

李 询,董诚明,齐大明,等. HPLC 多成分测定及主成分分析法对不同产地鲜地黄质量评价[J]. 江苏农业科学,2020,48(19):225-229.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.048

HPLC 多成分测定及主成分分析法对 不同产地鲜地黄质量评价

李 询,董诚明,齐大明,李 曼,邢 冰,侯杨威

(河南中医药大学药学院,河南郑州 450000)

摘要:以采自河北、山西、河南等省的 35 份鲜地黄为试验材料,以浸出物、多糖、梓醇、毛蕊花糖苷、地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷为考察指标,采用 HPLC 多成分同时测定与主成分分析法,评价不同产地鲜地黄品质差异。结果表明,3 个产地的 35 批鲜地黄品质差异明显,河南省的样品地黄苷 A、毛蕊花糖苷含量较高,河北省的样品地黄苷 D 含量较高,山西省的样品多糖含量较高,35 份鲜地黄样品的综合主成分值范围为 $-0.647\ 9 \sim 2.974\ 1$,河南产区的主成分分析均值最高,为 $0.306\ 8$,其次是河北省,为 $-0.183\ 7$,再次是山西,为 $-0.281\ 2$ 。不同产区地黄品质存在差异,综合分析以河南产区为佳,HPLC 多成分同时测定与主成分分析相结合可以综合评价鲜地黄的质量,为地黄原药材的质量评价提供便捷有效的参考依据。

关键词:鲜地黄;HPLC;浸出物;多糖;环烯醚萜苷;苯乙醇苷;主成分分析

中图分类号: S567.23⁺9.01;R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)19-0225-05

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)为玄参科多年生草本植物,主产于河南省、河北省、山西省、东北等地,以古怀庆府一带的怀庆地黄栽培历史最长,被称为怀地黄,气候、土壤等因素造成各地地黄有效成分有所差异。地黄作为临床常用药,质量控制至关重要,地黄中含有环烯醚萜苷类及苯乙醇苷类等主要成分,具有利尿、降糖、滋阴补血^[1-3],调节免疫,抗炎、抗衰老等作用^[4-7]。2015 年版《中国药典》中以梓醇和毛蕊花糖苷的含量作为质量评价的主要指标,难以全面考察其质量。

近年来地黄在山西、河南、河北等省种植较多,为研究各产地鲜地黄的质量差异,本研究选取河南、山西、河北 3 地的鲜地黄(北京 3 号)为研究对象,以浸出物、多糖及地黄中 5 种苷类物质的含量为考察指标,用高效液相色谱法同时测定梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷及毛蕊花糖苷含量。建立

便捷、可靠的方法同时测定鲜地黄中多种成分含量,分析各产地地黄质量差异,可为建立鲜地黄质量标准评价体系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

试验样品由笔者在不同产地采集,经河南中医药大学董诚明教授鉴定,为玄参科植物地黄北京 3 号的块根,55℃低温烘干打粉后供本试验研究使用。样品信息见表 1。

1.2 浸出物、多糖含量检测

浸出物按照《中国药典》2015 年版冷浸法测定;多糖含量按照苯酚-硫酸法测定^[8]。

1.3 梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷及毛蕊花糖苷含量测定

1.3.1 色谱条件 色谱柱为安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5- μ m),流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 min,1.3% A;5 min,1.5% A;6 min,3% A;14 min,3%;15 min,4% A;20 min,4% A;25 min,20% A;40 min,20% A);体积流量为 1 mL/min;柱温 35℃;检测波长 0~20 min:203 nm,21~35 min:334 nm;进样量 20 μ L(图 1)。

收稿日期:2019-12-19

基金项目:河南省重大科技专项(编号:171100310500);国家标准化项目(编号:ZYBZH-Y-HEN-18);国家重点研发专项(编号:14104584-2018-1)。

