 g,精密称定,置顶空瓶中,加2 mol/L三氟乙酸溶液10 mL使溶解,密封,然后将其转移至烘箱中,120℃水解4 h,取出,冷却至室温,滤过,残渣用5 mL水洗涤3次,合并滤液,滤液用3 mol/L NaOH溶液调pH至约7.0,加水定容至50 mL容量瓶中,摇匀,即得供试品溶液^[17]。

不加西藏木瓜药材样品,其余操作方法同供试品溶液,制得阴性对照品溶液。

2.3 衍生化处理

精密移取2.2项下各溶液0.5 mL,分别置5 mL离心管中,依次加入0.5 mol/L PMP甲醇溶液0.5 mL、0.3 mol/L NaOH溶液0.5 mL,混匀,置70℃烘箱中30 min,取出,冷却至室温,加0.3 mol/L 盐酸溶液0.5 mL,混匀,再加三氯甲烷1 mL涡旋萃取3次,弃下层三氯甲烷层,取上层液,置5 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得各衍生化溶液。

2.4 HPLC 指纹图谱建立与分析

2.4.1 方法学考察

精密度试验:取西藏木瓜药材样品(编号为S1)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3项下方法进行衍生化处理,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,以峰6(D-无水葡萄糖)为参照峰。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.65%(n=6),相对峰面积的RSD均小于2.84%(n=6),表明仪器精密度良好。

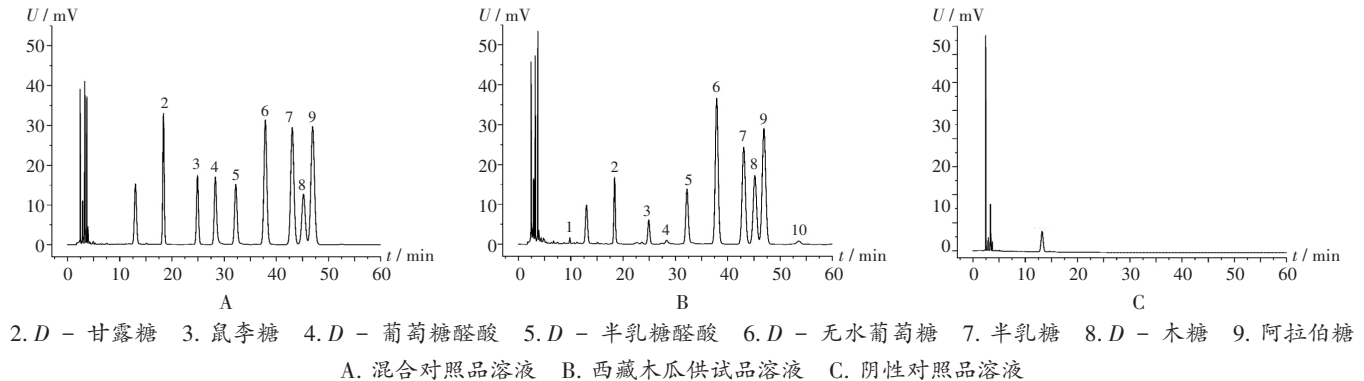


图1 高效液相色谱图

2. D - mannose 3. Rhamnose 4. D - anhydrous glucuronic acid 5. D - galacturonic acid 6. D - anhydrous glucose 7. Galacturonic acid 8. D - xylose 9. Arabinose
A. Mixed reference solution B. Test solution of *Chaenomeles thibetica* C. Negative reference solution

Fig.1 HPLC chromatograms

重复性试验:取西藏木瓜药材样品(编号为S1)适量,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.3项下方法进行衍生化处理,按2.1项下色谱条件进样测定,以峰6(*D*-无水葡萄糖)为参照峰。结果各共有峰相对保留时间的*RSD*均小于0.30%(*n* = 6),相对峰面积的*RSD*均小于2.81%(*n* = 6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取西藏木瓜药材样品(编号为S1)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3项下方法进行衍生化处理,分别于室温放置0,2,4,8,10,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,以峰6(*D*-无水葡萄糖)为参照峰。结果各共有峰相对保留时间的*RSD*均小于0.99%(*n* = 6),相对峰面积的*RSD*均小于2.72%(*n* = 6),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.4.2 指纹图谱生成

