

新型糖组成高效液相色谱分析技术的构建 及其在水飞蓟多糖质控中的应用

田灵敏, 邱雪梅, 潘子敬, 吕 游, 杨兴斌*

(陕西师范大学生命科学学院, 教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室, 陕西 西安 710062)

摘要: 本研究采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 作为还原醛糖的标记识别分子, 利用高效液相色谱-紫外检测器 (HPLC-UV) 和普通 C₁₈ 色谱柱, 建立了 10 种常见单糖在 13.5 min 内的快速 HPLC-UV 分析鉴别技术, 并成功地用于植物药水飞蓟多糖中单糖的组成分析。结果表明, 醛糖的 PMP 标记与流动相三乙胺 (TEA) 配比分离调节相结合, 可大幅度调节系列单糖 PMP 标记物的分离度, 具有很高的分离可控性; 水飞蓟多糖由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、半乳糖及阿拉伯糖 8 种单糖组成, 其摩尔比为 0.66 : 0.84 : 0.58 : 1.0 : 1.6 : 0.69 : 2.7 : 4.8; 样品测定回收率为 92.4%~104.0%。该方法简单、快速、准确, 可用于水飞蓟多糖的有效质量控制。

关键词: 水飞蓟多糖; 质量控制; 单糖组成; RP-HPLC

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0498-07

Development of a new HPLC technique for analyzing monosaccharide composition and its application in the quality control of *Silybum marianum* polysaccharide

TIAN Ling-min, QIU Xue-mei, Pan Zi-jing, LÜ You, YANG Xing-bin *

(Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: A new HPLC-UV technique for the separation and analysis of 10 monosaccharides achieved within 13.5 min using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) as the labelling molecule of the reductive monosaccharides has been established by combining common high performance liquid chromatography-UV and C₁₈ column. The established technique was applied to the quantification of the monosaccharide components in extract of *Silybum marianum*. The results showed that the tested 10 monosaccharides as PMP derivatives were baseline separated under the HPLC conditions proposed. It was confirmed that *Silybum marianum* extract was composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, xylose, galactose and arabinose with the molar ratio of 0.66 : 0.84 : 0.58 : 1.0 : 1.6 : 0.69 : 2.7 : 4.8. Quantitative recoveries of the compositional monosaccharides separated from the extract were in the range of 92.4%–104.0%, and the RSD values fell within 0.68%–3.81%. The results demonstrated that the proposed HPLC method was simple, rapid, convenient, and precise, and it was applicable to the analysis of the compositional monosaccharides of *Silybum marianum* extract.

Key words: *Silybum marianum* polysaccharide; quality control; monosaccharide composition; RP-HPLC

收稿日期: 2009-11-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (C30972054); 陕西省自然科学基金资助项目 (2007C23).

*通讯作者 Tel: 86-29-85310266, Fax: 86-29-85310546, E-mail: xbyang@snnu.edu.cn

糖类广泛存在于植物中,具有重要的生物功能和药用价值^[1-3]。近年来,随着蛋白与核酸研究的深入,随着糖类参与组织细胞功能活动机制的阐明,随着糖类特殊药用价值的凸现,丰富了人们对糖类的认识^[1, 4]。目前,国内外已报道了 100 多种天然聚糖,其中 95%以上为植物多糖和寡糖,其生物活性除了具有膳食纤维清除毒素、控制食量、平衡脂肪和稳定血糖的作用外,药理作用还涉及免疫调节、抗辐射、抗凝血、抗肿瘤、抗 HIV 病毒等^[5]。由于聚糖具有毒副作用小、使用安全等突出优点,近年来多糖和寡糖类药物和功能食品得到迅速发展。

