

熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究

陈素娟¹, 聂静¹, 张旗², 张艳秋¹, 杨芊芊¹, 高歌¹, 雷海民¹, 蔡程科¹, 李强^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 福建医科大学 药学院 天然药物学系, 福建 福州 350122

摘要: **目的** 制备熟地黄饮片标准汤剂, 并建立其质量标准。 **方法** 以水为提取溶剂, 参照标准化工艺制备了 15 批不同产地的熟地黄的标准汤剂, 测定毛蕊花糖苷, 计算出膏率, 并建立其 HPLC 指纹图谱分析方法。 **结果** 熟地黄标准汤剂中毛蕊花糖苷的质量浓度为 0.011~0.025 mg/mL, 出膏率为 40.19%~60.79%。指纹图谱包含 10 个共有峰, 通过对照品指认了 2 个, 分别是 5-羟甲基糠醛和毛蕊花糖苷, 对熟地黄标准汤剂指纹图谱的相似度进行评价, 其相似度均大于 0.9。 **结论** 本法简便, 精密度高, 重复性好, 可用于熟地黄标准汤剂的质量标准研究, 为熟地黄配方颗粒的质量控制提供参考。

关键词: 熟地黄; 熟地黄饮片标准汤剂; 5-羟甲基糠醛; 毛蕊花糖苷; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)09-2173-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.09.004

Quality standard on standard decoction of *Rehmanniae Radix Praeparata*

CHEN Su-juan¹, NIE Jing¹, ZHANG Qi², ZHANG Yan-qiu¹, YANG Qian-qian¹, GAO Ge¹, LEI Hai-min¹, CAI Cheng-ke¹, LI Qiang¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Natural Pharmaceutical Chemistry Department, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To prepare standard decoction of *Rehmanniae Radix Praeparata* and establish quality standard. **Methods** The 15 batches of *Rehmanniae Radix Praeparata* from various of habits were extracted with water according to the standardization process, and the contents of acteoside were determined, then its extract rates were calculated, and the analysis method of HPLC fingerprint was set up. **Results** The contents of acteoside in standard decoction of *Rehmanniae Radix Praeparata* were 0.011 — 0.025 mg/mL, and the extraction ratios ranged from 40.19% to 61.79%. The fingerprint contained 10 common peaks, and two of them were identified with standard substance, including 5-hydroxymethyl furfural and acteoside. The similarities of the fingerprint for the standard decoction of *Radix rehmanniae Praeparata* were analyzed and evaluated, and the similarities were more than 0.9. **Conclusion** This method is simple, accurate and reproducible, which can be applied to quality standard research on standard decoction of *Rehmanniae Radix Praeparata* and provide reference for the quality control of dispensing granules of *Rehmanniae Radix Praeparata*.

Key words: *Rehmanniae Radix Praeparata*; standard decoction of *Rehmanniae Radix Praeparata*; 5-hydroxymethyl furfural; acteoside; fingerprint; HPLC

熟地黄是由玄参科地黄属多年生草本植物地黄 *Rehmanniae glutinosa* Libosch. 的干燥块根经蒸制或加黄酒炖制而成^[1]。《本草图经》中记载, 熟地黄味甘, 微温, 归肝、肾经, 长于补血滋阴、益精填髓, 常被用于治疗精血不足和肝肾阴虚等症。现代药理研究表明, 熟地黄具有抗肿瘤、抗氧化、促进造血、提高记忆力等作用^[2-5]。近年来, 中药配方颗粒得到

广泛应用, 但用药剂量不统一、质量标准不明确等问题依旧存在, 严重影响了中药配方颗粒的疗效。国家药典委员会提出标准汤剂概念, 旨在提高中药配方颗粒的质量水平。中药饮片标准汤剂是以中医理论为指导、临床应用为基础, 参考现代提取方法, 经标准化工艺制备而成的单味中药饮片水煎剂^[6]。与饮片相比, 标准汤剂能够体现提取工艺的影响;

收稿日期: 2018-02-04

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制项目 (2011ZX09201-201-15)

