

六味地黄苷糖片多糖部位相对分子质量与组成分析

郝晓娟^{1,2}, 付娟^{2,3}, 胡军华^{2,3}, 王振中^{2,3}, 肖伟^{1,2,3*}
(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000; 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001; 3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

摘要: **目的** 分析六味地黄苷糖片多糖部位相对分子质量和组成。**方法** 以乙醇、乙醚、丙酮对多糖部位进行纯化, 采用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 法测定相对分子质量。三氟乙酸水解后, 通过气相色谱 (GC) 法分析多糖组成。**结果** 六味地黄苷糖片多糖部位重均相对分子质量在 10 万~20 万之间, 由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸组成, 以葡萄糖为主。**结论** 该方法简单可行, 重复性好, 可用于六味地黄苷糖片的质量控制。
关键词: 六味地黄苷糖片; 多糖部位; 相对分子质量; 组成; 高效凝胶渗透色谱 (HPGPC); 气相色谱 (GC)
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)01-0206-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.039

六味地黄方由熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻组成, 始见于《小儿药证直诀》, 由宋朝名医钱乙首创, 是中医滋补肾阴的经典名方^[1]。六味地黄苷糖片是在六味地黄汤的基础上, 结合现代药理学、药效学活性评价, 经两次醇沉、两步层析提取分离, 由水溶性多糖、以甘露三糖为主的寡糖, 以莫诺苷、马钱苷、芍药苷为主的糖苷类组成的创新中药, 其中多糖部位主要表现为免疫促进作用^[2]。

多糖是一类由多羟基醛或多羟基酮及其衍生物、聚合物的总称, 为中药中主要药效物质基础之一^[3], 其分子量大, 结构复杂, 生物活性有明显差异, 近年来越来越受到关注。由于该成分生物活性、分子量与其分布和组成密切相关, 故 2015 年版《中国药典》已将相对分子质量及其分布列入该成分质量标准中^[4-5]。

本实验以六味地黄苷糖片中多糖部位为研究对象, 对其相对分子质量及组成进行初步考察, 不仅为进一步研究该部位生物活性与其一级结构的关系提供基础, 又为提升该制剂质量标准提供依据。

1 材料

AL204、MS-105DU 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); HH-8 数显恒温水浴锅 (金坛市康华电子仪器制造厂); H1850R 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); LC-28AB 高效液相色谱仪, 配置 RID-10A 示差折光检测器 (日本岛津公司); KQ-500DB 型数控超声

波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司); HGC-36A 型氮吹仪 (天津市恒奥科技发展有限公司); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); Agilent7890B-7698A 气相色谱仪 (美国安捷伦公司);

磷酸二氢钾为色谱纯, 购自上海麦克林生化科技有限公司; 三氟乙酸为色谱纯, 购自美国天地公司; 乙醇、丙酮、乙醚、吡啶、甲醇、硼氢化钠、三氯甲烷等均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 正丙胺购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司。各相对分子质量葡聚糖 (T670、T410、T270、T110、T70、T40、T20、T5) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司、阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; L-(+)-阿拉伯糖 (批号 WXBB0 276 V, 纯度≥99%)、L-鼠李糖 (批号 WXBB5 979 V, 纯度≥99%) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; D-无水葡萄糖 (批号 110833-201908, 纯度 99.9%)、D-木糖 (批号 111508-201605, 纯度 99.9%)、D-甘露糖 (批号 140651-201805, 纯度 99.9%)、肌醇 (批号 190077-201501, 纯度 99.6%)、半乳糖 (批号 100226-201807, 纯度 100%)、D-葡萄糖醛酸 (批号 140648-201804, 纯度 99.8%)、D-半乳糖醛酸 (批号 111646-201702, 纯度 95.1%) 均购自中国食品药品检定研究院。

六味地黄苷糖片多糖部位 (批号 Z160601、Z171001、Z191001、Z191201、Z191202), 购自江苏康缘药业股份有限公司。

2 方法

2.1 分子量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 TSK-GEL G4000PWXL、TSK-GEL G1000PW 色谱柱(7.8 mm×300 mm)串联^[6-8]; 流动相 0.02 mol/L KH₂PO₄ 溶液; 体积流量0.5 mL/min; RID 检测器; 检测器、柱温箱温度 40 ℃; 进样量 20 μL。

