

不同炮制工艺熟地黄多糖单糖分析及其对卵巢颗粒细胞的影响

林好, 桂蜀华, 于兵兵, 阙晓慧, 朱嘉琪
(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 研究九蒸九晒、九蒸九烘、现代法炮制熟地黄及生地黄多糖的单糖组成、及其对大鼠卵巢颗粒细胞增殖活性的影响。方法 通过水提醇沉、活性炭除色素、TCA法脱蛋白、无水乙醚和丙酮除小分子化合物后获取多糖, 采用苯酚-硫酸法测定总多糖含量; 用4 mol/L三氟乙酸水解多糖, 加盐酸羟胺进行衍生化反应, 采用气相色谱法对其单糖组成进行分析, MTT法检测各组分多糖作用于大鼠卵巢颗粒细胞24 h的增殖情况。结果 九蒸九晒熟地黄的多糖含量最多, 达1.625%, 九蒸九烘熟地黄多糖含量最少, 只占0.949%; 4种炮制工艺地黄多糖中均含有阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖及半乳糖醛酸, 除生地黄多糖外其余熟地黄多糖还含有鼠李糖; 不同质量浓度多糖溶液对卵巢颗粒细胞均有一定的促进作用, 质量浓度150 μg/mL时对卵巢颗粒细胞增殖效果最显著。结论 该方法简便、准确、快速, 可用于熟地黄的质量控制, 对卵巢颗粒细胞有增殖效果。

关键词: 地黄; 中药炮制; 多糖; 卵巢颗粒细胞; 气相色谱法; 苯酚-硫酸法

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)12-2958-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.12.026

Analysis of polysaccharides and monosaccharides from *Rehmannia glutinosa* by different processing technology and effects on ovarian granulosa cells

LIN Hao, GUI Shu-hua, YU Bing-bing, QUE Xiao-hui, ZHU Jia-qi

(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

KEY WORDS: *Rehmannia glutinosa* Libosch.; traditional Chinese medicine processing; polysaccharides; ovary granulosa cell; gas chromatography; phenol sulfuric acid procedure

中药地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根^[1], 始载于秦汉时期的《神农本草经》, 被列为草部之上品, 有深远悠久的历史, 与菊花、牛膝、山药一起并称为“四大怀药”, 历代本草均有记载, 为常用滋补类中药之一, 据统计它的使用频率在中药处方中排名处于前10位。

中药必须经过炮制之后才能入药, 这是中医用药的特点之一。而中药炮制是根据中医药理论, 依照辨证施治用药的需要和药物自身性质, 以及调剂、制剂的不同要求所采取的制药技术和方法^[2-4]。而本研究所用九蒸九晒熟地黄为隔水清蒸6 h, 次日早上10点晒至下午5点为1次性蒸晒, 反复8次达到九蒸九晒。现代法炮制熟地黄参照

《广东省中药炮制规范2005版》, 取生地黄, 洗净, 润软, 蒸12 h, 停火取出, 烘置八成干, 切厚片, 晾干。另外, 本研究结合古法和现代法炮制, 首次提出九蒸九烘熟地黄, 取生地隔水清蒸6 h, 放置60℃烘箱烘4 h作为1次蒸烘, 如此反复8次达到九蒸九烘熟地黄^[5-6]。

多糖是生命四大基础物质之一, 是植物体内许多新陈代谢活动的必须物质, 兼具有多方面的药理活性和丰富的生物学功能, 是中药主要药效成分之一^[7-8]。而多糖中的单糖组成分析是其一级结构研究的重要内容, 是研究多糖的基础。目前, 关于熟地黄多糖的研究更多集中在活性筛选上, 而对其结构组成和含量分析研究较少^[9-10], 相关报道主要以红外光谱和薄层色谱分析熟地黄多糖的单糖组成

收稿日期: 2018-12-04

基金项目: 广东省自然科学基金 (S2012010010131)

作者简介: 林好 (1992—), 男, 硕士生, 从事中药复方新药开发与研究。Tel: 18312425739, E-mail: 1721716631@qq.com

* 通信作者: 桂蜀华 (1972—), 女, 博士, 副教授, 从事中药复方新药开发与研究。Tel: 18666928681, E-mail: gjl615@gzucm.edu.cn