作者简介:李 询(1994—),女,河南郑州人,硕士研究生,从事生药学研究。E-mail:1025552320@qq.com。

通信作者:董诚明,教授,从事中药材规划种植技术研究。E-mail:dcm371@hactem.edu.cn。

表 1 样品信息

样品编号	采集地区
B1	河北省安州市明官店乡张庄村
B2	河北省安州市明官店乡西章令村
B3	河北省安州市明官店乡西固村
B4	河北省石家庄市藁城区西关镇董家庄村
B5	河北省石家庄市藁城区西关镇董家庄村
B6	河北省邯郸市成安县柏寺营乡孙庄村
B7	河北省邯郸市成安县柏寺营乡孙庄村
B8	河北省邯郸市临漳县西羊羔乡羊羔村
B9	河北省邯郸市魏县院堡乡破井村
B10	河北省邯郸市成安县商城镇西商城村
B11	河北省邯郸市磁县高史镇西玉曹村
X12	山西省运城市夏县禹王乡司马村
X13	山西省永济市韩阳镇韩阳村
X14	山西省运城市临猗县孙吉镇南周村
X15	山西省运城市万荣县里望乡南阳村
X16	山西省运城市万荣县里望乡和井村
X17	山西省运城市稷山县翟店镇太宁村
X18	山西省运城市稷山县太阳乡东里村
X19	山西省运城市新绛县阳王镇西头村
X20	山西省临汾市襄汾县南贾镇荀董村
N21	河南省焦作市武陟县大封镇东唐郭村
N22	河南省焦作市温县赵堡镇赵堡村
N23	河南省焦作市武陟县西陶镇北阳村
N24	河南省焦作市武陟县大虹桥乡西刘村
N25	河南省焦作市武陟县小董乡北王村
N26	河南省焦作市温县岳村乡东坡村
N27	河南省焦作市温县祥云镇李肇村
N28	河南省焦作市温县南张羌镇南张羌村
N29	河南省焦作市温县赵堡镇北平皋村
N30	河南省焦作市温县北冷乡西南冷村
N31	河南省焦作市温县赵堡镇东辛庄村
N32	河南省焦作市孟州市化工镇杜庄村
N33	河南省焦作市孟州市西虢镇义井村
N34	河南省焦作市孟州市赵和镇冶墙村
N35	河南省焦作市孟州市赵和镇还封村

1.3.2 对照品溶液的制备 精确称取梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷及毛蕊花糖苷对照品,加超纯水配置成浓度分别为 2.4、0.3、0.2、0.2、0.3 mg/mL 的混标溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 精确称取生地样品粉末 0.8 g,置于具塞平底烧瓶中,加入甲醇 50 mL,称定质量,超声提取 1 h,放至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,精确量取续滤液 20 mL,浓缩近干,残渣用水溶解,转移至 10 mL 量瓶中,临用前用

0.22 μm 微孔滤膜过滤。

1.4 方法学考察

1.4.1 线性关系考察 取“1.3.2”节中制备的对照品溶液,记为溶液 1,依次稀释 1.25、2.00、4.00、10.00、20.00、40.00 倍,记为混标溶液 2~7(溶液 7 仅用于毛蕊花糖苷的线性范围考察)。按照“1.3.1”节的方法进样,以对照品进样量为横坐标(x),峰面积积分值为纵坐标(y),绘制标准曲线,得到回归方程见表 2。