取8批西藏木瓜药材样品(编号为S1-S8),分别按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3项下方法进行衍生化处理,按2.1项下色谱条件进样测定,并将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版),采用中位数法,以编号为S1药材样品的色谱图作为参照,设定时间窗宽度为0.1 min,调整图谱间距为40,经多点校正后采用全谱峰匹配生成8批西藏木瓜药材样品的HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱R,共确定10个共有峰。详见图2。

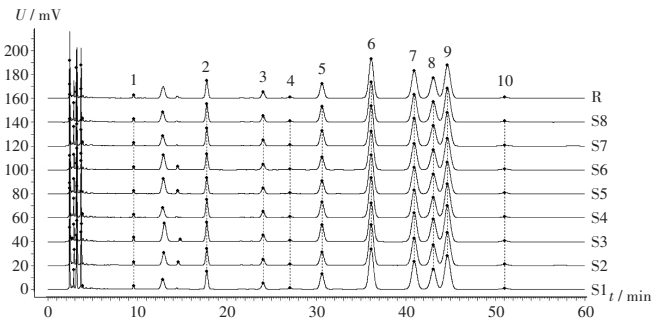


图2 8批西藏木瓜药材样品的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC superposed fingerprints of eight batches of *Chaenomeles thibetica* samples

2.4.3 相似度评价

以对照指纹图谱为参照,计算各批西藏木瓜药材样品指纹图谱的相似度。结果8批西藏木瓜药材样品的指纹图谱相似度均大于0.95,表明不同产地的西藏木瓜药材样品的质量稳定性较好。详见表2。

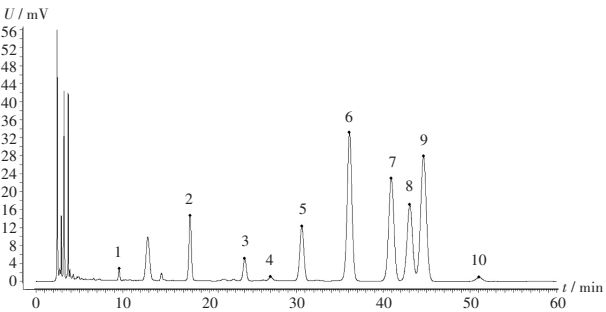
2.4.4 共有峰指认

通过对比对照品溶液的HPLC图谱(图1A)与对照指纹图谱(图3)的相对保留时间,指认8个共有峰,分别为峰2(*D*-甘露糖)、峰3(鼠李糖)、峰4(*D*-葡萄糖醛酸)、峰5(*D*-半乳糖醛酸)、峰6(*D*-无水葡萄糖)、峰7

表2 8批西藏木瓜药材样品指纹图谱相似度评价结果

Tab. 2 Evaluation results of the fingerprint similarity of eight batches of *Chaenomeles thibetica* samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	R
S1	1.000	0.998	0.996	0.997	0.988	0.977	0.971	0.961	0.995
S2	0.998	1.000	0.997	0.998	0.993	0.977	0.974	0.964	0.997
S3	0.996	0.997	1.000	0.999	0.996	0.967	0.962	0.952	0.992
S4	0.997	0.998	0.999	1.000	0.995	0.972	0.967	0.957	0.994
S5	0.988	0.993	0.996	0.995	1.000	0.961	0.959	0.950	0.989
S6	0.977	0.977	0.967	0.972	0.961	1.000	0.999	0.996	0.990
S7	0.971	0.974	0.962	0.967	0.959	0.999	1.000	0.998	0.988
S8	0.961	0.964	0.952	0.957	0.950	0.996	0.998	1.000	0.982
R	0.995	0.997	0.992	0.994	0.989	0.990	0.988	0.982	1.000



