

不同处理方法及影响因素对地黄中梓醇量的影响

张科¹, 郭建华¹, 田成旺², 张铁军^{2*}

1. 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 分析不同贮藏方式、炮制方法、温度、pH 值和酶对梓醇量的影响。方法 采用 HPLC 法测定鲜地黄不同炮制品及不同贮藏条件下梓醇量的变化, 并在不同温度、pH 值及酶的条件下, 放置一定时间后测定梓醇量。结果 鲜地黄中梓醇量明显高于其炮制品, 抽真空冷冻下梓醇量几乎不变, 而梓醇受 pH 影响较大, 强酸或强碱条件下均不稳定, 并随着温度升高而加剧这种变化, 同时易受 β -葡萄糖苷酶的影响。结论 梓醇对热稳定, 对酸、碱及 β -葡萄糖苷酶不稳定。

关键词: 鲜地黄; pH 值; 炮制; 梓醇; 高效液相色谱

中图分类号: R282.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)07-0896-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.023

Effects of various treatments and influencing factors on catalpol in *Rehmannia glutinosa*

ZHANG Ke¹, GUO Jian-hua¹, TIAN Cheng-wang², ZHANG Tie-jun²

1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the effect of different storage methods, processing methods, temperatures, pH values, and enzymes on the content of catalpol in *Rehmannia glutinosa*. **Methods** To investigate the content change of catalpol in different processed *R. glutinosa* under the different storage conditions by HPLC. And the content of catalpol was determined after being stored under different temperatures, pH values, and enzymes. **Results** The content of catalpol in fresh *R. glutinosa* was significantly higher than that in the processed ones. The content of catalpol in frozen under vacuum was almost unchanged. The content of catalpol was obviously influenced by pH value, especially in strong acid and alkali, and the change was enhanced at higher temperature. Meanwhile, the content of catalpol was easily influenced by β -glucosidase. **Conclusion** Catalpol is stable to high temperature, while unstable to acid, alkali or β -glucosidase.

Key words: fresh *Rehmannia glutinosa* Libosch.; pH value; processing; catalpol; HPLC

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根, 根据炮制方法的不同, 分鲜地黄、生地黄和熟地黄。地黄经过不同的炮制方法加工后, 其性味、功效也会发生相应的改变。鲜药材有着不同于其炮制品的独特药性与疗效, 已成为中药研发的热点之一。鲜地黄性寒, 味甘苦, 以清热生津、凉血止血为主^[1]。但鲜地黄汁多质脆, 不易保存^[2], 限制了其在临床及制药领域的广泛应用。现代药理学证明, 地黄中降血糖主要活性成分为环烯醚萜苷类, 梓醇为其代表性成分^[3]。本实验以梓醇为指标成分, 考察并分析了不同贮藏方式的鲜地黄及其炮制品中梓醇量的变化。在此研究基础上发现梓醇很

不稳定, 炮制及不当的保存方式均使梓醇量大幅下降。研究报道, 梓醇易受温度、pH 及酶的影响^[4-5], 但同时考察 3 种因素对梓醇的影响尚无报道。为探求影响梓醇变化的条件, 合理有效的利用鲜地黄药材, 本文首次针对其主要影响因素, 同时考察了温度、pH 及酶对其稳定性的影响, 力求揭示影响梓醇变化的最主要因素, 为合理有效利用鲜地黄药材提供一定的理论依据。

1 仪器和材料

高效液相色谱仪: Lab Alliance 高效液相色谱仪, SeriesII 二元泵系统, Lab Alliance 色谱工作站。Diamond C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μ m);

收稿日期: 2012-08-16

作者简介: 张科 (1986—), 男, 山西大同人, 天津医科大学药学院药学专业硕士研究生。Tel: (022)23006843 E-mail: zhangke06045114@163.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

电子天平: Sartorius (十万分之一天平); Mettler Toledo 万分之一天平 (Mettler Toledo 公司)。Autoscience 超声仪 (AS3120) (奥特宝恩斯仪器有限公司); 恒温水浴锅 (HH—4) (巩义市予华仪器有限公司); SYC—L 立式摇床 (上海联环生物工程有限公司)。

