

· 研究报告 ·

复方首乌藤合剂的总多糖含量测定及单糖组分分析

叶财发, 蔡跃辉, 曾棋平, 曹毅祥, 陈锦珊 (中国人民解放军联勤保障部队第九〇九医院制剂科/厦门大学附属东南医院制剂科, 福建漳州 363000)

[摘要] 目的 建立复方首乌藤合剂总多糖含量测定方法, 并分析多糖组分。方法 采用水提醇沉法提取复方首乌藤合剂多糖, 经苯酚-硫酸法处理后, 再利用紫外分光光度法测定该制剂中总多糖含量; 另外, 多糖经三氟乙酸水解后, 用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生多糖水解产物, 再利用高效液相色谱法, 依利特 krosmasil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温: 30 °C, 以乙腈-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=6.8) (18: 82) 为流动相, 进行等度洗脱; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长 250 nm, 进样量: 20 μl。分析 4 批次复方首乌藤合剂多糖中的单糖组分。结果 D-无水葡萄糖质量浓度在 21~105 μg/ml 范围内与吸光度线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=0.007X+0.0105$, $r=0.9982$; 平均加样回收率为 (100.45±1.57)% ($n=6$); 4 批样品测得的总多糖平均含量为 14.24、21.09、17.85、18.17 mg/ml; 复方首乌藤合剂多糖主要由甘露糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等 6 个单糖组成, 各个单糖峰面积比约为 9.10: 0.26: 1.00: 3.02: 4.14: 2.12。结论 该方法准确、可靠, 可用于该制剂中总多糖含量测定及单糖组分分析。

[关键词] 复方首乌藤合剂; 总多糖; 紫外分光光度法; 单糖; 高效液相色谱法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)02-0161-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201908021

Determination of total polysaccharide content and analysis of monosaccharide components in the caulis polygoni multiflori mixture

YE Caifa, CAI Yuehui, ZENG Qiping, CAO Yixiang, CHEN Jinshan (The Pharmacy Department, No.909 Hospital of Joint Logistic Support Force/Southeast Hospital Affiliated to Xiamen Univesity, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for analyzing total polysaccharide content and its monosaccharide composition in the caulis polygoni multiflori mixture. **Methods** The polysaccharides of the caulis polygoni multiflori mixture were extracted by water-extraction and alcohol-precipitation. After the treatment with phenol-sulfuric acid, the content of total polysaccharides in the preparation was determined by ultraviolet spectrophotometry. In addition, after the polysaccharide was hydrolyzed into monosaccharides with trifluoroacetic acid, the hydrolysate was derivatized with PMP, and then the PMP derivatives of monosaccharides were analyzed by HPLC method. Yilite krosmasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used at 30 °C. Acetonitrile-0.1% NaH₂PO₄ (pH=6.8) (16:84) was the mobile phase with a flow rate of 1.0 ml/min. The detecting wavelength was at 250 nm. The injection volume was 20 μl. **Results** concentration of D-anhydrous glucose in the range of 21 ~ 105 μg/ml had a good linear relationship with the absorbance. The linear regression equation was $A=0.007x+0.0105$, $r=0.9982$. The average recovery rate was (100.45±1.57)% ($n=6$). The average contents of total polysaccharides in four batches of samples were 14.24, 21.09, 17.85 and 18.17 mg/ml. The polysaccharide of the caulis polygoni multiflori mixture mainly consisted of D-mannose, D-glucosamine D-hydrochloride, D-Galacturonic acid, D-glucose, galactose, L-arabinose. The monosaccharides peak area ratios were about 9.10:0.26:1.00:3.02:4.14:2.12. **Conclusion** The method is accurate and reliable, and can be used for the determination of total content of polysaccharides and the analysis of monosaccharide composition in the preparation.

