

• 药剂与工艺 •

辅料砂仁、陈皮对熟地黄炮制前后化学成分的影响研究

陈青焱¹, 王小平², 雷 星¹, 高亚珍¹, 徐 杰¹, 王梁凤¹, 王 芳^{1*}, 杨 明^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 漳州卫生职业学院, 福建 漳州 363000

摘 要: 目的 分析不同砂仁陈皮制熟地黄炮制前后的化学成分含量变化, 探讨辅料砂仁、陈皮在熟地黄加工过程中的炮制作用。方法 采用 HPLC 法建立生地黄、砂仁陈皮制熟地黄及缺不同辅料熟地黄炮制品图谱, 结合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)、SPSS 21.0、SIMCA 14.1 软件进行分析, 并对 7 个非糖成分(梓醇、地黄苷 D、5-羟甲基糠醛、益母草苷、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、橙皮苷)和 8 个糖类成分(D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、毛蕊花糖)进行含量测定。结果 生地黄、砂仁陈皮制熟地黄与缺不同辅料砂仁陈皮制熟地黄炮制品在成分空间上存在差异; 含量测定结果表明, 生地黄炮制后, 单糖含量增加, 寡糖、苷类含量总体呈减少趋势, 生、熟地黄之间以及佐以砂仁、陈皮都使地黄成分含量存在差别, 且砂仁陈皮制熟地黄中 D-果糖、葡萄糖、甘露三糖含量相较于砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁、缺陈皮)分别增加了 29.24%、57.14%、44.65%。结论 辅料砂仁、陈皮的加入是其化学成分含量变化的重要因素, 为阐述砂仁陈皮制熟地黄的炮制机制提供依据。

关键词: 熟地黄; 砂仁; 陈皮; 中药炮制; 梓醇; 地黄苷 D; 5-羟甲基糠醛; 益母草苷; 毛蕊花糖苷; 异类叶升麻苷; 橙皮苷; D-果糖; 葡萄糖; 蔗糖; 蜜二糖; 棉子糖; 甘露三糖; 水苏糖; 毛蕊花糖

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6168-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.006

Effects of *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium* on chemical composition in *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata*

CHEN Qing-yao¹, WANG Xiao-ping², LEI Xing¹, GAO Ya-zhen¹, XU Jie¹, WANG Liang-feng¹, WANG Fang¹, YANG Ming¹

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 analyze the changes in the chemical composition content of Dihuang (*Rehmanniae Radix*, RR) before and after processing with different auxiliary materials *Amomi Fructus* (AF) and *Citri Reticulatae Pericarpium* (CRP), so as to explore the influence of auxiliary materials AF and CRP in the processing of Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*, RRP). **Methods** The fingerprints of RR, RRP and RRP with different lack of auxiliary materials were established by HPLC, combined with the "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM" (2012 version), SPSS 21.0 and SIMCA 14.1 software to analyze the fingerprints. The content of seven non-sugar components (catalpol, rehmannioside D, 5-hydroxymethyl furfural, leonuride, verbascoside, isoacteoside and hesperidin) and eight sugar components (D-fructose, glucose, sucrose, melibiose, raffinose, manninotriose, stachyose and verbascoside) were determined. **Results** There were differences in composition space between RR, AF

收稿日期: 2021-05-23

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1707200); 国家自然科学基金资助项目(81960714); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(闽教科[2017]52号); 漳州卫生职业学院科技创新团队(kjcx-5)

作者简介: 陈青焱(1997—), 女, 在读硕士, 主要研究方向为中药新剂型研究。Tel: 15979181859 E-mail: 1793224314@qq.com

*通信作者: 杨 明(1962—), 男, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: yangming16@126.com

王 芳(1983—), 女, 博士, 副教授, 从事中药制剂学研究。E-mail: cat689apple@163.com

and CRP on RRP and AF and CRP on RRP with different lack of auxiliary materials, and the content determination results showed that the content of monosaccharide increased in RR after processing, while the content of oligosaccharides and glycosides decreased after processing, the processing and auxiliary materials changed the composition content, the content of *D*-fructose, glucose and mannitriose in AF and CRP on RRP increased by 29.24%, 57.14%, and 44.65% respectively compared with that of AF and CRP on RRP (without AF or CRP). **Conclusion** The auxiliary materials AF and CRP affect the chemical composition changes of RR before and after processing. It provides a basis for elucidating the processing mechanism of AF and CRP on RRP.

Key words: *Rehmanniae Radix Praeparata*; *Amomi Fructus*; *Citri Reticulatae Pericarpium*; traditional Chinese medicine processing; catalpol; rehmannioside D; 5-hydroxymethyl furfural; leonuride; verbascoside; isoacteoside; hesperidin; *D*-fructose; glucose; sucrose; melibiose; raffinose; manninotriose; stachyose; verbascose

熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata* (RRP) 为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的炮制加工品。地黄 *Rehmanniae Radix* (RR) 炮制成熟地黄, 其性味由甘、寒转为甘、微温, 功能与主治由清热凉血、养阴生津转为补血滋阴、益精填髓^[1]。《药品化义》:“因肝苦急, 用甘缓之, 兼主温胆, 能益心血, 更补肾水。凡内伤不足, 苦志劳神, 忧患伤血, 纵欲耗精, 调经胎产, 皆宜用此”。因熟地黄味厚, 质黏腻, 而易碍胃助湿, 《顾松园医镜·本草必用》:“熟者性滞, 若痰多气郁之人, 能窒碍胸膈”, 现代研究亦表明, 熟地黄易引起滋腻碍胃现象^[2]。砂仁陈皮制地黄是江西建昌帮特色炮制品种, 经砂仁 *Amomi Fructus* (AF)、陈皮 *Citri Reticulatae Pericarpium* (CRP)、黄酒制后, 取砂仁、陈皮辛温香窜之气, 疏地黄之滞, 纠熟地滋腻碍脾之弊^[3]。目前, 辅料砂仁、陈皮对地黄内含化学成分的具体影响尚无研究报道。熟地黄主要的药理作用是调节免疫、影响血液系统功能, 其药效活性物质主要包括环烯醚萜类、苯乙醇苷类及糖类等成分^[4]。本实验采用 HPLC 法建立砂仁陈皮制熟地黄及不同缺辅料熟地黄炮制品图谱, 运用化学模式识别手段分析不同炮制品之间的差异情况, 并对其炮制前后主要药效活性物质环烯醚萜类、苯乙醇苷类及糖类成分进行含量测定, 以期明确辅料砂仁、陈皮对熟地黄内含化学成分的具体影响, 为阐明砂仁陈皮制熟地黄的炮制机制提供依据。

