

地黄生品与炮制品中 8 个糖类成分及不同炮制时间点其量变化分析

张文婷¹, 岳超¹, 黄琴伟¹, 袁堃¹, 严爱娟¹, 石上梅^{2*}

1. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052

2. 国家药典委员会, 北京 100061

摘要: **目的** 采用 HPLC 法分析地黄生品及炮制品中 8 种糖类成分, 探索炮制时间对地黄中糖类成分的影响。**方法** 采用 Prevail Carbohydrate ES 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量 0.8 mL/min, 蒸发光散射检测器检测, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱。**结果** 果糖、葡萄糖、蔗糖、密二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、毛蕊花糖分离良好。在相应质量浓度范围内 8 种化合物的线性关系良好, r 在 0.998 4~0.999 7; 平均加样回收率为 97.5%~103.2%。不同炮制时间点定量分析结果显示地黄中糖类成分蔗糖、棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖在炮制过程中呈下降趋势, 而果糖、葡萄糖、密二糖和甘露三糖明显上升。**结论** 地黄生品与炮制品中糖类比例明显不同, 不同炮制时间地黄中糖类成分有不同的变化趋势。

关键词: 生地黄; 熟地黄; 炮制; 糖类成分; 果糖; 葡萄糖; 蔗糖; 密二糖; 棉子糖; 甘露三糖; 水苏糖; 毛蕊花糖

中图分类号: R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)07-1132-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.012

Contents of eight saccharides in unprocessed and processed *Rehmannia glutinosa* and content changes at different processing time points

ZHANG Wen-ting¹, YUE Chao¹, HUANG Qin-wei¹, YUAN Kun¹, YAN Ai-juan¹, SHI Shang-mei²

1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China

2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China

Abstract: **Objective** To analyze the contents of eight saccharides in unprocessed and processed *Rehmannia glutinosa* by HPLC and to investigate the impacts of processing time on saccharides in *R. glutinosa*. **Methods** HPLC conditions were as follows: Prevail Carbohydrate ES column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), flow rate of 0.8 mL/min, ELSD detector, acetonitrile as mobile A and water as mobile B for gradient elution. **Results** Fructose, glucose, sucrose, melibiose, raffinose, manninotriose, stachyose, and verbascose were separated with good linear relationships within their corresponding concentration ranges, the r values were within 0.998 4—0.999 7; the average recovery was 97.5%—103.2%. The content analysis at different processing time points showed that sucrose, raffinose, stachyose, and verbascose exhibited decreasing trend during processing, while fructose, glucose, melibiose, and manninotriose exhibited significantly increasing trend. **Conclusion** The proportions of saccharides in unprocessed and processed *R. glutinosa* are significantly different, and the results of this study could provide the data support for revealing the processing mechanism of *R. glutinosa*.

Key words: unprocessed *Rehmannia glutinosa*; processed *Rehmannia glutinosa*; processing; saccharides; fructose; glucose; sucrose; melibiose; raffinose; manninotriose; stachyose; verbascose

地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根, 为最常用和用量最大的中药材之一。《中国药典》2015 年版收录的炮制方法有蒸法或酒炖法^[1], 地黄加工炮制后药性和功效发生改变, 生地黄大寒而凉血, 蒸制熟地黄性寒而补肾, 酒炖熟地黄性微温而补血^[2], 临

床依据不同药效而应用于不同病症。地黄主要含有糖类、环烯醚萜类、氨基酸类等成分, 其中糖类成分的生物学活性受到了广大学者的关注, 现代研究表明地黄低聚糖类具有提高机体免疫力、促进血细胞增殖、抗氧化、降血糖、抗老年痴呆等作用^[3-10]。目前文献报道地黄生品与炮制品主要关注梓醇、环

