

基于“色如漆,甘如饴”的砂仁陈皮制熟地黄炮制过程质量评价

陈青垚¹, 雷星¹, 高亚珍¹, 徐杰¹, 王梁凤¹, 杨明¹, 王小平^{2*}, 王芳^{1*}

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 漳州卫生职业学院, 福建漳州 363000)

[摘要] 目的:研究砂仁陈皮制熟地黄炮制过程样品表现颜色、综合甜度与苷类成分含量变化的关联性,为揭示地黄炮制原理奠定基础。方法:采用全自动色差计测量熟地黄样品粉末颜色;采用高效液相色谱法测定不同加热时间点样品中14个活性成分的含量(5-羟甲基糠醛、梓醇、益母草苷、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、橙皮苷、地黄苷D共7个苷类成分和D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖共7个糖类成分),流动相乙腈-水梯度洗脱。以糖类成分甜度计算样品综合甜度变化,运用SPSS 21.0软件对砂仁陈皮制熟地黄炮制样品色度值、综合甜度与苷类成分含量进行关联分析,以三角形面积法建立熟地黄炮制样品质量综合评价指数。结果:在炮制过程中,样品粉末色度值增加,样品表现颜色变深。含量测定结果显示,随加热时间增加,熟地黄样品的苷类成分含量减少,单糖成分含量增加,样品综合甜度增加。关联性分析结果表明色度值、综合甜度与环烯醚萜苷含量呈显著负相关($P<0.01$),色度值与呋喃醛衍生物含量、苯乙醇苷含量、黄酮类含量,以及综合甜度与呋喃醛衍生物含量、苯乙醇苷含量均呈显著正相关($P<0.01$),综合甜度与黄酮类含量呈明显正相关($P<0.05$)。炮制至52 h时样品综合评价指数最高,达0.99。结论:熟地黄样品粉末色度值聚类分析总体趋势与直观区分基本一致,结合样品粉末色度值、综合甜度与苷类成分含量3个指标可对砂仁陈皮制熟地黄进行综合质量评价。

[关键词] 地黄; 炮制; 色度值; 甜度; 特征图谱; 高效液相色谱法(HPLC); 相关性分析

[中图分类号] R22;R28;R943.1;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0154-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211859 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210819.1512.003.html>

[网络出版日期] 2021-08-20 15:43

Quality Evaluation in Processing of *Rehmanniae Radix Praeparata* Processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium* Based on "Color as Paint, Sweet as Maltose"

CHEN Qing-yao¹, LEI Xing¹, GAO Ya-zhen¹, XU Jie¹, WANG Liang-feng¹,

YANG Ming¹, WANG Xiao-ping^{2*}, WANG Fang^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education,

Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the correlation between the apparent color, comprehensive sweetness and the content of main components in the preparation of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*, so as to lay a foundation for revealing the processing principle of *Rehmanniae Radix*. **Method:** The color of *Rehmanniae Radix Praeparata* sample powder was measured by automatic colorimeter, the contents of 14 active components in samples with different heating time points were

[收稿日期] 20210521(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81960714);福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目(闽教科[2017]52号);漳州卫生职业学院科技创新团队项目(kjcx-5);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC21S52)

[第一作者] 陈青垚,在读硕士,从事中药新剂型研究,E-mail:1793224314@qq.com

[通信作者] *王小平,博士,教授,从事中药炮制及中药新制剂研究,Tel:0596-2559522,E-mail:jxrcwpxp@163.com;

*王芳,博士,副教授,从事中药制剂学研究,Tel:0791-87118645,E-mail:cat689apple@163.com

determined by high performance liquid chromatography, including 7 glycosides of catalpol, rehmannia glycoside D, leonurine glycoside, 5-hydroxymethyl furfural, verbascoside, isoacteoside and hesperidin, and 7 carbohydrates of *D*-fructose, glucose, sucrose, melibiose, raffinose, manninotriose and stachyose), and the mobile phase was acetonitrile-water for gradient elution. The comprehensive sweetness difference of sample was calculated by the sweetness of saccharides, SPSS 21.0 was used to analyze the relationship between the color, comprehensive sweetness and the main component contents in the processing of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*, the quality comprehensive evaluation index of *Rehmanniae Radix Praeparata* by triangular area method was established. **Result:** During the processing, the color value of the powder increased, and the apparent color of the sample became darker. the content determination results showed that the content of glycosides decreased, monosaccharides and comprehensive sweetness increased with the increase of heating time. The results of correlation analysis showed that chromaticity value, comprehensive sweetness were significant negatively correlated with the content of iridoid glycosides ($P<0.01$), the chromaticity value was significant positively correlated with the contents of furaldehyde derivatives, phenylethanoid glycosides, flavonoids and comprehensive sweetness was significant positively correlated with the contents of furaldehyde derivatives, phenylethanoid glycosides ($P<0.01$), and the comprehensive sweetness was positively correlated with the content of flavonoids ($P<0.05$). After 52 h of processing, the comprehensive evaluation index of samples reached 0.99. **Conclusion:** The overall trend of cluster analysis of powder chromaticity value of *Rehmanniae Radix Praeparata* is basically consistent with that of naked eyes, the comprehensive quality evaluation of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium* can be carried out by combining the three indexes of powder chromaticity value, comprehensive sweetness and glycosides content.