1 材料

LC-20AD_{XR} 型高效液相色谱仪、ELSD-LT II 低温型蒸发光散射检测器, 日本岛津公司; XSE205DR 梅特勒电子天平, 德国 Mettler-Toledo 公司; D24UV 纯水超纯水一体化机, 默克密理博公司; ZKF040 型真空干燥箱, 上海实验仪器厂有限公司。

生地黄 (产地河南, 批号 191115)、砂仁 (产地云南, 批号 180627)、陈皮 (产地浙江, 批号 200801-

2), 均购自安徽益生源中药饮片科技有限公司, 经江西中医药大学葛菲教授鉴定, 分别为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaetn.) Libosch. ex Fisch. et Mey. 的干燥块根、姜科豆蔻属植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实、芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮。

对照品梓醇 (批号 MUST-14122411)、益母草苷 (批号 MUST-20052601)、地黄苷 D (批号 MUST-20101311)、5-羟甲基糠醛 (批号 MUST-20051202)、毛蕊花糖苷 (批号 MUST-13122711)、异类叶升麻苷 (批号 MUST-20103104)、橙皮苷 (批号 MUST-20031701)、蔗糖 (批号 MUST-13122601)、葡萄糖 (批号 MUST-18032905)、*D*-果糖 (批号 MUST-13072803)、毛蕊花糖 (批号 MUST-20112705) 购自成都曼思特生物科技有限公司; 对照品水苏糖 (批号 PS020341) 购自成都普思生物科技有限公司; 对照品蜜二糖 (批号 505A023) 购自北京索莱宝科技有限公司; 对照品棉子糖 (批号 TA0423CA14)、甘露三糖 (批号 L29M6Y1) 购自上海月旭科技有限公司; 以上对照品质量分数均 ≥ 98%; 乙腈为色谱级, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 地黄炮制品的制备

参照《建昌帮中药炮制技术》^[5], 分别制备砂仁陈皮制熟地黄、砂仁陈皮制熟地黄 (缺陈皮)、砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁)、砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁、陈皮) 炮制品各 10 份, 粉碎过三号筛, 备用。

2.2 地黄样品特征图谱的建立

2.2.1 参照峰选择及混合对照品溶液配制 异类叶升麻苷是生、熟地黄中的主要有效成分之一, 鉴于该色谱峰峰面积较稳定, 故选择异类叶升麻苷作为参照峰; 精密称取 5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、橙皮苷对照品适量, 加甲醇溶解制成

质量浓度分别为 5-羟甲基糠醛 724.50 $\mu\text{g/mL}$ 、毛蕊花糖苷 12.66 $\mu\text{g/mL}$ 、异类叶升麻苷 18.43 $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷 29.46 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别精密称取不同熟地黄炮制品粉末 2 g 置于圆底烧瓶,精密量取 50 mL 甲醇,称定质量,加热 1 h,冷却,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,离心,取上清液,蒸干,用甲醇定容至 2 mL 量瓶,临用前用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得^[6]。

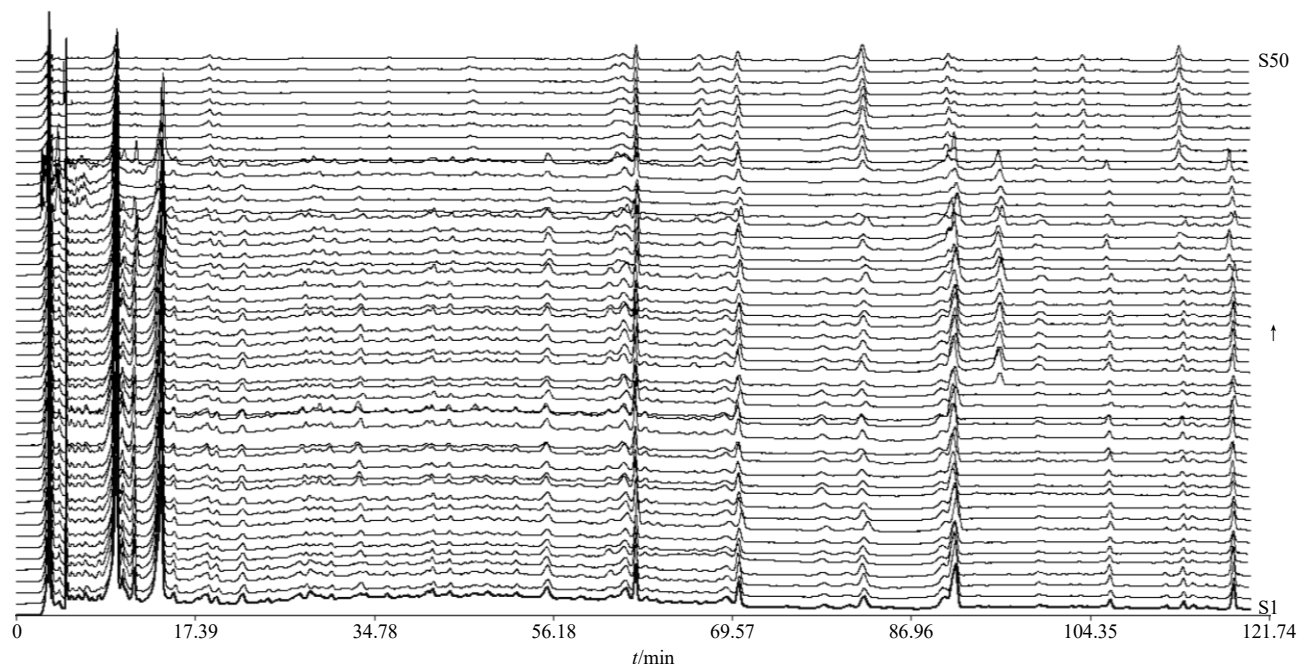
2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Inert Sustain C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱: 0~15 min, 3%~4%乙腈; 15~45 min, 4%~12%乙腈; 45~60 min, 12%~15%乙腈; 60~80 min, 15%~16%乙腈; 80~120 min, 16%~28%乙腈;进样量 20 μL ;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;体积流量 1 mL/min;检测波长 283 nm。

