

地黄不同炮制品薄层色谱鉴别方法的建立

张颖, 孙菲菲, 杨佳宁, 张江山, 张振凌*

(河南中医药大学药学院, 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 郑州 450008)

[摘要] 目的:建立地黄不同炮制品的薄层色谱鉴别方法。方法:以D-果糖、梓醇、蔗糖、棉子糖、水苏糖、蜜二糖及甘露三糖为对照品,考察提取溶剂(水,20%甲醇,50%甲醇,80%甲醇),展开剂(正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水,乙酸乙酯-吡啶-冰乙酸-水,正丁醇-冰乙酸-水),显色剂(苯胺-二苯胺-磷酸溶液,茚三酮溶液),点样量(2,4,6 μL),检视条件(日光,日光底部灯,365 nm和254 nm)对薄层色谱分析的影响,确定生地黄及熟地黄饮片的供试品溶液制备方法和最佳薄层色谱条件。结果:采用薄层色谱高效硅胶G板,以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂展开,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110 °C下加热显色,于日光底部灯下进行检视,所得地黄不同炮制品薄层色谱分离效果和显色效果更佳,斑点清晰且特征性好。结论:该薄层色谱鉴别方法操作简便易行,定性特征明显、结果直观,可有效鉴别地黄不同炮制品,并可为熟地黄的炮制终点确定提供实验依据。

[关键词] 地黄; 熟地黄; 薄层色谱法; 展开剂; 显色剂; 糖类; 提取溶剂

[中图分类号] R22;O657;R28;R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0142-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200849

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191223.1114.001.html>

[网络出版日期] 2019-12-23 11:17

Establishment of Thin Layer Chromatography Identification Method for Different Processed Products of Rehmanniae Radix

ZHANG Ying, SUN Fei-fei, YANG Jia-ning, ZHANG Jiang-shan, ZHANG Zhen-ling*

(Henan Engineering Research Center for Characteristic Processing Technology of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a thin layer chromatography (TLC) identification method for different processed products of Rehmanniae Radix. **Method:** Catalpol, D-fructose, sucrose, raffinose, stachyose, melibiose and manninotriose were used as control substances, and the effects of extraction solvents (water, 20% methanol, 50% methanol, 80% methanol), developing solvents (*n*-butanol-methanol-chloroform-glacial acetic acid-water, ethyl acetate-pyridine-glacial acetic acid-water, *n*-butanol-glacial acetic acid-water), color reagents (aniline-diphenylamine-phosphoric acid solution, ninhydrin solution), sampling volumes (2, 4, 6 μL) and inspection conditions (sunlight, bottom lamp of sunlight, 365 nm, 254 nm) on TLC were investigated to determine the preparation method of sample solution of Rehmanniae Radix and Rehmanniae Radix Praeparata and the optimal TLC conditions. **Result:** High performance silica gel G plate was used for TLC, *n*-butanol-methanol-chloroform-glacial acetic acid-water (13:5:5:1:2) was used as developing agent, aniline-diphenylamine-phosphoric acid solution was sprayed and heated at 110 °C for color development, and then inspected under the bottom lamp of sunlight. The separation and color development of different processed

[收稿日期] 20190925(018)

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-HEN-17,ZYBZH-Y-HEN-18);国家重点研发计划项目(2017YFC1702800,2018YFC1707202);河南中医药大学研究生科研创新基金项目(YJS 2018B11)

[第一作者] 张颖,在读硕士,从事中药饮片标准化研究,E-mail:zhangying6583@163.com

[通信作者] *张振凌,教授,从事中药炮制机制及饮片标准化研究,Tel:0371-65680970,E-mail:zhangz16758@163.com

products of *Rehmanniae Radix* were good with clear spots and good characteristics. **Conclusion:** The established TLC is simple and easy to operate with obvious qualitative characteristics and intuitive results. It can effectively identify different processed products of *Rehmanniae Radix* and provide experimental basis for determining the end point of processing of *Rehmanniae Radix Praeparata*.

[Key words] *Rehmanniae Radix*; *Rehmanniae Radix Praeparata*; thin layer chromatography (TLC); developing solvent; color reagent; carbohydrates; extraction solvent

