

经典名方百合地黄汤物质基准制备及过程质量控制研究

周 菲^{1,2}, 林美斯³, 王 琳^{1,2}, 李 锐², 张春容², 赵 丽², 林大胜^{1,2*}, 曹 科^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都泰合健康科技股份有限公司, 四川 成都 611731

3. 成都中医药大学附属医院针灸学校, 四川 成都 610097

摘要: 目的 制备百合地黄汤物质基准, 进行制备过程工艺和质量控制分析, 评价其科学性和合理性。方法 按古籍方法制备 15 批物质基准, 测定制备过程中梓醇和毛蕊花糖苷的含量, 计算转移率和出膏率; 建立 HPLC 指纹图谱检测方法, 分别检测饮片、煎煮液、浓缩液和物质基准的指纹图谱, 进行共有色谱峰归属、指认和相似度评价。结果 15 批物质基准梓醇和毛蕊花糖苷转移率分别为 81.40%~92.88% 和 28.90%~41.41%, 出膏率为 36.06%~41.71%, 均未出现离散数据; 煎煮、浓缩和冻干过程有效成分转移率较稳定。标定物质基准指纹图谱共有峰 16 个, 其中 6 个归属于百合、9 个归属于地黄, 指认了 3 个色谱峰; 饮片、煎煮液、浓缩液和物质基准指纹图谱相似度均大于 0.9; 煎煮液、浓缩液、物质基准 3 者对照图谱的相似度均大于 0.99。结论 该指纹图谱检测方法合理可行, 能同时适用于饮片、中间体和物质基准; 物质基准制备工艺科学合理, 不会造成其物质基础明显改变。本实验为百合地黄汤制剂开发奠定了基础, 为经典名方物质基准制备过程工艺与质量评价提供了新思路。

关键词: 经典名方; 百合地黄汤; 物质基准; 制备工艺; 质量控制; 指纹图谱; 转移率; 出膏率; 梓醇; 毛蕊花糖苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)16-3824-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.013

Preparation and process quality control of substance benchmarks of classical famous prescription of Baihe Dihuang Decoction

ZHOU Fei^{1,2}, LIN Mei-si³, WANG Lin^{1,2}, LI Rui², ZHANG Chun-rong², ZHAO Li², LIN Da-sheng^{1,2}, CAO Ke²

1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources with Southwest Characteristics, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chengdu Taihe Health Technology Group Inc., Ltd., Chengdu 611731, China

3. School of Acupuncture and Moxibustion, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610097, China

Abstract: Objective To prepare substance benchmarks of Baihe Dihuang Decoction (BDD), and evaluate the scientificity and rationality of preparation process by analyzing the process quality. **Methods** Fifteen batches of substance benchmarks were prepared according to the ancient method, the content of catalpol and acteoside in the preparation process was determined, and the transfer rate and extractum rate were calculated. Fingerprints of 15 batches of decoction pieces, decoction, concentrate and substance benchmarks were detected by HPLC, and the common peaks of fingerprints were attributed and identified; In addition, the similarity of fingerprints were evaluated. **Results** In 15 batches of substance benchmarks, the transfer rates of catalpol and acteoside were 81.40%—92.88% and 28.90%—41.41% respectively, the extractum rate was 36.06%—41.71%, and without discrete data. During the process of decoction, concentration and freeze-drying, the transfer rates of effective components were stable. In the fingerprints of substance benchmarks, 16 common peaks were determined, of which six peaks belong to *Lilii Bulbus*, nine peaks belong to *Rehmanniae Radix*. Three peaks were identified. The similarity of fingerprints of decoction pieces, decoction, concentrate, and substance benchmarks were

收稿日期: 2019-05-06

基金项目: 四川省科技计划项目 (2018SZ0008)

作者简介: 周 菲 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药制剂与质量控制研究。Tel: 18284322874 E-mail: 1083709968@qq.com

*通信作者 林大胜 (1965—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药制剂与质量控制研究。Tel: 13608016081 E-mail: hoistlds@vip.sina.com

曹 科 (1978—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药制剂与质量控制研究。Tel: 17348051506 E-mail: alancc@163.com

all over 0.9. The similarity of reference fingerprints of decoction, concentrate, and substance benchmarks were over 0.99.

Conclusion The fingerprint method is reasonable and feasible, which can be used for simultaneously determining the fingerprint of decoction pieces, intermediates and substance benchmarks. The preparation process is scientific and reasonable, and will not change substance basis significantly. The paper establishes a foundation for the development of preparation of BDD, and provides a new idea for the evaluation of process and quality of the substance benchmarks of classical famous prescriptions.

