

生地黄不同炮制阶段寡糖和梓醇的变化研究

邱建国, 张汝学, 贾正平*, 李茂星, 张泉龙, 周 璿, 尉丽力

兰州军区兰州总医院 药材科, 全军高原环境损伤防治重点实验室, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 考察生地黄不同炮制阶段所含地黄寡糖和梓醇量的变化。方法 采用水为溶媒, 超声提取不同炮制阶段生地黄中寡糖类成分, 流动相用乙腈-水 (72:28), 体积流量 1.0 mL/min, NH₂ 色谱柱分离, 示差折光检测器检测, HPLC 法测定; 采用甲醇为溶媒, 超声提取梓醇, 流动相用甲醇-0.1%磷酸溶液 (1:99), 体积流量 1.0 mL/min, C₁₈ 色谱柱分离, 检测波长 210 nm, HPLC 法测定。结果 不同炮制阶段生地黄中的寡糖成分及其量不同, 梓醇的量不同。结论 炮制改变了生地黄中寡糖成分类型及其量, 同时也影响梓醇的量。

关键词: 炮制; 生地黄; 寡糖; 梓醇; HPLC

中图分类号: R286.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2434-04

Change of oligosaccharide and catalpol contents in *Rehmanniae Radix* at various processing phases

QIU Jian-guo, ZHANG Ru-xue, JIA Zheng-ping, LI Mao-xing, ZHANG Quan-long, ZHOU Jun, WEI Li-li

Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage, PLA, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To investigate the contents of oligosaccharide and catalpol in *Rehmanniae Radix* at various processing phases. **Methods** Saccharide ingredient was extracted by ultrasonic extraction when water was used as solvent, separated by NH₂ chromatographic column while acetonitrile-water (72:28) as mobile phase at flow rate of 1.0 mL/min, detected by differential refractive detector, and assayed by HPLC. Catalpinol was extracted by ultrasonic extraction when methanol was used as solvent, separated by C₁₈ chromatographic column while methanol-0.1% phosphoric acid (1:99) as mobile phase at flow rate of 1.0 mL/min, detected at wavelength of 210 nm, and assayed by HPLC. **Results** There are significant differences at various processing phases of oligosaccharide and catalpol contents in *Rehmanniae Radix*. **Conclusion** Processing could change the content and composition pattern of oligosaccharide in *Rehmanniae Radix* and affect the content of catalpol in *Rehmanniae Radix* at the same time.

Key words: processing; *Rehmanniae Radix*; oligosaccharide; catalpol; HPLC

生地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libsch. 的干燥块根^[1]。本课题组多年来对生地黄的降血糖机制进行了系统研究, 发现其降血糖的主要成分是地黄寡糖^[2-3]。地黄寡糖主要有椴二糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖、甘露三糖、毛蕊四糖、毛蕊糖等, 其中水苏糖的量最高; 文献报道环烯醚萜苷类成分中的梓醇可能是生地黄降血糖作用的有效成分之一^[4]。本课题组曾对不同产地的生地黄、熟地黄进行了考察, 发现产地不同, 其中寡糖成分及其量不同, 梓醇的量也不同, 尤其是熟地黄^[5-6], 且与文献

报道不同。所以本课题组采用 HPLC 法考察了生地黄在不同加工炮制阶段时寡糖和梓醇的变化规律, 以便更好地控制熟地黄的产品质量。

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(日本岛津仪器公司), Phenomenex NH₂ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) (广州菲罗门科学仪器有限公司), 分析之星色谱工作站, Waters 高效液相色谱仪、Waters 996 紫外检测器、Waters 600 泵, C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm, 大连依

收稿日期: 2011-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672643, 30472186, 30772773); 甘肃省自然科学基金资助项目 (3ZS051-A25-078)

作者简介: 邱建国 (1970—), 副主任药师, 研究方向为西北高原植物及新药的研发。

Tel: (0931)8994676 13609354193 E-mail: qjianguo@163.com

*通讯作者 贾正平 Tel: (0931)8994652 E-mail: jiazp166@sina.com

利特仪器有限公司), 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), 高压锅(型号 MY—CD50D, 功率 900 W, 广东美的生活电器制造有限公司)。生地黄药材 2009 年购于河南淮阳, 经兰州军区兰州总医院药材科李茂星博士鉴定, 与《中国药典》2010 版一部正品相符; 棉子糖对照品(批号 X08D10MZT, 质量分数≥99.0%) 购于西安舟鼎国生物技术有限公司, 甘露三糖(批号 1450717, 质量分数≥99.0%)、棣二糖(批号 1362360, 质量分数≥99.0%) 购于 Sigma-Aldrich 公司, 水苏糖(批号 065K3775, 质量分数≥99.0%) 购于 United Kingdom 公司, 梓醇(批号 0808-200104) 购于中国药品生物

制品检定所; 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 生地黄炮制

将生地黄药材放置高压锅内加水清蒸, 采用最小火力(功率 100 W, 压力 20 kPa), 每隔 2 h 取样, 观察断面等外观特征, 连续考察至外观性状符合《中国药典》2010 版一部要求“断面发黑”。取出, 纵切片或横切片, 晾干。结果见表 1。