[Keywords] *Rehmanniae Radix*; processing; chromaticity; sweetness; characteristic spectrum; high performance liquid chromatography (HPLC); correlation analysis

熟地黄是由玄参科植物地黄块根经酒炖或蒸制而成,味甘,性微温,功效补血滋阴、益精填髓,临床应用广泛。然而,熟地黄质厚味浓,滋腻碍胃,易助湿生痰。《医学正传》记载:“熟地补血,而痰饮多者服之恐泥膈”;《顾松园医镜》云:“熟者性滞,若痰多气郁之人,能窒碍胸膈”。现代临床研究亦表明,熟地黄使用后常见胃纳欠佳、腹胀、便溏等现象,对脾虚湿痰盛者尤为不利,这在一定程度上限制了其临床应用^[1-3]。古代医家极其重视“疏地黄之滞”,在使用时或配伍芳香行气之药,如《本草通玄》记载:“佐以砂(仁)沉(香)纳气归肾,疏地黄之滞”,或选用特殊方法炮制的熟地黄,如砂仁制、砂仁沉香制、砂仁陈皮制等,其中砂仁陈皮制地黄是建昌帮传统特色品种,具有“气味纯真而独厚,补血而不凝滞”的特点^[4]。熟地黄炮制工艺复杂,但行业标准不全面,2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)对熟地黄的炮制程度仅规定质柔软而带韧性,不易折断,断面乌黑色,有光泽;气微,味甜^[5]。《本草图经》记载:“其地黄当光黑如漆,味甘如饴糖”^[6]。目前,多数饮片厂仍按传统经验生产,熟地

黄炮制工艺不太规范,进而导致产品质量参差不齐,临床疗效难以得到保障。

近年来,色差分析技术在中药研究领域应用越来越广泛,实现了对中药饮片及其粉末颜色的数字化分析,为中药质量评价提供了新型技术支持^[7-9]。熟地黄化学成分主要包括环烯醚萜及其苷类、糖及其苷类、氨基酸及微量元素等^[10-11]。张晓亚等^[12]采用糖组学与代谢组学分析了熟地黄中化学成分差异,但并未结合样品甜度、色泽对其质量进行评价。熟地黄传统炮制要求是“黑如漆,甜如饴”,且研究发现地黄炮制过程样品表观颜色变深、甜度增加,然而,目前熟地黄样品色泽、甜度变化与成分含量变化的内在关联尚不明确。基于此,本实验拟以不同加热时间点的熟地黄样品为研究对象,利用全自动色差计对样品表观颜色进行检测,采用高效液相色谱法(HPLC)测定环烯醚萜苷、呋喃醛衍生物、苯乙醇苷类、黄酮类与糖类等活性成分的含量^[13],对样品表观颜色、综合甜度(BQ)与苷类成分含量变化进行关联性分析,建立质量综合评价指数(QI)^[14],为基于“色如漆,甘如饴”的砂仁陈皮制熟地黄炮制

过程工艺制定提供依据。

1 材料

LC-20ADXR型高效液相色谱仪[日本岛津,包括ELSD-LT II低温型蒸发光散射检测器(ELSD)], ADCI系列全自动色差计(北京辰泰克仪器技术有限公司),明澈-D24UV型纯水/超纯水一体化系统(德国密理博公司)。生地黄(江西江中中药饮片有限公司,批号190910),砂仁(亳州精草中药饮片有限公司,批号2009134),陈皮(安徽益生源中药饮片科技有限公司,批号200801-2),以上饮片经江西中医药大学葛菲教授鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的干燥块根,姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* 的干燥成熟果实,芸香科植物橘 *Citrus reticulata* 的干燥成熟果皮。益母草苷,橙皮苷,梓醇,地黄苷D,毛蕊花糖苷,5-羟甲基糠醛,异类叶升麻苷,蔗糖, D-果糖,葡萄糖对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-20052601, MUST-20031701, MUST-14122411, MUST-20101311, MUST-13122711, MUST-20051202, MUST-20103104, MUST-13122601,

MUST-13072803, MUST-18032905,纯度均 $\geq 98\%$),水苏糖对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号PS020341,纯度 $\geq 98\%$),棉子糖、甘露三糖对照品[月旭科技(上海)股份有限公司,批号分别为TA0423CA14, L29M6Y1,纯度均 $\geq 98\%$],蜜二糖对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号505A023,纯度 $\geq 98\%$),黄酒(会稽山绍兴酒股份有限公司,食品级,批号20170901);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 样品的制备 参照2008年版《江西省中药饮片炮制规范》,取大小均一 生地黄 1.5 kg,加水浸透 24 h,取样(100 g,编号 S1),其余放入药罐中,微火 24 h,每隔 6 h 取样 1 次,每次 100 g,编号 S2~S5;加入砂仁、陈皮各 15 g,拌匀后继续 24 h,每隔 6 h 取样 1 次,每次 100 g,编号 S6~S9,取出,干燥至半干;加黄酒 120 g 拌匀,吸尽,蒸 6 h,每隔 2 h 取样 1 次,每次 100 g,编号 S10~S12,得砂仁陈皮制熟地黄样品 S1~S12,加热过程各样品的断面和粉末(过四号筛)情况见图 1。