2.2.4 精密度试验 精密称取砂仁陈皮制熟地黄粉末(S31),依“2.2.2”项方法制备供试品溶液,在“2.2.3”项色谱条件下连续进样 6 次,以参考峰的保留时间和峰面积为参照,计算共有峰的相对保留时间、相对峰面积 RSD 均小于 1.4%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密称取砂仁陈皮制熟地黄粉末(S31),分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h,按“2.2.3”项色谱条件进样,以参考峰的保留时间和峰面积为参照,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 1.9%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一份砂仁陈皮制熟地黄粉末(S31),按“2.2.2”项方法平行制备 6 个供试品溶液,在“2.2.3”项色谱条件下进样分析,以参考峰的保留时间和峰面积为参照,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 1.7%,表明色谱条件重复性良好。

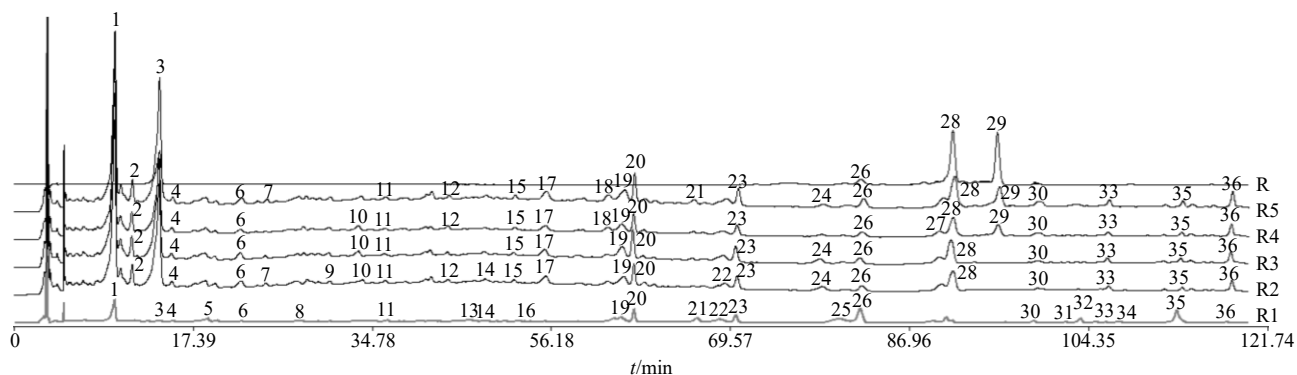
2.2.7 地黄样品测定 取 5 种地黄样品各 10 份,在“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样,图谱结果见图 1,并采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)对所记录的图谱进行分析,分别各自生成了 5 种地黄样品对照图谱,识别了生地黄 24 个共有峰,砂仁陈皮制熟地黄 23 个共有峰、砂仁陈皮制熟地黄(缺陈皮)19 个共有峰、砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁)22 个共有峰、砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁、陈皮)24 个共有峰,并且通过与混合对照品图谱(图 2)比



S1~S10-砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁、陈皮) S11~S20-砂仁陈皮制熟地黄(缺陈皮) S21~S30-砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁) S31~S40-砂仁陈皮制熟地黄 S41~S50-生地黄
S1—S10-AF and CRP on RRP (lack of AF, CRP) S11—S20-AF and CRP on RRP (lack of CRP) S21—S30-AF and CRP on RRP (lack of AF) S31—S40-AF and CRP on RRP S41—S50-RR

图 1 地黄样品图谱结果

Fig. 1 Atlas results of RR samples



3-5-羟甲基糠醛 26-毛蕊花糖苷 28-异类叶升麻苷 29-橙皮苷 R1-生地黄 R2-砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁、陈皮) R3-砂仁陈皮制熟地黄(缺陈皮) R4-砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁) R5-砂仁陈皮制熟地黄 R-混合对照品
3-5-hydroxymethylfurfural 26- verbascoside 28- isoacteoside 29-hesperidin R1-RR R2-AF and CRP on RRP (lack of AF, CRP) R3-AF and CRP on RRP (lack of CRP) R4-AF and CRP on RRP (lack of AF) R5-AF and CRP on RRP R-mixed reference substances

图 2 地黄不同炮制品对照图谱和混合对照品图谱

Fig. 2 Comparative atlas of different RR processed and mixed reference substances

对指认其中的 4 个, 分别是异类升麻苷、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、橙皮苷, 其保留时间分别为 14.083、82.577、91.189、95.760 min。

2.3 化学模式识别分析

2.3.1 系统聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 以“2.2.7”项下 50 个地黄样品全谱峰面积为变量, 采用 SPSS 21.0 分析软件, 以组间平均数联接法及 Pearson 相关性分析方法进行系统聚类分析, 结果见图 3。结果显示, 50 个地黄样品可自然聚为 3 大类, 生地黄为第 1 类 (S41~S50), 砂仁陈皮制熟地黄为第 2 类 (S31~S40), 砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁、陈皮)、砂仁陈皮制熟地黄 (缺陈皮)、砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁) 聚为第 3 类 (S1~S30)。

2.3.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 运用 SIMCA 14.1 软件, 以 50 个地黄样品 (S1~S50) 图谱的峰面积值作为变量, 观察炮制品的聚集情况, 见图 4。PCA 得分图结果与上述聚类分析结果相一致, 表明不同炮制品在主成分空间的分布上有特定区域, 进一步确定炮制品可明显归为 3 类。

2.3.3 差异成分分析 为了进一步筛选引起砂仁陈皮制熟地黄炮制品质量特征差异的标志性成分, 利用 SIMCA 14.1 软件对 50 个地黄样品 (S1~S50) 图谱的原始数据进行正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 考虑到数据较多, 以变量 VIP>1.4 作为筛选标准, 结果见图 5。结果显示, 有 15 个成分符合筛选条件, 即这些成分是造成不同地黄炮制品质量差异的主要标志性物质, 其中 12、94、97 号峰

