

地黄 HPLC-DAD 多波长指纹图谱的建立及其在熟地黄炮制中的应用

曹建军¹, 梁宗锁^{1,2*}, 杨东风¹, 刘永红¹, 段琦梅^{1,2}

1. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨陵 712100

2. 陕西省中药指纹图谱与天然产物库研究中心, 陕西 杨陵 712100

摘要: **目的** 以高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 色谱图为基础建立地黄多波长指纹图谱, 并通过熟地黄炮制终点检测分析其应用价值。**方法** 样品采用超声波法甲醇提取, 蒸干后用 15% 甲醇定容, 使用 Waters Sunfire C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.02% 磷酸水溶液线性梯度洗脱, 最大波长法选择多波长下重叠共有峰。用随机抽取的熟地样品多波长指纹图谱共有峰的平均值作为熟地的对照指纹图谱, 通过炮制样品与熟地标准多波长指纹图谱的相似性比较获得最佳加工炮制时间。**结果** 结果显示 205、284 nm 下地黄多波长指纹图谱可获得 18 个共有峰。生地黄在蒸制 25 h 后与熟地黄对照指纹图谱相似性最大, 是熟地黄蒸制的最佳时间。**结论** 多波长指纹图谱有利于显示样品成分细微变化及精确控制加工过程, 可用于中药材加工过程中质量控制。

关键词: 多波长指纹图谱; 熟地黄; 地黄; 炮制; 超声波法

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)02-0265-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.021

Establishment of HPLC-DAD multi-wavelength chromatographic fingerprints of *Rehmanniae Radix* and its application in processing *Rehmanniae Radix Praeparatae*

CAO Jian-jun¹, LIANG Zong-suo^{1,2}, YANG Dong-feng¹, LIU Yong-hong¹, DUAN Qi-mei^{1,2}

1. College of Life Science Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2. Shaanxi Research Center in Traditional Chinese Medicine Fingerprint & Nature Product Library, Yangling 712100, China

Abstract: Objective To develop the multi-wavelength chromatographic fingerprints for *Rehmanniae Radix* based on chromatographs of HPLC-DAD and to analyze the applicability by endpoint determination in processing *Rehmanniae Radix Praeparatae*. **Methods** Samples were extracted by ultrasonic method with methanol. The extract solutions were evaporated to dry and the residue was dissolved with 15% methanol. A Waters Sunfire C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was applied. Acetonitrile-0.02% phosphoric acid in water was used as mobile phase for gradient linear eluting. Maximum peak area was the criterion for choosing from overlapping peaks of the same constituent under different wavelengths. The means of common peaks in the multi-wavelength chromatographic fingerprints of *Rehmanniae Radix Praeparatae* chosen randomly were taken as the reference fingerprint index. The optimal processing time was determined by fingerprint similarity analysis between prepared samples and the reference. **Results** The result indicated that 18 common peaks were available in multi-wavelength chromatographic fingerprint under 205 and 284 nm. The similarity to reference *Rehmanniae Radix Praeparatae* reached the summit after preparing for 25 h. It could be considered to be the optimum time for preparing *Rehmanniae Radix Praeparatae*. **Conclusion** The multi-wavelength chromatographic fingerprint is a facility for revealing constituents variations in detail and for accurate controlling the herbal medicine process.

Key words: multi-wavelength chromatographic fingerprint; *Rehmanniae Radix Praeparatae*; *Rehmanniae Radix*; process; ultrasonic method

地黄 *Rehmanniae Radix* 有多种药用形式, 其中用量较大的是生地黄和熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparatae*。熟地黄是生地黄经蒸制或加黄酒炖制而成。生地黄富含梓醇、水苏糖等有效成分, 性寒,

收稿日期: 2013-06-15

基金项目: 陕西省科技统筹项目 (2012KTCL02-07); 国家“十一五”科技支撑计划项目资助 (2008BAD98B08)

