

· 化学与分析 ·

江西建昌帮炒熟地黄的 HPLC 指纹图谱

胡律江¹, 胡志方^{2*}, 王小平², 王进²

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000)

[摘要] 目的:建立江西建昌帮炒熟地黄的 HPLC 指纹图谱,为科学评价及控制炒熟地黄质量提供依据。方法:采用高效液相色谱法建立建昌帮炒熟地黄指纹图谱,并采用国家药典委员会的“中药指纹图谱相似度计算软件”对数据进行分析。结果:10 批次建昌帮炒熟地黄共有 13 个指纹图谱峰,经相似度计算,整体相似性好。结论:该方法稳定,重复性好,可用于建昌帮炒熟地黄的质量评价与控制。

[关键词] 熟地黄; 炒制法; 指纹图谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0033-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230033

HPLC Fingerprint of Processed *Rehmannia Radix Praeparata* with Jiangxi Jianchang Medicinal Band

HU Lyu-jiang¹, HU Zhi-fang^{2*}, WANG Xiao-ping², WANG Jin² (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi College of Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To set up HPLC fingerprints of *Rehmannia Radix Praeparata* processed by Jiangxi Jianchang medicinal Band and provide basis for quality evaluation and quality control of processed *Rehmannia Radix Praeparata*. **Method:** The fingerprints of *Rehmannia Radix Praeparata* processed by Jiangxi Jianchang medicinal Band were established by HPLC. Data analysis was conducted according to “2004A similarity software of Chinese medicine fingerprints” of the Chinese Pharmacopoeia Commission. **Result:** Thirteen peaks were identified in HPLC fingerprint of ten batches samples of *Rehmannia Radix Praeparata* processed by Jiangxi Jianchang medicinal Band, and the overall similarity was good according to the similarity calculation. **Conclusion:** This method is stable and reproducible, and can be used for quality evaluation and quality control of *Rehmannia Radix Praeparata* processed by Jiangxi Jianchang medicinal Band.

[Key words] *Rehmannia Radix Praeparata*; processing; fingerprint; HPLC

地黄经炮制成熟地黄,性由寒转温,味由苦转甘,功效由清转补,善于滋阴补血、益精填髓^[1]。其功效发生转变的物质基础是在炮制过程中地黄化学成分发生改变^[2]。目前,熟地黄炮制方法尚无统一标准,而不同炮制方法的操作环境与辅料对地黄中化学成分产生影响不同^[3-8]。江西建昌帮通过加入黄酒、砂仁、陈皮等辅料,采用传统炒制方法制备熟地黄,工艺独特,具有“气味纯真而独厚,补血而不凝滞”作用特点。在前期研究中,课题组已经完成了江西建昌帮炒熟地黄中单糖、多糖含量测定工

作^[9-10]。由于中药疗效是多成分协同作用的结果,单一成分难以全面衡量其质量和疗效。因此,本文拟采用指纹图谱技术对江西建昌帮特色炮制品种炒熟地黄进行指纹图谱研究,为全面评价和控制炒熟地黄的质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 1260 系列高效液相色谱仪(Alltech 3300 型蒸发光散射检测器,美国 Agilent), AB265-S 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo), FST-III-10 型超纯水机(上海富诗特), AR2140 型电子分析天

[收稿日期] 20141103(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160520);江西省自然科学基金项目(2009GZY0114)

