

地黄含有环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、糖类、氨基酸类、金属离子等多种化学成分^[3]。2020年版《中国药典(一部)》中记载的含熟地黄的成方制剂有151种。《中医方剂大辞典精选本》中含熟地黄的方剂有739首,且熟地黄常与补益药、清热药、活血化瘀药、利水渗湿药、收涩药、温里药配伍^[4-5],常入四物汤、六味地黄汤等中医经典汤剂。“汤者荡也,去大病用之。”说明中药饮片制成汤剂内服吸收快、药效发挥迅速,且可随证加减。本研究中依据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》,确定标准汤作为中药配方颗粒的研究参照物,通过测定熟地黄中地黄苷D含量,以出膏率、总多糖含量、转移率为质量评价指标,建立高效液相色谱指纹图谱,为熟地黄标准汤的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);U-2910型紫外-可见分光光度计(日本Hitachi公司);BT25S型电子天平(精度为十万分之一)、BS210S型电子天平(精度为万分之一),均购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;CP2102型电子天平(奥豪斯仪器<常州>有限公司,精度为百分之一);RM2135型轮转切片机(德国Leica公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);202V1型电热恒温干燥箱(上海实验仪器厂有限公司);YF111型高速粉碎机(江阴市创新机械设备有限公司,容量为100g)。

1.2 试剂

地黄苷D对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为L21010Y100752,含量 $\geq 98\%$);桃叶珊瑚苷对照品(批号为111761-200601,含量 $\geq 98\%$),D-无水葡萄糖对照品(批号为110833-201908,含量 $\geq 99.8\%$),均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。15批熟地黄饮片,按2020年版《中国药典(一部)》熟地黄项下要求,进行基原、形状、显微、薄层层析鉴别,经陕西省中医药研究院杨智峰教授鉴定为正品;进行水分、总灰分、酸不溶性灰分检查,并测定浸出物及毛蕊花糖苷、地黄苷D含量,详见表1。

2 方法与结果

2.1 标准汤制备

取15批样品饮片各100g,加热、煎煮2次,第1次加入7倍量水,浸泡30min,加热回流提取60min,趁热滤过,收集滤液,第2次加入6倍量水,回流提取40min,趁热滤过,合并2次滤液,并浓缩至500mL,得标准汤^[6]。

2.2 干膏率计算

分别精密量取15批熟地黄标准汤各5mL,分别置恒重蒸发皿中,水浴蒸干,残渣于105℃干燥3h,取出,分别置干燥器中放置30min,称定质量,计算干膏率。干膏率(%) = 干膏质量(g) × 总体积(mL) / [取样量 × 总生药量(g)] × 100%。结果干膏率平均值为67.01%,详见表2。

2.3 总多糖含量测定

溶液制备:称取105℃干燥至恒重的无水葡萄糖对

表1 15批熟地黄饮片信息(%)

Tab. 1 Information of 15 batches of *Rehmanniae Radix Praeparata*(%)

编号	批号	产地	检查项				含量	
			水分	浸出物	总灰分	酸不溶性灰分	毛蕊花糖苷	地黄苷D
S1	20190310	陕西	5.59	82.02	4.45	1.91	0.034	0.095
S2	20190320	陕西	5.69	83.96	6.00	1.86	0.041	0.082
S3	20190508	陕西	5.40	82.72	4.79	1.93	0.026	0.125
S4	20190522	河南	5.63	79.54	6.76	1.82	0.040	0.116
S5	20190609	河南	5.77	82.87	5.47	2.05	0.025	0.096
S6	20191001	河南	6.06	81.46	5.84	2.66	0.051	0.067
S7	20191022	河南	6.01	79.88	6.75	2.19	0.030	0.075
S8	20190501	河南	5.89	80.31	7.58	2.22	0.048	0.074
S9	20190922	河南	6.09	76.86	5.62	1.74	0.021	0.099
S10	20191228	山西	6.10	74.83	4.07	2.33	0.040	0.094
S11	20191101	河南	6.90	76.38	2.49	2.69	0.051	0.063
S12	20200112	河南	6.70	83.09	6.76	1.67	0.029	0.066
S13	20200201	河南	6.15	79.38	7.66	1.97	0.022	0.089
S14	20200202	河南	5.69	80.72	7.56	2.08	0.037	0.082
S15	20200108	河南	5.26	83.59	5.87	1.71	0.037	0.089

