

# 黄精多糖水解物柱前衍生 HPLC 指纹图谱

秦垂新\*, 曹子丰, 黄绮敏, 林伟斌

(无限极(中国)有限公司, 广东 江门 529156)

**[摘要]** 目的:建立黄精多糖柱前衍生 HPLC 指纹图谱。方法:以三氟乙酸(TFA)水解黄精多糖,水解产物加入 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)进行衍生化,采用 HPLC 测定单糖的衍生物。采用 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 6.7)-乙腈(84.5:15.5),检测波长 250 nm,柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>。结果:黄精多糖柱前衍生指纹图谱标示出 10 个共有峰,鉴别了 7 个共有峰(D-甘露糖,D-半乳糖醛酸,L-鼠李糖,D-半乳糖,D-葡萄糖,D-木糖,D-阿拉伯糖)。10 批黄精药材指纹图谱相似度 > 0.99。结论:该方法简便,分离度高,重复性及稳定性良好,可有效控制黄精多糖的质量。

**[关键词]** 黄精; 多糖; 柱前衍生化; 高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0065-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015110065

**Pre-column Derivatives HPLC Fingerprint of Polygonati Rhizoma Polysaccharide Hydrolysate**  
QIN Chui-xin\*, CAO Zi-feng, HUANG Qi-min, LIN Wei-bin (Infinitus (China) Company Limited, Jiangmen 529156, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a pre-column derivation HPLC method of chromatographic fingerprint of Polygonati Rhizoma polysaccharide. **Method:** Polygonati Rhizoma polysaccharide was hydrolyzed with trifluoroacetic acid and derivated by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). The monosaccharide composition was separated by reversed-phase technique on a Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase composed of 0.1 mol·L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 6.7) and acetonitrile in the ratio of 84.5:15.5. The flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 250 nm, and column temperature was at 30 ℃. **Result:** There were 10 common peaks from the fingerprint and 7 peaks were identified as D-mannose, L-rhamnose, D-galacturonic, D-galactose, D-glucose, D-xylose, and D-arabinose. The similarity of 10 batches of Polygonati Rhizoma polysaccharide was more than 0.99. **Conclusion:** The method is accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Polygonati Rhizoma.

**[Key words]** Polygonati Rhizoma; polysaccharide; pre-column derivatives; HPLC; fingerprint chromatogram

黄精味甘、性平,具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效<sup>[1]</sup>。黄精中的主要生理活性成分有多糖、甾体皂苷、蒽醌类化合物、维生素和多种氨基酸等<sup>[2-3]</sup>。有报道称<sup>[4-5]</sup>黄精多糖由葡萄糖、甘露聚糖和半乳糖醛酸按比例缩合而成。高英等<sup>[6]</sup>对黄精多糖分离纯化分段,得到 4 个相对分子质量级别的多糖,为阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖。现代药

理研究表明黄精多糖具有降血糖<sup>[6-7]</sup>、抗衰老<sup>[8]</sup>、增强免疫功能<sup>[9]</sup>、治疗血脂异常病<sup>[10]</sup>、抗疲劳<sup>[11]</sup>、提高和改善记忆<sup>[12]</sup>、抗肿瘤<sup>[13]</sup>等药理功能。《中国药典》采用蒽酮-硫酸法测定黄精多糖含量<sup>[14]</sup>,黄精多糖指纹图谱的研究鲜有报道。本研究对黄精多糖适当进行酸水解,柱前衍生化处理后进行 HPLC 分析,建立黄精多糖水解物柱前衍生 HPLC 指纹图谱研

**[收稿日期]** 20140605(013)

**[基金项目]** 广东省部产学研结合项目(2012B090600025)

**[通讯作者]** \*秦垂新,李锦记健康产品集团高级副总裁,从事中草药种植和检测研究, Tel: 13926152783, E-mail: Tim.Chun@infinitus-int.com

究,为评价黄精药材质量提供了一定的方法依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** LC-20AT 型高效液相色谱仪(DAD 检测器,日本岛津),TYXH-1 型漩涡混合器(乔跃电子有限公司),T1000 型 1/万电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司),HC-3018 型高效离心机(中科中佳科学仪器有限公司)。

