

怀山药、怀地黄及其“对药”中多糖的单糖组成及含量比较

徐辉¹, 朱金花², 刘绣华^{1,2*}, 郭海泉³

- (1. 河南省天然产物与免疫工程重点实验室, 河南大学化学生物医学研究所, 河南 开封 475004;
2. 河南大学化学化工学院环境与分析科学研究所, 河南 开封 475004;
3. 河南省武陟县永盛药材加工厂, 河南 焦作 454981)

[摘要] **目的:** 采用1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)柱前衍生化高效液相色谱法(HPLC)建立了多种单糖的分离模式,应用于怀山药、怀地黄单味药材及其“对药”中多糖的单糖含量测定,并对怀山药、怀地黄单味药材和配伍药对中的单糖组成及其含量进行了比较。**方法:** 以Hypersil ODS2色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为色谱柱,以0.05 mol · L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17)为流动相,检测波长254 nm,流速1 mL · min⁻¹,柱温30 °C。**结果:** 怀山药和怀地黄单味药及其“对药”3种多糖水解后均含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖,但未检测到岩藻糖。与山药多糖和地黄多糖相比,怀山药和怀地黄“对药”中多糖的单糖组分甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸和葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖的含量在山药多糖和地黄多糖之间。**结论:** 该方法操作简便快速、结果准确可靠,可用于分析药品及食品中多糖中的单糖组成和含量。

[关键词] 怀山药多糖; 怀地黄多糖; 对药多糖; 高效液相色谱; 柱前衍生化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0061-05

[doi] 10.11653/syfy2013130061

Comparison of the Composition and Content of Monosaccharide in *Dioscorea opposita*, *Rehmannia glutinosa* and the Medicine Pair

XU Hui¹, ZHU Jin-hua², LIU Xiu-hua^{1,2*}, GUO Hai-quan³

- (1. Key Laboratory of Natural Medicine and Immuno-Engineering of Henan Province, Institute of Chemical Biology of Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Institute of Environmental and Analytical Science, College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University, Kaifeng 475004, China;
3. Yongsheng Medicinal Material Processing Company of Wuzhi Country, Jiaozuo 454981, China)

[Abstract] **Objective:** The high performance liquid chromatography (HPLC) method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyranazolone (PMP) was developed to efficiently separate several monosaccharides. And the monosaccharide composition and content of polysaccharides in the medicine pair of *Dioscorea opposita* and *Rehmannia glutinosa* and their single herb medicine were determined and compared. **Method:** A Hypersil ODS2 column with the mobile phase of 0.05 mol · L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.7) - acetonitrile (83:17) at the detection wavelength of 254 nm was used. The flow rate was 1 mL · min⁻¹, the column temperature was kept at 30 °C. **Result:** All three polysaccharides contained mannose, rhamnose, glucuronic acid, glucose, galactose and arabinose. However, fucose was not detected. At the same time, it was found that the content of mannose, rhamnose, glucuronic acid, glucose, galactose and arabinose in their medicine pair was between in the single *Dioscorea opposita* polysaccharides and *Rehmannia glutinosa* polysaccharides. **Conclusion:**

[收稿日期] 20121126(013)

[基金项目] “十二五”国家科技支撑项目(2011BAI06B04);中国博士后科学基金面上项目(20110490992);河南省科技厅科技发展计划项目(092102310282)

[第一作者] 徐辉, 硕士研究生, 从事天然药物化学研究, Tel:15237835372, E-mail:xh724228712@163.com

[通讯作者] *刘绣华, 教授, 博士生导师, 从事天然产物及其活性研究, Tel:0378-2829251, E-mail:liuxiuhua@henu.edu.cn

The developed method is simple, rapid and accurate. Therefore, it is an efficient method to analyze the monosaccharide composition in different kinds of polysaccharides in drug and food.

