

创造条件；后期能加快神经细胞损伤的再修复，促进神经组织功能康复。

[参考文献]

- [1] Water J, Nicolson JK, Garrod S, et al. High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: optimization of sample preparation procedures and bio-chemical stability of tissue during spectral acquisition[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 282(1): 16.
- [2] XU Guo-wang, LU Xin, YANG Sheng-li. Recent advances in metabonomics[J]. *Acta Acad Med Sin*, 2007, 29(6): 701.
- [3] 张荣军, 游潮, 蔡博文, 等. Feeney法建立大鼠闭合性脑损伤模型及评估[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(12): 1015-1018.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1241.
- [5] 程发峰, 宋文婷, 郭少英, 等. 神经功能损伤评分在大鼠脑缺血实验中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(3): 43-47.
- [6] 车兆义, 邹悦, 宋清斌, 等. 大鼠实验中几种常用的采血方法探讨[J]. *局解手术学杂志*, 2008, 17(2): 84-85.
- [7] 陈应柱, 许俊, 袁成林. 大鼠缺血脑组织芯片的构建[J]. *中国脑血管病杂志*, 2006, 3(11): 504-507.
- [8] 杨永霞, 杨生义, 梁敏锋, 等. 乙肝后肝硬化患者血清代谢组的核磁共振氢谱研究[J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(1): 99-101.
- [9] 杨永霞, 梁敏锋, 陈阿丽, 等. 主成分分析方法在食管癌患者血清代谢物研究中的应用[J]. *中国医药导报*, 2010, 7(23): 97-98.
- [10] 李艳丽, 王洪彬, 郭灿雄, 等. 利用基于¹H NMR的代谢组学分析研究重离子辐射对大鼠额叶皮质区的影响[J]. *波谱学杂志*, 2010, 21(6): 103-112.

(责任编辑: 马力)

地黄炮制过程中毛蕊花糖苷变化的研究

尚伟庆¹, 贺清辉², 张建军²

1. 缙云县中医院, 浙江 缙云 321400; 2. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244

[摘要] 目的: 采用 RP-HPLC 法研究地黄中毛蕊花糖苷随炮制时间动态变化的情况, 建立生地黄和熟地黄中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量测定方法。方法: 采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱, 柱温 30℃; 流动相为甲醇 (A) -0.1%甲酸 (B), 梯度洗脱 (0 min, 30%A; 30 min, 40%A; 45 min, 45%A; 60 min, 55%A), 流速 1 mL/min; 检测波长 330 nm。比较生地黄不同炮制时间 (0 h, 8 h, 16 h, 32 h) 的特征图谱, 测定地黄饮片中的毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量。结果: 毛蕊花糖苷含量随炮制时间的增加而降低, 异毛蕊花糖苷含量随炮制时间增加而增加。生地黄中毛蕊花糖苷平均含量高于熟地黄, 异毛蕊花糖苷平均含量低于熟地黄。结论: 生地黄中毛蕊花糖苷在炮制过程中可能部分转化为异毛蕊花糖苷, 将熟地黄中的异毛蕊花糖苷和毛蕊花糖苷共同作为评价熟地黄质量的指标更加合理。

[关键词] 生地黄; 熟地黄; 炮制; 毛蕊花糖苷

[中图分类号] R283; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 05-0209-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.05.080

地黄为玄参科植物地黄 *Renmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根, 具有清热凉血、养阴生津的功效, 地黄中的主要化学

成分是以梓醇为代表的环烯醚萜及其苷类成分、以毛蕊花糖苷为代表的苯乙醇苷类及糖类成分。《中国药典》^[1]2010年版

[收稿日期] 2013-10-21

[基金项目] 广东省教育厅中药配方颗粒产业化产学研科技平台项目 (编号: 2011A091000005)

[作者简介] 尚伟庆 (1972-), 男, 主管中药师, 研究方向: 中药药材质量评价。

[通讯作者] 贺清辉, E-mail: qiyuping2008@163.com。

(一部)以梓醇和毛蕊花糖苷作为其质量控制指标。毛蕊花糖苷对神经系统、免疫系统具有明显的作用,特别是针对老年性疾病(老年痴呆)^[2]、免疫性疾病(慢性肾炎)具有明显的治疗作用^[3-4]。环烯醚萜类成分热稳定性较差^[5],地黄在炮制过程中以梓醇为代表的环烯醚萜类成分被大量破坏甚至消失,因此《中国药典》熟地黄项下仅以毛蕊花糖苷作为其质量控制指标,含量限度与地黄相同,均为不得少于0.02%。生地黄炮制成熟地黄后毛蕊花糖苷含量降低^[6],异毛蕊花糖苷含量随炮制时间逐渐增加。而《中国药典》^[1]仅以毛蕊花糖苷作为熟地黄的质量控制指标,且含量限度等同于地黄,没有体现生地黄炮制成熟后指标成分的变化。本研究通过采用RP-HPLC法,研究地黄中毛蕊花糖苷随炮制时间动态变化的情况,为生地黄和熟地黄炮制工艺和质量控制提供实验依据。

