

# HPLC 测定地黄炮制前后 3 种苷类物质的含量

岳超<sup>1</sup>, 高杰<sup>1</sup>, 石上梅<sup>2</sup>, 张文婷<sup>3\*</sup>

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310000; 2. 国家药典委员会, 北京 100000;  
3. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

**[摘要]** 目的:通过 HPLC 对生地黄和熟地黄中地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷 3 种活性成分进行含量测定,比较炮制前后含量变化。方法:Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 203 nm,柱温 30 ℃。结果:在该条件下 3 个活性成分均得到良好的分离,生地黄中,地黄苷 D、益母草苷和毛蕊花糖苷分别在进样量 68.10 ~ 3 405, 99.40 ~ 4 970, 14.52 ~ 726.0 ng 有良好的线性关系,加样回收率在 97.7% ~ 99.0%。结论:建立的含量测定方法稳定、灵敏度高,重复性强,可以用于地黄的质量评价。

**[关键词]** 地黄; 地黄苷 D; 益母草苷; 毛蕊花糖苷; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1; R283.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0071-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040071

## Simultaneous Determination of Three Components in Crude and Processed Rehmanniae Radix by HPLC

YUE Chao<sup>1</sup>, GAO Jie<sup>1</sup>, SHI Shang-mei<sup>2</sup>, ZHANG Wen-ting<sup>3\*</sup> (1. Zhejiang Medical University, Hangzhou 310000, China; 2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100000, China; 3. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of rehmannioside D, leonuride, acteoside in crude and processed Rehmanniae Radix, then compared the content variation before and after processing. **Method:** Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase was a mixture of acetonitrile (A)-water (B) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> for gradient elution, the column temperature was 30 ℃ with analysis was monitored at 203 nm. **Result:** Three components had good linear relationships: rehmannioside D in the range of 68.10-3 405 ng, leonuride in the range of 99.40-4 970 ng, acteoside in the range of 14.52-726.0 ng, the average recoveries in the range of 97.7%-99.0%. **Conclusion:** The method was steady with high precision and good sensitivity. It could be used for the quality control of Rehmanniae Radix.

**[Key words]** Rehmanniae Radix; Rehmanniae Radix praeparata; rehmannioside D; leonuride; acteoside; HPLC

地黄分为鲜、生、熟 3 种,功效各有不同。生地黄清热凉血、滋阴生津,熟地黄补血、滋阴。目前地黄中已分离得到的化学成分主要有环烯醚萜苷类、环烯醚萜类、紫罗兰酮类、苯乙醇苷类、多种糖类、氨基酸及微量元素等<sup>[1-2]</sup>, 烯醚萜苷类成分和苯乙醇苷类成分是地黄中的主要活性成分,同时也是地黄发挥疗效的主要物质基础<sup>[1,3-5]</sup>。现代药理学研究表明,地黄具有治疗心脑血管疾病、调节内分泌系

统、提高免疫力、抗肿瘤、降血糖以及抗炎等功效<sup>[6-7]</sup>。环烯醚萜类化合物极性普遍较大,易溶于水,加热过程化学成分有一定的变化<sup>[8]</sup>。2010 年版《中国药典》一部,熟地黄项下仅收载毛蕊花糖苷的含量测定项,熟地黄炮制过程复杂,由于产地及加工技术不同,使得熟地黄品质差异较大。饮片加工过程中,可能出现使用鲜地黄或陈年地黄作为加工原料或在炮制过程中减少蒸制时间,而药材中毛蕊花

**[收稿日期]** 20140804(007)

**[第一作者]** 岳超,在读硕士,从事中药质量评价分析与新药开发研究, Tel:15157145301, E-mail:185803541@qq.com

**[通讯作者]** \* 张文婷, 博士, 主任中药师, 从事中药质量评价分析与新药研究, Tel:0571-86459425, E-mail:leozhwt@163.com

糖苷含量却能达到指标限度的现象。这样无法控制熟地黄药材的质量,无法保证药性的充分发挥。本实验选择地黄苷 D 和益母草苷(环烯醚萜类化合物)、毛蕊花糖苷(苯乙醇苷类化合物)为指标性成分,进行含量测定,比较炮制前后 3 个指标性成分的变化,可为合理评价生地黄和熟地黄的质量提供依据。

### 1 仪器与试剂

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,配备 G1311B 型四元泵, G1329B 型自动进样仪, G1316A 型柱温箱, G4212B 型二极管阵列检测器, Agilent Chemstation 色谱工作站), AG285 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo)。

毛蕊花糖苷对照品(批号 111530-200505)购自中国食品药品检定研究院,益母草苷对照品(批号 34-1862,纯度 $\geq 98\%$ )购自四川省维克奇生物科技有限公司;地黄苷 D 对照品(纯度 $\geq 98\%$ )由河南省中医药研究院中药研究所提供。乙腈(MERCK 公司,色谱纯),甲醇(杭州化学试剂有限公司,分析纯),水为自制纯水。

