

道地产区地黄不同品种含梓醇量的比较

王 敏¹, 刘红彦², 黄璐琦^{1*}, 王 飞², 李先端¹, 洪巧瑜³, 吴志刚¹

(1. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2. 河南农业科学院植物保护研究所, 河南 郑州 450002;

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

地黄为临床常用中药, 来源于玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块茎。地黄在我国有悠久的栽培历史, 大部分省份都有引种栽培, 其中河南、山西、山东等省栽培的面积较大, 尤以旧称“怀庆府”的河南豫北地区为地黄的道地产区, 该地区出产的地黄被称之为“怀地黄”, 以其优良的质地享誉海内外。但目前地黄的栽培品种比较多, 仅从其道地产区种植面积最大的河南温县境内收集到的地黄品种就多达十余种。这些不同的地黄品种之间在品质上究竟有无区别, 有哪些区别, 是否所有的品种都可作为“道地药材”来使用, 这些都是需要进行深入研究的问题。

迄今为止, 对于地黄的质量控制标准, 尚无很完善的方法。一直以来常用梓醇作为地黄尤其是鲜地和生地的指标成分进行品质评价。梓醇是地黄的主要有效成分之一, 具有降血糖、利尿和缓泻等作用^[1]。目前常用 HPLC 法进行梓醇的分析^[2~6]。本试验即在文献报道的基础上, 建立了梓醇的反相高效液相测定方法, 进行了方法学考察, 取得了比较满意的结果, 并用此方法对采自河南温县的 8 种主要栽培品种进行了梓醇量的分析。

1 仪器、试剂与试药

Waters 全自动高效液相仪 2695—2996; 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm, 安捷伦公司); 梓醇对照品购自北京市药品检验所, 高纯水自制, 其他试剂皆为色谱纯。

8 个地黄栽培品种分别为: 85-5、9302、红薯王、金状元、大红袍、狮子头、北京 1 号、北京 2 号, 均于 2002 年收集自河南省温县, 由河南省温县农业科学研究所王乾璐研究员鉴定, 然后栽种在河南温县农业科学研究所试验田中, 统一管理, 同时采收, 并置烘箱中于 60 ℃ 干燥。取不同品种地黄的完整、干燥块茎, 逐个称质量, 取其中单株质量为 10~16.7 g

的块茎进行粉碎(此质量范围内符合地黄商品药材四等品的范畴), 过 80 目筛, 充分混匀, 置干燥器中备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 流动相 1% 乙腈, 体积流量 0.5 mL/min, 测定波长 210 nm, 柱温 35 ℃。进样量 5 μL, 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)。对照品及样品的色谱图见图 1。

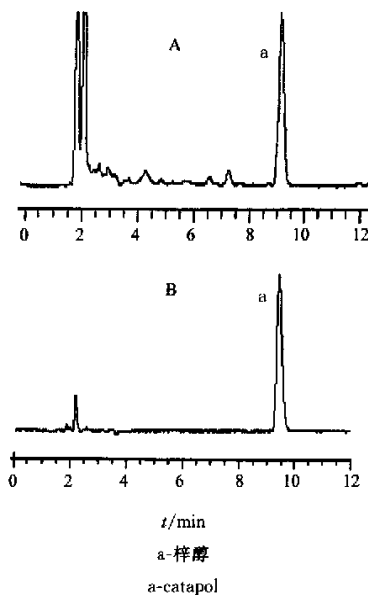


图 1 地黄(A)和梓醇(B)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of *R. glutinosa* (A) and catapol (B)

2.2 对照品溶液的制备: 精密称定梓醇对照品 4.96 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加流动相水-乙腈(99:1)溶解并稀释至刻度, 避光冷藏, 作为贮备液备用。

2.3 供试品液制备: 精密称定地黄样品 0.25 g, 加入 25 mL 甲醇, 称质量。室温超声浸提 30 min, 补足损失的质量, 滤过。弃去初滤液 2 mL, 取续滤液, 精密量取 10 mL 水浴蒸干, 用 1% 乙腈溶解定容至 10

收稿日期: 2005-04-11

基金项目: 国家科技部基础性工作专项重点项目 2001DEA20010

作者简介: 王 敏(1975—), 女, 助理研究员, 主要从事中药生药学研究。 Tel: 13683648237 E-mail: wmcatt@263.net

* 通讯作者 黄璐琦 Tel: (010)64014411-2853 E-mail: huangluqi@263.net

mL 量瓶中,微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液作为供试品液。

2.4 线性关系:将梓醇质量分数分别为 0.099 2、0.198 4、0.396 8、0.793 6、1.190 4、1.587 2、1.984 0 mg/mL 的对照品溶液分别精密注入 5 μ L 进行测定。以峰面积值(X)对质量分数(Y)作回归计算, $r=0.999\ 8$,回归方程 $Y=5.47\times 10^8 X-5.30\times 10^4$ 。表明梓醇在 0.496~9.92 μ g 与峰面积呈线性关系。