甲醇、乙腈均为色谱纯, 乙醇、磷酸均为分析纯, 去离子水。梓醇对照品 (批号 110808-200508, 质量分数为 99%) 购自中国生物制品检定所, α -葡萄糖苷酶及 β -葡萄糖苷酶 (天津市诺奥科技发展有限公司)。

鲜地黄 (批号 20100425、20101115、20110409、20111205、20120413、20121125) 采自河南焦作, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜块根; 其炮制品按《中国药典》2010 年版加工炮制。

2 方法与结果

2.1 梓醇的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Diomonsil C₁₈ 反相色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水 (1:99) 溶液, 检测波长 210 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 $^{\circ}$ C。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取梓醇对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 得含 0.19 mg/mL 梓醇的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取鲜地黄药材洗净擦干表面水分, 去除须根后切成 2~4 mm 细丝。精密称定上述鲜地黄细丝 2.0 g 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 20%乙醇 25 mL, 称其质量, 超声提取 30 min, 用 20%乙醇补足减失质量, 提取液经 0.45 μ m 滤膜滤过, 续滤液即为供试品溶液。

2.1.4 标准曲线的绘制 取梓醇对照品溶液, 依次精密吸取 1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 μ L 按上述色谱条件进样检测分析, 以样品中梓醇的峰面积值为纵坐标 (Y), 浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 得梓醇回归方程为 $Y=43\ 800 X+2\ 849.2$, $r=0.999\ 9$, 表明梓醇在 0.190~2.375 μ g, 峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取梓醇标准品溶液, 重复进样 6 次, 每次进样 10 μ L, 记录峰面积, 结果梓醇峰面积的 RSD 为 0.78%。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下的供试品溶液一份, 于 0、2、4、6、8、12、20、24 h 进样, 记

录峰面积, 结果梓醇峰面积的 RSD 为 1.31%, 结果表明供试品溶液室温放置 24 h 稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批鲜地黄样品, 平行制备 6 份供试品, 按上述方法和条件测定, 计算其质量分数, 结果梓醇质量分数的 RSD 为 1.38%, 表明本方法重复性好。

2.1.8 加样回收率试验 取已测定梓醇质量分数的鲜地黄样品 6 份, 分别加入含 0.19 mg/mL 梓醇的对照品溶液, 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液并测定, 计算平均加样回收率为 99.70%, RSD 为 1.65%。

2.2 不同保存方式下鲜地黄中梓醇量的变化

取 6 种不同贮藏方式和时间下鲜地黄样品, 按“2.1.3”项方法制备, 按照“2.1.1”项方法测定梓醇量。结果见图 1。

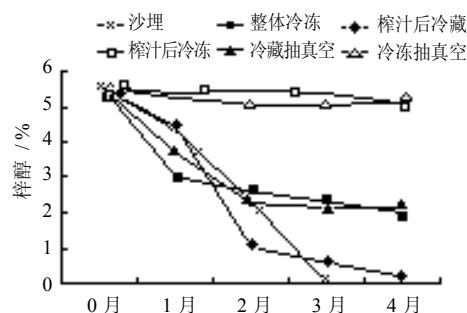


图1 不同保存方式下鲜地黄梓醇量的变化
Fig. 1 Content changes of catalpol in *R. glutinosa* under various preservation methods

由以上结果可以看出, 不同保存方式下梓醇量差异很大, 鲜地黄的冷冻保存效果优于冷藏和沙埋, 汁液冷冻效果优于整体冷冻效果, 抽真空冷冻与榨汁后冷冻效果相当, 推测是因为低温下 ($-18\ ^{\circ}$ C) 不利于微生物的生长, 酶的活性也大为降低, 抽真空可避免药材与空气接触, 防止其氧化。抽真空冷冻法对设备要求不高, 操作便利, 可作为鲜地黄药材理想的保存方法。

