

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.07.012

熟地黄高压炮制工艺研究*

陈子月¹, 彭小园², 解伟松³, 孙双龙², 刘兴超^{2,4}, 肖学风^{1△}

(1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617; 2. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200; 3. 河北仁心药业有限公司, 河北 保定 071200; 4. 河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心, 河北 石家庄 050200)

摘要:目的 探讨熟地黄炮制工艺。方法 采用高压蒸制法对地黄分别进行一次蒸制和二次蒸制, 高压一次蒸制后, 用水或黄酒焖润4 h后进行二次蒸制。采用高效液相色谱法测定熟地黄中梓醇、地黄苷D、毛蕊花糖苷和5-羟甲基糠醛(5-HMF)含量, 色谱柱为WondaSil® C₁₈-WR柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为210 nm, 柱温为35℃, 进样量为20 μL。结果 梓醇、5-HMF、地黄苷D、毛蕊花糖苷的质量浓度分别在0.008 88~0.079 92 mg/mL、0.008 80~0.079 20 mg/mL、0.012 04~0.108 36 mg/mL、0.006 98~0.062 82 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9, 1.000\ 0, 1.000\ 0, 0.998\ 7, n=5$); 精密度、重复性、稳定性试验结果的RSD均小于2%; 平均加样回收率分别为99.22%, 100.33%, 100.25%, 100.00%, RSD分别为0.71%, 1.36%, 0.92%, 1.13% ($n=6$)。熟地黄最佳炮制工艺为120℃条件下第1次蒸制10 min, 后用水或黄酒焖润4 h, 第2次蒸制20 min。结论 所建立的方法可用于同时测定熟地黄中地黄梓醇、地黄苷D、毛蕊花糖苷和5-HMF含量; 高压2次蒸制法可大大缩短熟地黄炮制时间, 可为工业化生产提供参考。

关键词: 熟地黄; 高压炮制; 梓醇; 地黄苷D; 毛蕊花糖苷; 5-羟甲基糠醛; 高效液相色谱法; 含量

中图分类号: R932; R283

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)07-0053-04

High Pressure Processing Technology of Rehmanniae Radix Praeparata

CHEN Ziyue¹, PENG Xiaoyuan², XIE Weisong³, SUN Shuanglong², LIU Xingchao^{2,4}, XIAO Xuefeng¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, China 301617; 2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei, China 050200; 3. Hebei Renxin Pharmaceutical Co., Ltd., Baoding, Hebei, China 071200; 4. Application Technology Research and Development Center of Traditional Chinese Medicine in Hebei Universities, Shijiazhuang, Hebei, China 050200)

Abstract: Objective To investigate the processing technology of Rehmanniae Radix Praeparata. **Methods** The first steaming and the second steaming for Rehmanniae Radix were carried out by the high-pressure steaming method. After the first high-pressure steaming, Rehmanniae Radix was stewed with water or yellow rice wine for 4 h and then carried out the second steaming. The contents of catalpol, rehmannioside D, verbascoside and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Rehmanniae Radix Praeparata were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was WondaSil® C₁₈-WR column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol aqueous solution (gradient elution), and the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of catalpol, 5-HMF, rehmannioside D and verbascoside were 0.008 88–0.079 92 mg/mL, 0.008 80–0.079 20 mg/mL,

*基金项目: 河北省重点研发计划项目[20373001D]。

第一作者: 陈子月, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药新药与药代动力学, (电子信箱)czyh11251123@163.com。

△通信作者: 肖学风, 女, 博士, 教授, 研究方向为中药新药和药代动力学, (电子信箱)kai1219@163.com。

新策略和机制探讨[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.

[11] 宗春燕, 苏学军, 梁雅娟. 超声浸渍法提取木蝴蝶中总黄酮的工艺研究[J]. 化学工程师, 2019, 33(2): 18–20.

[12] 胡殿丽, 吴鸣建. 木蝴蝶总黄酮超声提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2475–2477.

[13] 李云贵. 木蝴蝶总黄酮提取纯化及药理活性的研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2014.

[14] 赵献敏, 张松江, 李 南, 等. 木蝴蝶茶活性成分提取工艺及对阿尔兹海默病小鼠认知能力干预作用[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(8): 1753–1756.

