

地黄炮制过程中异毛蕊花糖苷含量的动态变化

于文娜，张振凌*，张颖，李柯柯，刘艳，王胜超
(河南中医药大学，郑州 450003)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定地黄中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量的方法,比较鲜地黄及其炮制品中异毛蕊花糖苷的含量变化情况。方法:采用 Waters-Symmetry Shield™ RP18 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 乙酸(18:82),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 334 nm,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。结果:在鲜地黄中暂未检测到异毛蕊花糖苷,而鲜地黄通过一定温度及时间的加工炮制后可产生异毛蕊花糖苷。清蒸不同时间的地黄样品中,毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量变化属于一个动态变化过程,且蒸制时间对地黄中异毛蕊花糖苷含量影响较大;鲜地黄在一定温度下烘制可产生异毛蕊花糖苷成分,但烘制不同时间段,其含量变化不明显。毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷在一定条件下可以相互转化。结论:地黄中异毛蕊花糖苷的产生部分由毛蕊花糖苷转化而来,可考虑将异毛蕊花糖苷也列为熟地黄的质量控制指标性成分之一。

[关键词] 地黄;熟地黄;炮制;毛蕊花糖苷;异毛蕊花糖苷;温度;烘制时间
[中图分类号] R283;R943.1;R284.1;R932 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)18-0022-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017180022
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1602.006.html>
[网络出版时间] 2017-06-28 16:02

Determination of Dynamic Changes of Isoacteoside in Processing
Process of Rehmanniae Radix

YU Wen-na, ZHANG Zhen-ling*, ZHANG Ying, LI Ke-ke, LIU Yan, WANG Sheng-chao
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of verbascoside and isoacteoside in Rehmanniae Radix simultaneously by HPLC, and to compare content changes of isoacteoside in Rehmanniae Radix and its processed products. **Method:** Contents of verbascoside and isoacteoside were determined by HPLC, Waters-Symmetry Shield™ RP18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was employed with a mobile phase of acetonitrile-0.1% acetic acid solution (18:82), flow rate of 1 mL·min⁻¹, column temperature at 30 ℃, detection wavelength of 334 nm and injection volume of 20 μL. **Result:** There was no isoacteoside in fresh Rehmanniae Radix temporarily, but through a certain temperature and time of processing, isoacteoside can be determined. In Rehmanniae Radix samples steamed at different times, the content change of verbascoside and isoacteoside was a dynamic change process, and the steaming time had a great effect on the content of isoacteoside in Rehmanniae Radix. Baked at a certain temperature, it can produce isoacteoside in fresh Rehmanniae Radix, but in the different time periods, the content of isoacteoside did not change obviously. Verbascoside and isoacteoside could be transformed into each other under certain conditions. **Conclusion:** Production of isoacteoside in Rehmanniae Radix is partly from the transformation of verbascoside; isoacteoside can be considered as a one of the quality control indexes of Rehmanniae Radix Praeparata.

[收稿日期] 20170414(015)
[基金项目] 国家公益性科研专项(201507002);呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心项目(教科计[2013]638号)
[第一作者] 于文娜,在读硕士,从事中药饮片研究与开发,Tel:18738152522,E-mail:1452741699@qq.com
[通讯作者] *张振凌,教授,博士生导师,从事中药饮片及新药研究,Tel:0371-65680970,E-mail:zhangzl6758@163.com

[Key words] Rehmanniae Radix; Rehmanniae Radix Praeparata; processing; verbascoside; isoacteoside; temperature; baking time

地黄始载于《神农本草经》^[1],其主要化学成分是以梓醇为代表的环烯醚萜苷类、毛蕊花糖苷为代表的苯乙醇苷类及糖类等。鲜地黄及地黄主要以梓醇及毛蕊花糖苷成分作为其质量评价指标,而由地黄炮制为熟地黄的过程中,以梓醇为代表的环烯醚萜类成分损耗殆尽,毛蕊花糖苷含量略有降低^[2];2015 年版《中国药典》熟地黄项下也仅以毛蕊花糖苷作为其质量控制指标,且质量分数不得少于 0.02%,这未能完全体现出地黄与熟地黄之间的差异。但有文献研究发现,异毛蕊花糖苷含量随地黄炮制时间增加而增加,且熟地黄高于地黄^[3]。另有研究表明毛蕊花糖苷和(或)异毛蕊花糖苷具有抗氧化、抗溶血等生物活性^[4]。且毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷具有相似的生物效应,如抗氧化^[4]、抗蛋白质糖化^[5]及免疫增强作用^[6]。此外,毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷均具有一定的肝保护作用^[7]。目前市面上的地黄品种及质量差异较大,甚至道地产区多个不同地黄品种间毛蕊花糖苷含量也存在较明显差异^[8],进而使得地黄炮制品也出现了较大差异,为保证该药材临床用药的稳定性,制定更合理的质量控制评价体系是关键。目前有关地黄炮制过程中异毛蕊花糖苷的动态变化研究较少,本实验拟通过 HPLC 研究地黄炮制过程中异毛蕊花糖苷的产生及其含量变化,为该药材的炮制机制研究及炮制工艺评价提供依据。