作者简介: 陈素娟, 女, 湖北大冶人, 中药化学专业在读硕士。E-mail: 18101257025@163.com

*通信作者 李强 (1972—), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: lq_cn@126.com

与配方颗粒相比,标准汤剂没有辅料的干扰,更加接近临床上直接服用的汤剂^[7-8]。故要求中药配方颗粒进行的药学研究均应与标准汤剂进行比较,以保证配方颗粒与标准汤剂的质量一致性。

熟地黄作为一种常用中药,其配方颗粒的应用相当广泛。由于缺乏全面有效的质量控制标准,导致市售的熟地黄配方颗粒的质量不一致,疗效不稳定^[9]。本实验以《中药饮片标准汤剂研究策略》为指导原则^[6],制备了15批不同产地的熟地黄饮片标准汤剂,并对其进行含量测定和指纹图谱研究,考察熟地黄饮片标准汤剂的出膏率范围,建立其质量标准,进一步提高熟地黄配方颗粒的质量控制水平。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (G1315B DAD 检测器, G1316A 柱温箱, G1312A 泵, G1313A 自动进样系统), KQ-5200DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), BS124S 型万分之一分析天平 (Sartorius 公司)。

甲醇 (色谱纯, 批号 173533, 赛默飞世尔科技); 冰乙酸 (分析纯, 批号 20170831, 北京化工厂); 乙醇 (分析纯, 批号 20160708, 天津福晨化学试剂厂)。5-羟甲基糠醛 (质量分数≥99.2%, 批号 111626-201610)、毛蕊花糖苷 (质量分数≥95%, 批号 MUST-1702715) 对照品均购自北京绿百草科技发展有限公司。15批熟地黄饮片均为自购, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根, 信息见表1。

2 方法和结果

2.1 熟地黄饮片标准汤剂的制备

精密称取熟地黄饮片 100 g, 加 7 倍量的水, 浸泡 30 min, 加热煮沸后保持微沸 60 min, 滤过, 残渣再加 6 倍量水, 煮沸后保持微沸 40 min, 滤过, 合并 2 次煎煮液, 浓缩, 定容至 500 mL, 得到质量浓度为 0.2 g/mL 的原药材溶液, 即得熟地黄饮片标准汤剂。

2.2 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A) - 0.1% 乙酸 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 1.5% A; 2~20 min, 1.5%→20% A; 20~40 min, 20%→70% A; 40~45 min, 70%→95% A; 45~50 min, 95% A。检测波长 285 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 5 μL, 柱温 30 ℃。色谱图见图1。

表1 熟地饮片信息

Table 1 Informations for *Rehmanniae Radix Praeparata*

编号	产地	批号
S1	河南温县	1711001
S2	河南温县	1701001
S3	河南温县	1709001
S4	河南温县	1704003
S5	河南温县	1704002
S6	河南焦作	1711029
S7	河南焦作	170910001
S8	安徽亳州	1710310182
S9	河南武陟	171109
S10	河南武陟	171125
S11	山西襄汾	17102311
S12	山西襄汾	17102312
S13	山西襄汾	17102313
S14	山西襄汾	17102314
S15	山西襄汾	17102315