地黄为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根,秋季采挖,鲜用或炮制后用,临床常用的炮制品有生地黄和熟地黄,其功效各异。生地黄性寒,味甘,能清热凉血,养阴生津;熟地黄性微温,味甘,能补血滋阴,益精填髓^[1]。现代药理实验表明,地黄具有增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤、抗骨质疏松、降血糖、抗胃溃疡、凉血止血、补血等作用^[2-10],其化学成分已见报道的有环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、氨基酸等^[11-16]。随着科学技术的进步,化学成分在建立饮片质量标准中起着越来越重要的作用,熟地黄炮制时间一般较长,古法记载中强调“色黑如漆,味甘如饴”为熟地黄的传统评价标准,且这种经验一直沿用至今,但到底蒸制多长时间可达到熟地黄炮制终点,如何判断其炮制终点,始终是熟地黄炮制研究的焦点。2015年版《中国药典》^[1]地黄项下有梓醇和毛蕊花糖苷的薄层鉴别,但将地黄及其加工炮制品熟地黄分别收载,薄层鉴别方法也不相同,检测成本较高;另外熟地黄饮片虽然单列,但其含量检测指标毛蕊花糖苷的含量限度与生地黄饮片相同,均不得少于0.020%,并未体现生地黄与熟地黄间的差异,造成了市场上有些熟地黄饮片虽含量符合要求但实际上并未真正达到传统炮制要求;此外,熟地黄薄层鉴别项下仅有毛蕊花糖苷的鉴别,并不能解决如何判断其炮制终点的问题。

基于以上方面,本研究以生地黄加工成熟地黄过程中化学成分的变化为出发点,旨在建立一种同时适用于生地黄、熟地黄的薄层色谱鉴别方法,使地黄项下的薄层色谱鉴别方法更加简便易行、经济实用。通过前期文献研究发现,在生地黄炮制为熟地黄的过程中,糖类成分随炮制时间的增加呈现出不同的变化趋势,进而使糖类成分在生地黄、熟地黄中的含量产生了较大差异^[17-21]。经对照饮片及对照品定位分析,预试验确定生地黄饮片中薄层鉴别指标为梓醇、蔗糖、棉子糖及水苏糖,熟地黄饮片中薄层鉴别指标为D-果糖、蜜二糖及甘露三糖,本研究根据糖类成分在生地黄与熟地黄中的差异对地黄不同炮制品进行薄层鉴别方法研究,建立可区别

生地黄、熟地黄的薄层色谱鉴别方法,为地黄饮片的质量评价提供参考。

1 材料

FW-200型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),BSA224S-CW型电子天平(德国赛多利斯科技仪器有限公司),ATS4型全自动薄层点样仪(瑞士卡玛公司)。生地黄、熟地黄对照饮片(中国食品药品检定研究院,批号分别为121180-201506,121196-201406,规格分别为2,1g),梓醇、蔗糖、棉子糖、水苏糖和D-果糖对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号分别为PS010435,PS020086,PS020223,PS020341,PS010306,纯度均>98%),甘露三糖、蜜二糖对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为L15N9Y74889,K23M7S15176,纯度均≥98%),硅胶G板(规格10cm×20cm,批号20190212)和高效硅胶G板(规格10cm×10cm,10cm×20cm,批号20190307)(青岛海洋化工厂),HSG型薄层色谱硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司,批号020190102,规格10cm×20cm),TLC Silica gel 60型硅胶G板(德国默克公司,规格10cm×20cm),水为蒸馏水或双蒸水,试剂均为分析纯。生地黄及熟地黄饮片经河南中医药大学药学院张振凌教授分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的干燥块根及其炮制加工品,D1~D10为生地黄饮片,S1~S10为熟地黄饮片,各批次样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱条件考察

2.1.1 供试品溶液的制备 分别取生地黄及熟地黄样品粉末1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加水50mL,超声处理1h,滤过,取续滤液5mL并转移至10mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 对照品、对照饮片溶液的制备 称取梓醇、蔗糖、棉子糖、水苏糖、蜜二糖、甘露三糖以及D-果糖对照品适量,加水分别制成每1mL约含1mg的对照品溶液;取生地黄及熟地黄对照饮片各1.0g,

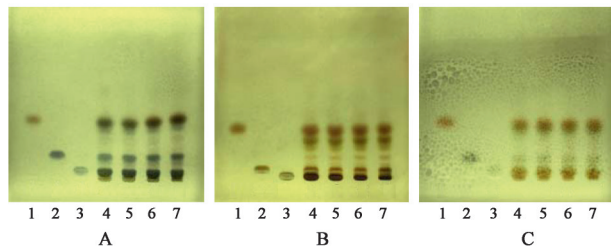
表1 生地黄和熟地黄的样品信息

Table 1 Sample information of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata*

