

表2 野生猪苓的3种成分的量(n=3)

Table 2 Determination of three components in wild

P. umbellatus (n=3)

产地	麦角甾醇 (mg·g ⁻¹)	麦角甾-4,6,8(14),22- 四烯-3-酮/(mg·g ⁻¹)	多糖/ (mg·g ⁻¹)
湖北神农架	0.703	0.021	4.739
陕西太白山	0.461	0.024	3.965

表3 栽培猪苓不同生长年限的3种成分的量(n=3)

Table 3 Determination of three components in cultivation

P. umbellatus in different growth years (n=3)

年限	麦角甾醇 (mg·g ⁻¹)	麦角甾-4,6,8(14),22- 四烯-3-酮/(mg·g ⁻¹)	多糖/ (mg·g ⁻¹)
三年生	0.708	0.021	4.750
四年生	0.589	0.019	4.338

3 结论

3.1 本实验 HPLC 定量测定的方法学研究过程中分别使用了甲醇-0.50% H₃PO₄ 水溶液(92:8)、甲醇-水溶液(96:4)、乙腈-水(60:40)等条件进行色谱分离试验,经综合考虑试验结果,选择的流动相为甲醇-水溶液(96:4)。其中麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮在 343 nm 检测波长下与其他组分能达到基线分离;麦角甾醇在 281 nm 检测波长下与其他组分能达到基线分离。同时对猪苓有效成分不同提取方法进行了对比试验,结果表明用 20 倍量无水乙醇超声 60 min 的提取方法效果最好。在建立的灵敏、可靠的 HPLC 定量测定方法的基础上,结合多糖的紫外分光光度法的测定,制定了猪苓麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、麦角甾醇和多糖 3 种化学成分为指标的质量评价方法。本方法可系统、全面地对不同来源的猪苓药材进行质量评价,并为规范猪苓药材标准提供了科学依据。

3.2 首次采用 3 种成分为指标的方法考察了不同地区猪苓商品药材、野生和栽培品的麦角甾醇、麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮和多糖的量。其中麦角甾醇最低量为 0.091 mg/g,最高量为 0.963 mg/g;麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮最低量为 0.005 mg/g,最高为 0.107 mg/g;多糖量最低为 2.992 mg/g,最高为 12.034 mg/g;部分药材多糖量高达 11.707、12.034 mg/g,而另两种成分的量却很低。以上结果表明,不同地区猪苓商品药材 3 种成分的量差异很大,反映了猪苓药材存在的质量问题。因此应及时采用科学的质量评价方法,制定出猪苓各成分限度标准,进行质量控制。本方法的应用和实施可解决目前猪苓药材市场质量控制标准不规范、质量差异大的问题;另外建议对于多糖量高而另两种成分量很低的猪苓药材可作为提取猪苓多糖的原料使用,由此可使猪苓资源合理应用。

3.3 研究表明,野生、栽培猪苓的 3 种成分的量与不同地区猪苓商品药材 3 种成分的量平均值相近似,但由于试验样品来源数量有限,缺乏一定的代表性,还需充分收集试验样品和进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985.
- [2] 许广波,傅伟杰,赵旭奎. 我国猪苓的研究进展[J]. 菌物研究, 2003,1(1):38-61.
- [3] 中国药典[S]. 一部, 2005.
- [4] 郭顺星,许锦堂. 不同年龄的野生与家种猪苓菌核等成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,1992,17(2):77-79.
- [5] 陈文强,邓百万,彭浩,等. 猪苓营养菌丝与野生菌核蛋白质成分分析[J]. 食用菌学报,2004,11(2):16-19.
- [6] 袁丹. 猪苓菌核中的抗醛固酮(醛甾酮)利尿成分[J]. 生物药学报,2001,27(6):867-870.
- [7] 黄驰,朱蓉贞. 猪苓多糖及其注射剂的含量测定研究[J]. 中成药, 1093,15(1):13-14.

柱前衍生化 RP-HPLC 法测定地黄中葡萄糖、半乳糖和蜜二糖

刘有平,张佳蕊,邵华,李小童,刘永利,邱欣*

(沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立同时测定地黄中葡萄糖、半乳糖和蜜二糖的 RP-HPLC 方法,为地黄药材的质量控制提供新的依据。方法 地黄药材以水超声提取,再用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化后,采用 Diamonsil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)分离,流动相为乙腈和 100 mmol/L 醋酸铵水溶液(pH 5.5)进行梯度洗脱,体积流量 1.0 mL/min,检测波长为 245 nm,柱温为 23.5 ℃,以内标法定量。结果 葡萄糖、半乳糖和蜜二糖分别在 90~900 μg/mL

* 收稿日期:2008-08-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20445003)

