

选取上述最佳条件进行验证试验。在A₁B₁C₁D₂试验条件下,一级萃取物中鼠尾草酸的含量为35.24% (n=3);在A₁B₃C₃D₃条件下,二级萃取物中鼠尾草酸的含量为55.90% (n=3)。由此证明上述最佳试验条件是可信的。

5 结论

5.1 无论是对一级分离还是二级分离,4因素影响萃取物中鼠尾草酸含量的大小顺序都是:分离压力>萃取温度>萃取压力>分离温度。

5.2 从正交试验结果可知,以萃取物中鼠尾草酸含量为指标,对于一级分离,超临界CO₂流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的最佳试验工艺条件:萃取压力40 MPa、萃取温度55℃、分离压力5 MPa、分离温度70℃;对于二级分离,超临界CO₂流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的最佳试验工艺条件:萃取压力20 MPa、萃取温度75℃、分离压力15 MPa、分离温度80℃。

5.3 通过两级分离,可使萃取物中的鼠尾草酸的含量达到56.11%。如此高的含量为迷迭香中抗氧化

活性成分的进一步开发利用提供了依据。

References

- [1] Tu P F, Xu Z H. Chemical constituents and their application from rosemary [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1998, 10(3): 62-68.
- [2] Paris A, Strukel J B, Renko M, *et al*. Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(8): 1426-1430.
- [3] Inatani R, Nakatani N, Fuwa H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives [J]. *Agric Biol Chem*, 1983, 47(3): 521-528.
- [4] Richheimer S L, Matthew W, Bernart, *et al*. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary [J]. *JAOCs*, 1996, 73(4): 507-514.
- [5] Senorans F J, Ibanez E, Caverio S, *et al*. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical fluid extracts of rosemary plants [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 870: 491-499.
- [6] Lopez-Sebastian S, Ramos E, Ibanez E, *et al*. Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 13-19.
- [7] Ibanez E, Oca A, Murga G, *et al*. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 1400-1404.

地黄在加工炮制过程中 HPLC 谱图的变化

温学森¹, 杨世林², 马小军², 郑俊华^{3*}

(1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 考察地黄在加工炮制过程中糖类成分的变化。方法 在加工炮制的4个不同阶段(65℃烘焙0, 1和6 d, 以及烘干样品切片后常压蒸制4 h)取样, 热水提取。色谱条件为: Sugar-pak-1型阳离子凝胶柱(柱温80℃), 水为流动相(流速为0.7 mL/min), 示差折光检测器检测。结果 鲜地黄中有3种主要成分, 分别为水苏糖(11%~15%)、蔗糖(0.30%~0.92%)和梓醇(0.27%~0.88%)。经过加工炮制, 不同阶段的HPLC色谱图发生了显著变化。烘焙1 d后出现一个显著的单糖峰(保留时间为10.2 min, 推定为半乳糖), 生地黄中该峰更加显著, 同时出现了棉子糖的色谱峰。熟地黄中, 果糖和葡萄糖的色谱峰十分显著。结论 根据HPLC色谱图的变化, 认为在烘焙阶段, 鲜地黄中水苏糖发生了脱半乳糖反应, 而在炮制熟地黄时, 由于蒸制又发生了脱果糖反应。地黄加工炮制的主要目的之一可能在于使水苏糖降解, 减轻胀气副作用。

关键词: 地黄; 加工炮制; 高效液相色谱; 水苏糖; 梓醇

中图分类号: R 284.1; R 286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0153-04

HPLC chromatogram changes with processing for roots of *Radix Rehmanniae*

WEN Xue-sen¹, YANG Shi-lin², MA Xiao-jun², ZHENG Jun-hua³

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union of Medical College, Beijing 100094, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Object** To investigate the saccharide changes of *Radix Rehmanniae* when being processed. **Methods** The fresh roots were torrefied at 65℃ and sampled at 0, 1, and 6 d. The samples and 4 h-

* 收稿日期: 2003-05-22
基金项目: 国家自然科学基金重点资助课题(39930220)

steamed slices of those dried roots were extracted with hot water respectively. The extracts were subjected to HPLC analysis, Sugar-pak-1 column at 80 °C, with water as the mobile phase at 0.7 mL/min and detected by RID. **Results** There are three principal components in the fresh roots, i.e. stachyose (11%—15%), sucrose (0.30%—0.92%), and catalpol (0.27%—0.88%). In the processing of the fresh roots, the HPLC chromatograms of the extracts differed to each other remarkably. On the chromatogram of roots torrefied for 1 d, one distinct monosaccharide peak displayed at 10.2 min, which is likely to be galactose, and it became prominent in the dried roots together with raffinose. In steamed ones, the peaks of fructose and glucose became outstanding. **Conclusion** According to the HPLC chromatograms, the degalactosylation of stachyose may take place during torrifying, while defructosylation during steaming. One of the principal purposes of the processing may be for stachyose degradation for its flatulence-causing character.