**1.2 试药** *D*-葡萄糖(纯度 $\geq 99\%$ ,批号 110833-201205),*D*-甘露糖(纯度 $\geq 99\%$ ,批号 140651-200602),*D*-盐酸氨基葡萄糖(批号 140649-200702,纯度 100%),*D*-半乳糖(纯度 $\geq 99\%$ ,批号 100226-201105)均购自中国食品药品检定研究院;*L*-鼠李糖(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 121029),*L*-岩藻糖(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 120927),*D*-葡萄糖醛酸(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 121009),*D*-木糖(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 121026),*D*-半乳糖醛酸(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 121106),*D*-核糖(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 121012),*D*-氨基半乳糖(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 120927),*D*-阿拉伯糖(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 121103)均购于上海融禾医药科技有限公司。3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉酮(PMP)(纯度 $\geq 99\%$ ,批号 A1216009,阿拉丁),三氟乙酸(TFA,纯度 $\geq 99\%$ ,批号 20120903,国药集团化学试剂有限公司),乙腈(Merk 公司,色谱纯),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。黄精样品均由无限极(中国)有限公司提供,经广州中医药大学新药开发中心魏刚研究员鉴定为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* 的干燥根茎。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** ZORBAX Eclipse XDB C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu$ m),流动相 0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 6.7)-乙腈(84.5:15.5),检测波长 250 nm,柱温 30  $^{\circ}$ C,流速 0.8 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别取 *D*-阿拉伯糖,*D*-核糖,*D*-甘露糖,*L*-岩藻糖,*D*-葡萄糖,*D*-葡萄糖醛酸,*D*-半乳糖醛酸,*D*-氨基半乳糖,*D*-木糖,*L*-鼠李糖等对照品适量,精密称定,加水配制成单糖混合对照品溶液(各单糖质量浓度约为 0.45 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>)。精密吸取混合对照品溶液 100  $\mu$ L 置 5 mL 的安瓶中,精密加入 0.6 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液 100  $\mu$ L,摇匀,精密加入 0.5 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> PMP 100  $\mu$ L,在 70  $^{\circ}$ C 条件下反应 60 min。取出,放冷,精密加入 0.3 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 100  $\mu$ L,混匀后转移至 5 mL 离心管中。加三氯甲烷 1 mL,涡旋混匀,离心(3 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>) 10

min,倒去三氯甲烷层,重复多次至三氯甲烷层无色,水层为对照品溶液。

## 2.3 供试品溶液制备

**2.3.1 多糖溶液的制备** 取本品粉末(50~60  $^{\circ}$ C 减压干燥,粉碎,过 20 目筛)2.5 g,精密称定,加入 80% 乙醇 100 mL,超声提取 1 h,滤过,滤器与滤渣用 80% 乙醇洗涤 3 次,每次 10 mL,将滤纸连同滤渣置烧瓶中,加水 100 mL,回流提取 1 h,取出,趁热抽滤,烧瓶与残渣用热水洗涤 4 次,每次 10 mL,合并滤液与洗液,浓缩至 10 mL 左右,放冷,离心 20 min(5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>),上清液转移至 10 mL 量瓶中,加水定容,摇匀。精密加入无水乙醇 40 mL(慢加快搅),置 5~10  $^{\circ}$ C 冰箱中放置 12 h,离心 10 min(5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>),倒去上清液,沉淀加 80% 乙醇洗涤 2 次,每次 10 mL,离心 10 min(5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>),用无水乙醇洗涤 2 次,每次 10 mL,离心 10 min(5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>),倒掉上清液,加热水使沉淀溶解,转移到 5 mL 量瓶中,放冷,加水定容,摇匀,得粗多糖溶液。

**2.3.2 多糖溶液的 TFA 部分酸水解方法** 精密吸取 2.3.1 项下粗多糖溶液 500  $\mu$ L,置 5 mL 安瓶中,精密加入 0.4 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> TFA 溶液 500  $\mu$ L,封口后置 110  $^{\circ}$ C 条件下水解 7 h,取出,放冷,水浴蒸干,残渣加入甲醇 1 mL 搅拌,蒸干以去除 TFA,重复多次,加热水使沉淀溶解,转移到 1 mL 量瓶中,放冷,加水定容,摇匀,得粗多糖水解溶液。

**2.3.3 PMP 衍生化方法** 精密吸取 2.3.2 项下样品的粗多糖水解溶液 100  $\mu$ L,置 5 mL 的安瓶中,精密加入 0.6 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 100  $\mu$ L,混匀,精密加入 0.5 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> PMP 100  $\mu$ L,置 70  $^{\circ}$ C 条件下衍生反应 60 min<sup>[15]</sup>。取出,放冷,精密加入 0.3 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 200  $\mu$ L,转移至 5 mL 离心管中,加水至 1 mL,涡旋混匀。加入三氯甲烷 1 mL,混匀,离心 10 min(3 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>),去掉三氯甲烷层,重复多次至三氯甲烷层无色,水层为供试品溶液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 20  $\mu$ L,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样,所测的指纹图谱与所得共有模式的相似度均 $>0.99$ ,表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

