1%冰醋酸(35∶65)、甲醇-0.1%磷酸水(梯度洗脱)、乙腈-0.4%冰醋酸(19∶81);检测波长283 nm、360 nm;柱温:30 ℃;体积流量:1.0 mL/min。在不同的色谱条件下,柚皮苷和新北美圣草苷均为一个主峰,改变流动相分析,未见异常峰,用面积归一化法计算,二者质量分数分别为99.3%、99.5%。其中甲醇-1%冰醋酸(35∶65),283 nm下检测图谱见图1。

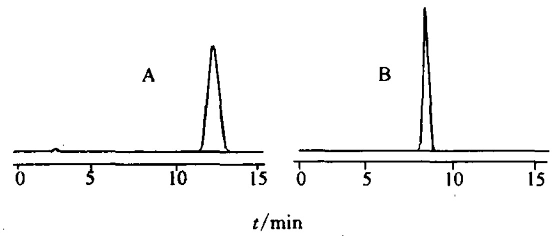


图1 新北美圣草苷(A)和柚皮苷(B)的HPLC色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of neoeriocitrin (A) and naringin (B)

3 讨论

柚皮苷和新北美圣草苷均为骨碎补的活性成分,量高,性质稳定,用上述制备方法进行提取、分离、纯化,操作方便,重现性好,符合对照品的质量分数要求,因而可作为对照品使用,供骨碎补药材及其复方中药的定性、定量分析。

大孔树脂精制时,具有吸附容量大、洗脱效率高等优点,使柚皮苷和新北美圣草苷的量提高,除去糖类等多数杂质。富集的样品上硅胶柱色谱分离后,所得新北美圣草苷部分由于柚皮苷和新北美圣草苷结构很相近,需采用制备薄层色谱或Sephadex LH-20反复柱色谱分离才能达到分离效果。

利用柚皮苷和新北美圣草苷在中性氧化铝中的吸附性能不同,将新北美圣草苷吸附在中性氧化铝上,而柚皮苷可在乙醇回流时解吸附,从而分离得到柚皮苷,经反复重结晶得到质量分数99.3%的柚皮苷白色结晶。被吸附在中性氧化铝上的新北美圣草苷可以在酸性乙醇超声条件下解吸附,但在酸性乙醇条件下回流会有部分转变成柚皮苷,说明新北美圣草苷在酸性高温条件下不稳定。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
[2] 李顺祥,龙 勉,张志光. 骨碎补的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(11): 75-78.
[3] 李顺祥,张志光,龙 勉. 不同产地骨碎补的柚皮苷测定[J]. 中南药学, 2003, 1(2): 103-104.
[4] 李顺祥,张志光,龙 勉,等. 骨碎补超微饮片的HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1634-1637.
[5] 徐传河,杨松松. 中药骨碎补化学成分研究(一):槲蕨根茎化学成分研究[J]. 辽宁中医学院学报, 1984, 1(1): 49-52.
[6] Li F, Meng Z, Xiong Y, *et al*. Stimulative activity of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. extracts and two of its flavonoids on the proliferation of osteoblastic like cells [J]. *Pharmazie*, 2006, 61: 962-965.
[7] 陈德昌. 中药化学对照品工作手册[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000.
[8] Kosuge K, Mitsunaga K, Koike K, *et al*. Studies on the constituents of *Ailanthus integrifolia* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42(8): 1669-1671.

高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法测定人工培养蛹虫草多糖的单糖组成

杨 威[1],殷 茵[1],宋丽艳[1,2],赵 昱[2],于荣敏[1]*
(1. 暨南大学药学院,广东 广州 510632; 2. 浙江大学药学院,浙江 杭州 310038)

摘 要:目的 采用高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法测定人工培养蛹虫草多糖的单糖组成。**方法** 以人工培养蛹虫草子实体为原料,利用热水和稀碱液分别对其水溶性多糖成分进行提取,分离得到6种人工蛹虫草水溶性多糖化合物。其中水提部分主要分离得到3种精多糖P50、P70-1和P70-2,碱提部分则分离得到3种精多糖CBP-1、CBP-2和CBP-3。高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法分别对上述6种精多糖的单糖组成成分进行了测定。**结果** 除CBP-3为葡聚糖外,其他5个多糖均为由*D*-甘露糖、*D*-半乳糖和*D*-葡萄糖组成的杂多糖。**结论** 采用高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法进行多糖化合物的单糖组成成分测定,无需进行衍生化,可达到简便、高效、准确地进行单糖组成分析之目的。

