

HPLC-ELSD 测定何首乌炮制过程中 单糖和双糖含量的变化

刘振丽^{1*}, 巢志茂², 李林福¹, 宋志前¹, 王 淳¹, 吕署一¹

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究何首乌炮制过程中内在成分的变化。方法: 采用高效液相色谱法, 以蒸发光散射检测器进行检测, 色谱柱为 Aminex HPX-87C; 水为流动相; 流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果: 随炮制时间的延长, 何首乌中的单糖 D-葡萄糖含量逐渐升高, D-果糖含量逐渐降低, 双糖蔗糖含量逐渐降低, 它们的总量也逐渐降低。结论: 何首乌在炮制过程中单糖和双糖含量不断变化。

[关键词] 何首乌; 炮制; 单糖; 双糖

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0006-03

[收稿日期] 2007-09-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30472191); 国家中医药管理局资助项目(04-052P64)

[通讯作者] * 刘振丽, Tel: (010) 64014411-2503; E-mail: zhenli_liu@sina.com.cn

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 经炮制后为制何首乌。生品具有解毒、消痈、润肠通便之功效, 炮制品具有补肝肾, 益精血, 乌须发等功效^[1]。其主要有效成分为蒽醌类、二苯乙烯苷类、磷脂类和糖类。研究结果显示, 何首乌炮制过程中既存在已知成分含量的变化^[2], 还有新的成分产生^[3]。经分离纯化和结构鉴定, 确定新产生的成分为 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF) 和 5-羟基麦芽酚(DDMP), 它们为糖的麦拉德反应的标志产物^[4]。目前对何首乌炮制前后糖类成分含量变化的研究, 都是以葡萄糖为对照品采用苯酚-硫酸法或蒽酮-硫酸法进行测定^[5,6]。而对于何首乌中单糖和双糖的组成种类以及它们在炮制过程中各自含量的变化未见报道。为深入研究何首乌炮制过程中内在成分的变化, 本文对何首乌炮制过程中单糖和双糖含量的变化进行了研究。

1 仪器、材料与试剂

高效液相色谱仪: HP1100, G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 恒温箱, HP 化学工作站。Alltech2000 蒸发光散射检测器。TCQ-250 超声波清洗器(北京医疗设备二厂); Sartorius CP 225D 电子天平。D-101 大孔吸附树脂(天津农药厂)。何首乌生品购自广东省德庆县德城镇药材公司, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。其制品为实验室依照中国药典方法, 自制不同时间的豆汁炖制品^[1]。D-无水葡萄糖(110833-200302)、D-果糖(111504-200001)、蔗糖(111507-200001)对照品购自中国药品生物制品鉴定所。水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 BIO-RAD Aminex HPX-87C(7.8 mm × 300 mm) 色谱柱; 水为流动相; 流速 0.6 mL·min⁻¹, 柱温 78℃。ELSD 检测器温度为 105℃, 载气流量 2.5 L·min⁻¹。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备和线性关系考察 精密称取 D-无水葡萄糖、D-果糖、蔗糖对照品, 加水分别制成每 1 mL 含 D-无水葡萄糖 1.458 mg、D-果糖 1.442 mg、蔗糖 1.56 mg 的溶液。分别精密量取等体积的上述对照品溶液混匀, 得到每 1 mL 含 D-无水葡萄糖 0.486 mg、D-果糖 0.481 mg、蔗糖 0.52 mg 的混合对照品溶液。分别精密吸取 3, 6, 9, 12, 15 μL, 注入液

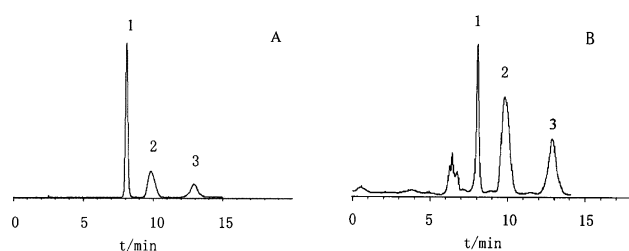


图 1 HPLC 色谱图

A. 对照品 B. 供试品

1. 蔗糖 2. D-葡萄糖 3. D-果糖

相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以测得的峰面积积分值的自然对数为纵坐标, 进样量的自然对数为横坐标(μg) 绘制标准曲线, 计算回归方程, D-无水葡萄糖: $Y = 4.52X + 1.75, r = 0.9999$, 表明 D-无水葡萄糖在(1.46~7.30) μg 具有良好的线性关系; D-果糖: $Y = 4.27X + 1.57, r = 0.9999$, 表明 D-果糖在(1.44~7.22) μg 具有良好的线性关系; 蔗糖: $Y = 5.48X + 1.51, r = 0.9998$, 表明蔗糖在(1.56~7.80) μg 具有良好的线性关系。

2.3 供试品溶液的制备 取何首乌生品及各制何首乌饮片粉末(过四号筛) 0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加入 80% 乙醇 100 mL, 80℃ 回流提取 4 h, 趁热滤过, 药渣用 80% 热乙醇洗涤 3 次, 每次 10 mL, 合并提取液和洗脱液, 60℃ 以下减压收干, 残渣加水 5 mL 使溶解, 摇匀, 过 D-101 大孔树脂柱(内径 1.5 cm, 长 15 cm), 以水 50 mL 洗脱, 收集洗脱液, 转移至 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 精密度试验 精密吸取同一炮制 32 h 的制何首乌样品溶液重复进样 5 次, D-无水葡萄糖峰面积积分值自然对数的 RSD 为 1.3%; D-果糖峰面积积分值自然对数的 RSD 为 1.9%; 蔗糖峰面积积分值自然对数的 RSD 为 2.0%。