多糖和寡糖的基本单糖组成结构是构成其重要药理活性的基础,而植物中的次生代谢产物也多以糖苷的形式存在,并发现其糖基部分对糖苷(黄苷、葱醌苷、苯丙素苷、三萜苷、皂苷、强心苷、糖肽、糖蛋白等)的代谢、吸收及生物活性产生重要的影响^[3]。因此,如何高效分离鉴别常见单糖,对糖类药品食品的质量控制以及糖苷类药物的间接糖组成质量控制具有重要意义,是亟待发展的技术。天然糖苷成分类型多样、结构复杂、单体分离鉴别困难,目前大多数该类有效成分对照品严重缺乏,已成为制约中药质量控制的“瓶颈”^[6]。同时,同一种苷元的糖苷因连接的单糖种类和数量的差异,使高效的色谱分离测定也难于进行,经常有错误的鉴定^[7]。因此,糖苷类药物中糖含量的间接控制值得探索。目前,糖类质量控制主要采用传统的苯酚-硫酸比色法测定总糖含量,但是,对于不同类型多糖,特别是对于与蛋白质、色素等杂质结合的结合型多糖的总糖含量测定,其准确度很低。因此,发展多糖和寡糖的各组成单糖含量与比例的准确鉴定技术极为迫切^[8-11]。

多糖是中药材的主要基质成分,通常由葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、核糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸等 10 种还原单糖中的部分单糖或全部单糖构成。值得注意的是,单糖因存在互变异构、差向异构及结构相似等特征,所以糖类分析有其自身的特点,必须具有高效的分离技术,因而一直是挑战药物分析科学领域的国际难题^[1, 12-14]。在糖类的分析中,HPLC 具有高效、稳定且普通实验室可配置等突出特征被视为理想的分析技术。但是,在现有的色谱分离技术条件下,通常只实现 6~8 种单糖的基线分离^[15-18],明显影响质控的准确性。为此,本研究在前期研究的基础上,采用 PMP 作为还原醛糖的标记分子,通过对缓冲液组成、有机胺的配比比例、梯度模式等分离参数的系统优化,构建了 10 种常

见还原单糖的 HPLC 快速、准确分离鉴别模式,并成功应用于中药水飞蓟多糖的糖组成质量控制。

材料与方法

仪器与试剂 Shimadzu LC-2010A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), Shimadzu Class-VP 6.1 色谱工作站, MILLI-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司), RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。D-甘露糖(Man), D-核糖(Rib), L-鼠李糖(Rha), D-葡萄糖醛酸(GlcUA), D-半乳糖醛酸(GalUA), D-葡萄糖(Glc), D-木糖(Xyl), D-半乳糖(Gal), L-阿拉伯糖(Ara), D-岩藻糖(Fuc)均购自美国 Sigma 公司。三氟乙酸(TFA)、TEA 和 PMP 分别购自德国 Merck 公司和北京化学试剂公司。色谱甲醇和乙腈均购自美国 Honeywell 公司。

对照品溶液的制备 精密称取一定量的 10 种单糖,分别用 10%甲醇溶液配成 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液。取适量母液稀释为 5 个不同浓度的系列单糖溶液,参考 Honda 等^[19]衍生化方法并作适当的改进:取单糖混合溶液 100 μL ,依次加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP 甲醇溶液 200 μL 和 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 300 μL 。混匀后在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 60 min,冷至室温,用 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液 300 μL 中和。加入氯仿 1.0 mL 萃取,振荡、离心,用细针头吸弃下层,重复 3 次。取上层水相加蒸馏水稀释至适当浓度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

水飞蓟多糖的制备 精确称取干燥的水飞蓟(*Silybum marianum* (L.) Gaerth) 种子 200 g,粉碎后(过 80 目筛)经 95%乙醇回流脱脂。晾干,并以 10 倍量的蒸馏水在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 3 次,每次 4 h。合并滤液,减压浓缩至 300 mL 左右后用 4 倍体积的无水乙醇沉淀 3 次。取蒸馏水溶解沉淀物后反复冻融 10 次除蛋白,离心后置于透析袋(截留 M_w 8 kDa)中透析两天,冷冻干燥得水飞蓟多糖。

供试品溶液的制备 取水飞蓟多糖 20 mg 溶解在装有 $3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TFA 溶液 2.0 mL 的安瓿瓶中充氮气封口,并在 95 $^{\circ}\text{C}$ 水解 8 h 后冷却至室温,冷却后的样品离心 5 min ($1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),上清液转至 5.0 mL 圆底烧瓶减压蒸干后加超纯水 1.0 mL 溶解。取水解液样品 100 μL ,按“对照品溶液的制备”项下方法制备 PMP 标记物。

