

HPLC 法测定海藻药材质量标志物 岩藻糖的含量

胡淑曼^{1,3}, 付志飞¹, 魏宝红^{1,3}, 马晓青^{1,3}, 吴爱英⁴,
卢京光⁴, 刘红兵^{1,2*}

- (1. 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室, 医药学院, 山东 青岛 266003;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237;
3. 青岛海洋生物医药研究院, 山东 青岛 266071;
4. 青岛市食品药品检验研究院, 山东 青岛 266071)

摘要: 目的 建立中药海藻药材岩藻糖含量的高效液相色谱法(HPLC)测定方法。方法 水提得海藻粗多糖, 继而经 2 mol/L 三氟乙酸降解、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮衍生后, 采用 HPLC 测定岩藻糖含量, 并进行方法学考察。结果 岩藻糖在 6.44 ~ 824.52 μg/mL 浓度范围内具有良好的线性关系, $y = 15.074x - 52.068$, $r = 0.9998$; 最低检测限 0.80 μg/mL, 最低定量限 1.61 μg/mL; 供试品溶液在 40 h 内稳定性良好, RSD 0.04%; 精密度、重复性良好, RSD 分别为 0.51% ($n = 6$)、1.15% ($n = 6$); 平均加样回收率为 99.28%, RSD 2.15% ($n = 9$)。结论 建立的方法简便准确、精密度高、重复性好, 可用于海藻药材的质量控制。

关键词: 海藻药材; 岩藻糖; 柱前衍生高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R282

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2021)01-011-05

Determination of characteristic ingredient-fucose in marine TCM *Sargassum* by HPLC

HU Shu-man^{1,3}, FU Zhi-fei¹, WEI Bao-hong^{1,3}, MA Xiao-qing^{1,3}, WU Ai-ying⁴,
LU Jing-guang⁴, LIU Hong-bing^{1,2*}

- (1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory of Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Marine Biomedical Research institute of Qingdao, Qingdao 266071, China; 4. Qingdao Research Institute for Food and Drug Control, Qingdao 266071, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of fucose in marine TCM *Sargassum* by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The polysaccharides were prepared by water extraction. After degraded by 2 mol/L trifluoroacetic acid and derivatized by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, an HPLC method had been developed for determination of fucose. **Results** The linear ranges were 6.44~824.52 μg/mL ($y = 15.074x - 52.068$, $r = 0.9998$) with the limits of detection 0.80 μg/mL and quantification 1.61 μg/mL.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973433); 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技创新工程专项(2018SDKJ0405); 青岛海洋生物医药技术创新中心建设专项项目(2017-CXZX01-3-10)资助

作者简介: 胡淑曼(1988-), 女, 工程师。

* **通讯作者:** 刘红兵, 女, 教授, 博士。研究方向: 海洋中药学。Tel: 0532-82031823; E-mail: liuhongb@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-04-24

Good precision (RSD 0.51%, $n=6$)、repeatability (RSD 1.15%, $n=6$) and stability(40 h in room temperature) were found. The average recovery rate was 99.28% (RSD 2.15%, $n=9$). **Conclusion** The established method was simple, accurate and reproducible, which could provide the reference for the quality control of marine TCM *Sargassum*.

Key words: *Sargassum*; fucose; precolumn derivatived-HPLC; quantitative analysis

