

黄芪多糖对照品标化方法研究

王莹^{1,2}, 王超¹, 安锦华³, 王亚丹¹, 金红宇^{1*}, 马双成^{1*}, 倪健²

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 北京中医药大学, 北京 100029

3. 美国泛华医药有限公司, 加利福尼亚州 帕罗奥多

摘要: **目的** 采用多种技术手段对黄芪多糖对照品进行标化, 以应用于注射用黄芪多糖的质量控制。 **方法** 采用紫外分光光度 (UV) 法对总糖量进行定量分析, 采用 HPLC 法于 250 nm 波长处检测 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生化后单糖组成及其量, 采用高效凝胶渗透色谱法测定多糖相对分子质量 (M_w) 及其分布, 用薄层色谱法检查其中游离单糖, 并采用气相色谱串联质谱法和核磁共振波谱 ($^1\text{H-NMR}$) 对糖苷键连接位置及构型进行判断。采用多个试验参数对首批黄芪多糖对照品的质量进行控制。 **结果** 此批黄芪多糖对照品由鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成, 其中葡萄糖为主要成分, 且本品中未检测出游离单糖; M_w 测定结果显示本品依次出现 4 个色谱峰, 其中主峰 (3 号峰) M_w 为 12 531, 峰面积比例为 83%; 总糖量以葡萄糖计为 94%; 气质联用法测得糖苷键类型主要有 8 种, 其中以 1,4-葡萄糖连接为主; 核磁确认异头氢为 α 构型。 **结论** 建立了黄芪多糖对照品标化的方法, 其定性鉴别及总糖定量测定结果准确、可靠, 可进一步对其在黄芪多糖产品中的质量控制技术进行研究。

关键词: 黄芪多糖; 对照品标化; 相对分子质量; 分布; 单糖组成; 糖苷键; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)23-4897-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.013

Study on standardization method of *Astragalus* polysaccharide reference substance

WANG Ying^{1,2}, WANG Zhao¹, AN Jin-hua³, WANG Ya-dan¹, JIN Hong-yu¹, MA Shuang-cheng¹, NI Jian²

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Pharmagenesis Inc., Palo Alto, California, USA

Abstract: Objective A variety of techniques were adopted to establish a standardization method of *Astragalus* polysaccharides (APs) reference substance. This reference substance was used for quality control of APs for injection. **Methods** The total sugar content was quantified by UV spectrophotometry ration. The content of monosaccharide was determined by HPLC at detective wavelength of 250 nm after derivatized with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). The high performance size exclusion chromatography method was used for the determination of molecular weight and distribution. TLC was applied to check the free monosaccharide. Then the glycosidic linkage position and configuration were detected by using gas chromatography tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$). A number of experimental parameters were applied to control the quality of APs reference substance. **Results** The APs was composed of rhamnose (Rha), galactose acid (GalA), glucose (Glc), galactose (Gal), and arabinose (Arb), and Glc was the main component and free monosaccharide were not detected in APs. The result of molecular weight test showed that there were four chromatographic peaks in APs, of which the main peak (peak 3) M_w was 12 531 and the peak area ratio was 83%. The amount of sugar was 94% by UV test in which the glc was calculated as reference substance. There were eight main types of glycosidic bonds detected by GC-MS. Among them, the 1,4-glucose linkage was the main one. The glycosidic bond confirmed by NMR was α configuration. **Conclusion** The standardization method of APs reference substance has been established in this study. The identification method and determination of sugar amount are accurate and reliable. In the further research, APs reference substance will be used in quality control of APs products.

收稿日期: 2017-07-21

作者简介: 王莹, 女, 助理研究员, 研究方向为中药质量控制及安全检测。Tel: (010)67095424 13691547801 E-mail: wayi_1986@163.com

*通信作者 马双成, 男, 博士, 博士生导师, 研究方向为中药质量民族药质量控制和评价研究。Tel: (010)67095277 E-mail: masc@nifdc.org.cn
金红宇, 男, 主任药师, 研究方向为中药质量控制及安全性研究。Tel: (010)67095424 E-mail: jhyw@nifdc.org.cn

Key words: *Astragalus* polysaccharides; standardization method of reference substance; molecular weight; distribution; monosaccharide components; glycosidic bond; quality control