作者简介: 曹建军 (1971—), 男, 博士, 研究方向为药用植物学。E-mail: caojianjun31152@163.com

*通信作者 梁宗锁 E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

具有清热凉血等功效。熟地黄含 5-羟甲基糠醛(5-HMF)等活性成分,性微温,具有滋阴补血的作用。这种药性的变化与加工过程中药材成分变化密切相关。研究表明地黄中梓醇、水苏糖等成分在熟地黄炮制过程中可能降解,同时糖衍生物 5-HMF 大量产生,使熟地黄向温性转变^[1-2]。由此可见熟地黄炮制过程中质量控制十分关键,既要保证生地黄充分熟化,又要使加工时间最短以节约能源。

高效液相色谱(HPLC)指纹图谱技术是被广泛认可的一种中药质量控制方法。但常用的单波长指纹图谱有时不能满足检测要求。在熟地黄指纹图谱建立常用的麦角甾苷检测波长 334 nm^[3]及熟地黄检测成分 5-HMF 检测波长 284 nm 附近,梓醇等环烯醚萜苷类成分并无吸收,在此波长附近的指纹图谱不能显示这些成分^[4],并且在此波长下指纹图谱共有峰较少。而在梓醇检测波长 205 nm 附近,5-HMF 吸收较小,质量分数低的样品峰值小甚至无峰。地黄指纹图谱研究较早,曾志等^[5]、李军等^[3]和贾玉梅等^[6]在 280、334、215、230 nm 波长下研究了生地黄、熟地黄和鲜地黄的 HPLC 指纹图谱。温学森等^[3]和曹建军等^[4]用示差折光检测器及在 205 nm 下研究了熟地黄加工过程中指纹图谱的变化。孙国祥等^[7-9]通过建立多波长指纹图谱采用均谱法、融合谱法等评价中成药质量。这些成果为本研究提供了参考。本实验采用多个波长下检测以获得较多的共有峰信息,以便更精确地控制药材加工过程,而二极管阵列检测器(DAD)为此方法提供了便利。

1 材料与试剂

生地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 产自河南武陟,由笔者鉴定,品级为 4 级(8~15 g)。熟地黄对照品从购自各地的熟地黄样品中随机抽取,来源见表 1。

乙腈(色谱纯);超纯水(成都优普超纯水机制备);磷酸(色谱纯,天津科密欧);样品制备用甲醇(分析纯,西安化学试剂厂);梓醇(批号 110808-200508)、麦角甾苷(批号 111530-200706)对照品来自中国食品药品检定研究院;5-HMF 对照品(批号 200805271,上海晶纯试剂公司),质量分数大于 98%。

2 方法

2.1 地黄多波长指纹建立及相似性计算

本研究中地黄多波长指纹是指从多波长指纹图

表 1 熟地黄的来源

Table 1 Sources of *Rehmanniae Radix Praeparatae*

编号	产地	性状	编号	产地	性状
P1	山西襄汾	块根	P6	河南武陟	饮片
P2	山西曲沃	块根	P7	河南武陟	块根
P3	山西临猗	饮片	P8	陕西汉中	饮片
P4	山西侯马	块根	P9	陕西汉中	饮片
P5	河南武陟	饮片	P10	河南温县	块根

谱中提取的各共有峰峰面积值的集合,即虚拟地黄。在生地黄加工成熟地黄过程中,定时取样检测,获得各加工时段的 HPLC 多波长指纹图谱,各时段多波长指纹图谱与熟地黄标准多波长指纹(随机抽取的熟地黄指纹的平均值)进行比较,相似性最大的时段即为加工的最佳时段。

多色谱指纹系统相似性计算之前通常把多个指纹图谱的数据进行融合,考虑到多波长指纹图谱类似于电化学检测器^[10]产生的 HPLC 指纹图谱,各波长指纹图谱是同一个样品在同一色谱条件下同时获得的,只在检测波长上有所差异,各波长指纹图谱的独立性较小。因此可以采用以下方法进行数据融合:样品各波长色谱中相同的共有峰按最大峰面积法选取,直接进行数据合并,建立多波长指纹。融合后的多波长指纹图谱峰面积标准化采用共有峰峰面积/总共有峰峰面积^[3,11]计算。相似性采用欧氏距离衡量,欧氏距离越小相似性越大^[4]。本实验数据计算均在 Excel 软件下完成。

