

酯 m/z 207 $[M+H]^+$ 、 m/z 229 $[M+Na]^+$ 峰; $t_R=18.1$ min 的色谱峰表现为 m/z 191 $[M+H]^+$ 、 m/z 213 $[M+Na]^+$ 及 m/z 229 $[M+K]^+$ 峰, 推测为泽
表 1 10 批密花石斛的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of 10 batches of *D. densiflorum* crude drugs

批号	峰 号								
	1	2(s)	3	4	5	6	7	8	9
1	0.678	1.000	1.076	1.690	1.749	1.997	2.026	2.089	2.442
2	0.681	1.000	1.076	1.694	1.753	1.998	2.027	2.091	2.443
3	0.682	1.000	1.076	1.695	1.754	1.997	2.026	2.090	2.441
4	0.683	1.000	1.076	1.696	1.755	1.998	2.027	2.090	2.443
5	0.683	1.000	1.076	1.698	1.758	1.999	2.028	2.091	2.444
6	0.684	1.000	1.076	1.698	1.758	1.997	2.027	2.090	2.443
7	0.684	1.000	1.076	1.699	1.757	1.997	2.025	2.089	2.441
8	0.685	1.000	1.076	1.700	1.759	1.998	2.027	2.091	2.443
9	0.685	1.000	1.076	1.701	1.759	1.997	2.026	2.090	2.441
10	0.686	1.000	1.076	1.701	1.760	1.998	2.026	2.091	2.442
均值	0.683	1.000	1.076	1.697	1.756	1.998	2.026	2.090	2.442

s 为参照物

s is reference substance

表 2 10 批密花石斛的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of 10 batches of *D. densiflorum* crude drugs

批号	峰 号								
	1	2(s)	3	4	5	6	7	8	9
1	0.165	1.00	0.469	0.058	0.567	0.179	0.079	0.083	0.155
2	0.150	1.000	0.468	0.046	0.563	0.189	0.045	0.091	0.154
3	0.159	1.000	0.552	0.067	0.669	0.152	0.091	0.089	0.162
4	0.163	1.000	0.458	0.059	0.597	0.173	0.075	0.094	0.146
5	0.135	1.000	0.474	0.059	0.653	0.180	0.084	0.091	0.158
6	0.152	1.000	0.467	0.061	0.569	0.198	0.095	0.091	0.153
7	0.155	1.000	0.537	0.075	0.568	0.186	0.075	0.097	0.160
8	0.159	1.000	0.395	0.038	0.463	0.193	0.058	0.068	0.126
9	0.163	1.000	0.467	0.061	0.569	0.179	0.075	0.089	0.149
10	0.158	1.000	0.473	0.049	0.634	0.156	0.049	0.090	0.179
均值	0.156	1.000	0.476	0.057	0.585	0.179	0.073	0.088	0.154

s 为参照物

s is reference substance

兰内酯。LC/MS 负离子检测图中, $t_R=21.3$ min 的色谱峰表现为 m/z 259 $[M-H]^-$ 峰, 推测为 *tristin*; $t_R=28.2$ min 的色谱峰表现为 m/z 331 $[M-H]^-$ 峰, 推测为鼓槌联苣; $t_R=38.6$ min 的色谱峰表现为 m/z 241 $[M-H]^-$ 峰, 推测为 2,5-二羟基-4-甲氧基苣; $t_R=39.5$ min 的色谱峰表现为 m/z 239 $[M-H]^-$ 峰, 推测为 *moscatin*; $t_R=41.9$ min 的色谱峰表现为 m/z 269 $[M-H]^-$ 峰, 推测为大黄素或芦荟大黄素。

质谱检测器可以提供更多化合物的信息, 是对紫外检测器的一种补充。本实验根据密花石斛及已知的石斛化学成分的报道, 利用质谱技术对其部分成分进行了初步定性, 可为密花石斛化学成分的进一步研究及质量控制提供参考。研究结果也说明, 密花石斛与同为石斛属的其他种石斛在化学成分上存在着共性, 将其作为药典收载正品石斛的代用品并无道理。