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),e2695 型全自动高效液相检测仪(美国 Waters 公司)。鲜地黄、地黄来源于河南省焦作,经河南中医药大学董诚明教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的块根;毛蕊花糖苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111530-201411,纯度 99.64%),异毛蕊花糖苷对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号 PS0003-0020,纯度 98.5%),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 不同蒸制时间熟地黄 按 2015 年版《中国药典》中熟地黄项下清蒸法,称取大小均匀的地黄,置蒸锅内蒸制,每隔 1 h 取样 1 次,即分别在 0,1,2,

3……36 h 不同时间点取样,切厚片,75 ℃ 干燥,即得样品 S-0 ~ S-36。

2.1.2 不同烘制时间地黄 取鲜地黄药材在同一温度下烘制,分别在 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 h 取样,切薄片,进行冷冻干燥,得样品 T-0 ~ T-12。

2.1.3 不同烘制温度地黄 取鲜地黄药材分别在 30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130 ℃ 条件下,烘制 2 h,取样后进行冷冻干燥,得样品 W-1 ~ W-11。

2.1.4 加对照品蒸地黄 取鲜地黄碎块、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷对照品适量,分别置于 10 mL 水解管中进行蒸制,分别在 0,3,6,9,12 h 取样,得样品 Z-1 ~ Z-5。

2.1.5 蒸制对照品溶液 毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷对照品溶液置于 10 mL 水解管中进行蒸制,分别在 0,3,6,9,12 h 取样,毛蕊花糖苷记为 M-1 ~ M-5,异毛蕊花糖苷的依次记为 Y-1 ~ Y-5。

2.2 毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 Symmetry Shield™ RP18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 乙酸(18:82),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 334 nm,柱温 30 ℃。进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取适量毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷对照品,置于 2 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 0.125,0.07 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 取样品 0.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,加热回流提取 1.5 h,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL 于蒸发皿中,60 ℃ 水浴浓缩至近干,残渣用流动相溶解并定容至 5 mL 量瓶中,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷对照品溶液 1,5,10,15,20,25 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得线性回归方程分别为 $Y = 1 \times 10^6 X - 80\,823$ ($R^2 = 0.999\,3$), $Y = 1 \times 10^6 X - 48\,769$ ($R^2 = 1.00$),线性范围依次为 0.125 ~ 3.125, 0.07 ~ 1.75 μg。

2.2.5 精密度试验 取同一对照品溶液,按 2.2.1

项下色谱条件测定,计算毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.7% 和 1.3%,说明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取熟地黄样品适量,按 **2.2.3** 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,计算毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的质量分数分别为 0.60,0.40 mg·g⁻¹,RSD 分别为 1.6% 和 1.9%,说明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取熟地黄样品适量,按 **2.2.3**

项下方法制备供试品溶液,分别在 0,2,4,8,12,24 h 按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,结果毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.7% 和 2.0%。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.2.8 加样回收率试验 称取熟地黄样品 6 份,每份约 0.4 g,分别精密加入 0.24 g·L⁻¹毛蕊花糖苷和 0.16 g·L⁻¹异毛蕊花糖苷对照品溶液各 1 mL,按 **2.2.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,结果见表 1,说明该方法准确可靠。

表 1 毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的加样回收率试验

Table 1 Recovery tests of verbascoside, isoacteoside in Rehmanniae Radix

指标成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
毛蕊花糖苷	0.400 4	0.240 2	0.24	0.478 2	99.17	98.90	0.7
	0.400 2	0.240 1	0.24	0.478 8	99.46		
	0.400 1	0.240 1	0.24	0.477 9	99.08		
	0.400 3	0.240 2	0.24	0.474 5	97.63		
	0.400 4	0.240 2	0.24	0.476 8	98.58		
	0.400 5	0.240 3	0.24	0.479 1	99.50		
异毛蕊花糖苷	0.400 4	0.160 2	0.16	0.319 0	99.25	98.32	0.9
	0.400 2	0.160 1	0.16	0.315 8	97.31		
	0.400 1	0.160 0	0.16	0.317 7	98.56		
	0.400 3	0.160 1	0.16	0.319 0	99.31		
	0.400 4	0.160 2	0.16	0.317 3	98.19		
	0.400 5	0.160 2	0.16	0.315 9	97.31		