2.5 精密度试验:同一对照品溶液连续进样 5 次,每次 5 μ L,按色谱图峰面积计算 RSD 为 0.65%,表明仪器精密度良好。

2.6 重现性试验:精密称取同一样品 5 份,按上述方法测定,计算质量分数测定结果的 RSD 为 0.979%,说明本法具有良好的重现性。

2.7 稳定性试验:取一地黄样品依法制备成供试品溶液,依法测定 0、2、4、6、8、10、12 h 的色谱峰面积,结果 RSD 为 2.23%,表明对照品溶液及供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收试验:精密称取已知梓醇量的地黄粉末 0.13 g,置三角瓶中,精密加入梓醇对照品一定量,其余操作同供试品液制备项下的方法,测定 5 份,计算平均回收率为 97.66%,RSD 为 2.24%。

2.9 不同品种地黄样品的测定结果:对不同品种地黄样品依照上法进行梓醇测定,结果见表 1。

表 1 样品测定结果(按干燥品计算)($n=2$)

Table 1 Determination of catapol (calculated by dried samples, $n=2$)

品 种	梓醇/%	品 种	梓醇/%
85-5	2.913	大红袍	3.278
狮子头	2.934	北京 2 号	3.307
金状元	2.966	北京 1 号	3.892
红薯王	3.252	9302	4.258

3 讨论

3.1 梓醇的测定方法:对于梓醇的测定方法,刘方等^[7]、刘长河等^[8,9]曾采用薄层扫描法建立了梓醇的测定方法,并用该方法测定了不同产地地黄的梓醇量,赵新峰等^[10]采用毛细管区带电泳内标法定量测定梓醇。但由于薄层扫描法不易操作,毛细管电泳法又不十分普及,因此目前对梓醇的测定还是以高效液相较为常见。但由于梓醇的极性较大,其最大吸收又位于紫外光谱的末端,对于反相高效液相和紫外检测系统而言,在理论上并不是十分适合,而且其热、光、酸碱稳定性都较差,这些给梓醇的测定带来一定的难度。在已报道文献中给出的液相色谱峰形

和分离效果不是很理想^[2,3],如出现双峰、拖尾或样品不能达到基线分离等情况。但在本实验中,通过对色谱条件的反复摸索,获得了良好的峰形和满意的分离度(图 1),其他各项方法学考察指标也都符合要求。

3.2 提取溶媒的选择:对同一地黄样品采用 5 种不同溶媒:水、50%甲醇、甲醇、50%乙醇和无水乙醇,分别用相同提取方法进行提取和测定。结果乙醇和 50%乙醇提取效率很低。其他 3 种溶媒提取效率相差不大(RSD=2.24%),其中,水和 50%甲醇提取的测定结果稍高,但操作过程中,50%甲醇提取液和水提液的滤过非常困难,且提取液颜色较深,杂质较多,故还是采用甲醇为提取溶媒。

3.3 提取方法考察:用超声 30 min 和回流 2 h 提取同一地黄样品,效果相当,RSD 为 0.252%,故用超声法。

3.4 提取时间考察:用不同的提取时间 15、30、45 min 提取同一样品,RSD 为 2.103%,效果相当;30 和 45 min 效果非常相近,故用 30 min 即可。

3.5 溶剂的不同用量:甲醇和样品分别按 100:1、50:1、25:1 比例(mL/g)提取同一样品,RSD 为 2.371%,效果相差不大,但 100:1 比例提取效率稍高,而且样品提取液颜色较浅,显示杂质浓度较低,更利于高效液相分析。

3.6 不同品种地黄在梓醇量上的差异:在已报道的文献中,普遍反映出不同产地、不同品种的生地梓醇量差异非常大,所得的数据从 1.4%^[8]到 4%^[5]不等。不仅如此,李先恩等^[5]进一步对同产地、同品种地黄的不同单株进行梓醇量分析,结果发现 20 个单株之间梓醇的量相差可高达一倍以上,如所测地黄品种“国林新一代”的最大量为 2.13 mg/g,最低为 0.91 mg/g,而所测不同品种地黄之间的梓醇量最高为 1.43 mg/g,最低则为“晋红一号”0.61 mg/g。造成不同产地、品种乃至个体之间所测得梓醇量存在如此之大差异的原因,除了地黄体内确实存在梓醇量差异的情况以外,梓醇的不稳定性、地黄的不同生长状况、不同加工处理方法、以及采样的代表性问题等也都是造成数据相差如此之大的原因。为此,为了尽可能客观地体现不同品种地黄之间的梓醇量差异,本试验将不同的地黄品种栽种在同一块试验田中统一管理和采收,并采用相同的温度进行干燥,取样时选取大致相同的块茎大小,尽量扩大取样量,并在粉碎后将粉末充分混匀,以尽量保证各品种的客观条件基本平行,使测定结果更有代表性地反映各

