

HPLC 法测定地黄、不同提取物及熟地黄中的梓醇

邱建国, 张汝学, 贾正平*, 盛杰, 李茂星, 樊鹏程, 王娟

(兰州军区兰州总医院药材科, 甘肃兰州 730050)

[摘要] 目的: 测定地黄、不同提取物及熟地黄中是否含有梓醇。有效地去除地黄水提取物所含的梓醇, 为进一步提取、纯化地黄中的地黄寡糖、梓醇, 比较、验证地黄寡糖和梓醇的降糖作用, 奠定一定的基础。方法: 采用甲醇为溶媒, 超声提取梓醇, 流动相用甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99), 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, C_{18} 色谱柱分离, 检测波长210 nm, 高效液相色谱法测定。结果: 地黄与熟地黄中梓醇含量存在显著性差异, 地黄水提取物含有少量的梓醇, 15%乙醇洗脱物中不含梓醇, 地黄水提取物甲醇超声提取后的残渣不含梓醇。结论: 该方法分离效果好、准确、快速、干扰少, 适用于检测地黄、熟地黄及地黄不同提取物中是否含有梓醇。

[关键词] 地黄; 熟地黄; 地黄不同提取物; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0023-03

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glucinos* Libosch. 的新鲜或干燥块根^[1]。

本课题组多年来对地黄的降血糖机理进行了系统研究, 发现其调节血糖的主要成分是地黄寡糖。文献报道环烯醚萜苷类中的梓醇可能是地黄降血糖作用的有效成分之一^[2]。所以我们对熟地黄、地黄、地黄不同提取物中梓醇的含量进行测定, 为进一步提取、纯化地黄中的地黄寡糖、梓醇, 比较、验证地黄寡糖和梓醇的降糖作用, 奠定一定的基础。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪; Waters996 紫外检测器; Waters600 泵、Millennium³² 色谱管理系统、 C_{18} 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) (大连依利特); METTLER AE240 电子分析天平(瑞典); SK7200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); FZQ-2 涡旋混合器(江苏泰县医疗器械厂); 微量进样器(上海安亭微量进样器厂); 果糖(中国药品生物制品检定所 1504-200001); 地黄(河南怀庆); 熟地黄(由同批地黄炮制而成); 其它试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters996 紫外检测器、Waters600 泵, C_{18} 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 检测波长为210 nm, 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99), 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为室温, 进样量20 μL 。结果见图1。

2.2 对照品溶液的制备 称取梓醇对照品适量, 精密称定, 用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99)制成每1 mL含10 μg 的溶液, 0.45 μm 滤过, 滤液备用。

2.3 地黄、熟地黄供试品溶液的制备 分别称取地黄、熟地黄0.5 g, 精密称定, 加甲醇5 mL, 超声提取30 min, 放冷, 用甲醇定容至5 mL, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99)溶解定容至5 mL, 0.45 μm 滤过, 滤液备用。

2.4 地黄水提取物供试品溶液的制备 称取地黄100 g, 精密称定, 每次加10倍量的水、煎煮3次, 每次1 h, 合并煎煮液, 在80 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥。称取干浸膏0.5 g, 精密称定, 加甲醇5 mL, 超声提取30 min, 放冷, 用甲醇定容至5 mL, 滤过, 残渣备用; 滤液水浴蒸干, 用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99)溶解定容至5 mL, 0.45 μm 滤过, 滤液备用。

2.5 地黄水提取物除去梓醇溶液的制备 2.4项下的残渣用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99)溶解定容至5 mL, 取1 mL, 离心(8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)15 min, 上清液0.45 μm 滤过, 滤液备用。

2.6 15%乙醇洗脱物溶液的制备^[3]

[收稿日期] 2009-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30672643, 30772773); 甘肃省自然科学基金(3ZS051-A25-078)

[通讯作者] * 贾正平, Tel: (0931) 8994652; E-mail: empriqqq@public.lz.gs.cn

2.6.1 提取 称取地黄1 000 g,加水 10 倍量,煎煮,提取3次,每次1.0 h。合并水提取液,浓缩至适量,备用。

2.6.2 离子柱分离 水提浓缩物先经过732型阳离子交换树脂柱,再经过717型阴离子交换树脂柱,进行离子交换处理。蒸馏水洗脱。洗脱至无色。洗脱液浓缩至适量,备用。

2.6.3 活性炭柱层析 浓缩的洗脱液用活性炭柱层析(100 cm × 7.5 cm, pH7.0),分别用水及5%、

10%、15%、20%乙醇洗脱,每一洗脱液洗至Molish反应为阴性,分别收集得I、II、III、IV4个部位,在80℃减压干燥得干浸膏。

2.6.4 15%乙醇洗脱物供试品溶液的制备 称取15%乙醇洗脱物的干浸膏0.5 g,精密称定,加甲醇5 mL,超声提取30 min,放冷,用甲醇定容至5 mL,滤过,滤液水浴蒸干,残渣用流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(1:99)溶解定容至5 mL,0.45 μm滤过,滤液备用。