2.1.2 多糖部位前处理 参考文献 [9] 报道。取多糖部位适量, 60%乙醇洗涤, 每次 20 mL, 涡流 2 min 后离心, 重复以上操作至醇洗液呈无色 (约洗涤 16 次), 转移至布氏漏斗中, 分别用乙醇、丙酮、乙醚反复洗涤, 挥干, 备用。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取“2.1.2”项下醇洗多糖 2.5 g, 置于烧瓶中, 精密加入流动相 100 mL, 称定质量, 100 ℃下回流提取 1 h, 放冷, 加水补足减失的质量, 摇匀, 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 即得。

2.1.4 对照品溶液制备 精密称取不同相对分子质量的葡聚糖、D-无水葡萄糖对照品各 50 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解后定容至刻度, 摇匀, 离心, 即得。

2.1.5 方法学考察

2.1.5.1 线性关系考察 取“2.1.4”项下对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。采用 GPC 软件, 以对照品重均分子量的对数 (log M_w) 为纵坐标 (Y), 保留时间为横坐标 (X) 进行回归, 得到方程为 $Y=2.622\ 4\times 10^{-3}X^3-0.220\ 8X^2+5.811\ 8X-43.186\ 6$ ($R^2=0.995\ 2$), 在 5 000~670 000 Da 范围内线性关系良好。

2.1.5.2 精密度试验 精密吸取“2.1.3”项下供试品溶液 20 μL, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 采用 GPC 软件测得峰面积 RSD 为 0.06%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5.3 稳定性试验 精密吸取“2.1.3”项下供试品溶液 20 μL, 于 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 采用 GPC 软件测得峰面积 RSD 为 0.49%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5.4 重复性试验 精密称取多糖部位样品 6 份, 按“2.1.2”项下方法处理, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样 20 μL 测定, 采用

GPC 软件测得峰面积 RSD 为 0.81%, 表明该方法重复性良好。

2.1.6 重均分子量测定 取六味地黄苷糖片多糖部位 Z160601、Z171001、Z191001、Z191201、Z191202 进行测定, 测得重均相对分子质量分别为 113 912、146 446、151 939、191 694、177 122。

2.2 多糖组成分析

2.2.1 气相色谱条件 ZB-5 色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 氢火焰检测器, 进样口温度 250 ℃, 检测器温度 280 ℃; 氮气体积流量 0.6 mL/min; 分流比 20 : 1; 程序升温 (200 ℃保持 2 min, 3 ℃/min 升至 245 ℃, 10 ℃/min 升至 270 ℃, 保持 2 min)^[10-13]; 进样量 2 μL。

2.2.2 标准品衍生物制备 精密称取鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、肌醇、甘露糖、无水葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸对照品各 2 mg, 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 1 mL 水溶解, 再加入 0.5 mol/L 碳酸钠溶液 78 μL, 30 ℃下水浴 45 min, 加入 4%硼氢化钠溶液 0.5 mL, 室温下放置 1.5 h, 滴加 25%乙酸至无气泡产生以除掉过量硼氢化钠, 将反应液过阳离子交换树脂柱, 并用 8 mL 水洗脱, 洗脱液浓缩至干后加入 3 mL 甲醇, 浓缩至干, 重复 5 次以除净过量乙酸。将浓缩至干的样品于 85 ℃下真空干燥 2 h, 加吡啶、正丙胺各 1 mL, 55 ℃下水浴 30 min, 放冷后于 55 ℃水浴中氮气吹干, 加吡啶、乙酸酐各 0.5 mL, 95 ℃下水浴 1 h, 放冷后于 25 ℃水浴中氮气吹干, 于 40 ℃下真空干燥 3 h, 取无水硫酸钠干燥 24 h 的 0.3 mL 氯仿溶解样品, 取 10 μL, 氯仿稀释至 200 μL, 即得, 并进行 GC 分析^[14-15]。

2.2.3 样品衍生物制备 精密称取样品 5 mg, 加入 0.4 mol/L 三氟乙酸 3 mL, 100 ℃下水浴 4 h, 加入甲醇 3 mL 浓缩至干, 反复 4~5 次以除净三氟乙酸, 加 1 mL 水充分溶解, 从“加入 0.5 mol/L 碳酸钠溶液 78 μL”开始, 其余操作同“2.2.2”项下, 即得。