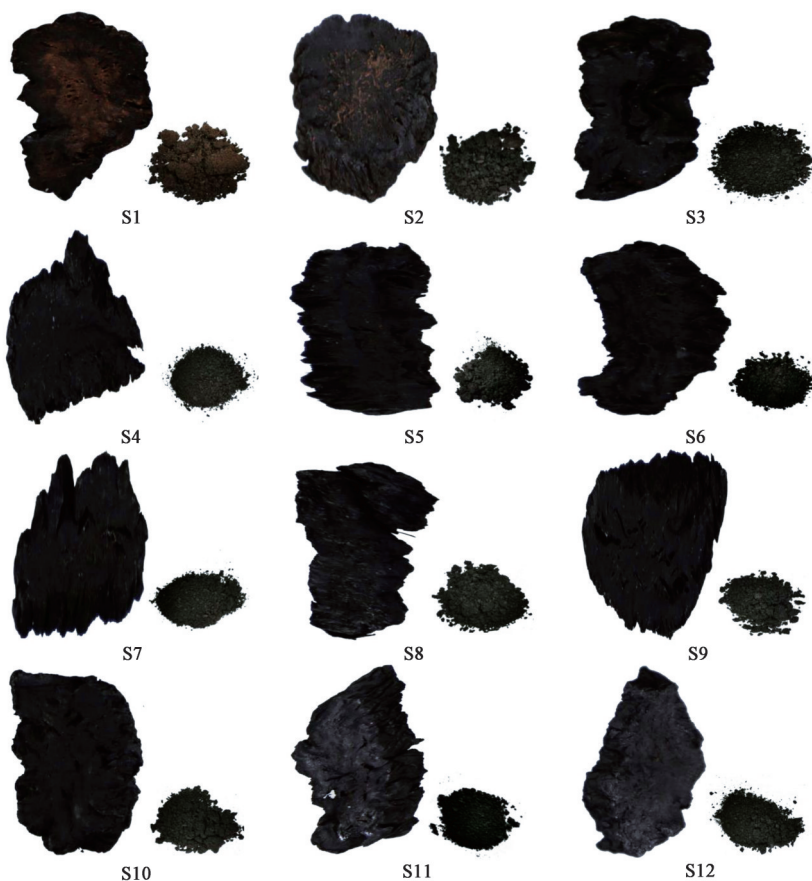


图1 砂仁陈皮制熟地黄饮片和粉末

Fig. 1 Decoction pieces and powder of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*

2.2 样品色度值测定 基于CIE1976 $L^*a^*b^*$ 均匀色空间系统^[15],将2.1项下样品S1~S12的粉末依次置于样品盒内,采用恒压粉体制样器将粉末制成平整的平面,利用全自动色差计测量探头依次进行测量,记录样品颜色的 L^*, a^*, b^* ,其中 L^* 代表明亮度, a^* 代表红-绿色轴, b^* 代表黄-蓝色轴,每份粉末测定3次,取平均值,计算综合色差值(ΔE^*),公式为 $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$,见表1。结果发现相较于样品S1,砂仁陈皮制熟地黄在炮制过程中,粉末颜色 L^*, a^*, b^* 均呈下降趋势,表明样品颜色变深。并且当 $\Delta E^* > 1$ 时^[15],样品色差可被肉眼识别,以加热时间为横坐标, ΔE^* 为纵坐标建立拟合曲线,拟合方程为 $Y = (1.71 \times 10^{-4} - 3.31 \times 10^{-7} X^2 + 1.027 \times 10^{-4} X^4) / (1 - 1.46 \times 10^{-7} X^2 + 8.48 \times 10^{-3} X^4 - 1.247 X^6)$ ($r = 0.996$),即当加热时间为52.92 h时, ΔE^* 达最大值。将12个样品粉末颜色量化结果导入SIMCA 14.1软件进行聚类分析(HCA),见图2。结果发现砂仁陈皮制熟地黄的炮制过程可分为4个阶段,即I期样品S1,II期样品S2~S5,III期样品S6~S9,IV期样品S10~S12;进一步采用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)模型分析,结果发现在地黄炮制过程中,色度值变化差异明显,且样品色度值差异与HCA结果相一致,见图3。

表1 砂仁陈皮制熟地黄样品的色度值变化

Table 1 Change of chroma value of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*

样品	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	颜色
S1	12.96	5.56	2.07	0.00	棕色
S2	13.64	3.89	1.25	1.98	棕褐
S3	13.65	3.26	1.38	2.50	黑褐
S4	13.44	3.80	0.97	2.13	黑褐
S5	12.83	3.74	0.81	2.22	黑褐
S6	11.90	2.59	0.69	3.44	乌黑
S7	11.74	2.00	0.76	3.98	乌黑
S8	10.82	1.50	0.78	4.77	乌黑
S9	10.53	1.24	0.52	5.19	乌黑
S10	9.97	2.08	-1.20	5.63	乌黑
S11	8.71	2.57	-2.28	6.78	亮黑
S12	9.07	2.36	-1.73	6.31	亮黑

2.3 苷类成分的含量测定

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取梓醇,地黄苷D,益母草苷,5-羟甲基糠醛,毛蕊花糖苷,异类叶升麻

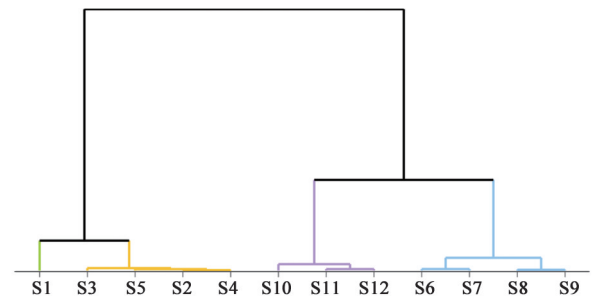


图2 砂仁陈皮制熟地黄炮制过程样品颜色的HCA

Fig. 2 HCA of color of samples in process of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*