海藻 (*Sargassum*) 是《中国药典》收录的 2 种海洋来源植物药 (另一种是昆布) 之一, 来源为马尾藻科植物海蒿子 *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Ag. 或羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 的干燥藻体, 具有消痰软坚散结、利水消肿的功能, 多用于瘰疬, 瘰疬, 瘰疬, 瘰疬, 瘰疬^[1-3]。多糖是褐藻门藻类的主要成分, 主要包括褐藻胶、褐藻糖胶和褐藻淀粉 3 种结构类型^[4], 其中褐藻糖胶 (fucoidan, 亦称岩藻聚糖、褐藻多糖硫酸酯) 具有显著的免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、抗炎等多种活性, 是海藻的主要药效物质^[5-6]。褐藻糖胶由岩藻糖、半乳糖、甘露糖、木糖、糖醛酸等组成, 其中岩藻糖是其特征单糖种类, 可以作为海藻质量控制的标志物之一。中国药典 2015 版【含量测定】以岩藻糖计海藻多糖, 采用 0.1% 蒽酮-硫酸溶液显色, 紫外-可见分光光度法测定。该方法虽对分析仪器要求不高, 但蒽酮-硫酸显色过程中的颜色干扰因素较多, 结果重现性不好, 误差较大。本文建立了测定海藻质量标志物岩藻糖含量的柱前衍生高效液相色谱法, 为提升中药海藻药材质量控制提供一定的方法依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Aglient 1260 II 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); MS 105DU 型电子天平 (上海梅特勒-托利多公司); DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南省方华仪器有限公司); DHG-9147A 型恒温烘箱 (上海精宏实验设备有限公司); HWS24 型恒温水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司); VORTEX GENIUS 型涡旋混合器 (德国 IKA 公司); H1650-W 型台式高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Mili-Q II 型纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

岩藻糖对照品 (批号 112014-201601, 纯度

99.7%, 中国食品药品检定研究院); 色谱纯乙腈、甲醇 (Merk 公司); 三氟乙酸 (TFA)、1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (PMP)、氢氧化钠、盐酸、磷酸二氢钾、三氯甲烷 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

海藻样品采自中国温州洞头, 经中国海洋大学生命学院刘涛教授鉴定为马尾藻科植物羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 的干燥藻体, 标本保藏于中国海洋大学医药学院海洋中药研究室。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱采用日本半井公司 COSMOSIL Packed 5 C₁₈-PAQ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为 0.1 mol/L KH₂PO₄-NaOH 缓冲溶液 (pH 6.0, A) 和乙腈 (B), 等度洗脱 18% B; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取岩藻糖对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得实际浓度为 1 649.04 μg/mL 的岩藻糖储备液。精密吸取上述储备液 0.5 mL, 加水逐级稀释得浓度为 824.52、412.26、206.13、103.06、51.53、25.77、12.88、6.44 μg/mL 的岩藻糖对照品溶液。每个浓度各取 100 μL, 分别加入 0.3 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液各 100 μL, 混匀, 至 70 °C 恒温水浴 90 min, 放冷, 加入 100 μL、0.3 mol/L 盐酸溶液中和。继而加入 500 μL 氯仿, 涡旋 30 s, 离心去除有机相, 重复 3 次。取水相, 过滤, 即得对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

取海藻粉末 (过三号筛) 约 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加水 20 mL, 静置 1 h, 加热回流提取 2 h, 3 000 r/min 离心 10 min; 药渣加 6 mL 水洗涤, 3 000 r/min 离心 10 min; 合并提取液与洗脱液, 转移至 50 mL 容量瓶中, 定容。精密吸

取 200 μL , 加入 2 mol/L 的 TFA 溶液 200 μL , 封管后, 置 100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱 5 h; 精密吸取水解液 200 μL , 加入 200 μL 甲醇, 氮气吹干, 以除去多余的 TFA。加入 100 μL 水溶解, 照对照品溶液的制备项下方法, 自“分别加入 0.3 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液各 100 μL ”起制备, 即得供试品溶液。

1.2.4 线性关系考察

精密吸取 1.2.2 项下对照品溶液 10 μL , 依次进样, 记录色谱图。以岩藻糖质量浓度为横坐标 x , 对照品峰面积为纵坐标 y , 绘制标准曲线。

1.2.5 检测限与定量限

参照 2015 版药典规定, 取逐级稀释的对照品溶液进样检测, 以信噪比为 3 确定检测限, 以信噪比为 10 确定定量限^[7]。

1.2.6 精密度实验

精密吸取同一对照品溶液, 按 1.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 每次 10 μL , 记录岩藻糖峰面积, 计算峰面积 RSD。

1.2.7 稳定性实验

取同一份供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40 h, 按 1.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录岩藻糖峰面积, 计算峰面积 RSD, 考察样品配置后的稳定性。