2.3 鲜地黄及其炮制品中梓醇的测定

2.3.1 鲜地黄供试品中梓醇的测定 按照“2.1.3”项制备方法制备鲜地黄供试品溶液, 按照“2.1.1”项方法进行测定。

2.3.2 炮制品中梓醇的测定 取生地黄及熟地黄样品粉碎后过 20 目筛。分别精密称定生地黄及熟地黄粉末约 1.0 g 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 20%乙醇 25 mL, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 20%乙醇补足减失质量, 摇匀, 提取液经 0.45 μ m 滤膜滤过, 取续滤液进样 5 μ L, 测得梓醇

的峰面积, 计算其中梓醇的量, 结果见表1。

由以上结果可知, 鲜地黄与生地黄中的梓醇量差异显著, 鲜地黄梓醇平均量约是生地黄的6倍, 经过进一步的清蒸或酒蒸, 梓醇量进一步降低。究其原因, 可能与加工炮制过程中加热或地黄本身 pH 改变以及地黄中酶的活性变化有关。经过前期对鲜地黄炮制及贮藏的研究发现, 梓醇是一种不稳定的化合物, 影响其变化的因素较多。为进一步合理开发利用鲜地黄, 本实验又考察了温度、pH 及酶对梓醇量的影响。

表1 地黄鲜品和炮制品中梓醇的量 ($n=3$)

Table 1 Determination of catalpol in fresh and processed *R. glutinosa* ($n=3$)

批号	样品	梓醇 / %
20100425	鲜地黄	3.78
	生地黄	0.61
	熟地黄 (清蒸)	0.22
	熟地黄 (酒蒸)	0.18
20101115	鲜地黄	4.01
	生地黄	0.66
	熟地黄 (清蒸)	0.13
	熟地黄 (酒蒸)	0.11
20110409	鲜地黄	3.58
	生地黄	0.52
	熟地黄 (清蒸)	0.24
	熟地黄 (酒蒸)	0.16
20111205	鲜地黄	4.23
	生地黄	0.62
	熟地黄 (清蒸)	0.18
	熟地黄 (酒蒸)	0.12
20110413	鲜地黄	3.65
	生地黄	0.57
	熟地黄 (清蒸)	0.14
	熟地黄 (酒蒸)	0.13

2.4 温度和 pH 对梓醇稳定性的影响

准确称取含 0.19 mg/mL 梓醇的梓醇对照品, 分别加入配制好的 pH 值分别为 2、5、7、9、12 的磷酸缓冲溶液, 制成 0.19 mg/mL 梓醇的溶液。将上述溶液分别灌封于 10 mL 的安瓿中, 再分别置于 37、60、80、100 °C 的恒温水浴锅, 于 0、1、2、4、8、12 h 时各取出 1 支, 立即置于 25 °C 的水浴中冷却 15 min, 取出溶液, 以 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 取续滤液 5 μ L 直接注入液相色谱仪测定。结果见图 2~5, 在 100 °C 及 pH 值为 7 的条件下, 梓醇的相对质量分数并没有明显变化, 说明梓醇对热是稳定的; 在 pH 值为 2 或 12 的强酸或强碱条件下, 1 h 后梓醇的相对质量分数即明显下降, 并随着温度升高而加剧这种变化, 100 °C 下梓醇甚至消失; 而在 pH 值为 5 或 9 时, 梓醇相对质量分数的变化相对较