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

地黄是我国最常用中药材之一,以鲜地黄、生地黄和熟地黄入药。为了探明其作用机制,日本学者进行了大量基础研究,已经从地黄中分离鉴定了近100种化合物^[1~5],并对糖类进行了比较深入的研究。目前已经证明多糖和低聚糖是地黄的重要活性成分^[5~8]。

Kitagawa等从怀地黄中分离出蔗糖和甘露醇^[3]。Tomoda等揭示了地黄的中性组份主要为糖类成分,包括葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、毛蕊糖和甘露醇等,碱性组份含有葡萄糖胺等^[4]。Kubo等分析了不同来源的不同加工炮制地黄,发现多数含有棉子糖族及其脱果糖类成分(defructosylation product),只是含量有较大区别,随着加工炮制,水苏糖含量大幅度下降,葡萄糖和果糖明显增加^[2]。

为了进一步了解地黄在加工炮制过程中糖类成分的变化,本实验采用HPLC法,分析了地黄在不同加工炮制阶段HPLC色谱图的变化规律。

1 材料和方法

1.1 材料:所用地黄为笔者收集并鉴定。经茎尖脱毒处理的品种,于4月中旬将试管苗经练苗后移栽至中国医学科学院药用植物研究所试验田,未经脱毒的样品直接于4月中旬将块根切段在相同条件下栽培,常规管理,10月底收获。

选各品种典型植株1株,“北京1号”脱毒与带毒植株各取3株,取每株中的最大块根(直径7~9 cm)。从块根中部切一圆片,约3~6 g,精密称重,研磨匀浆,加沸蒸馏水50 mL,沸水浴中加热10 min,趁热抽滤,残渣加沸水20 mL提取两次。合并滤液加水至100 mL,摇匀后取2 mL经0.45 μm微孔滤膜滤过,滤液待测。

另取“北京1号”脱毒植株6株,收获大块块根共20块,65 °C烘焙。1 d后于中部切片作为加工中

期样品;烘至恒重后(6 d),切片作为生地黄样品;将生地黄切片(厚约3 mm),称重,常压下连续蒸制4 h,作为熟地黄样品。溶液提取制备方法同上。

1.2 分析条件:Waters 510型色谱仪, Sugar-pak-1型阳离子凝胶交换柱(0.65 cm×30 cm),流动相为水,流速为0.7 mL/min,示差检测器,柱温80 °C,进样5或10 μL。

鲜地黄样品根据峰面积用外标法计算含量,每个样品测量3次,根据峰面积平均值计算糖的含量。糖类对照品由中国林业科学院分析测试中心提供,梓醇对照品购自中国药品生物制品检定所(批号:0808-9803)。

2 结果与讨论

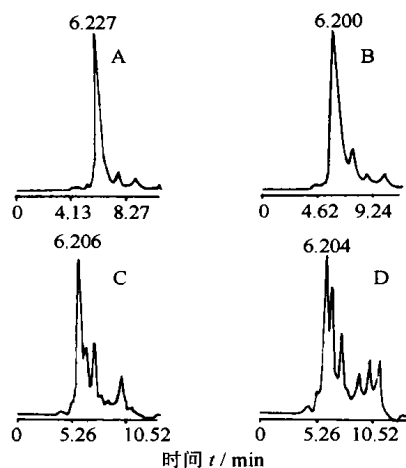
2.1 地黄糖类色谱峰的识别:由于凝胶色谱具有分子筛的作用,糖类按相对分子质量顺序出峰,相对分子质量相近的糖类难以良好分离。在本色谱条件下,鲜地黄各色谱峰分离良好,而生地黄和熟地黄的色谱峰出现重叠,见图1。各对照品的色谱图见图2。

鲜地黄色谱图中可见比较明显的6个峰,其中保留时间在6.2~6.3 min的峰为主要峰,占总峰面积的90%以上。根据对照品的色谱图可知其应为水苏糖。保留时间在7.7 min的峰为二糖,如蔗糖和麦芽二糖,在鲜地黄中,其应为蔗糖。

保留时间在8.8 min的色谱峰为梓醇。在地黄木质部提取液中加入梓醇对照品水溶液后,相应峰面积增加,因此确定该峰为梓醇的色谱峰。

由于葡聚糖对照品(相对分子质量为10 000)的出峰时间为5.4~5.5 min,因此保留时间在4.3~4.6 min相连的两个色谱峰应为多糖峰。5.2 min的峰可能为毛蕊糖。