1.2.8 重复性实验

精密称取同一批海藻粉末 6 份各 1.0 g, 分别按 1.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 1.2.1 项下色谱条件进样分析, 记录色谱峰面积, 计算岩藻糖含量, 求算 RSD。

1.2.9 加样回收率实验

取已知含量的样品粉末 9 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分成 3 组, 按岩藻糖对照品加入量与试样中岩藻糖含量分别为 50%、100%、150%, 加入岩藻糖对照品 2.857 4、5.715 0、8.572 1 mg, 按 1.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 1.2.1 项下色谱条件测定, 计算平均加样回收率。

1.2.10 耐用性实验

取同一海藻样品, 按 1.2.2、1.2.3 项下方法制备对照品溶液及供试品溶液, 按 1.2.1 项下色谱条件进行分析。考察不同品牌型号色谱柱: COSMOSIL 5 C₁₈-PAQ (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)、

Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Sino Pack C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 不同体积流量: 0.8、1.0、1.2 mL/min; 不同柱温: 25、30、35 $^{\circ}\text{C}$; 不同流动相比比例: 17% B、18% B、19% B。计算岩藻糖含量 RSD。

1.2.11 样品含量测定

取海藻样品, 按 1.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 1.2.1 项下色谱条件进样分析, 记录色谱峰面积, 代入标准曲线并计算海藻中岩藻糖含量。

2 实验结果

2.1 系统适用性试验考察结果

对照品溶液及供试品溶液的色谱图见图 1。岩藻糖 PMP 衍生物的保留时间为 20.9 min, 本实验条件下与相邻色谱峰的分度大于 1.5, 与其他组分分离完全, 对称因子符合要求, 理论塔板数大于 6 000, 系统适用性试验符合含量测定要求。

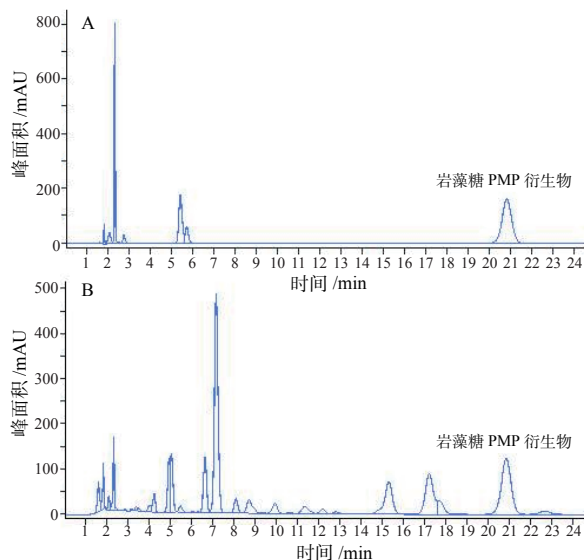


图 1 对照品溶液 (A) 和海藻样品 (B) 的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B) of Sargassum

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系考察

根据上述色谱条件进行测定, 记录峰面积, 以岩藻糖质量浓度为横坐标 x , 对照品峰面积为纵坐标 y , 绘制标准曲线, 得回归方程为: $y = 15.074x - 52.068$, $r = 0.9998$, 岩藻糖在

6.44~824.52 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好(见图2)。

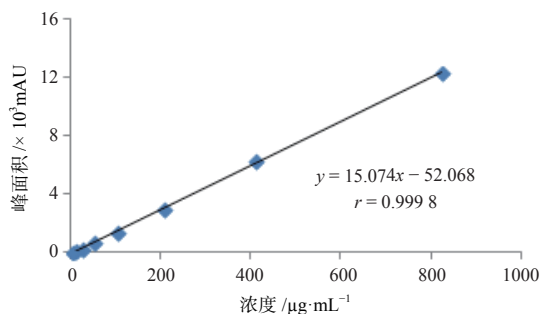


图2 岩藻糖标准曲线图

Fig.2 The standard curve of fucose

2.2.2 检测限及定量限

结果表明,以信噪比为3确定检测限为0.80 $\mu\text{g/mL}$,以信噪比为10确定定量限为1.61 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.3 精密度实验结果