及其结构, 而本实验采用苯酚-硫酸法和气相色谱法分析熟地黄总多糖含有量和单糖组成, 及其对细胞生物活性的影响, 此种分析方法更成熟, 结果更准确可靠, 并且通过峰面积可对熟地黄多糖的单糖进行含有量计算, 这对保证中药多糖的安全有效十分关键, 也可为熟地黄多糖质量研究提供新思路。

1 材料

1.1 仪器 安捷伦 6890N 气相色谱仪, 配备 HP-5 毛细管柱 (25 m×0.32 mm, 0.25 μm, 美国安捷伦公司); AEG-220 型电子分析天平 (日本岛津有限公司); RE-2000 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); T6 型新世纪紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); KQ-500 超声清洗仪 (精宏实验设备有限公司); Dragon-lab 移液枪 (北京大龙兴创实验仪器有限公司); 数显恒温水浴锅 (金坛市金成国胜试验仪器厂); Multiskan MK3 酶标仪 (芬兰 Thermo 公司); 3K20-高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); NU-8500 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司)。

1.2 试剂 葡萄糖对照品 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 含有量为 99%); 鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、半乳糖醛酸、果糖对照品 (上海源聚生物科技有限公司, 含有量 99%); 盐酸羟胺、肌醇、吡啶、醋酸酐 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 无水乙醇、甲醇 (天津市大茂化学试剂厂, 含有量 >99.9%); 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。DMEM/F12 培养基 (美国 Hy Clone 公司); 胎牛血清 (FBS)、青霉素、链霉素 (美国 Gibco 公司); 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 购于上海联硕生物科技有限公司。

1.3 药材 生地黄购于河南省焦作市武陟县地黄种植户, 经广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室吴文如副教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根。

2 方法

2.1 葡萄糖标准曲线绘制 精确称量干燥至恒定质量的葡萄糖对照品 21.20 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加超纯水溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 然后分别精密量取对照品溶液 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 至具塞试管中, 加水补至 2.0 mL, 各加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 6 mL, 摇匀, 用紫外-可见分光光度计在 487 nm 波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标 (Y), 葡萄

糖浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线。

2.2 响应面设计优化熟地黄多糖提取工艺 熟地黄多糖的提取采用水提醇沉法, 经 4% 活性炭除色素、三氯乙酸 (TCA) 法脱蛋白、丙酮、乙醚、无水乙醇清洗 3 遍除去小分子物质, 离心去上清烘干即得熟地黄多糖, 依据多糖提取的液料比、提取温度、提取时间 3 个变量作单因素考察, 以多糖提取量为指标, 综合单因素结果作三因子三水平的响应面设计优化多糖提取条件。其中, 液料比选取 1:10、1:20、1:30, 提取时间选择 80、100、120 min, 提取温度选择 60、70、80 °C, 通过 Design-Expert. V8.0.6 软件将数据模拟、比对、建模后选择试验最佳数学模型 (采用二次不含交叉项的响应面法)。

2.3 不同炮制工艺熟地黄多糖含有量测定 精确称量相同质量的不同炮制工艺熟地黄多糖于 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 然后各吸取 0.5 mL 至具塞试管中, 加水补至 2.0 mL, 再分别加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速加入 6 mL 浓硫酸, 放置于 40 °C 水浴锅中水浴 15 min, 以相应试剂为空白对照, 用紫外-可见分光光度计在 487 nm 处测定吸光度值。

2.4 供试品溶液衍生化条件 精确称取 4 种炮制工艺熟地黄多糖 20.00 mg 于 15 mL 离心管中, 加 3.0 mL 4 mol/L 三氟乙酸后封管, 置于 110 °C 烘箱水解 6 h, 然后旋转蒸发除去三氟乙酸, 再加适量甲醇除去残留的三氟乙酸, 反复操作 3 次; 加入 10 mg 盐酸羟胺、10 mg 肌醇、3.0 mL 吡啶于 90 °C 水浴锅反应 30 min, 取出, 加入 1 mL 醋酸酐溶液, 90 °C 保温 30 min, 将反应液过 0.22 微孔滤膜后进气相系统。

