

·化学与分析·

## 含熟地黄血清的高效液相色谱分析

崔瑛<sup>1\*</sup>, 王晓宁<sup>1</sup>, 房晓娜<sup>1</sup>, 段红福<sup>1</sup>, 丁岗<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 江苏中康药物科技有限公司, 南京 211100)

**[摘要]** 目的:探索熟地黄滋阴药效的物质基础对含熟地黄血清进行分析。方法:建立中医阴虚大鼠动物模型,用高效液相色谱法,通过比较熟地黄药材、阴虚大鼠含药血清、正常大鼠血清的高效液相指纹图谱,研究熟地黄血中移行成分。结果:含药血清中发现了1个与熟地黄原药材相同位置的波峰。结论:给药血清中与熟地黄药材相同位置的波峰,为熟地黄移行入血的原形成分,可能为熟地黄滋阴药效的活性成分,对其进行深入研究,有助于阐明熟地黄功效物质基础。

**[关键词]** 熟地黄;高效液相色谱法;含药血清

**[中图分类号]** R 284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0057-03

## HPLC Analysis of Medicinal Serum of Radix Rehmanniae Preparata

CUI Ying<sup>1\*</sup>, WANG Xiao-ning, FANG Xiao-na<sup>1</sup>, DUAN Hong-fu<sup>1</sup>, DING Gang<sup>2</sup>

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Jiangsu Zhongkang Medicine Technology Co. Ltd, Nanjing 211100, China)

**[Abstract]** **Objective:** The research aimed to analyse the medicinal serum of Prepared Radix Rehmanniae and explore the material base of Nourishing Yin effects on Prepared Radix Rehmanniae. **Method:** Based on Yin-Deficiency Rats model, established HPLC fingerprints of Prepared Radix Rehmanniae, The constituents absorbed into blood were determined by comparing HPLC fingerprints of Prepared Radix Rehmanniae, medicinal serum of Yin deficiency rats and blank serum. **Result:** After oral administration, one Chromatographic Peak was found in the medicinal serum as the same location as Prepared Radix Rehmanniae. **Conclusion:** The Chromatographic Peak in the medicinal serum which is as the same location as Prepared Radix Rehmanniae is the original constituent of Prepared Radix Rehmanniae absorbed into blood. and might be active component of nourishing yin. Further studies of them is helpful to clarify the bioactive material Base of Prepared Radix Rehmanniae.

**[Key words]** Prepared Radix Rehmanniae; HPLC; medicinal serum

熟地黄首载于《本草图经》,为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的根加黄酒炮制而成<sup>[1]</sup>,具有滋阴补血,益精填髓的功效。熟地黄中含有多糖、梓醇、氨基酸、苷类、5-羟甲基糠醛等多种化学成分;熟地黄对免疫系统、激素代谢、心血管系统、

造血系统等方面均有一定的药理作用<sup>[2]</sup>。

熟地黄化学成分的研究较多,但常规的化学分析方法,不能有效解决熟地黄药效的物质基础问题。作者根据中医药理论,结合现代技术手段,提出“病症-效应-血清药化学分析”研究熟地黄药效物质的思路<sup>[3]</sup>。本实验是上述思路的实践:首先建立熟地黄药材的 HPLC 指纹图谱,然后在符合中医阴虚证候的大鼠动物模型上,观察药效、分析熟地黄的含药血清,认识熟地黄血液中的移行成分,为筛选确定熟地黄的药效物质奠定基础。

**[收稿日期]** 20100102(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30772794)

**[通讯作者]** \*崔瑛,博士,教授,硕士生导师,从事中药药性及中药抗焦虑研究。Tel: 0371-65680967, E-mail: cyexin@ sina.com

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体重  $(250 \pm 10)$  g。由河北医科大学动物中心提供, 合格证号 812078。

**1.2 试剂药品** 甲状腺素片(批号 061101, 山东鲁北药业有限公司); 六味地黄丸(批号 090425 河南皖西制药); 生地黄药材于 2008 年 10 月购自河南省焦作市武陟县, 经河南中医学院药学科陈随清教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Liosch. 的干燥块根, 参照《中国药典》(2005 年版, 一部) 酒蒸法炮制成熟地黄。甲醇、乙腈 HPLC 级; 娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司; 其他试剂均为市售分析纯。