Key words: classical famous prescriptions; Baihe Dihuang Decoction; substance benchmarks; preparation process; quality control; fingerprint; transfer rate; extractum rate; catalpol; acteoside

百合地黄汤 (Baihe Dihuang Decoction, BDD) 出自东汉·张仲景所著的《金匮要略·百合狐惑阴阳毒病脉证治》，全方 2 味，君以百合，养阴润肺、清心安神，佐以地黄清热凉血、养阴、生津，两药合用，共奏养阴清热、补益心肺之功效，主治百合病之心肺阴虚内热症，是治疗百合病的经典方剂^[1-3]。百合病病证与现代神经精神系统类疾病病症类似，主要表现为精神恍惚、神志不定、舌赤、尿黄等症状，现在临床上常用 BDD 及其加减方来治疗各种类型的抑郁症，疗效显著、安全性高^[4-7]，其抗抑郁的机制可能与抑制单胺氧化酶活性、调节 HPA 轴功能紊乱等有关^[8-9]。

经典名方有着悠久、丰富的用药历史，BDD 作为一首经典名方，目前仍有较好的临床价值。为了更好地传承并创新开发经典名方药物，2018 年 5 月，国家药品监督管理局颁布了《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》，提出了“物质基准”，是指衡量制剂与中医临床所使用的药用物质是否一致的中药药用物质标准^[10]，经典名方复方制剂的所有药学研究均须与物质基准进行对比，以确保与物质基准的关键质量属性一致。因此，BDD 物质基准制备过程的科学性与合理性评价，是 BDD 制剂开发的重点和难点。本实验采用道地产区的 15 批百合和地黄饮片，随机组合，以古籍记载的煎煮方法为依据进行物质基准的煎煮-浓缩-干燥工艺研究，同时，建立指纹图谱检测方法，并结合有效成分转移率、出膏率等技术指标，对工艺全过程进行质量评价分析，以期为 BDD 制剂的开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；Agilent 1260 高效液相色谱仪，美国安捷伦公司；XS205DU 型电子分析天平（精密度 0.01 mg/0.1 mg）、XS204 型电子分析天平（精密度 0.1 mg），瑞士 Mettler Toledo 公司；LYO-1 型冷冻干燥机，上海

东富龙科技有限公司；PCDX-JB-10 型超纯水机，成都品成科技有限公司。

1.2 试药

乙腈为色谱纯，美国 Fisher 公司；水为超纯水，自制；其他试剂均为分析纯。对照品毛蕊花糖苷（批号 11530-201713，质量分数 92.5%）、梓醇（批号 110808-201711，质量分数 99.6%）均购自中国食品药品检定研究院；对照品异毛蕊花糖苷（批号 PCL-#-Ve635，质量分数 99.47%）、地黄苷（PCL-#-Ma982，质量分数 98.0%）均购自英国 PureChem Land 公司。

15 批百合和地黄 2 味药材购自 3 个不同产地，经四川省药品质量研究所主任药师黎跃成鉴定，分别为百合科植物百合 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker 的干燥肉质鳞叶和玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根。药材经炮制得 15 批百合饮片和地黄饮片，具体信息见表 1，经检验，药材和饮片的水分、浸出物、含量等均符合《中国药典》2015 年版相关规定^[11]。

2 方法与结果

2.1 饮片的含量测定

按《中国药典》2015 年版一部“地黄”项下含量测定方法，测定地黄饮片中梓醇和毛蕊花糖苷的含量，结果见表 2。

2.2 BDD 物质基准的制备^[12-14]

称取百合饮片 30 g 于烧杯中，加水 400 mL，浸泡 30 min，置电炉上加热至沸后保持微沸 50 min，煎煮至约 200 mL，滤过，得百合煎液。称取地黄饮片 30 g 于烧杯中，加 9 倍量水，浸泡 30 min，置电炉上加热至沸后保持微沸 20 min，滤过；残渣加 7 倍量水，加热至沸后保持微沸 15 min，滤过，合并 2 次滤液约 200 mL，得地黄煎液。合并上述 2 种煎液，合煎至 300 mL，得 BDD 煎煮液。取煎煮液 200 mL 减压浓缩至约 40 g，定容至 50 mL，得浓缩液，冷冻干燥，即得 BDD 物质基准。

表 1 15 批百合饮片和地黄饮片产地信息

Table 1 Origin information of 15 batches of *Lilii Bulbus* and *Rehmanniae Radix* pieces