[Key words] caulis polygoni multiflori mixture; total polysaccharides; ultraviolet spectrophotometry; monosaccharide; HPLC

[基金项目] 医院青年苗圃课题(16Y024); 福建中医药大学临床专项校管课题(NO.XB2017080)

[作者简介] 叶财发, 初级药师, 研究方向: 制剂研发与质量控制, Email: 273796753@qq.com

[通讯作者] 陈锦珊, 副主任药师, 研究方向: 医院药学, Email: cjs1223@souhu.com

复方首乌藤合剂是我院研制的特色制剂, 主要由首乌藤、合欢皮、菟丝子、五味子、续断、蔓荆子、川芎、煅牡蛎八味药材配制而成, 方中首乌藤为君药, 合欢皮为臣药, 菟丝子、五味子、续断为佐药, 川芎、蔓荆子、煅牡蛎为使药, 诸药合用, 具有

养心安神解郁、滋阴养肝、行血活气之功效,临床应用用于神经衰弱性失眠、眩晕及脑外伤引起的头痛、头晕等症^[1]。目前,该制剂的质量标准中主要控制其总黄酮、二苯乙烯苷含量^[2],未包含多糖含量控制,相关研究表明,多糖具有预防、改善、治疗失眠的作用,且滋阴养肝效果明显^[3-6]。因此,探究复方首乌藤合剂总多糖含量及多糖组成很有必要,本文在前期研究的基础上对该制剂粗多糖的组成及总多糖含量进行了分析,现报道如下。

1 材料与仪器

1.1 材料

复方首乌藤合剂为本院自制(规格:40 ml,批号:201906132,201906133,201906211,20190624);D-甘露糖(批号:140651-201504,质量分数99.4%)、D-盐酸氨基葡萄糖(批号:140649-201606,质量分数100%)、半乳糖(批号:160226-201506,质量分数100%)、D-葡萄糖(批号:110833-201707,质量分数99.9%)、D-半乳糖醛酸(批号:111646-201702,质量分数95.1%)、L-阿拉伯糖(批号:111506-200202,质量分数100%)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、三氟乙酸(TFA)均购自中国食品药品检定研究院;氢氧化钠、盐酸、甲醇、三氯甲烷、正丁醇、浓硫酸、苯酚、无水乙醇均为分析纯;水为本院自制纯化水。

1.2 仪器

紫外可见分光光度计(UNIC UV-2102 PCS,日本岛津);Agilent 1200 高效液相色谱系统(DAD检测器,美国Agilent公司);电子分析天平(AUX220,日本岛津);磁力加热搅拌器(KQY78-1,金坛市科析仪器有限公司);数显恒温水浴锅(HH系列,金坛市科析仪器有限公司);电动离心机(LD5-2A,北京医用离心机厂);电热鼓风干燥箱(101A-1E,上海实验仪器有限公司);超声清洗器(KQ-500B,昆山市超声仪器有限公司);真空干燥箱(DZF-6050,上海医用恒温设备厂)。

2 方法

2.1 提取多糖组分

精密吸取25 ml 复方首乌藤合剂,加入氯仿-正丁醇混合液(氯仿:正丁醇=5:1)20 ml,在磁力搅拌器上搅拌30 min,离心20 min(50 Hz,4000 r/min),回收上清液,去除蛋白质及有机溶剂;乙醇沉淀:向上清液中加入3倍体积的95%的乙醇,保持乙醇浓度在70%以上,静置过夜。离心15 min,收集沉

淀物,80℃真空干燥3 h,得到相应批号的复方首乌藤合剂多糖粉末。

2.2 总多糖含量的测定^[7-8]

2.2.1 对照品溶液配制

精密称取105℃干燥至恒重的D-无水葡萄糖0.1 g,置于100 ml容量瓶中,加水定容至刻度,备用。

2.2.2 供试品溶液配制

精密称取复方首乌藤合剂多糖粉末0.1 g,置于250 ml容量瓶中,加水定容至刻度,得供试品原液;再精密吸取3 ml供试品原液至10 ml容量瓶中,加水定容,即为供试品溶液。