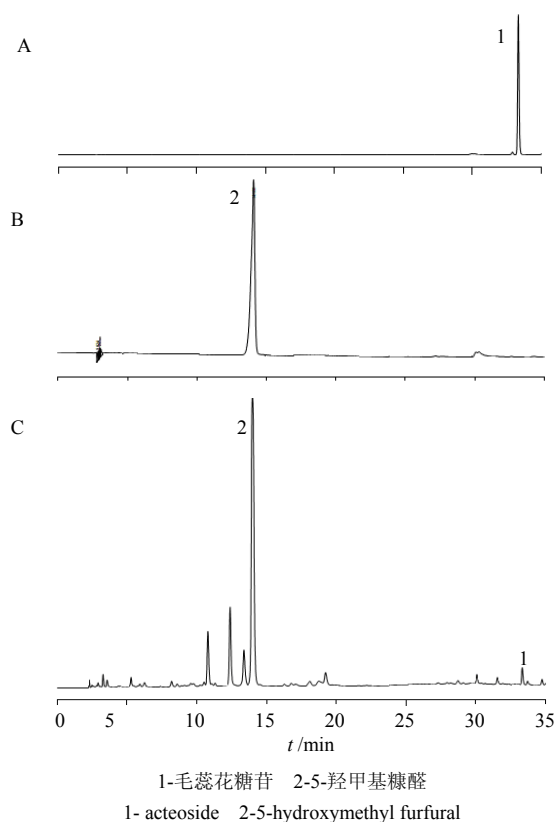


图1 毛蕊花糖苷对照品 (A)、5-羟甲基糠醛对照品 (B) 和熟地黄饮片标准汤剂 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of acteoside reference substance (A), 5-hydroxymethyl furfural reference substance (B), and standard decoction of *Rehmanniae Radix Praeparata*

2.3 对照品溶液的制备

精密称定毛蕊花糖苷和5-羟甲基糠醛对照品适量,分别置于10 mL量瓶中,加水溶解制成含毛蕊花糖苷0.2 mg/mL的对照品贮备液和含5-羟甲基糠醛0.01 mg/mL的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取熟地黄饮片标准汤剂,摇匀,精密吸取50 mL,减压浓缩至一定体积,加乙醇至体积分数为80%,静置过夜,滤过,滤液蒸干,残渣加水复溶,转移至10 mL量瓶中,超声处理30 min,取出,冷却,加水定容,摇匀,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液,即得熟地黄饮片标准汤剂供试品溶液。

2.5 线性关系考察

精密吸取对照品贮备液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,分别转移至2 mL量瓶中,加水至刻度,质量浓度分别为20、40、60、80、100、120 μg/mL。进样测定各成分的峰面积。以峰面积为纵坐标,质量为横坐标,计算得回归方程为 $Y=2\,210\,X-34.06$, $r=0.999\,4$,结果表明毛蕊花糖苷在0.10~0.60 μg与峰面积线性关系良好。

2.6 精密度试验

取批号1701001熟地黄饮片制备的标准汤剂供试品溶液,连续进样6次,测定毛蕊花糖苷峰面积,计算得其RSD值为1.3%。

2.7 稳定性试验

取批号1701001的熟地黄饮片制备的标准汤剂供试品溶液,分别于配制后0、2、4、8、16、24 h进样,测定毛蕊花糖苷峰面积,计算得其RSD值为1.7%,结果表明24 h内供试品溶液稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取批号1701001熟地黄饮片适量,平行制备6份标准汤剂,制备供试品溶液,进样测定毛蕊花糖苷峰面积,计算得其RSD值为2.6%。

2.9 回收率试验

精密称取批号1701001熟地黄饮片标准汤剂6份,分别精密加入与其相当量的80%、100%、120%的毛蕊花糖苷对照品,各平行两份,制备供试品溶液,测定含量,计算得毛蕊花糖苷的平均回收率为96.69%,RSD值为1.76%。

2.10 标准汤剂转移率

取15批次熟地黄饮片制备熟地黄饮片标准汤剂,分别制备供试品溶液,精密吸取5 μL进样,测定毛蕊花糖苷峰面积,计算熟地黄饮片标准汤剂中

毛蕊花糖苷的质量浓度,结果见表2。

2.11 标准汤剂出膏率

参照《中国药典》2015年版附录中的浸出物测定法进行,即取标准汤剂50 mL置已恒定质量的蒸发皿中,于100℃水浴蒸干,再放置105℃真空干燥箱中干燥至恒定质量,计算出膏率,结果见表2。

$$\text{出膏率} = (\text{干膏质量} \times \text{倍数}) / \text{药材质量}$$

2.12 熟地黄饮片中毛蕊花糖苷的测定

根据《中国药典》2015年版一部熟地黄项下规定对15批熟地黄中毛蕊花糖苷进行测定,见表2,均符合药典要求(毛蕊花糖苷含量 $\geq 0.02\%$)。

表2 熟地黄标准汤剂和饮片中指标的测定结果

Table 2 Results of indexes in *Radix Rehmanniae Praeparata* and its standard decoction