编号	BDD 物质基准批号	百合饮片		地黄饮片	
		批号	产地	批号	产地
S1	BDDWZJZ001	YF180702	江西万载县	YF180707	河南武陟大封镇
S2	BDDWZJZ002	YF180703		YF180706	河南武陟大封镇
S3	BDDWZJZ003	YF180704		YF180716	河南武陟大虹桥镇
S4	BDDWZJZ004	YF180705		YF180704	河南武陟北郭镇
S5	BDDWZJZ005	YF180706		YF180710	河南武陟大封镇
S6	BDDWZJZ006	YF180707	湖南武冈市	YF180708	河南武陟大封镇
S7	BDDWZJZ007	YF180708		YF180711	河南武陟大封镇
S8	BDDWZJZ008	YF180709		YF180703	河南武陟北郭镇
S9	BDDWZJZ009	YF180710		YF180713	河南武陟大虹桥镇
S10	BDDWZJZ010	YF180711		YF180712	河南武陟大封镇
S11	BDDWZJZ011	YF180713	湖南隆回县	YF180705	河南武陟北郭镇
S12	BDDWZJZ012	YF180714		YF180717	河南武陟大虹桥镇
S13	BDDWZJZ013	YF180715		YF180714	河南武陟大虹桥镇
S14	BDDWZJZ014	YF180716		YF180702	河南武陟北郭镇
S15	BDDWZJZ015	YF180717		YF180715	河南武陟大虹桥镇

表 2 饮片、中间体及物质基准中有效成分含量

Table 2 Content of effective components in decoction pieces, intermediates, and substance benchmarks

样品	地黄饮片/%		煎煮液/(mg·mL ⁻¹)		浓缩液/(mg·mL ⁻¹)		物质基准/%	
	梓醇	毛蕊花糖苷	梓醇	毛蕊花糖苷	梓醇	毛蕊花糖苷	梓醇	毛蕊花糖苷
S1	1.820	0.124	1.510	0.052	6.100	0.201	2.110	0.070
S2	1.800	0.141	1.630	0.042	6.360	0.168	2.200	0.057
S3	1.700	0.135	1.440	0.044	5.700	0.186	2.030	0.065
S4	1.810	0.123	1.570	0.052	6.180	0.193	2.120	0.064
S5	1.770	0.121	1.710	0.039	6.610	0.155	2.290	0.053
S6	2.060	0.108	1.630	0.046	6.670	0.174	2.360	0.058
S7	1.770	0.116	1.720	0.047	6.660	0.191	2.220	0.067
S8	1.630	0.118	1.530	0.041	5.860	0.177	1.950	0.059
S9	1.710	0.121	1.550	0.042	6.060	0.166	2.130	0.057
S10	1.880	0.135	1.610	0.048	6.480	0.188	2.240	0.066
S11	1.650	0.136	1.490	0.045	5.820	0.170	2.030	0.057
S12	1.800	0.140	1.540	0.049	6.140	0.196	2.160	0.063
S13	1.740	0.135	1.590	0.042	6.480	0.156	2.160	0.054
S14	1.700	0.128	1.540	0.041	6.120	0.162	2.110	0.058
S15	1.770	0.137	1.600	0.044	6.220	0.173	2.100	0.059
平均值	1.770	0.128	1.580	0.045	6.230	0.177	2.150	0.060
RSD/%	5.64	7.52	4.83	9.09	4.93	8.33	4.90	8.31

2.3 物质基准制备过程中有效成分的含量及出膏率的测定

2.3.1 梓醇的含量测定

(1) 色谱条件: 采用 Agilent1260 高效液相色谱

仪, Ultimate LP-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1%磷酸水溶液 (1:99) 为流动相; 进样量 10 μL; 检测波长 210 nm; 柱温 30 ℃; 理论板数按梓醇峰计算不低于 5 000。

(2) 对照品溶液的制备: 取梓醇对照品适量, 精密称定, 加流动相制成含梓醇 100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 即得。

(3) 供试品溶液的制备: ①煎煮液: 精密量取 BDD 煎煮液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。②浓缩液: 精密量取 BDD 浓缩液 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。③物质基准: 取 BDD 物质基准约 0.7 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相 80 mL 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 10 min 使溶解, 取出, 放冷, 定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

(4) 方法学考察: 对该方法进行方法学考察, 结果表明该方法精密度、重复性和稳定性良好; 以梓醇峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得线性回归方程 $Y=2.4368X+11.783$, $r=0.9999$, 梓醇在 7.93~507.71 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 梓醇的加样回收率在 96.8%~100.5%, RSD 为 2.3%, 该方法准确度良好。

(5) 样品测定: 对供试品溶液进行梓醇含量测定, 计算转移率(转移率=样品中梓醇量/饮片中梓醇量), 结果见表 2、3。

2.3.2 毛蕊花糖苷的含量测定

(1) 色谱条件: 采用 Waters e2695 高效液相色谱

表 3 物质基准制备过程中有效成分转移率及出膏率

Table 3 Extractum rates and transfer rates of effective components in preparation process of substance benchmarks