本实验共收集 6 家饮片加工企业生产的 9 批生地黄样品和 9 批熟地黄样品(炮制前后批号相同)进行含量测定。

### 2 方法与结果

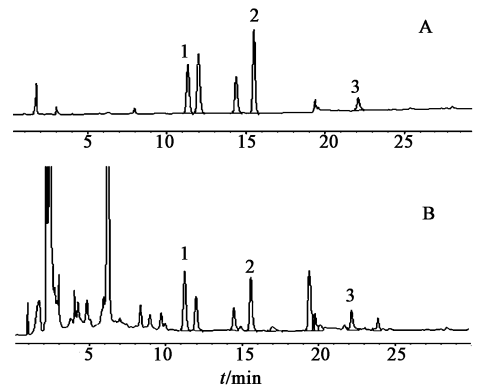
**2.1 色谱条件** Kromasil 100-5C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~15 min, 3%~8% A; 15.01~30 min, 20%~28% A),检测波长 203 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,理论板数按益母草苷峰计算不低于 5 000。见图 1。

#### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 取地黄苷 D、益母草苷和毛蕊花糖苷对照品适量,加 25% 甲醇制成每 1 mL 含地黄苷 D、益母草苷和毛蕊花糖苷为 70, 100, 15 μg 的混合溶液,即得。

**2.2.2 供试品溶液** 取生地黄粉末(华东中药饮片有限公司)适量,剪碎,精密加入与药材相同质量的硅藻土,粉碎,取样品粉末约 2 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入 25% 甲醇溶液 25 mL,超声处理 1 h,高速离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>)10 min 后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.3 线性关系考察** 精密吸取地黄苷 D(68.11 mg·L<sup>-1</sup>)、益母草苷(99.40 mg·L<sup>-1</sup>)和毛蕊花糖苷(14.52 mg·L<sup>-1</sup>)混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20,



A. 对照品; B. 样品  
1. 地黄苷 D; 2. 益母草苷; 3. 毛蕊花糖苷

图 1 地黄 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Rehmanniae Radix

30, 50 μL 进样;以色谱峰面积(Y)对进样量(X)进行回归,计算回归方程。结果显示,地黄苷 D、益母草苷和毛蕊花糖苷分别在进样量 68.10~3 405, 99.40~4 970, 14.52~726.0 ng 均有良好的线性关系,见表 1。

表 1 3 种指标性成分线性关系考察

Table 1 Linearities of the calibration curves of 3 marker components

成分	线性方程	r	线性范围/ng
地黄苷 D	$Y = 0.5171X + 5.5784$	0.9999	68.10 ~ 3 405
益母草苷	$Y = 0.5158X + 4.3950$	1.0000	99.40 ~ 4 970
毛蕊花糖苷	$Y = 1.2729X - 1.7479$	1.0000	14.52 ~ 726.0

**2.4 精密度试验** 精密吸取上述混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录峰面积。结果地黄苷 D 峰面积 RSD 0.2%,益母草苷峰面积 RSD 0.1%,毛蕊花糖苷峰面积 RSD 1.3%,表明本试验仪器精密度良好。

**2.5 重复性考察** 精密称取同一批生地黄样品粉末 6 份,按 2.2.2 项下方法制备样品溶液,测定峰面积并分别计算各成分含量。结果显示,地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷的平均质量分数分别为 1.195 (RSD 2.3%), 1.854 (RSD 2.0%), 0.259 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 2.4%)。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一份供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,结果地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷供试品溶液 RSD 分别为 0.8%, 0.8%, 2.5%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.7 加样回收率试验** 精密称取同一批生地黄

样品粉末 6 份分别置于锥形瓶中,分别精密加入地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷对照品溶液适量,使样品溶液中分别含有地黄苷 D 1.277 mg,

益母草苷 1.065 mg,毛蕊花糖苷 0.218 mg。按 2.2.2 项下方法制备。按照 2.1 项下色谱条件测定,计算平均回收率和 RSD。结果见表 2。

表 2 地黄中 3 个指标性成分的加样回收率试验

Table 2 Recoveries of 3 marked components in Rehmanniae Radix

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
地黄苷 D	1.005 4	1.202	1.277	2.481	100.22	99.0	2.5
	0.997 2	1.192	1.277	2.449	98.43		
	1.002 1	1.198	1.277	2.440	97.61		
	0.999 7	1.195	1.277	2.409	95.11		
	1.002 3	1.198	1.277	2.505	102.36		
	1.002 9	1.199	1.277	2.478	100.20		
益母草苷	1.005 4	1.864	1.065	2.910	98.23	98.5	2.2
	0.997 2	1.849	1.065	2.905	99.2		
	1.002 1	1.858	1.065	2.880	95.94		
	0.999 7	1.853	1.065	2.880	96.41		
	1.002 3	1.858	1.065	2.945	102.05		

