

HPLC 测定铁皮枫斗颗粒中甘露糖的含量

洪涛(浙江天皇药业有限公司, 浙江 天台 317200)

摘要: 目的 建立铁皮枫斗颗粒中铁皮石斛多糖水解产物甘露糖的含量测定方法。方法 采用 HPLC, 色谱柱采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 的乙酸铵溶液(20:80); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 250 nm。结果 甘露糖进样量在 80.64~403.20 μg 内呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$), 平均加样回收率为 98.52%, RSD 为 1.35%($n=6$)。结论 该方法简便可靠, 结果稳定, 重复性好, 可准确测定铁皮枫斗颗粒中甘露糖的含量, 且该方法较以前测定人参皂苷 Rb1 的方法更加合理, 可用于铁皮枫斗颗粒的质量控制。

关键词: 甘露糖; 铁皮枫斗颗粒; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0650-03

Determination of Mannose in TiePiFengDou Granules by HPLC

HONG Tao(Zhejiang Tianhuang Pharmaceutical Co., Ltd., Tiantai 317200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The HPLC method for determination of Mannose in TiePiFengDou granules was established. **METHODS** In this method, Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. Mobile phase consisted of acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ of ammonium acetate (20:80). Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and detection wavelength was 250 nm. **RESULTS** Mannose had a good linearity within the range of 80.64~403.20 μg. The average recovery was 98.52%, RSD=1.35%($n=6$). **CONCLUSION** The method is accurate, convenient and reproducible. Results are stable. The method can be applied for accurately determination of mannose in TiePiFengDou granules and it is more reasonable than the determination of ginsenoside Rb1 as quality standard. The method can be used as the quality control of TiePiFengDou.

KEY WORDS: mannose; TiePiFengDou granules; HPLC

铁皮枫斗颗粒系滋阴生津类中药产品, 由铁皮石斛^[1-3]、西洋参组成。铁皮石斛的主要功效成分是铁皮石斛多糖, 具有抗氧化作用^[4]。原方法测定西洋参成分人参皂苷 Rb1 含量, 不能控制其主药铁皮石斛含量, 本实验采用 HPLC 测定铁皮枫斗颗粒中铁皮石斛多糖水解产物甘露糖含量。甘露糖是铁皮石斛多糖的主要构成成分, 并与多糖含量成正比, 本方法专属性强、重复性好, 旨在为铁皮枫斗颗粒的质控提供一种有效的控制手段。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AE240 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; LG10-2.4A 型高速离心机(北京医用离心机厂)。

甲醇(分析纯, 杭州高晶精细化工有限公司); 甲醇(色谱纯, 天津市四友精细化学品有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津市四友精细化学品有限公司); 水为超纯水; 甘露糖对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 091212, 供含量测定用); 铁皮枫斗

颗粒(浙江天皇药业有限公司生产, 批号: 101202)为市售品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 的乙酸铵溶液(20:80); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃, 检测波长: 250 nm。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取甘露糖对照品约 0.01 g, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液(精密称取盐酸氨基葡萄糖约 1.2 g, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀即得)1 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 400 μL 于具塞离心管中, 按“2.3.3”项下方法进行衍生化, 分离收集上清液, 即得对照品溶液。对照品色谱峰见图 1C。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 样品提取 铁皮枫斗颗粒碾粉, 过 3 号筛, 取本品约 1 g, 精密称定, 用 80%乙醇 60 mL 索氏

作者简介: 洪涛, 男, 药师 Tel: (0576)83901220 E-mail: 53458283@qq.com

提取 6 h, 弃去乙醇液, 挥干多余乙醇, 残渣用热水溶解并转移至 50 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 精密量取 10 mL 于试管中, 精密加入内标盐酸氨基葡萄糖溶液 200 μ L, 混匀, 即得样品提取液。

2.3.2 样品水解 样品提取液离心(转速: 4 000 $r \cdot \min^{-1}$, 时间: 8 min), 精密取上清液 1 mL 置于安瓿瓶中, 加 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 0.5 mL, 封口, 110 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 冷却后用 NaOH 中和至中性, 即得样品水解溶液。

2.3.3 样品衍生化 精密取样品水解溶液、0.3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH、0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮)甲醇溶液各 400 μ L, 置具塞离心管中, 密塞, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 100 min, 放冷, 加 0.3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 0.5 mL, 加入三氯甲烷 2 mL, 振荡器振摇 1 min, 放置分层, 弃去三氯甲烷液, 同法萃取 3 次, 水层液离心, 收集上清液, 即得供试品溶液。样品色谱峰见图 1D。

2.4 空白试验

2.4.1 阴性对照液的制备 按处方组成, 按工艺要求制成缺铁皮石斛的阴性对照液。按“2.1”项下色谱条件测定, 结果在甘露糖峰出现的位置上无对应峰出现, 表明其他组分对测定无干扰。阴性对照色谱峰见图 1A。

2.4.2 缺内标供试品液的制备 按“2.3”项下方法制备缺内标盐酸氨基葡萄糖的供试品液。按“2.1”项下色谱条件测定, 结果在内标峰出现的位置上无对应峰出现, 表明其他组分对内标测定无干扰。色谱峰见图 1B。