[第一作者] 胡律江,博士,讲师,从事中药炮制与中药新技术研究, Tel:0791-86363831, E-mail:380085581@qq.com

[通讯作者] * 胡志方,教授,从事中药炮制及中药新制剂研究, Tel:0794-8239328, E-mail:jxrelf@163.com

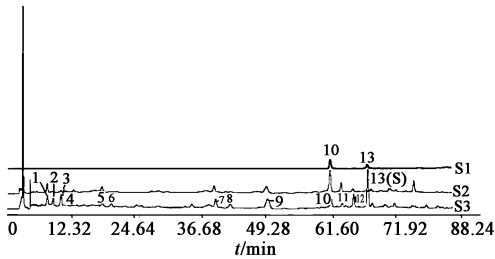
平(上海 Ohaus)。

1.2 试药 地黄(产地河南,批号 201110150305;产地山西,批号 10082411)均由江西富中药业有限公司提供,经本校李秀英副教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的根茎;辅料砂仁、陈皮由本校标本陈列室提供,黄酒(批号 20070913,镇江恒顺酒业有限责任公司),毛蕊花糖苷(批号 111530-200706)和橙皮苷(110721-200613)购自中国食品药品检定研究院,超纯水自制,中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A,国家药典委员会)。乙腈为色谱纯,其他均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 炆熟地黄的制备^[11] 采用生地黄为原料制备炆熟地黄共 10 批。取净生地黄,浸泡,取出,沥干,炆制 1 d,加入砂仁、陈皮细末,炆至汁尽,取出,晒至半干,加入定量黄酒拌匀,闷润,取出,适当蒸制,用竹刀或铜刀切斜长厚片,晒九成干。

2.2 色谱条件 Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 5% ~ 10% A; 12 ~ 40 min, 10% ~ 15% A; 40 ~ 70 min, 15% ~ 25% A; 70 ~ 85 min, 25% ~ 28% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 320 nm,柱温 30 °C。见图 1。



10. 毛蕊花糖苷;13. 橙皮苷;S1. 对照品;S2. 地黄;S3. 炆熟地黄
图 1 炆熟地黄 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC chromatography of *Rehmannia Radix Praeparata*

2.3 参照物溶液的制备 取毛蕊花糖苷、橙皮苷对照品适量,精密称定,加入流动相,制成每 1 mL 各含 90, 25 μg 的溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备 取熟地黄,粉碎成细粉,约 2 g,精密称定,至圆底烧瓶中,精密量取甲醇 50 mL,回流 1 h,放冷,摇匀,滤过,滤液浓缩至 20 mL,加入乙酸乙酯 20 mL,超声 15 min,取上清液,蒸干,用甲醇定容至 2 mL,临用前 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一供试品溶液注入高效液相色谱仪,按照 2.2 项下色谱条件,连续进样 6

次,记录色谱图,将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,得到各次进样的相似度 > 0.99, RSD 0.5%。各主要色谱峰的相对保留时间及相对峰面积值的 RSD 分别在 0.3% ~ 0.6% 和 0.9% ~ 2.2%,表明仪器整个系统的精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取第 1 批炆熟地黄样品共 6 份,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件,分别进样,记录色谱图,将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,得到各次进样的相似度均 > 0.952, RSD 0.7%。各主要色谱峰的相对保留时间及相对峰面积值的 RSD 分别在 0.2% ~ 0.9% 和 2.0% ~ 6.6%,表明该分析方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,按照 2.2 项下色谱条件,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样,记录色谱图并积分,将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”处理,得到各次进样相似度均 > 0.95, RSD 1.3%。各主要色谱峰的相对保留时间及相对峰面积值的 RSD 分别在 0.9% ~ 2.1% 和 1.1% ~ 5.7%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 炆熟地黄 HPLC 指纹图谱的建立

2.6.1 参照色谱峰的确定 根据参照物色谱峰,可知 10 号为毛蕊花糖苷峰,13 号为橙皮苷峰。由于 13 号峰在指纹图谱中保留时间及峰面积适当,故选用其(S 号峰)作为参照峰。生地黄与炆熟地黄中化学成分变化明显。在炆熟地黄图谱 13 个峰信号,与地黄相比较,其第 6, 8, 13(橙皮苷)为新增峰信号,5, 10(毛蕊花糖苷), 11, 21 号峰信号明显减弱,而 2, 3, 12 号峰信号呈增强趋势。

2.6.2 指纹图谱共有峰的标定 采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件,以中位数法生成对照指纹图谱,设定时间窗宽度为 0.35 min。结果共标定有 13 个共有指纹峰(图 1)。同时建立对照指纹图谱(R)及 10 批炆熟地黄的叠加指纹图谱,见图 2。