2.2.4 单糖组成测定 取六味地黄苷糖片多糖部位 Z160601、Z171001、Z191001、Z191201、Z191202 进行测定, 结果见表 1。

表 1 单糖组成测定结果

批号	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖	葡萄糖醛酸	半乳糖醛酸
Z191202	+	+	+	+	+	+	-	+
Z191201	+	+	+	+	+	+	-	+
Z191001	+	+	+	+	+	+	-	+
Z171001	+	+	+	+	+	+	-	+
Z160601	+	+	+	+	+	+	-	+

注: +表示含有该单糖, -表示不含有该单糖。

3 结果

3.1 相对分子质量测定

3.1.1 流动相选择 取“2.1.3”项下供试品溶液、“2.1.4”项下对照品溶液, 分析采用 TSK-GEL G4000PWXL (7.8 mm×300 mm) 色谱柱; 流动相 Na₂SO₄、

NaH₂PO₄、KH₂PO₄ 溶液; 体积流量 0.5 mL/min; RID 检测器、柱温箱温度 40 ℃, 结果见图 1。由此可知, Na₂SO₄ 溶液洗脱时供试品溶液在保留时间 20.5 min 附近有 1 个固定倒峰, 可影响葡聚糖出峰, 而 NaH₂PO₄、KH₂PO₄ 溶液洗脱时不存在倒峰, 故选择磷酸盐溶液作为流动相。

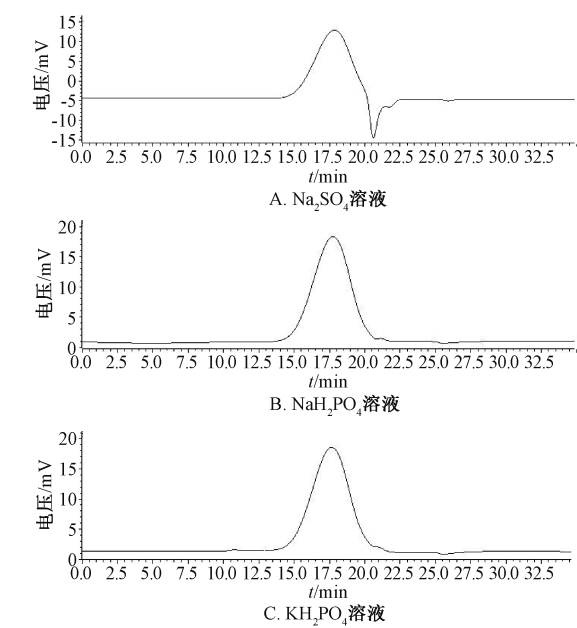


图 1 各流动相下 T40 HPGPC 色谱图

3.1.2 供试品提取方式选择 取“2.1.2”项下多糖样品，

表 2 单根色谱柱分子量测定结果

批号	Z160601	Z171001	Z191001	Z191201	Z191202
重均相对分子质量	265 748 101 663	251 070 117 961	263 738 128 991	273 652 156 620	281 495 145 741

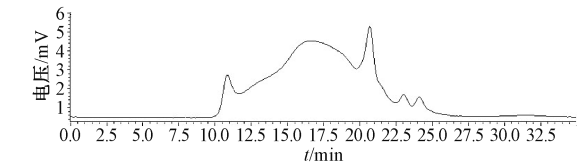


图 3 单根色谱柱多糖样品 HPGPC 色谱图

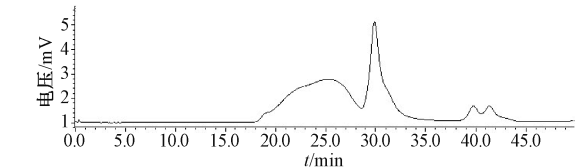


图 4 串联色谱柱多糖样品 HPGPC 色谱图

3.2 单糖组成分析

3.2.1 多糖部位酸水解种类选择 分别采用硫酸、三氟乙酸对多糖部位进行酸水解并衍生后，采用紫外检测器测定各单糖含量，结果见表 3。由此可知，三氟乙酸水解后除半乳糖醛酸含量低于硫酸水解后外，其他单糖的量均更高，而且该试剂腐蚀性小，沸点较低，容易除去，故本实验选择其对多糖部位进行水解。