品种之间的真实差异。

根据笔者的测定结果,在所分析的产区8个主要品种之间,梓醇量最低的为85-5(2.9%),最高的为9302(4.3%)。其中已知具有亲缘关系的85-5和金状元(金状元为85-5的父本)具有非常相近的梓醇量;同品系的北京1号和北京2号也具有比较相近的梓醇量。所测得的数据普遍高于文献已报道的生地梓醇量数据,可能是因为采用60℃烘箱干燥的方法大大减少了梓醇的损失,与其他文献直接采用产地加工好的生地为样品进行测定有所不同。

3.7 梓醇的量与地黄质量的关系:梓醇是环烯醚萜苷类物质,具有缓泻、利尿、降血糖等生物活性。目前,普遍以梓醇作为鲜地黄和生地黄的质量控制指标。《中国药典》2005年版以梓醇作为定量的指标,有些文献也直接将梓醇量的高低作为判断地黄质量好坏的依据。但根据文献报道的情况和本实验的测定结果,梓醇究竟能在多大程度上代表地黄的质量,量越高是否意味地黄的质量越好,还是一个值得商榷的问题。原因主要在于:(1)由于梓醇的不稳定性,地黄在采收加工的时候很容易造成梓醇不同程度的损失,因此,在实际生产中以梓醇作为质控指标,数据变化的幅度较大,如前所述,不同文献中得到的生地中梓醇的量的数据甚至相差两个数量级。(2)地黄是一味常用的配伍要药,在临床使用中具有多方面的功效,应用面较广,药理试验也表明具有多个系统的生物活性。梓醇的生物活性只能代表地黄功效的一个方面,而且并不是最主要的一个方面。(3)即使在梓醇所能代表的功效方面,梓醇量的高低是否与功效成正比,也是需要研究的问题。目前在对道地药材的研究中发现,对于一些公认质量较好的道地药材,其道地性,即优质性,在化学成分上往往表现为一个量的范围,或者多种组分的固定配比关系。由上述这几个方面可见,对于地黄的质量评价,在目前没有更好的化学成分质控方法的情况下,梓醇可以作为一个参考手段,但是仅以梓醇量的高低来判断地黄质量的好坏是有失偏颇和简单化的。

同种药材内为了不同的后续开发目的而选育不

同的类型满足不同的需要,是中药材今后的必然发展趋势,目前在一些需要量较大的药材生产上已经事实上出现了这样的格局。本实验对地黄道地产区8个主要品种在尽量去除环境、条件等各方面影响的情况下对其梓醇进行了平行测定。结果表明不同品种在梓醇量上确实表现出了不同的特性,例如新品种9302表现出较高的梓醇量(4.3%)。这为地黄药材今后的定向培育提供了一定的基础数据,提示在地黄的生产中可在品种上有所选择,如在目前的情况下,鲜地黄的生产可以9302为主,而熟地黄的加工和生产可以85-5等品种为主。

References:

- [1] Kitagawa I. On the constituents of rhizome of *Rehmannia glutinosa* Libosch. forma *huieichingensis* Hsiao [J]. *J Pharm Soc Japan*, 1971, 91(5): 593-596.
- [2] Du H Q, Guo X Y, Zhao X, et al. Study on *Rehmannia glutinosa* (Northern of China) (常用中药材品种整理与质量研究)(北方编)(I) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Chinese Union Medical College United Press, 1995.
- [3] Luo Y Y, Zhang S Q, Suo J Z. 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.
- [4] Wang H J, Bian B L, Yang J. A study on catalpol content changes in *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. under certain conditions [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(7): 408-409.
- [5] Li X E, Yang S L, Yang J S, et al. Study on content of catalpol in varieties and earthnuts of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2002, 37(11): 820-823.
- [6] Li J P, Zhou F J, Jia J W, et al. Effects of different store time and condition on the contents of catalpol in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(3): 273.
- [7] Liu F, Yu S L. Comparison of the contents of catalpol in *Rehmannia* root processed with different techniques [J]. *China Pharm* (中国药房), 2003, 14(6): 378-379.
- [8] Liu C H, Zhang L J, Li G S, et al. Determination of catalpol in *Rehmannia glutinosa* Libosch. from different habitats [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2002, 22(5): 259-260.
- [9] Liu C H, Li G S, Huang Y X, et al. Determination of catalpol in *Rehmannia glutinosa* Libosch. from different habitats [J]. *Tradit Chin Med Res* (中医研究), 2001, 14(5): 10-12.
- [10] Zhao X F, Sun Y Q. Determination of catalpol in *Radix Rehmanniae* by capillary zone electrophoresis [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22(6): 471-473.