

基于完全酸水解组成糖特征的几种法定基源 麻黄多糖鉴别研究

梁 军,孙黎明,宋 艳,王天龙,夏永刚,匡海学*

黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室

黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室,哈尔滨 150040

摘要:草麻黄多糖具有重要的免疫抑制作用,因此对几种法定基源麻黄属多糖进行鉴别是一项重要的工作。本研究采用 PMP 柱前衍生超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术分析草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖的完全酸水解单糖组成,考察其组成糖种类和含量变化,运用主成分分析多元统计分析方法,对源自草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根的二十批几种法定基源麻黄多糖实现了区分和辨别。甘露糖(1)、氨基葡萄糖(2)、半乳糖醛酸(8)和葡萄糖(9)在区分草麻黄多糖与麻黄根、中麻黄和木贼麻黄等三种麻黄多糖中起到了重要作用,半乳糖(10)在区分木贼麻黄多糖与草麻黄、中麻黄和麻黄根等三种麻黄多糖中起到了重要作用。PMP 柱前衍生 UPLC-MS/MS 技术结合多元统计学分析方法,通过完全酸水解组成糖种类和含量的变化规律进行草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖鉴别研究,该方法稳定可行,且重现性好,可为麻黄属多糖的质量评价提供有力参考。

关键词:麻黄多糖;完全酸水解;组成糖;超高效液相色谱-串联质谱;主成分分析

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.001

Identification of Polysaccharides from Several Kinds of Legal Base Source of Ephedra Based on the Characteristics of Compositional Saccharides

LIANG Jun, SUN Li-ming, SONG Yan, WANG Tian-long, XIA Yong-gang, KUANG Hai-xue*

Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of TCM and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Because polysaccharides from *Ephedra sinica* stem have reported to possess important immunosuppressive activity, it is significant to identify and discriminate polysaccharides from several kinds of legal base source of Genus *Ephedra*. This study realized the discrimination of polysaccharides from *Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C. A. Mey., *E. equisetina* Bge and *Badix Ephedra* employing UPLC-MS/MS techniques based on changeable rules of compositional monosaccharides by full acid hydrolysis. The results showed 20 batches of *Ephedra* polysaccharides was successfully discriminated using UPLC-MS/MS coupled with multivariate statistics method, such as principal component analysis (PCA). These *Ephedra* polysaccharides were attributed to different species and plant parts. Man (1), GlcN (2), GalUA (8) and Glc (9) played an important role in classifying between *E. sinica* polysaccharides and polysaccharides from *E. intermedia*, *E. equisetina* and *Badix Ephedra*, while Gal (10) played an important role in classifying between *E. equisetina* polysaccharides and polysaccharides from *E. intermedia*, *E. sinica* and *Badix Ephedra*. This method with the advantages of high stability and repeatability, could achieve a quality evaluation of plant polysaccharides from three kinds of legal base source of Genus *Ephedra*.

Key words: *Ephedra* polysaccharides; full acid hydrolysis; compositional saccharides; UPLC-MS/MS; PCA

麻黄为草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *E.*

intermedia Schrenk et C. A. Mey. 或木贼麻黄 *E. equisetina* Bge. 的干燥草质茎,是我国应用历史悠久的中药材,辛、微苦,温,具发表散寒、宣肺平喘、利水消肿等功效,始载于汉代《神农本草经》。已有不少研究证明麻黄具有显著的免疫抑制作用^[1-5],且中医在

收稿日期:2017-12-08 接受日期:2018-05-08

基金项目:国家自然科学基金(81803809,81303215);全国优秀博士学位论文作者专项基金(201367);中国博士后第61批科学基金面上项目(2017M611409)