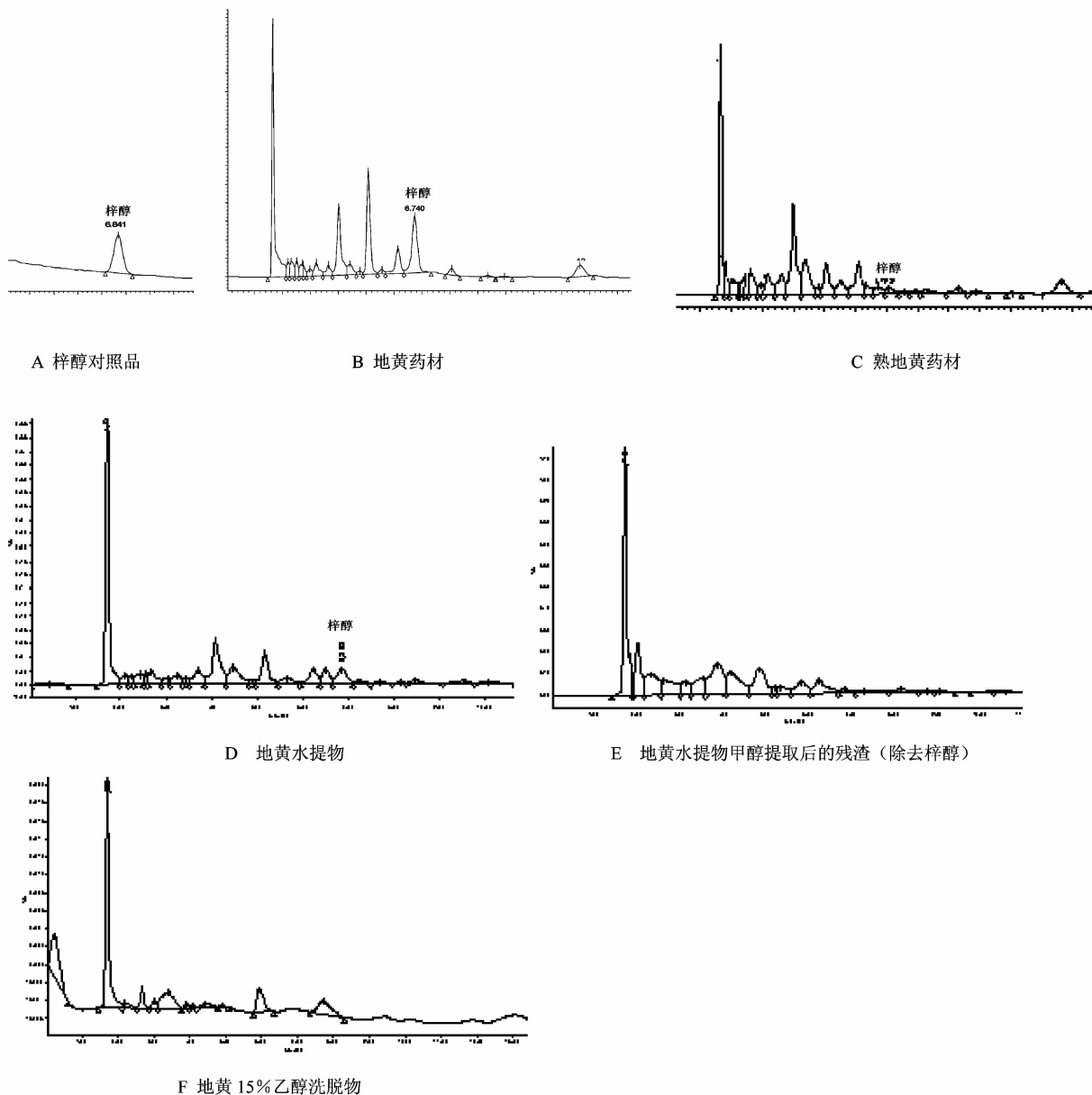


图1 梓醇对照品、熟地黄、地黄及不同提取物HPLC色谱图

地黄药材中的梓醇含量相对较高,每克药材含有2.04 mg,熟地黄每克药材含有0.322 mg,地黄水

提取物中含有少量的梓醇,15%乙醇洗脱物中不含有梓醇,地黄水提取物经过甲醇超声处理后可以去

除梓醇。

3 讨论

地黄、熟地黄甲醇提取物 HPLC 色谱图显示,成分、含量差别较大,其中梓醇的含量,地黄明显高于熟地黄。梓醇是一种环烯醚萜葡萄糖苷类化合物,地黄加工炮制熟地黄过程中,脱去糖基而发生了一系列化学变化,导致梓醇大幅降低的同时出现了新的化合物。

通过甲醇超声提取后的残渣,HPLC 色谱法检测表明不含有梓醇,地黄寡糖的含量没有显著变化,所以采用此方法可以有效地去除梓醇,为我们后面的提取、纯化地黄寡糖成分及验证地黄寡糖的降糖和梓醇的降糖药效学实验打下了一定的基础。

对于供试品的制备和检测条件,《中国药典》^[1]中地黄用甲醇加热回流提取 1.5 h,乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相洗脱;熟地黄没有含量测定一项。本

课题组经过实验改进,地黄用甲醇常温超声提取 0.5 h,甲醇-0.1% 磷酸溶液为流动相洗脱,梓醇的峰面积值更大,分离更好一些;熟地黄中的梓醇采用本课题组筛选出的提取方法及检测条件测定显示,含量低且和相邻峰之间的分离度均达不到标准,所以建议熟地黄含量测定不以梓醇为指标,而应该选用其它典型的成分为指标。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005:82.
- [2] 阴 健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京:学苑出版社,1994:274.
- [3] 张汝学,樊俊杰,贾正平,等. 地黄中寡糖的提取分离工艺研究[J]. 解放军药学学报,2005,21(1):34-36.