

2.8 回收率试验:取已测定量的药材细粉,分别取6份,每份约0.25 g,精密称定,置于50 mL量瓶中,各精密加入混合对照品溶液20 mL(含I 12.2 $\mu\text{g/mL}$ 、II 3.3 $\mu\text{g/mL}$)及甲醇适量,按供试品溶液制备方法处理,测定。结果I的平均加样回收率为99.4%,RSD=1.42%;II的平均加样回收率为98.2%,RSD=2.11%。表明试验方法准确。

2.9 样品测定:取27个不同产地菝葜及其近缘种药材,按供试品溶液制备方法处理,测定,按外标法以峰面积计算。样品来源及测定结果见表1。

表1 27个样品的来源及测定结果(n=3)

Table 1 Origin and determination of 27 samples (n=3)

品种	来源	产地	I/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	II/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
菝葜	<i>Smilax china</i>	重庆涪陵	0.94	0.26	1.20
		四川宜宾	0.20	0.98	1.16
		湖南平江	0.08	0.28	0.36
		湖南韶山	0.08	0.18	0.26
		湖南靖州	1.48	0.26	1.74
		江西月亮山	0.06	0.20	0.26
		江西杨家垄	0.16	0.34	0.50
		广西宾阳	1.14	0.66	1.80
		广西武鸣山	0.42	0.30	0.72
		浙江温州	0.20	0.24	0.44
		温州永嘉县	0.18	0.32	0.50
		安徽天柱山	0.10	0.70	0.80
		安徽坎天山	0.22	0.26	0.48
		安徽潜山	0.26	0.36	0.62
		广东韶关	0.14	0.22	0.36
		湖北麻城	0.48	1.68	2.16
		湖北大冶	0.04	0.20	0.24
		湖北通城	0.08	0.14	0.22
小叶菝葜	<i>S. microphylla</i>	湖北秭归	1.24	0.20	1.44
小果菝葜	<i>S. davidiana</i>	江西吉安	0.14	0.12	0.26
长托菝葜	<i>S. ferax</i>	江西吉安	0.24	0.10	0.34
束丝菝葜	<i>S. hemleyana</i>	贵州毕节	0.08	0.30	0.38
尖叶菝葜	<i>S. arisanensis</i>	湖北宜昌	0.08	0.48	0.56
肖菝葜	<i>Heterosmilax japonica</i>	广东徐闻	0.44	0.94	1.38
短柱肖菝葜	<i>H. yunnanensis</i>	广东遂溪	0.28	0.10	0.38
华肖菝葜	<i>H. chinensis</i>	广西武鸣	0.32	2.42	2.74

3 讨论

3.1 《中国药典》2005年版一部菝葜项下收载了薯蓣皂苷元的定量测定。文献报道,I具有抗氧化和抗肿瘤作用^[2],本课题组最近的研究表明,II亦具有显著的抗肿瘤作用。因此,对不同产地的菝葜中有效成分I和II进行测定研究,为综合评价不同产地菝葜资源品质提供了科学依据。

3.2 本研究表明:同一品种不同产地的菝葜中I和II的总量存在显著差异。菝葜在我国分布较广,多生长在海拔1000 m以下的林地。对测定结果与样品的分布特征及生态环境^[1,3]作相关性分析发现,菝葜中有效成分I和II的量与采集地的海拔高度有一定关系,产于海拔较高的菝葜I和II的总量较高,如采集于海拔在500~1000 m的湖北麻城、广西宾阳、湖南靖州、重庆涪陵、四川宜宾、安徽天柱山样品中量较高;不同品种菝葜中有效成分的总量亦有差别;总量在0.26%~2.74%,其中,产于广西武鸣的华肖菝葜、广东徐闻的肖菝葜及湖北秭归的小叶菝葜中量较高。

3.3 根据药农的经验,生长5年以上的菝葜才合药用。菝葜中萜类成分的量是否受生态环境和生长年限的影响,尚在进一步研究之中。

References:

- [1] Xu S Z, Gan G P, Wu H Z, et al. Investigation of the resources of *Smilax* medicinal plants [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2006, 20(1): 26.
- [2] Zhong F, Luo S J, Tang S M. Progress in study on mechanism of resveratrol inhibiting cell proliferation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(5): S-ii.
- [3] Xu S Z, Wang G Z, Gan G P, et al. The study on the correlation between the habitat and the quality of the *Smilax china* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(12): 1055.