* 通信作者 Tel:86-451-82193052; E-mail:hxkuang56@163.com

临床上也经常使用其治疗自身免疫性疾病,如过敏性哮喘、慢性肾炎、类风湿性关节炎(风湿痹症)等的方剂中配伍应用麻黄。

药化学研究表明草麻黄多糖具有重要的免疫抑制作用^[3-6],然而草麻黄多糖化学结构是否与中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖结构存在区别,一直以来鲜有科学报道揭示其异同点,因此开展对几种法定基源麻黄属多糖鉴别是一项重要的工作。课题组前期逐步探索了采用PMP柱前衍生高效毛细管电泳、高效液相和超高效液相等色谱方法对麻黄多糖及其单体多糖进行了单糖组成分析^[7-10],发现柱前PMP衍生超高效液相-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术在中药多糖组成分析方面显示了强大的优势,表现在快速分离、灵敏度高和重现性好^[7,8]。鉴于此,本研究拟采用前期建立的PMP柱前衍生UPLC-MS/MS技术^[10],结合利用完全酸水解方法,分析草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖的单糖组成,考察其组成糖种类和含量变化,运用主成分分析多元统计分析方法,对源自草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根的二十批麻黄属中药多糖实现了区分和辨别,为几种法定基源麻黄多糖的质量评价及质量控制提供初步依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验仪器

液相色谱-质谱联用仪:UPLC-MS采用ACQUITY UPLC系统(Waters公司,美国)联合API 4000 Qtrap质谱检测器(AB Sciex公司,美国)。电子天平,万分之一(梅特勒-托利多仪器有限公司,上海);超纯水仪(Milli-Q Reference,美国Millipore);Alpha 1-4 LD Plus冷冻干燥机(CHRIST公司,德国);超速离心机(Hettich D-78532,德国)。

1.1.2 试剂与药材

单糖对照品:甘露糖(Man,1)、氨基葡萄糖盐酸盐(GlcN,2)、氨基甘露糖盐酸盐(ManN,3)、核糖(Rib,4)、鼠李糖(Rha,5)、氨基半乳糖盐酸盐(GalN,6)、葡萄糖醛酸(GlcUA,7)、半乳糖醛酸(GalUA,8)、葡萄糖(Glc,9)、半乳糖(Gal,10)、阿拉伯糖(Ara,11)、海藻糖(Fuc,12),均为美国Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)公司产品。D-Glucose-6,6-d₂(D₂-Glc),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP);质谱级乙腈(Dika-

ma公司,美国);水为Milli-Q超纯水;三氟乙酸(TFA)购于德国Merck公司。

实验用药材:草麻黄(茎和根)经黑龙江中医药大学中药资源教研室王振月教授鉴定为麻黄科植物草麻黄(*E. sinica* Stapf)的干燥草质茎及根;中麻黄和木贼麻黄经黑龙江中医药大学附属第一医院制剂室主任方东军研究员鉴定为中麻黄(*E. intermedia* Schrenk. Et C. A. Mey.)和木贼麻黄(*E. equisetina* Bge.)的干燥草质茎,符合《中国药典》2015版相关质量标准。样品标本保存于黑龙江中医药大学中药化学教研室。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的制备

12种单糖(GalUA、GlcUA、Fuc、Rha、Glc、Gal、Man、Ara、Rib、GlcN、GalN和ManN)分析物分别用纯化水配制成为单独的储备液,D₂-Glc(内标)同样经纯化水配制成为内标储备液,之后再用纯化水将其稀释为2 000 μmol/L,备用。

1.2.2 麻黄多糖的制备

称取草麻黄、中麻黄、木贼麻黄药材各100 g,分别至2 000 mL圆底烧瓶中。通过水浴回流,然后醇沉离心并透析,最后冷冻干燥的方法制备得到草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖冻干品。

1.2.3 植物多糖的完全酸水解^[8,9]

称取上述制备的草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖粗多糖10 mg,分别置于具塞试管中,加入浓度为2 mol/L三氟乙酸(TFA)溶液4.0 mL,封管后于110 °C水解4 h,得水解样品溶液。反应液减压浓缩蒸干,加入适量甲醇,重复蒸干3次,除去其中残留的TFA(无酸味)。干燥水解产物以纯化水溶解至1.5 mL,离心,取上清液待衍生化。

1.2.4 衍生化标记^[10]