表 3 硫酸、三氟乙酸水解多糖后单糖含量比较

单糖	含量(硫酸水解)/%	含量(三氟乙酸水解)/%
半乳糖醛酸	1.506 2	1.029 0
葡萄糖	22.261 7	25.986 1
半乳糖	2.320 2	2.704 0
阿拉伯糖	0.343 7	0.447 0

加流动相涡流 2 min，制成每 1 mL 含 25 mg 单糖的供试品溶液，离心，取上清液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 2。由此可知，多糖样品直接涡流后进样时色谱图分离度较差，重均相对分子质量 20 000~70 000，可能是因为涡流不能将大分子量的多糖提取完全。

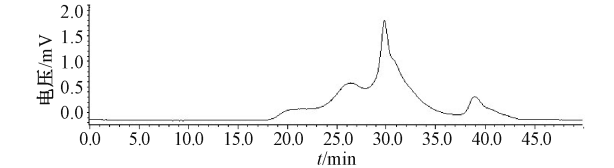


图 2 涡流提取多糖分子量 HPGPC 色谱图

3.1.3 串联色谱柱选择 固定流动相为 KH₂PO₄ 溶液，检测器、柱温箱温度均为 40 ℃，体积流量 0.5 mL/min，RID 检测器，考察单用 TSK-GEL G4000PWXL 色谱柱（7.8 mm×300 mm）及串联 TSK-GEL G1000PW 色谱柱（7.8 mm×300 mm）的分离效果，结果见表 2、图 3~4。由此可知，单根色谱柱的分离度低于串联色谱柱，不能很好地表明多糖部位的重均相对分子质量，故本实验选择串联色谱柱。

3.2.2 水解条件选择 分别以 0.4 mol/L 三氟乙酸、2 mol/L 三氟乙酸对多糖部位水解 2、4、6 h，按“2.2.3”项下方法制备衍生物，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，结果见表 4。由此可知，0.4 mol/L 三氟乙酸水解 4 h、0.4 mol/L 三氟乙酸水解 6 h、2 mol/L 三氟乙酸水解 6 h 得到的单糖种类相同，综合考虑成本和效率，本实验选择 0.4 mol/L 三氟乙酸水解 4 h。

表 4 水解条件考察结果

水解条件	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖	葡萄糖醛酸	半乳糖醛酸
0.4 mol/L 2 h	-	-	-	+	+	+	-	-
0.4 mol/L 4 h	+	+	+	+	+	+	-	+
0.4 mol/L 6 h	+	+	+	+	+	+	-	+
2 mol/L 2 h	-	-	-	-	+	-	-	-
2 mol/L 4 h	+	+	+	+	+	+	-	-
2 mol/L 6 h	+	+	+	+	+	+	-	+

注：+表示含有该单糖，-表示不含有该单糖。

3.2.3 结果分析 多糖部位经过三氟乙酸水解后采用 GC-MS 进行分析，并与 NIST 数据库进行匹配，结合单糖标准品衍生化后比对保留时间，初步鉴定出 7 种单糖衍生物，色谱图见图 5，GC-MS 裂解碎片与 NIST 质谱数据库的对比见图 6，由于阿拉伯糖、木糖均为五碳醛糖，甘露糖、葡萄糖、半乳糖均为六碳醛糖，衍生后质谱碎片相似，故在 NIST 质谱数据库中得到的结构信息也相似。表 5、图 5 显示，多糖水解液在鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡

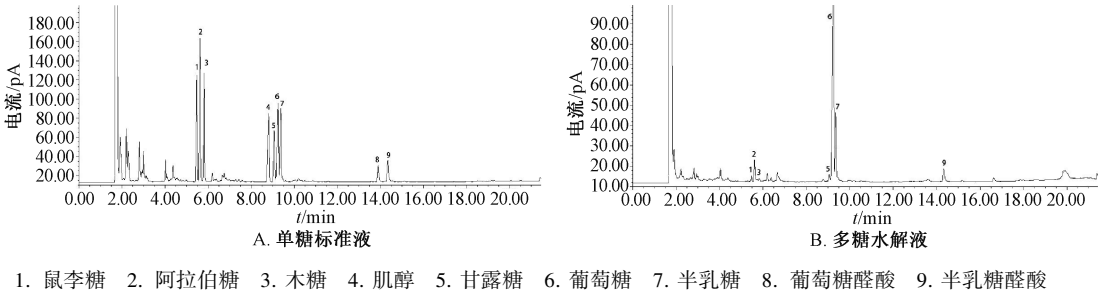
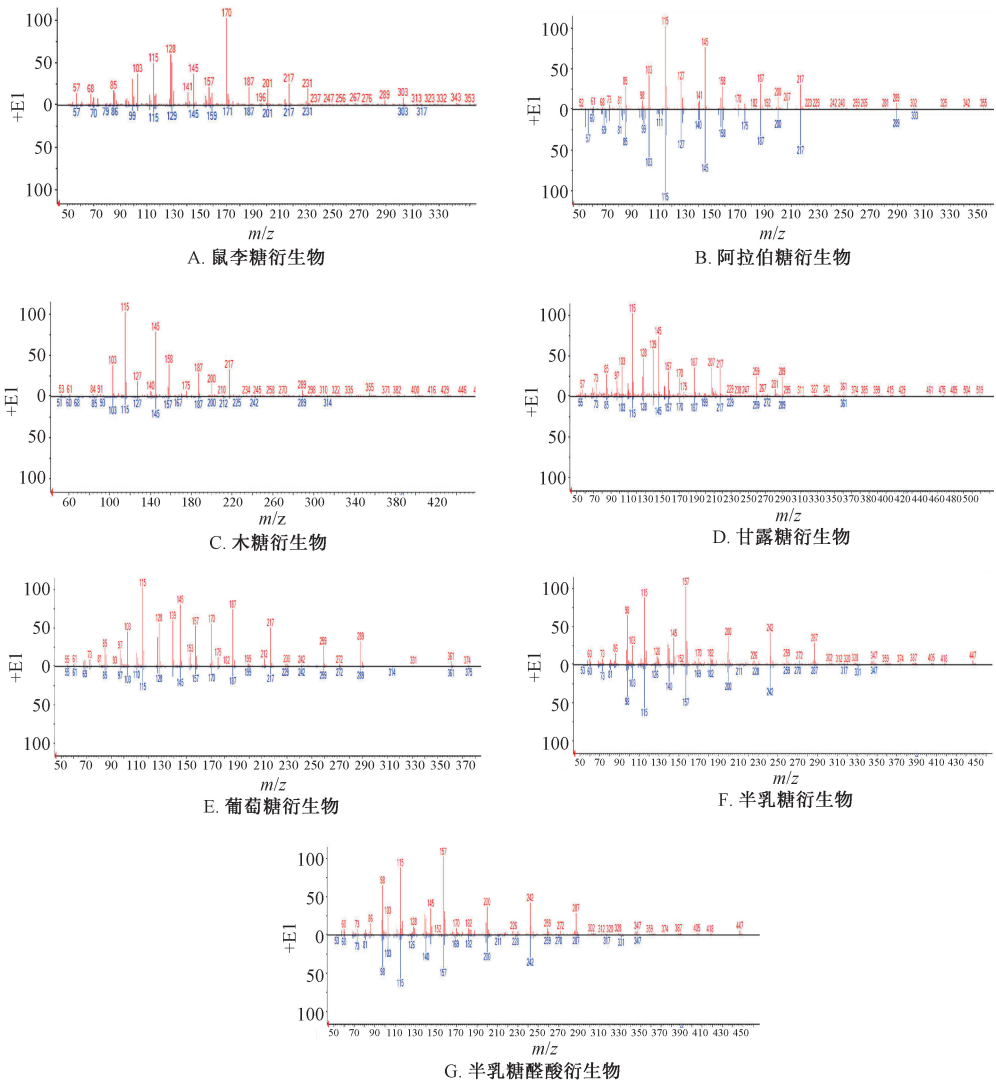


图 5 各单糖 GC 色谱图



注：图中央横线上方数字为样品裂解数据，下方数字为数据库裂解数据。

图 6 各色谱峰 GC-MS 裂解碎片与 NIST 质谱数据库比较

萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸 7 种单糖相同保留时间处均存在对应色谱峰，并且多糖水解液中葡萄糖含量最高。