收稿日期: 2015-11-03

作者简介: 张文婷, 主任中药师, 研究方向为中药质量评价与新药研究。Tel: (0571)87180337 E-mail: leozhwt@163.com

*通信作者 石上梅, 主任药师, 主要从事中药标准的研究与建立。E-mail: ssm@chp.org.cn

烯醚萜类、水苏糖等成分的差异^[11-12]，但同时测定地黄中 8 种糖类成分的分析方法尚未见报道。为了进一步探讨地黄炮制前后成分的变化规律，阐明炮制作用机制，本实验采用 HPLC-ELSD 法研究地黄生品与炮制品中 8 种糖类成分的变化情况，观察其动态变化过程，为揭示地黄炮制机制提供数据支持。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪，美国安捷伦公司，Chemstation 色谱工作站；AG285 电子天平，瑞士 Mettler Toledo 公司；2000ES 蒸发光散射检测器，Alltech 公司；KQ-300VDB 型双频数控超声波清洗仪，昆山市超声仪器有限公司；MilliQ-Advantage A10，Millipore 公司。

乙腈，Merck 公司，色谱纯；甲醇，杭州化学试剂有限公司，分析纯；纯水，Milli-Q 自制。D-无水葡萄糖（供定量测定用，质量分数 99.5%，批号 110833-201205）、蔗糖（供定量测定用，批号 111507-20001）、果糖（供定量测定用，质量分数 99.4%，批号 100231-121305），均购自中国食品药品检定研究院；密二糖（质量分数 99%，批号 C1301015）、棉子糖（质量分数 99%，批号 E1222007）、水苏糖（质量分数 98%，批号 G1316008），均购自 Aladdin Industrial 公司；甘露三糖（质量分数 > 99%），由中国食品发酵工业研究所赠送；毛蕊花糖（质量分数 > 95%，批号 120801），购于 Megazyme 公司。

地黄、熟地黄样品分别由嘉兴东方国药有限公司（批号：地黄 130605、130610，熟地黄 S130605、S130610）、宁波市中药饮片有限公司（批号：地黄 1305322、130606，熟地黄 S1305322、S130606）、浙江中医药大学中药饮片厂（批号：地黄 3 年存，熟地黄 3 年存）、杭州桐君堂医药药材有限公司中药饮片厂（批号：地黄 20130530、20130604，熟地黄 S20130530、S20130604）提供（同一厂家相应批次的熟地黄由对应批次的生地黄炮制得到），经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定均为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Prevail Carbohydrate ES 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水，梯度洗脱：0~20 min，72%~60%乙腈；20~30 min，60%~55%

乙腈；体积流量 0.8 mL/min；蒸发光散射检测器检测。典型图谱见图 1。

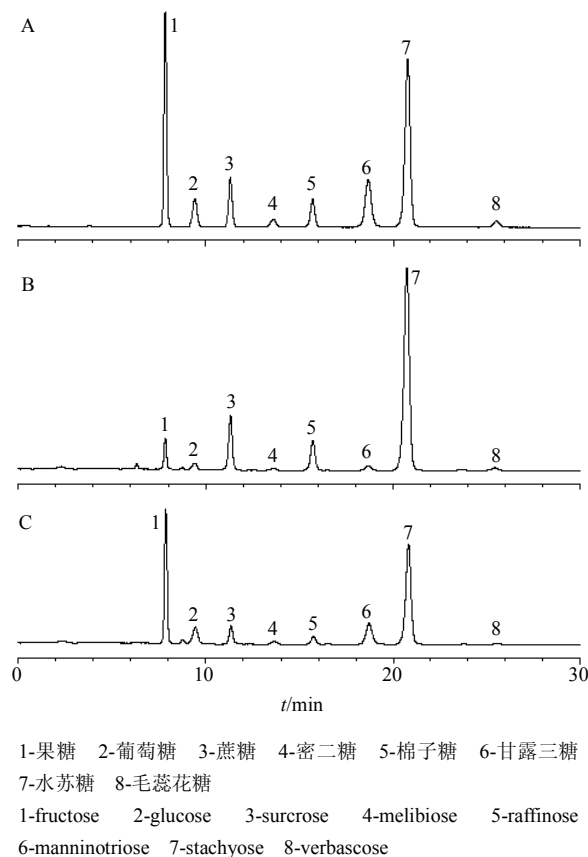


图 1 对照品 (A)、地黄 (B) 和熟地黄 (C) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of reference substances (A), unprocessed *R. glutinosa* (B), and processed *R. glutinosa* (C)