将12种单糖分析物的储备液混合在一起用水稀释,配成一系列已知浓度的工作溶液母液,分别吸取各浓度的工作溶液母液100 μL置于1.5 mL离心管中,同时加入内标工作液,然后向离心管中依次加入200 μL PMP(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)溶液(0.5 mol/L甲醇溶液)和200 μL氨水,混匀后置入70 °C水浴中加热反应30 min,取出室温放置10 min;再加入200 μL甲酸中和,混匀后用乙酸异戊酯萃取,振摇,于12 000 rpm离心10 min,小心弃去有机层,重复萃取3次,再加等体积的CHCl₃,剧烈震荡除去水相中的PMP,于12 000 rpm条件下离心10

min,取上层水相重复3次。将水相定容至1.0 mL,过0.22 μm微孔滤膜,制备得0.6~50.0 μmol/L的系列标准工作溶液,进行UPLC-MS分析。

1.2.5 色谱条件

使用 Cortecs UPLC C₁₈ (1.6 μm, 2.1 × 100 mm) 色谱柱,流动相 A 为纯乙腈,流动相 B 中加入 10 mmol/L 的甲酸铵,柱温 30 °C,流速 0.3 mL/min,最终的洗脱条件为:0~0.5 min,13% A;0.5~2 min,13%~16% A;2~15 min,16%~21% A;15~16 min,21%~60% A;16~17 min,60%~90% A;

17~17.1 min,90%~13% A;17.1~20 min,13% A。

1.2.6 质谱条件

电喷雾电离(ESI)源,毛细管电压 ± 4.5 kV,源温度 550 °C;气帘气和碰撞气压力分别设为 30 psi 和 10 psi;雾化气和气化气压力为 55 psi;碰撞电池入口电位和出口电位分别为 ± 10 V。采用负离子检测模式下多反应离子监测(MRM)模式,具体检测参数见表 1,UPLC-MS/MS 总离子流图见图 1。

表 1 化合物 1~12 的质谱多反应离子监测参数

Table 1 MS parameters used for analysis of compounds 1-12

峰 Peaks	母离子 Analysts	单糖分子量 Original M_w	母离子 $Q_1(m/z)$	子离子 $Q_3(m/z)$	去簇电压 DP (V)	碰撞能 CE (eV)
1	[M - H] ⁻	180.2	509.1	215.1	-49.2	-28.1
2	[M - H] ⁻	215.6	508.2	214.0	-65.9	-29.8
3	[M - H] ⁻	215.6	508.4	213.7	-64.5	-26.0
4	[M - H] ⁻	150.1	478.7	215.0	-58.4	-29.9
5	[M - H] ⁻	164.2	493.2	214.9	-60.6	-29.0
6	[M - H] ⁻	215.6	508.2	213.8	-67.9	-33.2
7	[M - H] ⁻	212.2	523.2	215.0	-55.9	-30.3
8	[M - H] ⁻	194.1	523.1	215.0	-57.5	-47.4
9	[M - H] ⁻	180.2	509.0	214.7	-59.9	-26.1
10	[M - H] ⁻	180.2	509.2	215.0	-65.0	-29.9
11	[M - H] ⁻	150.1	479.0	215.1	-48.4	-33.9
12	[M - H] ⁻	164.2	493.1	215.1	-54.5	-30.4
IS	[M - H] ⁻	182.2	511.2	214.6	-63.7	-28.0

注:1. 甘露糖;2. 氨基葡萄糖;3. 氨基甘露糖;4. 核糖;5. 鼠李糖;6. 氨基半乳糖;7. 葡萄糖醛酸;8. 半乳糖醛酸;9. 葡萄糖;10. 半乳糖;11. 阿拉伯糖;12. 海藻糖;IS: D₂-葡萄糖。

Note:1. Man;2. GlcN;3. ManN;4. Rib;5. Rha;6. GalN;7. GlcUA;8. GalUA;9. Glc;10. Gal;11. Ara;12. Fuc;IS: D₂-Glc.