[15] 张新勇, 窦金凤, 周国梁, 等. 木蝴蝶中黄酮类成分的提取工艺优化及面霜的制备[J]. 家庭医药, 2017(9): 3–5.

[16] 肖龙泉, 任亚硕, 吴德玲, 等. 紫外分光光度法测定醉鱼草

果实中总黄酮含量[J]. 安徽医药, 2015, 19(2): 263–265.

[17] 吕名蕊, 张 旋, 樊 璐, 等. 超声波辅助法提取核桃青皮总黄酮工艺及抗氧化活性研究[J]. 粮食与食品工业, 2021, 28(3): 34–39.

[18] 吴素仪, 丘泰球, 范晓丹. 超声波在中草药有效成分提取应用中的研究进展[J]. 江苏中医药, 2008, 40(7): 93–94.

[19] 万水昌, 王志祥, 乐 龙, 等. 超声提取技术在中药及天然产物提取中的应用[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(1): 60–62.

[20] 于晓瑾, 王振宇, 高 宇, 等. 超声提取百花草总黄酮工艺研究[J]. 中医药信息, 2015, 32(5): 27–31.

[21] 肖牧原. 低功率超声醇提薄荷总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国药业, 2021, 30(4): 41–45.

(收稿日期: 2021-05-18; 修回日期: 2021-09-25)

0.012 04 – 0.108 36 mg / mL, 0.006 98 – 0.062 82 mg / mL ($r = 0.999\ 9, 1.000\ 0, 1.000\ 0, 0.998\ 7, n = 5$). The *RSDs* of precision, repeatability and stability tests were less than 2%. The average recoveries were 99.22%, 100.33%, 100.25% and 100.00% with the *RSDs* of 0.71%, 1.36%, 0.92% and 1.13% ($n = 6$). The optimal processing technology of *Rehmanniae Radix Praeparata* was the first steaming for 10 min at 120 °C, then stewing with water or yellow rice wine for 4 h, and the second steaming for 20 min. **Conclusion** The HPLC method can be used for the simultaneous determination of catalpol, rehmannioside D, verbascoside and 5 – HMF in *Rehmanniae Radix Praeparata*. The high – pressure steaming twice method can greatly shorten the processing time of *Rehmanniae Radix Praeparata* and provide a reference for industrial production.

Key words: *Rehmanniae Radix Praeparata*; high – pressure processing; catalpol; rehmannioside D; verbascoside; 5 – hydroxymethylfurfural; HPLC; content

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根^[1],《神农本草经》将其列为上品。常用入药形式有鲜地黄、生地黄、熟地黄、生地炭、熟地炭等,不同炮制品的性味、功效不同。鲜地黄性寒,味甘苦,清热生津、凉血止血;生地黄性寒,清热凉血、养阴生津;熟地黄性温,补血滋阴、益精填髓^[2]。地黄炮制方法在古代有蒸制、熬制、醋炒制等,现代炮制方法主要有生用、酒炒制、炭炒制等^[3–4]。《中国药典(一部)》《全国中药材炮制规范》及各省市中药材炮制规范中,熟地黄的现代制法各异,甚至简化为一次性蒸制或酒炖,但炮制时间均过长^[5–8]。研究发现,炮制时间与次数对熟地黄的活性成分含量的影响较大^[9]。地黄中主要含有环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、呋喃醛衍生物等化合物^[10–11]。本研究中以地黄代表性成分梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷和 5 – 羟甲基糠醛(5 – HMF)为指标性成分,探讨了熟地黄的最佳炮制工艺,为工业化生产提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC – 20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); ME204E102 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为十万分之一); YX – 280D 型手提式压力蒸汽灭菌器(合肥华泰医疗设备有限公司); KQ – 300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 40 kHz); Mili – Q 型纯水/超纯水系统(美国 Milipore 公司)。