致谢: 中国药科大学中药学院徐珞珊教授帮助完成了密花石斛药材的 DNA 鉴定。

References:

- [1] Bao X S, Shun Q S, Chen L Z. The Medicinal Plants of *Dendrobium* (Shi-Hu) in China (中国药用石斛) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2001.
- [2] Technical Requirements of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard) (中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)) [S]. 2000.
- [3] Ma G X, Xu G J, Xu L S, et al. Studies on chemical constituents of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1994, 29(10): 763-766.
- [4] Bi Z M, Wang Z T, Zhang M, et al. Studies on chemical constituents of *Dendrobium fimbriatum* Hook. (蕙) [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(6): 421-422.
- [5] Fan C Q, Wang W, Qin G W, et al. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(8): 1255-1258.

液相色谱/蒸发光散射测定四物汤煎液中单糖和双糖的含量

梁乾德, 马百平, 王升启^X

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 建立液相色谱/蒸发光散射(HPLC-ELSD)测定四物汤煎液中 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖含量的方

X 收稿日期: 2003-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271617, 30070913); 军队“十五”重点项目(01Z019); 北京市“二四八”重大创新工程项目(H010210220113)

作者简介: 梁乾德(1971—), 男, 吉林省安图县人, 军事医学科学院助理研究员, 博士, 1994年毕业于北京中医药大学中药系, 2000年、2003年获得军事医学科学院药物分析学硕士、博士学位, 主要从事中药现代化基础研究。

Tel: (010) 66931423 E-mail: lqd@nic.bmi.ac.cn

* 通讯作者 Tel: (010) 66932211 Fax: (010) 66932211 E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

法。方法 对四物汤煎液进行稀释、醇沉等处理后采用 HPLC-ELSD 法分析。结果 1 mL 四物汤煎液中含 D-果糖 (33.4 ± 1.5) mg, D-葡萄糖 (24.2 ± 0.9) mg, 蔗糖 (112.7 ± 6.1) mg; D-果糖在 0.15~3.75 mg/mL, D-葡萄糖和蔗糖在 0.15~5 mg/mL, 具有良好的线性关系; 回收率为 D-果糖 128.5%, D-葡萄糖 114.7%, 蔗糖 124.7%; 日内 RSD 为 D-果糖 3.0%, D-葡萄糖 3.2%, 蔗糖 4.4%。结论 四物汤中含有丰富的单、双糖; HPLC-ELSD 可用于四物汤中单、双糖类物质的分析。

关键词: 四物汤; 糖; 含量测定; 液相色谱; 蒸发光散射检测器

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)04-0395-03

Determination of monosaccharide and disaccharide in condensed Siwu Decoction by HPLC-ELSD

LIANG Qian-de, MA Bai-ping, WANG Sheng-qi

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850, China)

Abstract: Object To establish a method by high performance liquid chromatography/evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) for the determination of contents of D-fructose, D-glucose, and sucrose in Siwu Decoction (SWD). Methods Condensed SWD was analyzed by HPLC-ELSD after dilution, precipitation by ethanol. Results Condensed SWD, 1 mL, contained (33.4 ± 1.5) mg of D-fructose, (24.2 ± 0.9) mg of D-glucose and (112.7 ± 6.1) mg of sucrose. The standard curves were linear within the range of 0.15—3.75 mg/mL for D-fructose and 0.15—5 mg/mL for D-glucose and sucrose. The recovery rates were 128.5% for D-fructose, 114.7% for D-glucose, and 124.7% for sucrose. The relative standard deviations (RSD) within-days were 3.0% for D-fructose, 3.2% for D-glucose, and 4.4% for sucrose. Conclusion SWD contains abundant monosaccharide and disaccharide. HPLC-ELSD can be used to analyse the monosaccharide and disaccharide in SWD.