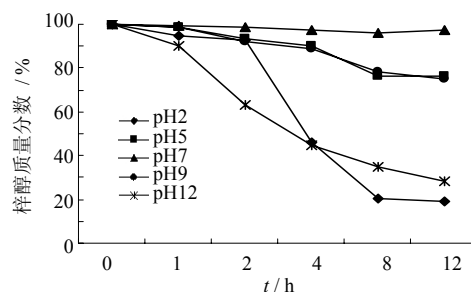


图2 37 °C 时不同 pH 值下的梓醇质量分数

Fig. 2 Content of catalpol under different pH values at 37 °C

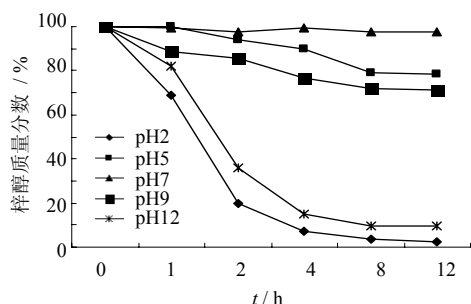


图3 60 °C 时不同 pH 值下的梓醇的质量分数

Fig. 3 Content of catalpol under different pH values at 60 °C

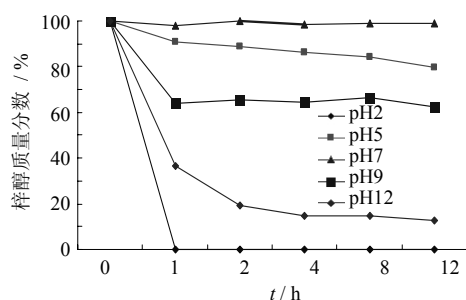


图4 80 °C 时不同 pH 值下的梓醇的质量分数

Fig. 4 Content of catalpol under different pH values at 80 °C

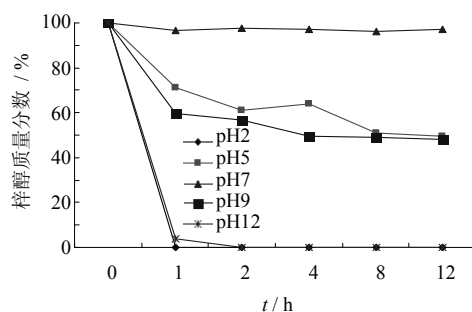


图5 100 °C 时不同 pH 值下的梓醇的质量分数

Fig. 5 Content of catalpol under different pH values at 100 °C

小, 100 °C 下 12 h 后梓醇相对量分数下降了 50%, 提示在对梓醇的制备及加工过程中应控制 pH 为中性, 并尽量在低温下操作, 避免由于高温而加剧 pH

引起的梓醇量降低。

2.5 酶对梓醇稳定性的影响

2.5.1 酶的种类对梓醇稳定性的影响 准确称取一定量的梓醇对照品溶液, 分别加入 10 倍底物量的 α -葡萄糖苷酶及 β -葡萄糖苷酶, 用 pH 值为 7 的磷酸缓冲溶液溶解, 制成 0.19 mg/mL 的梓醇溶液。将上述溶液分别置于 100 mL 的三角瓶中, 密封, 置于 37 °C 的恒温摇床中培养, 于 24 h 后取出, 冷却至室温, 取出三角瓶中的溶液, 以 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 续滤液直接注入液相色谱仪测定, 结果见图 6。

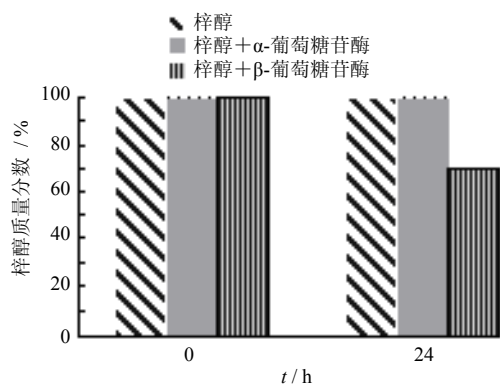


图 6 不同酶对梓醇质量分数的影响

Fig. 6 Effects of different enzymes on content of catalpol

由图 6 可知, 影响梓醇的量降低的酶为 β -葡萄糖苷酶, 24 h 后梓醇的量下降了 30%, 结果与文献报道一致^[3], 但 37 °C 时该酶的活性并不是最高, 并不能反映出该酶降低梓醇的量的真实程度, 因此又考察了不同温度下该酶对梓醇的影响。