2.2 对照品溶液的制备

取对照品适量，精密称定，加 25% 甲醇分别制成含果糖 362.7 μg/mL、葡萄糖 180.7 μg/mL、蔗糖 160.8 μg/mL、密二糖 133.4 μg/mL、棉子糖 168.0 μg/mL、甘露三糖 752.5 μg/mL、水苏糖 687.0 μg/mL、毛蕊花糖 72.8 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

选取杭州桐君堂提供的地黄（批号 20130530）平均分成 10 份，置蒸锅内，分别蒸制 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27 h，取出，低温干燥，得到不同炮制时间点的熟地黄样品。

取不同批次地黄的生品和炮制品适量，剪碎，精密称定，精密加入等量硅藻土，研匀，取粉末约 2 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入 25% 甲醇溶液 25 mL，精密称定质量，超声处理 1 h，放冷，加 25% 甲醇补足减失的质量，摇匀，高速离心 10 min 后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取上述混合对照品溶液 0.5~30 μL , 分别注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以进样量的对数为横坐标 (X), 峰面积积分值的对数为纵坐标 (Y), 以最小二乘法进行线性回归, 得回归方程、相关系数 (r) 及线性范围分别为果糖 $Y=1.723X+3.594$, $r=0.9991$, 0.181~2.902 μg ; 葡萄糖 $Y=1.532X+3.510$, $r=0.9986$, 90.4~3 614.0 ng; 蔗糖 $Y=1.422X+3.694$, $r=0.9992$, 80.4~3 216.0 ng; 蜜二糖 $Y=1.379X+3.286$, $r=0.9989$, 0.114~2.858 μg ; 棉子糖 $Y=1.486X+3.511$, $r=0.9993$, 0.162~3.240 μg ; 甘露三糖 $Y=1.450X+2.938$, $r=0.9997$, 0.343~10.278 μg ; 水苏糖 $Y=1.449X+3.470$, $r=0.9996$, 0.137~6.183 μg ; 毛蕊花糖 $Y=1.386X+3.592$, $r=0.9984$, 69.6~1 392.0 ng; 结果显示, 果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖和毛蕊花糖分别在相应进样范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

分别精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 以峰面积值为指标计算 RSD ($n=6$), 考察方法精密度, 结果果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖和毛蕊花糖的 RSD 分别为 1.5%、4.3%、2.7%、3.7%、1.8%、0.9%、0.8% 和 3.8%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

精密称取熟地黄 (批号 S130605) 粉末 6 份, 按照“2.3”项方法制备供试品溶液, 测定峰面积并分别计算各成分的量。结果果糖平均质量分数为 45.83 mg/g, RSD 为 1.4%; 葡萄糖平均质量分数为 24.43 mg/g, RSD 为 1.9%; 蔗糖平均质量分数为 17.24 mg/g, RSD 为 3.5%; 蜜二糖平均质量分数为 13.63 mg/g, RSD 为 2.7%; 棉子糖平均质量分数为 16.32 mg/g, RSD 为 1.8%; 甘露三糖平均质量分数为 78.53 mg/g, RSD 为 1.4%; 水苏糖平均质量分数为 81.01 mg/g, RSD 为 0.8%; 毛蕊花糖平均质量分数为 5.29 mg/g, RSD 为 4.3%。

2.7 稳定性试验

取重复性试验第 1 份供试品溶液, 分别间隔 0、3、6、9、11、13 h 进样分析, 以峰面积为指标计算 RSD, 考察供试品溶液稳定性, 结果供试品溶液果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖和毛蕊花糖峰面积的 RSD 分别为 1.5%、

3.0%、2.1%、4.2%、3.5%、2.2%、1.6%、4.3%, 表明对照品溶液和供试品溶液在 13 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

