

HPLC 同时测定地黄中 5 种苷类成分的含量

张留记^{1,2}, 周志敏², 屠万倩^{1*}, 刘晓苗²¹河南省中医药研究院, 郑州 450004; ²河南中医药大学, 郑州 450008

摘要: 建立高效液相色谱法同时测定地黄中梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷含量的方法。采用 SynergiTM Hydro-RP 80 Å 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 4 μm); 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水, 梯度洗脱; 流速为 1 mL/min, 柱温 35 °C; 检测波长: 梓醇、地黄苷 D 和益母草苷为 203 nm; 毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷为 334 nm。地黄中 5 种苷类成分分离良好, 各成分含量与峰面积在测定范围内均呈良好的线性关系($r \geq 0.9990$), 加样回收率分别为 96.43%、97.52%、96.16%、100.48%、97.21%, RSD 分别为 1.44%、2.56%、1.07%、1.98%、3.35%。该方法简单、快捷, 重现性好, 准确率高, 可为地黄的质量控制研究提供依据。

关键词: 地黄; HPLC; 梓醇; 地黄苷 D; 益母草苷; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.016

Simultaneous Determination of Five Glycosides in Rehmanniae Radix by HPLC

ZHANG Liu-ji^{1,2}, ZHOU Zhi-min², TU Wan-qian^{1*}, LIU Xiao-miao²¹Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China; ²Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

Abstract: To establish an HPLC method for simultaneous determination of catalpol, rehmannioside D, leonuride, acteoside, isoacteoside in Rehmanniae Radix. SynergiTM Hydro-RP 80 Å column (250 mm × 4.6 mm, 4 μm) was used, with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as the mobile phase in gradient elution mode. The column temperature was 35 °C, with flow rate 1.0 mL/min. The UV detection wavelength was set at the maximum absorption wavelength, 203 nm for catalpol, rehmannioside D and leonuride, 334 nm for acteoside and isoacteoside. The five kinds of glycosides in Rehmanniae Radix were separated well, and the linear relation was obtained ($r \geq 0.9990$). The average recoveries were 96.43%, 97.52%, 96.16%, 100.48% and 97.21%, with RSD 1.44%, 2.56%, 1.07%, 1.98%, 3.35%, respectively. The method is simple, accurate, reproducible, and can provide the basis for the quality control of Rehmanniae Radix.

Key words: Rehmanniae Radix; HPLC; catalpol; rehmannioside D; leonuride; acteoside; isoacteoside

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根, 味甘、寒, 具有清热凉血, 养阴生津的功效, 用于热入营血, 温毒发斑, 吐血衄血等^[1]。现代药理研究表明, 地黄具有降糖、降压、利尿、保护心血管等作用^[2-4]。地黄分布广泛, 以河南的温县、孟县、武陟、沁阳即古怀庆府为地黄的道地产区。地黄中主要活性成分为苷类, 其中环稀醚萜苷类成分为梓醇、二氢梓醇、益母草苷、桃叶珊瑚苷、蜜力特苷、地黄苷 A、B、C、D 等; 苯乙醇苷类成分为毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷等^[5,6], 药典采用梓

醇和毛蕊花糖苷为地黄的质控指标。本实验采用 HPLC 法对不同等级和产地的地黄中环稀醚萜苷类成分梓醇、地黄苷 D、益母草苷及苯乙醇苷类成分毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量进行了同时测定, 为进今后进一步提高地黄的质量控制方法提供依据。

1 仪器与试剂

2996 型高效液相色谱仪(包括 2695 型分离单元, 2996 型紫外检测器, Empower II 色谱工作站, 美国 Waters 公司); LIBROR-160DPT 万分之一分析天平(日本岛津公司), AE240 十万分之一分析天平(瑞士 Mettler 公司); SB-5200DT 超声波提取器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

梓醇(HPLC $\geq 98\%$, 批号 110808-201210), 购自

收稿日期: 2016-09-21 接受日期: 2016-11-14

基金项目: 国家中医药管理局重点研究室建设项目; 河南省重点科技攻关计划(102102310018)