作者简介:刘有平(1970—),男,山西长治人,博士,研究方向为药物代谢与药物动力学研究。

Tel:(024)23986342 E-mail:ypriu@163.com

*通讯作者 邱欣 E-mail:dixin63@hotmail.com

($r=0.9993$)、 $90\sim 900\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9990$)和 $27\sim 270\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9990$)线性关系良好;3种糖的平均回收率均 $>98.7\%$ ($n=9$), $\text{RSD}<3.3\%$ 。结论 该方法灵敏度高、分离效果好,可用于地黄药材的质量控制。

关键词:地黄;葡萄糖;半乳糖;蜜二糖;PMP 衍生;高效液相色谱

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)06-0974-03

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根,为我国常用的中药材之一,通常以鲜地黄、生地黄和熟地黄 3 种形式入药。地黄在我国有悠久的药用历史,被《神农本草经》列为上品。地黄中含有葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、水苏糖、甘露三糖、毛蕊花糖及地黄多糖 a、b 等糖类成分,其中,地黄寡糖类成分为地黄中主要活性成分。现代研究证明,地黄寡糖具有增强免疫、促进造血、降血糖和抗肿瘤等活性^[1]。有关地黄中活性糖组分分析的研究报道大多是采用比色法测定还原糖总量^[2,3]。温学森等^[4]采用凝胶色谱/示差折光检测法研究了地黄在加工炮制过程中 HPLC 谱图的变化规律,但因凝胶色谱分离效率低,糖组分的色谱峰相互重叠,无法准确定量。笔者建立了 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化 RP-HPLC 法同时测定地黄中 3 种还原糖的量。该法具有灵敏度高、专属性强等优点,可用于地黄药材的质量控制。

1 仪器和试剂

Agilent HPLC 1100 型液相色谱仪,配有四元梯度泵和 Agilent chemstation 色谱工作站。

D-葡萄糖一水合物(质量分数 99.5%,中国医药上海化学试剂公司),D-(+)-半乳糖(质量分数 99.0%,中国医药上海化学试剂公司);D-(+)-蜜二糖一水合物(质量分数 99.0%,ACROS 公司);D-(+)-木糖(质量分数 99.0%,Fluka 公司),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(分析纯,上海试剂有限公司分装),乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司),重蒸水(自制)。

生地黄分别购自河南、山东、山西和沈阳,经沈阳药科大学中药学院路金才副教授鉴定为玄参科植物地黄 *R. glutinosa* Libosch. 的块根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);预柱为 Easy Guard C₁₈ 保护柱(8 mm × 4.0 mm);流动相:A 为乙腈,B 为 100 mmol/L 醋酸铵水溶液(pH 5.5),梯度洗脱程序为 0~20 min,A 由 0%线性增加至 19%,20~27 min,A 由 19%线性增加至 22%;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:245 nm;柱温:23.5 °C;进样量:20 μL。在上述色谱条件下,3 组分峰与

各相邻峰的分度均大于 1.5,理论塔板数不低于 6 000。

2.2 对照品储备液的制备:分别精密称取葡萄糖一水合物对照品 124 mg(相当于葡萄糖 112.5 mg),半乳糖对照品 112.5 mg 和蜜二糖一水合物对照品 35.5 mg(相当于蜜二糖 33.5 mg),分别置 10 mL 量瓶中,加重蒸水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

分别精密量取葡萄糖、半乳糖和蜜二糖对照品储备液各 5 mL,置同一 25 mL 量瓶中,加重蒸水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 2.25、2.25、0.67 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.3 内标溶液的制备:精密称取木糖对照品 16.2 mg,置 10 mL 量瓶中,加重蒸水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 供试品溶液的制备:取已剪成碎末状的地黄样品 1.0 g,精密称定,加水 30 mL,超声提取 3 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,减压浓缩,将浓缩液定量转移至 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,再精密量取该溶液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 衍生化方法:取对照品溶液或供试品溶液 50 μL,置 1 mL 具塞试管中,分别加入内标溶液、0.3 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液各 50 μL,涡旋混合,于 70 °C 下反应 30 min,取出冷却至室温,加入 0.3 mol/L HCl 溶液 50 μL 中和反应液,再加入氯仿 200 μL,涡旋、离心,弃去下层,重复萃取 3 次,将上层溶液用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.6 线性关系考察:精密量取混合对照品储备液 0.4、1.2、2.0、3.0、4.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中,用重蒸水稀释至刻度,摇匀。分别取上述溶液 50 μL,衍生化后,进样分析。以葡萄糖、半乳糖和蜜二糖衍生物与内标衍生物的峰面积之比为纵坐标(Y),以质量浓度为横坐标(X),进行线性回归,得到葡萄糖、半乳糖和蜜二糖的回归方程分别为 $Y = 2.1874 X - 0.0181$ ($r = 0.9993$), $Y = 4.4939 X - 0.0231$ ($r = 0.9990$)和 $Y = 1.7089 X - 0.0193$ ($r = 0.9990$)。结果表明,葡萄糖、半乳糖和蜜二糖分别在 $90\sim 900\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $90\sim 900\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $27\sim 270\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.7 精密度试验:取一定质量浓度的对照品溶液,衍生化后,将所得溶液连续进样 5 次,葡萄糖、半乳糖和蜜二糖衍生物与内标衍生物的峰面积比值的 RSD 分别为 0.1%、0.1%、0.4%。