样品	煎煮液转移率/%		浓缩液转移率/%		物质基准转移率/%		出膏率/%
	梓醇	毛蕊花糖苷	梓醇	毛蕊花糖苷	梓醇	毛蕊花糖苷	
S1	82.42	42.18	83.52	40.32	83.77	40.99	38.24
S2	90.56	29.43	88.33	29.79	87.91	28.90	37.53
S3	84.12	32.59	82.94	34.15	84.31	34.04	36.06
S4	86.19	42.28	85.08	39.19	84.98	37.92	38.55
S5	95.48	31.65	92.09	31.57	92.88	31.50	36.91
S6	78.16	41.94	80.10	39.91	81.40	38.14	40.02
S7	96.61	40.17	93.79	41.03	89.56	41.41	38.72
S8	93.25	34.75	89.57	37.29	87.42	36.69	39.55
S9	90.06	34.96	88.30	34.13	89.53	34.05	36.12
S10	85.11	35.26	85.64	34.67	85.55	35.03	39.43
S11	90.30	33.31	87.88	31.10	89.26	30.30	40.51
S12	84.44	33.38	84.44	33.45	86.58	32.37	41.71
S13	91.38	31.11	93.10	28.89	90.52	28.99	38.62
S14	90.59	31.88	90.00	31.64	89.06	32.50	37.33
S15	89.83	32.34	87.57	31.39	85.32	31.02	36.58
平均值	88.57	35.15	87.49	34.57	87.20	34.26	38.39
RSD/%	5.71	12.37	4.47	11.69	3.35	11.39	4.18

谱仪, XSelect HSS T3 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1%醋酸水溶液(16:84)为流动相; 进样量 20 μL ; 检测波长 334 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 理论板数按毛蕊花糖苷峰计算不低于 5 000。

(2) 对照品溶液的制备: 取毛蕊花糖苷对照品适量, 精密称定, 加流动相制成含毛蕊花糖苷 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 即得。

(3) 供试品溶液的制备: ①煎煮液: 精密量取 BDD 煎煮液 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻

度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。②浓缩液: 精密量取 BDD 浓缩液 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。③物质基准: 取 BDD 物质基准约 0.7 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 35 mL 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 10 min 使溶解, 取出, 放冷, 定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

(4) 方法学考察: 对该方法进行方法学考察, 结果表明该方法精密度、重复性和稳定性良好; 以

毛蕊花糖苷峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得线性回归方程 $Y=36.249X-9.7553$, $r=1.000$,毛蕊花糖苷在 $1.53\sim 192.03\text{ }\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好,毛蕊花糖苷的加样回收率在 $97.9\%\sim 103.0\%$,RSD为 1.8% ,该方法准确度良好。

(5) 样品测定:对供试品溶液进行毛蕊花糖苷含量测定,计算转移率(转移率=样品中毛蕊花糖苷量/饮片中毛蕊花糖苷量),结果见表2、3。

2.3.3 出膏率的测定 测定15批物质基准的出膏率(出膏率=物质基准干膏质量/饮片投料量),结果见表3。

结果显示,地黄饮片梓醇和毛蕊花糖苷平均含量分别为 1.77% 和 0.128% ,RSD分别为 5.64% 和 7.52% ,说明道地产区不同产地药材炮制所得地黄饮片有效成分含量无明显差异。

煎煮液、浓缩液和物质基准中,梓醇平均转移率分别为 88.57% 、 87.79% 和 87.20% ,RSD分别为 5.71% 、 4.47% 和 3.35% ;毛蕊花糖苷平均转移率分别为 35.15% 、 34.57% 和 34.26% ,RSD分别为 12.37% 、 11.69% 和 11.39% 。因提取溶剂为水,梓醇极性较强而转移率较高,毛蕊花糖苷极性偏弱而转移率偏低;考虑地黄饮片中毛蕊花糖苷含量较低,其转移率波动可基本接受,说明煎煮、浓缩和冻干工艺较稳定,未造成有效成分的明显损失。

15批物质基准梓醇和毛蕊花糖苷平均质量分数分别为 2.15% 、 0.060% ,RSD分别为 4.90% 、 8.31% ,平均出膏率为 38.39% ,RSD为 4.18% ,未出现离散数据(均值的 $70\%\sim 130\%$ 以外)^[15],说明该制备工艺较合理,未造成明显的批间差异。

2.4 HPLC 指纹图谱分析

2.4.1 供试品溶液的制备

(1) 饮片供试品溶液:分别取百合煎液、地黄煎液,加水定容至 300 mL ,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

(2) 煎煮液:取BDD煎煮液,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

(3) 浓缩液:精密量取浓缩液 2 mL ,置 10 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

(4) 物质基准:取干燥粉末 0.7 g ,至 10 mL 量瓶中,加水使溶解,定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.2 混合对照品溶液的制备

分别取毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、地黄苷对照品适量,精密称定,加流动相制成分别含毛蕊花糖苷 $16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、异毛蕊花糖苷 $35\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、地黄苷 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,即得。