表 2 5 种苷类成分的标准曲线

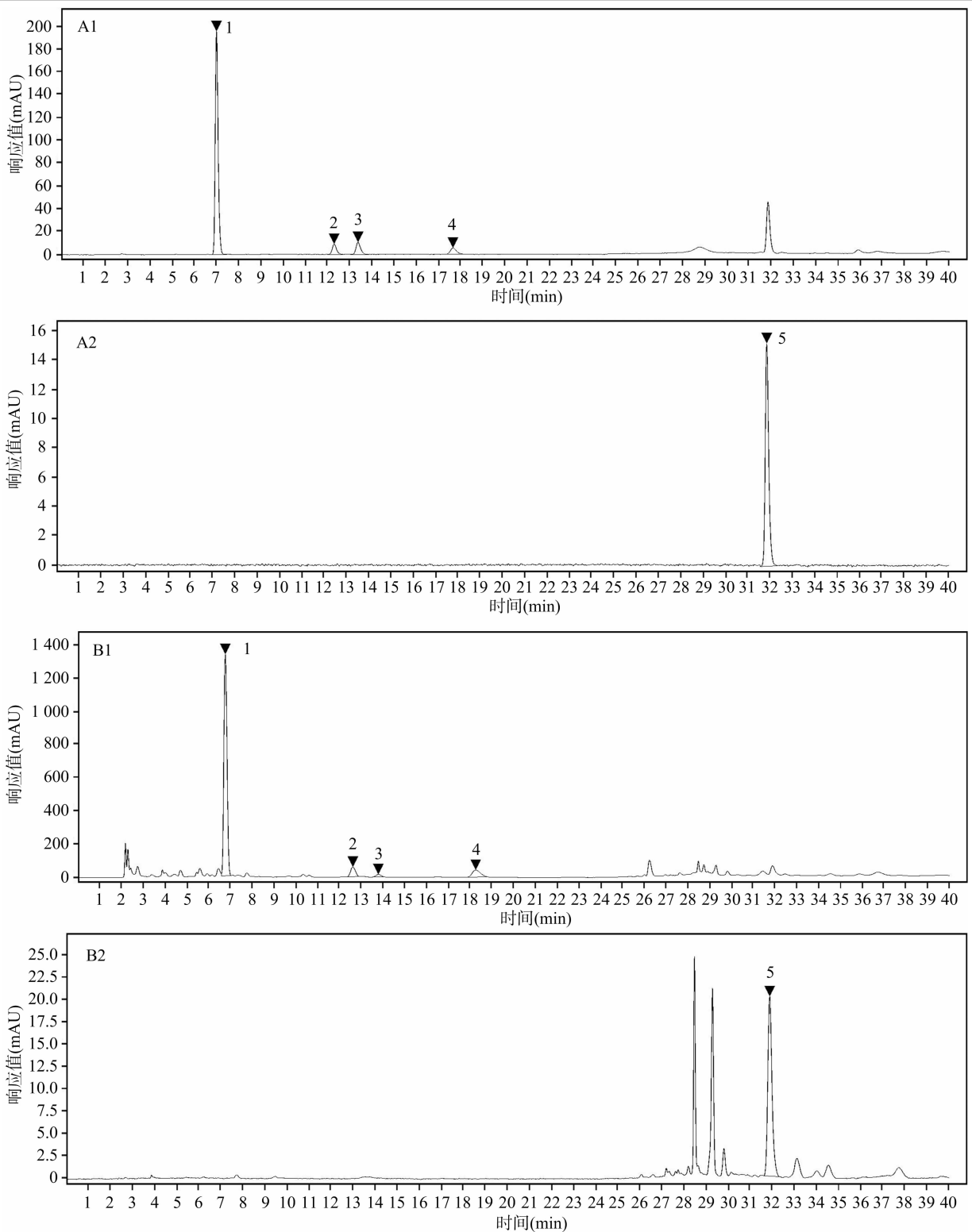
化合物	回归方程	r^2	线性范围 (μg)
梓醇	$y = 13.571\ 2x + 122.509\ 0$	0.999 65	60.0 ~ 1 920.0
地黄苷 D	$y = 11.907\ 9x + 3.945\ 0$	0.999 99	5.0 ~ 160.0
地黄苷 A	$y = 14.874\ 4x + 3.634\ 1$	0.999 99	7.5 ~ 240.0
益母草苷	$y = 10.204\ 1x + 1.454\ 9$	0.999 98	5.0 ~ 160.0
毛蕊花糖苷	$y = 10.797\ 3x + 5.148\ 4$	0.999 99	7.5 ~ 240.0

1.4.2 精密度试验 精确吸取同一鲜地黄供试品溶液,按照“1.3.1”节的色谱条件测定,重复进样 6 次,记录峰面积,计算得梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷的相对标准偏差(RSD)分别为 0.62%、1.75%、1.46%、1.74%、0.20%,表明仪器精密度良好。

1.4.3 重复性试验 精确称取同一批次的鲜地黄粉末 6 份,按“1.3.3”节方法制备供试品溶液,按照“1.3.1”节方法进行色谱条件测定,记录色谱图。得梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷及毛蕊花糖苷的 RSD 分别为 1.88%、1.27%、1.49%、0.68%、1.73%,表明此方法重复性良好。

1.4.4 稳定性试验 精确吸取同一鲜地黄供试品溶液 20 μL,分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、24 h,按照“1.3.1”节的色谱条件测定。结果梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷及毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.47%、0.31%、1.31%、1.61%、0.88%,表明室温条件下供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

1.4.5 加样回收率 精确称取已测定含量的 25 号样品粉末 6 份,每份 0.2 g,分别精确加入梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、益母草苷及毛蕊花糖苷对照品 6.51、0.12、0.37、0.72、0.32 mg,按照“1.3.3”节的方法制备供试品溶液(所有试剂均减半),按照“1.3.1”节的色谱条件测定,结果显示平均加样回收率分别为 99.87%、101.78%、96.14%、97.69%、