**1.3 仪器** Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站; RE52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); DZF-6020 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 高速冷冻离心机(北京医用离心机厂); 涡流混合器(姜堰市新康医疗器械有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Dikma Platisil  $C_{18}$  色谱柱  $(4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m})$ ; 流动相 A(乙腈)-B(0.1% 磷酸) 梯度洗脱, 0 ~ 20 min, 99.5% B, 20 ~ 50 min, 99.5% ~ 97.6% B, 50 ~ 80 min, 97.6% ~ 80% B, 80 ~ 95 min, 80% ~ 67% B; 检测波长 254 nm; 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量  $10 \mu\text{L}$ ; 柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 记录图谱 90 min。

### 2.2 供试品溶液的制备

**2.2.1 熟地黄 HPLC 供试液的制备** 称取熟地黄饮片  $(80 \text{ }^\circ\text{C}, \text{减压干燥 } 24 \text{ h})$  5 g, 适当粉碎, 精密称定, 第 1 次加 10 倍量水浸 30 min, 煎 45 min, 第 2 次加 8 倍量水, 煎 30 min, 合并煎液, 滤过, 减压浓缩至 10 mL, 加甲醇至含醇量 90%,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱过夜, 减压回收甲醇, 用初始流动相定容至 25 mL, 过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜, 供高效液相色谱分析用。

**2.2.2 灌胃药液的制备** 取同批熟地黄饮片  $(80 \text{ }^\circ\text{C}, \text{减压干燥 } 24 \text{ h})$  500 g。第 1 次加 10 倍量水浸 30 min, 煎 45 min, 第 2 次加 8 倍量水煎 30 min, 合并 2 次煎液, 浓缩至 625 mL, 即  $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 供大鼠灌胃用。

取六味地黄浓缩丸适量, 在研钵中加水研磨至全部溶解, 调浓度至  $1.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (含六味地黄丸生

药量/mL), 备用。

**2.2.3 阴虚动物模型的复制与血清样品的采集** 大鼠随机分为 5 组, A 正常对照组, B 阴虚模型组, C 阳性对照组(六味地黄丸), D 熟地黄低剂量组, E 熟地黄高剂量组, 每组各 12 只。笔者根据朱萱莹等<sup>[4]</sup>的造模方法, 对其造模的给药剂量进行调整, 除正常对照组外, 各组大鼠每天上午 10 点灌胃甲状腺片生理盐水溶液, 剂量  $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 灌胃体积  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 正常对照组灌服等体积生理盐水, 连续 3 周; 造模第 14 d 开始, 每天下午 3 点药物组灌胃, 熟地黄煎液高、低剂量组剂量分别为  $6, 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 六味地黄丸组  $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 给药体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 正常对照组和阴虚模型组给予等体积生理盐水, 连续 2 周。第 28 d 给药 1 h 后摘眼球取血 5 mL, 血液静置 2 h,  $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 分离血清, 同组血清合并。

**2.2.4 血清 HPLC 供试品的制备** 每组取血清 0.5 mL, 加甲醇 2 mL, 涡旋 3 min,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min, 取上清液 1.8 mL, 吹干, 残渣加 250  $\mu\text{L}$  初始流动相复溶, 涡旋 1 min,  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min, 取上清液供高效液相色谱分析用。