2.4.3 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱为Waters Symmetry C_{18} 柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流动相为乙腈- 0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱: $0\sim 10\text{ min}$, $5\%\sim 11\%$ 乙腈; $10\sim 25\text{ min}$, $11\%\sim 12\%$ 乙腈; $25\sim 37\text{ min}$, 12% 乙腈; $37\sim 44\text{ min}$, $12\%\sim 16\%$ 乙腈; $44\sim 50\text{ min}$, $16\%\sim 18\%$ 乙腈; $50\sim 53\text{ min}$, $18\%\sim 22\%$ 乙腈; $53\sim 58\text{ min}$, $22\%\sim 24\%$ 乙腈; $58\sim 65\text{ min}$, $24\%\sim 36\%$ 乙腈; $65\sim 68\text{ min}$, $36\%\sim 42\%$ 乙腈;检测波长 315 nm ;体积流量 1.0 mL/min ;柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$;进样量 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。精密吸取空白溶液、混合对照品溶液和物质基准供试品溶液各 $30\text{ }\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,测定,记录色谱图,结果见图1。

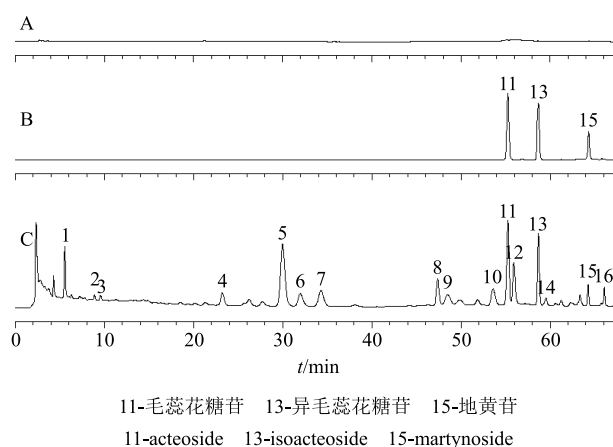


图1 空白对照(A)、混合对照品(B)和物质基准供试品(C)溶液的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC of blank control (A), mixed reference substances (B), and substance benchmarks (C)

2.4.4 精密度考察 取同一物质基准供试品溶液(批号BDDWZJZ011),按“2.4.3”项下色谱条件,连续进样6次,记录色谱图。以异毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD $<0.43\%$,相对峰面积的RSD $<1.83\%$,表明仪器精密度良好^[13]。

2.4.5 稳定性考察 取同一物质基准供试品溶液(批号BDDWZJZ011),按“2.4.3”项下色谱条件,分别在 0 、 2 、 4 、 8 、 12 、 24 h 时进样测定,记录色谱图。以异毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD $<1.11\%$,相对峰面积的RSD $<4.43\%$,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳

定性良好。

2.4.6 重复性考察 平行制备 6 份物质基准供试品 (批号 BDDWZJZ011), 按“2.4.3”项下色谱条件测定, 记录色谱图。以异毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的 $RSD < 0.61\%$, 相对峰面积的 $RSD < 4.58\%$, 表明该方法重复性良好。

2.4.7 样品检测与分析 取 15 批百合饮片、地黄饮片、BDD 煎煮液、浓缩液和物质基准, 按“2.4.1”

项下方法制备供试品溶液, 按“2.4.3”项下色谱条件分别测定, 记录色谱图。将样品色谱图导入中药指纹图谱相似度评价系统软件 (国家药典委员会, 2012A) 中, 采用平均数法, 时间窗为 0.1 min, 进行色谱峰匹配及相似度分析, 结果见图 2 和表 4、5。

结果显示, 15 批物质基准指纹图谱中, 发现 16 个共有峰, 其中 6 个色谱峰 (4~6、9、10、12 号峰) 归属于百合饮片, 占百合饮片总峰面积 85.11%,