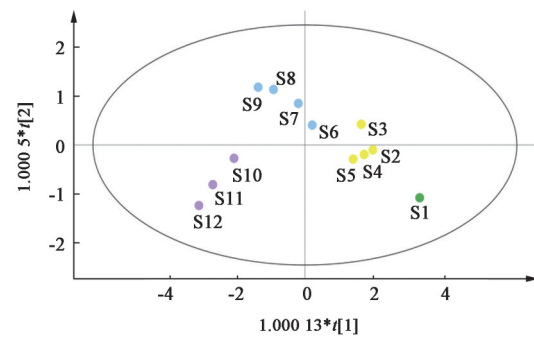


图3 砂仁陈皮制熟地黄炮制过程样品颜色的OPLS-DA

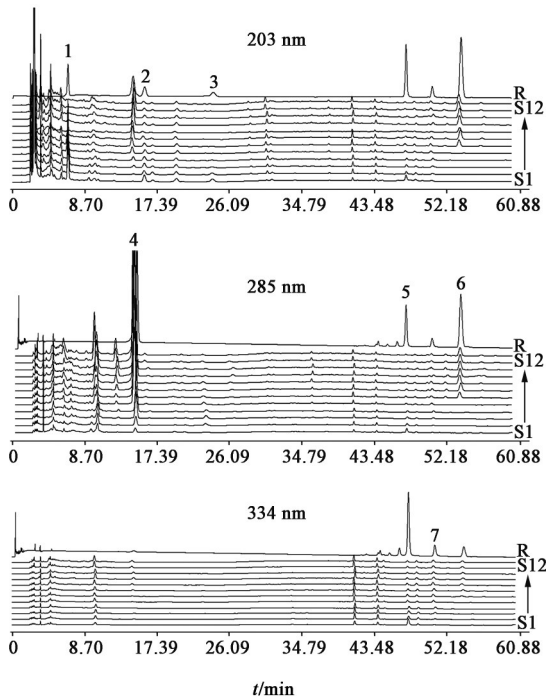
Fig. 3 OPLS-DA of color of samples in process of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*

苷和橙皮苷适量,加甲醇使溶解,制成质量浓度分别为594.40, 1 320.00, 720.00, 36.80, 124.16, 40.00, 422.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称定各炮制样品0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称重,室温下浸泡12 h,超声1.5 h(250 W, 40 kHz),冷却至室温,称重,加甲醇补足减失的质量,取续滤液25 mL,蒸干,残渣用15%甲醇使溶解,加15%甲醇定容至5 mL量瓶中,临用前过0.45 μm 微孔滤膜,即得^[16]。

2.3.3 色谱条件 Inert Sustain C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相选择乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~20 min, 3%~4%A; 20~40 min, 4%~20%A; 40~60 min, 20%~23%A),进样量10 μL ,柱温40 $^{\circ}\text{C}$,流速1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;梓醇、地黄苷D和益母草苷检测波长为203 nm,5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷检测波长为285 nm,异类叶升麻苷检测波长为334 nm。见图4。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取2.3.1项下混合对照品溶液0.06, 0.5, 1, 2, 5 mL,分别置于5 mL量瓶中,加甲醇定容,按2.3.3项下色谱条件测定,以质量



1. 梓醇; 2. 地黄苷 D; 3. 益母草苷; 4. 5-羟甲基糠醛; 5. 毛蕊花糖苷; 6. 橙皮苷; 7. 异类叶升麻苷; R. 混合对照品

图4 砂仁陈皮制熟地黄样品中苷类成分的HPLC

Fig. 4 HPLC of glycosides in *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*

浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得梓醇,地黄苷 D,益母草苷,5-羟甲基糠醛,毛蕊花糖苷,异类叶升麻苷和橙皮苷回归方程分别为 $Y=2.342 \times 10^3 X+85\ 880$ ($r=0.999\ 4$), $Y=3.757 \times 10^5 X+3\ 797.5$ ($r=0.999\ 8$), $Y=2.579 \times 10^5 X-225.08$ ($r=0.999\ 9$), $Y=2.608 \times 10^6 X-3\ 154$ ($r=0.999\ 3$), $Y=3.905 \times 10^4 X+10\ 821$ ($r=0.999\ 1$), $Y=2.071 \times 10^5 X+19\ 114$ ($r=0.999\ 9$), $Y=5.186 \times 10^6 X-261\ 524$ ($r=0.999\ 6$), 线性范围依次为 7.13~594.40, 15.84~1 320.00, 8.64~720.00, 0.44~36.80, 1.49~124.16, 0.48~40.00, 5.06~422.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.5 精密度试验 取 2.3.1 项下混合对照品溶液适量,按 2.3.3 项下条件连续进样 6 次,计算梓醇,地黄苷 D,益母草苷,5-羟甲基糠醛,毛蕊花糖苷,异类叶升麻苷和橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 1.0%, 0.4%, 0.8%, 1.0%, 0.8%, 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 称取样品 S6 适量,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.3.3 项下条件测定,计算梓醇,地黄苷 D,益母草苷,5-羟甲基糠醛,毛蕊花糖苷,异类叶升麻苷和橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 1.0%, 0.9%, 1.5%, 1.1%, 0.9%, 1.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性

良好。

2.3.7 重复性试验 称取样品 S6 共 6 份,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.3 项下色谱条件测定,计算梓醇,地黄苷 D,益母草苷,5-羟甲基糠醛,毛蕊花糖苷,异类叶升麻苷和橙皮苷平均质量分数分别为 0.37, 0.65, 0.33, 0.24, 0.10, 0.44, 0.20 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.5%, 0.9%, 1.0%, 1.0%, 1.0%, 0.9%, 1.5%, 表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收试验 精密称取 6 份样品 S6,每份约 0.2 g,分别按已知指标成分含量的 100% 加入混合对照品溶液 1 mL(梓醇,地黄苷 D,益母草苷,5-羟甲基糠醛,毛蕊花糖苷,异类叶升麻苷和橙皮苷质量分别 0.073, 0.133, 0.065, 0.051, 0.022, 0.091, 0.036 mg),按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.3 项下色谱条件测定,计算梓醇,地黄苷 D,益母草苷,5-羟甲基糠醛,毛蕊花糖苷,异类叶升麻苷和橙皮苷加样回收率分别为 102.30%, 99.54%, 101.38%, 99.70%, 99.41%, 101.92%, 101.50%, RSD 分别为 1.5%, 1.0%, 1.8%, 1.8%, 1.5%, 0.9%, 1.8%。