2.8 3 种指标性成分含量的测定 对收集到的 9 家生产企业共 14 批生地黄和 15 批熟地黄,按照 2.2.2

项方法制备成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果见表 3。

表 3 地黄中 3 个指标性成分含量测定

Table 3 Assay results of 3 marker components in Rehmanniae Radix

mg·g<sup>-1</sup>

生产企业	生地黄			熟地黄		
	地黄苷 D	益母草苷	毛蕊花糖苷	地黄苷 D	益母草苷	毛蕊花糖苷
华东中药饮片有限公司	2.771	3.873	0.314	2.355	0.846	0.150
	1.553	1.169	0.328	1.105	0.000	0.154
桐君堂中药饮片有限公司	1.949	1.388	0.321	1.083	0.000	0.310
	1.523	1.568	0.285	1.346	0.463	0.216
嘉兴东方国药有限公司	1.341	1.171	0.316	1.011	0.501	0.240
	1.100	0.548	0.433	0.722	0.193	0.249
金华医药中药饮片有限公司	1.591	1.108	0.477	0.978	0.324	0.285
	1.794	0.939	0.313	1.128	0.259	0.221
宁波市中药饮片有限公司	2.091	1.404	0.389	1.027	0.000	0.146

### 3 讨论

预试验比较乙腈-0.1% 冰乙酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-水为流动相及不同洗脱条件,考察被测组分与杂质峰分离情况,以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱时峰形较好,分离度高,基线平稳。

由于实验中的 3 个指标性成分中地黄苷 D、益母草苷为末端吸收,毛蕊花糖苷的最大吸收波长为

334 nm,为兼顾同时测定 3 个成分,最终选择 203 nm 作为检测波长。

在供试品溶液的制备过程中,分别对提取溶剂(25% 甲醇,75% 甲醇,甲醇和水)、提取时间(40,60,80 min)、取样量(1.5,2.0,2.5 g)进行了考察,结果表明不同提取条件含量差异不大,其中选用 2.0 g 样品粉末用 25 倍 25% 甲醇溶液超声处理 40,60,80 min 时含量达到最高,考虑到提取效率的完

全,最终选择 2.0 g 样品粉末用 25 倍 25% 甲醇溶液超声处理 60 min 为最终提取方法。

测定结果显示 3 种成分经过炮制加工均呈不同程度的降低。地黄苷 D 相对稳定,益母草苷系单糖苷,热稳定性较差<sup>[9]</sup>,熟地黄的炮制过程复杂,使其损失较大。《中国药典》2010 年版(一部)熟地黄的炮制方法中,并未明确蒸制或酒炖时间以及干燥的温度和时间等参数,这些因均素对地黄中化学成分有影响,使得不同批次生、熟地黄中 3 种成分含量差异较大。

本研究建立的 HPLC 同时测定地黄中地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷含量的测定方法,出峰时间短,分离度好,操作简便,专属性强,可为地黄的质量评价提供依据。

#### [参考文献]

[1] Li G S, Yu Z, Wang H S. Some research advances on chemical constituents and pharmacologic actions of *Rehmannia Glutinosa*[J]. *Foreign Med Sci (Chin Tradit Med)*, 2004, 26 (2): 74-75.  
[2] Liu Y F, Zhao Y, Wu W H, et al. Chemical constituents of *Re-hmannia glutinosa* and the change in the course of processing[J]. *World Notes Plant Med*, 2007, 22 (3): 102-108.

[3] 邢洁,徐为人,刘鹏. 栀子和地黄环烯醚萜类成分抗炎作用的虚拟评价[J]. *中草药*, 2009, 40 (6): 930-935.  
[4] 刘鹤香,肖振民,常东明. 怀地黄不同提取物的药理作用及有效部位分析[J]. *新乡医学报*, 1989, 6(4): 228-230.  
[5] Liu Y F, Zhao Y, Wu W H, et al. Chemical constituents of *Re-hmannia glutinosa* and the change in the course of processing[J]. *World Notes Plant Med*, 2007, 22 (3): 102-108.  
[6] Zeng Y, Jia Z P, Zhang R X. The progress in studies on chemical constituents and pharmacology of *Rehmanniae Radix*[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2006, 28 (4): 609-611.  
[7] Liu W X, Lu Y W, Du H T, et al. Pharmacological actions of *Radix Rehmanniae* and its active components research advances[J]. *J Inter Pharm Res*, 2009, 36 (4): 277-280.  
[8] 李更生,于震,王慧森. 地黄化学成分与药理研究进展[J]. *国外医学:中医中药分册*, 2004, 26 (2): 74.  
[9] Zhao Y, Wen X S, Wu W H. Current situation of the contents of catalpol in different preparations of *Radix Rehmanniae* [J]. *Chin Pharm J*, 2007, 42 (7): 486-488, 553.

[责任编辑 顾雪竹]