表2 样品中干膏率及总多糖、地黄苷D含量测定结果(%)
Tab. 2 Determination of dry extract rate, total polysaccharide and rehmannioside D content in the samples (%)

编号	干膏率	总多糖	地黄苷D		
			标准汤	饮片	转移率
S1	66.61	3.33	0.062	0.082	75.610
S2	65.46	3.59	0.087	0.125	69.600
S3	67.61	3.65	0.060	0.116	51.724
S4	66.83	3.55	0.075	0.096	78.125
S5	72.01	3.57	0.058	0.067	86.567
S6	68.92	3.61	0.055	0.075	73.333
S7	67.01	3.62	0.059	0.074	79.730
S8	68.57	3.63	0.070	0.099	70.707
S9	63.85	3.69	0.069	0.094	73.404
S10	70.42	3.53	0.057	0.063	90.476
S11	66.88	3.56	0.058	0.066	87.879
S12	64.59	3.68	0.055	0.089	61.798
S13	66.77	3.72	0.062	0.082	75.610
S14	64.02	3.62	0.066	0.089	74.157
S15	65.53	3.35	0.062	0.095	65.263

照品 43.43 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为 1.737 2 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液。分别精密量取 15 批标准汤各 0.5 mL,分别置 10 mL 离心管中,加 8 mL 无水乙醇,涡旋混匀,放置过夜,离心,倾出上清液,沉淀用 80% 乙醇洗涤 2 次;沉淀加水溶解,摇匀,定容,即得供试品溶液。

线性关系考察:精密量取葡萄糖对照品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 3.0 mL, 分别置 50 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀,制成质量浓度分别为 0, 2.084 64, 4.169 28, 6.253 92, 8.338 56, 12.507 84, 16.677 12, 20.846 40, 31.269 60 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。分别精密量取 3 mL,各置 10 mL 容量瓶中,加 5% 苯酚溶液 1.0 mL,混匀,迅速滴加浓硫酸 6 mL,涡旋混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min,取出,置水中,冷却至室温,混匀,以 0 $\mu\text{g/mL}$ 为空白溶液,于 490 nm 波长处测定吸光

度,以吸光度(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得总多糖回归方程 $Y=0.04777X-0.02282$, $R^2=0.99717$ ($n=9$)。结果表明,总多糖进样量在 2.084 64~31.269 60 mg 范围内与吸光度线性关系良好。

含量测定:分别精密量取 2.1 项下 15 批标准汤各 0.5 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,加水 2.5 mL,摇匀。按标准曲线制备项下方法,自“加 5% 苯酚溶液 1.0 mL”起依法测定吸光度,计算含量,即得总多糖含量。结果总多糖含量平均值为 3.58%,详见表 2。

2.4 地黄苷D含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.1% 磷酸溶液(5:95, V/V); 流速:1.0 mL/min; 检测波长:203 nm; 柱温:23 $^{\circ}\text{C}$ [1]; 进样量:10 μL [7-8]。

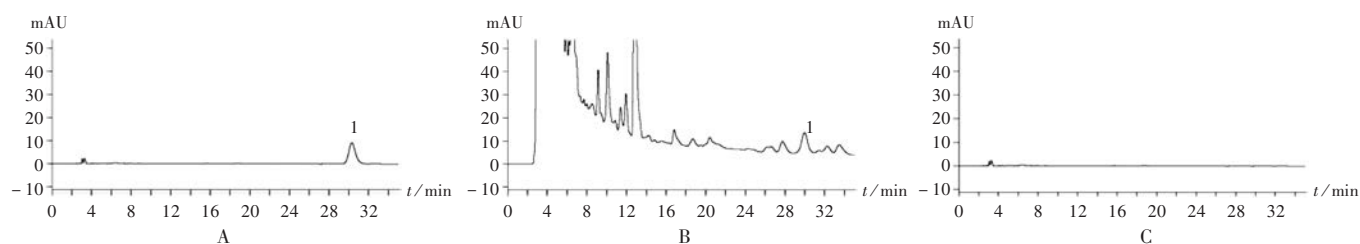
2.4.2 溶液制备

取地黄苷D对照品适量,精密称定,以 25% 甲醇溶解,制成地黄苷D质量浓度为 76.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。分别精密量取 2.1 项下 15 批标准汤各 5 mL,水浴蒸至近干,残渣用 25% 甲醇溶解,移至 10 mL 容量瓶中,加流动相定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。精密量取水 10 mL,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.4.3 方法学考察