10.2 min的色谱峰在鲜地黄中不明显,但在烘焙中期、生地黄和熟地黄中均十分显著,根据其出峰时间推断应为单糖,由于未得到相应的对照品,故难



A-鲜地黄 B-烘焙 1 d C-生地黄 D-熟地黄

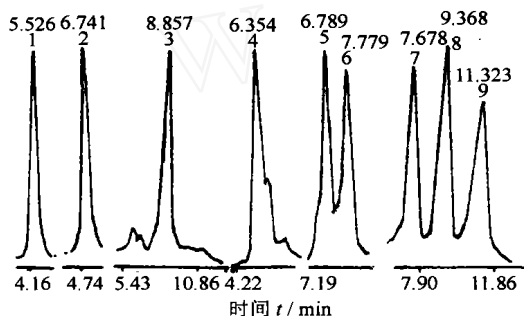
A-fresh root of *Radix Rehmanniae* B-root torried for 1 d

C-root torried for 6 d D-4 h-steamed slices of dried root

图 1 地黄(北京 1 号)不同加工品的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of processed

Radix Rehmanniae



1-葡聚糖 2,5-棉子糖 3-梓醇 4-水苏糖

6-蔗糖 7-麦芽糖 8-葡萄糖 9-果糖

1-glucan 2,5-raffinose 3-catalpol 4-stachyose

6-sucrose 7-maltose 8-glucose 9-fructose

图 2 各对照品的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substances

以确定,但其不可能是葡萄糖和果糖,因为两者的保留时间分别为 9.3 min 和 11.3 min。根据以往的研究结果,在地黄中含量较多的单糖应为半乳糖。保留时间在 6.7 min 的色谱峰在鲜地黄中未出现,在生地黄和熟地黄中十分明显,根据对照品色谱图可标定其为棉子糖,其中可能含有其他三糖类成分。

2.2 鲜地黄中相关成分的含量分析:由于部分对照品出现了降解或含有少量杂质,故地黄和水苏糖采用葡聚糖定量,蔗糖用麦芽二糖定量,梓醇用葡萄糖定量。各成分含量见表 1。

从表 1 可见,各品种中均以水苏糖含量最高,为鲜重的 11%~15%。地黄折干率通常为 25%,故水苏糖在生地黄中的含量应在 44%~60%。有关地黄

中水苏糖的含量有不同的报道^[2,4,9],可能与品种、加工方法和测定方法有关。Tomoda 等采用气相色谱法测得生地黄中水苏糖含量为 48.3%^[4],与本实验结果接近。其他成分含量变化较大,除本身含量不同外,可能与本实验测定方法的灵敏度较低有关。

表 1 鲜地黄中主要成分含量

Table 1 Contents of principal components

in fresh *Radix Rehmanniae*

品种	含量/%			来源
	水苏糖	蔗糖	梓醇	
北京 1 号	13.23	0.92	0.27	山东曲阜
	13.12	0.81	0.31	
	13.10	0.59	0.71	
	11.75	0.88	0.88	
	14.16	0.56	0.52	
	10.90	0.79	0.57	
土城	12.28	0.56	0.73	河南温县
邢疙瘩	14.02	0.50	0.79	
85-5	13.42	0.47	0.68	
H ₁	14.66	0.60	0.44	
金状元	14.68	0.37	0.71	山东菏泽
七顶葵	12.40	0.89	0.63	
红薯王	13.84	0.42	0.66	
千层叶	12.76	0.47	0.57	
829	13.03	0.30	0.68	

梓醇是地黄的主要成分之一,有关其含量报道相差较大。Kitagawa 报道为 0.11%^[3],罗燕燕等报道鲜地黄中梓醇含量达 2.7%~10.6%^[10],刘根成等报道为 0.7%~4.2%^[11],笔者采用本系统经对 10 个品种分析后,发现鲜地黄中梓醇含量在 0.27%~0.88%。

2.3 地黄 HPLC 色谱图在加工炮制过程中的变化:鲜地黄的色谱峰中,水苏糖最为显著,蔗糖和梓醇也较明显。文献报道鲜地黄提取液中还检测到毛蕊糖、棉子糖、甘露三糖、葡萄糖、果糖等^[2,4]。在本测定系统中,这些糖未在鲜地黄水提液中形成明显色谱峰,可能与检测器的分辨率较低有关,也可能当棉子糖含量很低时,被埋在水苏糖色谱峰的尾部,或可能前人在提取分离过程中水苏糖等发生分解所致。

烘焙 1 d 后,半乳糖的色谱峰(10.2 min)变得十分明显,并且在生地黄中更加突出。除鲜地黄中的原有峰依然存在外,生地黄中棉子糖(6.7 min)的峰十分显著,这说明在鲜地黄的烘焙过程中,水苏糖发生了分解,生成了棉子糖和半乳糖。果糖(11.3 min)和葡萄糖(9.3 min)的峰已经出现但还不明显。此外,还出现一个保留时间为 8.1 min 的未知峰。

