

# HPLC测定不同产地生地黄中地黄寡糖和梓醇的含量

邱建国, 张汝学, 贾正平\*, 李茂星, 樊鹏程, 张泉龙, 尉丽力  
(兰州军区兰州总医院国家中医药管理局临床中药学重点学科, 兰州 730050)

[摘要] 目的: 考察不同产地的生地黄中所含地黄寡糖和梓醇的含量。方法: 采用水为溶媒, 超声提取糖类成分, 流动相用乙腈-水(72:28), 流速  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\text{NH}_2$  色谱柱分离, 示差折光检测器检测, 高效液相色谱法测定; 采用甲醇为溶媒, 超声提取梓醇, 流动相用甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99), 流速  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\text{C}_{18}$  色谱柱分离, 检测波长 210 nm, 高效液相色谱法测定。结果: 产地不同, 生地黄中的地黄寡糖成分、含量不同, 梓醇含量不同。结论: 本方法操作简便、准确、快速、干扰少, 适用于生地黄中地黄寡糖和梓醇的含量测定。

[关键词] 产地; 生地黄; 地黄寡糖; 梓醇; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0110-04

## Determination of Content of Oligosaccharide and Catalpol in Rehmannia Root by HPLC

QIU Jian-guo, ZHANG Ru-xue, JIA Zheng-ping\*, LI Mao-xing,  
FAN Peng-cheng, ZHANG Quan-long, WEI Li-li

(Clinical Pharmacy Key Discipline of State Administration of Traditional Chinese Medicine,  
Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command, PLA, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract] Objective:** To contrast ingredients of rehmannia dride rhizome with different disct. **Method:** Carbohydrate was extracted by supersound and water used for solvent, was separated by  $\text{NH}_2$  chromatographic column and acetonitrile-water(72:28) for mobile phase at  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , was detected by refraction detector and was assayed by high-performance liquid chromatography. Catalpinoside was extracted by supersound and methanol used for solvent, was separated by  $\text{C}_{18}$  chromatographic column and methanol-0.1% phosphoric acid solution at  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , was detected at  $\lambda = 210 \text{ nm}$  and was assayed by high-performance liquid chromatography. **Result:** Carbohydrate ingredients of rehmannia dride rhizome and prepared rhizome of rehmannia are conformity, but content are different. Content of catalpinoside have striking difference. **Conclusion:** The method is good in the aspect of reproducibility and sensitivity. It can be applied to contrast for the ingredients of Rehmannia dride rhizome and prepared rhizome of rehmannia.

**[Key words]** place of production; rehmannia root; oligosaccharide; catalpol; high-performance liquid chromatography

生地黄为玄参科植物生地黄的新鲜或干燥块根<sup>[1]</sup>。本课题组多年来对生地黄的降血糖机制进行

了系统研究,发现其调节血糖的主要成分是地黄寡糖。地黄寡糖含有楝二糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖、甘露三糖、毛蕊四糖、毛蕊糖等,其中水苏糖含量最高;文献报道环烯醚萜苷类中的梓醇可能是生地黄降血糖作用的有效成分之一<sup>[2]</sup>。生地黄的产地很多,其中河南是其地道药材产地。产地不同,生地黄中地黄寡糖成分、含量不同,梓醇含量也不同;所以本课题

[收稿日期] 20100711(002)

[通讯作者] \* 贾正平, 主任药师, 教授, 博士生导师, 主要从事医院药学专业的研究, Tel: 0931-8994652, E-mail: Jiazp166@sina.com