[Key words] *Dioscorea opposita* polysaccharide; *Rehmannia glutinosa* polysaccharide; medicine pair polysaccharides; HPLC; precolumn derivatization

多糖是怀山药和怀地黄的主要活性成分之一。山药多糖具有降血糖、抗氧化、抗突变、免疫调节等生物活性^[1-2]。地黄多糖具有抗肿瘤、增强免疫力、抗衰老及抗氧化等功效^[3]。有学者曾用气相色谱法对山药多糖、地黄多糖的单糖组成进行了研究^[2-3],但分离纯化步骤十分繁琐,且气相色谱法不适合糖醛酸的分析。由于单糖极性较强,结构相近,且缺乏光学活性,利用示差折光检测器及其他相应的分析方法,无法满足样品对分离度和灵敏度的要求^[4]。因此,可利用具有强紫外吸收的 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)对单糖进行衍生化,不仅可以提高色谱检测的灵敏度,而且衍生条件比较温和,对单糖的结构没有影响^[5-6]。

山药和地黄配伍使用历史悠久,明代医家张锡纯曾记载山药和生地黄按照 1:1~2:1 比例配伍组成的“对药”,具有滋阴清热的功效^[7]。现代药理研究表明,怀山药和怀地黄混合提取一方面可提高得率,而且还有较好的药用效果^[8-10]。鉴于此,本实验在怀山药多糖、怀地黄多糖单独提取的基础上,将两种材料配伍组成“对药”后提取对药多糖,并建立测定多糖中单糖含量的高效液相色谱法,分析研究“对药”多糖与单味药多糖的单糖组成和含量的差异,从而为山药、地黄的临床配伍应用提供一定的实验依据。

1 材料

P230II 高效液相色谱仪,UV230II 紫外检测器,P230II 二元梯度泵,EC2006 色谱工作站(大连依利特分析仪器有限公司);RE52CS-1 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),TDL-5-A 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),DZF-6000 型真空干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司),PHS-P1 型酸度计(上海大普仪器有限公司),BS210S 型电子分析天平(北京赛得利斯公司)。

药材采购自河南省焦作市温县,由河南省中药研究所崔援军研究员鉴定,山药为薯蓣属植物山药 *Dioscorea opposita* Thunb 的干燥根茎,地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的干燥根茎。山药多糖、生地黄多糖和山药地黄混合多糖由本实验室自制;*D*-甘露糖(批号 F20111214)和 *D*-葡萄糖(批号

F20111026)购自国药集团化学试剂有限公司,*D*-半乳糖醛酸(批号 909A031)购自北京索莱宝科技有限公司;*D*-半乳糖(批号 42724)、*D*-鼠李糖(批号 1099799)、*L*-阿拉伯糖(批号 C1223041)和 *L*-岩藻糖(批号 1102021)均购自上海晶纯实业有限公司。衍生化试剂 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP,分析纯,上海晶纯实业有限公司,批号 A1216009),乙腈(色谱纯,天津四友精细化学品有限公司,批号 401019-08360),液相用水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取与纯化 称取 10 g 干燥至恒重的山药粉末,置索氏提取器中,加入低沸点石油醚(沸程 60~90℃)120 mL,85℃脱脂至无色。滤渣挥干后,加入 8 倍量 80% 的乙醇水溶液,于 80℃下回流提取 3 h,重复 2 次。药渣挥干乙醇后加 10 倍量水在 80℃水浴下回流提取 3 h,重复 2 次,合并滤液,减压浓缩。向浓缩液中加入 95% 的乙醇至醇含量达 80%,于 4℃下静置过夜。再离心(3 000 r·min⁻¹,10 min)得多糖沉淀,依次用 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤 2 次,真空干燥至恒重,充分研磨得山药粗多糖。

精制的山药多糖是通过将上述粗多糖采用 Sevag 法^[11-12][三氯甲烷-正丁醇(4:1)]除去蛋白得到的。将粗多糖溶于 50℃重蒸水中,并与三氯甲烷-正丁醇混合液以 5:1 的比例混合,置于分液漏斗中,充分振荡 30 min,静置分层,离心,除去三氯甲烷相和水相之间的变性蛋白,并收集上清液。重复数次,至上清液在 280 nm 处检测无吸收为止。取上清液加入无水乙醇使含醇含量达 80%,静置过夜,离心分离。沉淀物真空干燥至恒重,即得精制的山药多糖。

怀地黄多糖和山药地黄“对药”(1:1)多糖的提取方法同上。

2.2 多糖的水解 分别称取精制的山药多糖、生地黄多糖和山药地黄混合多糖各 20 mg 置于 10 mL 具塞试管内加入 2 mL 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄,100℃水解 8 h 得水解样品溶液。用 4 mol·L⁻¹ NaOH 溶液中和至 pH 约为 7.0,并加水定容到 10 mL,取上清液待衍生化。