HPLC 色谱条件 采用梯度洗脱方式。本试验在比较流动相磷酸(H_3PO_4 -NaOH)-甲醇、磷酸氢二钾(K_2HPO_4 -NaOH)-甲醇、磷酸二氢钾(KH_2PO_4 -NaOH)-

甲醇、 KH_2PO_4 -NaOH-乙腈和 KH_2PO_4 -TEA-乙腈体系的基础上, 确立 KH_2PO_4 -TEA-乙腈为理想流动相组成。流动相 A 为纯乙腈; B 由 0.45 g KH_2PO_4 、0.5 mL TEA、100 mL 乙腈和 900 mL 超纯水组成 (pH 7.5)。色谱柱: Venusil C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm ID, 5 μm); 梯度洗脱: 0 min, 94% B; 4 min, 94% B; 5 min, 88% B; 30 min, 88% B。进样量 10 μL , 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 250 nm, 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

结果

1 系列 PMP 标记单糖对照品的 HPLC 分离模式的构建

PMP 是标记还原醛糖选择性非常高的试剂, 标记过程简便。其标记原理为: 在温和的条件下 (无需任何催化剂), 一个还原糖醛基可与两分子 PMP 发生羟醛缩合, 有强烈的紫外吸收, 且具有不易裂解、分析时不产生异构峰等优点^[19]。为实现 PMP 标记单糖的

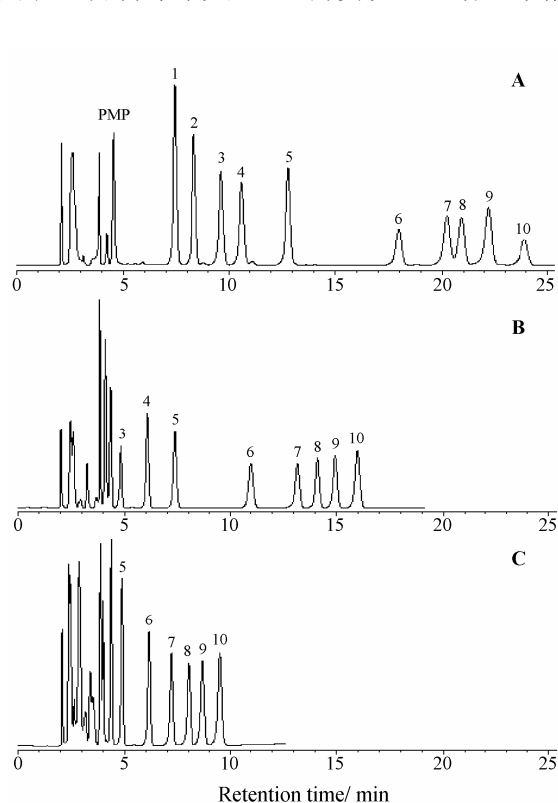


Figure 1 Effect of TEA concentrations on the separation of the ten PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)-labeled standard monosaccharides. The tested monosaccharides were labeled with PMP, and then analyzed by HPLC as described in the experimental section. TEA concentrations in mobile phase: (A) 3.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B) 4.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (C) 6.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Peaks 1: Mannose (Man); 2: Ribose (Rib); 3: Rhamnose (Rha); 4: Glucuronic acid (GlcUA); 5: Galacturonic acid (GalUA); 6: Glucose (Glc); 7: Xylose (Xyl); 8: Galactose (Gal); 9: Arabinose (Ara); 10: Fucose (Fuc, internal standard, IS)

快速和高效分离, 本实验通过调节乙腈和 KH_2PO_4 -TEA 缓冲液中 TEA 的浓度, 对 PMP 标记的 Man、Rib、Rha、GlcUA、GalUA、Glc、Xyl、Gal、Ara、Fuc 等 10 种还原单糖的 HPLC 分离条件进行了研究, 以期构建大批量单糖的高效分离模式。结果发现, 随着流动相中 TEA 配比的增加, 单糖的分离时间缩短, 并且色谱峰变窄变锐, 但在 TEA 浓度达到一定量的时候分离度却明显降低 (图 1)。在梯度洗脱分离模式下 (0 min, 93% B; 7 min, 93% B; 9 min, 91% B; 30 min, 91% B), TEA 的浓度为 3.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 (图 1A), 10 种单糖在 25.0 min 内达到完全基线分离, 分离效果最佳。因此, 本实验选择 3.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 TEA 的优化浓度。