多糖作为天然化学成分的一个大类,在自然界分布极广。来源于动物、植物以及微生物的中药材中几乎均含有多糖成分。多数中药中的多糖成分被认为是活性成分之一,据文献报道,多糖物质及其衍生物在增强机体免疫功能及抗肿瘤、抗肝炎、调血脂、降血糖、抗氧化等方面有一定的作用^[1-3]。同时,其功效的发挥与结构有着紧密的联系,主要影响活性的结构因素有单糖组成、糖连接方式、糖构型及相对分子质量分布等结构特征^[4-5]。但由于多糖结构的复杂性,使其质量控制难度较大。目前,多糖类药物质量标准存在的主要问题是缺乏特异的鉴别反应、专属的定量测定方法以及用于定性定量分析的多糖标准品或对照品和相对分子质量分布分析等^[6-8]。

黄芪多糖(*Astragalus* polysaccharides, APs)是中药多糖中研究最为活跃的产品之一^[9-12],并已获得市场广泛应用。其代表性制剂注射用黄芪多糖(国药准字 Z20040086)主要用于提高机体免疫力、辅助治疗癌症、糖尿病等疾病^[13-15],药效明显,有着非常广阔的应用前景。目前,缺乏可用于质量控制的 APs 对照品也是推进其质量标准提升缓慢的一大瓶颈。以标定的对照品为参比,来控制多糖产品批间差异,可能是解决多糖质量标准缺乏专属性的一个重要突破口。本研究由美国泛华有限公司提供的精制 APs 作为 APs 对照品原料,初步建立了 APs 对照品的标化方案,鉴于其结构复杂性,采用了多种技术手段结合的方式对其结构及量值进行测定,研究内容包括单糖组成^[16-19]、相对分子质量测定^[20-23]、糖苷键连接位置^[24-25]及糖构型^[26-27]等。进一步将其适用性进行探索,以期能为其他中药多糖对照品的开发及质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪-紫外检测器, Waters 公司; LC-20AD 高效液相色谱仪-示差检测器、GCMS-2010 气相色谱质谱联用仪, 日本岛津公司; 薄层色谱自动点样仪, 卡玛公司; 500 MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司。

1.2 试剂与供试品

对照品葡萄糖(批号 110833-201205)、半乳糖(批号 100226-201105)、半乳糖醛酸(批号 111646-

200301)、麦芽三糖(批号 10027-201102)、D₀~D₈ 右旋糖酐相对分子质量(M_w)系列对照品, 以上对照品均购于中国食品药品检定研究院; 异麦芽三糖(批号 CDAA-261002), 质量分数大于 97%, 购于上海安谱股份有限公司; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP), 质量分数 99%, 美国 Acros Organics 公司; 2 种单糖阿拉伯糖(批号 C12087500)、鼠李糖(批号 C16813500)购于 Dr Ehrenstorfer 公司, 质量分数均大于 97%; 供试品: APs 对照品原料, 由美国泛华医药有限公司提供, 批号 APS130901, 质量分数 >90%。

2 方法与结果

2.1 单糖组成测定

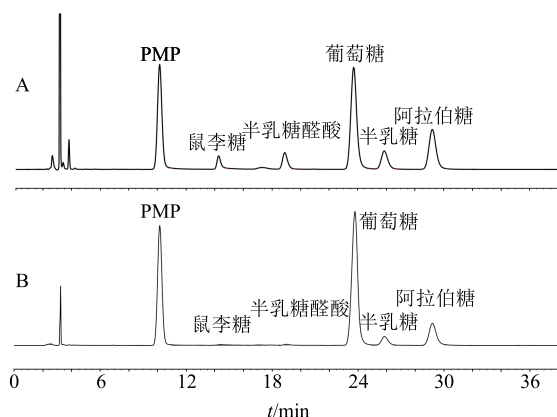
2.1.1 对照品溶液制备 分别精密称取鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖适量, 按质量比 1:1:20:1:2 配制混标溶液, 混标溶液中葡萄糖质量浓度为 1 mg/mL。定量吸取上述混标溶液 500 μ L, 加 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 67 μ L, 再加入 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 150 μ L, 搅拌均匀, 于 70 $^{\circ}$ C 反应 90 min。冷却至室温, 再加 0.3 mol/L 盐酸溶液 67 μ L 中和。加 1 mL 氯仿萃取, 分去下层有机层, 重复萃取 3 次。取上层溶液, 得混合对照品溶液, 待测。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取 APs 供试品约 20 mg, 加水定容至 5 mL, 定量吸取 250 μ L, 置于安瓿中, 加入等体积的 6 mol/L 三氟乙酸, 密闭, 于 110 $^{\circ}$ C 反应 6 h。氮气吹干, 加适量甲醇, 再吹干, 以除尽剩余三氟乙酸。加水 500 μ L, 使残渣溶解。按对照品溶液制备“加 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 67 μ L”起同法处理, 得上层溶液为供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Spolar C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以乙腈-0.1 mol/L 乙酸铵溶液(21:79, 加冰醋酸调节 pH 值为 5.5) 为流动相; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 检测波长 250 nm; 进样量 10 μ L。