题组对不同产地的生地黄中地黄寡糖及梓醇做了初步考察,为进一步研究生地黄质量奠定一定的基础,更好地控制生地黄的产品质量。

## 1 仪器与材料

SCL-6A 高效液相色谱仪, Shimadzu RID-6A 示差折光检测器(日本), phenomenex NH<sub>2</sub> 柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm)(美国),分析之星色谱工作站, Waters 高效液相色谱仪、Waters996 紫外检测器、Waters600 泵, C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm)(大连依利特), METTLER AE240 电子分析天平(瑞典), FZQ-2 涡旋混合器(江苏泰县医疗器械厂),微量进样器(上海安亭微量进样器厂),生地黄对照药材(中国药品生物制品检定所, 1180-200001),生地黄(河南新乡、河南西峡、河南三门峡、河南温县、河南淮阳、河南、甘肃庆阳、甘肃清水、甘肃金崖、甘肃大康营), 楝二糖(纯度 99.0%, 批号 1362360)、蔗糖(北京化学试剂三厂)、棉子糖(西安舟鼎国生物技术有限公司, 批号 X08D10MZT)、甘露三糖(批号 1450717)、水苏糖(批号 065K3775GAS10094-583)其他试剂均为分析纯,水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 地黄寡糖 HPLC 含量测定方法的建立<sup>[3]</sup>

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Spherisorb NH<sub>2</sub> 柱,检测器为 Shimadzu RID-6A 示差折光检测器,流动相乙腈-水(72:28),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温室温。楝二糖、蔗糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品和地黄寡糖供试品在同一保留时间有相同的色谱峰,且地黄寡糖在此保留时间没有干扰吸收峰。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取楝二糖、蔗糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品适量,分别配制成质量浓度为 16.5, 18.2, 17.2, 17.6, 17.1 g·L<sup>-1</sup> 混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 分别精密称取生地黄(河南新乡) 0.016 g,置 1.0 mL 离心管中,精密加入 1 000 μL 水溶解,涡旋,混匀,0.45 μm 滤过,滤液作为供试品溶液。

**2.1.4 线性关系考察** 取适量对照品溶液,分别进样 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL 进样,由峰面积对浓度求得工作曲线,得回归方程。楝二糖:  $A = 5.10 \times 10^5 C + 4.98 \times 10^5$ ,  $R^2 = 0.9988$ , 线性范围 49.5 ~ 495 g·L<sup>-1</sup>。蔗糖:  $A = 5.07 \times 10^5 C + 2.57 \times 10^6$ ,  $R^2 = 0.9986$ , 线性范围 54.6 ~ 546 g·L<sup>-1</sup>。棉子糖:  $A =$

$5.60 \times 10^5 C + 1.15 \times 10^6$ ,  $R^2 = 0.9953$ , 线性范围 51.6 ~ 516 g·L<sup>-1</sup>。甘露三糖:  $A = 5.58 \times 10^5 C + 1.22 \times 10^6$ ,  $R^2 = 0.9914$ , 线性范围 52.8 ~ 528 g·L<sup>-1</sup>。水苏糖:  $A = 3.05 \times 10^7 C + 7.99 \times 10^5$ ,  $R^2 = 0.9979$ , 线性范围 51.3 ~ 513 g·L<sup>-1</sup>。

**2.1.5 稳定性试验** 取同一批生地黄供试品溶液(河南新乡),放置室温,在同 1 d 内每隔 2 h 测定,连续考察 8 h,测定峰面积,计算得生地黄水苏糖 RSD 1.55%。

**2.1.6 精密度试验** 取生地黄同一批供试品溶液(河南新乡),分别连续进样 6 次,测定峰面积,计算生地黄棉子糖峰、水苏糖峰 RSD 分别为 0.91%, 0.85%。

**2.1.7 重复性试验** 取同一批生地黄 6 份,按供试品溶液制备项下进行制备,在上述色谱条件下分别进样测定并计算。生地黄中棉子糖平均质量分数 74.9 g·g<sup>-1</sup>, RSD 2.69%;水苏糖平均质量分数 376.9 g·g<sup>-1</sup>, RSD 2.72%。

**2.1.8 加样回收率试验** 取同一批生地黄(河南新乡)供试品 6 份,分别精密称取 0.08 g(约相当于棉子糖 5.992 mg,水苏糖 30.15 mg)、0.15 g(约相当于棉子糖 1.14 mg,甘露三糖 17.87 mg,水苏糖 12.12 mg),分别精密加入对照品溶液(棉子糖、甘露三糖、水苏糖质量浓度分别为 6, 5, 30 g·L<sup>-1</sup>) 1 mL 6 份、(棉子糖、甘露三糖、水苏糖质量浓度分别为 1.2, 18, 10.6 g·L<sup>-1</sup>) 1 mL 6 份,依法测定。生地黄中棉子糖,甘露三糖、水苏糖平均回收率分别为 101.08%, 99.36%, 100.51%, RSD 分别为 3.09%, 3.31%, 2.49%。结果见表 1。