关键词:人工蛹虫草;多糖;单糖;高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱
中图分类号:R284.2;R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)04-0531-05

收稿日期:2007-06-10
基金项目:广州市科技计划项目(2006Z3-E5031)
作者简介:杨 威(1982—),男,湖南岳阳人,暨南大学2004级硕士研究生,主要从事现代生物技术与中药现代化相关内容研究。
*通讯作者 于荣敏 Tel:(020)85220386 E-mail:tyrm@jnu.edu.cn

Determination of monosaccharide composition of polysaccharides in cultured *Cordyceps militaris* by high performance anion exchange chromatography with pulsed electrochemical detection

YANG Wei[1], YIN Yin[1], SONG Li-yan[1,2], ZHAO Yu[2], YU Rong-min[1]
(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310038, China)

Abstract: **Objective** To determine the monosaccharide compositions of polysaccharides in cultured *Cordyceps militaris* by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-electrochemical detection (HPAEC-PED). **Methods** Through the application of the hot-water extraction and dilute base extraction methods, taking the cultured *C. militaris* sporophore as raw matarial, six water-soluble polysaccharides were obtained from the cultured *C. militaris*. The polysaccharides named as P50-1, P70-1, and P70-2 were isolated from the hot-water extraction, and CBP-1, CBP-2, and CBP-3 from the base extraction. The six components of the monosaccharide in the polysaccharides were analyzed by HPAEC-PED. **Results** The results showed these water-soluble polysaccharides all consisted of mannose, glucose, and galactose except CBP-3, which was supposed to be a glucan. **Conclusion** This method is simple, high efficiency, accurate and can be used to determine the monosaccharide composition of polysaccharides without derivatization.

Key words: cultured *Cordyceps militaris*; polysaccharides; monosaccharide; high performance anion exchange chromatography with pulsed electrochemical detection (HPAEC-PED)

蛹虫草又称北冬虫夏草，与冬虫夏草同属于子囊菌亚门麦角菌科虫草属。关于蛹虫草多糖结构的研究仅仅是部分结构片断，尚无对其多糖组分的一级结构重复单元的阐明[1~8]。高效阴离子色谱法的出现为糖类物质的分离提供了既简单又高效的方法。由于糖类化合物没有紫外吸收，故不能用紫外或荧光法直接检测。若采用 GC 分析则须进行衍生化处理，从而大大增加了分析方法的复杂性和难度。目前，高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法（high performance anion exchange chromatography with pulsed electrochemical detection, HPACE-PED）技术已经成为糖类化合物分析的首选方法之一[9,10]。因此，本实验采用 HPAEC-PED 法对人工蛹虫草多糖的三氟乙酸完全水解产物的单糖组成进行了分析。

1 试剂与仪器

人工培养蛹虫草子实体干品由沈阳中天生物工程公司提供，由暨南大学于荣敏教授鉴定。*L*-鼠李糖、*L*-木糖、*L*-阿拉伯糖、*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖单糖对照品均为 Sigma 公司产品（质量分数 99%以上），其他试剂均为国产分析纯。

美国戴安 Dionex ICS—2500 高效离子色谱，Au 工作电极，Ag/AgCl 参比电极；Carbo PAC™ PA10 色谱柱（250 mm×2.0 mm）；在线自动脱气四元梯度泵；ED50 电化学脉冲安培检测器。

2 方法和结果

2.1 水提粗多糖的制备：取烘干的人工培养蛹虫草子实体 200 g，粉碎过 80 目筛后，用乙醇索氏提取以除去脂溶性物质。药材残渣风干后，加热水 3 L 提取 4 h，重复操作 3 次，滤过。合并滤液，浓缩，Sevag 法除去蛋白质，以蒸馏水透析 48 h。向透析液中加乙醇至含醇量为 50%，高速离心，收集沉淀，冷冻干燥得粗多糖 CP50；向离心后的上清液中继续加入乙醇，至含醇量为 70%，高速离心分离，收集沉淀，冷冻干燥得粗多糖 CP70（15.8 g）。

2.2 碱提粗多糖的制备：将水提后蛹虫草残渣用 0.1 mol/L NaOH 溶液 2 L 于室温下振荡提取 2 次，滤过。合并滤液，加 0.1 mol/L HCl 调 pH 7.0，离心。将所得上清液进行透析以除去小分子杂质，浓缩，加乙醇至含醇量为 60%，离心得到沉淀，冷冻干燥，得到碱提粗多糖 CBP（6.7 g）。