编号	产地	生产批号	生产企业	编号	产地	批号	生产企业
D1	河南	18030303	郑州瑞龙制药股份有限公司	S1	河南	B190508	郑州瑞龙制药股份有限公司
D2	山西	B190522	郑州瑞龙制药股份有限公司	S2	山西	B190514	郑州瑞龙制药股份有限公司
D3	河南	A181001	湖北金贵中药饮片有限公司	S3	河南	A181102	湖北金贵中药饮片有限公司
D4	河南	180901	安徽孟氏中药饮片有限公司	S4	山西	A181001	湖北金贵中药饮片有限公司
D5	山西	20181101	湖南药圣堂中药科技有限公司	S5	山西	180601	湖南药圣堂中药科技有限公司
D6	河南	190302	安国安兴中药饮片有限公司	S6	河南	190109	安国安兴中药饮片有限公司
D7	河南	1811300471	亳州市沪谯药业有限公司	S7	河南	1808120361	亳州市沪谯药业有限公司
D8	河南	20181101	山西振东道地药材开发有限公司	S8	河南	20170601	山西振东道地药材开发有限公司
D9	河南	181100179	康美(亳州)世纪国药有限公司	S9	山西	20180701	山西振东道地药材开发有限公司
D10	河南	170201	禹州市百草汇药业有限公司	S10	河南	160701	禹州市百草汇药业有限公司

照2.1.1项下方法制备相应对照饮片溶液。

2.1.3 不同展开剂考察 取熟地黄饮片供试品溶液及D-果糖、蜜二糖、甘露三糖对照品溶液各2 μL, 点于高效硅胶G薄层板上, 分别选择正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(12.5:4.5:5:1.5:1.5), 乙酸乙酯-吡啶-冰乙酸-水(7:3:0.2:1.4), 正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5)为展开剂展开, 喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液, 110 °C加热显色至斑点清晰, 于日光底部灯下检视。结果显示, 以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(12.5:4.5:5:1.5:1.5)为展开剂时各主斑点显色清晰, 展开效果较好, 见图1。



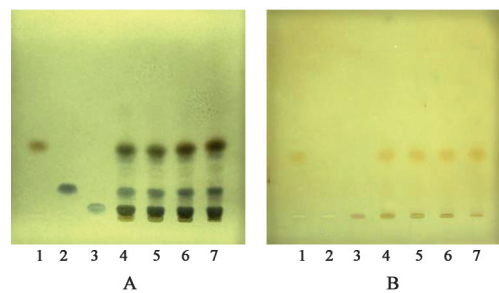
A. 正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(12.5:4.5:5:1.5:1.5); B. 乙酸乙酯-吡啶-冰乙酸-水(7:3:0.2:1.4); C. 正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5)

图1 熟地黄样品S1薄层鉴别的展开剂考察

Fig. 1 Investigation on different development agents for TLC of *Rehmanniae Radix Praeparata* sample S1

2.1.4 显色剂考察 取熟地黄饮片供试品溶液及D-果糖、蜜二糖、甘露三糖对照品溶液各2 μL, 点于高效硅胶G薄层板上, 以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(12.5:4.5:5:1.5:1.5)为展开剂, 展开, 分别喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液、茚三酮溶液, 110 °C加热显色至斑点清晰, 于日光底部灯下检视。结果发现以苯胺-二苯胺-磷酸溶液为显色剂时各斑点显色清晰; 以茚三酮溶液为显色剂时只有对照品D-果糖

显色, 故选择苯胺-二苯胺-磷酸溶液作为显色剂, 见图2。



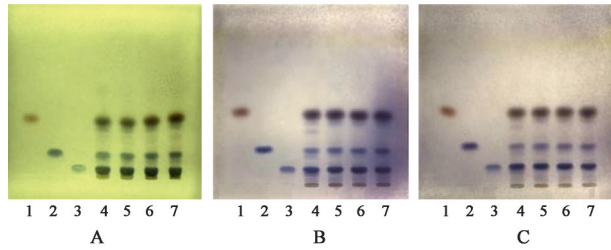
A. 苯胺-二苯胺-磷酸溶液; B. 茚三酮溶液

图2 熟地黄样品S1薄层鉴别的显色剂考察

Fig. 2 Investigation on different color reagents for TLC of *Rehmanniae Radix Praeparata* sample S1

2.1.5 展开剂比例的优化 以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(12.5:4.5:5:1.5:1.5)比例展开时, 甘露三糖分离效果不理想, 故在原来基础上对展开剂比例进行优化。取熟地黄饮片供试品溶液及D-果糖、蜜二糖、甘露三糖对照品溶液各2 μL, 点于高效硅胶G薄层板上, 分别以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:6:5:2:2)和正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂, 展开, 分别喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液, 110 °C加热显色, 于日光底部灯下检视。结果发现以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂时, 斑点清晰, 分离效果较好, 见图3。

2.1.6 提取溶剂考察 选择水, 20% 甲醇, 50% 甲醇, 80% 甲醇为提取溶剂, 照2.1.1项下方法制备相应供试品溶液, 取生地黄、熟地黄饮片供试品溶液及对照品溶液各2 μL, 点于高效硅胶G薄层板上, 以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)