2.1.4 测定结果 对照品及 APs 供试品测定图谱如图 1 所示, 样品呈现出 5 个单糖的色谱峰, 依次为鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖。

根据以上测定结果, 采用外标一点法以峰面积计算各单糖物质的量比, 所得结果如表 1 所示。从结果可见, 葡萄糖物质的量比最高达 90.9%, 其次



A-5 种单糖混合对照品溶液 B-APs 供试品溶液
A-Five mixed monosaccharide reference substances B-APs

图 1 APs 单糖组成测定的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of monosaccharide components in APs

表 1 APs 单糖组成测定结果

Table 1 Determination results of monosaccharide components in APs

单糖	t_R/min	物质的量比/%
鼠李糖	14.28	0.2
半乳糖醛酸	18.90	0.3
葡萄糖	23.72	90.9
半乳糖	25.86	2.4
阿拉伯糖	29.21	6.2

为阿拉伯糖和半乳糖，分别为 6.2% 和 2.4%。

2.2 游离单糖检查

对 APs 中量较高的 3 种单糖进行游离单糖检查，以保证黄芪多糖样品质量。

2.2.1 实验步骤 取 APs，加水制成质量浓度为 40 mg/mL 的溶液，作为供试品溶液。另取葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖对照品，分别加水制成含 5 mg/mL 的溶液，作为对照品溶液。按《中国药典》2015 年版四部通则薄层色谱法测定，吸取供试品溶液 10 μL ，对照品溶液 2 μL 点于同一硅胶 G 薄层板中，以正丁醇-0.1 mol/L 磷酸氢二钠-丙酮 (4:1:5) 为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 α -萘酚试液，在 100 $^{\circ}\text{C}$ 烘约 5 min，在日光下检视。

2.2.2 测定结果 结果如图 2 所示，供试品色谱中在与对照品色谱相应的位置上，未显相同颜色的斑点，显示本品中未检出此 3 种游离单糖。

2.3 糖苷键连接位置确定

2.3.1 实验步骤

(1) 甲基化反应: 称取 APs 样品 10 mg，加 10 mL

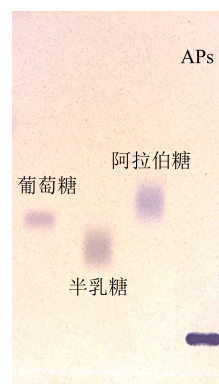


图 2 APs 中游离单糖检查薄层色谱图

Fig. 2 TLC for determination of free monosaccharide in APs

DMSO 溶解，20 $^{\circ}\text{C}$ 下超声波浴 30 min，尽量溶解样品。取以上溶液 1 mL 放入反应管内，加入约 50 mg 新鲜磨制的氢氧化钠粉末，充入氮气，超声 20 min。冰浴冷却至样液凝固，充入氮气，加入 0.5 mL CH_3I ，超声 20 min，期间控制超声波水浴的温度为 18~20 $^{\circ}\text{C}$ 。冰浴冷却至样液凝固，充入氮气，重复以上步骤 1 次。加入 4 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2 mL，终止甲基化反应。向反应液中加入 1.0 mL 氯仿，旋涡振荡混合，静置数分钟待分层后，吸出下层氯仿相。重复此操作，反应液用 1.0 mL 氯仿提取 3 次。合并氯仿相，加入 1.0 mL 水，旋涡振荡混合，3 000 r/min 离心 5 min，除去水相。重复此操作，氯仿相用 1.0 mL 水处理 2 次。向氯仿相加入少量无水硫酸钠，充分混合，以除去残留的水分。倒出上清液，氮气吹干。

(2) 水解: 加入 2 mol/L 三氟乙酸 1.0 mL，120 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h。冷却至室温，用氮气吹干。加入 0.5 mL 甲醇，用氮气吹干。

(3) 还原: 加入新配的 10 mg/mL 硼氢化钠溶液 1.0 mL，室温反应 2 h，期间振荡数次。逐滴加入 4 mol/L 乙酸中和，pH 试纸检测。加入 0.5 mL 甲醇，氮气吹干，重复 2 次。