2.5 气相色谱条件 HP-5 毛细管柱 (25 m×0.32 mm×0.25 μm); 升温程序, 120 °C 保持 3 min, 以 3 °C/min 升温至 180 °C, 再以 2 °C/min 升温至 210 °C, 保持 4 min; 气体体积流量 1.0 mL/min; 进样口温度 250 °C; 检测器温度 280 °C; 柱温 210 °C; 空气、氮气及氢气体积流量分别为 400、25、30 mL/min; 分流比 1:20; 进样量 1.0 μL。

2.6 大鼠卵巢颗粒细胞的分离与培养 取 3 周龄雌性 SD 大鼠, 皮下注射 PMSG50 IU 每只, 48 h 后取材。颈椎脱臼法处死大鼠, 剖开腹腔肉眼可见双侧卵巢表面大量发育的卵泡, 无菌条件下迅速取出双侧卵巢, 除去表面脂肪和被膜, 放入事先准备好

的PBS液中清洗3次,在体式显微镜下用1 mL注射器针头扎破卵泡,释放出颗粒细胞。加入4 mL 2.5%胰酶反复用吸管吹打悬液数次,使颗粒细胞团块分离,加入3 mL含血清培养液(F12)终止胰酶消化,并静置3 min,200目不锈钢细胞筛过滤,1 500 r/min离心5 min,洗涤滤液,弃上清收集细胞,台盼蓝染色计算细胞的存活率。将细胞植入96孔培养板中,每孔含细胞 1.5×10^5 个,于37 ℃、5% CO₂培养箱中预培养24 h。

2.7 原代大鼠卵巢颗粒细胞存活率 配制0.4%台盼蓝染液,再取适当密度的细胞悬液0.5 mL加入离心管,加入0.5 mL 0.4%台盼蓝染液,混匀,染色2~3 min,吸取少许悬液涂于载玻片上,加上盖片于镜下观察细胞并计数,计算细胞活力。细胞存活率 = [(细胞总数 - 死细胞数) / 细胞总数] × 100%。

2.8 细胞生长曲线制作 取原代大鼠卵巢颗粒细胞混合均匀后接种于96孔板,每孔200 μL,设5个复孔,当细胞贴壁后每隔2 d换1次培养液,空白对照为不加细胞的培养液,此后每隔24 h加20 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2-后置于37 ℃、5% CO₂培养箱孵育4 h,加150 μL二甲基亚砷溶解紫色结晶甲贖,于570 nm测定其吸光度值。

2.9 熟地黄多糖给药细胞方法 精密称量4种地黄多糖20.00 mg于15 mL离心管中,在超净工作台用含5%血清不含双抗的培养液溶解并稀释至10 mL,封口后40 ℃超声5 min作为给药卵巢颗粒细胞的母液;紫外消毒30 min后过0.22 μm微孔滤膜除菌和杂质,再分别配成质量浓度为25、50、75、100、150、200、250、300、400 μg/mL的梯度多糖溶液。大鼠卵巢颗粒细胞贴壁生长后的第6天开始给药,每孔200 μL,取5个复孔,同时设立空白对照孔,给药24 h后进行MTT试验。

2.10 数据统计学分析 全部数据采用SPSS 20.0统计软件进行分析,运用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 线性关系考察 采用苯酚-硫酸法测定葡萄糖线性关系,苯酚用量为1 mL,浓硫酸用量6 mL,回归方程为 $Y = 13.053X + 0.0233$ ($R^2 = 0.9960$),此方法紫外吸收稳定,葡萄糖在0.03 ~ 0.09 mg/mL范围内线性关系良好。

3.2 多糖提取 根据单因素实验结果,选取影响熟地黄多糖提取效果各因素中有意义的水平,通过

Design-Expert V8.0.6软件做响应面设计,结果见图1,其中液料比1:22.13,提取温度71.16 ℃,提取时间105.75 min;且液料比和提取温度的交互作用较显著,根据等高线可以直观地反映出各因素之间的交互作用,2个因素之间的交互作用越显著则图形越接近椭圆形,反之,则越接近圆形,此方法下多糖提取量可达0.470 1 g。

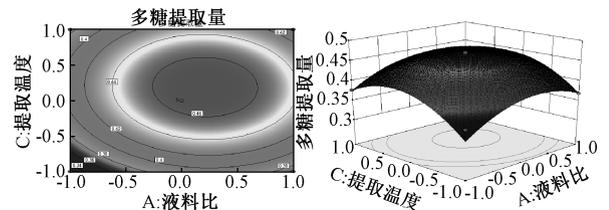


图1 各因素响应面

Fig. 1 Response surface plots for various factors

3.3 多糖含有量比较 采用经典苯酚-硫酸法测定四种炮制工艺地黄的总多糖含有量,结果见图2,其中九蒸九晒炮制地黄总多糖含有量最多,占总药材(20.00 g提取)含有量的1.625%。