2.2 生地黄及不同炮制阶段中寡糖成分的测定^[5, 7]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Spherisorb NH₂ 柱, 检测器为 Shimadzu RID—6A 示差折光检测器, 流动相为乙腈-水(72:28), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为室温。色谱图见图 1。

表 1 生地黄炮制不同阶段的性状

Table 1 Properties of *Rehmanniae Radix* at various processing phases

清蒸时间/h	断面等外观性状	气 味
2	多数小药材断面乌黑、发黏, 大药材中间有较多黄心	先甜后苦, 苦强
4	小药材断面乌黑、发黏, 部分大药材中间有较多黄心	先甜后苦, 苦强
6	小药材断面乌黑、发黏, 少数大药材中间有较多黄心	先甜后苦, 苦较强
8	小药材断面乌黑、发黏, 少数大药材中间有较少黄心	先甜后苦, 苦弱, 甜度增加
10	大、小药材断面均乌黑、发黏	先甜后苦, 苦弱, 甜度增加
12	大、小药材断面均乌黑、发黏	先甜后苦, 苦弱, 甜度增加

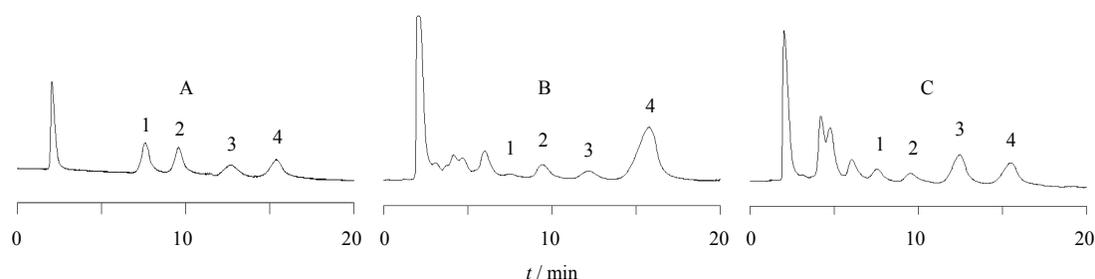


图 1 混合对照品(A)、生地黄(B)和生地黄炮制 4 h 时(C)糖类成分的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), and *Rehmanniae Radix* (B), and *Rehmanniae Radix* at 4 h processing phases (C) saccharide ingredient

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取棣二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品适量, 配制成质量浓度为 7.8、8.4、8.6、8.9 mg/mL 混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 将生地黄及不同炮制阶段的地黄粉碎成细粉(过 40 目筛, 干燥 24 h), 分别称取 0.5 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水约 9 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 用水定容至 10 mL, 摇匀, 取溶液 1 mL, 离心(8 000 r/min) 15 min, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.2.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 结果见表 2。可以看出生地黄中水苏糖和棉子糖的量随着炮制时间及炮制程度由高降低至零(10 h); 相反, 棣二糖和甘露三糖的量逐渐增加, 但是增幅与炮制时间并不成比例。

2.3 生地黄及不同炮制阶段中梓醇的测定^[8]

2.3.1 色谱条件 Waters 996 紫外检测器、Waters 600 泵, C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 210 nm, 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99),

表 2 不同炮制阶段地黄中寡糖和梓醇定量测定结果
Table 2 Quantitative determination of oligosaccharide and catalpol in *Rehmanniae Radix* at different processing phases

炮制时间/h	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	棣二糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	梓醇
0	2.89	31.08	26.06	243.11	11.5
2	15.00	26.42	83.74	134.16	2.6
4	18.97	19.44	94.32	79.84	0.9
6	26.38	9.15	115.16	48.95	0.6
8	27.86	6.35	132.56	34.83	—
10	30.36	—	164.55	—	—
12	31.67	—	171.03	—	—

“—”表示未检出
“—” non detected

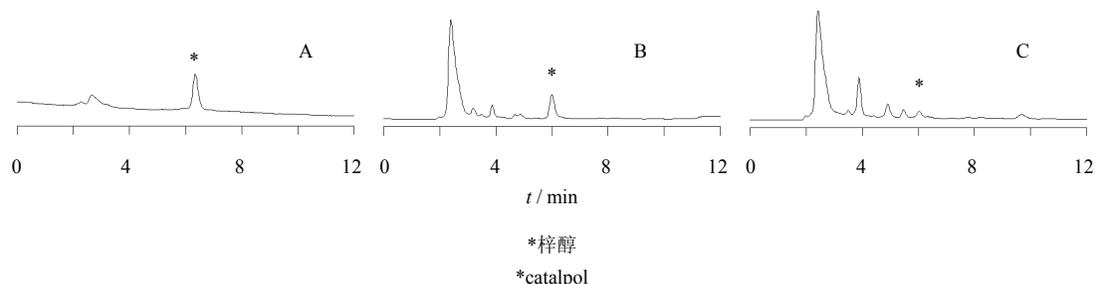


图 2 梓醇对照品 (A)、生地黄 (B) 和生地黄炮制 2 h 时 (C) 的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of catalpol reference substance (A), *Rehmanniae Radix* (B), and *Rehmanniae Radix* at 2 h processing phase (C)