(4) 乙酰化: 加入 1.0 mL 新配制的吡啶-乙酸酐 (1:1)，120 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。冷却至室温，氮气吹干。加入 1.0 mL 甲醇，氮气吹干，重复 2 次。加入 2 mL 二氯甲烷，旋涡振荡，离心，取上清液，进行 GC/MS 分析。

按照上述步骤操作后，得到 APs 部分甲基化的糖醇乙酯衍生物 (PMAA)。

2.3.2 GC/MS 分析条件

气相条件: 色谱柱为 SP-2330 (30 m $\times$ 0.25 mm，

2 μm), 起始温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 170 $^{\circ}\text{C}$, 再以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 240 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min。载气为 He, 体积流量 1.10 mL/min, 分流比: 10, 进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 离子接口温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 1 μL 。

质谱条件: 采用 scan 模式采集数据, 扫描离子范围为 m/z 50~500。

2.3.3 结果分析 采用以上方法对样品进行测定, 并与麦芽三糖 (1,4 位连接及端基葡萄糖)、异麦芽三糖 (1,6 位连接及端基葡萄糖) 比较, 由于 scan 扫描模式下, 杂峰干扰较大, 从 scan 图谱中提取出丰度较高 m/z 118 的碎片离子图 (即碎片 $\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}-\text{CHD}-\text{OAc}$), 如图 3 所示。通过与三糖对照品比较可明确判断出 APs 含有 1,4、1,6 位连接及端基葡萄糖。另外, 根据文献报道及对碎片离子解析, 可推

断出其他几种主要的糖苷键连接方式。计算其物质的量比, 其中葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖不同糖苷键的摩尔总数与单糖组成结果基本一致, 从侧面验证了推断结果的准确性, 如表 2 所示。

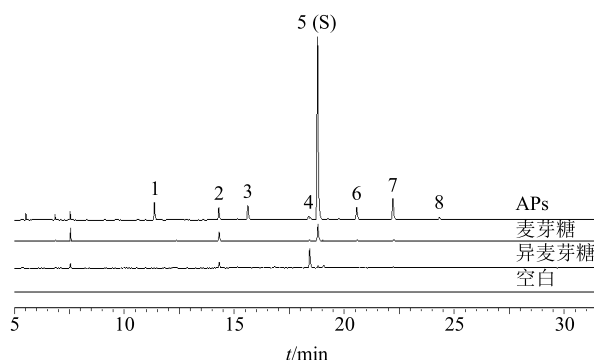


图 3 APs PMAA 产物的提取离子流图

Fig. 3 Extract ion flow chart of PMAA products of APs

表 2 APs 糖苷键连接位置测定结果

Table 2 Determination results of the glycosidic linkage position in APs

峰号	t_R/min	相对保留时间	PMAA	相对分子质量	连接点	物质的量比/%
1	11.4	0.60	1,4-Ac ₂ -2,3,5-Me ₃ -Araf	309	1-linked Araf	2.77
2	14.3	0.76	1,5-Ac ₂ -2,3,4,6-Me ₄ -Glc	323	1-linked Glc [#]	6.60
3	15.6	0.83	1,4,5-Ac ₃ -2,3-Me ₂ -Araf	337	1,5-linked Araf	3.94
4	18.4	0.99	1,5,6-Ac ₃ -2,3,4-Me ₃ -Glc	351	1,6-linked Glc [#]	1.52
5 (S)	18.8	1.00	1,4,5-Ac ₃ -2,3,6-Me ₃ -Glc	351	1,4-linked Glc [#]	74.55
6	20.6	1.09	1,3,4,5-Ac ₄ -2,6-Me ₂ -Gal	379	1,3,4-linked Gal	4.56
7	22.3	1.18	1,4,5,6-Ac ₄ -2,3-Me ₂ -Glc	379	1,4,6-linked Glc	8.66
8	24.4	1.27	1,3,4,5,6-Ac ₅ -2-Me-Glc	407	1,3,4,6-linked Glc	0.92

[#]指通过对照品确认后的糖苷键连接方式

[#]means the determination results of the glycosidic linkage position have been confirmed by the reference substances

2.4 凝胶渗透色谱法测定相对分子质量

2.4.1 对照品溶液的制备 取 9 个已知相对分子质量的右旋糖酐对照品, 分别加流动相稀释制成约含 10 mg/mL 的单标溶液作为对照品溶液。9 个对照品相对分子质量分别为 D₀ 180、D₁ 2 700、D₂ 5 250、D₃ 9 750、D₄ 13 050、D₅ 36 800、D₆ 64 650、D₇ 135 350、D₈ 300 600。