2.3.9 样品测定 取各炮制过程样品适量,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.3 项下条件测定,计算各指标成分含量,见表 2。以样品加热时间为横坐标,成分总量为纵坐标,分别对环烯醚萜苷类(梓醇、地黄苷 D 和益母草苷),呋喃醛衍生物(5-羟甲基糠醛),苯乙醇苷类(毛蕊花糖苷和异类叶升麻苷),黄酮类(橙皮苷)总量进行拟合,得上述成分的拟合方程分别为 $Y=0.003X^{3.5}-0.084X^3+1.091X^{2.5}-7.376X^2+27.506X^{1.5}-53.551X+41.187X^{0.5}+7.310$ ($r=0.999\ 8$), $Y=-0.000\ 2X^3+0.004X^{2.5}-0.029X^2+0.092X^{1.5}-0.108X+0.018X^{0.5}+0.010$ ($r=0.999\ 4$), $Y=(0.063X-0.323X^{0.5}+0.491)/(0.108X-0.582X^{0.5}+1)$ ($r=0.962\ 8$), $Y=(4.27X^3-0.001X^2+0.002X-0.003)/(4.09X^3+0.001X^2-0.07X+1)$ ($r=0.999\ 3$),说明环烯醚萜苷类、呋喃醛衍生物、苯乙醇苷类与黄酮类分别约在 52, 50, 52, 42 h 含量达到平台期。

2.4 糖类成分的含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品适量,加水使溶解,制成质量浓度分别为 34.442, 15.181, 15.742, 40.962, 18.632, 5.678, 34.357 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 精密称取 2.1 项下熟地黄样品 1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇 50 mL,超声 45 min(250 W, 40 kHz),冷却至室

表2 砂仁陈皮制熟地黄样品中苷类成分的质量分数($\bar{x}\pm s, n=3$)

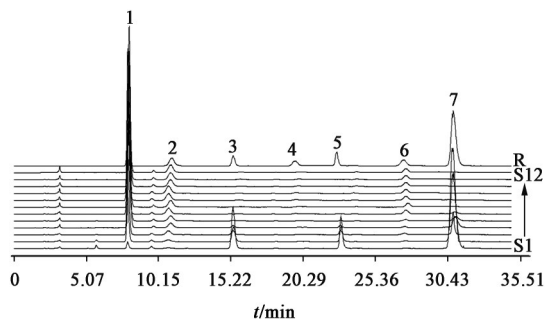
Table 2 Contents of glycosides in samples of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品	梓醇	地黄苷D	益母草苷	5-羟甲基糠醛	毛蕊花糖苷	异类叶升麻苷	橙皮苷
S1	2.87±0.11	1.57±0.07	2.87±0.15	0.01±0.01	0.44±0.05	0.05±0.01	-
S2	1.91±0.10	1.29±0.09	1.80±0.08	0.02±0.01	0.26±0.02	0.09±0.05	-
S3	1.00±0.06	0.97±0.05	1.00±0.05	0.06±0.03	0.21±0.02	0.25±0.01	-
S4	0.79±0.05	0.84±0.08	0.70±0.06	0.11±0.05	0.18±0.01	0.40±0.02	-
S5	0.54±0.04	0.76±0.06	0.39±0.02	0.19±0.02	0.13±0.01	0.41±0.01	-
S6	0.36±0.03	0.67±0.05	0.32±0.02	0.25±0.02	0.11±0.01	0.45±0.01	0.19±0.01
S7	0.26±0.03	0.58±0.05	0.20±0.02	0.39±0.03	0.11±0.01	0.50±0.02	0.23±0.02
S8	0.17±0.01	0.55±0.04	0.20±0.01	0.58±0.04	0.10±0.01	0.52±0.02	0.23±0.02
S9	0.00±0.00	0.44±0.03	0.19±0.01	0.65±0.04	0.06±0.01	0.53±0.02	0.23±0.03
S10	0.00±0.00	0.40±0.01	0.19±0.01	0.68±0.04	0.07±0.01	0.51±0.02	0.23±0.03
S11	0.00±0.00	0.39±0.02	0.18±0.01	0.73±0.03	0.07±0.01	0.52±0.01	0.23±0.03
S12	0.00±0.00	0.38±0.02	0.18±0.01	0.72±0.04	0.06±0.01	0.57±0.02	0.22±0.02

注：“-”表示响应值小无法积分或无(表3同)。

温,称定质量,加60%甲醇补足减失质量,取续滤液2 mL,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得^[17]。

2.4.3 色谱条件 Shodex Asahipak NH₂P-50 4E 色谱柱,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min, 75%A; 10~20 min, 75%~65%A; 20~35 min, 65%A),进样量5 μL,柱温40 ℃,流速1 mL·min⁻¹; ELSD 参数为雾化温度40 ℃,氮气压力350 kPa。见图5。



1. D-果糖; 2. 葡萄糖; 3. 蔗糖; 4. 蜜二糖; 5. 棉子糖; 6. 甘露三糖; 7. 水苏糖; R. 混合对照品

图5 砂仁陈皮制熟地黄样品中糖类成分的HPLC
Fig. 5 HPLC of carbohydrates in *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*