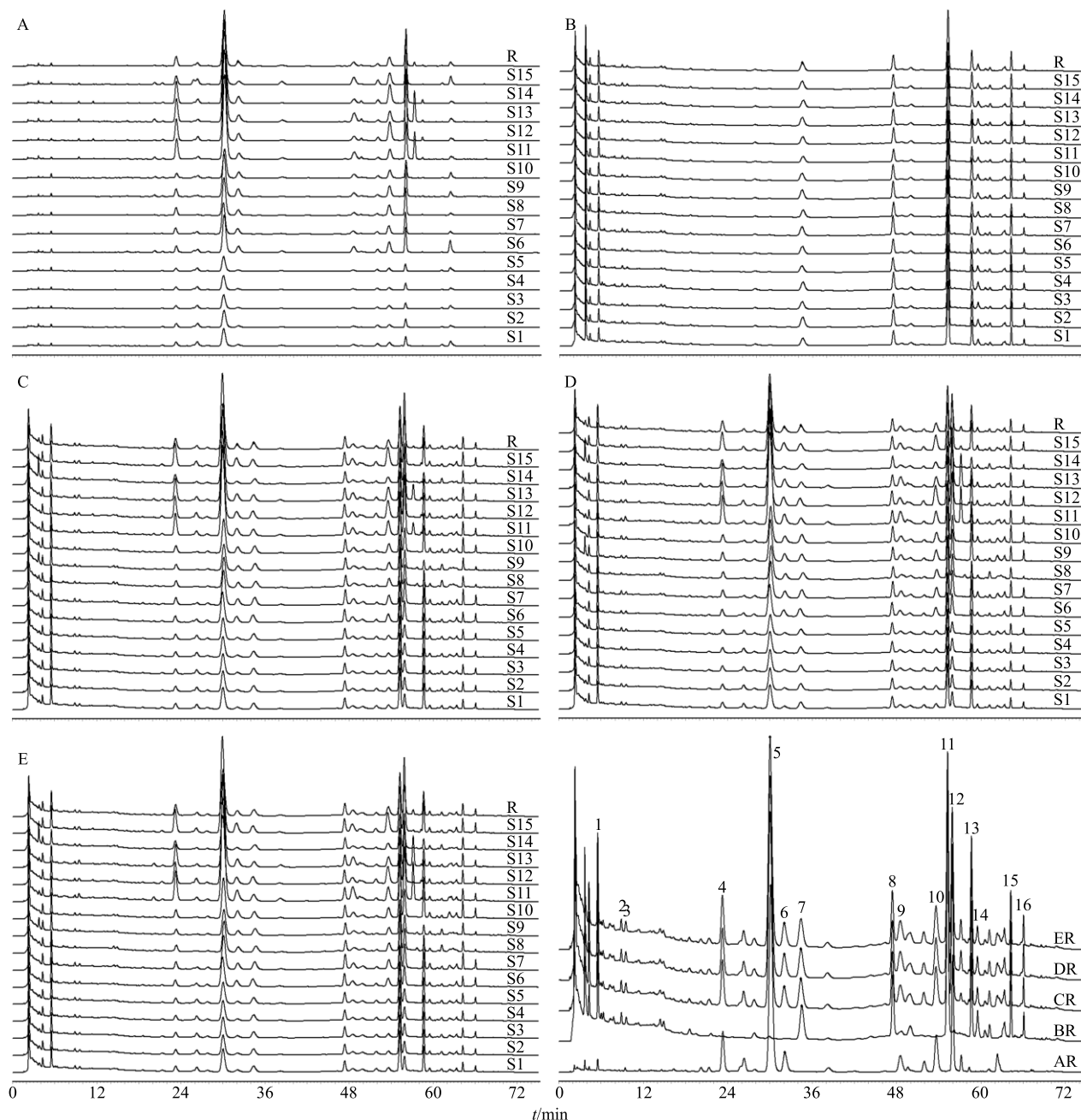


图 2 15 批百合饮片 (A)、地黄饮片 (B)、BDD 煎煮液 (C)、浓缩液 (D) 和物质基准 (E) 的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (AR、BR、CR、DR、ER)

Fig. 2 HPLC fingerprints of 15 batches of *Lilii Bulbus* (A), *Rehmanniae Radix* (B), BDD decoction (C), concentrate (D), and substance benchmarks (E), and their control fingerprints (AR, BR, CR, DR, ER)

表 4 饮片、中间体、物质基准与各自对照指纹图谱的相似度

Table 4 Similarities of decoction pieces, intermediates and substance benchmarks by comparing with their respective reference fingerprints

编号	相似度					编号	相似度				
	百合饮片	地黄饮片	煎煮液	浓缩液	物质基准		百合饮片	地黄饮片	煎煮液	浓缩液	物质基准
S1	0.976	0.997	0.946	0.950	0.947	S9	0.993	0.998	0.973	0.971	0.968
S2	0.984	0.996	0.939	0.940	0.926	S10	0.989	0.998	0.976	0.966	0.969
S3	0.977	0.999	0.939	0.940	0.930	S11	0.987	0.994	0.969	0.947	0.950
S4	0.984	0.996	0.938	0.939	0.929	S12	0.995	0.996	0.972	0.968	0.974
S5	0.974	0.998	0.942	0.928	0.934	S13	0.988	0.994	0.966	0.952	0.959
S6	0.981	0.997	0.963	0.962	0.964	S14	0.994	0.997	0.983	0.980	0.981
S7	0.995	0.997	0.967	0.967	0.959	S15	0.993	0.991	0.971	0.984	0.973
S8	0.993	0.993	0.979	0.977	0.958						

表 5 饮片、中间体、物质基准特征峰相对保留时间和相对峰面积

Table 5 Relative retention time and relative peak area of characteristic peaks in decoction pieces, intermediates, and substance benchmarks