Key words: Siwu Decoction (SWD); saccharide; determination; HPLC; ELSD

四物汤是补血常用方剂, 现代研究显示其具有促进机体造血功能的作用^[1]。四物汤中单、双糖类物质具有一定的促进血虚模型小鼠造血功能的作用, 并且这些单、双糖主要由 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖组成^[2]。为了深入研究四物汤的药效成分, 需要测定这 3 种糖在四物汤煎液中的含量。单、双糖类物质的含量测定通常采用高效液相色谱(HPLC)连接示差折光检测器(RID, refractive index detector)的方法, 但是该方法具有灵敏度较低、不能用于梯度洗脱等不足^[3]。蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)作为新一代通用型检测器, 具有灵敏度高、可进行梯度洗脱等优点。目前对中药水煎液中单、双糖含量测定的方法报道较少。本实验采用 HPLC-ELSD 建立了四物汤浓煎液中 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖的含量测定方法。

1 仪器与试药

高效液相色谱系统: Waters 2695(包括泵和自动进样器等, 美国), Alltech ELSD2000 蒸发光散射检测器(美国), 色谱工作软件为 Waters Empower Pro, Millipore 超纯水系统(美国)。

对照品 D-葡萄糖、蔗糖为分析纯, D-果糖为生化试剂, HPLC 流动相使用色谱纯乙腈和 Millipore 超纯水, 其他试剂均为分析纯。两批四物汤药材饮片

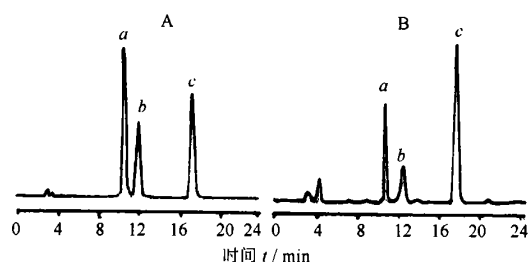
均购于北京同仁堂药店, 经军事医学科学院马百平副研究员鉴定分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch., 伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, 川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort., 毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根及根茎加工而成。

2 方法与结果

2.1 HPLC-ELSD 分析条件: 色谱柱为 Zorbax Carbohydrate 柱(250 mm×4.6 mm, 5 Lm), 保护柱为 Zorbax NH₂ 柱(12.5 mm×4.6 mm, 5 Lm), 流动相为乙腈-水(75:25), 流速为 1 mL/min, ELSD 检测器温度为 100 °C, 气流速度为 2.4 L/min。图谱见图 1。

2.2 四物汤煎液的制备: 取四物汤生药 200 g(其中熟地 73.2 g, 当归 48.8 g, 白芍 48.8 g, 川芎 29.3 g), 加 1 600 mL 水常温浸泡 1 h, 煎 30 min, 三层纱布滤出药液后, 再加 1 200 mL 水, 煎 20 min, 滤过后将两煎药液合并, 60 °C 浓缩至 200 mL, 得四物汤煎液。

2.3 供试品溶液的制备: 取四物汤煎液 1 mL, 加水稀释至 100 mL, 逐滴缓慢地加入乙醇 400 mL, 抽滤除去沉淀, 溶液浓缩至约 1 mL, 用 50% 乙醇溶液定容至 25 mL 量瓶, 经 0.45 Lm 微孔滤膜滤过后用于



a-D-果糖 b-D-葡萄糖 c-蔗糖
a-D-fructose b-D-glucose c-sucrose

图 1 混合对照品(A)和四物汤煎液(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and SWD (B)