2.3 水溶性粗多糖的分离纯化：称取粗多糖 50 mg，用蒸馏水 5 mL 溶解，以 DEAE-纤维素为凝胶填料的色谱柱（30 cm×2.6 cm）上样，洗脱液 0～0.5 mol/L NaCl 线性梯度洗脱，体积流量：0.6 mL/min，每管收集体积：6 mL，苯酚-硫酸法检测。将收集得到的各洗脱主峰出峰液用 DEAE-Sepharose FF 进行纯化，冷冻干燥。

2.3.1 水提粗多糖 CP50 的分离纯化：CP50 经 DEAE-纤维素色谱分离，显示在不同浓度 NaCl 洗脱液条件下出现两个峰形。收集洗脱下来的主峰，峰 I（11～31 管）为 0～0.1 mol/L NaCl 洗脱下来的部分，洗脱图谱见图1。将收集得到该峰出峰液浓

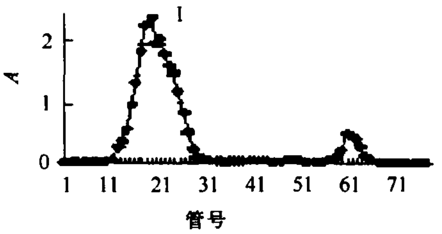


图 1 50%粗多糖 DEAE-纤维素色谱洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of 50% polysaccharides on DEAE-cellulose chromatogram

缩至小体积后，用 DEAE-Sepharose FF 进行纯化，使用洗脱液为 0.1 mol/L NaCl 溶液，出峰液经冷冻干燥，得 P50 精多糖化合物。

2.3.2 水提粗多糖 CP70 的分离纯化：CP70 经 DEAE-纤维素柱色谱分离，显示在不同浓度 NaCl 洗脱液条件下出现 3 个峰形。分别收集洗脱下来的前两个主峰，峰 I（9～22 管）为 0～0.05 mol/L NaCl 洗脱下来的部分，峰 Ⅱ（38～45 管）为 0.25～0.30 mol/L NaCl 洗脱下来的部分，洗脱图谱见图 2。将收集得到的主峰出峰液浓缩至小体积后，用 DEAE-Sepharose FF 进行纯化，峰 I 使用洗脱液为 0.05 mol/L NaCl，峰 Ⅱ 使用洗脱液为 0.30 mol/L NaCl。出峰液经冷冻干燥，分别得到 P70-1、P70-2 两个精多糖化合物。

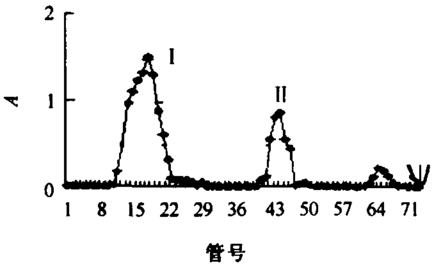


图 2 70%粗多糖 DEAE-纤维素色谱洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of 70% polysaccharides on DEAE-cellulose chromatograms

2.3.3 碱提粗多糖 CBP 的分离纯化：CBP 经 DEAE-纤维素柱色谱分离，显示在不同浓度 NaCl 洗脱液条件下出现 4 个峰形。分别收集洗脱下来的前 3 部分主峰，峰 I（9～17 管）为 0 mol/L NaCl 洗脱下来的部分，峰 Ⅱ（34～41 管）为 0～0.30 mol/L NaCl 洗脱下来的部分，峰 Ⅲ（57～63 管）为 0.40～0.60 mol/L NaCl 洗脱下来的部分，洗脱图谱见图 3。将收集得到的主峰出峰液浓缩至小体积后，用 DEAE-Sepharose FF 进行纯化，峰 I 使用洗脱液为无 NaCl 缓冲液，峰 Ⅱ 使用洗脱液为 0.30 mol/L NaCl，峰 Ⅲ 使用 0.6 mol/L NaCl 洗脱液。出峰液经冷冻干燥，分别得到CBP-1、CBP-2和CBP-33个精