系统适用性试验:取地黄苷D对照品溶液和供试品溶液各适量,按 2.4.1 项下色谱条件进样测定。结果理论板数以地黄苷D峰计大于 5 000,与相邻色谱峰分离度均大于 1.5。详见图 1。

专属性试验:取地黄苷D对照品溶液和阴性对照品溶液各适量,按 2.4.1 项下色谱条件进样测定。结果阴性对照品溶液色谱图中,在与地黄苷D对照品溶液色谱相同保留时间(30.3 min)处无干扰峰,表明专属性良好。详见图 1。



1. 地黄苷D

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. rehmannioside D

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察:分别精密量取地黄苷 D 对照品溶液 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加 25% 甲醇定容, 摇匀, 制成系列对照品溶液。按 2.4.1 项下色谱条件进样 10 μ L 测定, 记录峰面积。以地黄苷 D 质量浓度 (X , μ g/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 5.61415X + 4.56344$, $R^2 = 0.99998$ ($n = 7$)。结果表明, 地黄苷 D 进样量在 15.32 ~ 306.40 mg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:取地黄苷 D 对照品溶液和 2.4.2 项下供试品溶液各 10 μ L, 按 2.4.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果的 RSD 分别为 0.89% 和 0.64% ($n = 6$), 表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取 2.4.2 项下供试品溶液, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h 时按 2.4.1 项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.87% ($n = 7$), 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取标准汤 5 mL, 共 6 份, 按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算地黄苷 D 含量。结果地黄苷 D 平均含量为 0.118 mg/mL, RSD 为 1.85% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的标准汤(批号为 20200201)0.5 mL, 共 9 份, 分别精密加入地黄苷 D 对照品溶液(61.28 μ g/mL)0.5, 1.0 mL, 地黄苷 D 对照品溶液(122.56 μ g/mL)0.7 mL, 按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.4.1 项下色谱条件进样测定, 并计算回收率。结果见表 3。

表 3 加样回收试验结果 ($n = 9$)

Tab. 3 Results of the recovery test ($n = 9$)

样品含量(μ g)	加入量(μ g)	测得量(μ g)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
59.14	30.64	88.44	95.63		
59.14	30.64	88.49	95.79		
59.14	30.64	89.52	99.15		
59.14	61.28	122.79	103.87		
59.14	61.28	120.73	100.51	98.18	2.74
59.14	61.28	119.17	97.96		
59.14	85.79	143.22	98.01		
59.14	85.79	141.85	96.41		
59.14	85.79	141.73	96.27		

2.4.4 样品含量测定

取 15 批地黄标准汤各适量, 分别按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.4.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算标准汤、饮片中地黄苷 D 含量及转移率^[9-10]。转移率(%) = 本项指标成分中含量/饮片(上一环节)中指标成分含量 $\times 100\%$ 。结果标准汤、饮

片中地黄苷 D 平均含量分别为 0.064% 和 0.087%, 转移率平均值为 74.275%, 详见表 2。

2.5 高效液相色谱指纹图谱建立

溶液制备方法及方法学考察同 2.4 项。取 15 批熟地黄标准汤适量, 按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件进样测定, 将 15 批熟地黄标准汤的色谱图数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”, 以参照图谱为 S1, 时间宽度设为 0.10, 采用多点校正, 自动匹配, 生成对照图谱(R), 计算相似度, 详见图 2、图 3 和表 4。结果 15 批熟地黄标准汤指纹图谱相似度与对照图谱相似度均大于 0.95, 表明一致性很好^[11-15]。

