

HPLC-ELSD 测定地黄寡糖中地黄苷 A 含量

刘影^a, 杨菁^{a*}, 王晶^b, 刘涛^a(辽宁医学院, a.药学院; b.附属第一医院, 辽宁 锦州 121000)

摘要:目的 建立测定地黄寡糖中地黄苷 A 的高效液相色谱法。方法 采用 Agilent TC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相: 甲醇-水(10:90), 流速 1.0 mL·min⁻¹; ELSD 参数: 漂移管温度 110 °C, 载气流量 3.2 L·min⁻¹。结果 地黄苷 A 在 0.2~1.2 mg·mL⁻¹($r=0.9993$)内线性关系良好, 平均回收率为 98.8%(RSD=1.6%)。结论 该方法准确、简便、专属性好, 可用于地黄寡糖中地黄苷 A 成分的含量测定, 为地黄寡糖的质量控制提供了依据。

关键词: 地黄寡糖; 地黄苷 A; 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)11-1223-03

Determination of Rehmannioside A in *Rehmannia Glutinosa* Oligosaccharide by HPLC-ELSD

LIU Ying^a, YANG Jing^{a*}, WANG Jing^b, LIU Tao^a(Liaoning Medical University, a.Faculty of Pharmacy; b.First Affiliated Hospital, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method to determine the content of rehmannioside A in *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide. **METHODS** The HPLC-ELSD was used with Agilent TC C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 35 °C. The mobile phase was methanol and water(10:90) with a flow rate 1.0 mL·min⁻¹; The temperature of the drift tube in ELSD was 110 °C and the flow rate of dry air was 3.2 L·min⁻¹. **RESULTS** The rehmannioside A had a good linear relationship between 0.2-1.2 mg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The method is accurate, simple with good specificity, and it could be used to determine the content of rehmannioside A in *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide, which may be providing a evidence for the quality control of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide.

KEY WORDS: *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide; rehmannioside A; HPLC; ELSD

生地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的干燥块根。具有清热凉血、养阴生津的功效, 味甘, 性寒, 归心、肝、肾经^[1]。地黄寡糖是以地黄为原料, 经特定工艺制备的提取液^[2]。笔者以往研究发现, 地黄寡糖(*Rehmannia glutinosa* oligosaccharide, ROS)对谷氨酸导致的细胞损伤具有保护作用^[3]; 可剂量依赖性地增强缺血再灌注损伤大鼠的学习记忆能力, 降低海马谷氨酸含量, 提高海马磷酸化细胞外信号调节激酶 2 含量^[4]; 能够使大鼠海马组织的乙酰胆碱含量明显升高^[5]。还有人研究地黄寡糖对高胰岛素诱发的 HepG2 细胞胰岛素抵抗具有明显的改善作用^[6]。因此, 笔者对地黄寡糖的成分进行一系列的研究, 地黄苷 A 是地黄寡糖中的有效成分, 且地黄苷 A 具有良好的稳定性。地黄苷 A 能够明显改善环磷酸胺所致的小鼠白细胞和血小板减少及明显改善骨髓有核细胞数和 DNA 含量^[7],

还具有滋阴的效果, 增强体液免疫和细胞免疫功能^[8]。

本实验测定了地黄寡糖中的地黄苷 A 的含量。为地黄寡糖的质量控制提供参考。

1 仪器与材料

L-2000 高效液相色谱仪(日本日立公司), L-2130 四元梯度泵, L-2455 二极管阵列检测器, D-2000 Elite 色谱工作站, 蒸发光散射检测器(美国奥泰公司)。

乙腈、甲醇和甲酸均为色谱纯, 重蒸水为自制; 地黄苷 A 对照品(上海展舒化学科技有限公司, 批号: 20120501, 纯度>98.0%); 地黄(产自河南省武涉县西陶镇, 批号: 20110305, 由锦州奥鸿药业有限责任公司质量部工程师瞿建按中国药典 2010 年版一部地黄质量标准检验, 符合规定), 地黄寡糖自制(批号: 20120301, 20120302, 20120303)。

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20072202); 辽宁省教育厅资助课题(20060528)

作者简介: 刘影, 女, 硕士, 实验师 Tel: (0416)4673017 E-mail: ly924_1979@163.com *通信作者: 杨菁, 男, 博士, 教授 Tel: (0416)4673465 E-mail: jzyangjing@gmail.com