同时, 为了系统的优化 HPLC 分离体系, 在上述实验的基础上适当微调洗脱梯度中乙腈的配比, 结果发现, 10 种单糖分别在 27 min、18 min 以及 13.5 min 内均可达到很好的分离效果 (图 2A、B 和 C)。但也

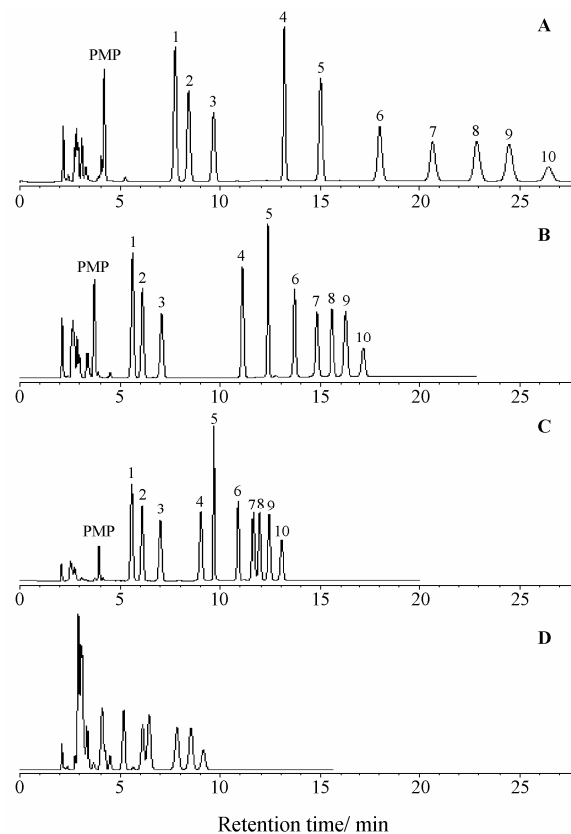


Figure 2 Effect of acetonitrile concentrations on the separation of the ten PMP-labeled standard monosaccharides. (A) 0 min, 3% acetonitrile; 5 min, 3% acetonitrile; 8 min, 7% acetonitrile; 30 min, 7% acetonitrile. (B) 0 min, 5% acetonitrile; 5 min, 5% acetonitrile; 8 min, 10% acetonitrile; 30 min, 10% acetonitrile. (C) 0 min, 6% acetonitrile; 4 min, 6% acetonitrile; 5 min, 12% acetonitrile; 30 min, 12% acetonitrile. (D) 0 min, 10% acetonitrile; 4 min, 10% acetonitrile; 5 min, 12% acetonitrile; 30 min, 12% acetonitrile

发现, 过高的乙腈配比, 反而导致单糖的分离度明显下降 (图 2D)。可见, 通过 PMP 标记醛糖与 TEA 柱分离调节相结合, 可大幅度调节大批量单糖 PMP 标记物的分离度, 具有很高的分离可控性。基于分离度、分析时间和峰形的综合考虑, 本试验最终选择 0~4~5~30 min 的时间梯度和 94%~94%~88%~88% B 的相应浓度梯度为优化的梯度洗脱分离模式 (图 2C)。在此新型模式下, 10 种单糖 PMP 标记物达到理想的分离效果, 各色谱峰的出峰顺序依次为 PMP、Man、Rib、Rha、GlcUA、GalUA、Glc、Xyl、Gal、Ara、Fuc (IS)。

2 方法学考察

2.1 线性关系 将 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液梯度稀释为 5 个不同浓度的单糖供试溶液, 配制成系列对照溶液 ($2.0 \sim 40.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。经 PMP 标记和 HPLC 分析, 获得各 PMP 标记单糖的峰面积。以待测 PMP 标记单糖与 PMP 标记内标 (Fuc) 的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 分析物的浓度 (X , $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