2.2 熟地黄炮制及样品溶液制备

2.2.1 熟地黄炮制 生地黄 1.5 kg,采用清蒸法^[2]炮制熟地黄,炮制过程中每隔 2 h 取样 1 次。

2.2.2 样品溶液制备 精确称取 0.500 0 g 样品粉末,置于 50 mL 量瓶中,加入甲醇振荡后定容,冷浸过夜后超声处理 90 min。冷却至室温后加甲醇定容。摇匀,滤过,取续滤液 25 mL 旋转蒸干,残渣用 15% 甲醇定容至 5 mL。用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后即可上样分析。

2.3 色谱分析

2.3.1 色谱条件 采用 Waters 高效液相色谱仪, Waters 1525 二元梯度泵, Waters Sunfire C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Waters Sunfire C₁₈ 保护柱(4 mm×5 mm), Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower Pro 色谱工作站。柱温 35 °C,流动相为乙腈(A)-0.02%磷酸水溶液(B),线性梯度洗脱

程序为 0~5 min, 1% A; 5~12 min, 1.5% A; 12~17 min, 3% A; 17~50 min, 7% A; 50~70 min, 9.5% A; 70~90 min, 12.5% A; 90~120 min, 18% A; 120~130 min, 21% A; 130~140 min, 25% A; 140~145 min, 29% A; 145~150 min, 38% A; 150~155 min, 45% A; 155~160 min, 65% A; 160~165 min, 100% A; 165~180 min, 100% A。体积流量 1 mL/min。二极管阵列检测器监测波长 190~400 nm, 进样量 20 μ L。

2.3.2 精密度试验 同一样品溶液按“2.3.1”项色谱条件进样, 24 h 内连续进样 5 次。

2.3.3 重复性试验 精密称取蒸制 4 h 样品 0.500 0 g 5 份, 按“2.2.2”项方法制备样品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件上样分析。

2.3.4 稳定性分析 同一样品室温存放, 48 h 内按上述色谱条件测定 5 次。

通过分析上述上样色谱峰保留时间和峰面积的 RSD 评价进样和仪器精密度、方法重复性和样品稳定性。

3 结果与分析

3.1 多波长指纹图谱的建立

地黄中次生成成分除糖类以外主要有 3 类: 环烯醚萜类、紫罗兰酮类和苯乙醇苷类, 而熟地黄中由加工产生糖衍生物糠醛类。其中环烯醚萜类和紫罗兰酮类均为萜类, 分子内共轭结构小, 紫外吸收波长短, 吸收相似。参考地黄中上述 4 类成分的主要吸收波长, 选取各样品在 205、284、330 nm 下的色谱图来构建多波长指纹图谱, 其中 205 nm 是《中国药典》2010 年版规定的生地黄检测成分梓醇的有效吸收区(图 1), 此波长下地黄中主要有效成分环烯醚萜类、紫罗兰酮类均有吸收。284 nm 是《中国药典》2010 年版规定的熟地黄的检测成分 5-HMF 的最大吸收波长(图 1)。330 nm 是苯乙醇苷类如麦角甾苷等的最大吸收区之一(图 1)。图 2 为熟地黄多波长指纹图谱及梓醇、5-HMF、麦角甾苷对照品的色谱图。在多个波长下, 样品间可识别的共有峰增加。如图 2 所示, 在 334、284 nm 下熟地黄样