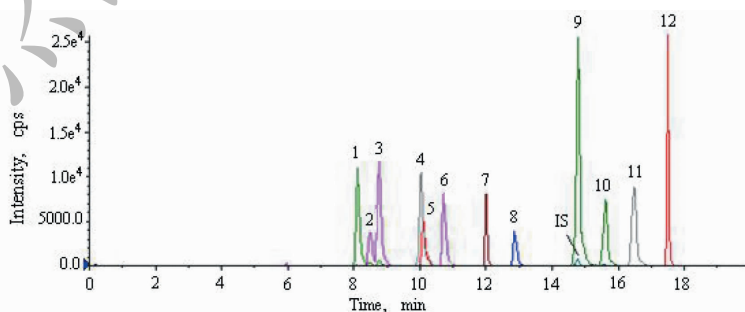


图 1 12 个单糖混合标准品总离子色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram (A) of 12 carbohydrates

注:1. 甘露糖;2. 氨基葡萄糖;3. 氨基甘露糖;4. 核糖;5. 鼠李糖;6. 氨基半乳糖;7. 葡萄糖醛酸;8. 半乳糖醛酸;9. 葡萄糖;10. 半乳糖;11. 阿拉伯糖;12. 海藻糖;IS: D₂-葡萄糖。

Note:1. Man;2. GlcN;3. ManN;4. Rib;5. Rha;6. GalN;7. GlcUA;8. GalUA;9. Glc;10. Gal;11. Ara;12. Fuc;IS: D₂-Glc.

2 结果

2.1 衍生化样品的测定

前期研究发现采用 UPLC-MS/MS 分析技术^[10],基质的作用对麻黄多糖水解物的检测影响不大,因此本研究采用已报道的 UPLC-MS/MS 分析方法,研究几种法定基源麻黄多糖完全酸水解产物的变化规律。草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖的完全酸水解产物,经 PMP 衍生化后进行 UPLC-MS/MS 分析,色谱图见图 2,组成糖特征见表 2。

2.2 几种法定基源麻黄多糖的主成分分析

基于对草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖单糖组成定量分析的基础上,采用 EZ info 软件,对

其进行主成分分析研究。图 3A 是草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖主成分分析二维得分图,结果表明草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖得到很好区分,其中草麻黄多糖位于第一象限(+,+),中麻黄多糖位于第二象限(-,+),木贼麻黄多糖位于第四象限(+,-),而麻黄根多糖位于第二和第三象限(-,+;-,-),且同一种麻黄多糖各批次之间差异较小。图 3B 是通过主成分分析方法分析二十批几种法定基源麻黄属多糖建立的载荷图,在载荷图中距离原点越远,说明该变量对样本差异的贡献越大,通过此图能够直观地发现完全酸水解检测到的 12 个单糖成分在划分草麻黄、中麻黄和木贼麻黄和麻黄根多糖均起到了非常重要的作用。例如,完全酸