3.4 方法学考察

3.4.1 精密度试验 精密吸取对照品和供试品溶液,在“2.5”项色谱条件下连续进样6次,每次进样1 μL,分别测得其中葡萄糖、半乳糖的保留时间和峰面积RSD均小于0.5%,表明该仪器精密度良好。

3.4.2 稳定性试验 精密吸取对照品和供试品溶液,在“2.5”项色谱条件下,每隔0、2、4、6、8、10、12 h进样1次,每次进样1 μL,分别测得葡萄糖、半乳糖的保留时间和峰面积RSD均小于1.0%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

3.4.3 重复性试验 准确称取对照品和供试品6份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,在“2.5”项色谱条件下进样,每次进样1 μL,测得葡萄糖、半乳糖的保留时间和峰面RSD值均小于2.0%,表明该方法重复性良好。

3.4.4 加样回收率试验 取9份已知葡萄糖、半乳糖含有量的九蒸九晒熟地黄5.00 g,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,加入等量的对照品混合均匀,过0.22 μm微孔滤膜备用,在“2.5”项色谱条件下进样,每次进样1 μL,测得葡萄糖、半乳糖的保留时间和峰面积,测得平均加样回收率96%~104%,RSD均小于4%。

3.5 多糖中的单糖组成分析

3.5.1 混标和各单糖标准曲线绘制 在“2.5”

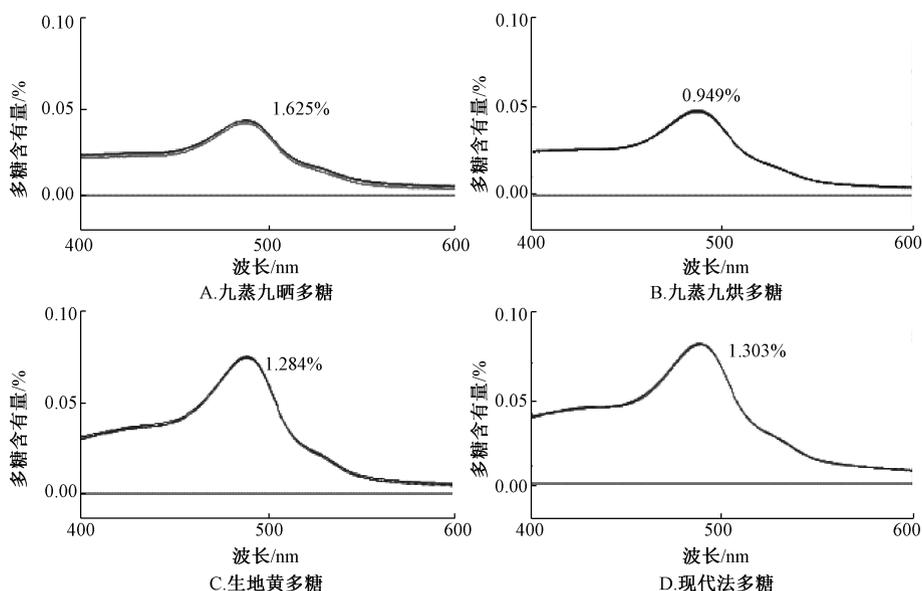
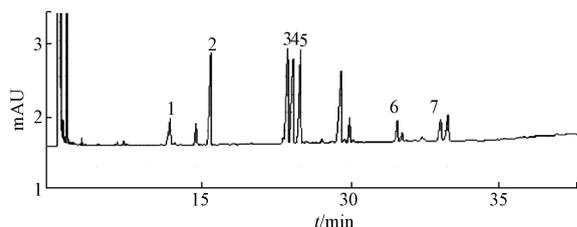


图2 各样品多糖含量分析

Fig. 2 Content analysis of total polysaccharides in various samples

项色谱条件下, 各色谱峰分离度较好, 理论塔板数均大于5 000, 混合单糖对照品出峰顺序依次为鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、半乳糖醛酸, 且在一定浓度上各单糖标准曲线均呈线性关系, 结果见图3、表1。



