

· 化学与分析 ·

鲜地黄提取物中 3 种原型入血成分的含量测定

王慧森, 刘明, 李更生*, 韩颖萍, 高雅
(河南省中医药研究院, 郑州 450004)

[摘要] **目的:** 建立鲜地黄提取物中 3 种原型入血成分的含量测定方法。**方法:** 以血清药物化学方法追踪确定地黄原型入血成分; 采用 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 35 °C; 乙腈-水为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm 的 HPLC 方法, 测定鲜地黄提取物中原型入血成分的含量。**结果:** 在大鼠含药血清中发现梓醇、地黄苷 D 和益母草苷均以原型入血; 此 3 种成分梓醇、地黄苷 D、益母草苷线性范围分别为 0.32 ~ 1.60 μg ($r = 0.999\ 6$), 0.406 ~ 2.03 μg ($r = 0.999\ 8$), 0.8 ~ 4.0 μg ($r = 0.999\ 8$); 平均回收率分别为 99.74% (RSD 2.53%, $n = 6$), 96.14% (RSD 1.31%, $n = 6$), 100.10% (RSD 2.73%, $n = 6$)。**结论:** 建立的含量测定方法简便可行、重复性良好, 测定 12 批次河南焦作产怀药鲜地黄提取物中此 3 种成分的含量, 总含量最高 20.28%, 最低 11.32%。故建议鲜地黄提取物中 3 种原型入血成分梓醇、地黄苷 D 和益母草苷总含量不得少于 15%。

[关键词] 鲜地黄提取物; 入血成分; 梓醇; 地黄苷 D; 益母草苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0066-05

[doi] 10.11653/syfy2013120066

Determination for Three Prototype Constituents into the Blood from Extract of Fresh *Rehmannia glutinosa*

WANG Hui-sen, LIU Ming, LI Geng-sheng*, HAN Ying-ping, GAO Ya
(Henan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for the determination for three prototype constituents into the blood from the extract of *Rehmannia glutinosa*. **Method:** The prototype constituents into the blood from *R. glutinosa* were confirmed by using the method of serum pharmacology, and then the extracts were determined by HPLC. Inertsil ODS-SP C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water as mobile phase; the column temperature was kept at 35 °C, and flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 203 nm. **Result:** It was found that in rat serum catalpol, rehmannioside D and leonuride could enter into the blood in prototype forms. The calibration curves of catalpol, rehmannioside D and leonuride were within 0.32-1.60 μg ($r = 0.999\ 6$), 0.406-2.03 μg ($r = 0.999\ 8$), 0.8-4.0 μg ($r = 0.999\ 8$). The average recoveries were 99.74% (RSD 2.53%), 96.14% (RSD 1.31%) and 100.10% (RSD 2.73%) respectively. **Conclusion:** The developed methods are simple, feasible and repeatable. They are used to determine three components from 12 batch extracts of *R. glutinosa* in Jiaozuo district, Henan Province. The maximum total content is 20.28%, and the minimum one is 11.32%. Suggestion that the total content of these three components from the extract of the *R. glutinosa* must not be less than 15% is provided.

[Key words] extract of fresh *Rehmannia glutinosa*; content into the blood; catalpol; rehmannioside D; leonuride; HPLC

[收稿日期] 20120725(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873442); 国家科技重大专项课题(2011BAI06B02)

[第一作者] 王慧森, 硕士, 副研究员, 从事中药活性成分的研究与开发, Tel: 13838261736, E-mail: whs_zz@126.com

[通讯作者] * 李更生, 博士, 研究员, 从事中药药性理论研究, Tel: 13663838889, E-mail: lgsn@sohu.com

地黄为玄参科植物地黄的块根^[1],在我国十多个省区都有栽培。道地药材怀地黄因其个大、质优而闻名,主产于河南焦作地区,是著名的“四大怀药”之一。根据加工炮制方法的不同,地黄分为鲜、生、熟地黄。鲜地黄多用于瘟病伤阴、高热烦渴、吐血、衄血等症,清热生津、止血之效胜于生地黄,而熟地黄功效为补肾滋阴。鲜地黄不同于生地黄和熟地黄的独特功效与其内在的化学成分密切相关^[2-3],未经过加工炮制使其大部分环烯醚萜苷类有效成分未被破坏^[4-5]。但鲜地黄不易保存,限制了临床应用,笔者前期通过对道地药材怀地黄鲜品进行提取及纯化工艺研究^[6],最终优选出能保留其大部分有效成分及特征性指纹成分的工艺条件,提取鲜地黄中多种活性成分制成提取物。在此基础上预建立鲜地黄提取物质量控制标准用于其质量评价。