2.2.9 样品测定 分别取鲜地黄、地黄、熟地黄(自制,符合 2015 年版《中国药典》的相关项下要求)样品各 6 批,按 **2.2.3** 项下方法制备供试品溶液,每批平行 2 份,根据水分测定结果换算为干燥品计算毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量,见表 2。结果发现在鲜地黄中暂未检测到异毛蕊花糖苷,地黄、熟地黄中均含有异毛蕊花糖苷,且熟地黄中异毛蕊花糖苷含量高于地黄。

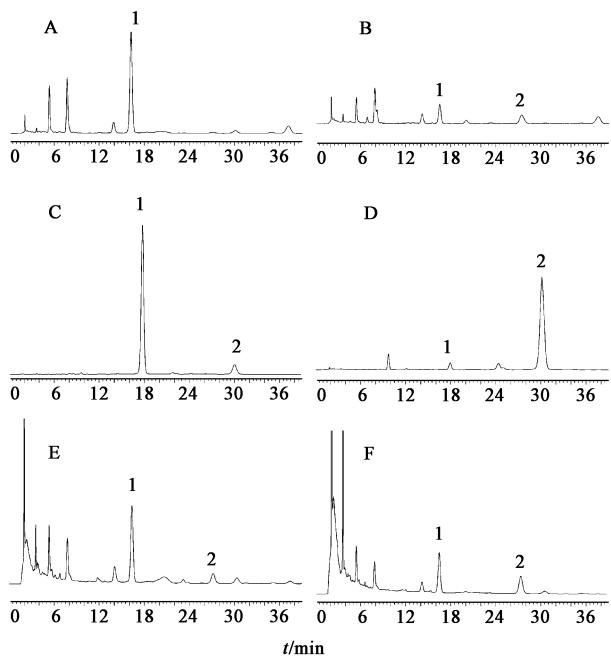
2.3 蒸制样品的含量测定 取水解管中蒸制样品 Z-1 ~ Z-5,用甲醇 50 mL 分多次洗出至平底烧瓶中,加热回流提取 1.5 h,放冷,滤过,精密量取续滤液 20 mL 于蒸发皿中,60 ℃ 水浴浓缩至近干,残渣用流动相溶解并定容至 5 mL 量瓶中,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,备用。同时将配制的单独对照品溶液(M-1 ~ M-5 及 Y-1 ~ Y-5)置水解管中进行蒸制,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,备用。按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,结果发现鲜地黄经过蒸制,可检测到异毛蕊花糖苷的存在;同时通过蒸制单独的对照品,发现毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷对照品蒸制 1 h 后均未发生转化,而在蒸制 3,6,9,12 h 后均发生转化,并且毛蕊花糖苷对照品溶液在蒸制 6 h,

表 2 鲜地黄、地黄、熟地黄中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量测定

Table 2 Determination of verbascoside and isoacteoside in fresh Rehmanniae Radix, Rehmanniae Radix and Rehmanniae Radix Praeparata

样品	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷
鲜地黄	0.075	0
	0.062	0
	0.088	0
	0.080	0
	0.154	0
	0.086	0
地黄	0.088	0.029
	0.080	0.026
	0.070	0.020
	0.130	0.021
	0.131	0.020
	0.136	0.023
熟地黄	0.043	0.030
	0.070	0.060
	0.062	0.032
	0.058	0.041
	0.063	0.040
	0.073	0.060

异毛蕊花糖苷对照品溶液在 9 h 后转化量稍多。见图 1。



A. 鲜地黄;B. 鲜地黄 (蒸 1 h);C. 对照品 (蒸 6 h);D. 对照品 (蒸 9 h);E. 地黄;F. 熟地黄;1. 毛蕊花糖苷;2. 异毛蕊花糖苷

图 1 地黄样品的 HPLC

Fig. 1 HPLC of Rehmanniae Radix samples

2.4 不同温度对鲜地黄中异毛蕊花糖苷产生的影响 取样品 W-1 ~ W-11,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,见图 2。结果发现鲜地黄药材在 70 ℃ 烘制一定时间可产生异毛蕊花糖苷,在温度 100 ~ 110 ℃ 条件下异毛蕊花糖苷含量稍增加。

