

# 地黄中寡糖含量的 HPLC 法测定

邱建国<sup>1</sup>, 张汝学<sup>1</sup>, 贾正平<sup>1\*</sup>, 李茂星<sup>1</sup>, 樊鹏程<sup>1</sup>, 王 娟<sup>1</sup>, 张红果<sup>2</sup>

(1. 兰州军区兰州总医院药材科, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州大学药学院, 兰州 甘肃 730000)

**[摘要]** 目的: 研究地黄寡糖简便有效稳定的测定方法。方法: 采用 NH<sub>2</sub>-C<sup>18</sup> 色谱柱分离, 示差折光检测器检测, 高效液相色谱法测定地黄中寡糖。结果: 水苏糖在 0.097 8~0.326 0 mg 时与峰面积呈良好的线性关系 ( $r = 0.999 0$ ), 平均加样回收率 ( $n = 6$ ) 为 99.43%, RSD 为 2.10%。结论: 该方法分离效果好、准确、快速、干扰少, 适用于地黄寡糖的质量控制。

**[关键词]** 地黄寡糖; 水苏糖; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0008-02

地黄为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根。我们课题组多年来对地黄的降血糖机理进行了系统研究, 发现其调节血糖的主要成分是地黄寡糖。地黄寡糖含有棣二糖、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。糖类特别是寡糖、多糖由于其结构的特殊性, 对其结构分析、质量控制一直是个难题, 所以本课题组对地黄寡糖的含量测定进行了研究, 采用 NH<sub>2</sub> 柱进行柱分离, 示差折光检测器检测, 高效液相色谱法测定的方法取得了较好的结果。

## 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(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)(美国), Millennium<sup>32</sup> 色谱管理系统, 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), 717 型阴离子柱, 732 型阳离子柱, 活性炭地黄寡糖(自制样品), 水苏糖(Product of United Kingdom 065K3775GAS10094-583), 其它试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 地黄水提取物中寡糖组分的分离<sup>[1]</sup>

**2.1.1 提取** 称取生地 1 000 g, 加水 10 倍量, 煎

煮, 提取 3 次, 每次 1.0 h。合并水提取液, 浓缩至适量, 备用。

**2.1.2 离子柱分离** 水提浓缩物先经过 732 型阳离子交换树脂柱, 再经过 717 型阴离子交换树脂柱, 进行离子交换处理。蒸馏水洗脱。洗脱至无色。洗脱液浓缩至适量, 备用。

**2.1.3 活性炭柱层析** 浓缩的洗脱液用活性炭柱层析(100 cm × 7.5 cm, pH7.0), 分别用水及 5%、10%、15%、20% 乙醇洗脱, 每一洗脱液洗至 Molish 反应为阴性, 分别收集得 I、II、III、IV 4 个部位。

### 2.2 水苏糖的 HPLC 含量测定方法的建立<sup>[2]</sup>

**2.2.1 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, 流动相为乙腈-水(70:30), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为室温。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, 见图 1。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 称取水苏糖对照品 16 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 16 mg 的溶液, 0.45 μm 滤过, 滤液备用。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 分别精密称取地黄洗脱部位 IV 粉末 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。

**2.2.4 线性关系考察** 分别精密吸取对照品溶液 ( $C = 16.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 μL 进样, 测定峰面积, 绘制工作曲线。以对照品溶液进样量 (mg) 为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 计算回归方

**[收稿日期]** 2008-10-28

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30672643, 30772773); 甘肃省自然科学基金(3ZS051-A25-078)

**[通讯作者]** \* 贾正平, Tel: (0931) 8994652; E-mail: empriqqq@public.lz.gs.cn

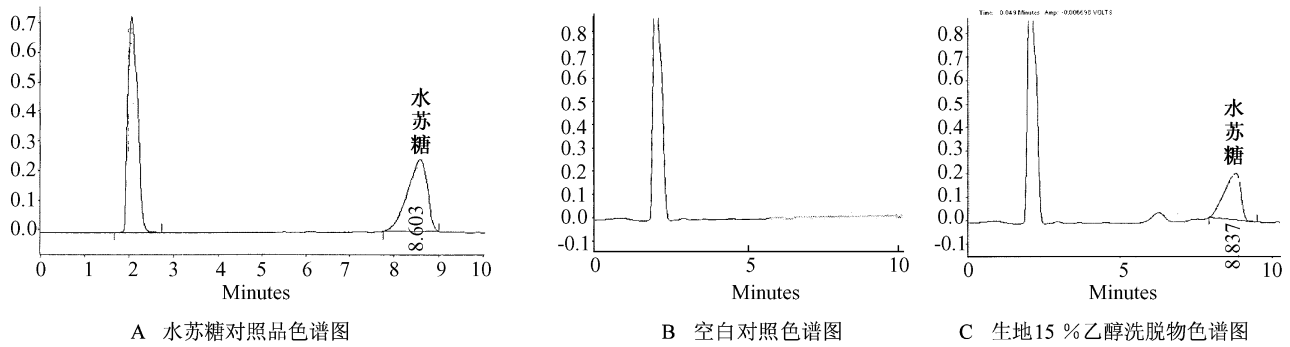


图 1 水苏糖、生地 15% 乙醇洗脱物及空白干扰 HPLC 色谱图

程,  $Y = 3.23 \times 10^7 X + 8.35 \times 10^5$  ( $R = 0.9980$ ), 即工作曲线在 0.0978~0.3260 mg 有良好的线性关系。