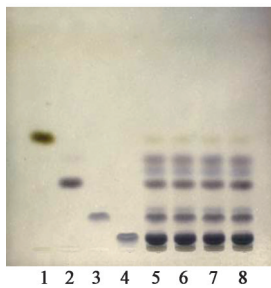


A. 正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(12.5:4.5:5:1.5:1.5); B. 正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:6:5:2:2); C. 正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)

图3 熟地黄饮片薄层鉴别的展开剂考察

Fig. 3 Investigation on different developing solvents for TLC of *Rehmanniae Radix Praeparata*

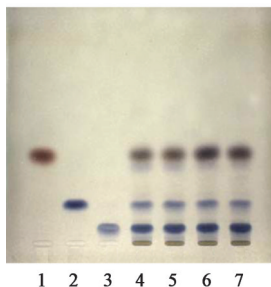
为展开剂,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110℃下加热显色,于日光底部灯下检视。结果发现不同提取溶剂下各斑点大小和颜色深浅无显著性差异,综合提取溶剂的成本考虑,选择蒸馏水为提取溶剂,见图4,5。



1. 梓醇对照品; 2. 蔗糖对照品; 3. 棉子糖对照品; 4. 水苏糖对照品; 5. 水提取样品; 6. 20% 甲醇提取样品; 7. 50% 甲醇提取样品; 8. 80% 甲醇提取样品

图4 生地黄样品D1薄层鉴别的提取溶剂考察

Fig. 4 Investigation on different extraction solvents for TLC of *Rehmanniae Radix sample D1*

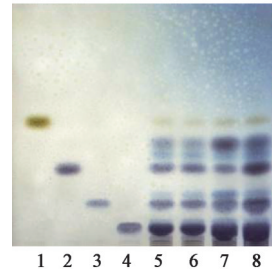


1. D-果糖对照品; 2. 蜜二糖对照品; 3. 甘露三糖对照品; 4. 水提取样品; 5. 20% 甲醇提取样品; 6. 50% 甲醇提取样品; 7. 80% 甲醇提取样品

图5 熟地黄样品S1薄层鉴别的提取溶剂考察

Fig. 5 Investigation on different extraction solvents for TLC of *Rehmanniae Radix Praeparata sample S1*

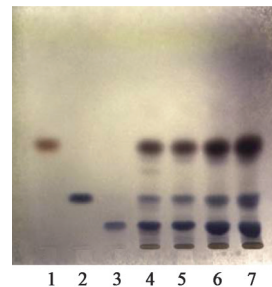
2.1.7 点样量考察 取各对照品及对照饮片溶液2μL,另分别吸取供试品溶液2,4,6μL点于同一高效硅胶G薄层板上,以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110℃下加热显色,于日光底部灯下检视,结果发现当点样量为4,6μL时存在不同程度的拖尾现象;当点样量为2μL时斑点清晰,分离效果较好,故选择点样量2μL,见图6,7。



1. 梓醇对照品; 2. 蔗糖对照品; 3. 棉子糖对照品; 4. 水苏糖对照品; 5. 生地黄对照饮片; 6. 点样量2μL; 7. 点样量4μL; 8. 点样量6μL

图6 生地黄样品D1薄层鉴别的点样量考察

Fig. 6 Investigation on different sampling quantity for TLC of *Rehmanniae Radix sample D1*



1. D-果糖对照品; 2. 蜜二糖对照品; 3. 甘露三糖对照品; 4. 熟地黄对照饮片; 5. 点样量2μL; 6. 点样量4μL; 7. 点样量6μL

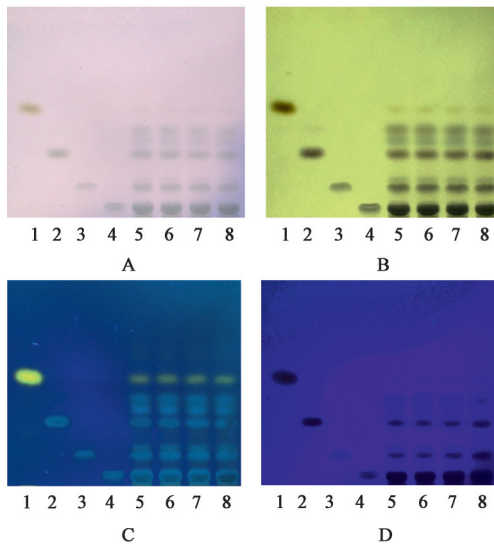
图7 熟地黄样品S1薄层鉴别的点样量考察

Fig. 7 Investigation on different sampling quantity of *Rehmanniae Radix Praeparata sample S1*