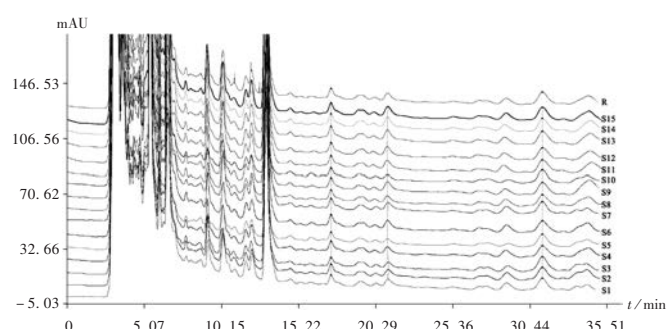


图 2 15 批熟地黄标准汤的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC superimposed fingerprint of 15 batches of *Rehmanniae Radix Praeparata* standard decoction

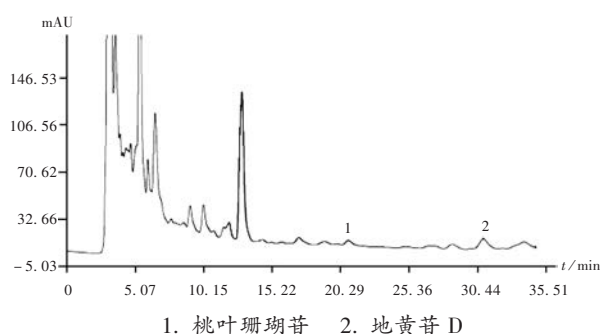


图 3 熟地黄标准汤高效液相色谱对照指纹图谱

1. aucubin 2. rehmannioside D

Fig. 3 HPLC reference fingerprint of *Rehmanniae Radix Praeparata* standard decoction

3 讨论

3.1 色谱条件选择

本研究中参考了 2020 年版《中国药典(一部)》^[11]熟地黄项下地黄苷 D 的含量检测色谱条件, 并综合比较峰形、分离度、出峰时间等参数, 流动相体系选择与药典一致[甲醇-0.1% 磷酸溶液(5:95, V/V)], 在 203 nm 波长处检测。

3.2 特征成分及参数范围确定

熟地黄标准汤中地黄苷 D 提取率高、转移率稳定,

表4 15批熟地黄标准汤高效液相色谱指纹图谱相似度评价

Tab. 4 Similarity of HPLC fingerprints of 15 batches of *Rehmanniae Radix Praeparata* standard decoction

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.985	0.984	0.978	0.976	0.989	0.990	0.978	0.987	0.995	0.988	0.993	0.991	0.991	0.993	0.995
S2	0.985	1.000	0.968	0.998	0.945	0.996	0.996	0.997	0.999	0.988	0.997	0.985	0.976	0.974	0.972	0.994
S3	0.984	0.968	1.000	0.961	0.982	0.969	0.979	0.965	0.969	0.982	0.969	0.989	0.987	0.989	0.991	0.985
S4	0.978	0.998	0.961	1.000	0.936	0.993	0.992	0.996	0.996	0.981	0.994	0.975	0.965	0.961	0.959	0.989
S5	0.976	0.945	0.982	0.936	1.000	0.955	0.959	0.939	0.948	0.973	0.955	0.978	0.981	0.974	0.980	0.971
S6	0.989	0.996	0.969	0.993	0.955	1.000	0.996	0.996	0.998	0.994	0.999	0.989	0.982	0.977	0.976	0.996
S7	0.990	0.996	0.979	0.992	0.959	0.996	1.000	0.994	0.996	0.994	0.996	0.992	0.985	0.983	0.983	0.998
S8	0.978	0.997	0.965	0.996	0.939	0.996	0.994	1.000	0.998	0.987	0.995	0.983	0.972	0.968	0.966	0.992
S9	0.987	0.999	0.969	0.996	0.948	0.998	0.996	0.998	1.000	0.993	0.997	0.987	0.978	0.974	0.974	0.996
S10	0.995	0.988	0.982	0.981	0.973	0.994	0.994	0.987	0.993	1.000	0.991	0.997	0.992	0.986	0.990	0.998
S11	0.988	0.997	0.969	0.994	0.955	0.999	0.996	0.995	0.997	0.991	1.000	0.989	0.983	0.978	0.976	0.996
S12	0.993	0.985	0.989	0.975	0.978	0.989	0.992	0.983	0.987	0.997	0.989	1.000	0.997	0.994	0.995	0.997
S13	0.991	0.976	0.987	0.965	0.981	0.982	0.985	0.972	0.978	0.992	0.983	0.997	1.000	0.994	0.995	0.992
S14	0.991	0.974	0.989	0.961	0.974	0.977	0.983	0.968	0.974	0.986	0.978	0.994	0.994	1.000	0.999	0.989
S15	0.993	0.972	0.991	0.959	0.980	0.976	0.983	0.966	0.974	0.990	0.976	0.995	0.995	0.999	1.000	0.990
R	0.995	0.994	0.985	0.989	0.971	0.996	0.998	0.992	0.996	0.998	0.996	0.997	0.992	0.989	0.990	1.000