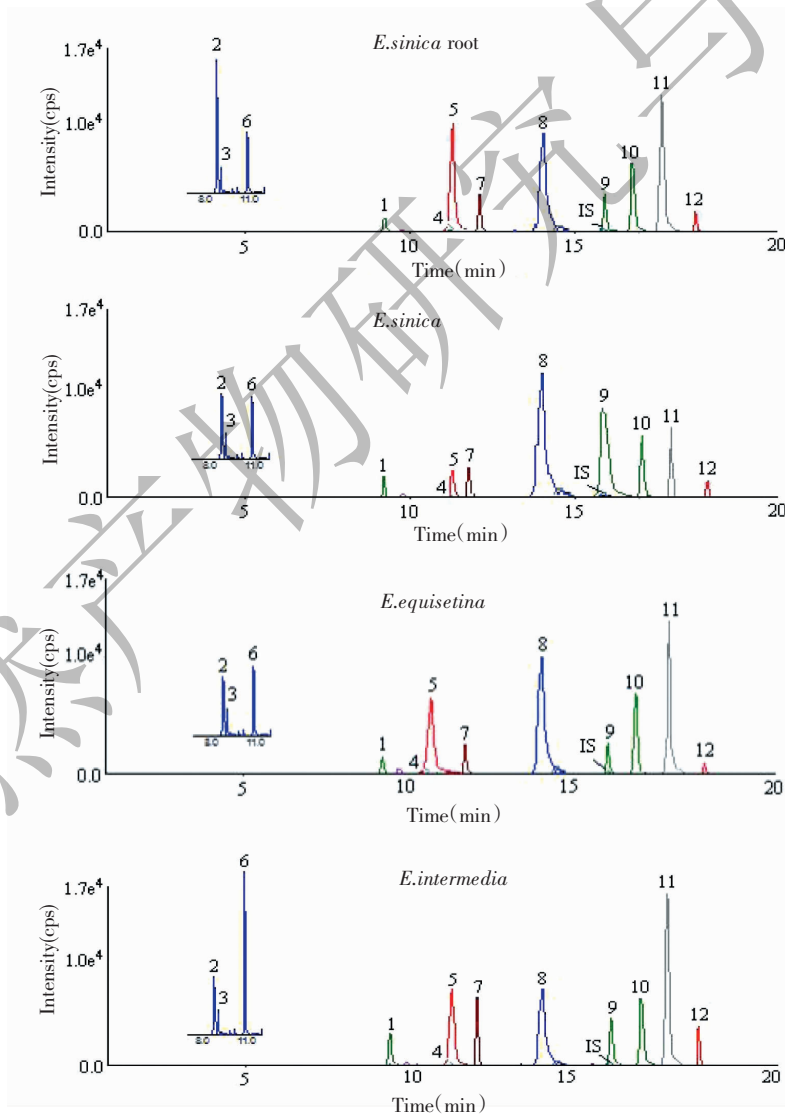


图 2 麻黄多糖样品完全酸水解衍生化色谱图

Fig. 2 Chromatograms of full acid hydrolysis of *Ephedra* samples

表2 几种法定基源麻黄植物多糖完全酸水解组成糖测定结果 (mol%)

Table 2 The measurement results of compositional saccharides in full acid hydrolysis of polysaccharides from several kinds of legal base source of genus *Ephedra* (mol%)

样品 Sample	批次 Batch	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
中麻黄 <i>E. intermedia</i>	1	3.08	0.26	0.06	1.29	11.79	1.72	5.80	28.26	2.84	6.69	35.41	2.81
	2	3.03	0.27	0.06	1.21	11.61	1.63	5.73	27.81	3.38	6.57	35.82	2.86
	3	2.97	0.28	0.06	1.04	12.07	1.64	5.56	29.71	3.01	6.36	34.67	2.72
	4	2.56	0.24	0.06	1.43	10.13	1.78	5.95	29.32	3.12	6.00	36.21	2.71
	5	2.92	0.30	0.07	1.53	10.94	1.69	4.82	30.58	3.85	6.76	33.72	2.81
麻黄根 <i>E. sinica</i> root	1	2.51	0.36	0.07	0.66	18.15	0.82	4.87	29.63	5.73	10.42	26.36	1.97
	2	2.59	0.36	0.07	0.83	19.86	0.75	4.66	30.33	5.70	8.55	25.90	1.83
	3	2.47	0.35	0.07	0.82	19.21	0.82	4.69	31.96	5.62	10.44	23.11	1.73
	4	2.63	0.42	0.09	1.17	20.54	0.85	4.94	28.03	5.84	10.17	24.98	1.44
	5	2.71	0.47	0.08	0.66	20.39	0.91	4.76	30.65	5.45	8.44	24.68	2.09
草麻黄 <i>E. sinica</i>	1	8.66	0.40	0.07	0.19	8.41	0.52	3.97	42.82	16.72	8.69	9.97	0.54
	2	8.32	0.43	0.07	0.18	8.30	0.47	3.87	44.85	15.35	8.39	10.05	0.62
	3	8.33	0.41	0.07	0.19	8.57	0.44	3.90	42.90	15.25	7.81	12.33	0.54
	4	10.06	0.42	0.06	0.18	8.23	0.40	3.93	40.53	16.29	10.09	10.55	0.62
	5	10.25	0.44	0.06	0.18	7.18	0.44	3.93	43.68	16.11	9.22	9.21	0.65
木贼麻黄 <i>E. equisetina</i>	1	8.98	0.36	0.04	0.39	14.89	0.48	5.61	37.03	5.92	11.62	15.16	0.84
	2	7.99	0.40	0.04	0.46	13.16	0.43	5.15	37.64	5.78	14.88	14.31	0.91
	3	8.38	0.34	0.04	0.40	14.56	0.45	3.95	36.67	6.02	14.61	14.99	0.78
	4	7.32	0.39	0.04	0.57	12.77	0.46	4.49	37.65	6.23	15.80	14.35	0.91
	5	7.28	0.38	0.04	0.69	12.11	0.41	4.36	38.92	5.50	16.35	14.15	0.99