2.5.2 不同温度下 β -葡萄糖苷酶对梓醇稳定性的影响 称取一定量的梓醇对照品, 加入 10 倍底物量的 β -葡萄糖苷酶, 用配制好的 pH 值为 7 的磷酸缓冲溶液溶解, 制成 0.19 mg/mL 的梓醇溶液。将上述溶液分别置于 100 mL 的三角瓶中, 密封, 分别置于 37、50、65 °C 的恒温摇床中培养, 于 24 h 后取出, 冷却至室温, 取出三角瓶中的溶液, 以 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 续滤液直接注入液相色谱仪测定, 结果见图 7。

50 °C 时梓醇量下降程度最大约 60%, 也从一定程度上反映了该酶的最佳活性温度在 50 °C 左右, 而 65 °C 时梓醇量几乎无变化, 提示此温度下该酶可能已经失活, 说明 β -葡萄糖苷酶在其酶活性范围内对梓醇的稳定性影响很大。

3 讨论

实验结果表明鲜地黄中梓醇质量分数明显高于

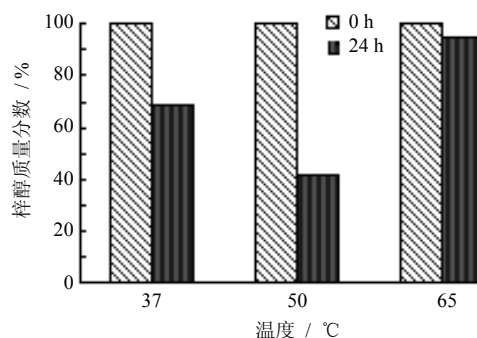


图 7 不同温度下 β -葡萄糖苷酶对梓醇质量分数的影响

Fig. 7 Effect of β -glucosidase on content of catalpol at different temperatures

其炮制品, 抽真空冷冻法保存下的鲜地黄梓醇质量分数最高, 可作为鲜地黄药材的保鲜方法。鲜地黄产后加工过程中梓醇质量分数大幅下降, 由于梓醇属于环烯醚萜苷类, 其结构易被破坏, 可能与加工过程中加热导致梓醇降解有关, 但实验结果说明梓醇能够耐受一定的高温, 受 pH 影响较大, 强酸或强碱条件下均不稳定, 并随着温度升高而加剧这种变化, 由此可知, 较高的 pH 和温度是梓醇质量分数变化的两个必要条件。另外, 实验也证实了 β -葡萄糖苷酶是影响梓醇质量分数的主要因素之一。因此在对鲜地黄制备加工及保鲜过程中应维持 pH 为中性, 并尽量在低温下操作, 这有利于保持梓醇质量分数的稳定, 更有效地发挥鲜地黄药材的应用价值。

我国含梓醇的植物资源相当丰富, 鲜地黄中的量最高, 这为梓醇新药开发提供了资源保证, 但鲜地黄不易保存并且梓醇会随着鲜地黄的加工炮制质量分数大幅下降。本实验在确定了鲜地黄最佳贮藏方式之后, 首次针对影响梓醇的主要因素, 系统分析了温度、pH 及酶对梓醇的量变化的影响, 为有效地利用鲜地黄药材提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 赵素容, 卢宛伟, 陈金龙, 等. 地黄梓醇降糖作用的实验研究 [J]. 时针国医国药, 2009, 20(1): 171-172.
- [2] 赵宇, 温学森, 武卫红. 地黄不同炮制品中梓醇含量分析现状 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(7): 486-488.
- [3] 赵宇, 温学森, 崔晶, 等. 鲜地黄中 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的提取与初步纯化 [J]. 中药材, 2006, 29(2): 137-139.
- [4] 李俊萍, 周福军, 贾建伟, 等. 不同贮藏条件对地黄中梓醇含量的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(3): 273-274.
- [5] 段红福, 卢锰, 崔瑛, 等. 速冻冷藏对鲜地黄汁中梓醇含量的影响 [J]. 中药材, 2009, 32(6): 863-864.