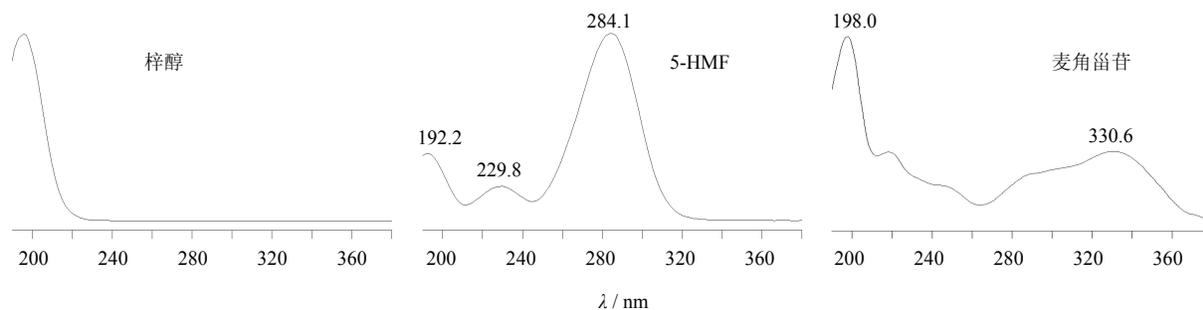


图 1 DAD 检测器下梓醇、5-HMF 和麦角甾苷的吸收曲线

Fig. 1 Absorption curves of catalpol, 5-HMF, and acteoside under DAD detector

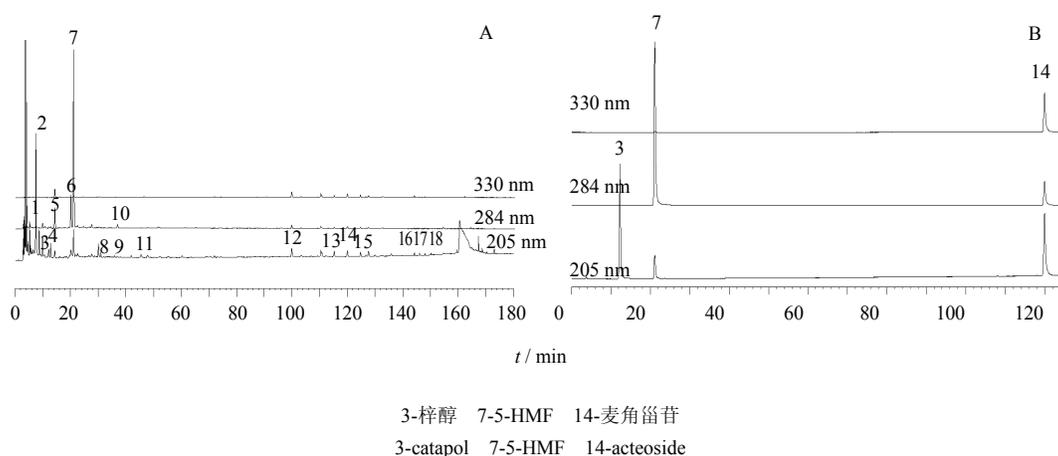


图 2 熟地黄的多波长指纹图谱 (A) 及梓醇、5-HMF 和麦角甾苷对照品色谱图 (B)

Fig. 2 Multi-wavelength chromatographic fingerprint (A) of *Rehmanniae Radix Praeparatae* and chromatogram (B) of catalpol, 5-HMF and acteoside reference substances

品各仅有约 9 个和 10 个显著的色谱峰, 缺少地黄中主要有效成分环烯醚萜苷类色谱峰, 这类成分仅在 190~230 nm 下有吸收 (图 1)。205 nm 下虽可达 18 个, 但部分峰如 5-HMF, 峰 6、10 等峰面积较小, 在部分样品中这些峰不能显示。

本实验中, 多波长指纹图谱中同物质重叠峰的选择标准是峰面积最大, 麦角甾苷的吸收峰值在 330 nm 附近, 与资料中显示的 334 nm 有差异, 这可能是由于仪器误差或流动相成分差异造成的。图 1 和 2 显示, 麦角甾苷等在 205 nm 下光吸收值比 330 nm 下高。在 330 nm 下不能监测梓醇等环烯醚萜苷类成分, 330 nm 下监测到的共有峰在 205 nm 下也可监测到, 而且峰面积均大于 330 nm 下的监测值, 因此以最大峰面积法进行数据融合时, 330 nm 下色谱图被舍弃。经共有峰识别、重复峰选择, 各波长下的共有峰数据直接合并, 熟地黄多波长指纹图谱构建完成。可用于地黄加工过程监测的多波长指纹图谱的共有峰为 18 个, 其中 4 个来自 284 nm 色谱, 可能均为炮制过程中的衍生成分。14 个来自 205 nm 色谱, 可能主要为环烯醚萜苷、紫罗兰酮类、苯乙醇苷类等 (图 2)。而且各共有峰峰面积最大化, 放大了加工过程中地黄中成分的微小变化。因此这种图谱更适合中药加工过程中的质量监测。

