

HPLC-ELSD 测定地黄不同炮制品中单糖含量

胡志方*, 王小平, 陈建章

(江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000)

[摘要] **目的:** 建立 HPLC-ELSD 测定地黄不同炮制品中单糖含量方法, 研究不同炮制方法对熟地黄单糖含量的影响。**方法:** 采用高效液相色谱法, 以蒸发光散射检测器进行检测, Prevail carbohydrate ES 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (75:25), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, ELSD 条件漂移管温度 65 °C, 空气流速 2.5 L·min⁻¹, 增益 1。**结果:** *D*-葡萄糖平均回收率为 98.24%, RSD 2.18%; *D*-果糖平均回收率为 98.37%, RSD 2.11%; 生地、炒制地黄、清蒸地黄、酒炖地黄中单糖含量分别为 1.62%, (27.22 ± 2.74)%, (9.63 ± 2.05)%, (16.97 ± 2.62)%。**结论:** 该方法操作简便, 可靠稳定, 结果准确; 地黄炮制品中单糖含量远远高于生地, 炒制地黄中单糖含量高于其他两种炮制方法, 为阐明其炮制机理提供实验依据。

[关键词] 高效液相色谱-蒸发光散射检测法; 熟地黄; 炒制法; *D*-葡萄糖; *D*-果糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0072-03

[doi] 10.11653/syfy2013130072

Determination of Monosaccharide Content in Different Processed Radix Rehmannia Praeparata by HPLC-ELSD

HU Zhi-fang*, WANG Xiao-ping, CHEN Jian-zhang

(Jiangxi College of Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method for determination of monosaccharide content in different processed Radix Rehmannia Praeparata and to study the effect of different processed method on monosaccharide content in Radix Rehmannia Praeparata. **Method:** HPLC-ELSD was applied to analyze the content of monosaccharide with prevail carbohydrate ES column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile-water (75:25) as mobile phase. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹; column temperature was kept at 30 °C; temperature of drift tube set at 65 °C, gas flow 2.5 L·min⁻¹ and gain 1. **Result:** The *D*-glucose and *D*-fructose average recovery was 98.24% (RSD 2.18%) and 98.37% (RSD 2.11%) respectively. The content of monosaccharide in Radix Rehmanniae from Wenzhi, steaming and stewing by liquor were 1.62%, 27.22% ± 2.74%, 9.63% ± 2.05%, 16.97% ± 2.62% respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible. The content of monosaccharide in Wenzhi Dihuang was higher than that of steaming Dihuang and stewing by liquor. It provides an experimental basis to illustrate its processing mechanisms.

[Key words] HPLC-ELSD; Radix Rehmanniae Praeparata; Wenzhi; *D*-glucose; *D*-fructose

生地黄经炮制加工熟地黄后, 性由寒转温, 味由苦转甘, 功效由清转补, 以滋阴补血、益精填髓为

主^[1]。其功效发生转变的物质基础是在炮制过程中地黄化学成分会发生改变^[2-4], 尤其是糖类成分变化大。由于不同炮制方法的操作环境与辅料不尽相同, 有可能导致地黄中化学成分改变的存在差异, 进而影响中医临床药效。在实验中选用的炒制地黄是江西建昌帮特色炮制品种, 在赣、闽、台等地区应用广泛。本文采用 HPLC-ELSD 法检测江西建昌帮炒制地黄与常用酒炖地黄、清蒸地黄中单糖-*D*-葡萄

[收稿日期] 20120820(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160520); 江西省自然科学基金项目(2009GZY0114)

[通讯作者] * 胡志方, 教授, 从事中药炮制及中药新制剂研究, Tel: 0794-8239328, E-mail: jxrelf@163.com

糖与D-果糖含量,研究不同炮制方法对地黄内在化学成分的影响差异。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),Alltech 3300 蒸发光散射检测器(美国奥泰科技(中国)有限公司),METTLER-TOLEDO AB265-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司),FST-III-10 型精密型超纯水机(上海富诗特仪器设备有限公司),OHAUS AR2140 型电子分析天平(奥豪斯仪器(上海)有限公司),KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

地黄药材购自江西富中药业有限公司,经江西中医药高等专科学校李秀英副教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa*;辅料砂仁、陈皮购自江西富中药业有限公司,黄酒(食品级 20111025,镇江恒顺酒业有限责任公司),D-无水葡萄糖(批号 110833-200503)、D-果糖(批号 111504-200001)购自中国药品生物制品检定所;超纯水。试剂除 HPLC 用乙腈为色谱纯外,其他均为分析纯。