2.1.8 检视条件考察 吸取供试品、对照品及对照饮片溶液各2μL,分别点于同一高效硅胶G薄层板上,以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110℃加热显色后分别在日光,日光底部灯,365nm以及254nm处检视。结果发现在日光底部灯下各斑点显色均较清晰,综合显色效果较好,见图8,9。

2.2 方法学验证

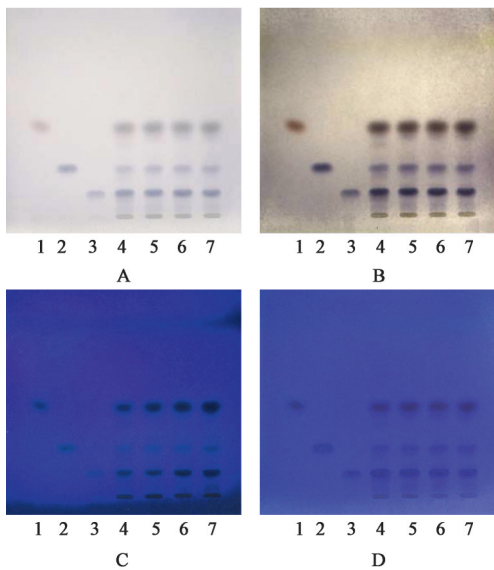
2.2.1 专属性考察 分别吸取2.1.1及2.1.2项下供试品溶液、对照饮片溶液和各对照品溶液适量,点于同一高效硅胶G薄层板上,按上述优选的检测方法进行专属性试验,见图10。结果发现在生地黄



1. 梓醇对照品; 2. 蔗糖对照品; 3. 棉子糖对照品; 4. 水苏糖对照品; 5. 对照饮片; 6~8. 样品 D1; A. 日光; B. 日光底部灯; C. 365 nm; D. 254 nm(图 11 同)

图 8 生地黄样品检视条件考察

Fig. 8 Investigation on inspection conditions of *Rehmanniae Radix* samples



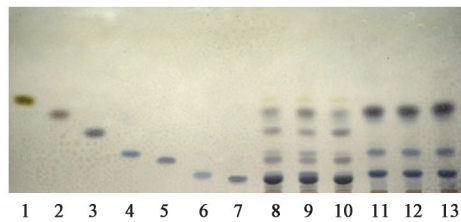
1. D-果糖对照品; 2. 蜜二糖对照品; 3. 甘露三糖对照品; 4. 对照饮片; 5~7. 样品 S1(图 12 同)

图 9 熟地黄样品检视条件考察

Fig. 9 Investigation on inspection conditions of *Rehmanniae Radix Praeparata* samples

饮片供试品溶液的薄层色谱中,比移值(R_f)为 0.50 的暗黄色条带, R_f 为 0.32 的蓝色条带, R_f 为 0.16 的蓝色条带和 R_f 为 0.05 的蓝色条带所呈现的颜色和位置分别与梓醇、蔗糖、棉子糖及水苏糖对照品条带一致,供试品溶液薄层色谱中所有条带与生地黄对照饮片溶液薄层色谱中条带一致;在熟地黄饮片供

试品溶液薄层色谱中, R_f 为 0.45 的棕色条带, R_f 为 0.22 的蓝色条带和 R_f 为 0.10 的蓝色条带所呈现的颜色和位置分别与 D-果糖、蜜二糖及甘露三糖对照品条带一致,供试品溶液薄层色谱中所有条带与熟地黄对照饮片溶液薄层色谱中条带一致,表明该方法专属性良好。



1. 梓醇对照品; 2. D-果糖对照品; 3. 蔗糖对照品; 4. 蜜二糖对照品; 5. 棉子糖对照品; 6. 甘露三糖对照品; 7. 水苏糖对照品; 8. 生地黄对照饮片; 9~10. 样品 D1; 11. 熟地黄对照饮片; 12~13. 样品 S1(图 13, 14 同)

图 10 地黄不同炮制品的专属性试验薄层色谱

Fig. 10 TLC of speciality test for different processed products of *Rehmanniae Radix*

2.2.2 稳定性考察 按 2.1.1 及 2.1.2 项下方法分别制备生地黄、熟地黄供试品溶液、对照饮片溶液和对照品溶液,照薄层色谱法[2015 年版《中国药典》(四部)通则 0502]试验,分别于制备后 0, 1, 2, 3, 4, 5 d 吸取各溶液 2 μ L, 分别点于高效硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂,展开,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110 $^{\circ}$ C 加热显色至斑点清晰,置日光底部灯下检视,结果表明供试品溶液在 5 d 内稳定性良好,见图 11, 12。