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的地黄苷 A 对照品 0.6 mg, 置于 1 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备^[2] 取 10 kg 地黄粉碎成 <2 mm 的颗粒, 用 25 L 注射用水浸泡 5 h, 离心取上清得上清液约 22 L, 将上清液于 35 °C 下真空浓缩至 10 L, 加入 95%乙醇 40 L 混合, 离心取上清 0.45 L 膜过滤, 得过滤液 48 L, 过滤液于 35 °C 下真空浓缩, 得浓缩液 10 L, 用截留分子质量为 5 ku 的超滤器将浓缩液超滤得超滤液约 9.5 L, 将超滤液用活性炭吸附, 膜过滤除菌分装。按质量标准检测, 符合规定: ①总固体含量为 18~22 g·L⁻¹; ②苯酚硫酸法测定总糖含量 85%以上, 其中含水苏糖 55%~65%, 梓醇 6%~12%; ③用高效液相色谱法, 以 TSK-2000swxl 色谱柱为固定相, 乙腈-三氟醋酸-水(40:0.1:60)为流动相, 检测波长 190 nm, 将先于胰岛素保留时间的峰视为高分子物质, 按归一化法计算高分子物质含量, 高分子物质含量<2%; ④在硅胶 G 板上, 以乙酸乙酯:乙醇:水:氨水(5:5:4:0.3)为展开剂, 展开 15 cm, 喷以 5%硫酸乙醇溶液为显色液, 可见有 Rf 值为 0.25, 0.42, 0.55 和 0.79 的 4 个斑点。

2.2 方法学验证

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent TC C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相: 甲醇-水(10:90), 流速 1.0 mL·min⁻¹; ELSD 参数: 漂移管温度 110 °C, 载气流量 3.2 L·min⁻¹, 载气为空气。分离度均>1.5, 理论板数按地黄苷 A 计算≥3 000, 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 各成分色谱峰峰型对称, 地黄苷 A 与其他峰能够基线分离。

2.2.2 标准曲线的制备 分别精密称取地黄苷 A 对照品适量, 加水配制成浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg·mL⁻¹ 的系列溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定。以溶液浓度的自然对数(X)为横坐标, 峰面积积分值的自然对数(Y)为纵坐标, 制备标准曲线, 得回归方程为 $Y=0.828 2X-4.132 4(r=0.999 3)$ 。结果表明地黄苷 A 的含量在 0.2~1.2 mg·mL⁻¹ 内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.3 仪器精密度考察 精密吸取同一对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 每次 10 μL, 测定地黄苷 A 峰面积积分值。结果显示保留时间稳定, 峰面积的 RSD=0.46%(n=6), 表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性考察 取批号为 20120301 的地黄寡糖 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 计算地黄苷 A 含量的 RSD 为 1.6%, 结果表明该方法重复性良好。

2.2.5 稳定性考察 精密吸取同一对照品溶液, 室温下放置, 于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。测得地黄苷 A 峰面积的 RSD 为 1.3%。结果表明地黄苷 A 在 12 h 内稳定。

2.2.6 加样回收率 精密称取已知含量的地黄寡糖 9 份, 每份 1 mL, 分别定量加入地黄苷 A 对照品溶液(0.6 mg·mL⁻¹)2, 1, 0.5 mL, 每个浓度重复 3 次, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 计算加样回收率。结果平均回收率为 98.8%, RSD=1.6%。

表 1 地黄苷 A 回收率实验

Tab 1 Results of recovery test of rehmannioside A

样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
0.630 6	1.2	1.815 5	98.74		
0.631 2	1.2	1.843 8	101.05		
0.629 7	1.2	1.818 5	99.07		
0.597 1	0.6	1.175 6	96.42		
0.598 1	0.6	1.175 9	96.31	98.8	1.6
0.597 6	0.6	1.189 4	98.63		
0.640 6	0.3	0.943 7	101.06		
0.640 7	0.3	0.938 5	99.27		
0.640 2	0.3	0.936 4	98.73		

2.3 样品含量测定

取不同批号的样品, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 结果见表 2。样品和对照品的高效液相色谱图见图 1。

表 2 地黄寡糖中地黄苷 A 测定结果

Tab 2 Content of rehmannioside A in ROS

批次	地黄苷 A 平均含量/mg·mL ⁻¹	RSD/%
20120301	0.625 4	1.3
20120302	0.596 2	0.8
20120303	0.638 1	1.5

