

生地黄低聚糖部位的 HPLC 指纹图谱

张杰, 刘炯, 张萌, 于雷, 杨云*
(河南中医学院 药学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:确定生地黄的低聚糖部位 HPLC 指纹图谱的测定方法,为道地产区生地黄以低聚糖类成分为指标的内在质量控制提供参考。方法:Agilent Zorbax NH₂ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 20 μL,检测器 ELSD,漂移管温度 90 ℃,氮气流速 3.0 L·min⁻¹,增益量 10,采用聚类分析和相似度分析对指纹图谱进行化学模式识别。结果:13 批生地黄低聚糖成分的各个色谱峰都得到了有效分离,确定了 12 个峰的特征指纹图谱,指认了其中的 6 个峰,样品分为了两类。结论:建立的 HPLC 指纹图谱可为生地黄以糖类成分为指标的内在质量控制提供依据。

[关键词] 怀地黄; 生地黄; 低聚糖; 高效液相色谱指纹图谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)22-0041-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220041
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.0951.004.html>
[网络出版时间] 2014-10-10 9:51

HPLC Fingerprint for Oligosaccharide Site Unprocessed Rehmanniae Radix

ZHANF Jie, LIU Jiong, ZHANG Meng, YU Lei, YANG Yun*
(College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] Objective: The aim of this paper was to study the HPLC fingerprint for oligosaccharides site in Rehmanniae Radix, and to provide reference for Rehmanniae Radix of the quality control according to the oligosaccharide composition. Method: Analysis was performed on an Agilent Zorbax NH₂ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the acetonitrile-water as mobile phase in gradient elution mode. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 ℃. The injection volume was 20 μL. The detector was ELSD, drift tube temperature was set at 90 ℃, nitrogen flow rate was set at 3.0 L·min⁻¹, and the gain volume was 10. Cluster analysis and principal component analysis were used to fingerprint pattern recognition. Result: Various peaks of thirteen batches of samples have been separated, and 12 peaks were identified as characteristic fingerprints in which six peaks were defined. And samples were divided into two categories. Conclusion: The established HPLC fingerprint can provide the basis for the quality control of Rehmanniae Radix.

[Key words] Huai-Rehmanniae Radix; Rehmanniae Radix; oligosaccharides; HPLC fingerprint

地黄秋季采挖,除去芦头、须根及泥沙,鲜用;或将地黄缓缓烘焙至约八成干。前者习称“鲜地黄”,后者习称“生地黄”^[1]。生地黄具有清热凉血、养阴生津等功效;熟地黄具有滋阴补血、益精填髓等功

效^[2]。目前发现多糖及其复合物中的糖链是生命科学中除肽链、核苷酸链之外具有重大生物学意义的第三链^[3]。小分子糖同样是一类具有较好生物活性的物质,如巴戟天小分子糖有抗应激药理活性,

[收稿日期] 20140429(015)
[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI006B02)
[第一作者] 张杰,硕士,从事中药活性物质研究与开发研究, E-mail: zhangjie198876@126.com
[通讯作者] * 杨云,教授,从事中药活性物质的研究与开发研究, E-mail: Yyun@china.com.cn

地黄小分子糖能够改善造血功、抗肿瘤、增强免疫^[4-5],水苏糖对亚临床肝性脑病具有治疗作用^[6]。基于此,本研究采集了道地产区的 13 批生地黄样本,并采用 HPLC 对 13 批生地黄样本中的主要低聚糖成分进行了指纹图谱研究,为道地产区生地黄药材的内在质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 2695 型高效液相色谱仪(包括 2424 型 ELSD 检测器,美国 Waters 公司),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯公司),AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler),ZK-82A 型真空干燥箱(上海市仪器总厂),XJA-100A 型微型高速粉碎机(姜堰市银河仪器厂)。