采用加样回收率测定法评价该方法的准确度。精密量取已测定的熟地黄 (批号 S130605) 粉末 6 份, 分别精密加入各对照品溶液适量, 按照供试品制备方法制备供试品溶液, 测定峰面积, 计算平均回收率和 RSD。结果果糖平均回收率为 103.2%, RSD 为 1.4%; 葡萄糖平均回收率为 98.8%, RSD 为 1.3%; 蔗糖平均回收率 99.1%, RSD 为 3.7%; 蜜二糖平均回收率 102.1%, RSD 为 2.0%; 棉子糖平均回收率 98.5%, RSD 为 2.2%; 甘露三糖平均回收率为 99.0%, RSD 为 2.7%; 水苏糖平均回收率为 97.5%, RSD 为 1.6%; 毛蕊花糖平均回收率为 101.3%, RSD 为 2.0%。

2.9 样品测定

取生地黄样品和炮制后的熟地黄样品, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 分别测定果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖和毛蕊花糖的量, 结果见表 1。

将不同炮制时间点的熟地黄样品, 分别按照“2.3”项方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 并计算各成分质量分数, 测定结果见表 2。

表 2 测定结果显示, 与炮制前比较, 熟地黄中果糖、葡萄糖、蜜二糖和甘露三糖明显升高, 而蔗糖、棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖明显下降 ($P<0.01$, 8 个成分炮制前后比较均具显著性差异), 这可能与炮制受热过程蔗糖分解为果糖和葡萄糖、棉子糖分解成为蜜二糖和果糖、水苏糖分解为甘露三糖或蜜二糖相关。从测定结果看出, 生地黄中以蔗糖、棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖为主成分, 而熟地黄中以果糖、葡萄糖、蜜二糖、甘露三糖为主成分。

不同炮制时间点的熟地黄各指标成分定量测定结果发现, 果糖、葡萄糖、蜜二糖和甘露三糖在炮制过程中呈现上升趋势, 9 h 内上升较为明显, 之后变化较为缓和。水苏糖、蔗糖、棉子糖和毛蕊花糖 4 种成分总体呈现下降趋势。

3 讨论

本实验还对地黄经液相分离所得各色谱峰用对照品对照和 LC-MS 手段验证, 证明了对照品成分与地黄中各成分的一致性。

本实验对回流提取和超声提取进行了比较, 结果显示回流提取方法部分指标成分低于超声提取方

表 1 生地黄和熟地黄样品测定结果 ($n = 2$)

Table 1 Determination of samples of unprocessed and processed *R. glutinosa* ($n = 2$)

企业	批号	规格	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
			果糖	葡萄糖	蔗糖	蜜二糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	毛蕊花糖
嘉兴东方国药有限公司	130605	生地	34.92	27.14	59.30	17.42	61.38	63.74	283.63	17.92
	S130605	熟地	88.56	49.60	32.99	26.66	31.39	147.17	153.31	10.79
	130610	生地	37.70	31.34	61.24	18.12	62.72	63.40	275.13	17.00
	S130610	熟地	82.17	44.63	29.33	23.61	27.75	143.09	154.09	10.18
宁波市中药饮片有限公司	1305322	生地	24.57	27.45	98.24	13.26	75.27	38.45	286.26	18.62
	S130532	熟地	130.41	76.10	12.26	37.03	9.92	207.01	31.34	—
	130606	生地	25.26	28.57	67.75	13.73	98.86	55.31	369.42	18.86
	S130606	熟地	133.92	85.71	13.71	38.32	14.65	105.86	27.38	—
杭州桐君堂医药药材有限公司	20130530	生地	13.99	21.27	73.73	10.76	109.90	24.07	314.50	16.11
	S20130530	熟地	105.97	59.56	11.62	40.08	17.62	113.56	61.31	—
	20130604	生地	28.63	25.79	41.36	21.59	75.39	47.46	266.90	15.81
	S20130604	熟地	96.61	54.25	10.38	35.15	13.85	107.44	35.51	—
浙江中医药大学中药饮片厂	3 年存	生地	15.97	21.93	65.36	12.96	111.00	27.14	324.63	18.21
	3 年存	熟地	69.61	44.72	45.36	23.24	71.24	283.32	208.45	13.75