2.2 方法精密度 取同一 10 种单糖标准品混合溶液 ($4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别在同一天及不同天 (3 日) 按前述色谱条件进行重复进样分析 ($n = 3$), 测得其峰面积 (A) 和保留时间 (t_R), 并计算方法精密度, 表示为标准偏差 (RSD%)。由表 1 可知, t_R 和峰面积 A 的日内 (intra-day) 精密度分别在 $0.33\% \sim 1.26\%$ 和 $0.51\% \sim 2.68\%$, 而日间 (inter-day) 精密度分别低于 2.69% 和 4.24% 。因此, 本法的精密度良好。

3 水飞蓟多糖的质量控制

3.1 单糖组成分析结果 精密称取水飞蓟多糖 20 mg, 按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液, 按“液相色谱条件”项下各 PMP 标记单糖含量测定的色谱条件, 测定水飞蓟中各单糖组成的含量。图 3

显示了水飞蓟多糖的单糖组成特征色谱图。与图 3A 标准谱图相似, 该多糖样品中各组成单糖仍然能够保持很好的基线分离 (图 3B)。结果表明, 水飞蓟多糖是一种典型的天然杂多糖, 单糖组成分别为 Man、Rha、GlcUA、GalUA、Glc、Xyl、Gal、Ara, 其在水飞蓟多糖水解液中的浓度分别为 4.00 、 5.17 、 3.59 、 6.18 、 9.97 、 4.28 、 16.80 和 $29.48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。摩尔比为 $0.66 : 0.84 : 0.58 : 1.0 : 1.6 : 0.69 : 2.7 : 4.8$ (摩尔百分含量分别为 5.03% 、 6.50% 、 4.52% 、 7.78% 、 12.5% 、 5.38% 、 21.1% 和 37.1%)。Ara 和 Gal 被确定为该多糖的主要组成单糖, 其摩尔百分含量达到 58.2% 。此外, 酸性 GlcUA 和 GalUA 的摩尔百分数约为 12.3% , 表明该中药水飞蓟多糖是一种酸性杂多

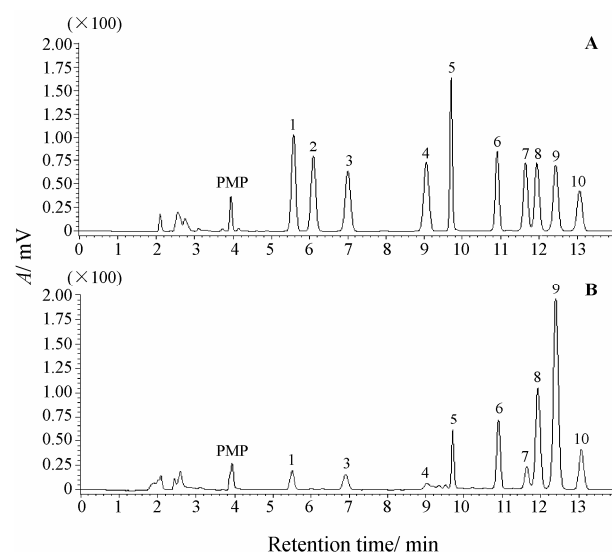


Figure 3 HPLC chromatograms of 10 PMP-labeled standard monosaccharides (A) and PMP-labeled monosaccharides released from *Silybum marianum* polysaccharide (B). The polysaccharide was hydrolyzed with TFA at 95°C for 8 h and then was labeled with PMP. The HPLC analysis was carried out as described in the experimental section

Table 1 Performance characteristics of the proposed HPLC method for the assay of 10 standard monosaccharides.

Analytes	t_R/min	Regression equation	Correlation (r^2)	Intra-day precision/%		Inter-day precision/%	
				t_R	A	t_R	A
Man	5.569	$Y = 0.225 1X - 0.480 4$	0.999 8	0.42	0.51	0.36	1.63
Rib	6.094	$Y = 0.174 0X - 0.287 1$	0.999 9	0.33	0.87	0.86	1.72
Rha	7.001	$Y = 0.150 3X - 0.355 9$	0.999 9	0.92	0.68	1.32	1.21
GlcUA	9.051	$Y = 0.179 0X - 0.445 8$	0.999 3	0.74	0.98	0.51	1.88
GalUA	9.694	$Y = 0.184 2X - 0.452 5$	0.999 4	0.59	1.61	1.02	2.03
Glc	10.909	$Y = 0.121 5X - 0.030 6$	0.999 1	0.65	1.10	0.97	2.15
Xyl	11.648	$Y = 0.121 3X - 0.043 4$	0.999 7	1.06	2.68	2.69	3.72
Gal	11.945	$Y = 0.120 0X + 0.043 3$	0.999 9	1.26	1.83	2.31	4.24
Ara	12.423	$Y = 0.140 5X - 0.036 9$	0.999 9	1.01	1.49	1.63	3.07