编号	熟地饮片中毛蕊花糖苷/%	标准汤剂中毛蕊花糖苷/(mg·mL ⁻¹)	出膏率/%
S1	0.047	0.025	46.81
S2	0.031	0.018	47.24
S3	0.029	0.017	49.53
S4	0.029	0.016	40.19
S5	0.031	0.016	44.10
S6	0.031	0.014	55.73
S7	0.038	0.022	55.04
S8	0.020	0.011	50.20
S9	0.028	0.013	61.79
S10	0.039	0.023	58.19
S11	0.032	0.019	43.54
S12	0.028	0.015	54.12
S13	0.030	0.018	56.47
S14	0.037	0.021	54.97
S15	0.028	0.013	53.82

2.13 HPLC 指纹图谱研究

2.13.1 指纹图谱的建立 准确吸取15批次熟地黄饮片标准汤剂供试品溶液5 μL注入HPLC色谱仪中,进样分析,记录指纹图谱色谱峰信息,见图2。生成的对照指纹图谱见图3。其中共有峰10个,用对照品对照指认了2个,分别是7号峰5-羟甲基糠醛、10号峰毛蕊花糖苷。

2.13.2 相对保留时间和相对峰面积 以保留时间相对稳定且峰面积较大的5-羟甲基糠醛(7号峰)的保留时间和峰面积为1.00,分别计算其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表3。

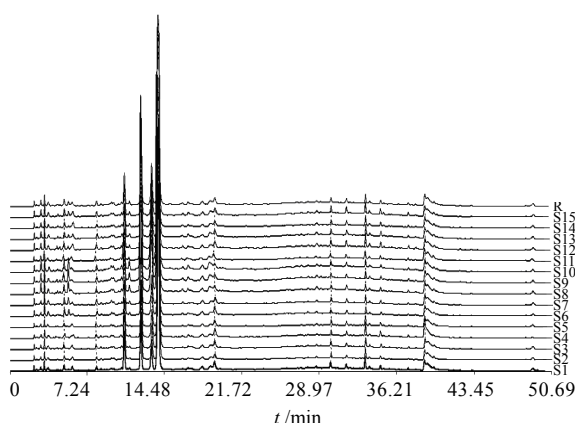


图2 熟地黄饮片标准汤剂的 HPLC 指纹图谱

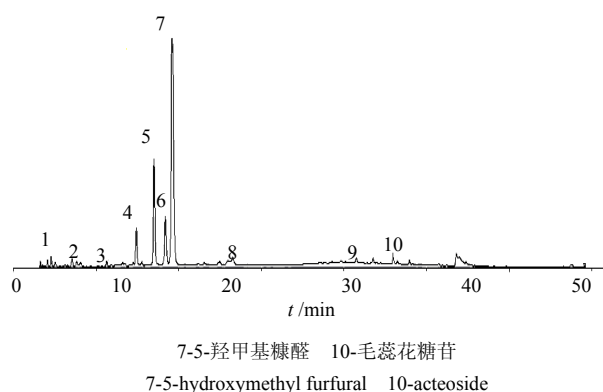
Fig. 2 HPLC fingerprint of standard decoction of *Rehmanniae Radix Praeparata*

图3 共用峰谱图和化学归属

Fig. 3 Common peaks spectrum and chemical attribution

表3 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积

Table 3 Relative retention time and relative peak area of each common peak

峰编号	相对保留时间	相对峰面积
1	0.24	0.02
2	0.37	0.02
3	0.59	0.01
4	0.77	0.09
5	0.89	0.30
6	0.96	0.15
7 (5-羟甲基糠醛)	1.00	1.00
8	1.38	0.03
9	2.16	0.02
10	2.40	0.02

2.13.3 指纹图谱相似度评价 将数据导入“中药指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)软件,进行