2.4.2 供试品溶液的制备 取 APs 适量, 精密称定, 加流动相制成质量浓度约为 10 mg/mL 的溶液, 作为供试品溶液。

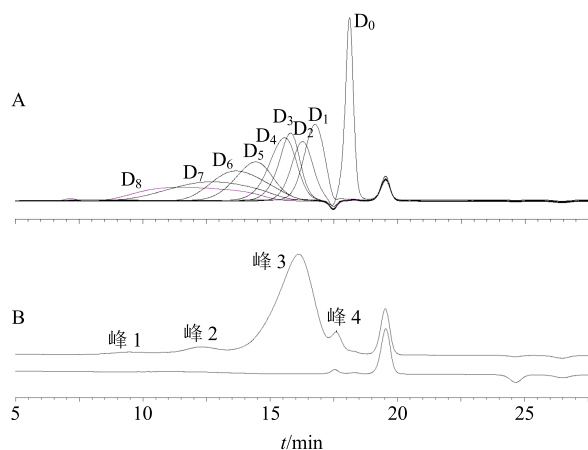
2.4.3 色谱条件 色谱柱为 Shodex GS-620 HQ (300 mm×8.0 mm, 6 μm); 流动相为 0.7%硫酸钠溶液; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.6 mL/min, 采用示差折光检测器进行测定, 进样量 10 μL 。分别将对

照品和供试品溶液注入液相色谱仪, 记录色谱图, 由 GPC 软件三次方程拟合标准曲线。右旋糖酐对照品 D₀ 峰理论塔板数应不小于 5 000。

2.4.4 测定结果 对相对分子质量对照品溶液及供试品溶液测定后, 所得色谱图如图 4 所示。样品色谱图呈现出 4 个分离不完全的色谱峰, 整体峰的重均相对分子质量 (M_w) 为 80 978, 分布系数为 22.28。其各峰的 M_w 依次是: 1 号峰 M_w 为 3 127 228; 2 号峰 M_w 为 224 180; 3 号峰 M_w 为 12 531; 4 号峰 M_w 为 624。从面积百分比看, 1 号峰和 2 号峰的峰面积比为 10%, 3 号峰为 83%, 4 号峰为 7%, 其中 3 号峰为主峰。

2.5 UV 测定总糖量

2.5.1 对照品溶液的制备 精密量取葡萄糖对照品



A-9 个对照品溶液图谱 B-空白试剂及供试品溶液图谱

A-Nine reference substances B-blank control and APs

图4 相对分子质量测定的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC for molecular weight determination

10 mg, 至 100 mL 量瓶中, 加水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。

2.5.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL, 分别置 10 mL 刻度管中, 加水至 2.0 mL。再加苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速滴加硫酸 5.0 mL、摇匀, 放置 5 min, 至水浴中加热 15 min, 取出, 迅速冷却至室温, 另以 2.0 mL 水作为空白对照, 进行以上操作。照分光光度法在 490 nm 波长处测定吸光度 (A), 以 A 值为横坐标, 质量浓度 (C) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归

方程为 $C=0.365\ 10\ A$, $r^2=0.990\ 77$ 。

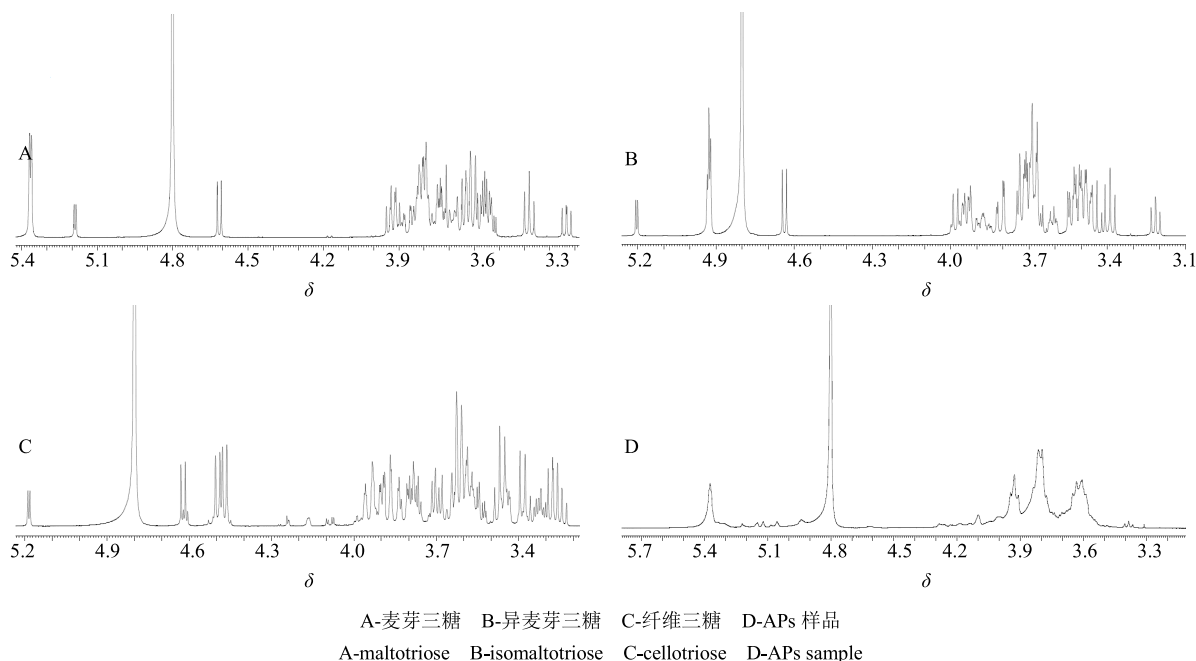
2.5.3 供试品溶液的制备 取 APs 约 50 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 10 mL 至 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 备用。