### 2.2 不同产地生地黄中糖类成分的 HPLC 检测比较<sup>[3]</sup>

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Phenomenex NH<sub>2</sub> 柱,检测器为 Shimadzu RID-6A 示差折光检测器,流动相乙腈-水(72:28),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为室温,进样量 20 μL。结果见表 2,图 1。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 分别称取葡萄糖、果糖、半乳糖、楝二糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖对照品 8 mg,精密称定,置 1.5 mL 离心管中,精密加 1 000 μL 水溶解,制成每 mL 含 8 mg 的溶液,0.45 μm 滤过,滤液备用。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 分别称取粉碎成细粉(过 40 目筛,干燥 24 h)的不同产地的生地黄各 0.5

表 1 地黄寡糖加样回收率试验结果

称样量/g	测得量/mg			回收率/%			平均回收率			RSD/%		
	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖
0.085 7	6.11	4.82	29.90	101.83	96.40	97.89						
0.084 0	6.32	5.25	30.40	105.33	105.00	99.62						
0.083 3	5.80	4.94	30.82	96.67	98.80	100.76						
0.085 8	5.92	4.82	31.0	98.67	96.40	101.59	101.08	99.63	100.51	3.09	3.31	2.49
0.081 9	6.03	5.10	30.4	100.50	102.00	98.41						
0.084 9	6.21	4.96	32.00	103.50	99.20	104.77						

注:棉子糖对照品加入量均为 6.0 mg,甘露三糖对照品加入量均为 5.0 mg,水苏糖对照品加入量均为 30.00 mg。

g 精密称定,加水 9 mL,超声提取 30 min,放冷,用水定容至 10 mL,取 1 mL,离心,8 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min,上清液 0.45 μm 滤过,滤液备用。

### 2.3 不同产地生地黄中梓醇成分的 HPLC 检测比较<sup>[1]</sup>

**2.3.1 色谱条件** Waters996 紫外检测器、Waters600 泵, C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm), 检测波长 210 nm, 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(1 99), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为室温, 进样量 20 μL。结果见表 2, 图 2。

表 2 不同产地生地黄中地黄寡糖及梓醇含量 %

产地	采集时间/年	蔗糖	棣二糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	梓醇
河南新乡	2008	-	-	7.49	-	37.56	1.01
河南西峡	2008	-	-	8.96	-	45.83	0.77
河南三门峡	2008	-	-	7.75	-	36.26	1.37
不详	不详	1.09	0.74	2.40	2.39	25.27	0.93
河南淮阳	2008	-	-	8.57	-	45.46	1.17
河南(不详)	2006	-	-	9.63	-	50.62	0.79
甘肃庆阳	2008	-	-	11.08	0.44	47.42	1.33
甘肃清水	2008	1.71	0.46	2.11	2.25	19.05	2.14
甘肃金崖	2008	5.44	0.35	4.51	1.64	44.19	1.00
甘肃大康营	2008	-	0.53	8.17	0.97	41.70	3.64

**2.3.2 对照品溶液的制备** 称取梓醇对照品适量,精密称定,用流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(1 99)制成每 mL 含 10 μg 的溶液,0.45 μm 滤过,滤液备用。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 分别称取粉碎成细粉(过 40 目筛,干燥 24 h)不同产地的生地黄 0.5 g,精密称定,加甲醇 5 mL,超声提取 30 min,放冷,用甲醇定容至 5 mL,滤过,水浴蒸干,残渣用流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(1 99)溶解定容至 5 mL,0.45 μm 滤过,滤液备用。