1. 鼠李糖 2. 阿拉伯糖 3. 甘露糖 4. 葡萄糖 5. 半乳糖
6. 果糖 7. 半乳糖醛酸
1. rhamnose 2. arabinose 3. mannose 4. glucose 5. galactose
6. fructose 7. galacturonic acid

图3 各成分气相色谱图

Fig. 3 Gas chromatograms of various constituents

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R ²	线性范围/ (mg·mL ⁻¹)
鼠李糖	Y=225 876.17X+27 210.69	0.998 5	0.050 0~0.250 0
阿拉伯糖	Y=239 528.61X-18 913.55	0.998 7	0.012 5~0.125 0
甘露糖	Y=291 277.42X+30 144.27	0.997 9	0.025 0~0.125 0
葡萄糖	Y=264 746.82X+6 188.34	0.999 5	0.050 0~0.500 0
半乳糖	Y=257 988.86X+28 506.56	0.999 1	0.100 0~1.000 0
半乳糖醛酸	Y=214 593.37X+9 473.62	0.998 9	0.010 0~0.100 0

3.5.2 单糖组成分析 4种炮制工艺地黄多糖的单糖分析见图4, 均含有阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 另外, 除地黄多糖外, 其余多糖的单糖组成还包括鼠李糖, 根据气相色谱面积归一化法及内参因子肌醇的峰面积对各单糖组分进行分析, 4种地黄的单糖摩尔比见表2。

3.6 细胞存活率 在倒置显微镜下观察细胞总数为83个, 被染色细胞6个, 根据公式为细胞存活

表2 各单糖摩尔比

Tab. 2 Molar ratio of various monosaccharides

单糖	摩尔比
九晒单糖	Rha : Ara : Man : Glc : Gal : GalA=0.62 : 0.41 : 0.72 : 1.00 : 3.83 : 0.61
九烘单糖	Rha : Ara : Man : Glc : Gal : GalA=0.42 : 0.26 : 0.46 : 1.00 : 3.96 : 0.83
现代法单糖	Rha : Ara : Man : Glc : Gal : GalA=0.10 : 0.27 : 0.20 : 1.00 : 2.80 : 0.48
生地黄单糖	Ara : Man : Glc : Gal : GalA=0.065 : 0.095 : 1.00 : 1.96 : 0.36

率=[(细胞总数-死细胞数)/细胞总数]×100%, 即细胞存活率=(77/83)×100%=95.18%。

3.7 细胞生长曲线 原代细胞贴壁生长后每隔

24 h加20 μL MTT于37℃、5% CO₂培养箱孵育4 h, 然后加150 μL DMSO溶解紫色结晶于570 nm测定其吸光度值, 以此观察细胞数量的变化, 见图5,