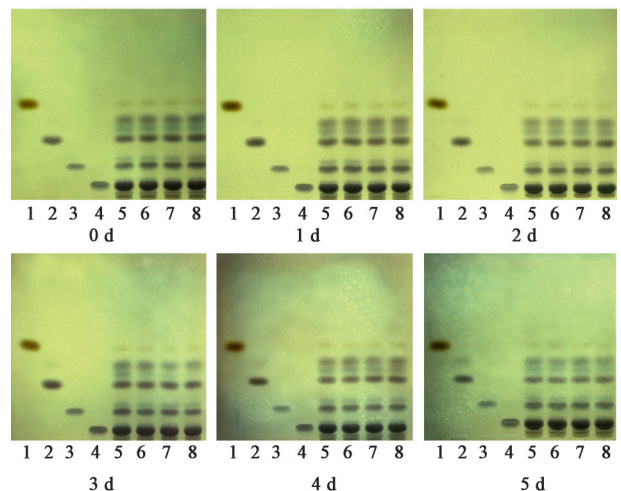


图 11 生地黄样品溶液的稳定性考察

Fig. 11 Investigation on stability of *Rehmanniae Radix* sample solution

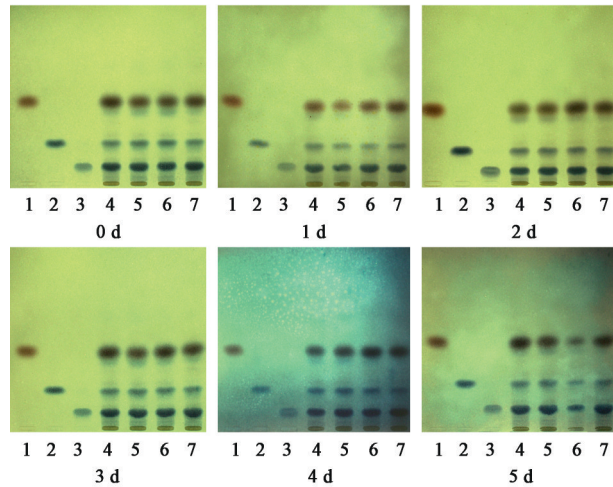


图12 熟地黄样品溶液的稳定性考察

Fig. 12 Investigation on stability of Rehmanniae Radix Praeparata sample solution

2.2.3 耐用性考察 取2.1.1及2.1.2项下溶液各2 μL,分别点于不同薄层板(青岛海洋硅胶G板、青岛海洋高效硅胶G板、默克硅胶G板、烟台江友高效G板),正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂,展开,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110℃加热显色至斑点清晰,置日光底部灯下检视,结果显示4种薄层板均呈现了较好的分离效果,其中默克硅胶G板色谱图中条带较窄、斑点清晰、分离效果最好;青岛海洋高效硅胶G板次之,综合成本考虑,选择青岛海洋高效硅胶G板作为实验用薄层板,见图13。取2.1.1及2.1.2项下溶液各2 μL,以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂,用硫酸调节不同湿度下的展开缸环境,于不同温度(4,25,40℃)及不同相对湿度(32%,47%,65%,88%)下展开,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110℃加热显色至斑点清晰,置日光底部灯下检视,结果发现不同温度及相对湿度对展开效果无明显影响,见图14。

2.3 验证试验 综上分析,最终确定地黄饮片薄层色谱鉴别方法为照2.1.1及2.1.2项下制备供试品、对照品、对照饮片溶液,吸取各溶液2 μL,分别点于同一高效硅胶G薄层板上,以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以苯胺-二苯胺-磷酸溶液,110℃加热显色至斑点清晰,于日光底部灯下检视。结果发现供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,见图15,16。

3 讨论

3.1 鉴别指标的选择 2015年版《中国药典》中熟

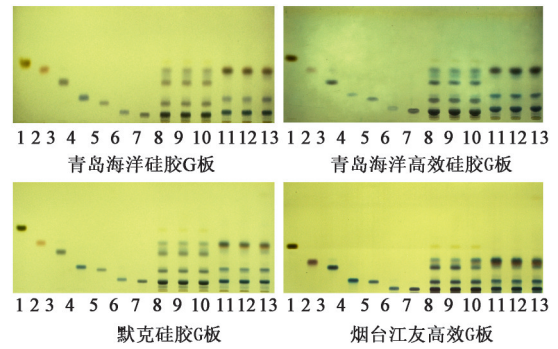


图13 地黄不同炮制品薄层鉴别的薄层板考察

Fig. 13 Comparison of different TLC plates for different processed products of Rehmanniae Radix