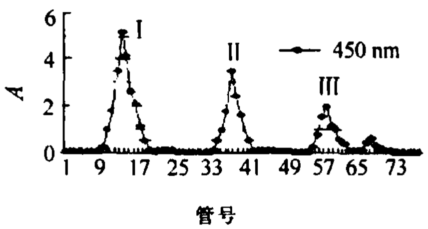


图 3 CBP 粗多糖 DEAE-纤维素色谱洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of CBP on DEAE-cellulose chromatogram

多糖化合物。

2.4 精多糖的验证[6]

2.4.1 凝胶色谱法验证：将所得精多糖分别用洗脱液 0.5 mL 溶解，分别上样于以 Sephacryl S-300 HR 为凝胶填料的色谱柱（70 cm×1.6 cm），蒸馏水为洗脱液，体积流量为 0.5 mL/min，每管收集体积为 1 mL，每管准确吸取 0.1 mL 以苯酚-硫酸法检测，以管号对吸光度绘制洗脱曲线。结果各自的洗脱曲线均呈一单峰，且对称分布。可认为所得多糖为纯品。

2.4.2 旋光度法验证：将精多糖分为 2 份溶于蒸馏水中，分别加乙醇至含醇量为 70%和 90%，离心，沉淀干燥后重新溶于蒸馏水中，分别测其旋光度，结果数值恒定。可认为所得多糖为纯品。

2.5 精多糖的单糖组成

2.5.1 酸水解：分别称取 P50、P70-1、P70-2、CBP-1、CBP-2 和 CBP-3 各 5 mg，各加入 2 mol/L 三氟乙酸 3 mL，于 95 ℃封管水解 6 h，所得水解液蒸干后加甲醇反复蒸干。

2.5.2 色谱条件：色谱柱为：Carbo PAC™ PA10（250 mm×2.0 mm）；检测器：脉冲安培检测器；进样量：20 μL；体积流量：0.2 mL/min；流动相：水提多糖的分析采用 H_2O-200 mmol/L NaOH（92∶8），碱提多糖的分析采用 H_2O-200 mmol/L NaOH（96∶4）。

2.5.3 单糖对照品溶液的制备：分别称取一定量的单糖对照品（*L*-鼠李糖、*L*-木糖、*L*-阿拉伯糖、*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖），加蒸馏水配成 1 mg/L 的溶液。

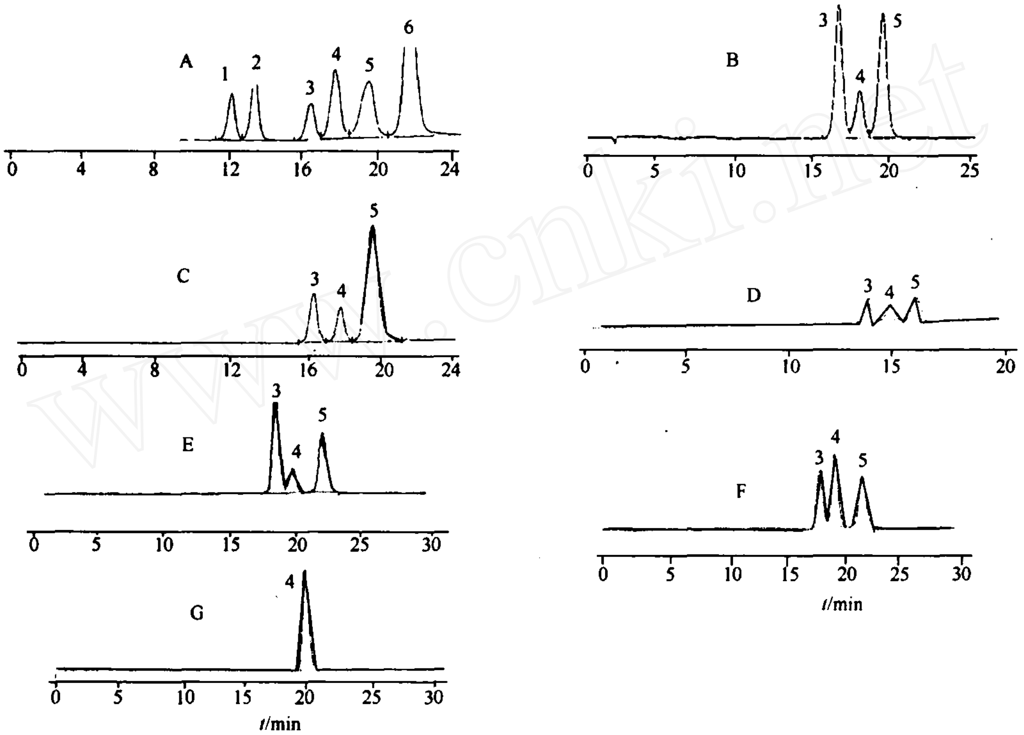
2.5.4 精多糖溶液的制备：取精多糖酸水解样品适量，加蒸馏水配成 5 mg/L 溶液。取 20 μL 进行 HPAEC-PED 测定。