色谱峰 编号	相对保留时间					相对峰面积				
	百合饮片	地黄饮片	煎煮液	浓缩液	物质基准	百合饮片	地黄饮片	煎煮液	浓缩液	物质基准
1	0.184	0.095	0.095	0.094	0.095	0.017	0.548	0.727	0.736	0.665
2	—	0.152	0.153	0.152	0.152	—	0.101	0.098	0.084	0.086
3	—	0.164	0.163	0.163	0.163	—	0.097	0.101	0.105	0.102
4	0.774	—	0.398	0.397	0.397	0.161	—	0.881	0.893	0.866
5	1.000	—	0.512	0.512	0.513	1.000	—	5.316	4.983	4.865
6	1.067	—	0.546	0.547	0.546	0.104	—	0.651	0.599	0.595
7	—	0.589	0.588	0.587	0.587	—	1.063	0.835	0.700	0.698
8	—	0.810	0.808	0.808	0.808	—	1.126	0.915	0.787	0.786
9	1.611	—	0.827	0.827	0.827	0.088	—	0.610	0.608	0.606
10	1.780	—	0.916	0.914	0.914	0.173	—	1.023	0.865	0.772
11		0.942	0.942	0.943	0.942	—	3.700	2.613	2.317	2.289
12	1.858	—	0.953	0.954	0.953	0.320	—	1.926	1.709	1.711
13	—	1.000	1.000	1.000	1.000	—	1.000	1.000	1.000	1.000
14	—	1.015	1.015	1.014	1.015	—	0.430	0.244	0.204	0.216
15	—	1.096	1.095	1.096	1.095	—	0.728	0.467	0.371	0.389
16	—	1.127	1.126	1.126	1.126	—	0.412	0.244	0.226	0.240

占物质基准总峰面积 52.44%；9 个色谱峰（2、3、7、8、11、13~16 号峰）归属于地黄饮片，占地黄饮片总峰面积 74.03%，占物质基准总峰面积 37.67%，并确认 11、13 和 15 号色谱峰分别为毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和地黄苷。表明，BDD 物质基准的主要物质群均可清晰地追溯到饮片，归属明确。选取分离度较好的异毛蕊花糖苷色谱峰作为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间 $RSD < 0.42\%$ ，相对峰面积 RSD 为 15.29%~70.41%。

15 批百合饮片、地黄饮片、煎煮液、浓缩液和物质基准指纹图谱与各自的对照指纹图谱相似度均 > 0.9 。表明不同产地不同批次饮片的主要物质群差异较小；煎煮液、浓缩液和物质基准各自的物质群较稳定，说明煎煮、浓缩和干燥工艺较科学、合理。煎煮液、浓缩液、物质基准 3 者对照图谱的相似度均 > 0.99 ，各共有峰相对保留时间基本一致，相对峰面积无明显变化。可见在物质基准制备过程中，主要物质群从饮片-煎煮液-浓缩液-物质基准能

逐级完整传递,且浓缩和干燥工艺未造成主要物质群峰面积明显丢失,说明物质基准制备过程整体工艺较科学、合理。

3 讨论

3.1 物质基准制备工艺合理性

《金匱要略》中 BDD 的原方为“百合(七枚,擘)、生地黄汁(一升);右以水洗百合,渍一宿,当白沫出,出其水,更以泉水二升,煎取一升,去滓,内地黄汁,煎取一升五合,分温再服。”经考证,方中“一升”约为现代 200 mL,“五合”约为现代 100 mL^[16]。方中生地黄汁为鲜地黄蒸炙后绞汁^[17],由于其炮制方法复杂,且现代临床少用,课题组前期研究发现鲜地黄汁与生地黄煎液物质基础基本一致,故以生地黄煎液替代鲜地黄汁入药。方中百合、生地黄用量由古籍考证结合现代中医临床使用情况,并经专家共识后得出。

本实验在 BDD 物质基准的制备工艺研究中,始终以古籍记载的煎煮方法为依据,以饮片-煎煮液-浓缩液-物质基准中主要物质群的量值传递关系为核心^[18],以有效成分转移率、出膏率等技术经济指标为支撑,开展制备过程的工艺和质量控制研究,以确保制备工艺的科学性和物质基准的批间质量一致性及可追溯性。

3.2 指标成分的选择

研究发现,BDD 中含有百合皂苷、岷江百合苷 D、谷氨酸、腺苷、多糖等多种活性成分^[19-20],百合中活性成分主要为甾体皂苷和多糖类,地黄中活性成分为梓醇、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、多糖等^[21-23]。本实验以梓醇和毛蕊花糖苷为指标成分,可将物质基准的质量控制与活性关联。实验后期将采用紫外-可见分光光度法对物质基准中百合皂苷及总多糖进行质量控制研究,以更全面地控制 BDD 物质基准的质量。