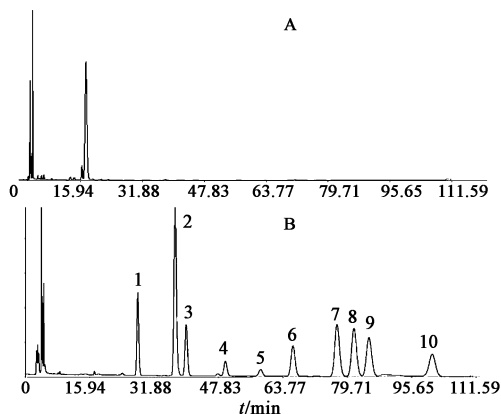
**2.4.2 重复性试验** 取同一批样品,依法制备 6 份供试品溶液进样分析,所测的指纹图谱与所得共有模式的相似度均 $>0.99$ ,表明重复性良好。

**2.4.3 精密度试验** 精密吸取供试品溶液 20  $\mu$ L,

连续进样 6 次,所测的指纹图谱与所得共有模式的相似度均 >0.99,表明精密度良好。

## 2.5 指纹图谱的建立与分析

**2.5.1 混合单糖对照品分析** 精密吸取 2.2 项下混合单糖对照品溶液 30  $\mu$ L,按 2.1 项下的色谱条件进样分析,见图 1,除氨基核糖、葡萄糖重叠外,其他 9 个成分分离度较好。



A. 空白溶液;B. PMP 衍生物

图 1 11 种单糖 PMP 衍生物的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of 11 PMP monosaccharide derivatives

**2.5.2 共有峰的确定及参照峰的选择** 按 2.3 项下方法制备 10 批样品供试品溶液,按 2.1 项色谱条件进样分析,图谱显示不同批次样品均具有大致相同的特征峰,共标示出 10 个共有峰。通过对照品保留时间定位及色谱峰紫外光谱分析,鉴别了 7 个共有峰,选择峰 7 (*D*-葡萄糖)作为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积,结果见表 1。

表 1 黄精多糖柱前衍生 HPLC 指纹谱相对保留时间、相对峰面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 HPLC chromatogram of Polygonati Rhizoma polysaccharide ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

峰号	相对保留时间	相对峰面积	成分
1	0.421 $\pm$ 0.002	1.312 $\pm$ 0.621	<i>D</i> -甘露糖
2	0.461 $\pm$ 0.002	0.929 $\pm$ 0.358	
3	0.500 $\pm$ 0.001	0.810 $\pm$ 0.451	
4	0.602 $\pm$ 0.003	0.871 $\pm$ 0.519	<i>L</i> -鼠李糖
5	0.620 $\pm$ 0.012	0.416 $\pm$ 0.520	
6	0.878 $\pm$ 0.003	1.424 $\pm$ 0.939	<i>D</i> -半乳糖醛酸
7(S)	1.000	1.000	<i>D</i> -葡萄糖
8	1.153 $\pm$ 0.002	31.609 $\pm$ 12.114	<i>D</i> -半乳糖
9	1.227 $\pm$ 0.007	0.469 $\pm$ 0.216	<i>D</i> -木糖
10	1.285 $\pm$ 0.001	1.352 $\pm$ 0.652	<i>D</i> -阿拉伯糖

**2.5.3 相似度分析** 采用“中药色谱指纹图谱相

似度评价系统软件”(2004A 版),以均值法生成样品指纹图谱的共有模式,10 批样品的重叠图及共有模式图谱分别见图 2,3。样品相似度结果分别为 1.000,0.998,0.999,0.999,0.998,0.998,0.999,0.999,0.999,1.000。根据《中国药典》2010 年版中药质量标准研究制定技术要求:采用相似度评价软件计算相似度,若峰数多于 10 个,且最大峰面积超过总峰面积的 70%,或峰数多于 20 个,且最大峰面积超过总峰面积的 60%,计算相似度时应考虑去除该色谱峰。由于峰 8 峰面积占总共有峰面积达 70%以上,影响整体的相似度,将峰 8 不计入积分,再计算 10 批样品相似度,结果分别为 0.999,0.999,0.999,0.999,0.999,0.998,0.999,0.979,1.000,0.999,显示相似度仍然很高,提示黄精样品多糖组成较稳定。

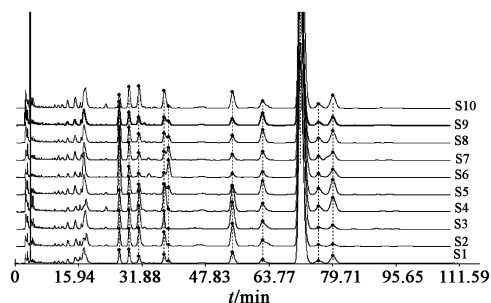


图 2 10 批黄精多糖柱前衍生 HPLC 指纹谱重叠

Fig. 2 Pre-column derivation HPLC characteristic fingerprint overlapping of polysaccharide hydrolysate from ten batches of Polygonati Rhizoma