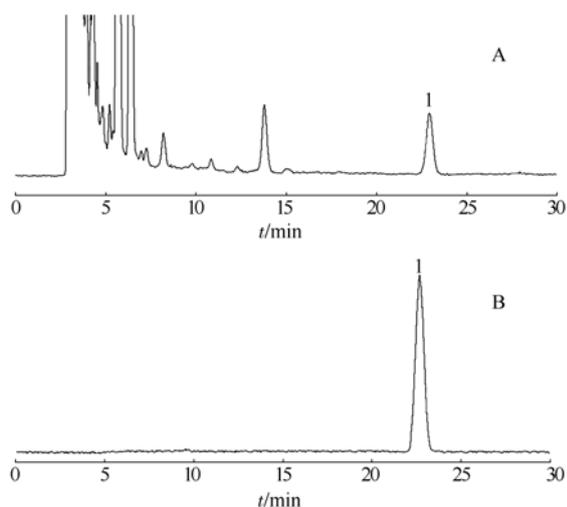


图 1 HPLC 色谱图

A-样品; B-对照品; 1-地黄苷 A

Fig 1 HPLC chromatograms

A-sample; B-control; 1-rehmannioside A

3 讨论

地黄苷 A 为环烯醚萜双糖苷, 有研究发现其热稳定性优于梓醇, 且地黄苷 A 的含量较高, 推测其可能是地黄寡糖的有效成分之一, 因此测定地黄寡糖中地黄苷 A 的含量对地黄寡糖中药效学研究非常重要。通过查阅文献对流动相进行考察, 选取乙腈水和甲醇水 2 种体系进行分离, 结果 2 种体系均在 10:90 分离效果好, 地黄苷 A 能与其他成分达到基线分离, 由于甲醇在价格和毒性上都优于乙腈, 因此选择甲醇水系统为流动相。

对于检测器的选择, 地黄苷 A 结构中只有一个双键, 无共轭结构, 紫外光谱存在末端吸收。文献报道^[9]均采用紫外检测器 203 nm 作为吸收波长。本实验采用紫外检测器进行了实验, 结果表明, 其他成分对地黄苷 A 干扰严重, 不能有效检测地黄苷 A。而在蒸发光散射检测器上, 显示检测效果很好。蒸发光散射检测器为通用型质量检测器, 检测时流动相在检测器内挥发成气体, 样品组分形成气溶胶, 进入检测室产生响应, 响应大小由被分析物质的颗粒数量和大小决定, 从而

获得理想的基线和检测的灵敏度, 克服了紫外末端检测的不足^[10]。

蒸发光散射检测器较易受漂移管温度及气体流速等参数的影响, 在色谱条件筛选过程中, 通过调整流动相的比例、漂移管温度和载气流速, 来考察地黄苷 A 与其他成分的分离情况, 选择最佳的参数。当气体有稳定的流速和压力, 所用溶剂和气体有一定的纯净度后, 能够保证测定结果的重复性和基线的稳定性。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 115.
- [2] YANG J, WANG H X, YUE C L. *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide and its extraction method: China, 2006100888 5017 [P]. 2008-06-041.
- [3] SHI J L, YANG J, XU X L. The effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on the damage induced by glutamate in hippocampal neurons [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2009, 25(3): 357-360.
- [4] YANG J, SHI H Y, LI Y, et al. Effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on learning and memory abilities in rats with focal cerebral ischemia and reperfusion injury [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2008, 22(3): 165-169.
- [5] SHI H Y, LI Y, SHI J L, et al. The effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on learning and memory abilities and cerebralach in rat with vascular dementia [J]. *Clin Pharmacol Tradit Chin Med*(中药药理与临床), 2008, 24(2): 27-29.
- [6] GUO L M, ZHANG R X, JIA Z P, et al. Effects of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on proliferation of HepG2 and insulin resistance [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32(13): 1328-1332.
- [7] YU Z, WANG J, LI G S. Effect of rehmanioside A on cyclophosphamide induced leukopenia in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 32(11): 1002-1004.
- [8] WANG J, YU Z, LI G S. Experimental study on rehmanioside A in nourishing yin and regulating immune functions [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2002, 37(1): 20-22.
- [9] LIU M, LI G S, WANG H S. Study on quality standard of *Radix Rehmanniae praeparata* [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(9): 1311-1313.
- [10] LI C J, GUO F Y. Studies on the determination of sachydrine hydrochloride in Compound Motherwort Capsules by HPLC-ELSD [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(1): 72-74.

收稿日期: 2013-03-05