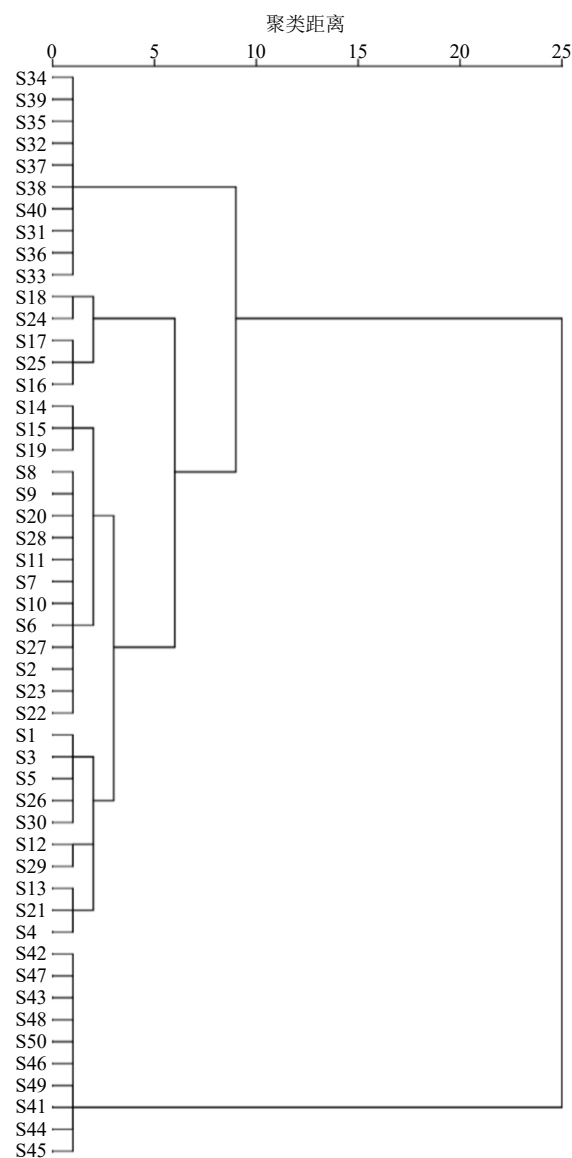


图 3 系统聚类分析图

Fig. 3 System cluster analysis diagram

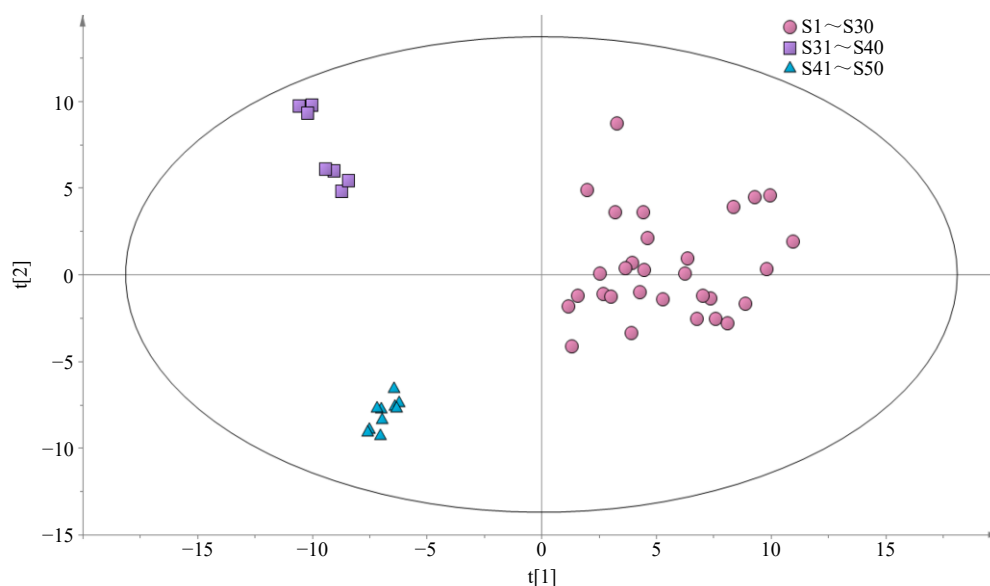


图 4 地黄不同炮制品 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score maps of different processed products of RR

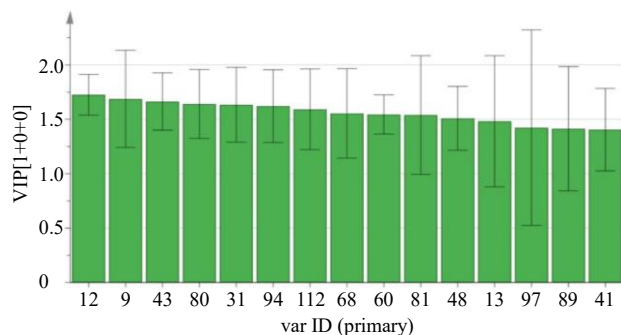


图 5 50 个地黄样品全谱峰 OPLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 5 VIP diagram of full-peak OPLS-DA model of 50 samples of RR

分别为 5-羟甲基糠醛、异类叶升麻苷、橙皮苷。

2.4 非糖类成分含量测定

2.4.1 非糖类成分对照品溶液的制备 取梓醇、益母草苷、地黄苷 D、5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷、异类叶升麻苷适量，精密称定，加甲醇溶解制成质量浓度分别为梓醇 0.297 mg/mL、益母草苷 0.219 mg/mL、地黄苷 D 0.161 mg/mL、5-羟甲基糠醛 0.046 mg/mL、毛蕊花糖苷 0.077 5 mg/mL、橙皮苷 0.071 mg/mL、异类叶升麻苷 0.044 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取炮制品粉末 0.5 g 置于带塞锥形瓶中，精密量取 50 mL 甲醇，称定质量，置室温下冷浸 12 h 后超声 1.5 h（功率 250 W，频率 40 kHz），冷却至室温，称定质量，用甲醇补足减失的质量，滤过，取续滤液 25 mL，蒸干，残渣用 15% 甲醇溶解，定容至 5 mL 量瓶中，用 0.45 μm 微孔滤

膜滤过，即得^[7]。

2.4.3 色谱条件 色谱柱为 Inert Sustain C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水，梯度洗脱：0~20 min, 3%乙腈；20~40 min, 3%~20%乙腈；40~60 min, 20%~23%乙腈；进样量 10 μL；柱温 40 °C；体积流量 1 mL/min；梓醇、益母草苷、地黄苷 D 检测波长 203 nm，5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷检测波长 285 nm，异类叶升麻苷检测波长 334 nm。