HPLC 测定生地黄中地黄苷 A 和 D

王慧森, 刘明, 李更生*

(河南省中医药研究院 中药研究所, 河南 郑州 450004)

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根,前者习称“鲜地黄”,后者习称“生地黄”。生地黄具有清热凉血,养阴,生津的功效。用于热病舌绛烦渴,阴虚内热,骨蒸劳热,

内热消渴,吐血,衄血,发斑发疹^[1]。地黄中主要活性成分为环烯醚萜苷类,此类成分结构近似,极性普遍较大易溶于水,热稳定性较差^[2]。研究发现地黄从鲜品加工成生地黄及熟地黄,梓醇的量降低至原来的

收稿日期:2007-02-15

基金项目:国家中医药局青年基金项目(95Y3411/95C018);河南省自然科学基金项目(0511043800)

作者简介:王慧森(1968—),女,河南南阳人,助研,硕士,主要从事天然药物化学成分的研究和中药新药的研发。

E-mail: whs_zz@yahoo.com.cn

*通讯作者 李更生 Tel: (0371) 66336574 E-mail: lgshn@sohu.com

1/10^[3],而地黄苷 A、D 比较稳定,且地黄中的量较高。地黄苷 A、D 具有滋阴补血的作用^[4,5],为地黄的主要有效成分。国内外尚未见同时测定地黄中地黄苷 A 和 D 的报道。本实验采用 HPLC 法同时测定市售的多个生地黄药材样品中地黄苷 A 和 D,其结果准确,可作为生地黄药材质量控制的定量测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器:高效液相色谱仪为日本岛津公司产品,岛津 LC-10A,SPD-M10A 二级管阵列检测器,Class-vp 5.13 操作软件。

1.2 试剂:乙腈为色谱纯(Merck 公司);甲醇为分析纯(北京化工厂);水为双蒸水并经 0.45 μm 水系滤膜滤过;D-101 型、DA-201 型、DM-301 型大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司)。

1.3 对照品:地黄苷 A、地黄苷 D 为自行提取精制,并经 UV、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定结构,高效液相法测定质量分数为 98%^[6]。

1.4 药材:市售,经本院都恒青研究员鉴定来源为地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Inertsil NH₂ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(迪马公司),流动相为乙腈-水(75:25),体积流量:1 mL/min,检测波长:203 nm,理论塔板数按地黄苷 A 和 D 的峰计算均应不低于 3 000。在此色谱条件下,样品分离良好。见图 1。

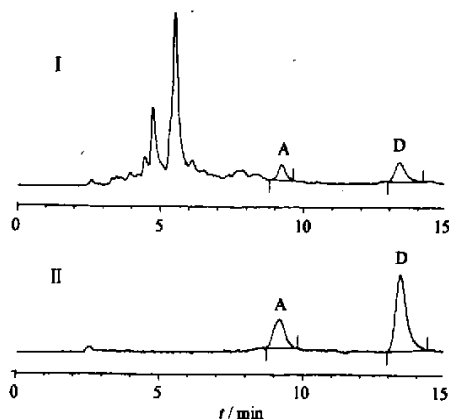


图 1 地黄苷 A、D 对照品(II)和样品(I) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of Rehmannioside A, D reference substance (II) and sample (I)

2.2 线性关系考察:精密称取地黄苷 A、D 对照品置 25 mL 量瓶中,以 70% 乙腈溶解制成分别为 1.92、1.32 mg/mL 的溶液,作为混合对照品液。精密吸取 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中,加 70% 乙腈稀释至刻度,摇匀,制成系列混合对照品溶液,

分别进样 10 μL,测定峰面积的积分值,以峰面积为横坐标,对照品的量为纵坐标进行回归,得地黄苷 A 回归方程为: $A = 6.51 \times 10^5 C - 2.04 \times 10^3$, $r = 0.9993$,线性范围为 0.192~0.960 mg/mL;地黄苷 D 回归方程为: $A = 2.69 \times 10^6 C + 3.44 \times 10^3$, $r = 0.9999$,线性范围为 0.132~0.660 mg/mL。