1.2 试药

怀地黄(安国市祁利堂中药材销售有限公司,批号为 20200316),经河北中医学院郑开颜副教授鉴定为正品;梓醇对照品(批号为 AF9030401),毛蕊花糖苷对照品(批号为 AF20110904),5 – HMF 对照品(批号为 AF9052005),纯度均不低于 98%,均购于成都埃法生物科技有限公司;地黄苷 D 对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号为 7534,纯度不低于 98%);甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: WondaSil® C₁₈ – WR 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A) – 水溶液(B), 梯度洗脱(程序见表 1); 流速: 1.0 mL / min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

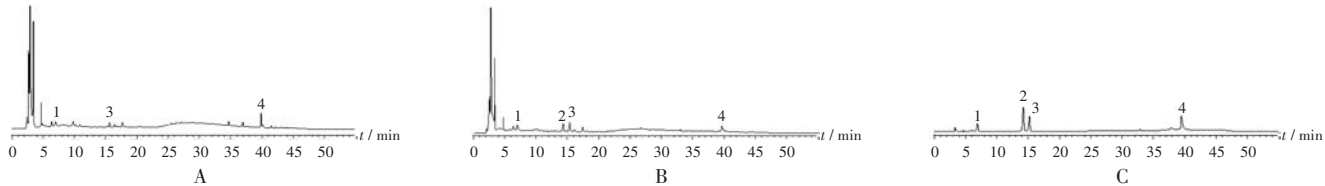
表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution procedure of the mobile phase(%)

时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
16 min	7	93	41 min	7	93
40 min	29	71	55 min	7	93

2.1.2 溶液制备

取怀地黄 / 熟地黄粗粉 0.1 g, 精密称定, 加 25 mL 50% 甲醇溶解, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷至室温, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。分别取梓醇、5 – HMF、地黄苷 D、



1. 梓醇 2. 5 – HMF 3. 地黄苷 D 4. 毛蕊花糖苷
A – B. 供试品溶液(生地黄、熟地黄) C. 混合对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Catalpol 2. 5 – HMF 3. Rehmannioside D 4. Verbascoside
A – B. Test solution(*Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata*) C. Mixed control solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

毛蕊花糖苷对照品 4.44, 4.40, 6.02, 3.49 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇-水溶液 (50:50, V/V) 定容, 超声处理 (功率为 300 W, 频率为 40 kHz) 至完全溶解, 配制上述 4 种成分质量浓度分别为 0.444, 0.440, 0.602, 0.349 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察: 取 2.1.2 项下混合对照品溶液, 分别吸取 2, 6, 10, 14, 18 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇-水溶液 (50:50, V/V) 定容, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 以各成分的质量浓度 (X , mg/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程。结果见表 2。

表 2 线性关系考察结果 ($n = 5$)

Tab. 2 Results of linear relationship test ($n = 5$)

成分	回归方程	r	线性范围 (mg/mL)
梓醇	$Y = 2.999 \times 10^6 X + 9.854 \times 10^2$	0.999 9	0.008 88 ~ 0.079 92
5-HMF	$Y = 8.186 \times 10^6 X - 4.186 \times 10^3$	1.000 0	0.008 80 ~ 0.079 20
地黄苷 D	$Y = 4.355 \times 10^6 X + 4.873 \times 10^2$	1.000 0	0.012 04 ~ 0.108 36
毛蕊花糖苷	$Y = 3.788 \times 10^6 X - 1.480 \times 10^4$	0.998 7	0.006 98 ~ 0.062 82

精密度试验: 取 2.1.2 项下混合对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定 6 次, 记录各对照品的峰面积。结果梓醇、5-HMF、地黄苷 D、毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 0.20%, 0.29%, 0.09%, 0.34% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 精密吸取 2.1.2 项下供试品溶液 20 μ L, 分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果梓醇、5-HMF、地黄苷 D 和毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.40%, 1.60%, 0.46%, 0.62% ($n = 5$), 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取 2.1.2 项下供试品溶液适量, 共 6 份, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果梓醇、5-HMF、地黄苷 D、毛蕊花糖苷含量的 RSD 分别为 0.35%, 0.79%, 0.95%, 1.86% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品 0.1 g, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 取 10 mL, 共 6 份; 分别取梓醇、5-HMF、地黄苷 D、毛蕊花糖苷对照品 0.171, 0.205, 0.333, 0.306 mg, 精密称定, 加入每份供试品溶液中, 超声处理 (功率为 300 W, 频率为 40 kHz) 使完全溶解, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 3。