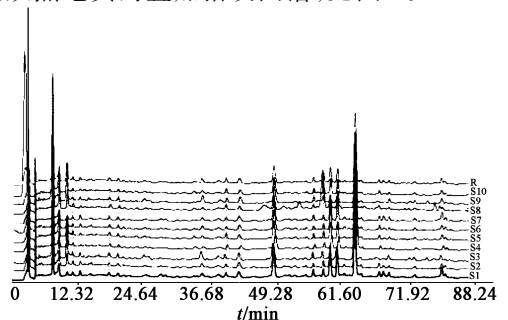


图 2 10 批炆熟地黄叠加 HPLC

Fig. 2 Ten batch HPLC chromatography of *Rehmannia Radix Praeparata*

选择第 1 批炆熟地黄的 HPLC 为参照图谱, 分别计算 10 批炆熟地黄共有指纹峰的相对保留时间

和相对峰面积, 见表 1, 2。

2.6.3 炆熟地黄相似度评价 本文采用指纹图谱

表 1 10 批炆熟地黄样品共有峰相对保留时间

Table 1 Common peak relative retention time of 10 batch of *Rehmannia Radix Praeparata*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.121	0.121	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.121	0.120	0.120	0.4
2	0.138	0.139	0.138	0.138	0.138	0.138	0.138	0.140	0.138	0.138	0.4
3	0.162	0.162	0.161	0.162	0.162	0.162	0.162	0.163	0.161	0.161	0.4
4	0.178	0.179	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178	0.180	0.177	0.183	0.9
5	0.284	0.285	0.284	0.285	0.285	0.285	0.284	0.288	0.285	0.286	0.4
6	0.310	0.310	0.310	0.311	0.301	0.310	0.310	0.314	0.311	0.311	0.4
7	0.624	0.624	0.623	0.625	0.624	0.625	0.625	0.625	0.626	0.625	0.1
8	0.662	0.663	0.663	0.665	0.662	0.663	0.662	0.664	0.665	0.665	0.2
9	0.763	0.763	0.762	0.764	0.763	0.764	0.763	0.763	0.764	0.764	0.1
10	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.880	0.880	0.05
11	0.908	0.908	0.907	0.907	0.908	0.908	0.908	0.906	0.908	0.908	0.06
12	0.949	0.949	0.949	0.949	0.948	0.949	0.949	0.949	0.949	0.949	0.02
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

表 2 10 批炆熟地黄样品共有峰相对峰面积

Table 2 Common peak relative retention area of 10 batch of *Rehmannia Radix Praeparata*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.224	0.344	0.701	0.629	0.879	0.345	0.235	0.920	0.924	1.062	50.7
2	0.119	0.136	0.444	0.285	0.541	0.134	0.186	0.500	0.288	0.502	54.1
3	0.067	0.106	0.543	0.323	0.516	0.109	0.088	0.508	0.597	0.508	65.8
4	0.032	0.035	0.132	0.067	0.102	0.024	0.037	0.166	0.061	0.119	63.4
5	0.037	0.036	0.083	0.051	0.098	0.043	0.048	0.077	0.082	0.157	52.6
6	0.036	0.032	0.072	0.049	0.050	0.037	0.038	0.045	0.073	0.115	46.8
7	0.054	0.038	0.154	0.077	0.087	0.045	0.045	0.106	0.094	0.103	45.1
8	0.087	0.088	0.192	0.107	0.117	0.092	0.091	0.115	0.177	0.123	31.1
9	0.314	0.289	0.403	0.330	0.372	0.281	0.294	0.375	0.403	0.421	15.1
10	0.069	0.041	0.106	0.065	0.079	0.036	0.059	0.094	0.108	0.088	33.7
11	0.070	0.065	0.110	0.093	0.104	0.049	0.052	0.279	0.187	0.114	63.5
12	0.236	0.0812	0.224	0.206	0.212	0.074	0.217	0.295	0.226	0.222	34.4
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

相似度软件“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)计算。10 批次炆熟地黄 HPLC 指纹图谱相似度计算结果, 见表 3。结果表明 10 批炆熟地黄中, 除第 10 批外, 其余 9 批与对照指纹图谱的相似度值均 >0.80, 与对照指纹图谱有良好的相似性。

3 讨论

选用乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸作流动相进行了比较, 结果确定以乙腈-0.1% 磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱时基线稳定, 峰形较好。在 254, 280,

320 nm 波长下扫描, 结果在 320 nm 处供试品的出峰最多, 分离度良好, 故最终确定检测波长为 320 nm。

对不同提取溶剂(甲醇, 50% 甲醇, 95% 乙醇), 不同提取时间(15, 30, 60, 120 min) 和超声(功率 150 W, 频率 40 kHz), 回流 2 种提取方法进行比较, 结果表明甲醇加热回流 60 min 提取的供试品溶液色谱峰数多, 组分含量高, 但图谱基线不佳。经将甲醇提取液浓缩, 再采用乙酸乙酯超声(功率 150 W,