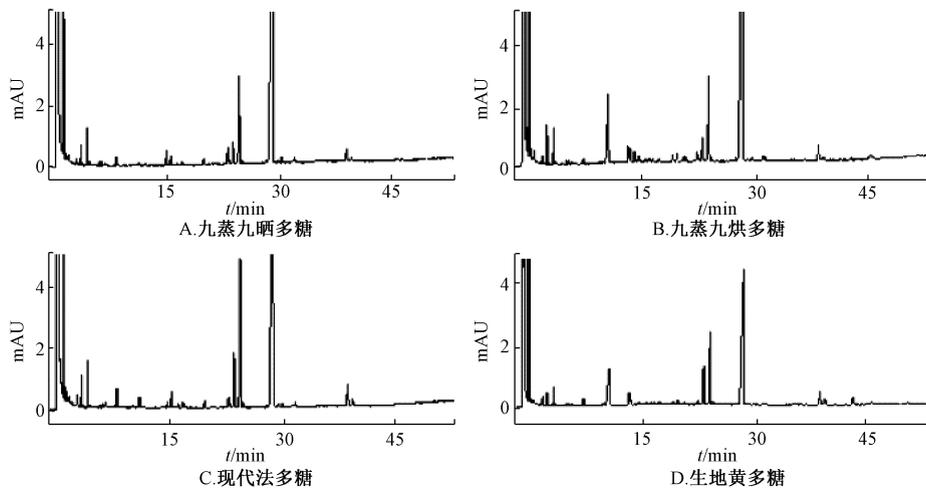


图4 多糖的单糖组成分析

Fig. 4 Monosaccharide composition analysis of polysaccharides

在细胞生长第6天时其吸光度值最大。

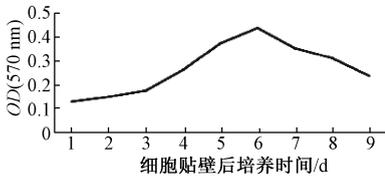
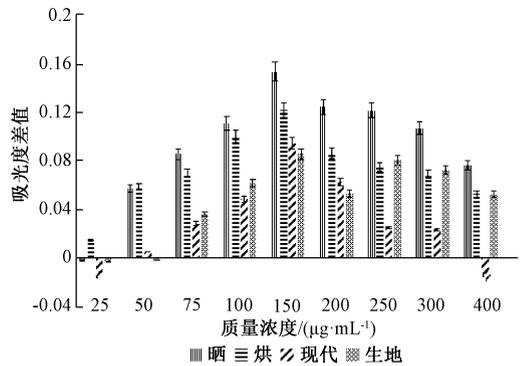


图5 细胞生长曲线

Fig. 5 Cell growth curve

3.8 不同炮制工艺熟地黄多糖给药细胞 各组分多糖分别配成质量浓度为25、50、75、100、150、200、250、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的梯度多糖溶液。大鼠卵巢颗粒细胞贴壁生长后的第6天开始给药，每孔200 μL ，给药24 h后进行MTT试验，结果见图6、表3，从图表中可知不同炮制工艺熟地黄多糖给药大鼠卵巢颗粒细胞后对其增殖效果为九蒸九晒熟地黄多糖>九蒸九烘熟地黄多糖>现代法熟地黄多糖>生

地黄多糖。



注：不同梯度浓度条形图从左至右依次为九蒸九晒熟地黄多糖、九蒸九烘熟地黄多糖、现代法熟地黄多糖、生地黄多糖

图6 各多糖给药卵巢颗粒细胞后与对照组比较

Fig. 6 Comparison of ovarian granulosa cells after administering various polysaccharides with the control group

表3 各多糖对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响

Tab. 3 Effects of various polysaccharides on the proliferation of ovarian granulosa cells in rats

质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	九晒多糖	九烘多糖	现代法多糖	生地黄多糖
对照	0.704±0.053	0.695±0.052	0.757±0.012	0.733±0.028
25	0.697±0.015	0.694±0.142	0.734±0.011	0.731±0.031
50	0.775±0.051	0.774±0.053	0.762±0.017	0.749±0.024
75	0.789±0.038	0.786±0.017	0.783±0.026	0.768±0.029
100	0.812±0.015*	0.804±0.014*	0.812±0.004*	0.813±0.009*
150	0.853±0.037*#	0.816±0.027*	0.834±0.022*	0.828±0.028*
200	0.824±0.039*#	0.784±0.044*	0.813±0.271*	0.798±0.008*
250	0.819±0.029*	0.744±0.009	0.782±0.024	0.842±0.031*
300	0.794±0.024*	0.742±0.025	0.793±0.009	0.820±0.009*
400	0.764±0.038	0.731±0.014	0.741±0.032	0.801±0.019

注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与现代法多糖比较，# $P<0.05$

4 讨论

中药材熟地黄是滋阴补肾的要药，现代药理研究表明，熟地黄还具有抗肿瘤、抗氧化、促进造血、提高记忆力等作用^[11-12]。当生地黄经过不同的炮制加工后，其化学成分、性味、药理作用均发生不同程度的改变，其性味由苦、凉转甘温，其功效也由清转补。本研究获悉地黄经过不同方法炮制后，其多糖含有量为九蒸九晒熟地黄>现代法炮制熟地黄>生地黄>九蒸九烘熟地黄，这可能与炮制前后部分多糖水解为小分子糖类和环烯醚萜类化合物降解生成糖类物质有关；而不同炮制工艺地黄多糖的单糖组成也不尽相同，其中九蒸九晒熟地黄多糖中各种单糖的成分较均衡，6种单糖的摩尔比为 Rha : Ara : Man : Glc : Gal : GalA = 0.62 : 0.41 : 0.72 : 1.00 : 3.83 : 0.61。