2.8 重现性试验:取同一批地黄样品,平行制备 5 份供试品溶液,衍生化后,进样分析,测得葡萄糖、半乳糖和蜜二糖质量分数的 RSD 分别为 0.5%、0.6% 和 0.5%。

2.9 稳定性试验:取衍生化后的供试品溶液,室温下放置,分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样分析,求得地黄中葡萄糖、半乳糖和蜜二糖质量分数的 RSD 均小于 5.0%,表明待测溶液室温条件放置 12 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验:取地黄样品约 0.5 g,精密称定,共称取 9 份,3 份为 1 组,分别按低、中、高质量浓度精密加入葡萄糖、半乳糖和蜜二糖对照品溶液,制备供试品溶液,衍生化后,进样分析,计算得葡萄糖、半乳糖和蜜二糖的平均回收率分别为 100.1%、100.8%、98.7%,RSD 分别为 2.4%、3.2%、3.3%。

2.11 样品测定:取所收集的各产地地黄样品,制备供试品溶液,衍生化后,进样分析,用内标法计算地黄中 3 种还原糖,色谱图见图 1,结果见表 1。

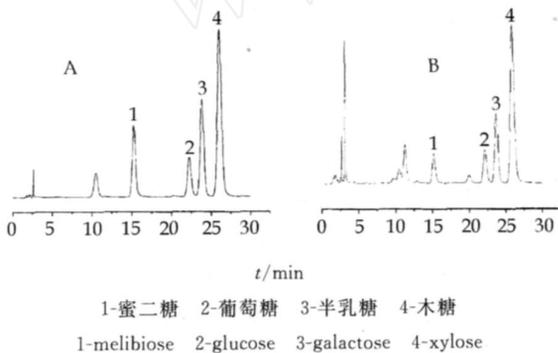


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

表 1 地黄中 3 种还原糖的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of reducing saccharides in *R. glutinosa* roots (n=3)

编号	来源	蜜二糖/ (mg · g ⁻¹)	葡萄糖/ (mg · g ⁻¹)	半乳糖/ (mg · g ⁻¹)
1	河南	2.5	21.0	20.9
2	山东	2.6	12.8	11.0
3	山西	2.7	12.6	15.5
4	沈阳	2.4	8.3	34.5

3 讨论

3.1 衍生化试剂的选择:由于糖既没有紫外吸收,也不产生荧光,因此发展了许多衍生化方法来对糖进行分析。目前糖的色谱检测方法,大多数采用衍生化后直接检测的方式。糖自身所具有的衍生化基团包括羟基、醛基或酮基等,可以实现还原或选择性酰胺化衍生操作,还可以通过缩合等反应衍生。常用的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮作为衍生化试剂,在碱性条件下,通过醛和某些含活泼氢的化合物发生缩合反应,形成新的碳-碳键。该法具有许多独特的优点,如衍生化反应定量进行、反应条件温和、紫外吸收很强、可用于多种分离模式的分析等等。

3.2 流动相的优化:在已有文献的基础上考察了不同 pH 值及等度与梯度洗脱对分离结果的影响,结果发现,pH 5.5 时,采用梯度洗脱分离效果最好。

3.3 采用柱前衍生化 RP-HPLC 法同时测定地黄中 3 种还原糖的量,结果表明,该方法灵敏度高,分离度好,为地黄质量控制提供了理论依据和方法基础。

参考文献:

- [1] 武卫红,温学森,赵宇.地黄寡糖及其药理活性研究进展[J].中药材,2006,29(5):507-600.
- [2] 李红霞,许闽,孟江,等.怀地黄多糖的含量测定[J].河南科学,2002,20(2):144-146.
- [3] 李军,张丽萍,张振凌,等.熟地黄清蒸和酒炖不同时间还原糖含量测定[J].中成药,2006,28(4):513-514.
- [4] 温学森,杨世林,马小军,等.地黄在加工炮制过程中 HPLC 谱图的变化[J].中草药,2004,35(2):153-156.