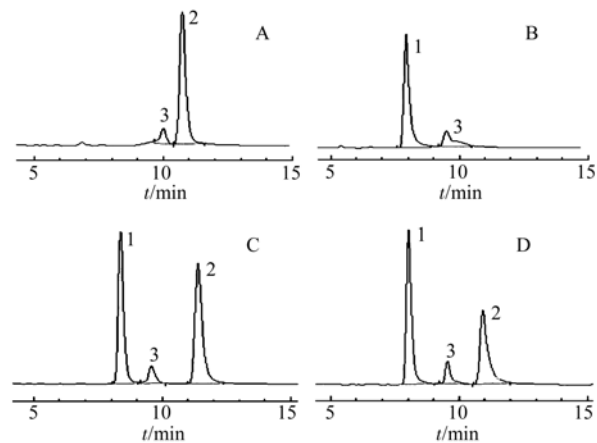


图 1 高效液相色谱图

A—空白样品溶液; B—缺内标的供试品溶液; C—对照品溶液; D—供试品溶液; 1—甘露糖; 2—内标(盐酸氨基葡萄糖); 3—PMP

Fig 1 HPLC chromatograms

A—blank; B—standard solution(no internal standard); C—sample solution; D—standard solution; 1—mannose; 2—internal standard; 3—PMP

2.5 标准曲线及线性范围

精密称取甘露糖对照品 10.08 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备液, 分别精密吸取甘露糖对照品储备液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 至 10 mL 具塞离心管中, 用水补足至 1 mL, 均精密加入内标溶液(浓度为 0.240 64 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)1 mL, 按“2.3.3”项下方法进行衍生化, 精密吸取此 5 种溶度对照品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 以色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=2.107\ 4 \times 10^2 X+5.572\ 8$, $r=0.999\ 8$, 结果表明: 甘露糖在 80.64~403.20 μg 内线性关系良好。

2.6 仪器精密度试验

精密吸取同一对照品溶液 10 μ L, 连续进样 7 次, 测定甘露糖峰面积, 其 RSD 为 0.25%。

2.7 重复性试验

取同一批号的样品 5 份, 分别测定, 结果甘露糖平均含量为 21.17 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.61%。

2.8 稳定性试验

取供试品溶液, 每天进样 1 次, 每次 10 μ L, 结果甘露糖色谱峰面积在 5 d 内基本无变化, RSD 为 1.33%, 表明在本实验条件下稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

铁皮枫斗颗粒碾粉, 过 3 号筛, 取本品 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 加入对照品及内标。用 80% 乙醇索氏提取 6 h 后, 弃去乙醇液, 挥干多余乙醇, 残渣用热水溶解并转移至 50 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 精密取此溶液 10 mL 于试管中, 按“2.3”项下方法制备, 分别依法测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果($n=6$)

Tab 1 Results of sample recovery test($n=6$)

样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
12.071 5	12.113 8	24.061 2	98.98	98.52	1.35
12.162 6	12.113 8	24.334 9	100.50		
12.024 1	12.113 8	23.846 3	97.59		
11.967 8	12.113 8	23.874 2	98.29		
12.102 8	12.113 8	23.812 3	96.66		
12.034 7	12.113 8	24.043 6	99.13		

2.10 样品测定

分别精密吸取对照品与供试品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪中, 测定其中甘露糖的色谱

峰面积及内标峰面积, 以内标法计算甘露糖含量。结果见表 2。铁皮枫斗颗粒中甘露糖含量均 $\geq 21.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

表 2 样品含量测定结果($n=5$)

Tab 2 The results of content in the sample($n=5$)

批 号	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
101202	26.45	0.64
101205	23.47	0.59
101206	25.14	1.23
101207	23.25	1.80
101208	24.69	1.12

3 讨论

因甘露糖为己糖结构, 在紫外无吸收, 直接采用紫外法或 HPLC 无法测定。甘露糖与 PMP 中比喹啉酮基作用生成 PMP-Man 衍生物, 衍生物中含有苯基结构, 在 250 nm 波长处有强紫外吸收^[5-6]。本研究先将铁皮枫斗颗粒中铁皮石斛多糖水解成单糖后与 PMP 进行衍生化, 再用 HPLC 测定甘露糖的含量。结果显示, 本法不仅灵敏、专属性强、分离度高, 可适用于本品的质控, 而且先将铁皮石斛多糖水解成单糖后再测定甘露糖(甘露糖为单糖, 在萃取过程中可以去除)含量, 避免了制剂中人为加入甘露糖的干扰。

本实验在选择流动相时, 用乙腈- $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酸铵溶液(20:80)为流动相, 甘露糖、PMP 和内标的色谱峰达到基线分离, 分离效果较好。对铁皮石斛多糖水解条件的选择试验, 发现用 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 110°C 水解 1 h 即可水解完全。衍生化条件考察试验, 发现采用本实验衍生化条件可彻底使甘露糖衍生化。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 265-266.
- [2] BAO X S, SHUN Q S, CHEN L Z. Chinese medicinal dendrobium [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 2001: 56-60.
- [3] YANG H, WANG S C, WANG Z T, et al. Dendrobium polysaccharides research [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2004, 39(4): 254-256.
- [4] YANG B X, YU S K, SUN J J, et al. Assessment of dendrobium candidum and soybean isoflavone's synergistic antioxidative function [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(11): 885-887.
- [5] WANG J, WANG Q, XIANG W S. Chromatography to the analysis of carbohydrates in the application [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2001, 29(2): 222-227.
- [6] ZHANG L, ZHANG X, YOU J M, et al. Analysis of neutral saccharides by HPLC after pre-column derivatization with 2-(9-Carbazole)-ethoxycarbonyl hydrazide [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2004, 32(8): 1002-1005.

收稿日期: 2011-06-10