1.2 试药 蔗糖(sucrose,批号 111507-200302),半乳糖(批号 100226-201105)购自中国食品药品检定研究院,果糖(批号 BBT0163),葡萄糖(glucose,批号 BBT0176),棉籽糖(raffinose,批号 BBT0177),水苏糖(stachyose,批号 BBT0176)均购自天津一方科技有限公司,纯度均 >98%。乙腈为色谱纯,试验用水均为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材 怀地黄样品 13 批,全部采自道地产区温县,其中地黄规范化种植基地 6 批,所有样品经由本院生药教研室董诚明教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的新鲜块根,标号为 S1 ~ S13。全部为栽培品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax NH₂ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 72% ~ 70% A; 10 ~ 60 min, 70% A; 60 ~ 90 min, 70% ~ 72% A),记录时间 60 min,恢复平衡时间 30 min,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 20 μL,检测器 ELSD,漂移管温度 90 ℃,氮气流速 3.0 L · min⁻¹,增益 10。

2.2 供试品溶液的制备 生地黄由鲜地黄新鲜块根于 60 ℃ 烘箱中烘至约八成干,切成约 5 mm 小块,80 ℃ 减压干燥 24 h 后,粉碎成细粉^[1],过 80 目筛,装袋密封置于干燥器内室温保存,得生地黄粉末。

精密称取生地黄样品粉末 2 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密量取并加入水 30 mL,称定质量,100 ℃ 水浴回流 1.5 h,放至室温,溶剂补足失重,自然过滤,弃去初滤液,取续滤液 20 mL,以等量石油醚、乙酸乙酯依次萃取^[7],精密量取萃取后的水液 10 mL 置蒸发皿中,60 ℃ 水浴挥干,残渣以 70% 乙腈溶解

并定容至 5 mL 量瓶,摇匀,置冰箱中 4 ℃ 冷藏备用,临用前过 0.22 μm 微孔滤膜即得。

2.3 对照品溶液的制备 取水苏糖、棉籽糖、蔗糖、葡萄糖、果糖对照品各 5 mg,精密称定,置 5 mL 量瓶中,加 70% 乙腈 3 mL 超声溶解,并定容至刻度,摇匀,临用前过 0.22 μm 微孔滤膜即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL,连续进样 5 次,记录各共有峰保留时间和峰面积,计算各个共有峰相对保留时间、相对峰面积以及 RSD,结果显示相对保留时间 RSD 在 0.43% ~ 1.68%,相对峰面积 RSD 在 1.34% ~ 3.09%。说明该仪器精密度良好,符合指纹图谱检测要求。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液 20 μL,分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进行测定,记录各个共有峰相对保留时间、相对峰面积以及 RSD,结果显示,相对保留时间 RSD 在 0.31% ~ 1.40%,相对峰面积 RSD 在 1.46% ~ 3.55%,说明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批药材样品 5 份,按照供试品溶液制备方法进行制备,连续进样,计算各个共有峰相对保留时间、相对峰面积以及 RSD,结果显示,相对保留时间 RSD 在 0.38% ~ 2.52%,相对峰面积 RSD 在 2.16% ~ 4.42%,说明样品制备工艺重复性良好。

2.5 特征图谱的构建和解析

2.5.1 共有模式的建立 对 13 批生地黄的指纹图谱进行分析,以棉籽糖作为参考峰,以峰的共有率 > 90% 为依据,用软件 Chromap 1.5 对 13 批生地黄黄色谱图进行了处理,标定了 12 个共有峰,建立的生地黄低聚糖部位的特征图谱,见图 1。12 个共有峰面积之和均占原有色谱图所有峰面积的 90% 以上,共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.20% ~ 1.57%,相对峰面积的 RSD 在 18.74% ~ 47.90%。用此图谱可以作为生地黄以低聚糖部位为指标的评价标准。其中 7.31 min 峰是果糖,8.09 min 峰是葡萄糖,8.51 min 峰是半乳糖,10.24 min 峰是蔗糖,16.85 min 峰是棉籽糖,28.47 min 峰是水苏糖。

2.5.2 相似度计算 运用国家药典委员会制定的《中药指纹图谱相似度计算软件》2004 A 版,对 13 批样品中的指纹图谱进行了处理。按照药典委员会对中药材指纹图谱的处理方法的建议,本实验采用中位数法生成对照指纹图谱,时间窗宽度经试验得出 0.25 之后就稳定了,并经多点校正和色谱峰自动