2.1.4 样品含量测定

取各蒸制时间段的样品适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定 3 次,

表 3 加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 3 Results of recovery test ($n = 6$)

成分	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
梓醇	0.177	0.171	0.348	100.00	99.22	0.71
	0.177	0.171	0.347	99.42		
	0.177	0.171	0.348	100.00		
	0.177	0.171	0.346	98.83		
	0.177	0.171	0.346	98.83		
	0.177	0.171	0.345	98.25		
5-HMF	0.015	0.205	0.219	99.51	100.33	1.36
	0.015	0.205	0.216	98.05		
	0.015	0.205	0.221	100.49		
	0.015	0.205	0.224	101.95		
	0.015	0.205	0.222	100.98		
	0.015	0.205	0.222	100.98		
地黄苷 D	0.380	0.333	0.715	100.60	100.25	0.92
	0.380	0.333	0.716	100.90		
	0.380	0.333	0.713	100.00		
	0.380	0.333	0.715	100.60		
	0.380	0.333	0.708	98.50		
	0.380	0.333	0.716	100.90		
毛蕊花糖苷	0.294	0.306	0.599	99.67	100.00	1.13
	0.294	0.306	0.601	100.33		
	0.294	0.306	0.595	98.37		
	0.294	0.306	0.598	99.35		
	0.294	0.306	0.605	101.63		
	0.294	0.306	0.602	100.65		

记录峰面积, 并计算各蒸制时间段 4 个成分的含量。结果见表 4 和表 5。

表 4 120 $^{\circ}$ C 条件下地黄一次蒸制各成分含量测定结果
(%, $n = 3$)

Tab. 4 Determination results of various ingredients content in *Rehmanniae Radix* first steaming at 120 $^{\circ}$ C (%, $n = 3$)

蒸制时间 (min)	梓醇	5-HMF	地黄苷 D	毛蕊花糖苷
0	0.74	0	0.96	1.06
10	0.46	0	0.95	0.73
15	0.41	0	0.84	0.64
20	0.35	0.03	0.76	0.59
25	0.18	0.09	0.75	0.44
30	0	0.11	0.73	0.30
35	0	0.14	0.69	0.26
40	0	0.37	0.67	0.14

2.2 炮制工艺研究

采用高压炮制熟地黄。1) 高压一次蒸制: 将生怀地黄清洗干净, 置高压锅中, 设蒸制温度为 120 $^{\circ}$ C, 分别蒸制 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min, 蒸制完毕, 取出, 切片,

表5 120℃条件下地黄二次蒸制各成分含量测定结果
(%, n = 3)

Tab. 5 Determination results of various ingredients content in
Rehmanniae Radix second steaming at 120℃(%, n = 3)

蒸制时间(min)	梓醇	5-HMF	地黄苷D	毛蕊花糖苷
0	0.74	0	0.96	1.06
10	0.31	0.10	0.83	0.47
20	0	0.14	0.67	0.17
30	0	0.28	0.61	0.06
40	0	0.41	0.46	0.03

晾干,用于含量测定。2)高压二次蒸制:将生怀地黄清洗干
净,置高压锅中,设蒸制温度为120℃,先蒸制10 min,
然后加入40%的水焖润4 h,再分别蒸制10,20,30,40 min,
蒸制完毕,取出,切片,晾干,用于含量测定。

含量测定结果:高压一次蒸制和高压二次蒸制各
成分含量变化见表4和表5。可见,2次蒸制梓醇、地黄
苷D和毛蕊花糖苷的含量都随蒸制时间的增加而降低,
而5-HMF的含量随蒸制时间的增加而升高。梓醇的含
量在蒸制过程中下降很快,毛蕊花糖苷的含量也下降
较快,而地黄苷D的含量在炮制过程中虽有下降,但下降
幅度不高。一次蒸制40 min时,梓醇含量为0,5-HMF、地
黄苷D和毛蕊花糖苷的含量分别为0.37%,0.67%,
0.14%;二次蒸制20 min时,梓醇含量为0,5-HMF、地
黄苷D和毛蕊花糖苷的含量分别为0.14%,0.67%,
0.17%,均符合2020年版《中国药典(一部)》中熟地黄
含量测定标准。