任凤霞^[16]等报道，六味地黄汤中多糖部位由鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸组成，而未检测到木糖与甘露糖；本实验发现，多糖水解液中木糖、甘露糖含量较低，表明 GC 法可提高检测灵敏度。

4 讨论与结论

六味地黄苷糖片是按照由“中药饮片组方（饮片配伍）向中药复方活性成分群组方（组分配伍）发展”的中药经典方剂“二次开发”思路，多糖部位是该制剂发挥免疫调节作用的主要部位，但该成分具有难气化、无紫外吸收等特点，导致相关研究成为中药领域的难点^[14-16]。本实验采用乙醇、丙酮、乙醚对六味地黄苷糖片多糖部位进行

表 5 单糖标准液、多糖水解液中单糖 GC 保留时间比较 (min)

单糖	单糖标准液中	多糖水解液中
鼠李糖	5.458	5.469
阿拉伯糖	5.612	5.606
木糖	5.812	5.828
甘露糖	9.055	9.050
葡萄糖	9.234	9.247
半乳糖	9.367	9.351
半乳糖醛酸	14.315	14.328

脱脂，并除去色素及小分子杂质。由于 HPGPC 测定多糖部位相对分子质量以 Na₂SO₄ 溶液为流动相时，在固定位置有倒峰，从而影响测定，故本实验选择磷酸盐溶液作为流动相。仅以 TSK-GEL G4000PWXL 色谱柱为固定相时，色谱峰分离度差，而串联 TSK-GEL G1000PW 色谱柱后峰形和分离效果较好，最终测得其相对分子质量在 10 万~20 万之间。再通过 GC-MS 法对六味地黄苷糖片多糖部位进行分析，发现它由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸组成，其中葡萄糖含量最高，而且结构中含有糖醛酸，推测该聚糖可能主要由葡萄糖组成，同时各批次之间单糖组成无明显差异。

综上所述，本实验完善了六味地黄苷糖片多糖部位原料及制剂的质量标准，可为该制剂质量控制提供理论依据。

参考文献：

[1] 王晓燕. 六味地黄苷糖中糖苷部位的化学成分研究[D]. 北京：中国人民解放军军事医学科学院，2009.

[2] 罗云, 朱梦良, 赵海平, 等. 不同厂家六味地黄浓缩丸多糖含量比较[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 289-290.

[3] 宁书年, 张桂. 生物多糖类物质对人体的作用[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 613-614.

[4] 秦建鲜, 黄锁义. 中药多糖相对分子质量测定方法的概述

[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 226-229.

[5] 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.

[6] 屠银芳, 何正有, 刘婧, 等. HPLC 同时测定纯菜多糖及其胶囊中的分子量和含量[J]. 华西药学杂志, 2017, 32(3): 291-293.

[7] 胡卫珍, 齐振宇, 陈晓芳, 等. 凝胶渗透色谱联用多角度激光光散射测定铁皮石斛多糖分子量及其分布[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(6): 1166-1167; 1175.

[8] 应一君, 刘艳芳, 张劲松, 等. 紫芝子实体活性多糖的纯化和结构解析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(1): 133-138.

[9] 战兴晓, 刘希光, 刘祥龙, 等. 女贞子多糖相对分子质量与组成分析[J]. 中草药, 2019, 50(18): 4288-4292.

[10] 伍燕, 申利群, 朱华. 假芝菌丝体多糖 ARP 的纯化、结构及抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(9): 214-219.

[11] 张庆, 袁源, 邓扬龙, 等. 不同栽培方式银耳多糖单糖组成分析及体外抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 54-60.

[12] 招钰, 周小玲, 郭海燕, 等. 茶多糖中单糖组成比较[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(4): 547-550.

[13] 韩威, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 银耳多糖单糖组成分析的三种色谱方法比较[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3): 359-361; 302.

[14] Wang X, Zhang L H, Wu J L, *et al.* Improvement of simultaneous determination of neutral monosaccharides and uronic acids by gas chromatography[J]. *Food Chem*, 2017, 220: 198-207.

[15] 马虎强, 刘洋, 张红, 等. 骆驼刺茎枝粗多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. 中国药师, 2018, 21(1): 48-52.

[16] 任凤霞, 乔善义, 赵毅民, 等. 六味地黄汤中 3 个多糖组分的化学结构研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(24): 1904-1907.