多波长指纹数据的融合常见的有数据处理前融合和处理后融合。前者如在中药质量控制中的均谱法^[9]、融合谱法^[10]以及本研究的最大法。后者如用权重法、均值法和投影参数法^[11]在相似性计算后进行融合。

3.2 方法有效性分析

在精密度、可重复性和样品稳定性分析中, 5

次进样所得多波长指纹图谱中共有峰面积和保留时间的 RSD 分别在 5% 和 3% 以内, 表明仪器和进样精密度较好, 样品提取方法、色谱条件适用, 样品溶液在室温下 48 h 内稳定。

以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-1% 乙酸溶液作流动相进行梯度洗脱, 效果均不理想。用回流及超声波提取变化不大, 考虑到处理方便及批处理量采用超声波提取。尝试用 20%、40%、60%、80% 甲醇水溶液和甲醇直接提取 1 g 样品, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后上样分析, 但色谱峰较少, 峰较低, 且提取溶剂极性越小, 保留时间小的峰越容易出现畸形, 而用极性较大的 40%、20% 甲醇水溶液提取时, 保留时间最长的脂溶性成分在指纹图谱中减小至消失, 而且溶液滤过困难。研究表明地黄的主要有效部位在水溶性部分^[12], 脂溶性成分的丢失对指纹图谱的代表性影响不大。综合考虑到以上各种因素, 决定采用甲醇提取, 这样可以减少蛋白、多糖等物质的溶出, 有利于滤过和保护色谱柱。提取液蒸干后再用少量 15% 甲醇溶液定容, 用微孔滤膜滤过后即可上样分析, 这样虽然损失了部分脂溶性成分色谱峰, 但可使进样液与初始流动相极性相差不多, 从而使保留时间小的水溶性成分畸形峰的形成减少, 而且提取液浓缩了 5 倍, 色谱峰明显增高, 增多。

3.3 熟地黄加工过程中多波长指纹图谱变化及最佳加工时间

图 3 显示熟地黄炮制过程中指纹图谱的变化, 梓醇等快速减少, 5-HMF 逐渐上升。5-HMF 在蒸制中第 1 次取样时 (2 h) 就已产生。而 205 nm 下蒸制 6 h 才出现明显的峰。随炮制时间增加量上升的成分一般在 284 nm 下峰面积较大, 此图谱更适