注:1. 甘露糖;2. 氨基葡萄糖;3. 氨基甘露糖;4. 核糖;5. 鼠李糖;6. 氨基半乳糖;7. 葡萄糖醛酸;8. 半乳糖醛酸;9. 葡萄糖;10. 半乳糖;11. 阿拉伯糖;12. 海藻糖。

Note:1. Man;2. GlcN;3. ManN;4. Rib;5. Rha;6. GalN;7. GlcUA;8. GalUA;9. Glc;10. Gal;11. Ara;12. Fuc.

水解产物甘露糖(1)、氨基葡萄糖(2)、半乳糖醛酸(8)和葡萄糖(9)位于第一象限,且距离原点均较远,并结合含量测定结果,确定其在区分草麻黄多糖与麻黄根、中麻黄和木贼麻黄多糖中起到了重要作用;同理,完全酸水解成分半乳糖(10)在区分木贼麻黄多糖与其他三种多糖中起到了重要作用。

麻黄和麻黄根虽同出一物,但二者中医传统功效完全不同,麻黄和麻黄根中多糖类成分差异是否能够一定程度上解释其功效的差异,因此,进一步开展了基于完全酸水解的麻黄多糖与麻黄根多糖的主成分分析。图4A为采用EZ info软件建立的草麻黄多糖与草麻黄根多糖的主成分分析二维得分图,可

见草麻黄多糖和草麻黄根多糖二者完全区分,与图3A主成分分析结果相似,也进一步印证了图3A分析结果。图4B为利用草麻黄多糖与草麻黄根多糖主成分分析方法所建立的载荷图,通过载荷图更能直观地发现完全酸水解检测到的12个单糖成分,在区分草麻黄多糖与草麻黄根多糖中均起到了非常重要的作用。具体来讲,甘露糖(1)、氨基葡萄糖(2)、半乳糖醛酸(8)和葡萄糖(9)等四个成分为草麻黄根多糖中的特征性成分,氨基甘露糖(3)、核糖(4)、鼠李糖(5)、氨基半乳糖(6)、葡萄糖醛酸(7)、半乳糖(10)、阿拉伯糖(11)和海藻糖(12)等八个成分为草麻黄多糖中的特征性成分,这个结果进一步印证