2010年版《中国药典》中多数中药是以测定一个或几个体外成分的含量为质量控制指标,所测成分多为药物主要成分,但并不一定是口服后入血的活性成分^[7-8]。中药口服给药后药物成分需经血液输送到靶点才能产生作用,因而给药后血清中含有的成分才可能是中药的体内直接作用物质。中药血清药物化学即是以传统药物化学方法为基础,多种现代技术综合应用,确定中药药效物质基础的应用学科,已经成为质量标准制订的重要手段之一^[9-10]。

笔者曾对地黄化学成分血清药物化学进行了初步研究^[11],本实验通过比较对照品、给药血清、空白血清的HPLC图谱,从而确定地黄环烯醚萜苷类血中移行成分,以3种原型入血成分梓醇、地黄苷D、益母草苷为指标性成分,建立了HPLC含量测定方法,并分别对12批次河南焦作地区产怀药鲜地黄制备得提取物进行含量测定,测定3种血中移行成分的含量,用于怀药鲜地黄提取物内在质量控制,为其质量评价提供数据参考。

1 材料

美国Waters2695高效液相色谱仪,Waters2996双波长检测器,Empower色谱数据工作站;1/10万分析天平(日本岛津)。HP-20型大孔吸附树脂(日本三菱);梓醇对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号110808-200508;地黄苷D、益母草苷,自制,纯度>98%。乙腈为色谱纯(美国Merck公司产品),水为双蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

鲜地黄药材为产于河南焦作温县、武陟怀药种植基地,样品经河南中医学院陈隋清教授鉴定为*Rehmannia glutinosa* Libosch.的新鲜块根。

取鲜地黄药材,以乙醇溶液为溶媒,组织破碎提取3次,过滤,合并滤液,真空低温浓缩至无醇,得粗提液。取粗提液适量,用适量水稀释,过滤,取滤液经HP-20型大孔吸附树脂柱色谱,水洗脱除杂,30%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收乙醇并浓缩至干,即得。

2 方法

2.1 地黄血中移行成分的研究确认

2.1.1 灌胃液的制备 称取鲜地黄提取物适量,用蒸馏水溶解,制成质量浓度为 $0.7 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液,备用。

2.1.2 给药方式及血样采集处理 Wistar大鼠12只,雌雄不限,随机分为两组:空白组、地黄环烯醚萜苷部位组。给药组剂量 $1 \text{ mL}/100 \text{ g}$,药液质量浓度 $0.7 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,空白组给予同量蒸馏水,连续3 d,1次/d。末次药前禁食12 h,自由饮水,给药1 h后,肌内注射10%水合氯醛麻醉(剂量 $0.004 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$),腹主动脉取血,置离心管中 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液置 $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活30 min,置 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

精密吸取血清2 mL,加乙腈8 mL,涡旋振荡2 min, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,氮气吹干仪干燥,用少量流动相溶解,定容到2 mL量瓶中, $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,供高效液相色谱分析用。

2.1.3 分析与结果 分别吸取空白血清及含药血清样品注入高效液相仪,采集主要成分全程图谱。色谱条件,Inertsil ODS-SP柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$),流动相乙腈-水(3:98),检测波长203 nm,柱温 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

空白血清、给药血清及对照品图谱比较分析,给予环烯醚萜苷部位的血清图谱(图1)较空白血清图谱(图2),在6.8,14.3,16.7 min位置多出3个峰,保留时间分别与梓醇、地黄苷D、益母草苷对照品图谱(图3~6)保留时间基本一致。由以上分析结果可知,环烯醚萜苷部位有3个入血成分,且均为地黄中的原型成分即梓醇、地黄苷D、益母草苷。