表 2。可以看出梓醇由生地黄中的 11.5 mg/g 随着炮制时间的延长逐渐降低, 当炮制达到 8 h 时, 梓醇峰近似于基线, 10 h 时其量为零, 所以熟地黄中检测不到梓醇。

3 讨论

本课题组研究发现, 在加工炮制过程中, 寡糖类成分均不稳定, 由分子结构分析, 水苏糖和棉子糖均失去一个果糖而变成相应的甘露三糖和棣二糖。蔗糖峰也随着炮制时间及炮制程度呈下降趋势, 而单糖 (半乳糖、果糖、葡萄糖) 的峰面积呈上升趋势, 增加约 3 倍多, 由于半乳糖、果糖、葡萄糖结构接近, 难以分开, 每个单糖量的增加程度无法计算。梓醇是一种环烯醚萜葡萄糖苷类化合物, 加工炮制过程中会脱去糖基而发生一系列化学变化, 王宏洁等^[9]报道将梓醇与葡萄糖、半乳糖、棉子糖、果糖、蔗糖、水苏糖 6 种糖类混合 100 °C 加热 10 h, 梓醇的量未见明显降低, 与 1986 年日本学者曾报道

体积流量 1.0 mL/min, 柱温为室温, 进样量 20 μL。色谱图见图 2。

2.3.2 对照品溶液的制备 称取梓醇对照品适量, 精密称定, 用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液 (1:99) 制成 100 μg/mL 对照品溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 将生地黄及不同炮制阶段生地黄粉碎成细粉 (过 40 目筛, 干燥 24 h), 分别称取 0.5 g, 精密称定, 加甲醇 10 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 用甲醇定容至 10 mL, 滤过, 精密吸取续滤液 5 mL, 水浴蒸干, 残渣用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液 (1:99) 溶解并定容至 5 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液备用, 作为供试品溶液。

2.3.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 结果见

梓醇分解产生黑色物质的原因可能为地黄中梓醇与糖发生聚合反应的结论有所不同, 梓醇的变化有待进一步考证。温学森等^[10]报道熟地黄的色谱图与鲜地黄和生地黄相比, 突出的变化为水苏糖的量相对减少, 棉子糖相对增加, 葡萄糖和果糖变得十分显著, 而梓醇的色谱峰变得不明显^[9]。

本课题组曾研究发现, 不同产地的熟地黄中寡糖类成分类型及其量存在较大差异^[5], 通过对生地黄不同炮制阶段中寡糖和梓醇的变化考察发现, 当生地黄炮制完全时, 即达到《中国药典》2010 年版一部收载熟地黄性状“表面乌黑色, 有光泽, 黏性大。质柔软而带韧性, 不易折断, 断面乌黑色, 有光泽”要求时^[1], 检测不到水苏糖、棉子糖和梓醇, 而甘露三糖、棣二糖及单糖的量明显增加, 同时, 甘露三糖峰前面出现了一个小峰, 由于其量较少, 还未鉴定该成分。由本研究结果可初步判断炮制程度不同是导致不同产地熟地黄中寡糖类成分类型及

其量存在较大差异的主要原因之一。

根据本课题组的系列研究,建议甘露三糖和楝二糖作为熟地黄质量控制指标成分。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 张汝学, 贾正平, 李茂星, 等. 地黄寡糖对 2 型糖尿病大鼠外周血像、激素水平和胰岛病理学的影响 [J]. 西北国防医学杂志, 2009, 30(3): 161-164.
- [3] 张汝学, 贾正平, 李茂星, 等. 地黄寡糖改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 868-871.
- [4] 阴 健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1993.
- [5] 邱建国, 贾正平, 张汝学, 等. 生地与熟地中糖类和梓醇的比较研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1117-1119.
- [6] 邱建国, 张汝学, 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): 585-587.
- [7] 邱建国, 张汝学, 贾正平, 等. 地黄中寡糖含量的 HPLC 法测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 8-9.
- [8] 邱建国, 张汝学, 贾正平, 等. HPLC 法测定地黄、不同提取物及熟地黄中的梓醇 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 23-25.
- [9] 王宏洁, 边宝林, 杨 健. 地黄中梓醇变化条件的探讨 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(7): 408-409.
- [10] 温学森, 杨世林, 马小军, 等. 地黄在加工炮制过程中 HPLC 谱图的变化 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 153-156.

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版)、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》), 为提高稿件处理效率, 更好地为广大读者和作者服务, 中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国> 或 www.tiprpress.com 点击进入 4 刊网页, 在页面左侧有“作者登录”链接, 第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿; 作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

衷心感谢广大读者、作者和编委对本刊长期以来的关心和支持!

天津中草药杂志社