了图 3B 的结果。

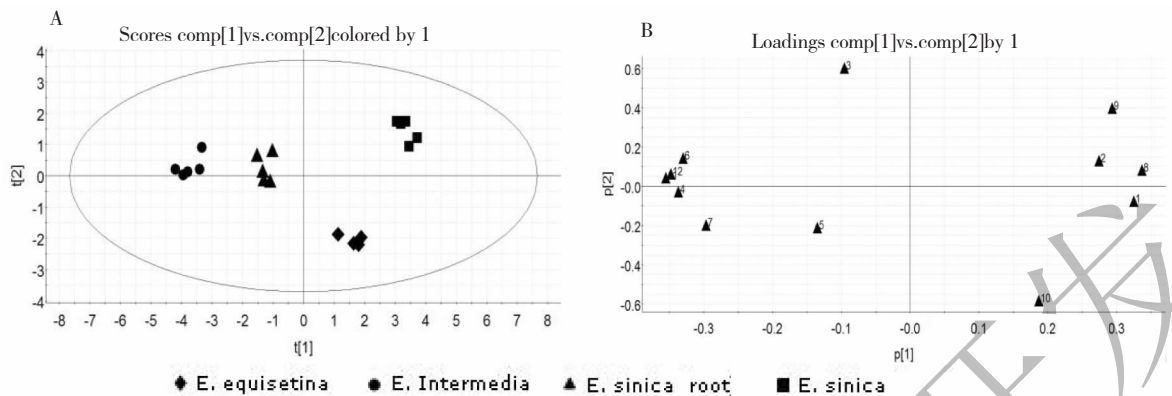


图 3 通过 EZ info 软件分析 20 批麻黄多糖完全酸水解的样品

Fig. 3 Pattern recognition analyses of 20 polysaccharides complete acid hydrolysis samples from mahuang by EZ info soft

注: A, 主成分分析二维得分图; B, 主成分分析建立的因子载荷图。

Note: A, Scores plot from PCA; B, Loading plot from PCA.

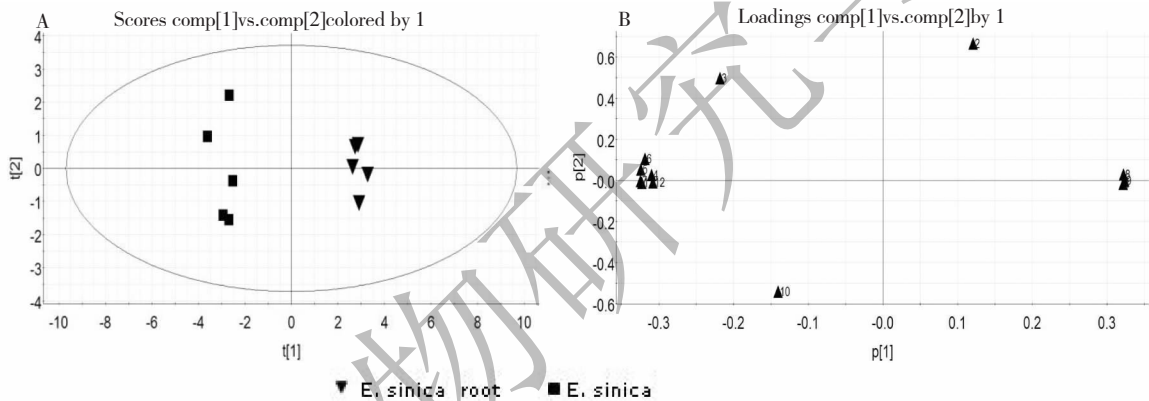


图 4 通过 EZ info 软件分析 10 批草麻黄(根和茎)多糖完全酸水解的样品

Fig. 4 Pattern recognition analyses of 10 polysaccharides complete acid hydrolysis samples from mahuang by EZ info soft

注: A, 主成分分析二维得分图; B, 主成分分析建立的因子载荷图。

Note: A, Scores plot from PCA; B, Loading plot from PCA.

3 讨论

由于糖类化合物极性较强,且没有发光基团,使得糖类化合物的分析尤为困难,而柱前衍生化可以使糖类物质带上紫外或荧光基团,提高碳水化合物的疏水性,衍生化后的衍生产物带电荷,且结构稳定不易分解,分析时其他杂质干扰小,更容易被质谱检测器检测到^[11],故本研究采用质谱作为检测器。与课题组早期研究比较^[12],采用完全酸水解降解方法,通过 PMP 柱前衍生超高效液相紫外检测(UPLC-UV)方法,草麻黄多糖中微量的氨基葡萄糖、氨基甘露糖、氨基半乳糖和海藻糖难以检出^[12],因此本研究采用 UPLC-MS/MS 检测技术,有利于更好的