2.2.3 最大吸收波长测定

精密吸取对照品储备液6.0 ml,置于100 ml量瓶中,加水定容至刻度,即得对照品溶液。精密吸取对照品溶液1.0 ml,置于10 ml量瓶中,加入4%的苯酚溶液1.0 ml,振荡摇匀,然后加入7 ml浓硫酸,立即摇匀,100℃水浴15 min,然后冰浴15 min,冷却至室温。以相应试剂为空白,在400~550 nm范围内扫描光谱。结果发现,对照品溶液在486 nm处有最大吸收,故选择486 nm。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线的制备及线性关系考察

精密吸取葡萄糖对照品储备液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,分别置10 ml量瓶中,用水定容至刻度。然后各精密吸取1.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加入4%的苯酚溶液1.0 ml,振荡摇匀,然后加入7 ml浓硫酸,立即摇匀,100℃水浴15 min,然后冰浴15 min,冷却至室温,在486 nm波长处测定吸光度(Y)。以 Y 为纵坐标,浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线方程: $Y=0.007X+0.0105$, $r=0.9982$ 。

2.3.2 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下的对照品溶液1.0 ml,按“2.3.1”项下方法测定吸光度,连续测定6次,根据标准曲线方程计算多糖含量,求RSD。结果得到RSD为0.24%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验

精密量取供试品溶液(批号:20190624)1.0 ml,置10 ml量瓶中,按“2.3.1”项下方法测定吸光度。在显色后0、10、20、40、60、80、100、120 min分别测定吸光度,求RSD。结果得到RSD为3.54%($n=7$),表明该制剂多糖提取液在显色后120 min内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验

取复方首乌藤合剂(批号:20190624)6份,按

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下方法测定吸光度,计算多糖含量。结果测得6份供试品溶液中多糖的平均含量为18.23 mg/ml, RSD为0.33%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验

精密量取已知浓度为61 $\mu\text{g/ml}$ 的供试品溶液

(批号:20190624)6份,每份0.5 ml,各加入0.5 ml浓度为63 $\mu\text{g/ml}$ 的葡萄糖对照品溶液,按“2.3.1”项下方法操作,于486 nm波长处测定吸光度,计算加样回收率。结果显示该方法的平均加样回收率为100.45%,RSD为1.57%(见表1)。

表1 复方首乌藤合剂加样回收率试验结果 ($n=6$)

样品加入量 (μg)	葡萄糖加入量 (μg)	吸光度	测定量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
30.50	31.50	0.445	62.00	100.00	100.45	1.57
30.50	31.50	0.442	61.67	99.46		
30.50	31.50	0.457	63.33	102.15		
30.50	31.50	0.456	63.67	102.69		
30.50	31.50	0.441	61.33	98.92		
30.50	31.50	0.453	61.67	99.46		

2.4 总多糖含量测定

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下方法测定吸光度,计算多糖含量。用外标法计算总多糖含量(以葡萄糖计),结果见表2。

表2 复方首乌藤合剂含量测定结果 ($n=3$)

批号	总多糖含量/(mg/ml)	平均值/(mg/ml)	RSD/(%)
201906211	14.24	14.24	0.25
201906211	14.20		
201906211	14.27		
201906132	21.09	21.09	0.66
201906132	20.95		
201906132	21.23		
201906133	17.76	17.85	0.66
201906133	17.80		
201906133	17.98		
20190624	18.15	18.17	0.58
20190624	18.07		
20190624	18.28		

2.5 单糖分析

2.5.1 对照品溶液的制备

称取各单糖对照品: D-甘露糖、D-盐酸氨基葡萄糖、D-半乳糖醛酸、D-无水葡萄糖、半乳糖、L-阿拉伯糖等各约10 mg,精密称定,分别置于5 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

2.5.2 供试品溶液的制备

取多糖粉末(批号:20190624)150 mg,精密称定,置于10 ml具塞试管中,加水3 ml,再加TFA3 ml,

封管于110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解1 h,取出,放冷,水浴蒸干,用甲醇1 ml溶解,蒸干,重复处理3次以除去残留的TFA,残渣加水溶解^[9],转移至5 ml量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得。