Method precision was expressed as coefficient of variation (RSD%, $n = 3$) for migration time (t_R , min) and peak areas (A)

Table 2 Recovery and precision (RSD%) of the monosaccharide analysis in *Silybum marianum* polysaccharide by spiking method

Monosaccharides	Content in sample /mmol·L ⁻¹	Spiked amount /mmol·L ⁻¹	Found amount /mmol·L ⁻¹	Recovery /%	RSD /%
Man	4.00	5.00	8.91	99.0	1.35
Rib	ND	5.00	4.80	96.0	1.06
Rha	5.17	10.00	15.47	102.0	1.24
GlcUA	3.59	5.00	8.33	97.0	0.68
GalUA	6.18	10.00	16.10	99.5	0.96
Glc	9.97	10.00	20.45	102.4	1.12
Xyl	4.28	5.00	8.58	92.4	2.37
Gal	16.80	20.00	38.27	104.0	3.81
Ara	29.48	30.00	59.60	100.2	2.94

ND: Not detected. $n = 3$

糖, 可望有较好的生物活性。

3.2 回收率及测定精密性试验 精密称取水飞蓟多糖 20 mg, 定量加入对照品, 测定加样回收率, 结果如表 2 所示。结果表明, 10 种单糖的加样回收率在 92.4%~104.0% 之间, RSD 在 0.68%~3.81% 之间。表明本法回收率高, 测定结果准确, 可用于水飞蓟多糖的单糖质量控制。

讨论

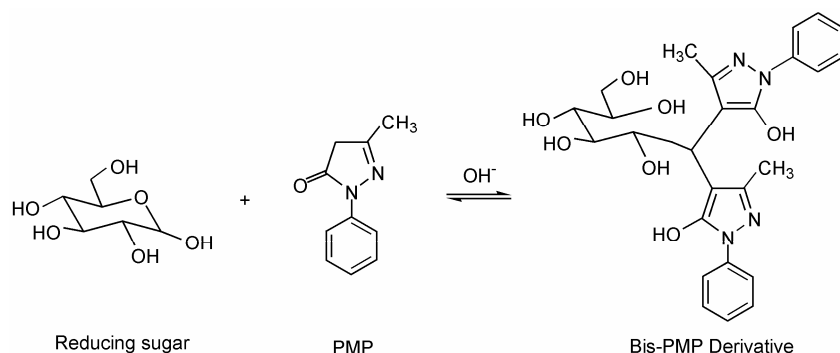
糖类作为细胞的基本结构成分和初级代谢产物广泛存在于植物中, 且植物中次生代谢产物也多以糖苷的形式存在。因此, 发展糖类高效质控技术具有重要意义。在糖类的众多分析鉴定技术中, HPLC 色谱鉴定技术目前发展较快, 已广泛应用于各种药品和食品的生产研发和质量评定等^[15-17, 20-31]。但是, 由于现有色谱分离技术的限制, 能够实现基线分离的单糖种类受到严重的制约^[15-18, 24-31]。为此, 国内外学者正采用各种色谱技术发展建立糖类的质量控制新方法, 是国际竞相开发的技术^[15-18, 24-31]。

糖类无紫外吸收, 对糖的直接检测往往是利用

示差折光检测器 (RID) 来进行, 但 RID 灵敏度较低且不能用于梯度洗脱^[9, 22, 23]。常用的氨基柱对糖有较高的分离效率, 但是由于氨基柱自身的水解以及固定相上的氨基与糖分子中的羰基之间易形成希夫碱, 影响了糖分离, 缩短了该类柱的使用寿命^[9, 22, 23, 32]。近年来, 阴离子交换-积分安培法检测色谱联用技术在糖类分析中得到一定的应用^[8], 但该类色谱分析系统稳定性不高、操作繁琐且费用高、要求强碱性环境(要求耐碱色谱柱)、仪器复杂昂贵和普通实验室很少配置等问题限制了其广泛的应用^[9, 22-23]。因此, 高效的糖分离分析技术值得继续探索。