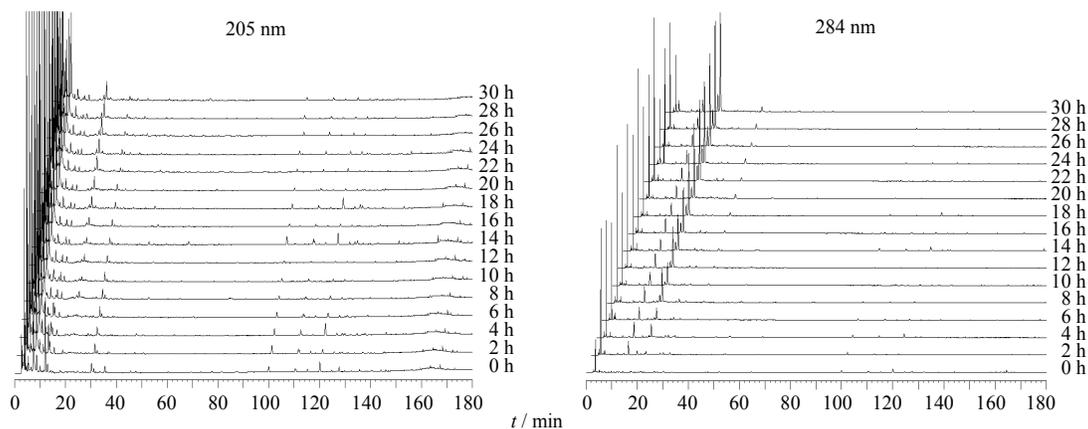


图 3 熟地黄加工过程中各时段采样的 205 nm 和 284 nm 指纹图谱变化

Fig. 3 Variation of chromatographic fingerprints at 205 and 284 nm in each period of processing *Rehmanniae Radix Praeparatae*

于监测衍生成分变化。而随蒸制时间延长质量分数减少的成分在 205 nm 图谱中峰面积较大, 因此 205 nm 波长下的指纹图谱更适合监测地黄原生成分。由于鲜地黄、生地黄中不含或极少含有熟地黄炮制过程中产生的衍生产物, 因此对于这 2 种药材, 仅 205 nm 单波长指纹图谱就具有良好的代表性, 可显示环烯醚萜、紫罗兰酮类和苯乙醇苷类等成分。而对于熟地黄而言, 205、284 nm 多波长指纹更具代表性, 除可显

示以上 3 类成分外, 又可精细显示糠醛类等衍生成分。

随机抽取的熟地黄对照样品多波长指纹图谱比较见图 4, 多波长指纹图谱比单波长指纹图谱更准确地反映这些样品的熟化程度、加工方法等特征^[4]。把这些对照样品的多波长指纹图谱中共有峰峰面积的平均值作为熟地黄标准指纹图谱。熟地黄炮制过程中各时段采样的多波长指纹图谱与熟地黄标准指纹图谱之间的相似性见图 5。

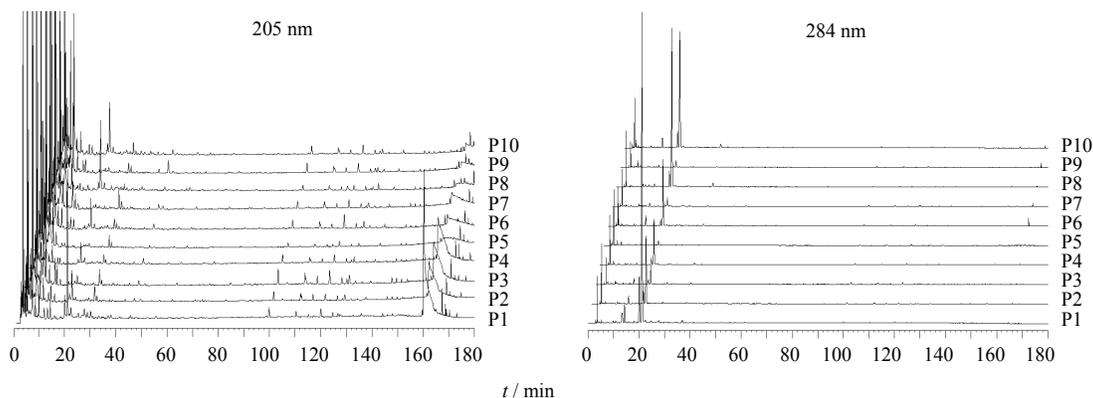


图 4 熟地黄对照样品 205 nm 和 284 nm 指纹图谱比较

Fig. 4 Comparison on fingerprints at 205 and 284 nm among *Rehmanniae Radix Praeparata* reference substances

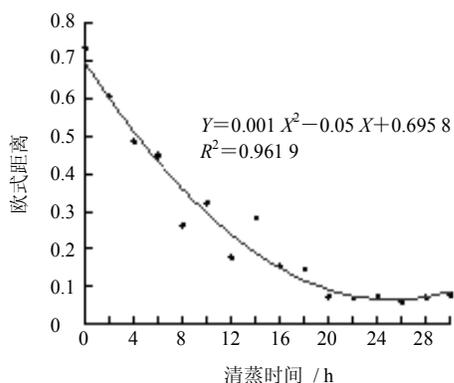


图 5 熟地黄加工过程中各时段采样与熟地黄标准指纹图谱的相似性距离系数

Fig. 5 Sample in each period to *Rehmanniae Radix Praeparata* in its processing and similarity distance coefficients of *Rehmanniae Radix Praeparata* reference fingerprint