中医认为，肾藏精，主生殖，卵子的发育与肾关系密切，临床多用补肾中药以促进女性卵巢内激素的分泌，刺激其卵泡生长发育及排出，而卵巢颗粒细胞的生长分化恰恰是原始卵泡启动、生长的关键，是卵泡发育的标志^[13]。本研究通过 MTT 法检测结果显示，卵巢颗粒细胞在不同组分熟地黄多糖作用下增殖效果各不相同，呈一定的量效关系，当质量浓度为 150 μg/mL 时其增殖效果最显著，且九蒸九晒熟地多糖>九蒸九烘熟地多糖>现代法熟地多糖>生地黄多糖，在质量浓度为 100、150、200 μg/mL 与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；当质量浓度为 150、200 μg/mL 时九蒸九晒熟地多糖与现代法熟地多糖给药卵巢颗粒细胞后组间有显著性差异 ($P < 0.05$)，这可能与多糖分子量大小不同有关，因不同分子量多糖进入机体内消化代谢均不同，分子量较大的多糖难以吸收，这也从侧面反映九蒸九晒熟地黄具有较好的物质药效基础，而现代法熟地多糖作用于卵巢颗粒细胞虽具有一定的增殖效果，但随着给药剂量的增大反而抑制细胞生长，这可能是现代法炮制熟地黄多采用一次性蒸制，烘箱干燥，普遍存在蒸不透、容易腻胃等缺陷。后续研究将采用血清药理学给药大鼠卵巢颗粒细胞，并通过高效凝胶过滤色谱法测定不同炮制工艺熟地黄的多糖分子量。综上所述，本实验针对熟地滋阴补肾传统功效展开研究，结合炮制化

学、药理学的分析，这将为熟地黄多糖的进一步开发与探索提供参考，同时这也可作为药材炮制过程中的质量控制手段^[14]，此外，通过分析比较不同炮制工艺熟地黄的化学成分和含有量差别，以期为不同炮制工艺熟地黄的药效差异提供理论指导。

参考文献：

- [1] 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，2015：125-126.
- [2] 颜迁州. 中药炮制方法对临床应用疗效的影响探讨[J]. 医药卫生(全文版)，2017，9(1)：114-115.
- [3] 孟陶. 中药炮制对中药饮片疗效的影响分析[J]. 海峡药学，2016，28(9)：176-177.
- [4] 周瑞，郜玉钢，臧埔，等. 炮制对中药活性成分及功效的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21(3)：209-212.
- [5] 蔡瑞利，刘高胜，龚千锋，等. 地黄炮制的历史沿革及现代研究[J]. 江西中医学院学报，2006，18(3)：40-41.
- [6] 柳祚勤，桂蜀华，夏荃，等. 不同炮制加工的熟地黄对雌性大鼠排卵功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(13)：6-11.
- [7] Li S P, Wu D T, Lv G P, et al. Carbohydrates analysis in herbal glycomics [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2013, 52(5)：155-169.
- [8] Liao S F, Liang C H, Ho M Y, et al. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated globo H-series epitopes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(34)：13809-13814.
- [9] 吴诗云，钟益宁，张焱，等. 熟地黄多糖含量测定方法研究[J]. 安徽农业科学，2016，44(35)：154-156；161.
- [10] 陈传福. 熟地黄多糖提取纯化工艺研究及其结构组成的初探[D]. 泰安：山东农业大学，2008.
- [11] Zhang X, Zhang A, Jiang B, et al. Further pharmacological evidence of the neuroprotective effect of catalpol from *Rehmannia glutinosa* [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(20)：484-490.
- [12] Huang Y, Wu C, Liu Z, et al. Optimization on preparation conditions of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide liposome and its immunological activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 104：118-126.
- [13] Schmitz C R, Souza C A, Genro V K, et al. LH (Trp8Arg/Ile15Thr), LHR (ins LQ) and FSHR (Asn680Ser) polymorphisms genotypic prevalence in women with endometriosis and infertility [J]. *Assist Reprod Genet*, 2015, 32(6)：991-997.
- [14] 雷敬卫，白雁，樊克锋. NIR 和 HPLC 指纹图谱在熟地黄饮片质量稳定检测中的对比研究[J]. 中国中药杂志，2008，33(18)：2052-2055.