2.3 精密度试验:精密吸取同一份样品溶液,重复进样 6 次,每次 10 μL,分别测定峰面积积分值,计算得地黄苷 A 的 RSD = 1.91%;地黄苷 D 的 RSD = 2.11%。

2.4 稳定性试验:取同一份样品溶液分别在配制后 0、2、4、6、8、10 h 进样 10 μL,记录峰面积积分值,结果地黄苷 D 峰面积的 RSD 为 3.51%,地黄苷 D 峰面积的 RSD 为 2.23%,结果表明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.5 重现性试验:取同一生地黄药材,精密称取药粉 0.5 g,平行取 6 份进行提取测定,计算其质量分数,求得地黄苷 A 和 D 的 RSD 分别为 1.52% 和 3.97%。

2.6 加样回收率试验:平行取同一生地黄(地黄苷 A 0.356%;地黄苷 D 0.166%)药粉 6 份,每份 0.25 g,精密称定,分别加入混合对照品溶液(地黄苷 A 1.92 mg/mL;地黄苷 D 1.32 mg/mL) 0.5 mL,按样品测定方法进行测定,计算地黄苷 A 和 D 的平均回收率分别为 96.1% (RSD 为 1.9%)、97.4% (RSD 2.2%)。

2.7 样品的测定:将生地黄药材剪切成约 2 mm 的薄片,60 °C 干燥 6 h,至干燥器中放冷。取适量粉碎过四号筛,精密称取生地黄药粉 0.5 g,置圆底烧瓶中,加 50% 甲醇 30 mL,冷浸过夜,水浴回流 1.5 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加水 2 mL 使溶解,放冷,通过 DA-201 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,长 15 cm),以水 80 mL 洗脱,弃去水液,再用 30% 甲醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,用 70% 乙腈溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加 70% 乙腈至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。进样 10 μL,测得地黄苷 A 和 D 的峰面积,按外标一点法计算质量分数,结果见表 1。

表 1 样品测定结果(n=3)

Table 1 Determination of samples (n=3)

药材来源	地黄苷 A/(mg·g ⁻¹)	地黄苷 D/(mg·g ⁻¹)
本院药房	3.25	1.63
河南省药材公司	3.15	1.53
河南温县饮片厂	3.58	1.70

(下转第 1744 页)

3 结语

目前,国内尚无人研究红三叶草异黄酮在体内的代谢及微生物转化试验。

红三叶草异黄酮单位质量于物质的量较高,是一种应用范围广,治疗效果好的雌激素替代物质。由于结构原因,需要在体内转化成活性更高的羟基异黄酮之后才能表现其植物雌激素及其他生理作用。因此,红三叶草异黄酮去甲基化研究对新产品的开发具有重要意义。

References:

- [1] Ranich T, Bhathena S J, Velasquez M T. Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease [J]. *J Ren Nutr*, 2001, 11(4): 183-193.
- [2] Shi S F, Yu C Q. Progress in research on phytoestrogens and their effect targets [J]. *J Chin Integr Med* (中西医结合学报), 2005, 3(5): 408-410.
- [3] Graham Edmund K, Alan James H. Cardiovascular and bone treatment using isoflavones [P]. US: 20040072765, 2004-04-09.
- [4] Graham Edmund K. Methods of cholesterol reduction using isoflavones [P]. US: 20040170713, 2004-09-02.
- [5] Graham Edmund K. Dietary supplements comprising soy hypocotyls containing at least one isoflavone [P]. US: 7045155, 2006-05-16.
- [6] Mark Eric G. Method of preparing and using compositions extracted from vegetable matter for the treatment of cancer [P]. US: 6900240, 2005-05-31.
- [7] Delmonte P, Rader J L. Analysis of isoflavones in foods and dietary supplements [J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(4): 1138-1146.
- [8] Rufer C E, Kulling S E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(8): 2926-2931.
- [9] Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R, et al. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(16): 5797-5805.
- [10] Chen X F, Shi G F. A review of studies on red clover isoflavones [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(2): 309-312.
- [11] Adams N R. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle [J]. *J Anim Sci*, 1995, 73: 1509-1515.
- [12] Yu L, Zhang Y Z, Xin Y. Study on extracting red clover isoflavones by ultrasonic wave [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2006, 9: 124-126.
- [13] Jing L G, Zhang Y Z, Yang J. Development of the application of soy isoflavones in health foods and pharmaceutical [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2002, 19(6): 692-697.
- [14] Zhang Y Z, Sun Y M. A discussion about some terms used in researches on soy isoflavone [J]. *Chin Cereals Oils Asso* (中国粮油学报), 2004, 19(4): 50-52.
- [15] Lamartiniere C A, Moore J, Holland M, et al. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995, 208(1): 120-123.
- [16] Song T T, Hendrich S, Murphy P A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 1607-1610.
- [17] Corinna E R, Sabine E K. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 2926-2931.
- [18] Nestel P J, Pomeroy S, Kay S, et al. Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(3): 895-898.
- [19] Teede H J, McGrath B P, DeSilva L, et al. Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women [J]. *Arterios Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(6): 1066-1071.
- [20] Yu L N, Zhang Y Z, Xin Y. Progress of application of red clover isoflavones in health food and pharmaceutical [J]. *Amino Acids Biotic Resour* (氨基酸和生物资源), 2005, 27(4): 65-68.
- [21] Albertazzi P. A review of non-hormonal options for the relief of menopausal symptoms [J]. *Treat Endocrinol*, 2006, 5(2): 101-113.
- [22] Lukaczer D, Darland G, Tripp M, et al. Clinical effects of a proprietary combination isoflavone nutritional supplement in menopausal women: a pilot trial [J]. *Altern Ther Health Med*, 2005, 11(5): 60-65.
- [23] Imhof M, Gocan A, Reithmayr F, et al. Effects of a red clover extract (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women [J]. *Maturitas*, 2006, 55(1): 76-81.
- [24] Peter H M, van de Weijer, Ronald Barentsen. Isoflavones from red clover (promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo [J]. *Maturitas*, 2002, 42: 187-193.
- [25] Tempfer C B. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature [J]. *Fertil Steril*, 2007, 87(6): 1243-1249.
- [26] Heinonen S M, Wahala K, Adlercreutz H. Metabolism of isoflavones in human subjects [J]. *Phytochem Rev*, 2002, 175-182.
- [27] Tolleson W H, Doerge D R, Churchwell M I, et al. Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes *in vitro* [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 4783-4790.
- [28] Kelly G E, Nelson C, Waring M A, et al. Metabolites of dietary (soy) isoflavones in human urine [J]. *Clin Chim Acta*, 1993, 223: 9-22.

(上接第1733页)

3 讨论

3.1 地黄苷 A 和 D 结构中只有一个双键,无共轭结构,紫外吸收光谱图在末端有吸收,样品溶液及对照品溶液在 203 nm 处吸收均较强,故测定波长定为 203 nm。

3.2 在样品提取条件的筛选试验中,曾分别采用 50% 甲醇、80% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、80% 乙醇、乙醇回流提取,提取液滤过,定容,作为供试品溶液。进样 10 μ L 测定地黄苷 A、D 的峰面积,结果表明 50% 甲醇回流提取 1.5 h,地黄苷 A、D 的提取率最高,故采用本法制备供试品液。

3.3 在制备样品溶液时曾选用 D-101 型、DA-201 型、DM-301 型 3 种大孔吸附树脂用于样品提取液的除杂,结果 DA-201 型大孔吸附树脂除杂效果较好,样品回收率最高。故选择 DA-201 型大孔吸附树脂用于样品提取液的除杂。

3.4 分别以乙腈-水(60:40,65:35,70:30,75:25,80:20)为流动相进行测定,结果乙腈-水(75:25)为流动相时,地黄苷 A 和 D 的峰形对称性较好,与其他杂质峰达基线分离。故选择乙腈-水(75:25)为流动相。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Li G S, Yu Z, Wang H S. Chemical constituents and pharmacological research progress of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Foreign Med Sci, Tradit Chin Med* (国外医学-中医中药分册), 2004, 26(2): 74-76.
- [3] Wang H J, Bian B L, Yang J, et al. 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.
- [4] Wang J, Yu Z, Li G S, et al. Experimental study on rehmannioside A in nourishing yin and regulating immune functions [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(1): 20-22.
- [5] Yu Z, Wang J, Li G S, et al. Experimental study on rehmannioside D in the action of nourishing yin, enriching the blood and reducing the blood sugar [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2001, 28(4): 240.
- [6] Wang H S, Li G S, Liu M, et al. Isolation and elucidation for iridoid glycosides in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Tradit Chin Med Res* (中医研究), 2005, 4: 17.