2.5.4 总糖测定 取供试品溶液 0.5 mL 置于 10 mL 比色管中, 照标准曲线制备项下的方法自“加水至 2.0 mL”起, 测定 A 值, 按回归方程计算, 重复测定 6 次, 样品多糖量均值为 94.1%, RSD 为 2.98%。

2.6 核磁法测定异头氢构型

2.6.1 实验步骤 为了确定 APs 中主要连接方式葡聚糖的异头氢构型, 采用 Bruker AV-III 核磁共振波谱 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) 进行测定, 并与异麦芽三糖对照品 (结构中含 α -1,6 葡萄糖)、麦芽三糖 (结构中含 α -1,4 葡萄糖) 以及纤维三糖 (结构中含 β -1,4 葡萄糖) 对照品进行对比。分别称取 APs 及对照品各 5 mg, 以 D_2O 为溶剂进行测定。

2.6.2 实验结果 本品的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱信号 (500 MHz, D_2O) 及其归属如下: 麦芽三糖异头氢: δ 5.37 (2H), $J_{1,2}$ 为 3.5 Hz; 异麦芽三糖异头氢: δ 4.93 (2H), $J_{1,2}$ 为 3.5 Hz; 纤维三糖异头氢: δ 4.46~4.50 (2H), $J_{1,2}$ 为 8.0 Hz; APs 异头氢: δ 5.37、4.94, 见图 5 所示。本品测定位移值与麦芽三糖、异麦芽三糖 α 异头氢对应, 且与相关文献报道一致^[26], 故可判定为本品中 1,4 和 1,6 葡萄糖的端基氢均为 α 构型。



A-麦芽三糖 B-异麦芽三糖 C-纤维三糖 D-APs 样品
A-maltotriose B-isomaltotriose C-cellotriose D-APs sample

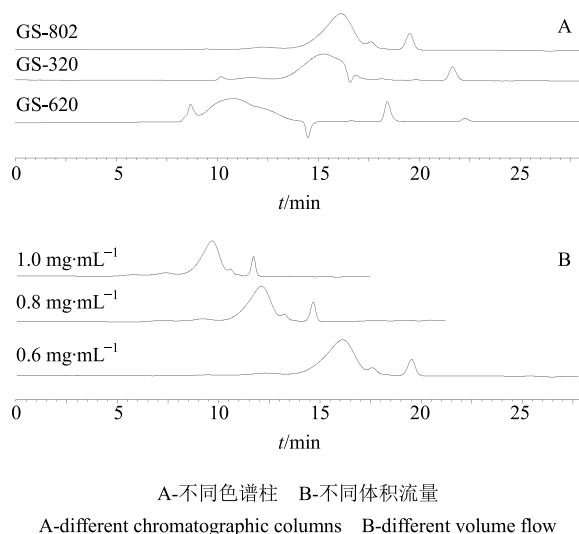
图5 用于构型测定的对照品及样品核磁图谱

Fig. 5 NMR chromatogram of reference substances and APs for configuration determination

3 讨论

3.1 相对分子质量测定条件优化

分别采用 Shodex GS-320、Shodex GS-620 以及 Shodex OHpak SB-802 3 根色谱柱以及不同的体积流量对色谱条件进行优化, 结果见图 6。通过对比发现: GS-620 柱的分离度最佳, 并在体积流量为 0.6 mL/min 的条件下能达到较好的分离, 最终确定 Shodex GS-620 柱作为分离柱。