本文根据单糖 PMP 标记物的结构特点 (路线图 1), 采用普通实验室配置的 HPLC-UV 和常用 C₁₈ 色谱柱, 分别以乙腈-磷酸二氢钾为流动相, 并在流动相中配比一定量的 TEA 调控剂, 已成功地对 10 种 PMP 标记单糖实现了基线分离 (图 3)。其分离机制推测如下 (路线图 1): ① 还原单糖经 PMP 标记后, 在 PMP 结构部位形成 2 个 $p-\pi$ 共轭的烯醇式酸性结构部分 (羟基), 为与有机胺形成中性离子对色谱分离机制提供了可能; ② 五元富电子吡啶环中的氮可能与 C₁₈ 色谱柱的残余硅羟基形成氢键, 并与流动相中的有机胺产生竞争吸附; ③ PMP 结构部位中的苯、甲基等非极性基团会增加其在非极性 C₁₈ 色谱柱上的保留识别; ④ 酸性条件下 PMP 结构部位中的氮的离子化, 为分离优化提供更多机会。本文与 Currie 等^[8]最近发表的结果相比, 后者采用的是阴离子交换色谱-积分安培法才达到对 11 种单糖的分离 (其中包括有明显结构差异且少见的 2-脱氧-D-半乳糖和氨基葡萄糖), 且此方法使用特殊的 CarboPac PA10 column 糖分析柱, 其实用性受限。

本文在前期工作基础上, 通过对流动相中有机胺的配比种类、比例、梯度模式等分离参数的系统优化, 成功创立了对可能存在于中药材中的常见 10 种单糖的快速、准确 HPLC 分析技术。首次在 13.5 min

**Scheme 1** Chemical reaction of reducing carbohydrate with PMP reagent.

内对 10 种常见单糖实现快速基线分离,并应用于水飞蓟多糖中单糖组成的定性定量控制。方法学的研究结果也表明,该方法简单、快速和灵敏,具有潜在的应用前景。

本研究的特征在于采用通用 HPLC-UV 系统及 C₁₈ 色谱柱,发展高效的糖类色谱鉴别技术,可满足普通实验室开展工作的需要。该糖类 HPLC-UV 分离鉴别技术可用于药品食品中常见单糖的准确鉴别和定量控制,以及糖苷功能成分的间接定量,可望成为在无合适对照品时可供选择的间接质控技术;该研究将为植物源药物质控技术的发展提供新思路,为糖工程、糖生物学研究以及开发具有自主知识产权的糖类和糖苷类药物提供理论与技术依据。

References

- [1] Nathan B. A spoonful of sugar [J]. *Nature*, 2009, 457: 617–620.
- [2] Auclair S, Silberberg M, Gueux E, et al. Apple polyphenols and fibers attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 5558–5563.
- [3] Yao XS, Wu LJ. *Medicinal Chemistry of Natural Products (天然药物化学)* [M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006, 54.
- [4] Bertozzi CR, Kiessling LL. *Chemical glycobiology* [J]. *Science*, 2001, 291: 2357–2364.
- [5] Topping D. Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health [J]. *J Cereal Sci*, 2007, 46: 220–229.
- [6] Xie PS. *Chromatographic fingerprint of Traditional Chinese Medicine (中药色谱指纹图谱)* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005.
- [7] Huber LS, Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones [J]. *Food Chem*, 2009, 113: 1278–1282.
- [8] Currie HA, Perry CC. Resolution of complex monosaccharide mixtures from plant cell wall isolates by high pH anion exchange chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1128: 90–96.
- [9] Wang QJ, Fang YZ. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 812: 309–324.
- [10] Di X, Chan KKC, Leung HW, et al. Fingerprint profiling of acid hydrolyzates of polysaccharides extracted from the fruiting bodies and spores of Lingzhi by high-performance thin-layer chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1018: 85–95.
- [11] Quémener B, Bertrand D, Marty I, et al. Fast data preprocessing for chromatographic fingerprints of tomato cell wall polysaccharides using chemometric methods [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1141: 41–49.
- [12] Nakakita S, Sumiyoshi W, Miyanishi N, et al. Gas-phase pyridylation of saccharides: development and applications [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 2674–2679.
- [13] Férmas S, Gonnet F, Varenne A, et al. Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 4987–4993.
- [14] Muir JG, Rose R, Rosella O, et al. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 554–565.
- [15] Nogueira LC, Silva F, Ferreira I, et al. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1065: 207–210.
- [16] Villena MA, Pérez JD, Ubeda JF, et al. A rapid method for quantifying aroma precursors: application to grape extract, musts and wines made from several varieties [J]. *Food Chem*, 2006, 99: 183–190.
- [17] Li J, Chen ML, Zhu Y. Separation and determination of carbohydrates in drinks by ion chromatography with a self-regenerating suppressor and an evaporative light-scattering detector [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1155: 50–56.
- [18] Wei Y, Ding MY. Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 904: 113–117.
- [19] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-phrazolone derivatives [J]. *Anal Biochem*, 1989, 180: 351–357.
- [20] Zhang XM, Du LQ, Xie JH, et al. Determination of pineapple saccharides components by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2007, 28: 450–452.
- [21] Liu YF, Li L, Li D, et al. Determination of monosaccharide and disaccharide in foods by HPLC method [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2007, 28: 293–296.
- [22] Wang J, Wang Q, Xiang WS. Application of chromatography to the analysis of carbohydrates [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2001, 29: 222–227.
- [23] Jiang XM, Tian W, Zhang HX, et al. Determination of sugars by chromatography methods [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2006, 26: 1181–1186.