2. *D*-甘露糖 3. 鼠李糖 4. *D*-葡萄糖醛酸 5. *D*-半乳糖醛酸
6. *D*-无水葡萄糖 7. 半乳糖 8. *D*-木糖 9. 阿拉伯糖
图3 西藏木瓜药材样品的高效液相色谱对照指纹图谱
2. *D*-mannose 3. Rhamnose 4. *D*-anhydrous glucuronic acid
5. *D*-galacturonic acid 6. *D*-anhydrous glucose 7. Galacturonic
8. *D*-xylose 9. Arabinose

Fig. 3 HPLC reference fingerprint of *Chaenomeles thibetica* sample (半乳糖)、峰8(*D*-木糖)、峰9(阿拉伯糖)。以峰6(*D*-无水葡萄糖)为参照,计算得各共有峰相对保留时间的*RSD*为0~0.90%(*n* = 8),相对峰面积的*RSD*为0~34.05%(*n* = 8)。结果表明,西藏不同产地的西藏木瓜药材样品具有相同的单糖组成,但单糖含量有差异。详见表3。

2.5 单糖含量测定

2.5.1 方法学考察

线性关系考察:精密吸取2.2项下单糖对照品母液,置同一50 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,配制*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖醛酸、*D*-无水葡萄糖、半乳糖、*D*-木糖质量浓度分别为4.210, 0.476, 7.279, 34.675, 27.644, 13.829 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品溶液1, 2, 4, 6, 8, 10 mL,置不同10 mL容量瓶中,加水定容,制备不同质量浓度的混合对照品溶液,按2.3项下方法进行衍生化处理,按2.1项下色谱条件进样测定,以各单糖的峰面积(*Y*)为纵坐标、质量浓度(*X*, $\mu\text{g/mL}$)为横坐标进行线性回归。结果见表4。

表 3 8 批西藏木瓜药材样品 HPLC 图谱共有峰的相对保留时间(RRT)与相对峰面积(RPA)

Tab. 3 Relative retention time (RRT) and relative peak area (RPA) of common peaks in the HPLC chromatograms of eight batches of *Chaenomeles thibetica* sample

峰号	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		RSD(%)	
	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA
峰1	0.262	0.017	0.263	0.009	0.264	0.016	0.265	0.022	0.265	0.017	0.266	0.012	0.268	0.010	0.269	0.012	0.90	30.42
峰2	0.488	0.206	0.490	0.126	0.491	0.216	0.493	0.212	0.494	0.189	0.495	0.180	0.498	0.176	0.499	0.175	0.77	15.60
峰3	0.662	0.095	0.664	0.064	0.666	0.103	0.668	0.098	0.669	0.091	0.671	0.086	0.674	0.084	0.674	0.082	0.66	13.70
峰4	0.748	0.020	0.750	0.012	0.749	0.019	0.749	0.017	0.748	0.015	0.748	0.015	0.748	0.014	0.747	0.013	0.12	18.08
峰5	0.849	0.275	0.850	0.167	0.849	0.301	0.847	0.282	0.846	0.230	0.845	0.231	0.844	0.177	0.843	0.160	0.30	24.27
峰6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00	0.00
峰7	1.134	0.671	1.134	0.672	1.133	0.743	1.132	0.757	1.131	0.690	1.131	0.720	1.130	0.643	1.130	0.643	0.15	6.29
峰8	1.192	0.399	1.192	0.142	1.192	0.620	1.191	0.595	1.188	0.503	1.191	0.439	1.191	0.417	1.191	0.380	0.11	34.05
峰9	1.236	0.787	1.236	0.867	1.236	1.341	1.234	1.321	1.234	1.285	1.233	1.193	1.233	1.232	1.232	1.194	0.13	18.15
峰10	1.414	0.028	1.412	0.026	1.412	0.041	1.410	0.044	1.411	0.042	1.410	0.039	1.409	0.036	1.409	0.030	0.12	19.31