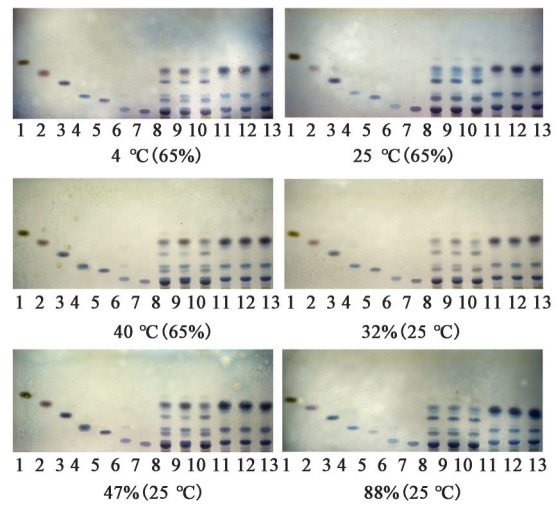
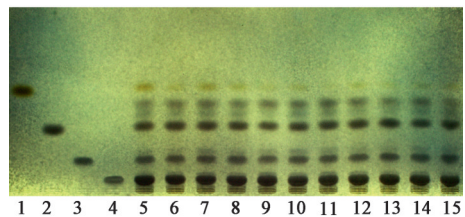


图14 地黄不同炮制品薄层鉴别的温度和相对湿度考察

Fig. 14 Investigation of different temperature and relative humidity for different processed products of Rehmanniae Radix



1. 梓醇对照品;2. 蔗糖对照品;3. 棉子糖对照品;4. 水苏糖对照品;5. 对照饮片;6~15. 样品D1~D10

图15 生地黄样品的薄层色谱分析

Fig. 15 Analysis of Rehmanniae Radix samples by TLC

地黄项下含量检测指标毛蕊花糖苷的含量限度与生地黄相同,但在生地黄炮制为熟地黄的过程中,长时间的蒸炖过程会造成熟地黄饮片中的毛蕊花糖苷含量降低,这可能使得饮片企业采用合格的生地黄也很难炮制出达到2015年版《中国药典》标准的熟地黄饮片,故个别饮片企业往往采取缩短炮制时间或者加入地黄叶提取物等方法使其含量达到要求,进而造成市场上的有些熟地黄饮片并未真正

1. *D*-果糖对照品; 2. 蜜二糖对照品; 3. 甘露三糖对照品; 4. 对照饮片;
5~14. 样品 S1-S10

图16 熟地黄样品的薄层色谱分析

Fig. 16 Analysis of *Rehmanniae Radix Praeparata* samples by TLC

达到其传统炮制要求, 直接影响了熟地黄饮片的质量; 另外2015年版《中国药典》地黄项下虽已有梓醇和毛蕊花糖苷的薄层鉴别, 但二者样品前处理及展开剂系统条件并不相同, 鉴别成本较高, 且毛蕊花糖苷的薄层鉴别方法存在较大弊端, 方法中采用0.1%的2, 2-二苯基-1-苦肼基无水乙醇溶液浸板, 在实际操作中浸板过程需重复操作才能使其斑点清晰可见, 且其染色剂价格较贵。

针对以上问题, 本研究以生地黄炮制加工成熟地黄过程中化学成分的变化为出发点, 前期研究发现在生地黄炮制为熟地黄的过程中, 糖类成分随炮制时间呈现不同的变化趋势, *D*-果糖、葡萄糖、蜜二糖、甘露三糖及总还原糖含量有所增加, 而蔗糖、棉子糖、水苏糖、半乳糖及毛蕊花糖含量有所下降, 糖类成分在炮制过程中的不同变化趋势使其在生地黄、熟地黄中含量比例产生了较大差异^[17-21]; 另外, 糖类成分无紫外吸收, 相比于高效液相色谱法, 采用薄层色谱法对生地黄、熟地黄饮片中糖类成分进行鉴别与分析的操作更加简便易行^[22]; 且在生地黄对照饮片薄层色谱图中, 经对照品定位发现梓醇、蔗糖、棉子糖及水苏糖斑点清晰; 在熟地黄对照饮片薄层色谱图中, *D*-果糖、蜜二糖及甘露三糖斑点清晰可见; 因此, 本文选取梓醇、蔗糖、棉子糖及水苏糖作为生地黄饮片中的薄层鉴别指标, *D*-果糖、蜜二糖及甘露三糖作为熟地黄饮片中薄层鉴别指标。此外, 达到炮制要求的熟地黄饮片薄层色谱图与生地黄饮片薄层色谱图有很大区别, 未达到炮制要求时, 则熟地黄供试品溶液色谱中除了*D*-果糖、蜜二糖及甘露三糖斑点外, 还会有生地黄饮片中梓醇、蔗糖、棉子糖及水苏糖等斑点显现, 可在一定程度上指示熟地黄炮制终点, 避免或减少“熟地黄不熟”等现象的发生。