分析。

2.4 标准曲线制备:精密称取 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖对照品各 500 mg(实际称量值为 D-果糖 488.6 mg、D-葡萄糖 482.1 mg 和蔗糖 471.7 mg),以 50% 乙醇溶液溶解定容于 50 mL 量瓶,得各糖浓度为 10 mg/mL 的对照品溶液。对此溶液进行稀释得到各糖浓度为 0.15, 1, 1.25, 2, 2.5, 3, 3.75, 5 mg/mL 的溶液(实际浓度按相应比例计算),D-果糖进样 0.15, 1, 2, 3, 3.75 mg/mL 对照品溶液各 10 μ L, D-葡萄糖和蔗糖进样 0.15, 1.25, 2.5, 3.75, 5 mg/mL 的对照品溶液各 10 μ L,以浓度和峰面积为横纵坐标绘制标准曲线。结果表明,D-果糖在 0.15~3.75 mg/mL, D-葡萄糖和蔗糖在 0.15~5 mg/mL,峰面积与浓度呈良好的线性关系,回归方程和相关系数分别为 D-果糖: $C = 1.5152 \times 10^{-7} A + 0.02274$, $r = 0.99996$; D-葡萄糖: $C = 1.6795 \times 10^{-7} A + 0.07226$, $r = 0.99987$; 蔗糖: $C = 1.4242 \times 10^{-7} A + 0.02299$, $r = 0.99984$ 。

2.5 回收率和精密度考察:取 5 份四物汤煎液各 1 mL,每份加入 D-果糖 20 mg、D-葡萄糖 13 mg、蔗糖 50 mg,混匀后按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,稀释一倍后进样 10 μ L,按标准曲线方程计算 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖含量,另取 5 份四物汤煎液直接测定含量。将二者含量差值除以加入糖的量,计算回收率,得回收率及其 RSD 分别为 D-果糖: 128.5%, 12.6%; D-葡萄糖: 114.7%, 11.9%; 蔗糖: 124.7%, 7.1%。同时用这 5 份样品测得的含量计算精密度,得日内 RSD 分析为 D-果糖 3.0%,

D-葡萄糖 3.2%,蔗糖 4.4%。

2.6 样品含量测定:将两批四物汤煎液(药材批号 001101 和 010619)按供试品溶液制备方法各制备 5 份供试品溶液,稀释一倍后进样 10 μ L,按标准曲线方程计算 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖含量,结果见表 1。可见由两批药材所制备的四物汤煎液中各糖的比例相近。

表 1 两批药材制备的四物汤浓煎液中单、双糖的含量测定结果 (n=5)

Table 1 Determination results of mono- and disaccharides in condensed SWD from two batches of Chinese medicinal materials (n=5)

批号	D-果糖 /(mg · mL ⁻¹)	D-葡萄糖 /(mg · mL ⁻¹)	蔗糖 /(mg · mL ⁻¹)
001101	33.4 ± 1.5	24.2 ± 0.9	112.7 ± 6.1
010619	48.8 ± 1.5	35.4 ± 1.1	110.2 ± 4.9

3 讨论

四物汤水煎液成分复杂,将水煎液稀释后进行 80% 乙醇沉淀,可以去除保留时间较长的大分子糖类物质以及蛋白质、黏液质等,这样的样品前处理方法比较简便、实用。本方法中单、双糖的保留时间和峰面积对环境温度比较敏感,宜使用柱温箱。本实验中未使用柱温箱,对方法的回收率有一定影响。

蒸发光散射检测器灵敏度远远高于示差折光检测器,使用的样品很少,并且能避免大量进样对分离效果的不利影响,是一种实用的糖类检测手段。

从测定结果看出,四物汤水煎液中含有丰富的单、双糖,其中蔗糖含量特别高,占四物汤生药质量的 1/10 以上。这些数据对于探讨四物汤补血作用的物质基础具有参考价值。

References:

- [1] Liang Q D, Wang S Q, Gao Y. Development in basal research of Si-Wu-Tang [J]. Tianjin J Tradit Chin Med (天津中医药), 2003, 20(5): 83-86.
- [2] Liang Q D, Li W H, Wang H X, et al. Saccharide analysis of SI-WU-TANG by automated multiple development and off-line coupling thin layer chromatography electrospray ionization mass spectrometry techniques [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 28(7): 632-635.
- [3] Wei Y, Ding M Y. Analysis of trehalose in transgenic tobacco extracts by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2001, 19(3): 226-229.