HPLC测定生地黄中地黄苷A和D

作者：[王慧森](#)，[刘明](#)，[李更生](#)
作者单位：[河南省中医药研究院](#)，[中药研究所](#)，[河南](#)，[郑州](#)，[450004](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2007, 38(11)

参考文献(6条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [Li G S;Yu Z;Wang H S](#) [Chemical constituents and pharmacological research progress of Rehmannia glutinosa](#) 2004(02)
3. [Wang H J;Bian B L;Yang J A](#) [A study on catalpol content changes in Rehmannia glutinosa \(Gaertn.\) Libosch. under certain conditions](#) 1997(07)
4. [Wang J;Yu Z;Li G S](#) [Experimental study on rehmaionoside A in nourishing yin and regulating immune functions](#)[[期刊论文](#)]-[中国药学杂志](#) 2002(01)
5. [Yu Z;Wang J;Li G S](#) [Experimental study on rehmaionoside D in he action of nourishing yin, enriching the blood and reducing the blood sugar](#)[[期刊论文](#)]-[辽宁中医杂志](#) 2001(04)
6. [Wang H S;Li G S;Liu M](#) [Isolation and elucidation for iridoid glycosides in Rehmannia glutinosa](#) 2005(04)

本文读者也读过(10条)

1. [刘达](#). [吴广均](#). [张云](#). [吴振宇](#) [清肝方在ConA诱导的肝损伤中免疫调节作用的研究](#)[[期刊论文](#)]-[中国医药导刊](#) 2010, 12(1)
2. [李更生](#). [王慧森](#). [刘明](#). [石任兵](#) [高效液相色谱法测定三种中成药中地黄苷D的含量](#)[[期刊论文](#)]-[中医研究](#) 2007, 20(3)
3. [熊玉兰](#). [王金华](#). [屠国瑞](#). [石刚刚](#). [Xiong Yulan](#). [Wang Jinhua](#). [Tu Guorui](#). [Shi Ganggang](#) [熟地黄麦角甾苷对小鼠肾毒血清肾炎治疗作用的研究](#)[[期刊论文](#)]-[世界科学技术-中医药现代化](#)2006, 8(5)
4. [于红权](#). [YU Hong-quan](#) [地黄药用价值探微](#)[[期刊论文](#)]-[中国现代药物应用](#)2008, 2(23)
5. [屠万倩](#). [屈凌波](#). [张留记](#) [HPLC法测定不同怀地黄种植品种中地黄苷A的含量](#)[[期刊论文](#)]-[中医研究](#)2009, 22(2)
6. [匡岩巍](#). [卢宪伟](#). [吴祖泽](#). [KUANG Yan-Wei](#). [LU Yan-Wei](#). [WU Chu-ze](#) [大孔吸附树脂分离纯化鲜地黄叶中梓醇的初步研究](#)[[期刊论文](#)]-[军事医学科学院院刊](#)2009, 33(6)
7. [李更生](#). [王慧森](#) [HPLC法测定地黄中地黄苷D含量](#)[[期刊论文](#)]-[中草药](#)2003, 34(8)
8. [白雁](#). [李雯霞](#). [王星](#) [近红外光谱法测定不同品种鲜地黄中水分含量](#)[[会议论文](#)]-2009
9. [李惠](#). [俞桂新](#). [王涛涛](#). [胡之璧](#). [LI Hui](#). [CHOU Gui-xin](#). [WANG Zheng-tao](#). [HU Zhi-bi](#) [HPLC测定地黄中麦角甾苷的含量](#)[[期刊论文](#)]-[中国中药杂志](#)2006, 31(10)
10. [李敏](#). [李卫东](#). [LI Min](#). [LI Wei-dong](#) [ConA引起小鼠肝损伤实验研究](#)[[期刊论文](#)]-[中国比较医学杂志](#)2008, 18(7)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200711047.aspx