表 4 6 种单糖成分的方法学考察结果(n = 6)

Tab. 4 Results of the methodological investigation of six monosaccharide components (n = 6)

单糖成分	回归方程	r	线性范围 (μg / mL)	检测限 (ng / mL)	定量限 (ng / mL)	RSD(% , n = 6)	
						稳定性试验	重复性试验
D - 甘露糖	Y = 155.45 X - 2.326 3	0.999 8	0.421 ~ 4.210	1.62	4.98	3.12	1.63
D - 葡萄糖醛酸	Y = 135.59 X + 2.835 6	0.999 5	0.048 ~ 0.476	2.13	7.28	2.18	2.88
D - 半乳糖醛酸	Y = 120.62 X - 11.484 0	0.999 5	0.728 ~ 7.279	3.98	12.69	2.34	2.03
D - 无水葡萄糖	Y = 107.49 X - 80.904 0	0.999 4	3.468 ~ 34.675	5.73	19.11	0.53	1.47
半乳糖	Y = 158.15 X + 1.008 3	0.999 8	2.764 ~ 27.644	3.43	9.62	0.11	1.03
D - 木糖	Y = 160.47 X - 8.428 6	0.999 4	1.383 ~ 13.829	3.59	10.32	0.48	1.14

检测限与定量限确定:取 2.2 项下混合对照品溶液适量,加水逐级稀释,按 2.3 项下方法进行衍生化处理,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以信噪比(S / N)为 10:1 时的质量浓度为定量限,以 S / N 为 3:1 时的质量浓度为检测限。结果见表 4。

稳定性试验:取西藏木瓜药材样品(编号为 S1)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下方法进行衍生化处理,分别于室温放置 0,2,4,8,10,12 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表 4,表明供试品溶液在室温放置 12 h 内稳定性良好。

重复性试验:取西藏木瓜药材样品(编号为 S1),按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.3 项下方法进行衍生化处理,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表 4,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的西藏木瓜药材样品(编号为 S1),精密称定,平行 6 份,分别精密加入已知质量浓度的对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下方法进行衍生化处理,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 5。

2.5.2 样品含量测定

取 8 批西藏木瓜药材样品(编号为 S1 - S8),每批平行 3 份,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下方法进行衍生化处理,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算各单糖的含量。结果见表 6,表明不同产地西藏木瓜多糖的单糖含量存在差异,主要体现在半乳糖醛酸、D - 无水葡萄糖、D - 木糖。

3 讨论

3.1 研究样品选择

我国的木瓜品种较多,常见木瓜品种有番木瓜、毛叶木瓜、光皮木瓜、西藏木瓜、皱皮木瓜、日本木瓜^[18]。其中,西藏木瓜的主要产地有西藏拉萨、昌都、林芝及四川西部的甘孜州。曾对比四川甘孜州与西藏林芝的木瓜样品,结果发现甘孜州产木瓜更接近皱皮木瓜,故本研究选择了西藏主要产地的 8 批野生西藏木瓜作为研究样品。

3.2 供试品溶液制备方法选择

西藏木瓜药材中的单糖、寡糖等小分子会干扰多糖的单糖组成分析,导致结果不准确,故需通过提取、

表 5 6 种单糖成分的加样回收试验结果 (n = 6)

Tab. 5 Results of the recovery rate of six monosaccharide components (n = 6)