炮制品:炆制地黄^[5]、酒炖地黄^[6]、清蒸地黄^[7]依法制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Prevail carbohydrate ES 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(75:25),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,ELSD 条件:漂移管温度 65 ℃,空气流速 2.5 L·min⁻¹,增益 1。

2.2 试液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称量 D-无水葡萄糖、D-果糖对照品适量,用蒸馏水溶解制成质量浓度分别为 0.663, 1.077 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 60 ℃ 干燥至恒重的生地约 2 g,地黄不同炮制品粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 60% 甲醇 100 mL,超声 30 min,滤过,精密吸取续滤液 2 mL,置 5 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,取上清液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 标准曲线的制备 取对照品储备溶液,精密量取 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密量取 20 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积。以对照品峰面积的常用对数(A)为横坐标,以 D-葡萄糖、D-果糖的质量(μg)的常用对数(Y)为纵坐标作图,以最小二乘法进行线性回

归,得线性方程 $Y_{D-葡萄糖} = 1.0107A - 1.9423$ ($r = 0.9999$); $Y_{D-果糖} = 0.9629A - 2.1284$ ($r = 0.9999$)。根据上式,线性范围分别为 D-葡萄糖 0.663 ~ 13.26 μg, D-果糖 1.077 ~ 21.54 μg。

2.4 精密度试验 取同一对照品溶液,依法重复进样 6 次,结果 D-葡萄糖峰面积对数的平均值为 2.813, RSD 0.34%; D-果糖峰面积对数的平均值为 3.369, RSD 0.49%。

2.5 稳定性试验 取 2.2.2 项下供试品溶液,分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样测定一次,结果 D-葡萄糖峰面积对数的 RSD 0.69%; D-果糖峰面积对数的 RSD 0.99%。表明样品溶液在 24 h 内稳定。

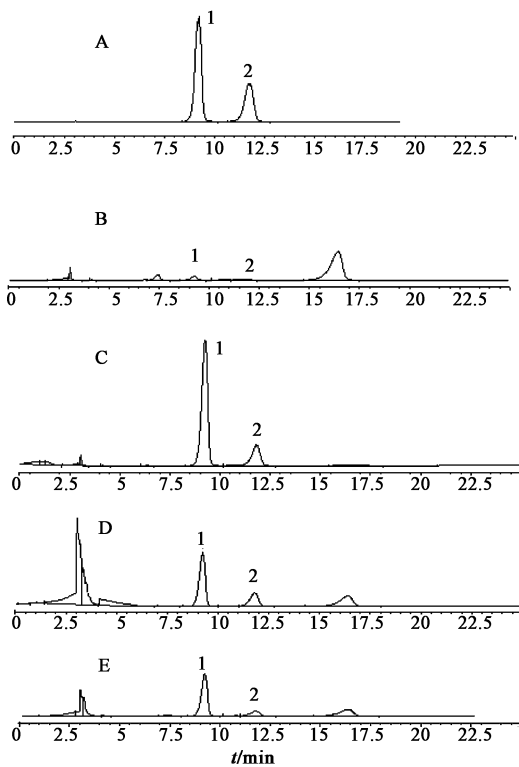
2.6 重复性试验 精密称取炆制地黄样品 5 份,按 2.2.2 项下方法制备成供试品溶液,依法测定含量。结果 D-葡萄糖含量为 10.67% (g·g⁻¹), RSD 1.41%; D-果糖含量为 16.20% (g·g⁻¹), RSD 1.78%。

2.7 加样回收率试验 称取 6 份已知含量的炆制地黄样品 0.4 g,精密称定,每份加入 D-葡萄糖约 40 mg、D-果糖约 60 mg,按 2.2.2 项下方法制备成供试品溶液,依法测定,计算平均回收率。结果平均回收率分别为 98.24% (RSD 2.18%), 98.37% (RSD 2.11%)。见表 1。

表 1 2 种单糖加样回收率试验

对照品	取样量 /g	样品中的量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
葡萄糖	0.401 3	42.82	40.11	81.84	97.29	98.24	2.18
	0.404 6	43.17	40.02	83.29	100.25		
	0.400 9	42.78	40.17	81.02	95.20		
	0.401 0	42.79	40.16	82.76	99.53		
	0.400 6	42.74	40.05	81.48	96.72		
	0.402 8	42.98	40.01	83.16	100.43		
果糖	0.401 3	65.01	60.24	124.36	98.52	98.37	2.11
	0.404 6	65.54	60.18	126.73	101.67		
	0.400 9	64.95	60.29	122.61	95.64		
	0.401 0	64.96	60.05	124.10	98.48		
	0.400 6	64.90	60.14	124.52	99.14		
	0.402 8	65.25	60.03	123.34	96.76		