**2.2.5 稳定性试验** 日内稳定性考察: 对照品溶液放置室温, 在同 1 d 内每隔 2 h 测定, 连续考察 8 h, 稳定性好,  $RSD = 1.55\%$ ; 日间稳定性考察: 对照品溶液放置冰箱冷藏室 ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ), 在每天同 1 时间测定, 连续考察 7 d, 稳定性好,  $RSD = 3.66\%$ 。

**2.2.6 精密度试验** 取同一浓度的供试品溶液, 进样 6 次,  $RSD = 0.93\%$ 。

**2.2.7 加样回收率试验** 取供试品 6 份, 精密加入一定量的已知浓度的被测成分对照品, 依法测定。结果见表 1。平均回收率为 99.36%,  $RSD = 2.11\%$ 。

**2.2.8 重复性试验** 取同一供试品溶液 6 份, 按 2.2.3 项目下制备样品, 按 2.2 项下测定, 重复性好,  $RSD = 2.69\%$ 。

表 1 水苏糖加样回收率试验结果表

试验号	样品称样量 (g)	样品含水苏糖量 (mg)	加入对照品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.0041	2.6572	4.25	6.8003	97.48	99.43	2.10
2	0.0045	2.9165	4.25	7.1781	100.27		
3	0.0040	2.5924	4.25	6.6809	96.20		
4	0.0041	2.6572	4.25	6.9718	101.52		
5	0.0045	2.9165	4.25	7.2041	100.90		
6	0.0042	2.7220	4.25	6.9821	100.23		

**2.2.9 供试品溶液的测定** 将 2.2.2 项和 2.2.3 项下的制备液, 分别进样 20  $\mu\text{L}$ , 测得峰面积, 由标准曲线回归方程计算得供试品浓度, 15% 乙醇洗脱物水苏糖量为 64.81% ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )。由于生地水提取物的出膏率为 60% ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 水提取物的 15% 乙醇洗脱物得率 6.63% ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 所以生地药材含水苏糖 2.56% ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )。

### 3 讨论

高效液相色谱法分析糖类化合物所用流动相一般为水和乙腈的二元混合溶液, 流动相配比视分离

组分的多少、相对分子质量范围、结构组成等不同而定。通过乙腈-水 (50:50)、乙腈-水 (65:35)、乙腈-水 (70:30)、乙腈-水 (80:20) 等不同的比例试验, 对于低聚糖水苏糖出峰时间选择乙腈-水 (70:30) 最好。

由于糖类的强极性, 能在氨基键合相柱中保留, 但氨基键合相柱的化学降解导致了其耐用性差, 用一段时间后就会出现保留能力降低、峰形差等柱效降低甚至损坏的情况, 所以长期使用此分析柱试验, 可见水苏糖保留时间拖延、峰形低、峰形差等现象, 这是氨基键合相柱的特点并非水苏糖的稳定性问题。

由于糖类缺乏发色基团, HPLC 法测定糖类时对检测器的要求很严格, 对于单糖多采用 ELSD<sup>[3]</sup> 检测器, 对于低聚糖和多糖多采用 RID 或低波长的 UV 检测器, 水苏糖作为地黄寡糖中的低聚糖, 经试验采用 RID 检测器效果较好。

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两种方法计算、比较。工作曲线回归方程法计算供试品中水苏糖含量和加样回收率中水苏糖含量的  $RSD$  分别为 1.04%, 3.51%; 用外标一点法计算供试品中水苏糖含量和加样回收率中水苏糖含量的  $RSD$  分别为 0.93%, 2.94%。由此可知, 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。所以建议在以后的试验中地黄寡糖含量测定采用外标一点法计算, 既可以减少对照品的浪费, 又可以降低计算带来的误差。

### [参考文献]

- [1] 张汝学, 樊俊杰, 贾正平, 等. 地黄中寡糖的提取分离工艺研究[J]. 解放军药学学报, 2005, 21(1): 34-36.
- [2] 赵学芳. 高效液相色谱法提取地黄低聚糖条件优选[J]. 卫生职业教育, 2006, 24(4): 126-128.
- [3] 陈琴鸣, 刘文英. HPLC-ELSD 在中药糖类分析中的应用[J]. 中草药, 2008, 39(6): 955-957.