2.3 单糖的衍生 分别取 200 μL 上述多糖水解液或单糖与糖醛酸的混合标准溶液于 5 mL 具塞试管中,分别加入 200 μL 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMP 甲醇溶液和 200 μL 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液,充分混合,置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 50 min。冷却 10 min 后,加入 200 μL 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液中和,200 μL 重蒸水稀释。然后加入 1 mL 三氯甲烷涡旋混匀 30 s,离心 10 min,分离。将上层水相重复萃取 3 次后,经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,待分析。

2.4 色谱条件 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 大连依利特公司),流动相 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17),流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 254 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL ,混合对照品及供试品色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察 精密称取甘露糖 0.010 1 g、鼠李糖 0.010 2 g、半乳糖醛酸 0.020 0 g、葡萄糖 0.020 0 g、半乳糖 0.020 1 g、阿拉伯糖 0.010 0 g 和岩藻糖 0.010 0 g,置 10 mL 量瓶中,用重蒸水溶解并定容到刻度,摇匀,然后分别取 0.025, 0.1, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0 mL 稀释定容到 10 mL,作为系列混合对照品溶液。分别取 200 μL 上述混合对照品溶液按 2.3 项下方法进行衍生化,并按 2.4 项下方法的色谱条件下测定。以单糖浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,回归方程见表 1。

表 1 单糖及糖醛酸的标准曲线

标准物质	线性回归方程	r	线性范围/ μg
甘露糖	$Y = 124.06X + 23.76$	0.999 2	0.10 ~ 16.16
鼠李糖	$Y = 106.85X - 3.80$	0.998 7	0.10 ~ 16.32
半乳糖醛酸	$Y = 120.68X + 12.61$	0.999 6	0.20 ~ 32
葡萄糖	$Y = 99.89X + 4.14$	0.999 0	0.20 ~ 32
半乳糖	$Y = 132.41X - 53.08$	0.999 0	0.20 ~ 32.16
阿拉伯糖	$Y = 155.34X + 3.93$	0.999 7	0.10 ~ 16
岩藻糖	$Y = 116.33X - 47.47$	0.999 8	0.10 ~ 16

2.6 精密度试验 将同一山药地黄混合多糖水解液,经衍生化处理,在相同的色谱条件下连续进样 5 次,分析数据。得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 0.55%, 1.40%, 0.38%, 0.95%, 1.27%, 0.24%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 将同一山药地黄混合多糖水解液衍生化后分别放置 0, 2, 4, 8, 12 及 24 h 后进样,记录峰面积,得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为

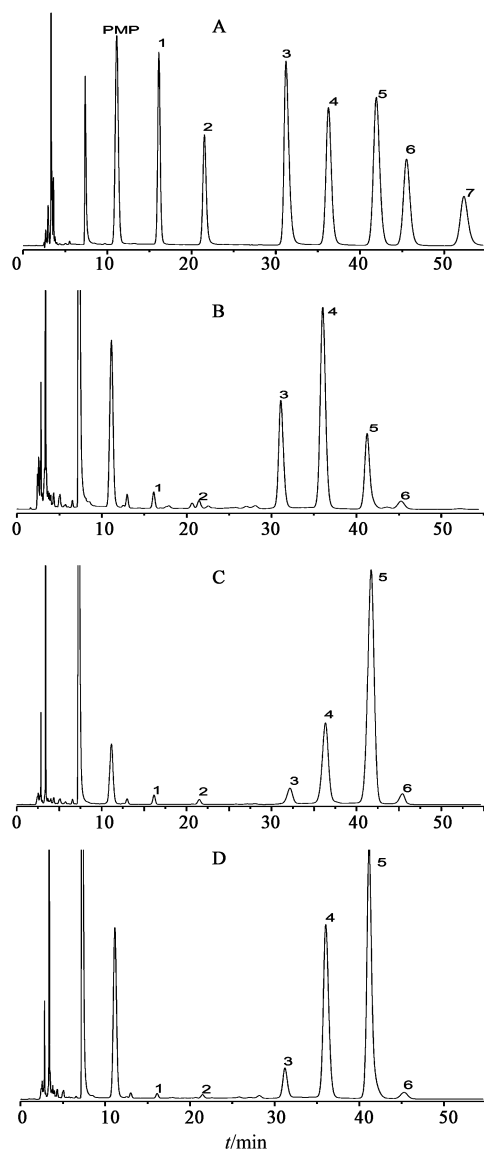


图 1 对照品、多糖水解样品 PMP 衍生化产物的 HPLC
A. 对照品; B. 山药; C. 地黄; D. 山药、地黄混合多糖;
1. 甘露糖; 2. 鼠李糖; 3. 半乳糖醛酸; 4. 葡萄糖;
5. 半乳糖; 6. 阿拉伯糖; 7. 岩藻糖