* 通讯作者 Tel: 86-371-66331718; E-mail: wqtu632@126.com

中国药品生物制品检定所;地黄苷 D (HPLC \geq 98%, 批号 150412), 益母草苷 (HPLC \geq 98%, 批号 140213), 毛蕊花糖苷 (HPLC \geq 98%, 批号 151121), 异毛蕊花糖苷 (HPLC \geq 98%, 批号 150617), 均购自四川省维克奇生物科技有限公司。生地黄 2016 年分别购自河南省武陟县、河南省温县, 并经河南省中医药研究院都恒青研究员鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmanniaglutinosa* Libosch. 的干燥块根。甲醇、乙腈为色谱纯(赛默飞世尔科技有限公司), 水为重蒸馏水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Synergi™ Hydro-RP 80Å (250 mm \times 4.6 mm, 4 μ m), 流动相为乙腈(A)-0.2% 磷酸水(B), 梯度洗脱(0 ~ 8 min, 3% A; 8 ~ 9 min, 3% ~ 4% A; 9 ~ 25 min, 4% A; 25 ~ 35 min, 4% ~ 20% A; 35 ~ 50 min, 20% A), 流速为 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 0 ~ 30 min, 203 nm, 30 ~ 50 min, 334 nm。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品适量, 加重蒸水溶解并配置成质量浓度分别为 0.925、0.162、0.168、0.041、0.038 mg/mL 的混合对照溶液。

2.3 供试品溶液的制备

将地黄粉碎成粗粉, 取约 0.8 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声提取 1 h, 放至室温, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 20 mL, 浓缩至近干, 残渣加 20 mL 蒸馏水溶解, 通过 D101 型大孔吸附树脂(内径约 1.8 cm, 柱高约 6 cm), 依次以水和 80% 乙醇洗脱, 弃去水洗液, 收集 80% 乙醇洗脱液, 水浴蒸干, 残渣加水溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 用 0.45 μ m 孔径微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 标准曲线制定

精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液 1、2、5、8、10 和 15 μ L, 注入高效液相色谱仪测定, 以峰面积(y)对进样量(x)进行回归计算, 得 5 种苷类成分的回归方程和线性范围, 见表 1。

表 1 回归方程和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of the 5 investigated components

成分 Analyte	线性方程 Calibration curve	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range(μ g)
梓醇 Catalpol	$y = 7.46 \times 10^6 x - 1.33 \times 10^3$	0.9990	0.925 ~ 13.875
地黄苷 D Rehmnnioside D	$y = 1.65 \times 10^5 x - 1.09 \times 10^4$	0.9992	0.162 ~ 2.430
益母草苷 Leonuride	$y = 4.84 \times 10^5 x - 4.89 \times 10^2$	0.9995	0.168 ~ 2.520
毛蕊花糖苷 Acteoside	$y = 1.81 \times 10^6 x - 1.60 \times 10^2$	0.9998	0.041 ~ 0.615
异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	$y = 7.28 \times 10^5 x + 6.20 \times 10^3$	0.9995	0.038 ~ 0.570

2.5 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液, 按“2.1”色谱条件重复测定 6 次, 记录峰面积并计算 RSD 值, 得到梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的色谱峰面积的 RSD 分别为 1.12%、2.34%、1.23%、0.96%、3.02%。

2.6 稳定性实验

将同一供试品溶液在制备后放置 0、2、4、6、8、10 h, 按上述色谱条件进行定量分析, 测得梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷在不同时间色谱峰面积的 RSD 值为 2.43%、1.76%、1.25%、1.82%、1.6%。

2.7 重复性实验

精密称取同一批次药材, 按供试品溶液的制备方法制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算分析得到梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量的 RSD 值分别为 2.43%、1.66%、2.96%、3.65%、1.76%。

2.8 加样回收率实验

取已知含量的武陟地黄三等药材 6 份, 每份约 0.4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入含梓醇 0.7172 mg/mL、地黄苷 D 0.0427 mg/mL、益母草苷 0.0564 mg/mL、毛蕊花糖苷 0.0432 mg/mL 和异毛蕊花糖苷 0.0126 mg/mL 的混合对照品溶液 10 mL, 再分别精密加入甲醇 40 mL, 以下按“2.2”项下方法

制备加样回收供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,计算回收率,梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的平均回收率分别为 96.43%、97.52%、96.16%、100.48%、97.21%,RSD 值分别为 1.44%、2.56%、1.07%、1.98%、3.35%。