表 2 不同炮制时间点的熟地黄各成分定量测定结果 ($n = 2$)

Table 2 Determination each constituent in processed *R. glutinosa* at different processing time points ($n = 2$)

炮制时间/h	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	果糖	葡萄糖	蔗糖	蜜二糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	毛蕊花糖
0	29.09	37.52	48.80	19.45	57.82	52.85	291.26	20.35
3	49.13	38.42	33.33	21.64	44.94	85.87	225.13	14.89
6	88.24	49.75	29.52	28.09	33.39	151.07	181.52	12.83
9	107.04	59.67	19.33	33.86	21.17	199.87	126.72	10.99
12	105.63	51.70	9.85	34.21	11.62	209.43	53.14	8.54
15	101.89	59.48	9.39	36.76	8.06	214.15	34.41	7.58
18	118.74	80.59	10.50	43.98	7.74	231.91	26.18	6.01
21	102.59	61.12	7.86	35.79	—	223.74	12.69	5.30
24	112.18	69.57	8.61	40.44	—	236.53	6.35	3.53
27	113.24	73.39	8.91	42.42	—	230.95	5.07	3.74

法,与文献报道^[13-15]这些糖类热不稳定性相吻合,故本实验选用超声提取方法。超声时间比较结果显示,超声 40 min 与超声 60 min 结果基本一致,为保证提取完全,实验选用超声 60 min。本实验还对提取溶剂体积进行了比较,结果显示所设计的溶剂体积满足提取要求。本方法所得生地黄和熟地黄图谱特征性明显,可方便地区分两者,方法简便,结果准确,可为评价生地黄和熟地黄质量提供依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [2] 张丽萍, 李 军, 张振凌, 等. 熟地黄炮制方法的历史沿革 [J]. 河南中医学院学报, 2005(2): 69-71.
- [3] 汤建芳, 茹祥斌, 顾国明, 等. 地黄低聚糖对小鼠免疫和造血功能的作用 [J]. 中药药理与临床, 1997, 13(5): 19-21.
- [4] 陈力真, 冯杏婉, 周金黄, 等. 地黄多糖 b 的免疫抑制作用及其机理 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1993, 7(2): 153-156.
- [5] 刘福君, 赵修南, 汤建芳, 等. 地黄寡糖对 SAMP8 小鼠造血祖细胞增殖的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1998, 12(2): 127-130.

- [6] 苗明三, 孙艳红, 方晓艳. (怀) 熟地黄多糖抗氧化作用 [J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(10): 32-33.
- [7] 樊 森, 杨 菁, 白 剑, 等. 地黄寡糖及其主要成分对大鼠脑片氧化应激损伤保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(5): 64-67.
- [8] 苗明三, 方晓艳. 怀地黄多糖免疫兴奋作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2002, 9(3): 159-160.
- [9] 张汝学, 贾正平, 刘景龙, 等. 地黄寡糖对 2 型糖尿病大鼠肝脏糖代谢关键酶活性及基因表达的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 316-320.
- [10] 蒋 青, 沈明勤, 石 磊, 等. 地黄寡糖对血管性痴呆大鼠海马区神经细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 192-196.
- [11] 李更生, 刘 明, 王慧森, 等. 地黄药材炮制过程中环烯醚萜苷类成分动态变化的研究 [J]. 中国中医药科技, 2008, 15(6): 440-442.
- [12] 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.
- [13] 胡志方, 王小平, 郭慧玲, 等. 地黄不同炮制品中低聚糖含量的 HPLC-ELSD 测定 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 877-879.
- [14] 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): 1997-2000.
- [15] 刘彦飞, 赵 宇, 武卫红, 等. 地黄的化学成分及其在加工炮制过程中的变化 [J]. 国外医药·植物药分册, 2007, 22(3): 102-108.