3.3 指纹图谱条件考察

实验中比较不同生产厂家(Waters、Shimadzu、Agilent)色谱柱的分离效果,对流动相、柱温、体积流量等色谱条件进行了反复考察,根据色谱峰的数量、峰形及分离度,最终以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。采用二极管阵列检测器(DAD 检测器)对物质基准供试品溶液进行全波长扫描,分析三维图谱,比较 210、230、280、315、334 nm 波长下的色谱图,结果在 315 nm 时,色谱峰较多,且响应值较高,故以 315 nm 作

为检测波长。

3.4 指纹图谱相似度评价分析

15 批物质基准指纹图谱中,共有峰相对峰面积变化较大,主要是 3 个产地的百合饮片含量差异较大,百合饮片总峰面积为隆回县>武冈市>万载县。因此,在经典名方及其他中药新药的研发中,首先应控制原药材质量的均一性,若药材因产地不同而质量差异较大时,可固定产地或控制药材的含量限度范围,并且在生产中可采取饮片均化投料的方法,以控制中成药质量的均一性和稳定性,从而确保其临床疗效的稳健发挥。

3.5 应用

本实验建立了同时适合于 BDD 饮片、中间体及物质基准的指纹图谱检测方法,该方法合理可行、重复性好,能较全面地展示饮片和物质基准中的主要物质群。物质基准制备工艺整体较科学、合理,过程工艺不会造成其物质基础的明显改变,制得的物质基准质量稳定、批间差异小,为 BDD 复方制剂的开发及一致性评价奠定了基础,也为经典名方物质基准制备过程工艺与质量评价提供了新思路。

参考文献

- [1] 元·赵以德.金匱方论衍义 [M].北京:中医古籍出版社,2012.
- [2] 清·张璐.千金方衍义 [M].北京:中国中医药出版社,1998.
- [3] 丁腾,孙宇宏,杜霞,等.经典名方百合地黄汤的化学成分与网络药理学研究 [J].中草药,2019,50(8):1848-1856.
- [4] 强亚,武嫣斐.百合地黄汤治疗阈下抑郁 48 例临床观察 [J].中西医结合心脑血管病杂志,2015,13(2):256-257.
- [5] 徐文君,吴国伟,胡云英.百合地黄汤加减治疗老年抑郁症 32 例 [J].浙江中西医结合杂志,2001,11(3):157-158.
- [6] 孟彦,贾怡,武嫣斐,等.百合地黄汤在神经精神系统中的应用研究进展 [J].中草药,2018,49(1):251-255.
- [7] 郭利红,姚华强,康震.百合地黄汤治疗更年期抑郁症的临床疗效及对神经内分泌系统的影响 [J].中医药导报,2016,22(8):70-72.
- [8] 薛剑,李冀.百合地黄汤对抑郁模型大鼠行为及海马内单胺类神经递质和单胺氧化酶含量的影响 [J].中医药学报,2018,46(1):109-111.
- [9] D'Aquila P S, Collu M, Gessa G L, et al. The role of

- dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 405(1/3): 365-373.
- [10] 国家药品监督管理局. 关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理的规定的公告 [EB/OL]. 2018-06-01. <http://cnda.cfda.gov.cn/WS04/CL2050/228247.html>. 2018-05-29/2018-06-01.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求 (征求意见稿) [S]. 2016.
- [13] 医疗机构中药煎药室管理规范 [S]. 2009.
- [14] 赵 丹. 国家食药监总局发布经典名方简化注册审批管理规定征求意见稿 [J]. 中医药管理杂志, 2017, 25(20): 190.
- [15] 刘 冲, 刘荫贞, 乐智勇, 等. 桂枝饮片标准汤剂质量标准研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1577-1583.
- [16] 李宇航, 郭明章, 孙 燕, 等. 仲景方用药度量衡古今折算标准研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(9): 597-600.
- [17] 汉·张仲景. 金匱要略方论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [18] 唐晓章, 林美斯, 周 菲, 等. 经典名方芍药甘草汤的物质基准量值传递分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 62-69.
- [19] 彭修娟, 杨新杰, 陈衍斌, 等. 基于中药整合药理学平台的百合地黄汤治疗抑郁症的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1338-1344.
- [20] Zhang X Y, Han X L, Qian Z B. Study on optimization of extraction process of saponins from *Bulbus Lili* and their antidepressant effects [J]. *Asian J Chem*, 2014, 26(18): 5970-5972.
- [21] 刘 鹏, 林志健, 张 冰. 百合的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 201-211.
- [22] Xia Z, Wang F, Zhou S, *et al*. Catalpol protects synaptic proteins from beta-amyloid induced neuron injury and improves cognitive functions in aged rats [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 69303-69315.
- [23] 沈华旦, 方江济, 郭鹏程, 等. 基于 HPLC-UV-DPPH 法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 582-588.