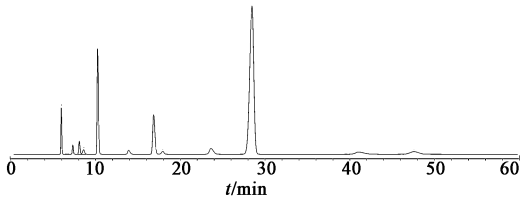


图1 生地黄低聚糖部位的 HPLC 特征谱

匹配,得出 13 批样品的相似度,结果见图 2,表 1。

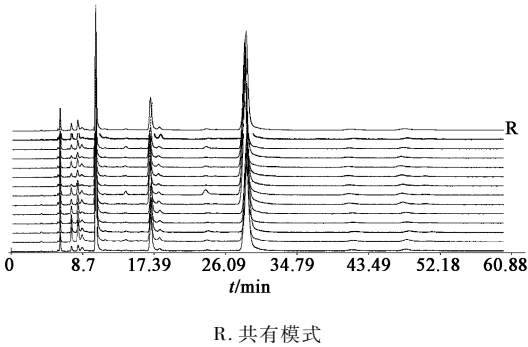


图2 13 批生地黄样品低聚糖部位 HPLC

表 1 13 批生地黄样品的样品信息及相似度计算

No.	品种	产地	相似度
S1	85-5	温县宛西制药怀药生产基地	0.998
S2	生津一号	温县宛西制药怀药生产基地	0.983
S3	山西种	温县宛西制药怀药生产基地	0.982
S4	沁怀一号	温县宛西制药怀药生产基地	0.973
S5	红薯王	温县宛西制药怀药生产基地	0.979
S6	北京 3 号	温县宛西制药怀药生产基地	0.995
S7	北京 3 号	孟州市化工镇高桥村	0.99
S8	北京 3 号	孟州市化工镇刘庄村	0.982
S9	北京 3 号	孟州市化工镇许庄村	0.992
S10	怀丰号	武陟县大封镇大司马村	0.998
S11	北京 3 号	武陟县大封镇东岩村	0.988
S12	沁怀 1 号	武陟县大封镇大司马村	0.997
S13	北京 3 号	温县南张羌镇朱家庄	0.894

从相似度的结果上看,只有 S13 样品的与对照图谱的相似度较低为 0.894,其他的样品的相似度都在 0.97 以上。因此,所测的 13 批样品可以分为两类,S13 为 I 类,其他的为 II 类,II 类的质量优于 I 类。这 13 批样品指纹图谱的匹配峰面积 RSD 和波动都较大,得出的相似度结果和范围都应该较大,但得出的确是相似度结果较大波动较小,所以 2004A 版相似度计算软件更倾向于对所测样品的定性分析,对于样品所含成分含量计算权重较小。因此,对于质量控制还需要结合其他分析方法。

2.5.3 聚类分析 运用软件 CHROMAP 1.5 对 13

批生地黄低聚糖部位的 HPLC 图谱进行聚类,Data pretreatment 选项为 Uniformization,聚类结果树状图见图 3。从结果上可以看出,样品分为两类时,I 类为 S11,S9,S10,S13,S3,S8,S1,S2,II 类为 S6,S12,S7,S5,S4。