2.83%, 2.40%, 4.66%, 2.06%, 1.85%, 1.42%, 表明 24 h 内单糖衍生物稳定性良好。

2.8 重复性试验 取同一批山药和地黄粉末各 5 g 混合,平行 5 份,按 2.1 项下方法提取“对药”多糖,分别称 20.00 mg,按照样品测定方法,测定“对药”样品中单糖峰面积,并按照标准曲线计算其含量。得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖含量的 RSD 分别为 2.75%, 3.90%, 2.55%, 1.36%, 1.57%, 2.09%, 表明该方法具有良好的重复性。

2.9 加标回收试验 精密称取甘露糖 0.007 3 g、

鼠李糖 0.006 2 g、半乳糖醛酸 0.032 5 g、葡萄糖 0.186 0 g、半乳糖 0.200 5 g、阿拉伯糖 0.016 3 g,用重蒸水溶解并定容到 50 mL,再移取 1 mL 稀释定容到 10 mL 得混合对照品溶液。取已知含量的“对药”多糖水解液 200 μ L,平行 6 份,分别加入 100 μ L 上述混合对照品溶液,按照样品溶液测定方法,计算回收率,结果见表 2。

表 2 各单糖加样回收率试验

测定成分	样品中 含量/ μ g	加入量 / μ g	测得值 / μ g	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
甘露糖	1.42	1.46	2.82	95.90	96.80	2.00
	1.42	1.46	2.83	96.57		
	1.42	1.46	2.84	97.26		
	1.42	1.46	2.86	98.63		
	1.42	1.46	2.81	95.21		
	1.42	1.46	2.84	97.26		
鼠李糖	1.31	1.24	2.49	95.16	94.76	2.68
	1.31	1.24	2.53	98.39		
	1.31	1.24	2.46	92.74		
	1.31	1.24	2.44	91.13		
	1.31	1.24	2.50	96.00		
	1.31	1.24	2.49	95.16		
半乳糖醛酸	13.05	6.50	19.43	98.15	97.20	1.45
	13.05	6.50	19.39	97.54		
	13.05	6.50	19.49	99.08		
	13.05	6.50	19.37	97.23		
	13.05	6.50	19.29	96.00		
	13.05	6.50	19.24	95.23		
葡萄糖	74.02	37.20	109.78	96.13	97.60	2.63
	74.02	37.20	109.47	95.29		
	74.02	37.20	110.61	98.36		
	74.02	37.20	110.03	96.80		
	74.02	37.20	112.11	102.39		
	74.02	37.20	109.92	96.51		
半乳糖	81.26	40.10	120.25	102.21	98.32	2.02
	81.26	40.10	120.04	96.71		
	81.26	40.10	120.61	98.13		
	81.26	40.10	120.32	97.41		
	81.26	40.10	120.66	98.26		
	81.26	40.10	120.25	97.23		
阿拉伯糖	3.23	3.26	6.41	97.54	96.10	1.15
	3.23	3.26	6.39	96.93		
	3.23	3.26	6.31	94.48		
	3.23	3.26	6.34	95.40		
	3.23	3.26	6.37	96.32		
	3.23	3.26	6.35	95.71		

2.10 样品测定 分别称取 2.1 项下山药多糖、地黄多糖和混合多糖各 4 份,每份 20.00 mg,在上述处理方法和色谱条件下测定其组成和各组分含量。将混合单糖对照品图谱与多糖样品的图谱对照,结果表明,怀山药、怀地黄“对药”及怀山药和怀地黄单味药材 3 种多糖都含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖,但未检测到岩藻糖。与山药多糖和地黄多糖相比,怀山药和怀地黄“对药”中多糖的单糖组分的含量在山药多糖和地黄多糖之间。各单糖及糖醛酸的含量结果见表 3。

表 3 样品中各种单糖及糖醛酸含量测定($n=4$) %

单糖名称	山药 多糖	RSD	地黄 多糖	RSD	山药地 黄对药 多糖	RSD
甘露糖	0.576	2.81	0.344	0.24	0.355	1.36
鼠李糖	0.306	4.40	0.334	0.89	0.325	2.10
半乳糖醛酸	10.274	0.88	1.682	0.47	3.262	0.76
葡萄糖	24.208	0.45	13.80	0.69	18.506	1.71
半乳糖	7.280	0.79	28.36	0.50	20.314	0.73
阿拉伯糖	0.600	3.02	1.103	0.35	0.807	0.92