2.5.5 精多糖水解产物的单糖组成：根据出峰时间，通过与单糖对照品色谱图对照比较，对人工蛹虫草精多糖 P50、P70-1、P70-2、CBP-1、CBP-2、CBP-3 水解产物进行高效阴离子色谱分析，最终确定了 6 个多糖的单糖组成及其所含单糖的物质的量比，结果见表 1，图谱见图 4。

表 1 人工蛹虫草精多糖水解物中各单糖的峰面积比例

Table 1 Percentage of peak area of various monosaccharides in polysaccharides hydrolysates of cultured *C. militaris*

多糖	*L*-鼠李糖/%	*L*-阿拉伯糖/%	*D*-半乳糖/%	*D*-葡萄糖/%	*D*-甘露糖/%	*L*-木糖/%
P50	无	无	40.71	15.52	43.38	无
P70-1	无	无	25.12	16.20	58.68	无
P70-2	无	无	32.35	24.63	43.02	无
CBP-1	无	无	51.48	12.87	35.66	无
CBP-2	无	无	29.73	38.67	31.60	无
CBP-3	无	无	无	99.99	无	无



1-*L*-鼠李糖 2-*L*-阿拉伯糖 3-*D*-半乳糖 4-*D*-葡萄糖 5-*D*-甘露糖 6-*L*-木糖

1-*L*-Rha 2-*L*-Ara 3-*D*-Gal 4-*D*-Glc 5-*D*-Man 6-*L*-Xyl

图 4 单糖对照品 (A)、P50(B)、P70-1(C)、P70-2(D)、CBP-1(E)、CBP-2(F)、CBP-3(G)的高效阴离子色谱图

Fig. 4 HPAEC-PED Analysis of momosaccharide reference substance (A), P50 (B), P70-1 (C), P70-2 (D), CBP-1 (E), CBP-2 (F), and CBP-3 (G)

经高效阴离子色谱分析，根据单糖峰面积，计算得到人工蛹虫草水溶性多糖中各单糖比例：P50 中 *D*-甘露糖：*D*-葡萄糖：*D*-半乳糖为 0.433 8：0.155 2：0.407 1；P70-1 中的 *D*-甘露糖：*D*-葡萄糖：*D*-半乳糖为 0.586 8：0.162 0：0.251 2；P70-2 中 *D*-甘露糖：*D*-葡萄糖：*D*-半乳糖为 0.430 2：0.246 3：0.323 5；CBP-1 中的 *D*-甘露糖：*D*-葡萄糖：*D*-半乳糖为 0.356 6：0.128 7：0.514 8；CBP-2 中的 *D*-半乳糖：*D*-葡萄糖：*D*-半乳糖为 0.316 0：0.386 7：0.297 3；CBP-3 中仅含 *D*-葡萄糖。

3 讨论

利用高效阴离子色谱测得人工蛹虫草 6 种水溶性多糖 P50、P70-1、P70-2、CBP-1、CBP-2 和 CBP-3 的单糖组成成分大致相同，除 CBP-3 为一葡聚糖外，其余的水溶性多糖均为由 *D*-葡萄糖、*D*-半乳糖和 *D*-甘露糖构成的杂多糖，只是各自所含单糖的物质的量比例有所不同，可见所检出的 3 种单糖是人工蛹虫草水提多糖的主要成分。

将高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱分析结果与气相色谱分析结果（另文发表）对照比较人工蛹虫草水溶性多糖的单糖成分，发现两种分析方法对单糖组成分析结果有一定的差异，但这种差异不大。与气相色谱法相比，高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法操作简单，无须进行衍生化，便能高效、准确地进行单糖组成分析，成功避免了因多糖衍生化而产生的异构体，使每种糖都能得到单一的色谱峰，无溶剂峰的“拖尾”现象，且离子色谱法具有很高的灵敏度，能对多糖中的痕量单糖组分进行测定，非常适

合样品来源较困难的糖组分分析。

参考文献：

[1] 车振明．虫草多糖生物活性研究进展及其应用前景 [J]. 食用菌，2004，12(6)：3-5.