诠释几种法定基源麻黄多糖的组成糖特征。

本研究采用 UPLC-MS/MS 技术分析草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖的完全酸水解所致单糖(甘露糖、氨基葡萄糖、氨基甘露糖、核糖、鼠李糖、氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和海藻糖)组成,考察其组成糖种类和含量变化,具体组成糖种类和含量见表 2,运用主成分分析多元统计分析方法,对源自几种法定基源草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根的二十批麻黄属中药多糖实现了区分和辨别,对进一步研究不同种属特征的麻黄多糖具有重要意义。采用酶法降解麻黄属多糖,虽能获得某些特异性水解片段^[10],但降解产物有时难于表征和定量,且多糖水解酶价格

昂贵和制备困难,因此采用完全酸水解降解方法,利用 UPLC-MS/MS 技术结合多元统计学方法分析可作为一种选择性的麻黄多糖辨别方法。该方法通过多糖完全酸水解降解方法,基于几种法定基源麻黄多糖单糖组成变化规律实现了草麻黄、中麻黄、木贼麻黄和麻黄根多糖鉴别研究,该方法稳定可行,且重现性好,可为麻黄属多糖的质量评价提供新的依据。

参考文献

- 1 Yan SH(严士海),Zhu XX(朱萱萱),Men DL(孟达理),*et al.* Effects of *ephedran* on lymphocyte subgroups of EAT mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊),2008, 26:1069-1071.
- 2 Men DL(孟达理),Yan SH(严士海),Xu ZY(许芝银). Effect of *ephedran* on erythrocytolysin for mation of mouse caused by sheep erythrocyte [J]. *J Jiangsu Univ; Med Edit* (江苏大学学报:医学版),2007,17:379-380.
- 3 Sun YP(孙延平). Studies on pharmacological effects of allergic asthma immunosuppressive polysaccharide from herba *ephedrae* [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine(黑龙江中医药大学),2011.
- 4 Mu GR(穆光锐). Studies on pharmacological effects of anti-rheumatoid arthritis immunosuppressive polysaccharide from herba *ephedrae* [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine(黑龙江中医药大学),2012.
- 5 Mei DX(梅冬雪). Studies on Pharmacological effects of chronic nephritis immunosuppressive polysaccharide from herba *ephedrae* [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine(黑龙江中医药大学),2011.
- 6 Wang YH(王艳红),Wang QH(王秋红),Xia YG(夏永刚),*et al.* Pharmacological evaluation on nature and flavor of the chemical subdivision of *Ephedrae Herba* [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2011,33:2044-2047.
- 7 Xia YG,Wang QH,Liang J,*et al.* Development and application of a rapid and efficient CZE method coupled with correction factors for determination of monosaccharide composition of acidic heteropolysaccharides from *Ephedra sinica* [J]. *Phytochemical Analysis*,2015,22:103-111.
- 8 Liang J(梁军),Xia YG(夏永刚),Yang BY(杨炳友),*et al.* Analysis of monosaccharide compositions of ESP-B1 from *Ephedrae Herba* by HPLC pre-column derivatization [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2011,42:1985-1988.
- 9 Liang J(梁军),Sun LM(孙黎明),Xia YG(夏永刚),*et al.* Analysis of monosaccharide compositions of *Ephedrae radix et rhizoma polysaccharide* based on UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Med Form*(中国实验方剂学杂志),2017,23:73-78.
- 10 Xia YG, Wang TL, Sun LM, *et al.* A new UPLC-MS/MS method for the characterization and discrimination of polysaccharides from genus *Ephedra* based on enzymatic digestions [J]. *Molecules*,2017,22:1-12.
- 11 Zhao D(赵丹),Feng F(冯峰),Su YZ(粟有志),*et al.* Determination of monosaccharide in *Spirulina polysaccharide* by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chrom*(色谱),2017,35:413-420.
- 12 Kuang HX, Xia YG, Liang J, *et al.* Fast classification and compositional analysis of polysaccharides from TCMS by ultra-performance liquid chromatography coupled with multivariate analysis [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84: 1258-1266.