3 讨论

3.1 色谱柱的选择 单糖分析常用的高效液相色谱柱为糖分析柱和氨基键合相柱,其相应的检测器示差折光检测器价格昂贵,分析成本较高,且不适用于梯度洗脱^[13-14]。本实验室通过对样品进行衍生化处理,采用价格相对较低的 ODS 柱,常规的紫外检测器,可同时测定 5 种中性单糖和 1 种酸性单糖。此方法不仅提供了山药多糖和生地黄多糖的单糖组成的基本信息,且适用于其他多糖组成的分析,为分析多糖的单糖组成提供了可供选择的方法。

3.2 流动相的选择 本试验发现流动相的组成对色谱峰保留时间的影响较大。当采用乙腈-醋酸缓冲盐(0.1 mol \cdot L⁻¹, pH 5.5, 19:81^[15])为流动相时,半乳糖醛酸拖尾严重,葡萄糖和半乳糖未达到基线分离。而以乙腈-磷酸缓冲盐体系(0.05 mol \cdot L⁻¹, pH 6.7)为流动相,以等度洗脱的方式,可以使几种单糖和单糖酸实现良好的分离,并具有稳定的保留时间和较好的峰形。因此,本试验采用乙腈-磷酸缓冲盐体系为流动相。

3.3 衍生化时间的考察 目前,文献中报道的衍生化时间一般为 30 min^[16-18]。本文在其他试验条件相同的情况下,将山药多糖水解产物和 PMP 甲醇溶液分别以不同的反应时间(30, 40, 50, 60, 70,

100 min)进行衍生化,考察衍生化产物的峰面积变化。结果表明,反应时间为50 min时各糖的PMP衍生化产物的峰面积最大,且各单糖峰分离较好;反应时间为30 min时衍生化反应不完全,因此衍生化反应时间选为50 min。

本研究采用PMP柱前衍生化高效液相色谱法,建立了多种单糖的分离模式,并首次成功运用本方法测定怀山药、怀地黄“对药”及单味药材中多糖的单糖组成及含量,为综合利用“对药”多糖提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] 王洪新,王远辉. 山药多糖的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3):321.
- [2] 顾林,姜军. 山药多糖的分离纯化及组成研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9):158.
- [3] 张艳萍,俞远志,张虹. 气相色谱分析地黄多糖的单糖组成及其含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4):419.
- [4] 张明月,邹一可,王东,等. 女贞子多糖的提取工艺及单糖组成[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):87.
- [5] Honda S. Post-column derivatization for chromatographic analysis of carbohydrates[J]. J Chromatogr A, 1996, 720:183.
- [6] Lu Y, Yang X B, Zhao Y, et al. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3):742.
- [7] 刘建,张玲娟,孙立峰. 张锡纯对药[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:21.
- [8] 崔景朝,赵自明. 中药配方颗粒研究进展(II)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):240.
- [9] 陈曦,骆健美,王敏. 怀山药和怀地黄多糖同步提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5):1228.
- [10] 李超柱,陈艳辉,颜幕英,等. 怀地黄和怀山药混合提取多糖工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(7):99.
- [11] 刘绣华,李明静,赵东保,等. 山药多糖-铁复合物及其制备工艺. 中国:ZL:03159291.0. [P] 2008-01-16.
- [12] 吴思,李天河,赵越,等. 六味地黄生物制剂中多糖脱蛋白方法对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):56.
- [13] 戴军,朱松,汤坚. PMP柱前衍生化高效液相色谱法分析杜氏岩藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报, 2007, 26(2):206.
- [14] 袁忠海,吴道澄,赵燕,等. 高效液相色谱法测定魔芋精粉中葡甘露聚糖的含量及单糖组成[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7):621.
- [15] 徐瑾,李彤,张庆合,等. 柱前衍生化高效液相色谱等度洗脱分析单糖的方法建立[J]. 生命科学仪器, 2005, 3(2):30.
- [16] Fu D T, O'Neill R A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoprotein by high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1995, 227(2):377.
- [17] Honda S, Suzuki S, Taga A. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 30:1689.
- [18] 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.

[责任编辑 顾雪竹]