2.5.3 柱前衍生方法

取上述6种单糖对照品溶液各50 μl 置于同一10 ml EP管中,供试品溶液1.0 ml置于10 ml EP管中,分别加入1.0 ml 0.5 mol/L的PMP/甲醇溶液和1.0 ml 0.3 mol/L的氢氧化钠溶液,混合均匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴50 min,取出后冷却至室温,分别加入1.0 ml 0.3 mol/L的盐酸溶液中和,再加入2 ml氯仿萃取,取上清液,重复处理3次,除去未反应的PMP,0.22 μm 滤膜滤过^[9],即得。

2.5.4 色谱条件

色谱柱:Agilent Exted- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流动相:乙腈(A)-0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH=6.8)(B)等度洗脱(A:B=16:84);流速:1.0 ml/min;检测波长250 nm;进样量:20 μl 。

2.5.5 结果

精密吸取适量“2.5.2”项下供试品溶液及“2.5.1”项下对照品溶液,按照“2.5.3”项下衍生方法进行衍生,按照“2.5.4”项下色谱条件进样,分别得到供试品溶液色谱图(图1),从复方首乌藤合剂多糖中识别出甘露糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等6种单糖。

根据5次各单糖的峰面积比测定结果进行计算,甘露糖:盐酸氨基葡萄糖:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖=9.10:0.26:1.00:3.02:4.14:2.12,可见甘露糖的峰面积占比接近50%,提示甘露糖可能是