结果显示,岩藻糖峰面积RSD为0.51% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性实验结果

稳定性实验结果显示,室温下放置40 h,岩藻糖峰面积RSD为0.04%,表明供试品溶液室温放置40 h内稳定。

2.2.5 重复性实验结果

重复性实验结果显示,6份海藻样品中岩藻糖平均含量为1.149%,RSD为1.15%,表明方法重复性良好。

2.2.6 加样回收率实验结果

加样回收率结果见表1,该法的回收率限度在95.35%~101.88%之间,平均加样回收率为99.28%,RSD为2.15%,符合药典要求。

表1 回收率实验结果 ($n=9$)

Table 1 The results of recovery test ($n=9$)

分组	取样量/g	样品含有量/mg	加标量/mg	实测量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
50% 加入量	0.502 8	5.776 7		8.501 0	95.35		
	0.509 3	5.851 3	2.857 4	8.686 4	99.22		
	0.507 7	5.833 0		8.624 5	96.70		
100% 加入量	0.506 9	5.823 8		11.483 9	99.04		
	0.507 6	5.831 8	5.715 0	11.654 2	101.88	99.28	2.15
	0.508 1	5.837 6		11.630 1	101.36		
150% 加入量	0.509 3	5.851 3		14.333 5	98.95		
	0.506 9	5.823 8	8.572 1	14.449 1	100.62		
	0.507 4	5.829 5		14.436 4	100.41		

2.2.7 耐用性实验结果

耐用性实验结果显示,变动色谱柱品牌型号、体积流量、柱温、流动相比比例,岩藻糖含量RSD分别为0.48%、0.87%、0.31%、0.44%,对含量测定结果无显著影响,表明方法耐用性良好。

2.3 样品测定

3份海藻样品,按1.2.11项下方法测定,测定结果表明按干燥品计算,海藻中岩藻糖含量分别为1.264%、1.274%、1.292%,平均含量为1.277%,RSD为1.11%。

3 小结与讨论

本文以海藻药材中的标识成分岩藻糖为质控指标,建立了稳定、灵敏、专属性强的柱前衍生

高效液相色谱法测定其含量。因岩藻糖无紫外吸收,目前常用的含量测定方法有比色法^[8-9]、染色法^[10-11]、Gameron法^[12]、气相色谱法^[13]、亲水作用色谱-蒸发光检测(HILIC-ELSD)法^[14]、高效液相色谱-蒸发光检测(HPLC-ELSD)法^[15]、PMP柱前衍生高效液相色谱法^[16-17]、高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法^[10]等。然而比色法及染色法干扰因素多,重现性不好;Gameron法过程繁琐,测定误差大;气相色谱法容易出现色谱峰异构化分裂;液质谱联用法是一种比较精确的方法,但通常主要用于测定微量及痕量组分的分析检测,对于含量较高的物质,高效液相色谱法是1种比较理想的方法,与蒸发光检测器相比紫外检测器灵敏度更高。本文采用优

化的柱前衍生高效液相色谱法建立海藻标识成分岩藻糖含量测定方法, 所建立的方法衍生化反应条件温和, 衍生产物稳定, 分析时不产生异构峰, 检测灵敏度高, 可用于海藻药材与饮片的质量控制。

在制备单糖 PMP 衍生物的步骤中, 衍生化反应完成后需要用有机试剂萃取除去游离 PMP。常用的试剂为氯仿和乙酸异戊酯, 故本研究分别考察了氯仿萃取 3 次、氯仿萃取 2 次 + 乙酸异戊酯萃取 1 次、氯仿萃取 1 次 + 乙酸异戊酯萃取 2 次、乙酸异戊酯萃取 3 次等 4 种方法对测定的影响。从岩藻糖衍生物峰面积来看, 乙酸异戊酯萃取 3 次的回收率最差, 其他三法相当。但在实际操作过程中发现, 如果有机相含有乙酸异戊酯, 萃取时与水相分层不清晰, 极易引起操作误差。鉴于此, 本文用氯仿去除游离 PMP。