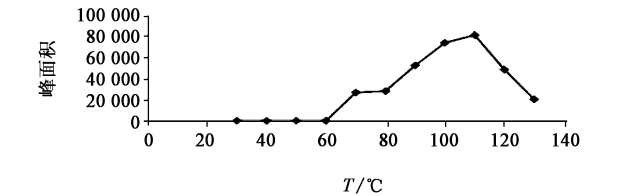


图 2 不同温度对鲜地黄中异毛蕊花糖苷含量的影响

Fig. 2 Effect of temperature on content of isoacteoside in fresh Rehmanniae Radix

2.5 不同时间对地黄样品中指标成分含量的影响 取样品 T-0 ~ T-12 及样品 S-0 ~ S-36,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,见表 3 和图 3。结果发现清蒸不同时间的地黄样品中,毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量变化属于一个动态变化过程,且蒸制时间对地黄中异毛蕊花糖苷含量影响较大;鲜地黄在一定温度下烘制可产生异毛蕊花糖苷成分,但烘制不同时间段,其含量变化不明显。

表 3 地黄清蒸不同时间样品中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量测定

Table 3 Determination of verbascoside and isoacteoside in Rehmanniae Radix samples steamed at different times

样品	蒸制时间/h	毛蕊花糖苷/%	异毛蕊花糖苷/%
S-0	0	0.13	0.02
S-1	1	0.16	0.04
S-2	2	0.14	0.04
S-3	3	0.13	0.04
S-4	4	0.07	0.03
S-5	5	0.10	0.05
S-6	6	0.15	0.07
S-7	7	0.14	0.06
S-8	8	0.17	0.08
S-9	9	0.19	0.09
S-10	10	0.07	0.03
S-11	11	0.08	0.04
S-12	12	0.09	0.05
S-13	13	0.06	0.04
S-14	14	0.04	0.03
S-15	15	0.05	0.03
S-16	16	0.07	0.06
S-17	17	0.12	0.08
S-18	18	0.05	0.04
S-19	19	0.12	0.08
S-20	20	0.06	0.04
S-21	21	0.06	0.04
S-22	22	0.06	0.04
S-23	23	0.04	0.03
S-24	24	0.04	0.03
S-25	25	0.05	0.04
S-26	26	0.04	0.03
S-27	27	0.04	0.03
S-28	28	0.04	0.03
S-29	29	0.03	0.03
S-30	30	0.04	0.03
S-31	31	0.03	0.02
S-32	32	0.03	0.02
S-33	33	0.03	0.02
S-34	34	0.02	0.02
S-35	35	0.01	0.01
S-36	36	0.03	0.03

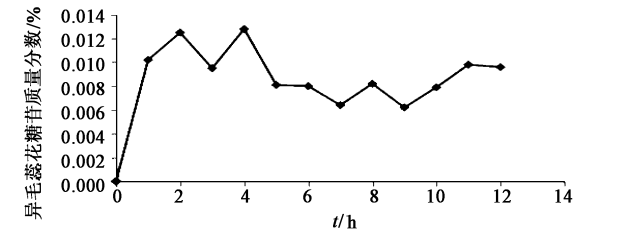


图 3 烘制不同时间的鲜地黄中异毛蕊花糖苷的含量变化

Fig. 3 Content changes of isoacteoside in fresh Rehmanniae Radix baked at different times

3 讨论

本文参考了 2015 年版《中国药典》熟地黄【含量测定】项下方法^[9],并对检测波长、流动相系统进行了调整和优化,最终选择乙腈-0.1% 乙酸

(18:82),检测波长 334 nm。本文对鲜地黄、地黄、熟地黄中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量进行了测定,发现鲜地黄在一定温度及时间下,加工炮制后会产生异毛蕊花糖苷,且地黄中异毛蕊花糖苷的含量会随炮制时间不同而产生变化。说明地黄中异毛蕊花糖苷的产生及变化受时间及温度的影响较大,该发现对地黄炮制机制的探讨及炮制工艺的优化具有一定参考意义。本研究在前人研究基础上,考察了时间及温度对地黄中异毛蕊花糖苷含量的影响,并对毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷之间的转化关系进行了探讨,分别对二者对照品溶液进行单独蒸制,发现在加热过程中二者可以相互转化。但本研究针对地黄批次及品种间差异考虑较少,对系统研究地黄及其炮制品中异毛蕊花糖苷的含量变化仍具有一定的局限性。