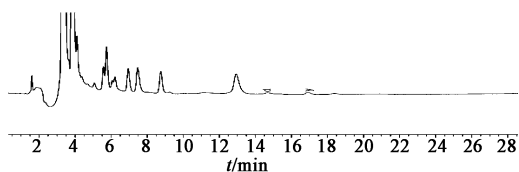


图1 给予地黄环烯醚萜苷部位大鼠血清的HPLC

2.2 鲜地黄提取物中入血成分含量测定方法研究

2.2.1 HPLC 色谱条件 Inertsil ODS-SP 柱(4.6

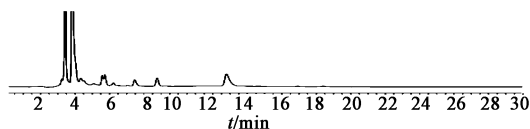


图 2 大鼠空白血清 HPLC

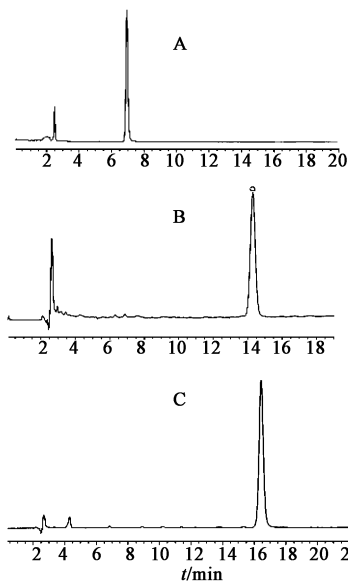
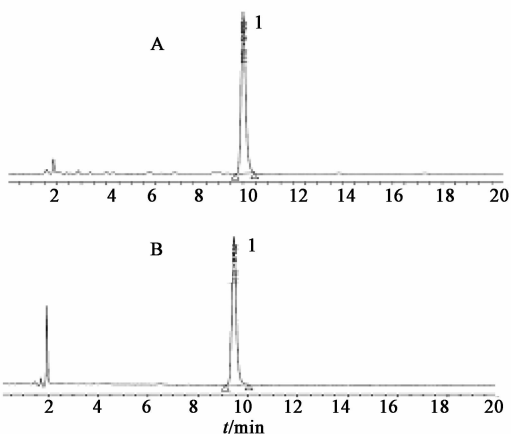


图 3 梓醇(A)、地黄苷 D(B)、益母草苷(C)对照品 HPLC



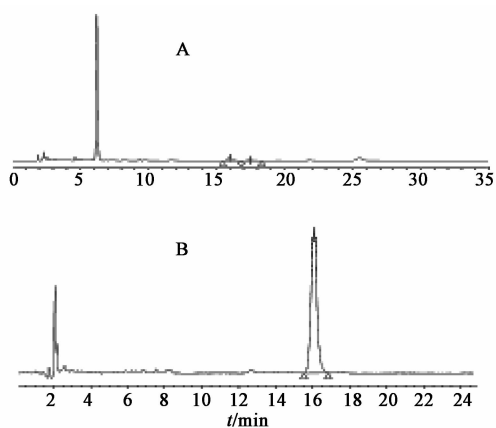
A. 提取物样品; B. 对照品; 1. 梓醇

图 4 鲜地黄提取物及梓醇对照品的 HPLC

mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 (I) 乙腈-水 (2:98), (II) 乙腈-水 (4:98), 检测波长 203 nm, 柱温为 35 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。

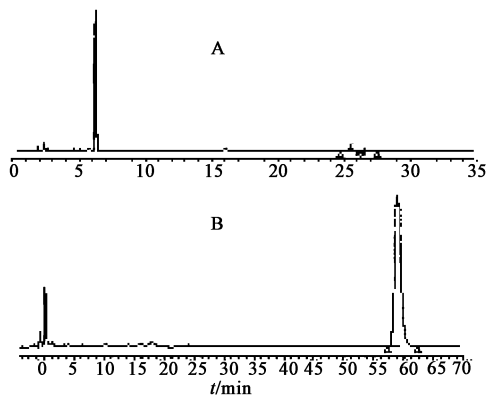
2.2.2 对照品溶液制备 分别取梓醇、地黄苷 D、益母草苷对照品适量, 精密称定, 分别加流动相制成每 1 mL 含 0.16, 0.203, 0.4 mg 的溶液, 即得梓醇、地黄苷 D、益母草苷对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取鲜地黄提取物 0.12 g, 精密称定, 置 25 mL 的量瓶中, 加流动相定容, 超声处理 (功率 350 W, 频率 50 kHz) 20 min, 放冷, 加流



A. 提取物样品; B. 地黄苷 D 对照品

图 5 鲜地黄提取物及地黄苷 D 对照品的 HPLC



A. 提取物样品; B. 益母草苷对照品

图 6 鲜地黄提取物及益母草苷对照品的 HPLC

动相补足至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得鲜地黄提取物供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取梓醇、地黄苷 D、益母草苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 注入液相色谱仪, 分别按上述色谱条件测定梓醇、地黄苷 D、益母草苷的吸收峰峰面积值, 以峰面积为纵坐标, 对照品含量为横坐标, 绘制工作曲线, 得线性回归方程 $Y_{梓醇} = 7.51 \times 10^5 X + 2.78 \times 10^4$ ($r = 0.9996$), 线性范围 0.32 ~ 1.60 μg; $Y_{地黄苷 D} = 5.43 \times 10^5 X + 2.50 \times 10^3$ ($r = 0.9998$), 线性范围 0.406 ~ 2.03 μg; $Y_{益母草苷} = 4.61 \times 10^5 X + 8.16 \times 10^3$ ($r = 0.9998$), 线性范围 0.8 ~ 4.0 μg。