外观评价:高压一次蒸制40 min时,切制的熟地黄
片仍不符合《中国药典》要求;高压二次蒸制20 min时,
切制的熟地黄均符合要求。

优选的炮制工艺:通过分析4种成分的含量变化
和对炮制品外观评价,优化了熟地黄的炮制工艺,即
高压二次蒸制,将生地黄先蒸制10 min,用水或黄酒焖
润4 h,再蒸制20 min。第1次蒸制的目的是加快水的吸
收、焖润完全。分别考察二次蒸制10,20,30,40 min时
炮制熟地黄成品的外观,结果二次蒸制20 min能完全
满足试验要求,达到了二次蒸制的目的。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

关于地黄中各成分的检测报道中,流动相以乙腈-
水系统梯度洗脱为主,考虑到检测指标成分中梓醇的
极性较强,乙腈-水系统中水占比较大,对于大多数普
通碳十八键合硅胶的色谱柱,高比例的水易导致固定
相流失,缩短了色谱柱的使用寿命。故采用甲醇-水系
统进行梯度洗脱,其中甲醇占15%,能有效保护色谱
柱。通过全波长扫描发现,210 nm波长能满足同时检测

4种指标性成分的要求。

3.2 指标成分选择

参考2015年版和2020年版《中国药典(一部)》中
生地黄和熟地黄的检测指标,选取梓醇、毛蕊花糖苷和
地黄苷D作为检测指标。地黄炮制过程中,大多数成分
含量都呈下降趋势,而5-HMF的含量明显上升,故选
择5-HMF为熟地黄炮制过程变化的标志物。

3.3 药材产地差异影响炮制质量

炮制过程中,发现生地黄若用水或黄酒焖润透,进
一步蒸制所需时间就会缩短,而由于产地差异问题,在
焖润过程中,生地黄内部存在硬芯,导致蒸制时间即使
延长也会出现不合格产品。

3.4 方法评价

二次蒸制可获得合格的熟地黄,通过对熟地黄中
指标性成分的测定与炮制过程中成分含量变化的比
较,优化熟地黄的炮制新工艺在保证产品质量的同时
大大缩短了炮制时间,为熟地黄的工业化生产提供了
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,2020:129-130.
- [2] 张丽萍,李 军,张振凌,等. 熟地黄炮制方法的历史沿革[J].
河南中医学院学报,2005,20(2):69-71.
- [3] 杜 珂,高晓霞,王 锋,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.
- [4] 王 悦,周 巧,张学兰,等. HPLC法同时测定地黄及不同
炮制品中8种成分的含量[J/OL]. 中药材,2021(1):64-68.
[2021-04-02]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=ZY-CA2021012600B&uniplatform=NZKPT&v=5WOF9Ei-WyL9Qxu7LHi0EE06T4Uxc3_QSOwKVjJgjG0d9bufJNl68ls-wbq4wIgmw. DOI:10.13863/j.issn/1001-4454.2021.01.012.
- [5] 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.
- [6] 沈丽琴,杨 晗,李胜华,等. 地黄不同工艺炮制过程中主要活性
成分的变化规律研究[J]. 亚太传统医药,2019,15(10):75-79.
- [7] 王 勃,张晓燕,吕辰子,等. 多指标-响应曲面法优选酒炖
熟地黄最佳炮制工艺[J]. 中草药,2019,50(9):2065-2073.
- [8] 单国顺,赵启苗,项欣欣,等. 酒炖法制熟地黄炮制工艺优
化研究[J]. 时珍国医国药,2019,30(6):1377-1380.
- [9] 张振凌,吴若男,于文娜,等. 生地黄产地加工炮制一体化
工艺研究[J]. 中草药,2018,49(20):4767-4772.
- [10] 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.
- [11] 朱逸超,任 娟,仇 雪,等. 酒炖地黄炮制过程中4种活性成
分含量变化[J]. 中国中医药信息杂志,2020,27(2):48-52.

(收稿日期:2021-06-17;修回日期:2021-11-21)