2.9 样品含量测定

分别取不同等级、不同产地的地黄药材,每个样

品重复称 3 份,按上述方法及色谱条件进行样品制备和 5 种苷类成分的定量分析,按照以下公式进行含量测定,测定结果见表 2,对照品及供试品色谱图见图 1。含量按如下公式计算。

$$\text{样品含量} = \frac{\text{测得量}(\mu\text{g})}{\text{进样体积}(10\ \mu\text{L})}$$

$$\frac{\text{取样量}(\text{g}) \times \text{取样体积}(20\ \text{mL}) \times 1000}{\text{溶液体积}(50\ \text{mL}) \times \text{定容体积}(10\ \text{mL})} \times 100\%$$

表 2 地黄中 5 种苷类成分的含量测定结果($n=3$)

Table 2 Content determination results of 5 glycosides in Rehmanniae Radix($n=3$)

产地来源 Sources	梓醇 Catalpol(%)	地黄苷 D Rehmannioside D(%)	益母草苷 Leonuride(%)	毛蕊花糖苷 Acteoside(%)	异毛蕊花糖苷 Isoacteoside(%)	总含量 Total content(%)
武陟一等 Wuzhi First-class	1.8025	0.1470	0.1424	0.0442	0.0185	2.1546
武陟二等 Wuzhi Second-class	2.2053	0.1108	0.1362	0.0596	0.0189	2.5380
武陟三等 Wuzhi Third-class	1.7929	0.1068	0.1411	0.0781	0.0315	2.1504
温县一等 Wenxian First-class	2.1305	0.1534	0.1625	0.0172	0.0279	2.4915
温县二等 Wenxian Second-class	2.2902	0.1307	0.1727	0.0180	0.0312	2.6983

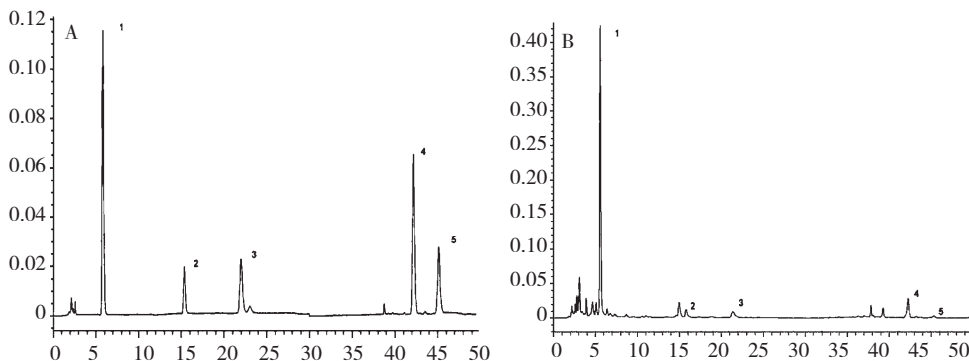


图 1 混合对照品和地黄供试品溶液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards(A) and Rehmanniae Radix sample (B)

注:1. 梓醇 2. 地黄苷 D 3. 益母草苷 4. 毛蕊花糖苷 5. 异毛蕊花糖苷

Note:1. catalpol;2. rehmannioside D;3. leonuride;4. acteoside;5. isoacteoside

3 讨论与结论

3.1 流动相的选择

参考有关文献^[7,8]并通过预实验比较了以乙腈-水,乙腈-0.5%冰乙酸水溶液,乙腈-0.2%磷酸水溶液等多种流动相的洗脱条件,考察被测组分之间以及与杂质峰的分离情况,结果以本文所选流动相进行梯度洗脱时,分离度较好,基线平稳。另外,在待测组分出峰后通过提高流动相中乙腈的比例消除样品中的杂质对连续进样带来的干扰,同时起到保护色谱柱的作用。

3.2 检测波长的选择

在实验中,5 种待测成分均在最大吸收波长下

测定,提高了检测的灵敏度。利用 Waters Empower II 色谱工作站定时波长功能,建立了 0~30 min,203 nm 作为梓醇、地黄苷 D、益母草苷的检测波长;30~50 min,334 nm 作为毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的检测波长,在同一色谱条件下完成地黄中 5 种苷类成分的检测,方便快捷。