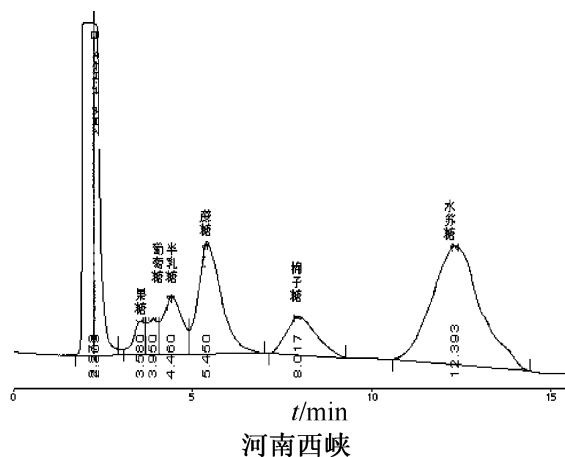
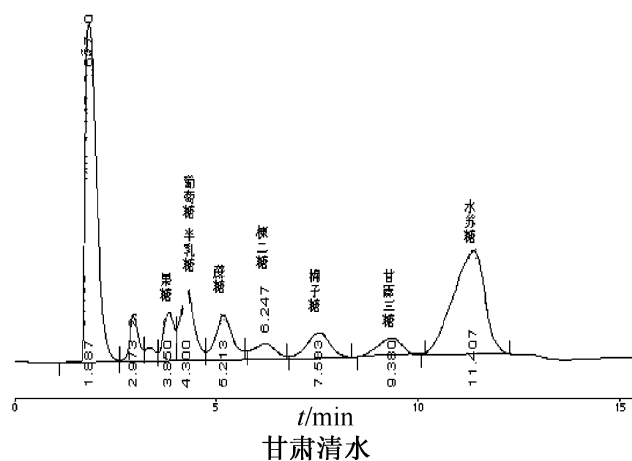


图 1 生地黄中糖类成分 HPLC

由表 2 可以看出生地黄中糖类成分水苏糖含量最高,产地不同,含量有所差异,河南产的生地黄普遍较高,甘肃产的生地黄中水苏糖含量差异较大,但是相对较高;河南新乡、河南三门峡、河南淮阳、河南西峡、对照药材中没有检测到甘露三糖,其他产地的甘露三糖含量也较低;所有产地均含有棉子糖,含量相对较高,水苏糖含量较高的生地黄,棉子糖含量也较高,水苏糖含量较低的生地黄,棉子糖含量也较低。河南新乡、河南三门峡、河南淮阳、河南(不详)、甘肃庆阳、对照药材产的生地黄中没有检测到棣二糖;因蔗糖峰和果糖、葡萄糖、半乳糖 3 个单糖峰比较接近,有的供试品中蔗糖峰与单糖峰没有分开,所以没有积分计算。