1 仪器与试药

仪器:Agilent 1200型高效液相色谱仪,VWD检测器,四元低压梯度泵,在线真空脱气机,柱温箱,ALC-110.4万分之一电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司),KQ-250E型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),DFY-200摇摆式高速中药粉碎机(温苓市中德中药机械有限公司)。试药:毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷为实验室自制(利用¹H NMR、¹³C NMR、MS等波谱技术鉴定了化学结构),HPLC检出纯度均大于96%。甲醇(色谱纯,购自上海晶纯试剂有限公司),甲酸(分析纯,广州化学试剂厂),甲酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司),实验用水为纯净水(华润怡宝食品饮料有限公司),其他试剂均为分析纯。生地黄、熟地黄购自北京同仁堂、二天堂、康乐三家药店,经暨南大学药学院药剂学教研室马志国老师鉴定为玄参科植物地黄[*Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey.]的根茎。

2 方法与结果

2.1 地黄炮制过程中的特征图谱变化研究

2.1.1 不同炮制时间熟地黄饮片的制备 取地黄800g,全部粉碎过24目筛,取出一份为生品,备用。其余进行清蒸炮制32h,每隔8h取出1份样品,60℃干燥,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 参考《中国药典》^[1]生地黄的方法,取上述生地黄生品约0.8g样品,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50mL,加热回流提取1.5h,放冷,摇匀,滤过。精密量取续滤液20mL,减压回收溶剂近干,残渣用30%甲醇溶解,转移至5mL量瓶中,加30%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。参考《中国药典》^[1]熟地黄的方法,取上述不同炮制时间的熟地黄约1g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇50mL,加热回流30min,放冷,摇匀,滤过,精密量取续滤液25mL,减压回收溶剂近干,残渣用流动相溶解,转移至5mL量瓶中,加流动相至刻度,滤过,摇匀,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250mm×4.6

mm,5μm)色谱柱;流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸(B)梯度洗脱(0min,30%A;30min,40%A;45min,45%A;60min,55%A),流速1mL/min;柱温:30℃;检测波长:330nm;进样量:20μL。采用HPLC法,对炮制不同时间(0h、8h、16h、32h)的熟地黄进行分析,对特征图谱进行分析比较,记录主要色谱峰面积,毛蕊花糖苷和M1在炮制过程中的变化趋势如图1,结果见表1。

表1 毛蕊花糖苷和M1不同时间的峰面积数据

成分	0h	8h	16h	32h
毛蕊花糖苷	525.5	518.1	440.8	309.0
M1(t _R =33min)	68.3	72.1	86.4	87.7

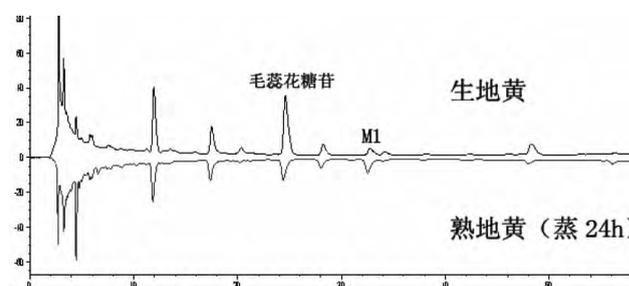


图1 炮制前后毛蕊花糖苷和M1特征对比图谱

上图1和表1可知,炮制过程中毛蕊花糖苷的含量随炮制时间逐渐降低,同时在33min处有一峰M1逐渐增加,推断炮制过程中毛蕊花糖苷转化为M1,为了分析M1的结构,采用异毛蕊花糖苷标准品比对,结果保留时间一致,故推断炮制过程中毛蕊花糖苷转化为异毛蕊花糖苷。

2.2 地黄中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量测定

2.2.1 市售生地黄和熟地黄饮片的处理 市售三份生地黄(北京同仁堂、二天堂、康乐药店)粉碎,过24目筛,备用。市售三份熟地黄(北京同仁堂、二天堂、康乐药店)粉碎,过10目筛,备用。其中,熟地黄粘度较大,无法直接粉碎,先与60℃下烘干48h,再进行冷冻,从冰箱取出后即刻粉碎,即可。

2.2.2 供试品溶液的制备 生地黄、熟地黄供试品溶液的制备方法同前。

2.2.3 对照品溶液的制备 取毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成每1mL含毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷分别为0.210mg、0.151mg的混合溶液,即得。

2.2.4 线性关系 分别精密吸取上述对照品储备液0.5,1,2,4,6,8mL置10mL量瓶中,以50%甲醇稀释至刻度,摇匀,得不同浓度的对照品混合溶液,分别精密吸取20μL按上述色谱条件进样测定色谱峰面积,以对照品进样量(μg)为横坐标,峰面积值为纵坐标,进行线性回归。结果表明各成分在各自进样范围内线性关系良好,见表2。