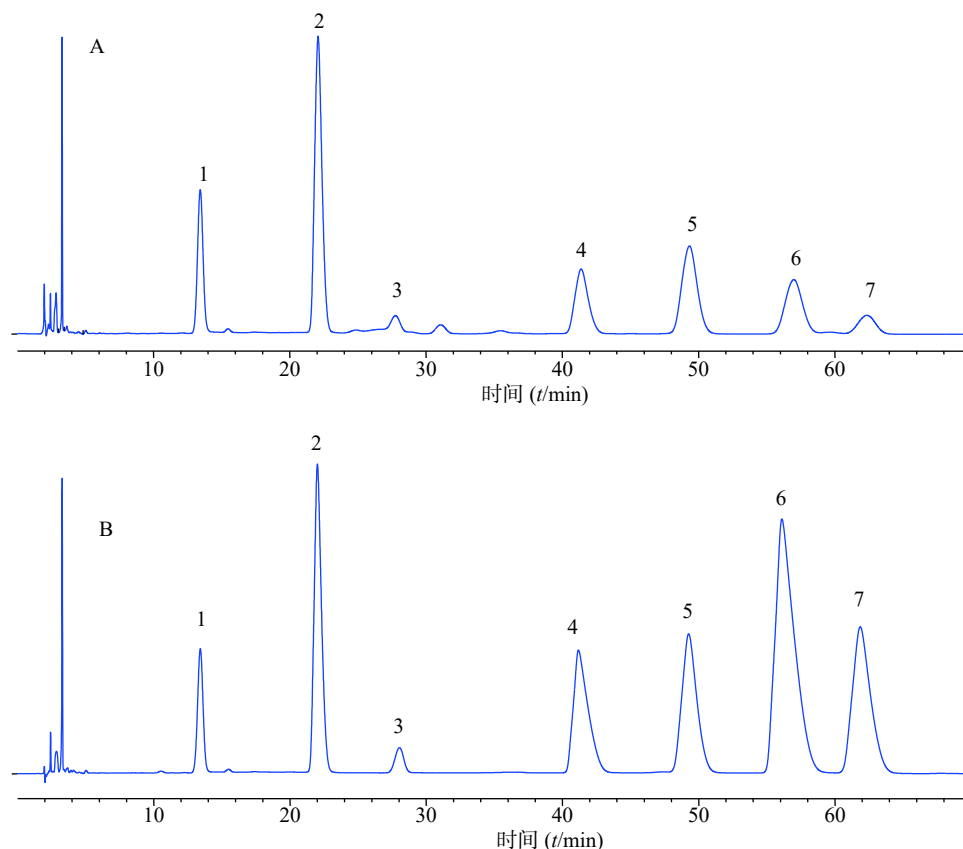


图1 复方首乌藤合剂多糖色谱图

A. 供试品溶液; B. 对照品溶液; 1.PMP; 2. D-甘露糖; 3. D-盐酸氨基葡萄糖; 4. D-半乳糖醛酸; 5. D-葡萄糖; 6.半乳糖; 7. L-阿拉伯糖

复方首乌藤合剂发挥特殊药效的原因之一。

3 讨论

3.1 苯酚-硫酸法的样品处理

采用苯酚-硫酸法预实验时,发现供试品和对照品溶液如无水浴和冰浴处理,可能造成供试品过热且结果不稳定;若冰浴后无冷却至室温操作,吸光度结果偏小,故本实验选择先水浴,再冰浴,冷却至室温来避免以上情况出现。

3.2 单糖组分洗脱方法的选择

在考察流动相时,发现乙腈比例大于25%时,各个色谱峰之间的分离度达不到要求;另外,如采用梯度洗脱方法,色谱峰6(半乳糖)与7(阿拉伯糖)之间分离度达不到要求,故选择等度洗脱。综合考虑,选择0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH=6.8)等度洗脱作为本实验流动相。

3.3 制剂中总多糖含量及单糖组分的探讨

复方首乌藤合剂是由首乌藤、合欢皮、菟丝子、五味子、续断、蔓荆子、川芎、煅牡蛎八味药材配制而成的中药复方制剂,甘露糖的峰面积占比接近50%。根据相关研究发现,首乌藤中单糖成分以

阿拉伯糖及半乳糖为主^[10];合欢皮多糖较高,但未对单糖组分进行分析^[11];菟丝子多糖的主要组成是甘露糖,且含量最高^[12];五味子以葡萄糖为主,甘露糖含量低^[13];蔓荆子多糖含量较低^[14];川芎多糖以葡萄糖及半乳糖为主^[15]。综上可知,甘露糖可能主要来源于菟丝子,葡萄糖可能主要来源于五味子、川芎,阿拉伯糖可能主要来源于首乌藤。

4 结论

综上所述,采用苯酚硫酸法结合紫外分光光度法可以较为准确测定复方首乌藤合剂总多糖含量,柱前衍生化法结合高效液相色谱适用于分析该制剂多糖水解产物中的单糖组分,上述方法可为复方首乌藤合剂多糖质量控制提供参考。

【参考文献】

- [1] 张荣,王庆芬,田文君,等.复方首乌藤合剂中药材的鉴别和大黄素的测定[J].*华西药理学杂志*,2008,23(1):117-118.
- [2] 曾棋平,曹毅祥,黄丽珊,等.复方首乌藤合剂的薄层鉴别和总黄酮的含量测定[J].*药理学实践杂志*,2016,34(5):424-427.
- [3] 杨勇.首乌藤加味治疗失眠58例[J].*光明中医*,2011,26(11):2236-2237.
- [4] 胡献国.用合欢治疗失眠的验方5则[J].*求医问药*,2009(7):

- 53.
- [5] 刘立萍. 灵芝多糖的药理学作用(摘要)[C]//中华中医药学会2014第七次临床中药学术研讨会论文集. 重庆, 2014: 129-130.
- [6] 张云峰, 叶小芳. 牛膝多糖的生物学功能研究进展[J]. *畜牧兽医杂志*, 2007, 26(4): 29-30.
- [7] 蔡小辉, 曾棋平, 王艺红, 等. 星点设计-效应面法优化镰形棘豆多糖的提取工艺[J]. *药学服务与研究*, 2017, 17(6): 427-431.
- [8] 王庆芬. 刺参中多糖的提取分离、结构表征及其核苷类物质的分析[D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
- [9] 宋佳, 张振秋, 李峰. 柱前衍生HPLC对鹿茸多糖中单糖组成的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(9): 2227-2230.
- [10] 张华锋, 张杰, 刘炯, 等. 首乌藤多糖的分离纯化及初步结构

- 解析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 5-8.
- [11] 夏洁, 舒畅, 王庆, 等. 合欢皮多糖提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. *武汉轻工大学学报*, 2018, 37(5): 89-94.
- [12] 徐丽媛, 李志猛, 杨蕾, 等. 菟丝子多糖含量测定方法的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 34(8): 548-551.
- [13] 王艳杰, 吴勃岩, 梁颖, 等. 五味子多糖提取、含量测定及多糖组分分析[J]. *中医药信息*, 2009, 26(6): 30-32.
- [14] 李秋红. 菟丝子等十三味中药最佳炒制工艺研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009: 24-60.
- [15] 孙晓春, 颜军, 何钢, 等. 川芎多糖的分离纯化及其单糖组成测定[J]. *四川农业大学学报*, 2011, 29(1): 56-60.