本研究供试品溶液的制备中, 提取步骤基本同药典法, 仅料液比不同, 药典法为 1 : 200, 本文为 1 : 20。在多糖水解成单糖的步骤中, 本文考察了水解时间的影响, 结果见图 3, 水解 6 h 的岩藻糖 PMP 衍生物峰面积最大, 此后随着时间的延长, 峰面积反而减小, 提示过长时间的酸水解可能导致单糖结构的破坏, 故本文最终确定水解时间为 5 h。

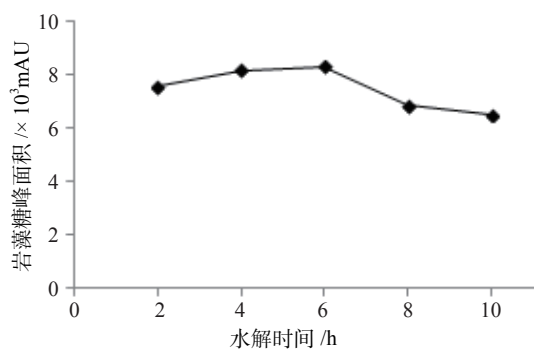


图 3 水解时间对岩藻糖 PMP 衍生物峰面积的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis time on the peak areas of the PMP derivatives

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 管华诗, 王曙光. 中华海洋本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.
- [3] 陈震, 刘红兵. 马尾藻的化学成分与生物活性研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2012, 31(5): 41-51.
- [4] 纪明侯. 海藻化学 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1997.
- [5] 付志飞, 刘红兵, 管华诗. 褐藻糖胶的抗肿瘤作用及构效关系研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2013, 32(4): 76-82.
- [6] ALE M T, MIKKELSEN J D, MEYER A S. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds [J]. Mar Drugs, 2011, 9(10): 2106-2130.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 [M]. 北京: 中国医学科技出版社, 2015: 376.
- [8] 李建杰, 胡婷, 赵峡, 等. 南极海茸多糖咀嚼片的制备及含量测定 [J]. 中国海洋药物, 2019, 38(1): 56-62.
- [9] 黄桂华, 叶静, 张娜, 等. 改进 Dische 比色法测定海带中的岩藻聚糖含量 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(7): 295-299.
- [10] ZHU Z J, ZHU B W, LIU X L, et al. Development and application of a HPLC-MS/MS method for quantitation of fucosylated chondroitin sulfate and fucoidan in sea cucumbers [J]. Carbohydr Res, 2018, 466: 11-17.
- [11] HAHN T, SCHULZ M, ZAYED A, et al. Cationic Dye for the Specific Determination of Sulfated Physaccharides [J]. Anal Lett, 2016, 49(12): 1948-1962.
- [12] 王春霞, 高鹏, 王晓梅, 等. 海带中岩藻聚糖硫酸酯的测定方法比较 [J]. 轻工科技, 2014(9): 15-16.
- [13] 赵增芹, 刘希光, 牛锡珍, 等. 毛细管气相色谱法测定海带提取多糖中的 L- 褐藻糖含量 [J]. 海洋科学, 2004, 28(10): 10-13.
- [14] 陈艳萍, 王宇, 曾令杰, 等. HILIC-ELSD 法测定岩藻聚糖硫酸酯中岩藻糖 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 519-521.
- [15] 吴巍, 孙敬, 冯士超. HPLC-ELSD 测定岩藻聚糖硫酸酯中 L- 岩藻糖 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(21): 90-92.
- [16] GUO H Z, LIU F L, JIA G Y, et al. Extraction optimization and analysis of monosaccharide composition of fucoidan from Saccharina japonica by capillary zone electrophoresis [J]. J Appl Phycol, 2013, 25(6): 1903-1908.
- [17] 王泽文, 冷凯良, 孙伟红, 等. 柱前衍生高效液相色谱法分析海带岩藻聚糖的单糖及糖醛酸组成 [J]. 分析科学学报, 2011, 27(1): 26-30.