表2 2-苯乙醇苷类成分的线性关系

化合物	标准曲线方程	r	线性范围(μg)
毛蕊花糖苷	$Y=1238.6X-48.567$	0.999 1	0.21~3.36
异毛蕊花糖苷	$Y=1302.8X-46.002$	0.999 3	0.151~2.416

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,进样 20 μL,连续进样 6 次,记录峰面积 A,计算 RSD 分别为 0.78%、0.73%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取药材粉末 1 g,精密称定,按优选的供试品溶液的制备方法制备样品液,备用。分别在 0h、2h、4h、8h、12h 进样,测得峰面积 A,计算 RSD 分别为 1.12%、2.33%,表明样品在 12h 内测定稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称定干燥粉末 1 g,按优选的供试品溶液的制备方法制备 5 个样品液,分别进样 20 μL,测定,计算毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量的平均值(n=5)分别为 0.64 mg/g、0.061 mg/g;RSD 分别为 2.53%、2.73%。结果表明方法重复性较好。

2.2.8 加样回收试验 取“2.2.7”项下已测知含量的粉末 3 份,每份约 0.5 g,精密称定,每组分别精密加入毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品溶液,再以甲醇补足至 50 mL,然后按“2.1.2”项下方法制备供试液,进样分析。毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷平均回收率结果见表 3。

表3 加样回收率结果表

成分	样品中量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)	平均值 (n=3)
毛蕊花糖苷	0.325	0.320	0.662	105.3	1.54	104.2%
	0.320	0.320	0.647	102.1		
	0.323	0.320	0.660	105.3		
异毛蕊花糖苷	0.031	0.031	0.063 2	103.9	2.36	101.6%
	0.031	0.031	0.061 7	99.0		
	0.031	0.031	0.062 6	101.9		

2.2.9 样品含量测定 称取不同批次的药材干燥粉末约 1 g,精密称定。按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液。分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,测定,以外标法计算含量。结果见表 4。结果显示,生地黄中毛蕊花糖苷平均含量高于熟地黄,熟地黄中异毛蕊花糖苷平均含量高于生地黄。

3 结论

本试验表明,地黄中毛蕊花糖苷随着炮制时间的增加而不断降低,同时在 33 min 处有一峰 M1 逐渐增加,采用异毛蕊花糖苷标准品比对,保留时间一致,推断 M1 为异毛蕊花糖苷,即在炮制过程中毛蕊花糖苷转化为异毛蕊花糖苷。但 M1

表4 生地黄、熟地黄样品中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷含量 mg/g

地黄	毛蕊花糖苷 平均值	异毛蕊花糖苷 平均值
生地黄(同仁堂)	0.27	0.034
生地黄(二天堂)	0.32	0.026
生地黄(康乐)	0.64	0.061
熟地黄(同仁堂)	0.19	0.048
熟地黄(二天堂)	0.17	0.068
熟地黄(康乐)	0.43	0.130

的结构有待于下一步采用 LC-MS 和分离制备的方法进行确定。

通过对三批市售生地黄和熟地黄中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的测定发现,生地黄中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷平均含量分别为 0.041% 和 0.004 0%,熟地黄中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的平均含量分别为 0.026%、0.008 2%,即熟地黄中的毛蕊花糖苷含量低于生地黄,地黄炮制后毛蕊花糖苷含量降低。而《中华人民共和国药典》^[1]2010 年版(一部)中对熟地黄中毛蕊花糖苷的含量限度要求与地黄相同,均为不得少于 0.02%,这与毛蕊花糖苷在炮制过程中明显减少的客观事实不符。因此,建议在评定熟地黄时,毛蕊花糖苷含量限度应与生地黄有所区别,即适当降低熟地黄中毛蕊花糖苷的含量限度。

同时,毛蕊花糖苷并不是熟地黄区别于生地黄的特征成分,而熟地黄中的异毛蕊花糖苷的含量高低与炮制过程直接相关,因此,熟地黄中应该增加异毛蕊花糖苷的含量测定,这样,会更准确、科学、有效地控制熟地黄的质量。

[参考文献]

- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 年版. 北京:化学工业出版社, 2010: 115-117.
- Quanbo Xiong, Yasuhiro Tezuka, Takuji Kaneko. Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages[J]. European J Pharmacol, 2000, 400(1): 137.
- 高燕,蒲小平. 类叶升麻苷抗鱼藤酮致 SH-SY5Y 细胞损伤机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(2): 1611.
- 张洪泉,刘晓梅,石惠芳. 麦角甾苷对实验动物消化功能的影响[J]. 中国野生植物资源, 2000, 20(6): 451.
- 杨培民. 地黄清蒸不同时间梓醇和 5-羟甲基糠醛的含量比较[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(7): 1096-1098.
- 王宏洁,金亚红,李鹏跃. 鲜、生、熟地黄药材中 3 种活性成分含量的比较[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1923-1925.

(责任编辑:马力)