单糖成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	单糖成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
D-甘露糖	1.387	1.518	2.873	97.89	97.35	1.13	D-无水葡萄糖	10.133	10.542	20.380	97.20	98.63	2.49
	1.387	1.518	2.865	97.36				10.133	10.542	20.466	98.02		
	1.387	1.518	2.839	95.65				10.133	10.542	20.333	96.76		
	1.387	1.518	2.873	97.89				10.133	10.542	20.583	99.13		
	1.387	1.518	2.886	98.75				10.133	10.542	21.028	103.35		
	1.387	1.518	2.853	96.57				10.133	10.542	20.394	97.33		
D-葡萄糖醛酸	0.138	0.200	0.329	95.50	93.17	2.03	半乳糖	4.406	4.022	8.266	95.97	99.33	2.37
	0.138	0.200	0.325	93.50				4.406	4.022	8.492	101.59		
	0.138	0.200	0.322	92.00				4.406	4.022	8.421	99.83		
	0.138	0.200	0.328	95.00				4.406	4.022	8.326	97.46		
	0.138	0.200	0.323	92.50				4.406	4.022	8.390	99.06		
	0.138	0.200	0.319	90.50				4.406	4.022	8.512	102.09		
D-半乳糖醛酸	2.429	2.530	5.068	104.31	100.99	2.64	D-木糖	2.617	2.513	5.064	97.37	98.53	1.97
	2.429	2.530	4.956	99.88				2.617	2.513	5.138	100.32		
	2.429	2.530	4.964	100.20				2.617	2.513	5.128	99.92		
	2.429	2.530	4.972	100.51				2.617	2.513	5.051	96.86		
	2.429	2.530	5.056	103.83				2.617	2.513	5.034	96.18		
	2.429	2.530	4.888	97.19				2.617	2.513	5.143	100.52		

表 6 8 批西藏木瓜药材样品中各单糖含量测定结果
($\bar{X} \pm s, \text{mg} / \text{g}, n = 3$)

Tab. 6 Results of the content determination of monosaccharides
from eight batches of *Chaenomeles tibetica* samples ($\bar{X} \pm s,$
 $\text{mg} / \text{g}, n = 3$)

编号	D-甘露糖	D-葡萄糖醛酸	D-半乳糖醛酸	D-无水葡萄糖	半乳糖	D-木糖
S1	6.92±0.01	0.68±0.00	12.18±0.01	50.69±0.52	21.93±0.29	13.23±0.34
S2	6.89±0.04	0.67±0.01	11.86±0.03	49.35±0.44	20.53±0.13	13.05±0.36
S3	6.85±0.00	0.68±0.03	10.88±0.01	42.68±0.38	19.68±0.05	15.81±0.60
S4	6.36±0.00	0.67±0.02	9.42±0.02	43.84±0.68	18.71±0.12	14.69±0.09
S5	6.52±0.01	0.68±0.01	8.81±0.00	44.64±0.25	19.53±0.10	14.17±0.03
S6	6.45±0.00	0.69±0.01	9.27±0.01	47.02±0.37	21.31±0.04	13.15±0.12
S7	6.68±0.01	0.67±0.02	7.70±0.03	48.27±0.24	20.34±0.06	13.05±0.10
S8	6.67±0.00	0.68±0.00	6.86±0.00	49.07±0.75	20.28±0.03	12.04±0.03

精制过程,以去除小分子糖。本研究中先用95%乙醇回流,再通过水提取、醇沉、离心的方式去除小分子糖,获得精制的西藏木瓜多糖。有文献报道,在去除小分子糖的基础上,还包括采用Sevage法^[19]和透析法^[20]去除多糖的蛋白质和小分子杂质的过程,从而制备更纯净的多糖。但本研究的目的是研究西藏木瓜多糖的单糖组成,而蛋白质等杂质并不干扰多糖的单糖组成,故本研究中的供试品溶液制备方法仅除去小分子糖。