- [24] Gomis DB, Tamayo DM, Alonso JM. Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 436: 173–180
- [25] La Torre GL, La Pera L, Rando R, et al. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis [J]. *Food Chem*, 2008, 110: 729–734.
- [26] Blanco D, Muro D, Gutiérrez MD. A comparison of pulsed amperometric detection and spectrophotometric detection of carbohydrates in cider brandy by liquid chromatography [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 517: 65–70.
- [27] Fernández-Navales J, López MI, Sánchez MT, et al. Short-wave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines [J]. *Food Res Int*, 2009, 42: 285–291.
- [28] Fernández-Navales J, López MI, Sánchez MT, et al. A feasibility study on the use of a miniature fiber optic NIR spectrometer for the prediction of volumic mass and reducing sugars in white wine fermentations [J]. *J Food Eng*, 2008, 89: 325–329.
- [29] Gomis DB, Tamayo DM, Valles BSR, et al. Detection of apple juice concentrate in the manufacture of natural and sparkling cider by means of HPLC chemometric sugar analyses [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 201–203.
- [30] de Carvalho LMJ, de Castro IM, da Silva CAB. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro- and ultra-filtration [J]. *J Food Eng*, 2008, 87: 447–454
- [31] Jones PR, Gawel R, Francis IL, et al. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine [J]. *Food Qual Prefer*, 2008, 19: 596–607.
- [32] Yang XB, Zhao Y, Wang QW, et al. Analysis of the monosaccharide components of *Angelica* polysaccharides by high performance liquid chromatography [J]. *Anal Sci*, 2005, 21: 1177–1180.

《药学报》入选 WHO 西太平洋地区医学索引 (WPRIM)

2009 年 12 月, 经过本刊编辑部申请, 以及 WHO 西太平洋地区医学索引 (The Western Pacific Region Index Medicus, WPRIM) 中国生物医学期刊评审委员会评审, 并经 WPRIM 期刊评审委员会审核, 《药学报》已获准加入 WPRIM。

为了促进卫生信息的全球共享与利用, 世界卫生组织 (WHO) 于 2005 年启动了全球卫生图书馆 (Global Health Library, GHL) 项目, 拟建立基于互联网的卫生虚拟图书馆, 旨在便捷地向全世界提供卫生相关信息。GHL 的一项重要内容是建立全球医学索引 (Global Index Medicus, GIM), 提供全世界的医学文献题录及文摘。WPRIM 是 GHL 项目的一个重要组成部分, 主要收录 WHO 西太平洋各成员国和地区所出版的覆盖卫生、生物医学领域的期刊及灰色文献的题录 (包括文摘) 信息。WPRIM 检索服务平台将于 2010 年 5 月正式开通。