图 5 显示随着样品清蒸时间延长, 采样指纹图谱与熟地黄标准指纹图谱相似性距离减小, 26 h 时达到最小, 此时相似性最大。从图中可见在清蒸 20 h 以后相似性距离均较小。以蒸制时间和相似性距离为自变量和因变量作曲线拟合可知相似性距离最小值在 25 h 附近。因此可认为清蒸 25 h 左右是生

地黄加工成熟地黄的最佳时间。这与传统上生地黄加工成熟地黄的最佳蒸制时间 (24 h 左右) 及加黄酒最佳炖制时间 (20 h 左右) 基本相符^[13], 也与 205 nm 单波长测定的估计值较相近^[6]。与单波长指纹图谱相比, 地黄多波长指纹图谱放大了 5-HMF 的影响, 更符合《中国药典》2010 年版规定的 5-HMF 作为熟地黄检测成分的要求。

4 讨论

以地黄含有化学成分群为基础构建 HPLC-DAD 多波长指纹图谱来研究熟地黄炮制过程中指纹的变化和熟地黄最佳炮制时间。研究显示 HPLC-多波长指纹图谱可增加相似性分析所需的共有峰数量, 最大法选择多波长下重叠峰可放大药材加工过程中成分的精细变化, 因此可以作为药材加工过程中的质量控制手段。

参考文献

- [1] 朱梅芬, 刘向前, 吴柱熹, 等. 地黄的炮制对梓醇和 5-羟甲基糠醛含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1155-1157.
- [2] 温学森, 杨世林, 马小军, 等. 地黄在加工炮制过程中 HPLC 谱图的变化 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 153-156.
- [3] 李 军, 俞桂新, 张丽萍, 等. 不同产地清蒸熟地黄饮

- 片高效液相指纹图谱研究 [J]. 中医学报, 2011, 26(11): 1338-1340.
- [4] 曹建军, 梁宗锁, 杨东风, 等. 应用 HPLC 指纹图谱技术确定熟地黄炮制终点 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2556-2560.
- [5] 曾志, 杨东晖, 宋力飞, 等. 高效液相色谱指纹图谱应用于地黄的研究 [J]. 分析化学, 2003, 31(12): 1485-1488.
- [6] 贾玉梅, 段红福, 崔瑛, 等. 怀鲜地黄 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2011, 31(5): 729-733.
- [7] 孙国祥, 车磊, 李闰飞. 一种评价多波长中药色谱指纹图谱新方法——均谱法 [J]. 中南药学, 2011, 9(7): 533-538.
- [8] 孙国祥, 张静娴. 基于三波长融合谱的系统指纹定量法鉴定龙胆泻肝丸的真实质量 [J]. 色谱, 2009, 27(3): 318-322.
- [9] 孙国祥, 王玲娇. 基于双波长 HPLC 指纹谱的一级系统指纹定量法鉴定木香顺气丸质量 [J]. 化学学报, 2010, 68(18): 1903-1908.
- [10] Ma L J, Zhang X Z, Zhang H P, *et al.* Development of a fingerprint of *Salvia miltiorrhiza Bunge* by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 846(1/2): 139-146.
- [11] Fan X H, Cheng Y Y, Ye Z L, *et al.* Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 555(2): 217-224.
- [12] 崔瑛, 丁岗, 孙曙光, 等. 地黄不同提取部位 HPLC 指纹图谱实验研究 [J]. 河南中医学院学报, 2003, 18(4): 18-19.
- [13] Yu L, Sun S Q, Fan K F, *et al.* Research on processing medicinal herbs with multi-steps infrared macro-fingerprint method [J]. *Spectrochim Acta A*, 2005, 62(1/3): 22-29.