3.3 单糖测定方法选择

目前,常见单糖检测方法有薄层色谱法、离子色谱

法、毛细管电泳法、气相色谱法、HPLC法等^[21]。其中,薄层色谱法存在灵敏度低和显色效果、分离度、重复性差等问题,仅适用于单糖组成的定性分析^[22];离子色谱法的检测过程中使用的NaOH易使糖类成分分解和异构化,影响测定结果,导致准确性不佳^[20];毛细管电泳法使用的色谱柱内径较小,且样品用量少,导致其检测灵敏度低、重复性差^[23];气相色谱法需经过衍生化处理使其转化为具有挥发性的高热稳定性衍生物,操作过程烦琐,且易发生副反应,易对结果造成较大误差^[24];HPLC法具有无挥发性限制、分析速率快、灵敏度高、分离效果好、重复性好等优点,常被用于糖类成分的定性和定量分析^[25-27]。HPLC法测定单糖时分为衍生化法和非衍生化法,非衍生化法一般直接联用蒸发光检测器和示差折光检测器,但其检测灵敏度低,检测限要求较高,价格昂贵,步骤烦琐^[28];衍生化法需将样品用衍生化试剂处理后再联用紫外检测器进行检测,PMP作为一种常用的柱前衍生化试剂,能与单糖形成在250 nm波长处有强吸收的PMP-单糖-PMP衍生物,且反应条件温和、产物稳定。因此,本研究中选择柱前衍生化HPLC法测定样品中单糖成分的含量。

3.4 流动相选择

曾考察不同摩尔浓度的磷酸盐缓冲液对色谱峰的影响,结果磷酸盐摩尔浓度越高,理论板数越高,色谱

峰对称性相对越好,但实际操作中易产生色谱柱堵塞的问题,大大缩短了色谱柱的使用寿命,其原因可能是有机溶剂乙腈会导致磷酸盐析出,最终选择了0.05 mol/L磷酸盐缓冲液;还考察了磷酸盐缓冲液-乙腈不同比例对色谱峰分离效果的影响,结果发现,磷酸盐缓冲液-乙腈比例在(80~85):(20~15)范围内时,单糖能够实现分离,色谱系统耐用性较好。故流动相选择0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(82:18,V/V)。

3.5 单糖成分分析

单糖的指纹图谱中共有10个共有峰,根据目前已知的常见单糖成分,除2个共有峰(峰1和峰10)外,共鉴定出其余8个共有峰的单糖类型,但其中的鼠李糖和阿拉伯糖市售标准品均为供定性使用,无法确定其纯度,故未测定鼠李糖和阿拉伯糖的含量。后续研究中,将继续确证峰1和峰10代表的物质的结构,并在校准鼠李糖、阿拉伯糖纯度的基础上准确测定其含量。

3.6 方法评价

本研究中建立的西藏木瓜多糖柱前衍生化HPLC指纹图谱和单糖含量测定方法稳定,结果准确,可用于西藏木瓜多糖的单糖组成分析。不同产地的西藏木瓜具有相同的单糖组成,但单糖含量存在差异,该差异与海拔高度、光照、生长环境的相关性需进一步研究。