3.3 供试品制备方法的确定

在参考药典提取方法的同时,考察比较了提取方式(加热回流提取、超声提取),提取时间(0.5、1、1.5 h)对测定结果的影响,结果显示加热回流和超声提取的测定结果基本一致,提取时间超过 1 h 后,5 种成分含量无明显差异。同时在制备供试品溶液时通过大孔树脂进行纯化,去除多糖、粘液质等杂质

成分,经过 HPLC 检测,与未经大孔吸附树脂处理的样品色谱相比,明显减少了杂质峰吸收,使待测成分准确定量。

3.4 小结

在实验中,分别测定了不同等级、不同产地的多个地黄样品,结果表明,不同产地的地黄中苷类成分含量存在显著差异,温县地黄中环稀醚萜苷类成分梓醇、地黄苷 D、益母草苷均大于武陟生地,苯乙醇苷类成分毛蕊花糖苷含量较小,略低于药典规定量;同一产地不同等级的样品中苷类成分含量也存在一定差异,其中武陟地黄中梓醇、毛蕊花糖苷含量均符合药典规定,以地黄二等各成分含量最高。本文建立的同时测定地黄中 5 种苷类成分含量的方法,可丰富生地的质控指标,经过方法学考察,具有良好的精密度、准确度和重复性,简便易行,可为地黄及含地黄的复方药物的质量控制和综合评价提供参考依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 124-126.
- 2 Liu J(刘静), Liu M(刘梅), Yang B(杨波), et al. Effect of Radix Rehmanniae extract on hyperuricemia mice. *China*

JDrug App Monitor(中国药物应用与监测), 2015, 12: 347-350.

- 3 Zhang XP(张学平), Zhao HM(赵慧民), Tang RX(汤瑞霞), et al. Clinical observation on QiShenDiHuangJiang-Tanggranules in treating gestational diabetes mellitus. *West J Tradit Chin Med*(西部中医药), 2015, 28(5): 92-94.
- 4 Wu JH(吴金环), Gu HY(顾红岩), La XJ(喇孝瑾), et al. Effects of Rehmanniae Radix and Rehmanniae Radix Preparata on blood glucose and lipid in diabetic mice. *China ExpFormu*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17: 161-163.
- 5 Zhu QQ(朱俏娟), Zhong L(钟亮), Qi J(戚进). Advances in studies on iridoids in root of *Rehmanniaglutinosa*. *Strait Pharm J*(海峡药学), 2015, 27(9): 1-5.
- 6 Zhang BY(张波泳), Jiang ZZ(江振作), Wang YF(王岳飞), et al. Analysis of chemical constituents in fresh, dried and prepared Pehmanniae Radixby UPLC/ESI-Q-TOF MS. *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2016, 38: 1104-1108.
- 7 Zhang WM(张文萌), Zhang S(张石), Fu JN(付金楠), et al. Simultaneous determination of four components in processed Rehmanniae Radixby RP-HPLC. *JShenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2012, 29: 367-372.
- 8 Yue C(岳超), Gao J(高洁), Shi SM(石上梅), et al. Simultaneous determination of three components in crude and processed Rehmanniae Radix by HPLC. *China ExpFormu*(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(4): 71-74.

(上接第 175 页)

- 30 Liu Y, et al. 3D scaffold of PLLA/pearl and PLLA/nacre powder for bone regeneration. *Biomed Mater*, 2013, 8: 065001.
- 31 Chen YH(陈怡德), et al. Study of mouse alveolar bone defect repairation by dialdehyde bletilla striata glucomanna/hydroxypropyl chitosan/nano-nacre powder composited scaffolds. *J Shandong Univ, Health Sci*(山东大学学报, 医学版), 2016, 54: 7-11.
- 32 Xiao WD(肖文德), et al. Evaluation of cell biocompatibility of PDGF-BB Releasing Nano-nacre/PDLLA/FG composite

scaffold. *Chin J Bone Joint Injury*(中国骨与关节损伤杂志), 2011, 26: 1081-1083.

- 33 Xiao WD(肖文德), et al. Biological security evaluation of PDGF-BB releasing nano-nacre/PDLLA/FG composite scaffold. *Chin J Bone Joint Injury*(中国骨与关节损伤杂志), 2013, 28: 1038-1040.
- 34 Pang YZ(庞永志) et al. Experimental study of bletilla glucomannan/nacre powder composites repairing the alveolar bone defects in rabbits. *J Shandong Univ, Health Sci*(山东大学学报, 医学版), 2013, 1: 37-45.