能表征提取物的均一性,因此采用地黄苷 D 为质量评价的定量指标成分^[9,16]。按 15 批熟地黄标准汤以各参数均值的 75%~125% 计,参数范围为,出膏率 50.26%~83.76%,地黄苷 D 转移率 55.700%~92.833%,各项实测值均在标准汤参数范围内,表明熟地黄标准汤质量均一性好^[16-17]。

2015 年版《中国药典(一部)》熟地黄项下含量测定项为毛蕊花糖苷的检测,由于毛蕊花糖苷含量在地黄中仅为万分之二,且在炮制过程中极不稳定,易发生降解和转化。针对此问题,国家通过立项研究与评价抽验结合,将毛蕊花糖苷换成有滋阴、补血及降血糖活性且含量较高、性质更稳定的地黄苷 D 作为熟地黄的含量测定指标^[18]。

综上所述,所建立的质量标准及高效液相色谱指纹图谱可为熟地黄标准汤的质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 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,2020:132.
- [2] 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.
- [3] 中文玲,彭相君,于丽萍. 熟地黄活性成分药理作用的相关研究[J]. 临床医药文献电子杂志,2019,6(85):194.
- [4] 杜珂,高晓霞,王峰,等. 基于药效物质基础的熟地黄质-效评价研究进展[J]. 中草药,2019,50(6):1477-1484.
- [5] 李卫民,李卫红. 方剂中熟地黄配伍规律的研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(12):2810-2812.
- [6] 陈世林,刘安,李琦,等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J].

中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.

- [7] 陈素娟,聂静,张旗,等. 熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究[J]. 现代药物与临床,2018,33(9):2173-2177.
- [8] 李艳英,陈建红,李雪梅. 熟地黄饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(3):146-155.
- [9] 李娟,邢亚东,李姗姗,等. 不同炮制方法对熟地黄中 7 种化学成分含量的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2020,45(5):634-637.
- [10] 张留记,王建霞,屠万倩,等. 生地黄与熟地黄中 5 个苷类成分和总多糖的含量比较[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(4):566-571.
- [11] 王子怡,李艳荣,杜义龙,等. 山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定[J]. 中成药,2020,42(8):2079-2083.
- [12] 郝磊,孙福仁,高晗,等. 山楂标准汤剂的 HPLC 特征图谱研究[J]. 河北工业科技,2019,36(6):422-428.
- [13] 倪丽丽,戴莹,窦志华,等. 茵陈标准汤剂质量传递规律研究[J]. 中草药,2020,51(11):2954-2966.
- [14] 田方,孙福仁,张肖建,等. 合欢皮标准汤剂的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 河北工业科技,2019,36(2):128-134.
- [15] 陈锦霞,曾杉,林碧珊,等. 火麻仁标准汤剂的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国现代中药,2020,22(12):2063-2067.
- [16] 陈萍,郭冬,杨锦,等. 决明子标准汤剂质量评价研究[J]. 中国药业,2020,29(13):51-55.
- [17] 陈萍,薛佩芸,梁馨月,等. 银杏叶标准汤剂质量评价研究及高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 中国药业,2019,28(12):17-20.
- [18] 岳超,高杰,石上梅,等. HPLC 测定地黄炮制前后 3 种苷类物质的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):71-74.

(收稿日期:2020-11-04)