参考文献

- [1] 倪志诚. 西藏经济植物志[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1990:277.
- [2] 欧洋,马静,张朝阳,等. 西藏木瓜的鉴别及其齐墩果酸、熊果酸的测定[J]. 华西药学杂志,2014,29(6):670-672.
- [3] 宋双双,王晓,刘峰,等. 西藏木瓜体外抗氧化活性研究[J]. 食品科技,2014,39(10):245-248.
- [4] 张琪,李智,杜俊辉,等. 木瓜化学成分、生物活性及其应用研究进展[J]. 食品研究与开发,2023,44(19):180-188.
- [5] 青海省药品检验所. 中国藏药[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996:502-507.
- [6] 赵志国,井凤,张敏敏,等. 西藏木瓜HPLC指纹图谱研究及多成分测定[J]. 中草药,2018,49(10):2454-2459.
- [7] 龚复俊,卢笑丛,陈玲,等. 西藏木瓜挥发油化学成分研究[J]. 中草药,2006,37(11):1634-1635.
- [8] 陆斌,邵则夏,宁德鲁,等. 云南木瓜种质资源与果实营养成分[J]. 中国南方果树,2003,32(5):62-63.
- [9] MU S, YANG WJ, HUANG GL. Antioxidant activities and mechanisms of polysaccharides[J]. Chemical Biology & Drug Design,2021,97(3):628-632.
- [10] YE GY, LI J, ZHANG JH, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from Dendrobium wardianum[J]. Carbohydrate Polymers,2021,269:118253.
- [11] LI CX, LIU Y, ZHANG YZ, et al. Astragalus polysaccharide: a review of its immunomodulatory effect[J]. Archives of Pharmacal Research,2022,45(6):367-389.
- [12] 代云云,谢晓蓉,王鹏波,等. 中药多糖降脂作用机理的研究进展[J]. 中药药理与临床,2021,37(5):219-223.
- [13] ZHANG ZX, ZHANG L, XU HS. Effect of Astragalus polysaccharide in treatment of diabetes mellitus: a narrative review[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 39(1): 133-138.
- [14] FANG S, WANG TM, LI YY, et al. Gardenia jasminoides Ellis polysaccharide ameliorates cholestatic liver injury by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2022,205:23-36.
- [15] 于典,黄磊,华国栋,等. 基于HPLC指纹图谱建立医院紫草药材验收标准[J]. 中国药业,2021,30(22):85-87.
- [16] 孙全,徐冲,刘霞,等. 基于指纹图谱及化学识别模式的乌梅炮制品质量评价[J]. 中国药业,2019,28(9):18-20.
- [17] 范芳芳,魏伯平,李宁,等. HPLC法测定藏药蔓菁中葡萄糖含量及其特征图谱分析[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(7):1465-1468.
- [18] 李圣波. 木瓜种质资源保护与创新利用[J]. 中国花卉园艺,2019(6):46-47.
- [19] 赖戈娜,贾文玉,罗思婉,等. 猪苓多糖的PMP柱前衍生化-HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药房,2020,31(7):788-793.
- [20] 刘永玲,赵建国,赵治兵,等. PMP柱前衍生HPLC法测定八月瓜果皮多糖中单糖组成[J]. 食品研究与开发,2023,44(21):131-137.
- [21] 杨雯,王嘉,王栋,等. 多糖中单糖测定方法的研究进展[J]. 北方药学,2020,17(8):181-183.
- [22] 韩威,姜瑞芝,陈英红,等. 银耳多糖单糖组成分析的三种色谱方法比较[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(3):359-361.
- [23] 尹大芳,孙晓杰,郭莹莹,等. 单糖定性定量的色谱分析方法的研究进展[J]. 食品工业科技,2020,41(24):321-329.
- [24] 徐洲,达小梅. PMP柱前衍生HPLC法测定松乳菇多糖的单糖组成[J]. 西昌学院学报(自然科学版),2023,37(3):1-6.
- [25] 齐国敏,曹华斌,林旭聪. 凉粉草多糖水解单糖成分的高效液相色谱指纹图谱分析[J]. 分析试验室,2023,42(4):501-506.
- [26] 付兴情,黄绿,吴增,等. 柱前衍生化-高效液相色谱法分析缅甸刺梧桐胶多糖的单糖组成[J]. 分析科学学报,2021,37(1):75-80.
- [27] 赵非,牛莉娟,刘宗哲,等. 高效液相法测定若羌红枣多糖的单糖组成[J]. 食品科技,2019,44(11):321-326.
- [28] 周彦强,吴光斌,陈发河. PMP柱前衍生化HPLC法测定黄秋葵多糖的单糖组成[J]. 食品科学,2019,40(4):266-271.

(收稿日期:2024-01-03;修回日期:2024-09-17)