不同产地生地黄中梓醇成分含量差异不是很大,甘肃产的生地黄中梓醇含量相对较高,但是含量

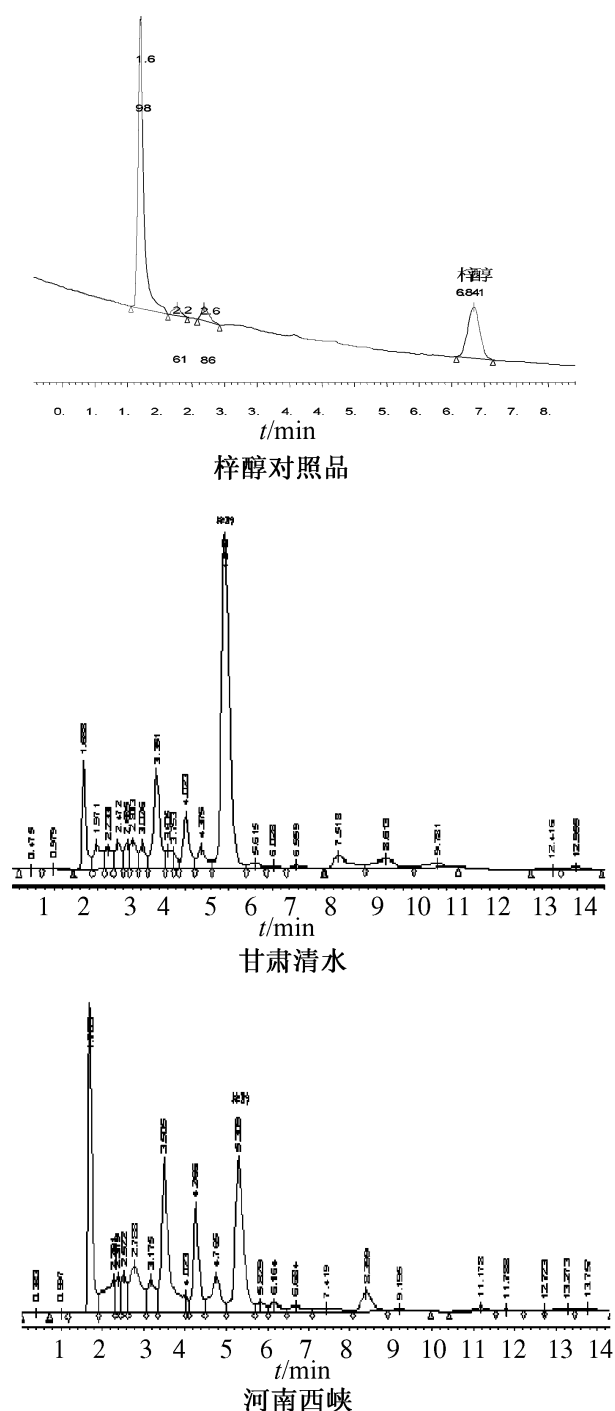


图 2 生地黄中梓醇成分 HPLC

普遍比水苏糖含量低。

不同产地生地黄中糖类成分含量和梓醇含量并不成一定的比例,如甘肃清水产的生地黄中水苏糖含量相对较低,但梓醇含量较高;河南西峡产的生地黄,水苏糖含量较高,但梓醇含量较低。

刘长河等<sup>[4]</sup>采用薄层扫描法对河南、山西和山东部分地区的生地黄中的梓醇进行了测定,其中河南温县产生地黄梓醇含量较高,以山东嘉祥、山东济宁、山西襄汾所产生地黄梓醇含量较低。

### 3 讨论

由生地黄测定结果可以看出,产地不同,其所含寡糖成分、含量均不一样,有的产地没有检测到甘露三糖和棓二糖。究竟什么导致了寡糖成分的差异,

鲜生地黄炮制成生地黄时造成的,还是生长环境造成的?因此本课题组对超声提取和煎煮提取做了对比,并对干燥条件做了考察,发现在较高的温度和较长时间下,水苏糖不稳定,分解成甘露三糖和果糖;梓醇是一种环烯醚萜葡萄糖苷类化合物,加工炮制过程中,脱去糖基而发生了一系列化学变化,导致梓醇大幅降低的同时出现了新的化合物<sup>[5]</sup>;梓醇的含量与生地黄块根的外形有一定相关性,形状大的梓醇含量高,小的含量低<sup>[6]</sup>;也有文献报道,梓醇含量较低可能是药农在烘制过程中,温度过高,梓醇受热破坏所致<sup>[7-8]</sup>;所以亟待进一步深入研究造成不同产地生地黄所含寡糖成分和梓醇成分的含量差异的真正原因。

对供试品含量的计算,采用工作曲线回归方程法和外标一点法 2 种方法计算、比较<sup>[3]</sup>,用外标一点法计算的误差比用工作曲线回归方程法的误差小。所以在试验中生地黄寡糖含量测定采用外标一点法计算。

为了避免供试品的制备影响含量的差异,所以将所有的药材均粉碎后过 40 目筛,并置五氧化二磷干燥器中干燥 24 h,水分测定均 5%。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005.
- [2] 阴健,郭力弓.中药现代研究与临床应用[M].北京:学苑出版社,1994:274.
- [3] 邱建国,张汝学,贾正平等.生地黄中寡糖含量 HPLC 测定[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(8):8.
- [4] 刘长河,张留记,李更生,等.不同产地的生地黄中梓醇含量比较[J].中国医院药学杂志,2002,22(5):259.
- [5] 刘彦飞,赵宇,武卫红,等.生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.
- [6] 王太霞,李景原,胡正海.生地黄的形态结构与化学成分研究进展[J].中草药,2004,35(5):585.
- [7] 郝武常,朱宇红,朱志峰,等.炮制对生地黄中梓醇含量的影响[J].中国中药杂志,1997,22(6):345.
- [8] 王宏洁,边宝林,杨健,等.生地黄中梓醇变化条件的探讨[J].中国中药杂志,1997,22(7):408.

[责任编辑 邹晓翠]