【收稿日期】 2019-08-06 【修回日期】 2019-12-11

【本文编辑】 陈盛新

(上接第 137 页)

类黑素进行水提; Langner 等^[9]在室温条件下采用 1:12 料液比, 水浸提 1 h, 提取到土豆类黑素粗制品。类黑素成分复杂, 提纯困难。目前, 主要的纯化方法有大孔树脂、超滤和凝胶层析等方法。何健^[10]等发现 X-5 大孔树脂是曲霉型豆豉类黑素的最佳吸附树脂。秦礼康等^[11]利用 S-8 树脂分离得到豆豉两个类黑素组分。本实验在水浸提法的基础上进行改良, 最终获得最优提取工艺。结果显示类黑色素在 420 nm 处有较强吸收^[12]。

3.3 气相色谱条件的筛选

实验采用气相色谱法检测菌群代谢物乙酸的含量。参照文献^[13-14], 结果显示其色谱条件对于本样品分析效果不佳; 在柱温选择中, 恒温法对乙酸检测效果不理想, 峰形不稳定, 因此实验采取梯度升温。经反复试验, 最终获得正文中的检测参数, 分离效果好, 可作为本实验乙酸检测条件。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015年版(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 31.
- [2] 赵重博, 吴建华, 曾媛媛, 等. 山楂饮片体外抗菌实验研究[J]. *现代中医药*, 2017, 37(3): 82-83, 88.
- [3] JEMMALI M. Influence of the maillard reaction products on some bacteria of the intestinal flora[J]. *J Appl Bacteriol*, 1969, 32(2): 151-155.
- [4] EINARSSON H, SNYGG B G, ERIKSSON C. Inhibition of

- bacterial growth by maillard reaction products[J]. *J Agric Food Chem*, 1983, 31(5): 1043-1047.
- [5] STECCINI M, GIAVEDONI P, SARAIS I, et al. Antimicrobial activity of maillard reaction products against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Ital J Food Sci*, 1993, 5(2): 147-150.
- [6] CHANG C J, LIN C S, LU C C, et al. Corrigendum: *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut Microbiota[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16130.
- [7] 吴建华, 孙净云. 山楂有机酸部位对胃肠运动的影响[J]. *陕西中医*, 2009, 30(10): 1402-1403.
- [8] BORRELLI R C, VISCONTI A, MENNELLA C, et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(22): 6527-6533.
- [9] LANGNER E, NUNES F M, POŻAROWSKI P, et al. Melanoidins isolated from heated potato fiber (Potex) affect human colon cancer cells growth via modulation of cell cycle and proliferation regulatory proteins[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 57: 246-255.
- [10] 何健, 黄占旺, 史杰, 等. 大孔树脂对曲霉型豆豉类黑素的精制研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(4): 156-159.
- [11] 秦礼康, 丁霄霖. 陈容豆豉类黑精提取及骨架肽段氨基酸组成分析[J]. *食品科学*, 2006, 27(1): 125-129.
- [12] RUFÍAN-HENARES J A, MORALES F J. Antimicrobial activity of melanoidins[J]. *J Food Qual*, 2007, 30(2): 160-168.
- [13] 宋菲. 香菇多糖对双歧杆菌和大肠杆菌体外生长的影响[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(24): 145-147.
- [14] 王广, 马淑霞, 胡新俊, 等. 党参多糖对双歧杆菌和大肠埃希菌体外生长的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(3): 199-201.

【收稿日期】 2019-04-25 【修回日期】 2020-02-18

【本文编辑】 陈盛新