2.4.4 线性关系考察 依次量取“2.4.1”项下混合对照品溶液 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 mL 于 5 mL 量瓶内，加甲醇稀释至刻度，摇匀。按“2.4.3”项下色谱条件进样，记录峰面积，以进样质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，进行线性回归，得到梓醇、益母草苷、地黄苷 D、5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷、异类叶升麻苷的回归方程及其线性范围分别为梓醇 $Y=13\,582\,X+340\,912$, $r=0.999\,3$, 线性范围 5.94~297.20 μg/mL；地黄苷 D $Y=2619\,X+46\,826$, $r=0.999\,7$, 线性范围 4.40~220.00 μg/mL；益母草苷 $Y=2156\,X-456.65$, $r=0.999\,0$, 线性范围 3.22~161.00 μg/mL；5-羟基甲糠醛 $Y=196\,591\,X-168\,236$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.92~46.00 μg/mL；毛蕊花糖苷 $Y=796\,324\,X-2\,856.2$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.56~78.00 μg/mL；橙皮苷 $Y=1\,418\,395\,X-7\,438.1$, $r=0.999\,8$, 线性范围 1.42~71.00 μg/mL；异类叶升麻苷 $Y=582\,792\,X+1\,289.8$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.88~44.00 μg/mL。

2.4.5 精密度试验 取“2.4.1”项下对照品溶液,按“2.4.3”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,计算梓醇、益母草苷、地黄苷 D、5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷、异类叶升麻苷峰面积的 RSD 分别为 0.41%、0.81%、0.76%、0.61%、0.86%、1.01%、0.79%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 精密称取砂仁陈皮制熟地黄粉末(S31),按“2.3.2”项方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h,按“2.4.3”项下色谱条件进样,记录峰面积,计算益母草苷、地黄苷 D、5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷、异类叶升麻苷峰面积 RSD 分别为 1.66%、1.31%、0.67%、1.73%、2.00%、0.75%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.7 重复性试验 精密称取同一份砂仁陈皮制熟地黄粉末(S31)6 份,按“2.4.2”项下平行制备供试品溶液,依“2.4.3”项色谱条件下进样,测定峰面积,计算益母草苷、地黄苷 D、5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷、异类叶升麻苷平均质量分数分别为 6.179、1.079、3.982、0.265、2.896、1.617 mg/g, RSD 分别为 1.21%、0.86%、0.89%、1.36%、1.20%、0.99%,表明色谱条件重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 精密称取已测定含量的砂仁陈皮制熟地黄粉末(S31)6 份,分别加入“2.4.1”项下对照品溶液 2.5 mL,按“2.4.2”项下制备供试品溶液,依“2.4.3”项色谱条件进样,测定各成分含量,计算梓醇、益母草苷、地黄苷 D、5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、橙皮苷、异类叶升麻苷的平均加样回收率分别 98.9%、99.4%、98.3%、99.7%、98.5%、99.9%、101.6%, RSD 分别为 0.91%、1.21%、0.86%、0.97%、1.04%、1.15%、0.99%。

2.4.9 样品含量测定结果 按“2.4.2”项方法制备供试品溶液,平行制备 3 份,依“2.4.3”项下色谱条件测定,结果见图 6,记录各炮制品中测定成分的峰面积,含量计算结果见表 1。

2.5 糖类成分含量测定

2.5.1 糖类成分对照品溶液的制备 取 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、毛蕊花糖对照品适量,精密称定,水溶解制成质量浓度分别为 D-果糖 6.888 mg/mL、葡萄糖 3.572 mg/mL、蔗糖 3.704 mg/mL、蜜二糖 9.638 mg/mL、棉子糖 4.384 mg/mL、甘露三糖 1.334 mg/mL、水苏糖 1.299 mg/mL、毛蕊花糖 2.012 mg/mL 的混合对

照品溶液。

2.5.2 供试品溶液的制备 分别取“2.1”项下 5 种炮制品粉末约 1 g 置于具塞锥形瓶中,精密称取 60% 甲醇溶液 50 mL,超声 45 min,滤过,吸取续滤液 2 mL,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

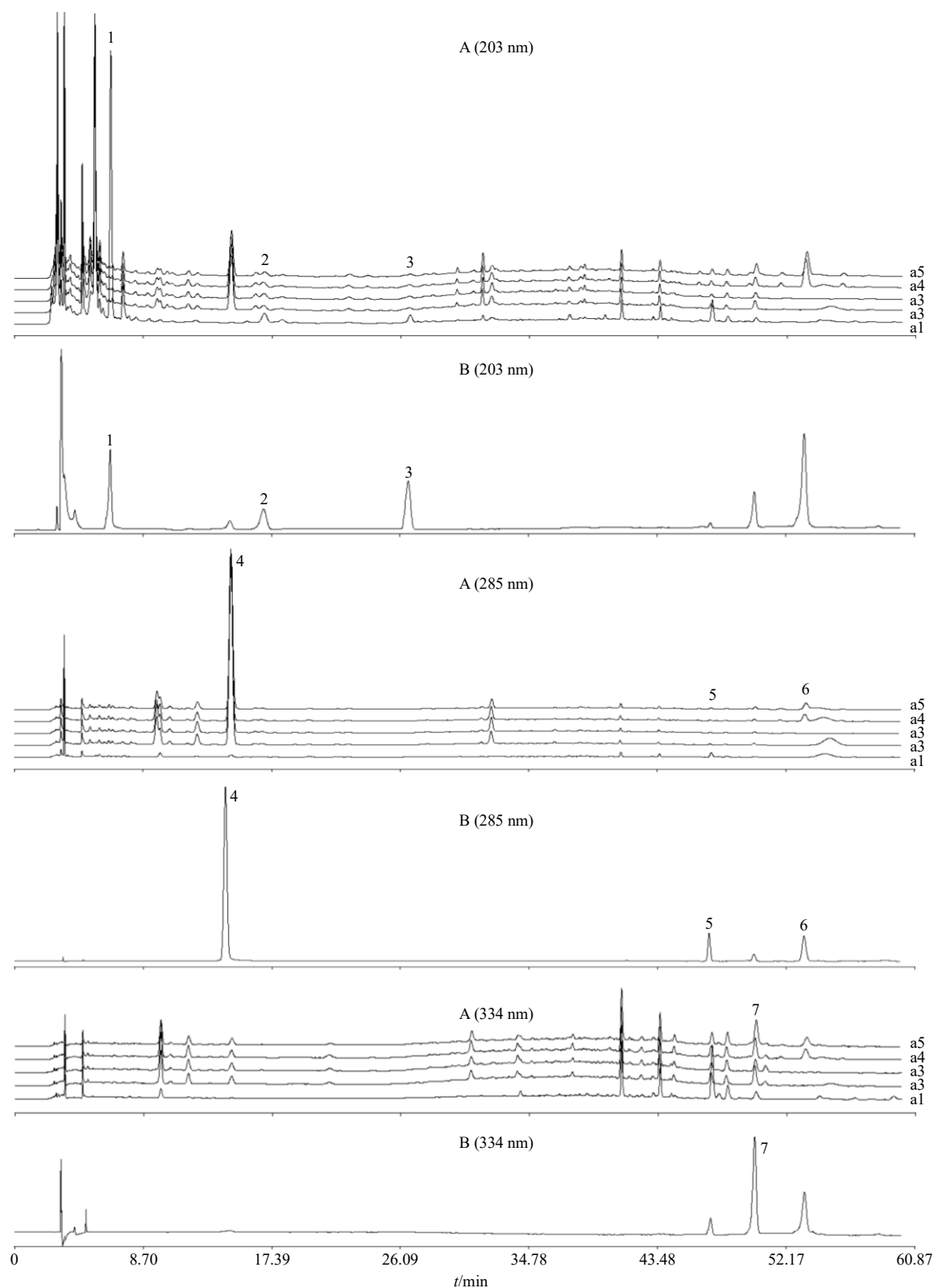
2.5.3 色谱条件 Shodex Asahipak NH₂ P-50 4E 色谱柱;流动相为乙腈-水溶液,梯度洗脱:0~10 min,75%乙腈;10~20 min,75%~65%乙腈;20~45 min,65%乙腈;进样量 5 μ L;柱温 40 $^{\circ}$ C;体积流量 1 mL/min;ELSD 参数:雾化温度 40 $^{\circ}$ C,氮气压力为 350 Pa。