3.2 检测条件的优化 本文对薄层鉴别条件进行了详细考察, 在色谱系统中考察了提取溶剂(水,

20% 甲醇, 50% 甲醇, 80% 甲醇), 展开剂(正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水, 乙酸乙酯-吡啶-冰乙酸-水, 正丁醇-冰乙酸-水), 显色剂(苯胺-二苯胺-磷酸溶液, 茚三酮溶液), 点样量(2, 4, 6 μ L), 检视条件(日光, 日光底部灯, 365 nm, 254 nm)对薄层色谱分析的影响, 从而确定供试品溶液制备方法和最佳薄层色谱检测条件, 并在色谱鉴定的方法学验证中对其专属性、稳定性和耐用性进行了考察, 最终确定薄层鉴别分析方法为以蒸馏水为提取溶剂提取样品, 点样量2 μ L, 以正丁醇-甲醇-三氯甲烷-冰乙酸-水(13:5:5:1:2)为展开剂, 点于高效硅胶G板, 显色剂为苯胺-二苯胺-磷酸溶液, 于日光底部灯下进行检视, 结果表明该方法具有操作简单、专属性强、稳定性好、斑点清晰等特点。综上所述, 本文所建立的薄层色谱鉴别方法操作简便易行, 定性特征明显、结果直观, 且经济实用, 不仅可区分地黄不同炮制品, 同时在一定程度上可指示熟地黄炮制终点, 可为其质量评价提供一定参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 124-125.
- [2] 奚香君, 张永宁, 袁丽超, 等. 香菇多糖、地黄煎影响小鼠免疫及内分泌功能的比较研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(2): 50-52.
- [3] 沈华旦, 方江济, 郭鹏程, 等. 基于HPLC-UV-DPPH法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究[J]. 中草药, 2018, 49(3): 582-588.
- [4] 贾绍华, 张道勇, 刘冰洁. 地黄不同炮制品中水苏糖含量比较及其水苏糖抗肿瘤活性的研究[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(4): 511-514.
- [5] 谢丽华, 陈娟, 李生强, 等. 六味地黄丸对绝经后骨质疏松症肾阴虚证JAK/STAT信号通路基因的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(7): 741-746.
- [6] 段卫娜, 张振凌, 孔莹莹, 等. 地黄不同炮制品组成的增液汤降低糖尿病大鼠血糖血脂作用的对比研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 187-191.
- [7] 王之, 简桂花, 汪年松. 地黄治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(4): 363-365.
- [8] 王竹立, 崔颖, 叶美红. 干地黄提取物A保护胃黏膜作用的形态学研究及与热休克蛋白的关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(S1): 38-42.
- [9] 贾秀梅, 张振凌, 吴瑞环. 鲜地黄及保鲜加工品对血热出血模型大鼠凉血止血药效比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 127-132.

- [10] 赵丹,张振凌,王胜超,等. 不同方法炮制的熟地黄的补血作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19):46-49.
- [11] 李红伟,孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2):218-228.
- [12] 岳超,高杰,石上梅,等. HPLC测定地黄炮制前后3种苷类物质的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4):71-74.
- [13] 郭阿莉. 不同炮制方法对地黄化学成分及药理作用的影响[J]. 中国民间疗法, 2019, 27(4):86-88, 108.
- [14] 张留记,王建霞,屠万倩,等. 生地黄与熟地黄中5个苷类成分和总多糖的含量比较[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(4):566-571.
- [15] 于文娜,张振凌,张颖,等. 地黄炮制过程中异毛蕊花糖苷含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18):22-26.
- [16] 陶益,蒋妍慧,唐克建,等. 地黄炮制前后化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(1):102-106.
- [17] 边宝林,王宏洁,倪慕云. 地黄及其炮制品中总糖及几种主要糖的含量测定[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(8):469-471.
- [18] 张文婷,岳超,黄琴伟,等. 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[J]. 中草药, 2016, 47(7):1132-1136.
- [19] 孟祥龙,马俊楠,张朔生,等. 熟地黄炮制(九蒸九晒)过程中药效化学成分量变化及炮制辅料对其影响研究[J]. 中草药, 2016, 47(5):752-759.
- [20] 张慧芳. 不同炮制方法对地黄中糖类及梓醇含量影响研究概况[J]. 实用中医药杂志, 2009, 25(7):501-502.
- [21] 周丽. 基于整体观的地黄“九蒸九制”质/效评价研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2017.
- [22] 宋文静,张炜,骆桂法,等. 藏药菥蓂子的定性、定量方法研究[J]. 中国药房, 2019, 30(13):1816-1821.

[责任编辑 刘德文]