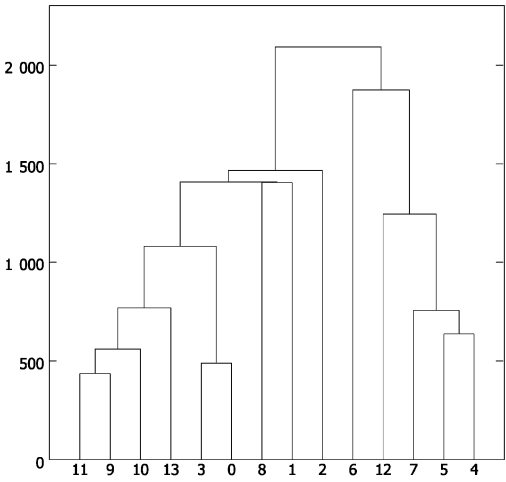


图3 13 批生地黄样品聚类分析

把 1 号峰(5.96 min),5 号峰(10.24 min),7 号峰(16.85 min),10 号峰(28.47 min),确定为四强峰,绝对面积之和大于所在色谱图所有峰面积之和的 80%。根据四强峰的大小把样品分为两类时,I 类为 S2,S4,S5,S7,S9,S10,S11,S13,其他的为 II 类。结合相似度分析和聚类结果,把 13 批样品分为两类时,I 类为 S1,S3,S5,S6,S7,S8,S9,S12,其他的为 II 类,从分类的结果上看,I 类样品的共有峰和四强峰的绝对面积皆大于 II 类,所以 I 类质量优于 II 类。

3 讨论

本实验所采地黄样品虽属同一产地但属于不同培育品种,生地黄的炮制为实验室炮制,这样降低了生地黄炮制过程对分析结果的影响。

考察了超声法、回流法、水浴 1,1.5,2 h 提取方法,通过记录和对各供试品溶液在 60 min 内的色谱图,选择色谱峰数量多、峰形好、含量高、分离度好的作为供试品溶液制备方法,得出水浴提取的方法结果较好。

由于糖类成分在正常的紫外区域和可见光范围内没有吸收,也无荧光,所以,不经过衍生的低聚糖不适合使用紫外检测器和荧光检测器^[8]。示差折光检测器和蒸发光散射检测器都属于通用型检测器,故本实验对两种检测器进行了优选。由于示差折光检测器不适用于梯度洗脱^[9-10],故首先考察了

示差折光检测器等度洗脱条件,图谱基线平稳,但保留时间较短的成分分离效果不好;而蒸发光散射检测器适用于梯度洗脱,并且图谱基线平稳,各成分分离效果较好。因此,笔者采用蒸发光散射检测器建立了地黄低聚糖部位的 HPLC 指纹图谱。

在流动相的筛选中,考察了用甲醇-水尝试等度洗脱的可行性,结果发现等度洗脱分离效果远不及梯度洗脱,且将甲醇换为乙腈能使分离效果明显提高。用乙腈-水进行梯度洗脱,可使保留时间较短的成分得到较好分离,且基线平稳,结合对照品确定各低聚糖峰大致均匀分布于 5 ~ 60 min 之间,60 min 后无峰出现,故选择乙腈-水梯度进行洗脱 80 min,其中 60 ~ 80 min 为色谱柱回冲时间,不采集色谱图。

[参考文献]

[1] 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, 2010:115.

[2] 刘卫欣,刘克伟,杜海涛,等. 地黄及其活性成分药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36 (4):277.

[3] 崔瑛,王君明,冯志毅,等. 地黄对家兔阴虚热盛证型发热的解热作用[J]. 河南中医,2007,27 (1):31.

[4] 刘福君,赵修南,聂伟,等. 地黄低聚糖增强小鼠免疫功能的作用[J]. 中国药理学通报,1998,14(1):90.

[5] 戴慧,高晓明. 多糖特异性免疫识别的分子机制及其免疫生物学意义[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25 (1):35.

[6] 李瑞军,吕栋,廖胜东,等. 中药提取物水苏糖治疗亚临床肝性脑病 30 例[J]. 中国新药杂志,2003,12 (6):469.

[7] 于雷,李晓坤,张华锋,等. RP-HPLC-RID 法同时测定怀地黄中单糖、低聚糖的含量[J]. 药物分析杂志, 2013,33(6):977.

[8] 温学森,杨世林,马小军,等. 地黄在加工炮制过程 HPLC 谱图的变化[J]. 中草药,2004,35(2):153.

[9] 邱建国,张茹学,贾正平,等. HPLC 法测定地黄及含地黄成药中寡糖[J]. 中草药,2010,41(12):1997.

[10] 边宝林,王宏杰,倪慕云,等. 地黄及其炮制品中总糖及几种主要糖的含量测定[J]. 中国中药杂志,1995, 20(8):469.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届全国期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www. cjcmm. com. cn