2.4.4 线性关系考察 精密吸取2.4.1项下混合对照品溶液0.04, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mL, 分别置于5 mL量瓶中,加甲醇定容,按2.4.3项下色谱条件测定,以对照品峰面积的常用对数为横坐标,进样量的常用对数为纵坐标,采用最小二乘法进行线性回归,得D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品回归方程分别为 $Y=0.744X-3.285$

($r=0.999\ 6$), $Y=0.636X-2.313$ ($r=0.999\ 4$), $Y=0.492X-1.815$ ($r=0.999\ 5$), $Y=0.437X-1.003$ ($r=0.999\ 7$), $Y=0.566X-2.195$ ($r=0.999\ 9$), $Y=0.595X-2.492$ ($r=0.999\ 5$), $Y=0.850X-4.050$ ($r=0.999\ 7$), 线性范围依次为1.378~34.442, 0.607~15.181, 0.630~15.742, 1.638~40.962, 0.745~18.632, 0.227~5.678, 1.374~34.357 μg。

2.4.5 精密度试验 取2.4.1项下混合对照品溶液,按2.4.3项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积,计算D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖峰面积的RSD分别为0.5%, 0.8%, 0.6%, 0.8%, 0.7%, 1.1%, 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 精密称取样品S3适量,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0, 2, 4, 8, 12, 24 h按2.4.3项下色谱条件测定,计算D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖峰面积的RSD分别为0.6%, 0.9%, 0.9%, 0.9%, 1.3%, 1.0%, 1.8%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.7 重复性试验 精密称取样品S3共6份,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.3项下条件测定,计算D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖平均质量分数分别为143.62, 63.90, 35.83, 61.05, 31.11, 32.30, 62.44 mg·g⁻¹, RSD分别为1.4%, 0.9%, 1.1%, 0.9%, 1.1%, 0.9%, 1.5%, 表明该方法重复性良好。

2.4.8 加样回收试验 精密称取6份样品S3,每份约0.2 g,分别按已知含量的100%加入混合对照品

溶液 1 mL(D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖质量分别 29.456, 13.846, 7.223, 12.317, 6.245, 6.452, 12.270 mg), 按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.3 项下色谱条件测定, 计算 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖加样回收率分别为 99.14%, 98.33%, 101.25%, 99.34%, 99.56%, 100.63%, 101.82%, RSD 分别为 1.4%, 1.0%, 1.0%, 2.0%, 2.0%, 2.0%, 1.3%。

2.4.9 样品测定 取各炮制过程样品适量, 按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.3 项下色谱条件测定, 计算各指标成分含量, 见表 3。为研究样品甜度

的差异性, 鉴于砂仁陈皮制熟地黄中糖类种类较多, 根据蔗糖甜度 1.00, 采用权重算法得到炮制过程样品的 BQ, 计算公式为 $BQ = (T_a \times A + T_b \times B + T_c \times C + T_d \times D + T_e \times E + T_f \times F + T_g \times G) / (T_a + T_b + T_c + T_d + T_e + T_f + T_g)$, 式中 A~G 分别为 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖的含量; $T_a, T_b, T_c, T_d, T_e, T_f, T_g$ 为上述糖类成分的甜度值, 分别为 1.75, 0.7, 1, 0.33, 0.26, 0.1, 0.22^[18-19], 见表 3。以样品加热时间为横坐标, BQ 为纵坐标, 得拟合方程 $Y = 0.9 \times 10^{-3} X^2 - 0.098 X^2 + 3.793 X + 52.317 (r = 0.990)$, 说明随着加热时间加长, 甜度值增加, 且 52~54 h 增加幅度趋于平缓。

表 3 熟地黄炮制过程样品中糖类成分的质量分数(n=3)

Table 3 Contents of carbohydrates in Rehmanniae Radix Praeparata processed with Amomi Fructus and Citri Reticulatae Pericarpium (n=3)

样品	D-果糖($\bar{x} \pm s$) /mg·g ⁻¹	葡萄糖($\bar{x} \pm s$) /mg·g ⁻¹	蔗糖($\bar{x} \pm s$) /mg·g ⁻¹	蜜二糖($\bar{x} \pm s$) /mg·g ⁻¹	棉子糖($\bar{x} \pm s$) /mg·g ⁻¹	甘露三糖($\bar{x} \pm s$) /mg·g ⁻¹	水苏糖($\bar{x} \pm s$) /mg·g ⁻¹	BQ
S1	18.54±0.61	28.92±0.85	108.25±2.15	-	94.60±2.05	-	235.93±4.25	54.46
S2	83.80±1.93	41.57±0.75	63.27±1.88	-	62.07±0.87	16.01±0.44	162.37±3.53	67.08
S3	142.18±2.65	64.23±0.83	36.12±0.81	61.58±1.69	31.23±0.64	32.26±0.71	61.35±0.77	86.02
S4	172.07±3.17	78.87±1.61	22.66±0.71	64.90±1.74	21.44±0.68	37.27±0.83	34.27±0.86	95.70
S5	190.18±4.23	86.59±2.01	12.79±0.46	76.95±1.86	13.40±0.39	42.10±0.80	14.97±0.45	101.52
S6	185.18±4.35	85.44±1.95	8.12±0.23	75.07±1.97	7.90±0.26	42.37±0.76	6.98±0.25	97.38
S7	195.42±4.21	103.75±2.35	-	82.43±2.31	-	42.77±0.71	1.97±0.06	102.41
S8	197.77±4.24	96.64±1.59	-	79.57±2.16	-	42.80±0.80	-	101.90
S9	199.23±4.65	100.24±2.34	-	74.31±1.59	-	48.97±0.99	-	102.81
S10	198.05±4.36	105.19±2.13	-	97.20±1.49	-	50.30±1.21	-	104.89
S11	203.26±4.85	105.49±2.06	-	88.69±1.37	-	52.47±0.95	-	106.44
S12	197.13±4.36	113.72±2.65	-	88.94±1.35	-	55.62±0.79	-	105.39