A1、A2—混合对照品；B1、B2—鲜地黄样品；1—梓醇；2—黄芩 D；3—地黄苷 A；4—益母草苷；5—毛蕊花糖苷

图1 混合对照品及鲜地黄样品色谱

102.57%, RSD 值分别为 0.96%、1.23%、1.35%、0.58%、1.03%, 表明此方法能够很好地提取出指标性成分。

1.4.6 样品测定 35 份鲜地黄样品按“1.3.3”节进

行制备, 以“1.3.1”节条件测定, 每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

按照“1.2”“1.3”节所述检测 35 份样品中考察

指标的 含量,结果见表 3。浸出物含量最高的是 N21,多糖含量最高的是 X13,梓醇含量最高的是 N22,毛蕊花糖苷含量最高的是 N22,地黄苷 D 含量最高的是 B5,地黄苷 A 含量最高的是 N22,益母草苷含量最高的是 N33。

表 3 样品含量测定结果

样品编号	浸出物含量 (%)	多糖含量 (%)	梓醇含量 (%)	毛蕊花糖苷含量 (%)	地黄苷 D 含量 (%)	地黄苷 A 含量 (%)	益母草苷含量 (%)
B1	89.270 0	14.789 9	3.365 6	0.028 7	0.209 7	0.013 9	0.414 3
B2	87.160 0	13.089 2	3.334 3	0.141 0	0.193 4	0.041 1	0.432 7
B3	87.730 0	15.082 6	3.725 2	0.032 7	0.244 9	0.026 3	0.346 1
B4	89.167 8	12.579 4	3.650 0	0.033 4	0.320 7	0.033 4	0.350 0
B5	90.704 3	10.197 8	3.730 0	0.083 9	0.332 1	0.031 5	0.377 5
B6	86.146 9	10.415 9	3.096 0	0.077 9	0.285 4	0.061 0	0.384 7
B7	87.033 3	13.773 7	3.671 8	0.065 8	0.224 7	0.061 1	0.488 0
B8	89.841 8	16.295 6	3.585 5	0.052 0	0.222 4	0.042 9	0.431 8
B9	90.898 6	11.498 4	4.232 9	0.045 2	0.241 2	0.037 8	0.501 0
B10	84.893 3	14.078 4	4.244 5	0.050 0	0.256 4	0.036 2	0.428 5
B11	84.549 5	14.807 0	3.716 8	0.036 2	0.184 7	0.041 4	0.379 3
X12	83.492 4	12.879 6	3.784 3	0.359 8	0.204 4	0.051 9	0.470 9
X13	85.466 9	19.363 5	2.947 2	0.221 5	0.262 8	0.080 6	0.389 1
X14	86.027 0	13.002 1	4.746 3	0.029 7	0.253 8	0.032 4	0.442 5
X15	84.193 4	13.022 1	4.517 4	0.037 6	0.283 4	0.033 3	0.427 0
X16	86.432 6	16.244 9	3.303 2	0.070 6	0.214 0	0.055 0	0.419 9
X17	87.285 2	13.759 6	3.562 6	0.036 9	0.228 9	0.043 0	0.481 5
X18	88.904 9	15.589 9	2.813 5	0.091 3	0.184 7	0.020 3	0.338 8
X19	88.002 8	13.981 0	3.854 1	0.083 1	0.254 1	0.066 7	0.350 1
X20	87.894 3	18.083 4	3.701 4	0.172 1	0.320 5	0.046 2	0.437 9
N21	90.996 4	15.974 7	3.798 6	0.042 8	0.306 4	0.041 0	0.453 8
N22	87.096 0	8.260 4	4.851 8	0.862 5	0.138 7	0.196 4	0.416 8
N23	86.381 8	15.440 5	3.566 0	0.075 2	0.180 8	0.094 8	0.487 9
N24	88.617 6	8.884 0	3.783 1	0.604 3	0.190 2	0.114 9	0.517 3
N25	86.547 2	14.634 4	3.256 8	0.157 8	0.185 0	0.059 6	0.360 8
N26	87.429 1	14.389 1	3.137 0	0.105 8	0.172 2	0.091 8	0.446 3
N27	88.368 1	10.754 0	3.940 3	0.146 7	0.246 2	0.072 0	0.510 1
N28	86.471 6	13.406 1	3.346 4	0.056 5	0.172 3	0.063 7	0.488 1
N29	87.184 5	11.914 7	3.394 6	0.093 2	0.273 7	0.051 3	0.406 6
N30	86.793 5	14.154 1	3.875 2	0.399 6	0.209 1	0.053 1	0.50 3
N31	87.737 5	13.386 8	4.358 7	0.109 1	0.186 0	0.042 0	0.231 0
N32	85.857 6	13.480 3	3.662 2	0.096 1	0.151 9	0.072 3	0.444 9
N33	83.926 0	12.273 7	3.192 8	0.257 4	0.188 4	0.082 7	0.559 7
N34	87.982 9	16.552 5	2.807 4	0.038 8	0.248 7	0.054 0	0.374 4
N35	87.294 1	14.912 7	3.446 9	0.095 1	0.241 6	0.053 5	0.423 6