A-不同色谱柱 B-不同体积流量

A-different chromatographic columns B-different volume flow

图 6 GPC 色谱条件优化

Fig. 6 Optimization of GPC chromatographic conditions

3.2 糖苷键连接方式测定法探讨

甲基化分析是研究糖类结构的重要化学方法, 它广泛用于寡糖和多糖中单糖残基间连接位置的确定。其主要过程为①将多糖中游离羟基全部甲基化; ②水解得到部分甲基化的单糖; ③将这些单糖还原和乙酰化, 得到 PMAA; ④用 GC/MS 测定部分甲基化衍生物的种类和数量, 就能推测出单糖残基的连接方式。PMAA 的质谱图解析是甲基化分析的难点之一, 通常可以采取 3 种方法: 一是采用 GC/MS 谱库进行检索, 根据谱库数据与样品的匹配度进行解析, 但这种方法有时误差较大; 二是与标准品谱图进行比对, 根据质谱图的质荷比 (m/z) 和丰度确定样品峰, 但标准品图谱不易获得, 且可能会有少许误差; 三是根据电离规律进行解析, 这种方法比较科学可靠, 但难度较大^[14]。为了测定结果的准确性, 本研究采用以上 3 种方式相互结合、相互验证的方法, 除了对比谱库、文献以及分析电离规律外, 亦采用主要含有 1,4 和 1,6 葡萄糖苷键的三糖类化合物作为对照品以确定主要糖苷键类型。

3.3 糖苷键构型测定法探讨

液相、质谱等方法在糖类化合物的结构解析中发挥着重要的作用, 但上述方法都不能解决糖类化合物的构型和构象问题。采用一维、多维核磁共振技术为糖类化合物的化学结构和三维空间结构的研究提供了技术手段^[16]。一维氢谱常用于推断异头氢构型, 一般来讲不同构型异头氢化学位移及耦合常数数值有差异。 α 构型异头质子信号 δ 5.0~5.8, β 构型异头质子信号 δ 4.4~5.0, 而糖环其他的非异头质子信号在 δ 3.2~4.5。本品测定结果 δ 5.37、4.94, 位于较低场, 且其化学位移值与 α 构型三糖一致, 故通过理论推断和化学品对照方式可判断本品构型。

3.4 单糖组成测定方法学考察

采用全水解, PMP 衍生化法对单糖组成进行测定, 可明确单糖种类。对单糖组成测定方法中水解温度、时间及衍生化条件均进行了摸索, 以达到完全水解及衍生化的目的, 最终得出本研究“2.1”项的实验方案。但方法在定量方面仍存在一定的局限性。由于其水解及衍生测定步骤繁杂, 可控性和重复性相对较差, 致使测定结果有一定偏差。本研究对此方法的重复性、回收率及稳定性进行测试, 所得结果如表 3 所示。从结果可看出半乳糖醛酸的回收率及稳定性均较差, 回收率仅为 8%, 且其量在 2 h 后开始呈现明显的下降, 无法准确测定。其他几类单糖虽回收率和稳定性基本符合定量测定要求, 但其重复性均不佳。故将此部分测定定义为定性鉴别法, 同时对其中葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖下限值进行规定。

表 3 单糖组成测定方法稳定性、回收率及重复性结果

Table 3 Stability, recovery and reproducibility of monosaccharide components method

单糖	稳定性 (24 h) RSD/%	回收率/%	重复性 RSD/%
葡萄糖	0.4	103.9	5.3
半乳糖	8.5	82.6	22.3
阿拉伯糖	0.9	83.4	29.1
半乳糖醛酸	60.4	8.2	10.7
鼠李糖	5.6	61.0	4.3

3.5 标化方案的确定

最终通过建立 HPLC 法测定单糖组成、TLC 法检查游离单糖、GC/MS 法测定糖苷键连接位置、GPC 法测定相对分子质量、紫外分光光度法测定总糖量以及核磁法测定异头氢构型, 确定了 APs 对照

品的标化方案。并通过重复测定,对其主要参数做了如下规定:本品应由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖和半乳糖醛酸组成,其中葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的物质的量比分别应不得低于68.0%、2.0%、2.5%;TLC法测定本品中应不得检出游离葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖;相对分子质量测定HPLC色谱图中应依次出现4个主要色谱峰,其中主峰(3号峰) M_w 应为8 000~18 000,峰面积百分比应不小于60%;APs中葡萄糖主要以末端、1,4-、4,6-、1,6-位连接为主,与麦芽三糖、异麦芽三糖相比,在保留时间相应的位置上(t_R 为10~25 min)应出现碎片离子一致的2个主要色谱峰;UV法测定APs含多糖以葡萄糖计应不低于90%;APs中1,4和1,6葡萄糖的端基氢应为 α 构型。