2.5.4 线性关系考察 分别吸取“2.5.1”项下混合对照品溶液 0.25、1.00、2.00、4.00、5.00 mL 置于 5 mL 量瓶中,定容,得系列混合对照品溶液,按“2.4.3”项下色谱条件测定,以糖类成分峰面积的自然对数为纵坐标(Y),糖类成分的质量的自然对数为横坐标(X)作图,进行线性回归方程计算,计算 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、毛蕊花糖回归方程及相关系数(r),结果分别为 D-果糖 $Y=1.138X+4.660$, $r=0.9997$,线性范围 1.72~34.44 μ g;葡萄糖 $Y=1.282X+3.872$, $r=0.9994$,线性范围 0.89~17.86 μ g;蔗糖 $Y=2.771X+3.047$, $r=0.9992$,线性范围 0.93~18.52 μ g;蜜二糖 $Y=2.353X+2.215$, $r=0.9993$,线性范围 2.41~48.19 μ g;棉子糖 $Y=2.078X+3.658$, $r=0.9997$,线性范围 1.10~21.92 μ g;甘露三糖 $Y=1.727X+4.153$, $r=0.9995$,线性范围 0.33~6.67 μ g;水苏糖 $Y=1.267X+4.102$, $r=0.9999$,线性范围 3.25~65.00 μ g;毛蕊花糖 $Y=1.332X+4.571$, $r=0.9991$,线性范围 0.50~10.06 μ g。

2.5.5 精密度试验 取“2.5.1”项下对照品溶液,依“2.4.3”项色谱条件连续进样 6 次,测得 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、毛蕊花糖峰面积 RSD 分别为 0.78%、1.01%、0.63%、0.44%、0.69%、0.93%、1.04%、0.77%,表明仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性试验 精密称取生地黄粉末(S41),按“2.5.2”项下制备供试品溶液,在制备后 0、2、4、8、12、24 h 依“2.5.3”项色谱条件进样,测得 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖、毛蕊花糖峰面积 RSD 分别为 1.89%、1.24%、0.76%、0.86%、0.63%、0.93%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.7 重复性试验 精密称量同一份生地黄粉末



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 a1-生地 a2-砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁、陈皮) a3-砂仁陈皮制熟地黄(缺陈皮) a4-砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁) a5-砂仁陈皮制熟地黄
1-catalpol 2-rehmannioside D 3-leonuride 4-5-hydroxymethyl furfural 5-verbascoside 6-hesperidin 7-isoacteoside a1-RR a2-AF and CRP on RRP (lack of AF, CRP) a3-AF and CRP on RRP (lack of CRP) a4-AF and CRP on RRP (lack of AF) a5-AF and CRP on RRP

图 6 地黄不同炮制品非糖类成分 (A) 及其混合对照品 (B) HPLC 图

Fig. 6 HPLC map of non-sugar components of different processed products of RR (A) and its mixed reference substance (B)

表 1 地黄不同炮制品中非糖类成分的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Mass fraction of non-sugar components in different processed products of RR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	梓醇	地黄苷 D	益母草苷	5-羟甲基糠醛	毛蕊花糖苷	橙皮苷	异类叶升麻苷
生地黄	5.251±0.019	3.146±0.015	2.820±0.011	0.027±0.001	0.278±0.002	0	0.064±0.002
砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁、陈皮)	—	1.289±0.009	0.312±0.005	0.754±0.008	0.088±0.001	0	0.315±0.006
砂仁陈皮制熟地黄 (缺陈皮)	—	1.109±0.008	0.213±0.002	0.570±0.003	0.059±0.001	0	0.194±0.002
砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁)	—	1.033±0.010	0.208±0.002	0.757±0.006	0.059±0.001	0.908±0.008	0.215±0.003
砂仁陈皮制熟地黄	—	1.234±0.009	0.218±0.002	0.795±0.007	0.053±0.001	0.581±0.004	0.325±0.003