2.2.5 精密度试验 精密吸取梓醇对照品溶液 2 μL、地黄苷 D 对照品溶液或益母草苷对照品溶液各 10 μL, 分别重复进样 5 次, 按上述色谱条件分别测定各对照品峰面积积分值, 梓醇、地黄苷 D 及益母草苷峰面积 RSD 依次为 0.38%, 0.62%, 0.39%。

2.2.6 稳定性试验 分别精密吸取同一供试品溶液, 于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 注入高效液相色谱仪, 按上

述色谱条件分别测定梓醇、地黄苷 D、益母草苷峰面积积分值, RSD 依次为 1.77%, 0.84%, 0.79%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一鲜地黄提取物 6 份, 按 2.2.3 项下制备方法制备 6 份供试品溶液, 分别测定提取物中的梓醇、地黄苷 D、益母草苷含量。求得梓醇的平均含量为 18.42%, RSD 0.70%; 地黄苷 D 的平均含量为 1.86%, RSD 0.79%; 益母草苷的平均含量为 2.45%, RSD 2.66%, 表明本方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 分别取适量 2.2.7 项下样品 6 份, 精密称定, 置 10 mL 的量瓶中, 分别精密加入 3.098, 0.385, 0.499 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的梓醇、地黄苷 D、益母草苷对照品溶液各 1 mL, 加流动相定容, 超声处理(功率 350 W, 频率 50 kHz) 20 min, 放冷, 加流动相补足至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得加样回收率试验样品溶液。按上述色谱条件测定梓醇、地黄苷 D、益母草苷的含量, 计算回收率, 得梓醇、地黄苷 D、益母草苷平均加样回收率分别为 99.74%, 96.14%, 100.10%, RSD 分别为 2.53%, 1.31%, 2.73%。结果见表 1。

3 结果

取 12 批次鲜地黄提取物分别按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下的色谱条件进行

表 1 梓醇、地黄苷 D、益母草苷加样回收率试验

No.	称样量 /mg	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	
梓醇	1	21.83	4.021	7.100	99.39	99.74	2.53
	2	19.27	3.550	6.700	101.68		
	3	22.02	4.056	7.175	100.68		
	4	18.87	3.476	6.475	96.78		
	5	18.99	3.498	6.500	96.88		
	6	21.50	3.960	7.150	102.98		
地黄苷 D	1	21.72	0.404	0.770	95.06	96.14	1.31
	2	20.16	0.375	0.743	95.58		
	3	21.94	0.408	0.775	95.32		
	4	18.82	0.350	0.725	97.40		
	5	18.92	0.352	0.730	98.18		
	6	21.40	0.398	0.765	95.32		
益母草苷	1	21.80	0.534	1.045	102.40	100.10	2.73
	2	19.27	0.472	0.955	96.79		
	3	22.00	0.539	1.025	97.39		
	4	18.86	0.462	0.970	101.80		
	5	18.98	0.465	0.980	103.21		
	6	21.47	0.526	1.020	99.00		

测定, 计算各批提取物中梓醇、地黄苷 D、益母草苷的含量和总含量。结果见表 2。

表 2 12 批鲜地黄提取物含量测定

No.	样品鲜药材产地	药材品种/级别	提取物样品含量/%			总含量/%
			梓醇	地黄苷 D	益母草苷	
1	武陟大虹桥乡东刘村	北京 1 号/2 级	15.87	2.02	2.38	20.28
2	武陟大虹桥乡东刘村	北京 1 号/3 级	12.20	2.47	2.82	17.49
3	武陟大虹桥乡东刘村	北京 1 号/4 级	11.92	1.96	2.91	16.79
4	温县温泉镇陆庄	北京 1 号/2 级	6.19	1.90	3.23	11.32
5	温县温泉镇陆庄	北京 1 号/3 级	13.78	1.78	3.00	18.55
6	温县温泉镇陆庄	北京 1 号/4 级	10.28	1.73	2.68	14.68
7	温县温泉镇卫沟村	北京 1 号/2 级	13.26	3.30	6.08	22.64
8	温县温泉镇卫沟村	北京 1 号/3 级	6.62	2.60	5.96	15.18
9	温县温泉镇卫沟村	北京 1 号/4 级	6.15	1.76	3.80	11.70
10	武陟大虹桥乡东刘村	85-5/1 级	14.82	1.64	3.58	14.82
11	武陟大虹桥乡东刘村	85-5/2 级	14.63	1.50	2.40	18.53
12	武陟大虹桥乡东刘村	85-5/3 级	7.36	1.53	3.11	12.00