在中医理论基础上,地黄经过炮制后,除了其成分会发生相应的变化,其药性、药效、外观颜色及味道也会发生改变。如鲜地黄、地黄、熟地黄中毛蕊花糖苷的含量依次降低,有研究表明毛蕊花糖苷抗氧化能力与浓度呈明显的量效关系^[10],这与地黄炮制加工后毛蕊花糖苷的含量变化有一定关系。但在地黄加工炮制过程中,异毛蕊花糖苷等成分变化与其性味、药效所对应的关系仍需进一步深入研究,阐明其炮制机制是下一步研究的主要内容。

苯乙醇苷是一类由咖啡酸、苯乙醇苷元、糖基三部分组成的糖苷类化合物。从化学结构上看,苯乙醇苷类成分与苯丙素类和木脂素类化合物有一定的相似性,且生物起源关系密切,均来自桂皮酸途径。苯乙醇苷类化合物的生物合成途径可能由氨基酸经过一系列反应生成咖啡酸、咖啡酸酯类、阿魏酸、苯乙醇及其苷类等中间产物,进而经过反应生成苯乙醇苷类化合物^[11-12]。异毛蕊花糖苷的生成途径可能有 2 条:①地黄中的毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷均属于苯乙醇苷类,互为同分异构体,且均含有酯键,在蒸制过程中,pH 处于弱酸性^[13],可发生可逆的酯化反应^[14],即酸性条件下二者均可水解发生酯键断裂生成咖啡酸和羟基络醇^[15],而水解产生的中间产物又可在加热的酸性条件下通过酯化反应生成毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷,故毛蕊花糖苷可发生异构化转化为异毛蕊花糖苷^[16]。②地黄蒸制过程中,苯丙氨酸或 L-酪氨酸受热脱氨生成 α,β -不饱和酸,又经过有氧取代生成中间产物咖啡酸,咖啡酸可经过烷基取代等一系列反应生成中间产物苯乙醇类化合物^[17],而咖啡酸和羟基络醇(3,4-二羟基苯乙

醇)在一定条件下可能通过酯化反应而生成异毛蕊花糖苷,但关于其具体的合成途径仍需实验验证。

[参考文献]

[1] 佚名. 神农本草经[M]. 黄奭,辑. 北京:中国古籍出版社,1982:35.

[2] 王宏洁,金亚红,李鹏跃,等. 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.

[3] 尚伟庆,贺清辉,张建军. 地黄炮制过程中毛蕊花糖苷变化的研究[J]. 新中医,2014,46(5):209-211.

[4] CHEN C H, LIN Y S, Chien M Y, et al. Antioxidant and anti-hypertensive activities of acteoside and its analogs [J]. Bot Stud, 2012, 53(4):421-429.

[5] LIU Y H, LU Y L, HAN C H, et al. Inhibitory activities of ac-teoside, isoacteoside, and its structural constituents against pro-teinglycation *in vitro* [J]. Bot Stud, 2013, doi:10. 1186/1999-3110-54-6.

[6] HUANG D F, TANG Y F, NIE S P, et al. Effect of phenyle-thanoid glycosides and polysaccharides from the seed of *Planta goasiatica* L. on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 620(1/3):105-111.

[7] 宋志宏,雷丽,屠鹏飞. 肉苁蓉属植物的药理活性研究进展[J]. 中草药,2003,34(9):16-18.

[8] 周倩. 地黄标准物质及熟地黄质量评价标准的研究[D]. 郑州:河南大学,2014.

[9] 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,2015:125.

[10] 杨建华,胡君萍,热娜·卡斯木,等. 肉苁蓉属植物中六种苯乙醇苷类化合物抗氧化活性的构效关系研究[J]. 中药材,2009,32(7):1067-1069.

[11] Paul M D. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach* [M]. 3rd edition. Hoboken: A John Wiley and Sons, 2009:148-154.

[12] 潘英妮. 管花肉苁蓉鲜品化学成分及生物活性的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2011.

[13] 郭艳霞. 美拉德反应与地黄炮制机理的关系研究[D]. 济南:山东大学,2012.

[14] 倪沛洲. 有机化学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2007:377.

[15] 万茵,黄婧嫣,苏昱,等. HPLC 同时测定毛蕊花糖苷、咖啡酸和羟基酪醇[J]. 分析实验室,2016,35(1):30-33.

[16] 姜秋,蒋海强,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中 5 种苯乙醇类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):60-63.

[17] 王金芳. 肉苁蓉不同部位苯乙醇苷类成分的定性定量研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.

[责任编辑 刘德文]