2.5 关联性分析 将样品 S1~S12 的色度值, BQ, 环烯醚萜苷总量, 呋喃醛衍生物总量, 苯乙醇苷总量和黄酮类总量输入 SPSS 21.0 软件进行 Pearson 相关性分析, 结果表明色度值, BQ 与环烯醚萜苷总量呈显著负相关($P < 0.01$); 色度值与呋喃醛衍生物总量、苯乙醇苷总量、黄酮类总量, 以及 BQ 与呋喃醛衍生物总量、苯乙醇苷总量呈显著正相关($P < 0.01$); BQ 与黄酮类总量呈正相关($P < 0.05$)。说明炮制过程中色度值, BQ 与苷类成分的变化紧密联系。

2.6 熟地黄炮制过程样品的 QI 建立^[20] 采用三角形面积法, 分别以色度值(AQ), BQ 及内在质量(CQ)3 个方面建立 QI, 其中 CQ 以测定苷类成分变化趋势评价为主, $DQ = 1 - DQ_d / DQ_{d \max} + DQ_c / DQ_{c \max} + DQ_f / DQ_{f \max} + DQ_g / DQ_{g \max}$, 式中 $DQ_{d, c, f, g}$ 分别代表不同熟地黄样品中环烯醚萜苷类、呋喃醛衍生物、苯乙醇苷类、黄酮类的含量, $DQ_{d, c, f, g \max}$ 依次表示该类成

分含量的最大值; 将每个方面数据进行归一化处理, 消除量纲分别为 $AQ = AQ_i / AQ_{\max}$, $BQ = BQ_i / BQ_{\max}$, $CQ = CQ_i / CQ_{\max}$, 式中 i 代表炮制过程样品; 进行集成处理, 计算公式为 $a = (AQ^2 + BQ^2)^{1/2}$, $b = (AQ^2 + CQ^2)^{1/2}$, $c = (BQ^2 + CQ^2)^{1/2}$, $p = (a + b + c) / 2$, $S_i = [p \times (p - a) \times (p - b) \times (p - c)]^{1/2}$, $QI = S_i / 0.866$, 式中 a, b, c 为三角形的三边, p 为全周长的一半, S_i 为炮制过程样品三角形面积, 参数 0.866 为各维度为 1 时最大的三角形面积, 熟地黄炮制过程 QI 见表 4, 结果发现当炮制至 52 h 时, QI 为 0.99。

3 讨论

本文采用梯度洗脱测定砂仁陈皮制熟地黄样品中 14 个活性成分, 分离效果良好; 苷类含量测定时选择乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相时, 目标成分色谱峰分离效果均良好, 故选用乙腈-水为流动相, 考虑到苷类成分

表4 砂仁陈皮制熟地黄样品的QI

Table 4 QI of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium*

样品	DQ _d	DQ _e	DQ _f	DQ _g	AQ	BQ	CQ	QI
S1	7.31	0.13	0.49	0.00	0.00	0.51	0.20	0.06
S2	5.00	0.29	0.36	0.00	0.29	0.63	0.24	0.14
S3	2.97	0.85	0.46	0.00	0.37	0.81	0.37	0.25
S4	2.33	1.46	0.58	0.00	0.31	0.90	0.45	0.30
S5	1.70	2.46	0.55	0.00	0.33	0.95	0.49	0.34
S6	1.34	3.31	0.56	0.19	0.51	0.91	0.74	0.52
S7	1.04	5.11	0.61	0.23	0.59	0.96	0.87	0.65
S8	0.92	7.55	0.61	0.23	0.70	0.96	0.94	0.75
S9	0.63	8.49	0.58	0.23	0.77	0.97	0.96	0.81
S10	0.59	8.87	0.57	0.23	0.83	0.99	0.97	0.86
S11	0.57	9.52	0.59	0.23	1.00	1.00	0.99	0.99
S12	0.56	9.35	0.63	0.22	0.93	0.99	1.00	0.95

的检测波长差别较大,参考2020年版《中国药典》,选择3个检测波长进行测定;糖类含量测定时主要参考文献[17],优化梯度洗脱程序,确定糖类成分含量测定的色谱条件。

由熟地黄炮制过程饮片和粉末的表观颜色可知,样品S1带有明显棕色,样品S2由棕色转棕褐色,随加热时间增加,样品由黑褐色变为亮黑色,部分样品表观颜色直观难以明确区分;而借助色度值HCA和OPLS-DA可知,砂仁陈皮制熟地黄炮制过程中可分为4个阶段,总体趋势与直观区分基本一致,表明炮制前后地黄表观颜色出现明显的变化,且引起色度值空间分布上的差异,而S6,S12分别为加入砂仁、陈皮与加入黄酒后取得的样品,表明砂仁、陈皮、黄酒影响了砂仁陈皮制熟地黄炮制过程颜色的变化,自南北朝起,就常以黄酒、砂仁等辅料加工地黄,使其性更温,助滋补而无油腻之虞^[21],说明地黄炮制过程中加入砂仁、陈皮、黄酒具有一定的合理性^[22]。