根据结果, 确定鲜地黄提取物含梓醇不得 < 8%, 地黄苷 D 不得 < 1.7%, 益母草苷不得 < 2.8%, 3 者总含量不得 < 15%。

4 讨论

曾以 100%, 50%, 70% 甲醇和流动相超声提取制备供试品溶液, 测定梓醇、地黄苷 D 和益母草苷

HPLC 测定蒙古扁桃种仁中 α -维生素 E 的含量

苏琨, 石松利*, 郑东华, 李巨欣

(内蒙古科技大学包头医学院药学院, 内蒙古包头 014060)

[摘要] 目的: 利用高效液相法, 测定出蒙古扁桃中维生素 E 的含量。方法: 采用色谱为 Wondasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水(98:2), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 300 nm, 检测器温度为室温(25 $^{\circ}$ C)。结果: α -维生素 E 在 1~100 μ g 呈良好的线性关系, 方程为 $Y = 5\ 176.7X - 7\ 645.8$ ($r = 0.999\ 6$), 平均回收率为 99.4% ($n = 3$, RSD 1.740%), 蒙古扁桃桃仁中维生素 E 的含量在 7.12~15.36 μ g·g⁻¹, 以雅布格戈壁最高, 固阳爬榆树最低。结论: 该法可用于测定蒙古扁桃桃仁中的维生素 E 的含量, 结果准确可靠, 快速灵敏。

[关键词] 蒙古扁桃, α -维生素 E, 高效液相

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0070-03

[doi] 10.11653/syfy2013120070

Determination of Alpha Tocopherol Content in *Amygdalus mongolica* by HPLC

SU Kun, SHI Song-li*, ZHENG Dong-hua, LI Ju-xin

[收稿日期] 20120817(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102760); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJ10185)

[第一作者] 苏琨, 讲师, 硕士, 从事蒙药资源开发利用研究, Tel: 15044937220, E-mail: nmsk528@126.com

[通讯作者] * 石松利, 副教授, 博士, 从事中蒙药成分及资源开发利用研究, Tel: 0472-7167855, E-mail: shisongli122@126.com

的峰面积, 结果表明流动相提取率较高、杂质较少。另对提取方法筛选, 直接溶解或超声处理 10, 20, 30 min, 结果表明超声处理 20 min 溶出充分。故供试品溶液的制备采用加流动相超声处理 20 min 进行提取。

由于样品中含量的较大差别, 梓醇采用流动相(I)乙腈-水(2:98), 地黄苷 D 和益母草苷采用流动相(II)乙腈-水(4:98), 均达到良好分离效果。

对 12 批不同产地怀地黄提取物进行含量分析发现, 各指标成分含量存在较大差异, 品种、等级和环境因素均影响药材成分含量, 制备鲜地黄提取物药材的选择应当考虑品种、等级和产地。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 115.
- [2] 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.
- [3] 吴金环, 顾红岩, 喇孝瑾, 等. 地黄与熟地黄对糖尿病小鼠血糖血脂的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 161.

- [4] 王宏洁, 金亚红, 李鹏跃, 等. 鲜、生、熟地黄中 3 种活性成分含量的比较[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1923.
- [5] 郭东艳, 王梅, 唐志书, 等. 生地黄煎煮过程中梓醇含量的动态变化规律及止血作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 144.
- [6] 吕杨, 王慧森, 李更生, 等. 正交试验优选鲜地黄提取工艺[J]. 中医研究, 2009, 22(2): 18.
- [7] 刘倩, 喇万英. 基于体内代谢-药效学相关性分析的中药复方药效物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 272.
- [8] 陈晓萌, 陈畅, 李德凤, 等. 中药有效成分辨识的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 249.
- [9] 王喜军. 中药及血清药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789, 835.
- [10] 王莉梅, 金向群. 中药血清化学在中药及中药复方研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 77.
- [11] 张雅阁, 李更生, 王慧森, 等. 地黄化学成分血清药物化学的初步研究[J]. 中医研究, 2010, 23(5): 32.

[责任编辑 顾雪竹]