2.5 稳定性试验 取炮制 32 h 的制何首乌样品溶液, 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定一次, D-无水葡萄糖峰面积积分值自然对数的 RSD 为 2.2%; D-果糖峰面积积分值自然对数的 RSD 为 0.9%; 蔗糖峰面积积分值自然对数的 RSD 为 2.5%。表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一炮制 32 h 的制何首乌样品 5 份, 按 2.3 项制备方法处理, 进行含量测定。D-无水葡萄糖含量的 RSD 为 1.0%; D-果糖含量的 RSD 为 2.9%; 蔗糖含量的 RSD 为 2.7%。

2.7 回收率试验 取已知含量的炮制 32 h 的制首

乌粉末 0.25 g 6 份,精密称定,分别精密加入 D-无水葡萄糖 D-果糖和蔗糖对照品,按 2.3 项处理,进行含量测定,计算 D-无水葡萄糖回收率为 98.8%,RSD 为 2.1%;D-果糖回收率为 98.7%,RSD 为 1.5%;蔗糖回收率为 98.8%,RSD 为 2.0%;结果见表 1 2 3。

2.8 含量测定 精密吸取对照品溶液 5 μL、10 μL,各供试品溶液(5~15) μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,计算样品中含量,结果见表 4。

表 1 D-葡萄糖回收率试验结果

供试品 取样量 (g)	供试品中 葡萄糖量 (mg)	添加的葡 萄糖量 (mg)	测得的葡 萄糖量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
0.250 21	19.56	20.00	39.25	98.5	98.8	2.1
0.252 34	19.73	20.00	38.87	95.7		
0.254 14	19.87	20.00	40.00	100.7		
0.249 69	19.52	20.00	39.49	99.8		
0.251 56	19.67	20.00	40.11	102.2		
0.252 37	19.73	20.00	38.96	96.1		

表 2 D-果糖回收率试验结果

供试品 取样量 (g)	供试品中 果糖量 (mg)	添加的 果糖量 (mg)	测得的 果糖量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
0.250 21	18.32	18.50	36.22	96.8	98.7	1.5
0.252 34	18.47	18.50	37.01	100.2		
0.254 14	18.60	18.50	37.05	99.7		
0.249 69	18.28	18.50	36.20	96.9		
0.251 56	18.41	18.50	37.01	100.5		
0.252 37	18.47	18.50	36.59	97.9		

表 3 蔗糖回收率试验结果

供试品 取样量 (g)	供试品中 蔗糖量 (mg)	添加的 蔗糖量 (mg)	测得的 蔗糖量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
0.250 21	2.224	2.250	4.494	100.9	98.8	2.0
0.252 34	2.243	2.250	4.521	101.2		
0.254 14	2.259	2.250	4.405	95.4		
0.249 69	2.220	2.250	4.419	97.7		
0.251 56	2.236	2.250	4.425	97.3		
0.252 37	2.244	2.250	4.502	100.4		

3 讨论与结论

试验中 HPLC-ELSD 图谱显示,从何首乌中检出的单糖为 D-葡萄糖和 D-果糖,双糖为蔗糖。未检出 D-半乳糖、乳糖、鼠李糖和木糖。测定结果(表 4)

表 4 何首乌炮制不同时间单糖和双糖含量测定结果(mg·g⁻¹)

炮制时间 (h)	D-葡萄糖	D-果糖	蔗糖	总量
0(生首乌)	15.35	250.66	66.40	332.41
16	67.52	94.28	29.99	191.79
32	78.18	73.20	8.89	160.27
60	87.39	60.62	5.36	153.37

显示,随炮制时间的延长,何首乌中 D-葡萄糖含量逐渐升高,而 D-果糖和蔗糖含量逐渐降低,它们的总量也随炮制时间的延长而降低,而且在炮制的前 16 h 各种成分含量的变化幅度最大。

各种糖类成分在炮制过程中可发生脱水 and 热降解反应,并且在何首乌中其它成分如氨基酸类的共同存在下,会发生非酶褐变的麦拉德反应。蔗糖是由 D-葡萄糖和 D-果糖组成,其在炮制加热的过程中发生降解,进而发生其它反应变化。糖类成分的含量随炮制时间的变化,反映了麦拉德反应的反应特点。何首乌炮制前后功效的改变必然与其内在成分与量的变化有关。研究这些变化,对阐明何首乌炮制原理具有重要意义。

在实验中何首乌采用 80% 乙醇提取,可溶性成分很多,采用了通过 D-101 大孔树脂柱纯化后进行 HPLC 测定,以减轻对色谱柱的污染。采用本测定方法进行测定,糖类成分的保留时间和峰面积对环境温度变化敏感,因此采用控制柱温箱温度的方法以保证测定结果的准确。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005. 122.
- [2] 刘振丽,宋志前,张玲. 不同炮制工艺对何首乌中成分含量的影响[J]. 中国中药杂志,2005,30(5):336.
- [3] 刘振丽,李林福,宋志前. 何首乌炮制前后高效液相色谱的变化[J]. 中草药,2005,36(11):1622.
- [4] Brands C. M, Alink G. M, van Boekel M. A, et al. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction[J]. J. Agric. Food Chem., 2000,48(6):2271-2275.
- [5] 赵声兰,赵荣华,解奉江,等. 炮制工艺对制何首乌饮片磷脂和总糖的影响研究[J]. 云南中医中药杂志,2005,26(5):33.
- [6] 丘小惠,孙景波,许东瑾,等. 不同炮制条件对何首乌水溶性糖含量和分子量的影响[J]. 上海中医药杂志,2007,41(4):69.