熟地黄的色谱图与鲜地黄和生地黄的相比,突出的变化为水苏糖含量相对减少,而棉子糖相对增

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。发生这种显著变化的原因可能在于经过蒸制后水苏糖(也可能包括棉子糖)发生了脱果糖反应,从而使果糖的含量增加,形成的甘露三糖可能在棉子糖的位置出现。梓醇分解可能是葡萄糖增加的主要原因。人体肠道内不含降解棉子糖族糖类的 α -半乳糖苷酶,因此水苏糖等进入下部肠道后,可使双歧杆菌等大量繁殖,有利于人体健康,但可产生大量氢气、二氧化碳和甲烷,被认为是造成肠道胀气的主要因素^[12]。根据本实验结果,我们认为,地黄加工炮制的主要目的可能在于降解水苏糖,避免由此造成的不良反应。

由于本测试条件的限制,地黄加工品中各糖类组份的色谱峰不能完全分开,无法准确定量。但从HPLC色谱图的变化来看,本系统可清楚地反映地黄在加工炮制过程中主要成分的变化,为进一步了解地黄加工炮制机制奠定了基础,同时HPLC图谱还可作为地黄加工炮制的质控措施。

References

- [1] Kitagawa I, Hori K, Kawanishi T, *et al*. On the constituents of the root of fukuchiyama-jio, the hybrid of *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea* and *R. glutinosa* f. *hueichingensis* [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1998, 118(10): 464-475.
- [2] Kubo M, A sano T, Matsuda H, *et al*. Studies on *Radix: Rehmanniae* III The relation between changes of constituents and improvable effects on roots of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1996, 116(2): 158-168.
- [3] Kitagawa I, Nishimura T, Furubayashi A, *et al*. On the constituents of rhizome of *Rehmannia glutinosa* Libosch. var. *hueichingensis* f. Hsiao [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1971, 91(5): 593-596.
- [4] Tomoda M, Kato S, Onuma M. Water-soluble constituents of *Radix Rehmanniae* I Carbohydrates and acids of *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1971, 19(7): 1455-1460.
- [5] Tomoda M, Miyamoto H, Shimizu N, *et al*. Characterization of two polysaccharides having activity on the reticulo-endothelial system from the root of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42(3): 625-629.
- [6] Liu F J, Zhao X N, Tang J F, *et al*. Effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide of hematopoietic function in senescence accelerated mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1997, 13(6): 509-512.
- [7] Wei X L, Ru X B. Effects of low molecular-weight *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on p53 gene expression [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1997, 18(5): 471-474.
- [8] Zhang R X, Gu G M, Zhang Y X, *et al*. The modulatory effects of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides (ROS) on glucose metabolism in experimental diabetic and hyperglycemic rats [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1996, 12(1): 14-17.
- [9] Bian B L, Wang H J, Ni M Y. Determination of total saccharide and several main saccharides of *Rehmannia glutinosa* L. and its processed products [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(8): 469-471.
- [10] Luo Y Y, Zang S Q, Suo J Z, *et al*. Determination of catalpol in *Radix Rehmanniae* by high performance liquid chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1994, 29(1): 38-39.
- [11] Liu G C, Du H Q, Liang L. Determination of catalpol in adhesive *Rehmannia* (*Rehmannia glutinosa*) by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(2): 71.
- [12] Guimarães V M, Rezende S T, Moreira M A, *et al*. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58: 67-73.

人参白虎汤配伍规律研究 ——不同配伍条件下钙离子含量变化

丁选胜, 戴德哉, 汤晓*

(中国药科大学 药理研究室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 通过研究不同配伍条件下钙离子含量变化, 探讨人参白虎汤配伍规律。方法 采用直接滴定法测定人参白虎汤中各单味药物及不同配伍组别和全方中钙离子含量。结果 单味药物中, 仅石膏和炙甘草中含有钙离子; 当石膏与其他药物配伍合煎后, 钙离子含量提高; 在保持原方配伍比例条件下, 全方中的钙离子含量高于其他配伍组别。结论 石膏与其他药物配伍合用后, 钙离子含量提高。

关键词: 人参白虎汤; 配伍规律; 钙离子含量

中图分类号: R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0156-03

* 收稿日期: 2003-06-23

基金项目: 教育部振兴行动计划资助; 江苏省博士后基金资助

作者简介: 丁选胜(1962—), 男, 安徽广德人, 中国药科大学博士后。Tel: (025) 83271453 E-mail: dxs0162@sina.com