峰点校正和数据匹配,运用中位数法建立对照指纹图谱。计算 15 批待测指纹图谱与对照图谱的相似度。结果显示, S1: 0.998, S2: 0.997, S3: 0.998, S4: 0.992, S5: 0.997, S6: 0.999, S7: 0.999, S8: 0.978, S9: 0.973, S10: 0.971, S11: 0.999, S12: 0.998, S13: 0.997, S14: 0.997, S15: 0.996。相似度均大于 0.9, 符合要求。

3 讨论

实验选择的熟地黄经测定均符合《中国药典》2015 年版的规定(毛蕊花糖苷质量分数 $\geq 0.02\%$)。15 批熟地黄饮片标准汤剂中毛蕊花糖苷的质量浓度为 0.011~0.025 mg/mL, 即毛蕊花糖苷总质量分数为 0.005 6%~0.012 6%。有研究表明^[10-11], 毛蕊花糖苷不稳定, 在标准汤剂制备过程中含量会有所减少, 建议毛蕊花糖苷的质量浓度不少于 0.01 mg/mL 或质量分数不少于 0.005%, 可以作为熟地黄饮片标准汤剂的质量标准。

标准汤剂通过浓缩干燥得到干膏粉, 作为配方颗粒生产的中间体, 控制出膏率可解决因制备工艺或原药材质量不一造成的配方颗粒品质不一的问题。以平均出膏率(51.45%)的 75%~125%(38.59%~64.31%)作为出膏率的允许范围, 对产品进行质量控制^[12]。故建议以出膏率为 38%~64%为熟地黄饮片标准汤剂的出膏率允许范围。

中药治疗疾病机制为多成分的协同作用, 仅控制某一个成分难以全面控制质量。指纹图谱作为中药质量控制的一种分析手段, 具有操作简便、分析速度快的优点, 因此需根据指纹图谱的相似度、主成分峰的个数和相对保留时间、相对保留面积规定相应的参数进一步控制成品质量。本实验中相似度均 0.97 以上, 考虑大生产中因操作等原因造成误差, 建议熟地黄标准汤剂相似度应不低于 0.95。主成分峰个数应不少于 10 个。此外建议各主成分峰相对保留时间和相对峰面积可参照本实验中的相关参数。

本实验根据《中药饮片标准汤剂研究策略》中相关描述, 确定了标准汤剂制备的相应工艺参数, 制备了 15 批次不同产地的熟地黄饮片的标准汤剂, 建立了熟地黄饮片标准汤剂的制备工艺, 并从指标性成分的测定和转移率、出膏率和指纹图谱方面全面控制其质量, 结果表明该熟地黄饮片标准汤剂制备方法与临床基本一致、质量较稳定, 因此本实验建立的质量标准可为熟地黄配方颗粒的进一步质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 125-126.
- [2] 李乃谦. 熟地黄活性成分药理作用的研究进展 [J]. 中国处方药, 2017, 15(1): 14-15.
- [3] 朱妍, 徐畅. 熟地黄活性成分药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(11): 173-175.
- [4] Zhang X, Zhang A, Jiang B, *et al.* Further pharmacological evidence of the neuroprotective effect of catalpol from *Rehmannia glutinosa* [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(6/7): 484-490.
- [5] 黄霞. 熟地黄现代研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2004, 23(5): 25-26.
- [6] 陈士林, 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] 崔景朝, 赵自明. 中药配方颗粒研究进展(II)—中药单煎与合煎对比研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 240-245.
- [8] 李松林, 宋景政, 徐宏喜. 中药配方颗粒研究浅析 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 1-7.
- [9] 王科锋. 熟地配方颗粒质量标准研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(11): 40-41.
- [10] 吴培培, 闫明, 霍仕霞. 苯乙醇苷类化合物的研究进展 [J]. 医药导报, 2011, 30(10): 1316-1319.
- [11] 尚伟庆, 贺清辉, 张建军. 地黄炮制过程中毛蕊花糖苷变化的研究 [J]. 新中医, 2014, 46(5): 209-211.
- [12] 朱广伟, 李西文, 邬兰, 等. 赤芍饮片标准汤剂制备及质量标准研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2016, 18(12): 2062-2069.