“—”表明响应值小无法积分，下表同

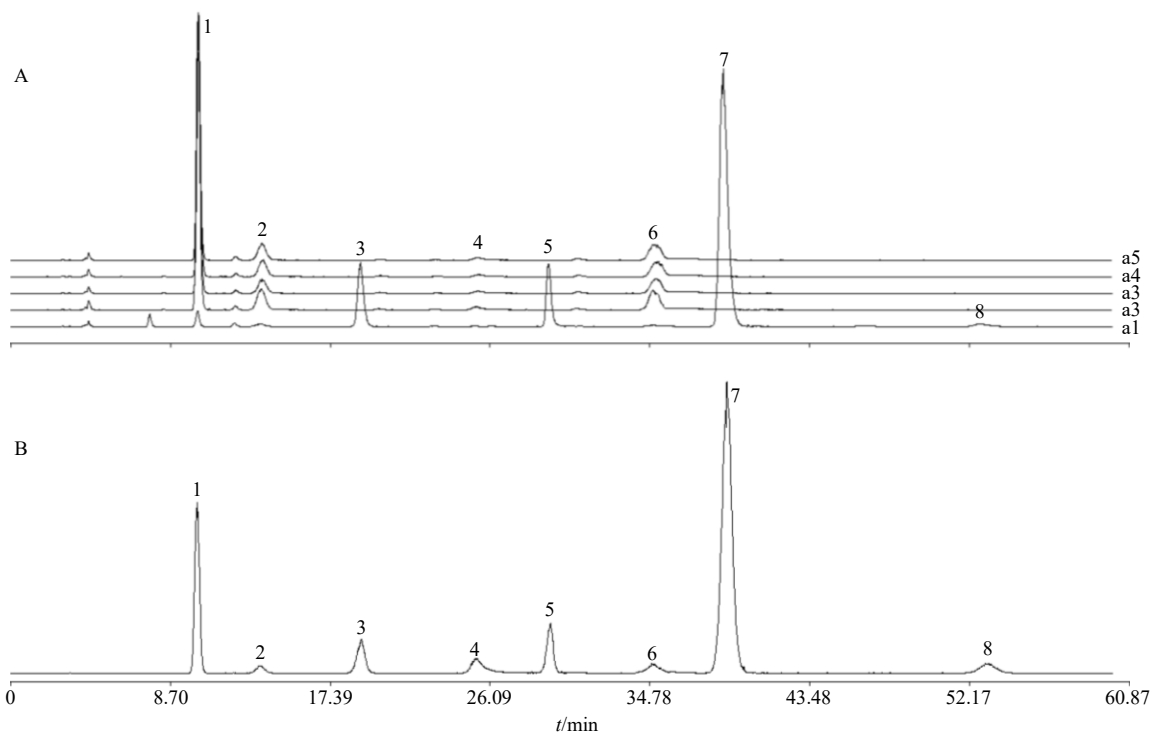
“—” indicates that the response value is too small to integrate, same as following table

(S41)，平行制备 6 份，按“2.5.3”项下色谱方法进样，测得 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖、毛蕊花糖平均质量分数分别为 19.022、27.256、88.954、94.652、248.507、13.040 mg/g，RSD 分别为 1.01%、0.89%、0.95%、0.89%、1.43%、0.91%，表明重复性良好。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取已测定含量的生地黄 (S41) 6 份，分别加入“2.5.1”项下糖类对照品溶液 3 mL，按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液，

依“2.5.3”项色谱条件进样，测定含量，计算 D-果糖、葡萄糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、毛蕊花糖的平均加样回收率分别为 98.8%、99.1%、97.0 %、100.5%、97.4%、99.4%、98.6%、101.5%，RSD 值分别为 1.24%、0.98%、1.36%、1.07%、0.95%、1.79%、0.99%、1.56%。

2.5.9 样品含量测定结果 糖类对照品溶液与供试品溶液分别按“2.5.3”项下色谱条件测定，结果见图 7 和表 2。



1-葡萄糖 2-D-果糖 3-蔗糖 4-蜜二糖 5-棉子糖 6-甘露三糖 7-水苏糖 8-毛蕊花糖 a1-生地 a2-砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁、陈皮) a3-砂仁陈皮制熟地黄 (缺陈皮) a4-砂仁陈皮制熟地黄 (缺砂仁) a5-砂仁陈皮制熟地黄
1-glucose 2-D-fructose 3-sucrose 4-melibiose 5-raffinose 6-mannotriose 7-stachyose 8-verbascose a1-RR a2-AF and CRP on RRP (lack of AF, CRP) a3-AF and CRP on RRP (lack of CRP) a4-AF and CRP on RRP (lack of AF) a5-AF and CRP on RRP

图 7 地黄不同炮制品糖类成分 (A) 和糖类对照品 (B) HPLC 图谱

Fig. 7 HPLC map of sugars composition in different processed products of RR (A) and sugars reference substances (B)

表 2 地黄不同炮制品中糖类成分的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Mass fraction of sugars in different processed products of RR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	D-果糖	葡萄糖	蔗糖	蜜二糖	棉子糖	甘露三糖	水苏糖	毛蕊花糖
生地黄	18.632±0.076	27.445±0.048	89.047±0.105	—	94.533±0.128	—	248.469±0.526	13.577±0.017
砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁、陈皮)	127.543±0.187	76.141±0.081	—	82.561±0.119	—	40.752±0.048	—	—
砂仁陈皮制熟地黄(缺陈皮)	164.461±0.256	104.094±0.122	—	78.740±0.111	—	43.000±0.082	—	—
砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁)	177.172±0.401	119.037±0.309	—	80.448±0.088	—	51.096±0.089	—	—
砂仁陈皮制熟地黄	174.405±0.296	119.854±0.185	—	79.488±0.097	—	57.196±0.079	—	—

3 讨论

3.1 地黄样品特征图谱分析

本研究采用 HPLC 色谱建立了生地黄、砂仁陈皮制熟地黄及不同缺辅料熟地黄炮制品图谱,经分析,5 种炮制品可明显归为 3 类,即生地黄、砂仁陈皮制熟地黄与砂仁陈皮制熟地黄不同缺辅料熟地黄炮制品,可知生、熟地黄之间以及佐以砂仁、陈皮都使地黄在成分空间存在差异^[8-9]。差异成分筛选结果显示,12(5-羟甲基糠醛)、94(异类叶升麻苷)、97(橙皮苷)号峰是引起地黄样品质量特征差异的主要成分,炮制后 5-羟甲基糠醛大幅度产生,使熟地黄向温性转变^[10],异类叶升麻苷是补肾的重要成分^[10-11],橙皮苷是砂仁陈皮制熟地黄新增成分^[12],现代研究表明橙皮苷具有促进胃肠蠕动的功效^[13],预测砂仁、陈皮共炮制使砂仁陈皮制熟地黄更好地发挥益精填髓的功效,纠熟地滋腻碍脾之弊。剩余 12 个差异成分有待进一步研究。