含量测定结果发现,成分含量呈一定增加(减少)趋势,主要过程涉及苷类分解为苷元和糖、低聚糖分解为寡糖、美拉德反应等,其中含量增加的成分有异类叶升麻苷,5-羟甲基糠醛,橙皮苷,D-果糖,葡萄糖,蜜二糖,甘露三糖;含量下降的有梓醇、益母草苷、毛蕊花糖苷、蔗糖、棉子糖、水苏糖、地黄苷D,与文献报道相一致^[23];对成分含量变化趋势进行拟合发现,IV期样品(50~54 h)中环烯醚萜苷类、呋喃醛衍生物、苯乙醇苷类、黄酮类、糖类含量波动变化小,即存在最佳炮制终点。

通过测量熟地黄炮制过程样品表观颜色可知,砂仁陈皮制熟地黄随着加热时间的增加,ΔE*逐渐升高,炮制后期符合传统性状描述“表面乌黑”^[24]。样品表观颜色变黑,很大程度与5-羟甲基糠醛、葡萄糖和D-果糖含量增加,梓醇、地黄苷D和益母草苷含量下降有关。文献报道显示,熟地黄炮制过程样品色泽由棕褐色转为亮黑色,与其含糖类、糠醛或含有活泼羟基的化合物等有关^[25];对色度值变化趋势进行拟合可知,加热时间达到52.92 h时,ΔE*达到最大值。在炮制过程中,苷类及糖类成分的分解导致葡萄糖、果糖含量大幅度增加^[17],以蔗糖甜度为基础,进行权重算法,可知样品BQ逐渐增加,体现“甘如饴”特征,且加热至52~54 h,甜度增加幅度趋于平缓,正如张景岳所云:“形体之本在精血,熟地至静之性,以至甘至厚之味,实精血形成中第一纯厚之药”^[26]。

由于中药的复杂物质属性,其品质可用颜色、气味、内在活性成分等进行表征。目前,指标性成分的含量测定是中药评价的主要途径,然而不同评价方法的评价结果有时并不一致,甚至相互矛盾,不利于从整体上认识中药的整体品质,而QI为中药提供了客观的、可量化的综合评价体系^[27]。本文研究了砂仁陈皮制熟地黄炮制过程色度值,BQ与成分的动态联系,并建立了QI,结果发现炮制至52 h时QI达最高值,即预测52 h为砂仁陈皮制熟地黄的最佳炮制终点,为规范其炮制工艺及质量评价提供了依据;然而,熟地黄样品色度值与药效的相关性还需进一步实验验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 王芳,于欢,李风琴,等. 砂仁制地黄的炮制工艺分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):5-10.
 [2] 陈思琦,李佳欣,吴鑫宇,等. 熟地黄的药理学研究进展[J]. 化学工程师,2019,33(11):46-50.
 [3] 李卫民,邓中甲. 至阴之品——地黄说[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:9-10.
 [4] 张秀芬,王思梦,白建英,等. 经典名方地黄饮子的古代文献考究[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):59-64.
 [5] 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.
 [6] 苏颂. 本草图经[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1994:81.
 [7] 李佳园,魏晓嘉,万国慧,等. “辨状论质”的历史沿革

- 与现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 189-196.
- [8] 胡佳莉, 刘林, 李钟, 等. 黄精发酵过程中有效成分含量与色泽的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 169-176.
- [9] 罗传红, 廖维, 袁瑞芳, 等. 基于颜色-成分关联的余甘子商品等级划分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 171-179.
- [10] 严斐霞, 谢永艳, 陈畅, 等. 熟地黄炮制过程中的化学成分变化和药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10): 2493-2495.
- [11] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218-228.
- [12] 张晓亚, 徐金娣, 许军, 等. 整合糖组与代谢组学方法比较蒸制和酒炖熟地黄化学成分[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1591-1600.
- [13] 李娴, 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, 643.
- [14] 彭成. 系统中药学指导下的益母草多维评价研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(9): 1233-1236.
- [15] 邹慧琴, 李硕, 林相龙, 等. 基于色度学理论的甘草颜色数字化方法学研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(12): 2681-2685.
- [16] 孟祥龙, 马俊楠, 张朔生, 等. 熟地黄炮制(九蒸九晒)过程中药效化学成分变化及炮制辅料对其影响研究[J]. 中草药, 2016, 47(5): 752-759.
- [17] 胡志方, 王小平, 陈建章. HPLC-ELSD测定地黄不同炮制品中单糖含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 72-74.
- [18] 伊尚武, 张文彬, 姜淑芬, 等. 甜味剂的发展及其对我国传统制糖业的影响[J]. 中国糖料, 2004(2): 51-55.
- [19] 高贤玉, 张发明, 柏天琦, 等. 云南10个芒果栽培品种糖酸组分分析[J]. 中国热带农业, 2019(5): 54-59.
- [20] 荆文光, 程显隆, 刘安, 等. 基于“辨状论质”综合评价指数的厚朴饮片等级划分和优质优效研究[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2285-2293.
- [21] 刘俊杰, 王金平, 弓铭, 等. 熟地滋腻碍胃辨析[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(3): 509-511.
- [22] 胡志方, 王小平, 郭慧玲, 等. 江西建昌帮炒制熟地黄中辅料作用探索(II)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 7-9.
- [23] 胡律江, 胡志方, 王小平, 等. 江西建昌帮炒制熟地黄的HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 33-36.
- [24] LONG M X, BO W, YAN Z X, et al. The dynamic changes and mechanisms of Rehmanniae Radix processing based on Maillard reaction[J]. TMR, 2021, 6(1): 1-11.
- [25] 宋琳琳, 薛淑娟, 王利丽, 等. 不同储藏年限地黄化学成分分析[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2661-2669.
- [26] 李志庸. 张景岳医学全书[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 1460.
- [27] 张定堃, 王伽伯, 杨明, 等. 中药品质整合评控实践: 附子品质综合指数[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2582-2588.

[责任编辑 刘德文]