表 3 炒熟地黄 HPLC 指纹图谱相似度计算

Table 3 HPLC fingerprint similarity calculation of Rehmannia Radix Praeparata

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S
S1	1	0.978	0.645	0.723	0.806	0.895	0.914	0.685	0.645	0.626	0.893
S2	0.978	1	0.719	0.755	0.863	0.914	0.902	0.722	0.724	0.657	0.930
S3	0.645	0.719	1	0.840	0.876	0.77	0.723	0.730	0.963	0.681	0.902
S4	0.723	0.755	0.84	1	0.756	0.931	0.914	0.639	0.726	0.569	0.885
S5	0.806	0.863	0.876	0.756	1	0.791	0.771	0.808	0.878	0.739	0.938
S6	0.895	0.914	0.770	0.931	0.791	1	0.984	0.653	0.697	0.587	0.927
S7	0.914	0.902	0.723	0.914	0.771	0.984	1	0.642	0.641	0.569	0.907
S8	0.685	0.722	0.730	0.639	0.808	0.653	0.642	1	0.751	0.619	0.819
S9	0.645	0.724	0.963	0.726	0.878	0.697	0.641	0.751	1	0.689	0.877
S10	0.626	0.657	0.681	0.569	0.739	0.587	0.569	0.619	0.689	1	0.765
S	0.893	0.930	0.902	0.885	0.938	0.927	0.907	0.819	0.877	0.765	1

注:S:对照指纹图谱。

频率 40 kHz) 处理 (10, 15, 30 min), 表明在 15 min 时图谱基线显著好转, 且主要色谱峰信息未减少。与文献报道提取方法^[12]比较, 本法包含的色谱峰信息更多。

由实验结果分析, 采用不同产地的原药材制备的炒熟地黄炮制品的色谱非共有峰信息有差异, 而采用同一产地的原药材制备的第 10 批炒熟地黄, 虽然其色谱共有峰相对保留时间与其他批次炮制品基本一致, 但相对峰面积呈现一定的差异性, 导致相似度偏低, 表明工艺参数的控制精度差异会对炮制品质量均一性产生显著影响。

建昌帮药界认为地黄经加入黄酒、砂仁、陈皮炮制后性转微温, 取其辛温香窜之气, 健脾行滞、纳气归肾, 以增强补益之功, 体现出古人炮制用药的独到之处。由本实验表明, 辅料的加入的确改变了熟地黄中药效物质成分的组成, 在炒熟地黄中出现了辅料陈皮的主要药效成分橙皮苷的色谱峰, 且经前期研究表明, 辅料对炮制过程中地黄化学成分的变化也可产生明显影响^[13]。

建昌帮采用炮制工艺加工的熟地黄, 品质独特, 本文选取了 13 个特征峰构成了炒熟地黄的指纹图谱, 以提供更全面的质量控制信息。且该实验方法重复性好, 稳定性强, 可作为建昌帮炒熟地黄内在质量控制的评价方法。

[参考文献]

[1] 叶定江, 张世臣. 中药炮制学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 290-291.

[2] 石桥博文. 关于生药的基原、炮制及质量的临床生药学研究——地黄对血栓证的药理病理学研究[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1983, 5(3): 52-54.

[3] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典·古代部分[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1986: 70-72.

[4] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典·现代部分[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1989: 69-74.

[5] 卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 47-49.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 116.

[7] 陈建章, 邓国旺. 不同炮制法对中药微量元素的影响[J]. 中药材, 1992, 15(5): 24-27.

[8] 马亚兵, 王海刚, 高海青, 等. 中药微量元素与其药理的关系研究[J]. 首都医药, 2009(22): 42-43.

[9] 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.

[10] 胡志方, 王小平, 郭慧玲, 等. HPLC-ELSD 测定地黄不同炮制品中低聚糖含量[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 877-879.

[11] 江西省中药饮片炮制规范编写组. 江西省中药饮片炮制规范[S]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 327.

[12] 雷敬卫, 白雁, 樊克锋. NIR 和 HPLC 指纹图谱在熟地黄饮片质量稳定性考察中的对比研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2052-2055.

[13] 胡志方, 王小平, 郭慧玲, 等. 江西建昌帮炮制地黄中辅料作用探索(I) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 1-5.

[责任编辑 顾雪竹]