[2] 李承范，千学技．真菌多糖的生物化学研究 [J]. 延边大学医学学报，2004，27(4)：321-323.

[3] 陈俐彤，曹红峰，黄文芳．蛹虫草的化学成分 [J]. 现代食品科技，2005，21(3)：192-195.

[4] 王 蕾，于荣敏，张 辉，等．人工培养蛹虫草多糖的分离纯化及其结构的初步研究[J]. 中国生化药物杂志，2003，24(1)：23-25.

[5] 宾 文，宋丽艳，于荣敏，等．人工培养蛹虫草多糖的抗炎及免疫作用研究 [J]. 时珍国医国药，2003，14(1)：1-2.

[6] 李 信，许 雷．蛹虫草菌产生时胞外多糖及其理化性能和抗氧化活性的初步研究 [J]. 微生物学杂志，1997，17(3)：13-15.

[7] Yu R M, Wang L, Zhang H, *et al*. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75: 662-666.

[8] Yu R M, Song L Y, Zhao Y, *et al*. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75: 465-472.

[9] Bonn G. High-performance liquid chromatographic elution behavior of oligosaccharides, monosaccharides and sugar degradation products on series-connected ion-exchange resin columns using water as the mobile phase [J]. *J Chromatogr*, 1985, 322: 411-424.

[10] 墨淑敏，梁立娜，蔡亚岐，等．高效阴离子交换色谱在易极化阴离子痕量分析中的应用 [J]. 色谱，2005，33(4)：557-561.

[11] Lacourse W R. *Pulsed Electrochemical Detection in High Performance Liquid Chromatography* [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1997.

桑皮苷A对照品的制备研究

舒树苗[1]，潘 勤[2*]，肖 峰[2]，朱小兰[2]

(1. 天津中医药大学，天津 300193；2. 天津中新药业研究中心，天津 300457)

摘 要：目的 研究从桑白皮中制备桑皮苷A对照品的制备方法。**方法** 结合大孔树脂吸附、硅胶柱色谱和凝胶柱色谱对桑白皮提取物进行分离、纯化，利用TLC和HPLC-ELSD对分离产物进行质量分数检测，并通过各种波谱手段等对其进行结构确证。**结果** 从桑白皮中分离、纯化出桑皮苷A对照品，质量分数>98.5%。**结论** 该方法制备出的桑皮苷A对照品符合中药化学对照品的相关要求，可作为桑白皮药材和含桑白皮成药质量控制，以及中药药效物质基础研究用的化学对照品。

关键词：桑白皮；桑皮苷A；对照品

中图分类号：R284.2 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)04-0535-02

Preperation of reference substance of mulberroside A from root bark of *Morus alba*

SHU Shu-miao[1], PAN Qin[2], XIAO Feng[2], ZHU Xiao-lan[2]

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. R & D Center of Tianjin Zhongxin Pharmaceuticals, Tianjin 300457, China)

Abstract: Objective To establish a separation method for reference substance of mulberroside A from the root bark of *Morus alba*. **Methods** Ethanol-extract of the root bark of *M. alba* was isolated and purified by macroporous resin, silica gel, and Sephdex LH-20 column chromatography. The purity of mulberroside A was identified by TLC and ELSD-HPLC. Its structure was identified by spectral analysis. **Results** The compound was completely separated from the root bark of *M. alba*. The purity of the reference substance was not less than 98.5%. **Conclusion** The compound prepared by the above-mentioned method is accorded with the relative demands of chemical reference substance in Chinese materia medica. It can be used as a reference substance for the quality control and the research of herbal medicine.

Key words: the root bark of *Morus alba* L.; mulberroside A; reference substance

桑白皮为桑 *Morus alba* L. 去除栓皮的根皮，主要用于肺热咳喘、水肿、胀满尿少、面目肌肤浮肿等症。桑白皮水或甲醇提取物具有祛痰、抗炎、降血糖、降压、抗癌、抗菌等作用[1]，其中桑皮苷A为桑

收稿日期：2007-06-30

作者简介：舒树苗(1980—)，女，天津人，硕士，2007年获得天津中医药大学中药系硕士学位，研究方向为植物化学。
E-mail: shushumiao22@sina.com

* 通讯作者 潘 勤 E-mail: qinpan@vip.sina.com