参考文献

- [1] 李启艳,祝清芬,刘春霖,等.党参多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J].中草药,2017,48(5):907-912.
- [2] 董莉,蒋金珩,郭菲,等.复方库拉索芦荟多糖凝胶剂处方工艺研究及其体外释药特性评价[J].中草药,2016,47(24):4345-4350.
- [3] 张培,郑晓萍,马玉玲,等.党参多糖单糖组成与其对HepG2细胞毒活性的相关分析[J].中草药,2016,47(15):2684-2692.
- [4] 高小荣,刘培勋.多糖构效关系研究进展[J].中草药,2004,35(2):229-232.
- [5] 张芳,郭盛,钱大玮,等.枸杞多糖的提取纯化与分子结构研究进展及产业化开发现状与前景分析[J].中草药,2017,48(3):424-432.
- [6] 范慧红.2010年版《中国药典》中多糖类药物标准的修订[J].中国药理学杂志,2010,45(17):1294-1297.
- [7] 郭志辉,韩丽,杨明,等.中药多糖定量测定方法的探讨[J].中成药,2014,36(10):2172-2174.
- [8] 高怡婷,柳文媛.多糖的制备工艺与质量控制研究进展[J].药学进展,2016,40(3):205-211.
- [9] 邓瑾,郑立发,张振海,等.黄芪多糖-Eudragit S100结肠定位释放喷雾干燥粉的制备和体外溶出评价[J].中草药,2014,45(6):778-781.
- [10] 张莹,王蕾,杜梦楠.注射用黄芪多糖治疗肿瘤的临床研究进展[J].药物评价研究,2016,39(6):1092-1094.
- [11] 杨龙,韩冬,巩文艺.黄芪多糖对严重烧伤大鼠心肌损伤的保护作用[J].现代药物与临床,2016,31(3):284-289.
- [12] 陈锋.注射用黄芪多糖的提取工艺改进[D].天津:天津大学,2014.
- [13] 郑召鹏,杨卫兵,李宁,等.注射用黄芪多糖预防非小细胞肺癌化疗后骨髓抑制的疗效观察[J].中草药,2013,44(2):208-209.
- [14] 张莹,贾英杰,李小江,等.注射用黄芪多糖对耐顺铂人肺腺癌细胞A549/DDP耐药逆转作用研究[J].药物评价研究,2012,35(6):417-419.
- [15] 许敬.注射用黄芪多糖联合甲地孕酮对晚期恶性肿瘤患者生活质量的改善作用[J].中草药,2012,43(7):1385-1386.
- [16] 单俊杰,王易,翁颖琦,等.黄芪毛状根多糖与黄芪多糖化学组成及免疫活性的比较[J].中草药,2002,33(12):1096-1100.
- [17] 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.
- [18] 许杜娟,夏泉,刘钢,等.高效液相法测定黄芪中性多糖的单糖组成[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(9):4-7.
- [19] Wang M, Yang X B, Zhao J W, et al. Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Smilax glabra* Roxb. [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 156(1): 390-402.
- [20] Yang W F, Wang Y, Li X P, et al. Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117(1): 1021-1027.
- [21] 刘芹,宁嘉玲,丁侃.基于高效凝胶渗透色谱法的银耳多糖质量控制研究[J].中草药,2011,42(9):1732-1735.
- [22] 简龙海,夏晶,沈盈盈,等.黄芪注射液中多糖相对分子质量的高效凝胶渗透色谱研究[J].药物分析杂志,2010,30(11):2037-2040.
- [23] 颜军,易勇,邬晓勇,等.黄芪多糖的相对分子质量测定及单糖组成分析[J].食品科技,2012,37(12):278-284.
- [24] 周鹏,谢明勇,傅博强.多糖的结构研究[J].南昌大学学报,2001,25(2):198-204.
- [25] 李波,芦菲.多糖的甲基化方法及图谱解析[J].天然产物研究与开发,2012,24(1):79-83.
- [26] 刘玉红,王凤山.核磁共振波谱法在多糖结构分析中的应用[J].食品与药品,2007,9(8):39-43.
- [27] 刘明,李春霞,辛现良.核磁共振技术在糖类化合物化学结构研究的应用[J].中国药理学杂志,2009,44(5):324-326.