运用主成分分析法,浸出物、梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、益母草苷、毛蕊花糖苷、多糖含量为指标性成分,对 35 份地黄样品中的百分含量进行综合分析。根据降维结果,共挑选出 3 个主成分 PC1、PC2、PC3,特征值分别为 2.674、1.372、0.887。累计贡献值为 70.476%,具有代表性,可以用来评价地黄质量。综合主成分值可以反映不同地黄的质量,得分越高表示成分质量分数越高,地黄质量越好。由表 4 可知,35 份鲜地黄样品的综合成分值在 -0.647 9 ~ 2.974 1,表明不同产地鲜地黄的成分量范围。综合

值排序可以看出 N22 号即河南省温县赵堡镇赵堡村的鲜地黄质量最好, X13 号即山西省永济市韩阳镇韩阳村的鲜地黄质量最差, 河南省、河北省、陕西省鲜地黄指标性成分主成分分析均值分别为 0.306 8、-0.183 8、-0.281 2, 河南各地的平均分最高, 山西产地的平均分最低。

表 4 综合主成分值及各产地均值

样品编号	综合主成分值
B1	-0.503 0
B2	-0.094 8
B3	-0.480 8
B4	-0.240 4
B5	0.149 3
B6	-0.058 0
B7	-0.068 5
B8	-0.336 6
B9	0.331 4
B10	-0.288 6
B11	-0.431 4
X12	0.232 2
X13	-0.647 9
X14	-0.014 6
X15	-0.216 5
X16	-0.488 7
X17	-0.257 0
X18	-0.618 8
X19	0.013 0
X20	-0.532 8
N21	-0.318 4
N22	2.974 1
N23	0.004 9
N24	1.702 5
N25	-0.156 5
N26	0.060 2
N27	0.542 7
N28	-0.083 4
N29	-0.078 5
N30	0.381 2
N31	0.154 6
N32	0.106 7
N33	0.240 0
N34	-0.645 6
N35	-0.282 0

3 讨论

本研究建立了鲜地黄中 5 种化学成分同时测定的 HPLC 方法, 该法高效、准确、重复性好, 能客观准确地反映出不同产地鲜地黄化学成分含量的差异, 对于评价鲜地黄质量优劣具有一定的参考价值。多指标测定有利于更加全面地考察鲜地黄的药效物质基础, 结合浸出物、多糖含量有利于更加全面、客观评价鲜地黄药材的质量。

本研究采用主成分分析法, 通过变量之间的相关性减少变量将数据降维, 将本试验所得的 7 个指标进行综合全面评价, 从而有效地反映不同指标与鲜地黄质量的关系, 更加全面客观地评价不同产地地黄品质差异。结果表明, 不同产地鲜地黄差异明显, 河南省的样品中地黄苷 A、毛蕊花糖苷含量较高, 河北省的样品地黄苷 D 含量较高, 山西省的样品多糖含量较高, 与各地环境气候及人为因素有关。经主成分分析, 得出各产地鲜地黄综合质量为河南优于河北优于山西, 这与地黄道地性相符, 河北地区所用地黄种栽基本来源于河南省, 因此质量优于山西省。

参考文献:

- [1] 赵素容, 卢尧伟, 陈金龙, 等. 地黄梓醇降糖作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 171-172.
- [2] 董 昭, 陈长勋. 梓醇药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2013, 35(5): 1047-1051.
- [3] 于 震, 王 军, 李更生, 等. 地黄苷 D 滋阴补血和降血糖作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2001, 28(4): 240-242.
- [4] 唐永富, 黄丹菲, 谢明勇, 等. 毛蕊花苷和异毛蕊花苷对树突状细胞增殖的影响[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(23): 1785-1787.
- [5] 王 军, 于 震, 李更生, 等. 地黄苷 A 对“阴虚”及免疫功能低下小鼠的药理作用[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(1): 20-22.
- [6] 宋小敏, 廖理曦, 董 馨, 等. 毛蕊花糖苷抑制脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2506-2510.
- [7] 邢海燕, 苗 鑫, 张晓菲, 等. BDNF 乙酰化修饰参与毛蕊花糖苷对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(16): 1910-1917.
- [8] 张璐琪, 刘苏伟, 王 飞, 等. 地黄多糖超声提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(12): 2662-2667.