3.2 地黄炮制前后非糖类成分的变化

炮制工艺与质量评价中,多注重成分炮制前后变化趋势^[14-15]。上述实验结果表明,生地黄炮制后,苷类含量总体呈减少趋势,苷类成分受热酯键断裂,梓醇、益母草苷、地黄苷 D、毛蕊花糖苷可分解出葡萄糖和相应苷元,异类叶升麻苷可分解出甘露吡喃糖、葡萄糖和相应苷元^[10],炮制后增加的葡萄糖、果糖与氨基酸易发生美拉德反应,使 5-羟甲基糠醛成分含量升高,故炮制后地黄乌黑如漆^[16];砂仁陈皮制熟地黄中地黄苷 D、异类叶升麻苷、益母草苷含量均高于砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁)、砂仁陈皮制熟地黄(缺陈皮),推测同时佐以砂仁、陈皮在一定程度上缓解了地黄苷 D、异类叶升麻苷、益母草苷的分解。

3.3 地黄炮制前后糖类成分的变化

糖类成分含测结果显示,炮制后糖类成分呈寡

糖减少,单糖增加的趋势,且砂仁陈皮制熟地黄中 D-果糖、葡萄糖、甘露三糖含量相较于砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁、缺陈皮)分别增加了 29.24%、57.14%、44.65%,可知同时佐以砂仁、陈皮能有效促进低聚糖分解成单糖、增加新增成分甘露三糖的稳定性,实验数据显示砂仁陈皮制熟地黄(缺砂仁)中糖类成分的变化也尤为突出。炮制过程中,水苏糖主要分解为甘露三糖和 D-果糖^[17],棉子糖可分解为蜜二糖和果糖或半乳糖和蔗糖,部分甘露三糖、蜜二糖可分解成半乳糖和葡萄糖^[18],蔗糖分解成葡萄糖和 D-果糖^[19],由于人体缺乏消化酶 α -D-半乳糖苷酶,而砂仁、陈皮的加入可使 D-果糖、葡萄糖含量均升高,易于消化,改善了熟地黄滋腻之性,而单糖增加的变化趋势是否改变肠内固有的菌群代谢也值得后期深入研究^[20];现代药理研究表明果糖、葡萄糖具有为机体直接供给热能、补充体液及营养全身的补益功效^[21];蜜二糖、甘露三糖是生地黄炮制后新增成分,研究发现甘露三糖对体外小鼠骨髓细胞的增殖作用与对照组有显著性差异,表明甘露三糖是熟地增强免疫、造血、降血糖等活性的重要成分^[22]。李时珍提出“盖地黄性泥得砂之香而窜,合和五脏冲和之气归缩丹田故也”,相较于清蒸地黄,炮制过程加入砂仁可提高血清胃泌素、血浆胃动素的含量,降低胃内容物残留率,有效消除大鼠滋腻碍胃的现象^[2],研究表明,陈皮能促进胃肠动力、胃排空、胃肠蠕动作用,与传统功效“理气宽中”相一致^[23]。地黄同砂仁、陈皮共炮制时,香燥之性渗透至地黄内,缓解熟地滋腻之性^[24];上述研究发现辅料砂仁、陈皮是改变砂仁陈皮制熟地黄成分种类、成分含量的重要因素,为阐述砂仁陈皮制熟地黄的炮制机理奠定基础,后期将进一步研究砂仁、陈皮引起熟地黄成分变化对药效的影响^[25]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 129-130.
- [2] 李娟, 卫向龙, 庄蕴丁, 等. 比较熟地黄不同炮制品引起大鼠滋腻碍胃现象的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(14): 1336-1339.
- [3] 王小平, 胡志方, 王进, 等. 不同炮制法对熟地黄中化学成分影响的比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 91-93.
- [4] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [5] 陈建章, 胡志方. 建昌帮中药炮制技术 [M]. 北京: 中华中医药出版社, 2019: 165-167.
- [6] 张静, 马瑛. 多指标综合平衡法-正交试验优化九蒸九晒地黄炮制工艺 [J]. 中国药房, 2016, 27(7): 962-965.
- [7] Meng X L, He M J, Guo R, *et al.* Investigation of the effect of the degree of processing of *Radix Rehmanniae Preparata* (Shu Dihuang) on Shu dihuangtan carbonization preparation technology [J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1193.
- [8] 王中华, 窦志英, 王洋, 等. 基于毛蕊花糖苷含量分析陈皮和砂仁在熟地黄炮制中的影响性研究 [J]. 天津中医药, 2019, 36(12): 1234-1240.
- [9] 胡志方, 王小平, 郭慧玲, 等. 江西建昌帮炮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.
- [10] 曹建军, 梁宗锁, 杨东风, 等. 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 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 265-270.
- [11] 石玉红, 杨欢, 冉海凤, 等. 基于 UPLC-MS 技术研究右归饮在正常大鼠和腺嘌呤所致肾虚大鼠的入血成分 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2287-2297.
- [12] 李晓霞, 许莹, 徐波, 等. 橙皮苷对果糖饮食诱导的非酒精性脂肪肝小鼠的作用研究 [J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 249-253.
- [13] Wu M, Li Y, Gu Y. Hesperidin improves colonic motility in loeramide-induced constipation rat model via 5-hydroxytryptamine 4R/cAMP signaling pathway [J]. *Digestion*, 2020, 101(6): 692-705.
- [14] 谭利平, 竹林, 黄峥峥, 等. 差异性炮制方法对丹参药材中丹酚酸 B 的变化研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(7): 1008-1011.
- [15] 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.
- [16] 薛淑娟, 陈随清. 基于代谢组学分析不同蒸制次数熟地黄中糖类成分的变化规律 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 1-5.
- [17] 雷金艳, 贾建伟. 地黄中水苏糖的研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(6): 935-937.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 王如月. 燕麦多糖及其寡糖的制备与对肠道微生物的影响研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [21] 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.
- [22] 连晓岚, 胡海燕, 许言午, 等. 熟地甘露三糖对小鼠骨髓造血干/祖细胞体外扩增的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1590-1591.
- [23] 许姗姗, 许浚, 张笑敏, 等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 35-44.
- [24] 王芳, 于欢, 李凤琴, 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.
- [25] Li H K, Zhang W D, Gu Y, *et al.* Strategy of systems biology for visualizing the "Black box" of traditional Chinese medicine [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2020, 6(3): 260.

[责任编辑 郑礼胜]