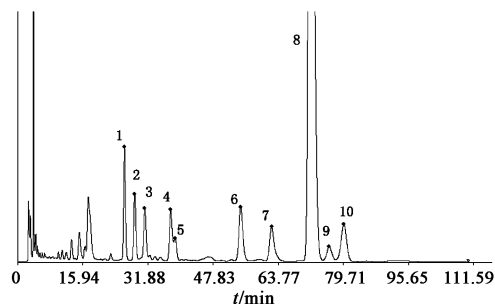


图 3 10 批黄精多糖柱前衍生 HPLC 指纹谱共有模式

Fig. 3 Common pattern of pre-column derivation HPLC characteristic fingerprint of polysaccharide hydrolysate in Polygonati Rhizoma

## 3 讨论

为了减少脂溶性成分的干扰,先采用 80% 乙醇超声处理方法以去除脂溶性成分,水提 1 次可将多糖提取完全。参考文献[14-16]方法对黄精多糖进行 TFA 酸水解时间和 PMP 衍生时间考察,分别考察

了水解时间4,5,6,7,8 h, 衍生时间30,40,50,60,70,80 min, 以共有特征峰的峰面积和作为衡量指标, 随时间的延长多糖趋于完全水解, 当水解时间超过7 h, 峰面积和开始减少, 随着衍生时间的延长, 主要共有特征峰的峰面积和随之升高, 衍生时间为40 min 多糖趋于反应完全, 反应40~60 min 共有峰面积和几乎不变, 当衍生时间超过60 min, 峰面积和开始减少, 由于成品最佳衍生时间为60 min, 且为了保证反应更完全, 所以最终选择了60 min 为衍生时间。最后得到较优水解及衍生条件: 水解时间7 h, 衍生时间1 h。

黄精多糖中单糖的组成以D-半乳糖为主, 其次为D-半乳糖醛酸, D-葡萄糖, D-甘露糖, 所含多糖组成与文献报道<sup>[4-6]</sup>相近。相似度评价结果显示10批黄精多糖水解衍生物相似度高(>0.99), 提示黄精多糖质量较稳定。该方法可作为黄精质量控制的参考依据之一。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 288.

[2] 李凤玲, 何金环. 植物多糖的结构与分离纯化技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2008, 24(10): 276-279.

[3] 曹明菊, 郑晓燕, 陈丽华. 黄精多糖的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2008, 9(4): 52-55.

[4] 庞玉新, 赵致, 袁媛, 等. 黄精的化学成分及药理作用[J]. 山地农业生物学报, 2003, 22(6): 547-555.

[5] 张瑞宇. 中药黄精的研究和开发利用途径[J]. 渝州大学学报: 自然科学版, 2002, 19(4): 5-8.

[6] 高英, 叶小利, 李学刚, 等. 黄精多糖的提取及其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2037-2133.

[7] Miuar T K A. The Difference in Hypoglycemic Action between Polygonati Rhizoma and Polygonati Officinalis Rhizoma [J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(11): 1605-1606.

[8] 李友元, 成威, 邓洪波, 等. 黄精多糖对App转基因小鼠大脑及性腺组织端粒酶活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(11): 844-846.

[9] P K. Raveendran Nair E A. Immune stimulating Properties of a novel Polysaccharide from the medicinal plant Tinopora cordifolia [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 13(4): 1645-1659.

[10] 陈世伟, 张立实, 张红敏. 食物成分调节血脂作用的研究[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 9(1): 1351-1354.

[11] 刘诗琼, 秦晓群, 李世胜. 黄精多糖对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 中国当代医药, 2009, 16(10): 31-35.

[12] 张峰, 张继国, 王丽华, 等. 黄精多糖对东莨菪碱致小鼠记忆获得障碍的改善作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(36): 5410-5412.

[13] 叶红翠, 张小平, 余红, 等. 多花黄精粗多糖抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6): 34-36.

[14] 陈虎虎, 孙静, 杨金颖, 等. 柱前衍生化-高效液相色谱法测定蒙古黄芪多糖中单糖的组成[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 468-470.

[15] 蒋梅, 谭丽蓉, 黄晓洁, 等. 枸杞子多糖柱前衍生HPLC指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 53-56.

[16] 茅蕾蕾, 陈颖, 胡碧原, 等. 银杏外种皮多糖的单糖组成分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 262-266.

[责任编辑 顾雪竹]