2.8 样品含量测定 精密吸取各供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,依法计算样品中含量。对照品及样品色谱图见图 1,结果见表 2。



A. 混合对照品; B. 生地黄; C. 炮制地黄;
D. 酒炖地黄; E. 清蒸地黄; 1. 果糖; 2. 葡萄糖

图 1 地黄不同炮制品单糖含量测定 HPLC

表 2 生地及地黄炮制品中单糖含量测定 ($\bar{x} \pm s$)

样品	样品数	D-葡萄糖 /%	D-果糖 /%	单糖 /%
生地	1	0.74	0.88	1.62
炮制地黄	5	10.79 ± 1.36	16.42 ± 1.51	27.22 ± 2.74
清蒸地黄	5	3.03 ± 1.28	6.60 ± 2.22	9.63 ± 2.05
酒炖地黄	5	8.08 ± 1.53	8.89 ± 1.87	16.97 ± 2.62

3 讨论

目前检测还原糖多采用比色法或 HPLC-RID 法,但前者只能测定还原糖总量,而 RID 灵敏度低,受温度影响大,系统平衡时间长。HPLC-ELSD 的优点是受温度的影响较小,基线不易发生漂移,重复性与可靠性好。相对氨基柱稳定性差及固定相易流失的缺点,Prevail carbohydrate ES 色谱柱对糖的分析效果好。

蒸发光散射检测器漂移管温度 65 °C,气体流量 2.5 L·min⁻¹时,基线噪音可满足分析要求。曾按流动相乙二醇与水不同配比(80:20),(75:25),(70:30)进行比较分析,结果表明当流动相比比为 75:25 时,目标峰峰形好,其中果糖、葡萄糖色谱峰对称因子分别为 1.013,1.095,分析时间适宜。

比较 80% 甲醇、60% 甲醇的提取效果,结果表

明 80% 甲醇制备的供试品中可溶性杂质少,但 60% 甲醇的提取效率更高,其所含可溶性杂质不影响目标成分的测定。

有研究表明地黄不同炮制品的药理作用存有差异^[8-9],功效差异的物质基础是随炮制条件改变而变化的地黄内在成分的质与量。研究表明,不同炮制方法对地黄单糖含量的影响不尽相同,炮制品中单糖含量明显高于生品,采用建昌帮特殊的的炮制工艺制备的炮制地黄的单糖含量高于酒炖地黄与清蒸地黄。其产生的原因是在熟地黄炮制加工过程中,生地黄中部分多糖苷和低聚糖类物质水解生成单糖,故熟地黄中单糖含量变化大。

传统炮制熟地黄的品质要求是黑如漆,甜如饴。明代著名医家曾云^[10]:“形体之本在精血,熟地至静之性,以至甘至厚之味,实精血形成中第一纯厚之药”。这均体现熟地黄性味最突出的特点是甘(甜)味。建昌帮炮制地黄低聚糖含量低,但单糖含量高,甜度强,符合建昌帮“气味纯真而独厚”的品质特性,在南方药界享有良好声誉。现代药理作用业已表明果糖、葡萄糖具有直接供给热能、补充体液及营养全身的补益功效。

[参考文献]

- [1] 叶定江,张世臣.中药炮制学[M].北京:人民卫生出版社,1999:289.
- [2] 刘彦飞,赵宇,武卫红.地黄的化学成分及其在加工炮制过程中的变化[J].国外医药·植物药分册,2007,22(3):102.
- [3] 王宏洁,刘婷,梁爱华,等.鲜地黄化学成分的分离鉴定及活性作用初探[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):15.
- [4] 邱建国,张汝学,贾正平,等.HPLC法测定地黄、不同提取物及熟地黄中的梓醇[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(1):23.
- [5] 江西省中药饮片炮制规范编写组.江西省中药饮片炮制规范[S].上海:上海科学技术出版社,2009:327.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:116.
- [7] 邓富明,余寿祥,张海云.樟树中药传统炮制法[M].南昌:江西人民出版社,1984:105.
- [8] 崔瑛,房晓娜,王会霞,等.地黄不同炮制品补血作用研究[J].时珍国医国药,2009,20(1):20.
- [9] 吴金环,顾红岩,喇孝瑾,等.地黄与熟地黄对糖尿病小鼠血糖血脂的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):161.
- [10] 李志庸.张景岳医学全书[M].北京:中国中医药出版社,2002:1460.

[责任编辑 顾雪竹]