**2.3 高效液相色谱分析** 按 2.1 项下的色谱条件, 分别测定熟地黄药材供试液、空白血清、六味地黄丸组含药血清、熟地黄高、低剂量组含药血清的高效液相色谱图。

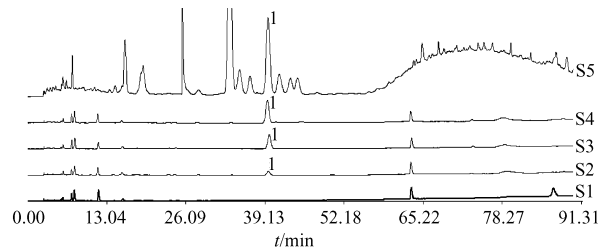


图 1 熟地黄药材与血清的指纹图谱叠加图

S1. 空白血清样品; S2. 六味地黄丸含药血清;  
S3. 熟地黄低剂量含药血清; S4. 熟地黄高剂量含药血清; S5. 熟地黄药材样品。

## 3 讨论

本实验成功复制了大鼠甲亢阴虚动物模型。给药组大鼠灌胃相应药物 14 d, 观察到六味地黄丸组和熟地黄组均一定程度改善了甲亢阴虚模型大鼠的体重、饮水量、进食量及降低模型大鼠血清中  $T_3, T_4$  浓度, 表现出了熟地黄的补阴作用。

(下转第 61 页)

**2.8 供试品测定** 取 2 批样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,结果见表 3。

表 3 样品质量分数测定 ( $n=2$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	阿魏酸	盐酸川芎嗪
20090218	79.899	0.302
20090708	79.885	0.311

### 3 讨论

经紫外吸收峰检测,发现阿魏酸和盐酸川芎嗪在 275 ~ 330 nm 都有吸收,所以通过在这个吸收系数之间标品连续进样,通过比较峰型和峰的面积,最终选定 280 nm 为吸收值。曾有报道<sup>[2-3]</sup>,阿魏酸和盐酸川芎嗪遇热极易损失,所以在提取制备的过程中,应尽量避免高温,以增加其含量,保证疗效。

实验中曾分别以二氯甲烷和三氯甲烷作为萃取

溶剂,比较后发现二氯甲烷的提取效果更好。

本实验建立的反相高效液相色谱法,采用一种流动相,同时测定抗眩晕颗粒中阿魏酸和盐酸川芎嗪的含量,操作简便快捷,重复性、稳定性好,结果可靠准确,可作为抗眩晕颗粒剂的质量标准控制。

#### [参考文献]

- [1] 鲁红梅,岳南,林文森,等. 抗晕平冲剂的药效学试验及临床观察[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2001,9(6):264.
- [2] 谢秉湘,陈静. 高效液相色谱法测定妇科十味片中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(9):23.
- [3] 桂卉,肖锦仁,邹龙. HPLC 考察川芎茶调颗粒制备中川芎嗪的动态变化[J]. 中成药,2003,25(4):279.

[责任编辑 全燕]

(上接第 58 页)

为了认识熟地黄滋阴作用的活性物质,作者制定了熟地黄药材的指纹图谱,同时在相同色谱条件下测定了空白血清、含药血清的色谱,并进行了仪器精密性、稳定性、重复性的考察,均符合相关要求。

通过对药材与血清的指纹图谱叠加图发现:与空白血清色谱图(S1)比较,熟地黄高(S4)、低(S3)剂量组含药血清及六味地黄丸组血清(S2)中相对应的保留时间处均出现了一个新的色谱峰,即 1 号峰,且此峰在熟地黄药材指纹图谱中也存在。通过二极管阵列检测器的扫描,药材及含药血清中的 1 号峰的紫外吸收特征相同,可以确定为同一物质。因此,含熟地黄血清的 1 号峰可能为熟地黄吸收入血的原形成分。同时熟地黄高剂量组、熟地黄低剂量组、六味地黄丸组 3 组含药血清中 1 号峰的峰面积  $S_4 > S_3 > S_2$ ,进一步说明了熟地黄吸收入血的该

成分的多少与熟地黄给药剂量密切相关。

本研究结果表明,1 号峰为熟地黄吸收入血的原形成分,该成分可能为熟地黄养阴功效的活性成分,但其化学结构有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:83.
- [2] 黄霞. 熟地黄现代研究进展[J]. 内蒙古中医药,2004,(5):25.
- [3] 崔瑛,刘菊,冯静,等. 对中药药性研究的思考[J]. 河南中医学报,2008,23(4):28.
- [4] 朱莹莹,彭青,王淑云,等. 乌鳖口服液对甲亢阴虚大鼠滋阴作用的研究[J]. 中药药理与临床,2002,18(2):39.

[责任编辑 邹晓翠]