

怀地黄药材 HPLC 指纹图谱研究

王彦志, 张杰, 张华锋, 刘炯, 杨云*, 冯卫生, 卫冰
(河南中医学院药学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 建立怀地黄药材的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。方法: 采用 HPLC 梯度洗脱法, 对怀地黄药材进行测定, 色谱条件, Dikma Diamonsil_{C₁₈} 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 磷酸水系统梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 205 nm。结果: 标定了 13 个共有峰, 建立了 HPLC 指纹图谱, 该图谱的相关系数均在 0.99 以上。结论: 该方法精确可靠, 重复性好, 可为控制怀地黄药材内在质量提供科学依据。

[关键词] 怀地黄; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0083-04

[doi] 10.11653/syjf2013230083

HPLC Fingerprint of *Rehmannia glutinosa*

WANG Yan-zhi, ZHANG Jie, ZHANG Hua-feng, LIU Jiong, YANG Yun*, FENG Wei-sheng, WEI Bing
(Pharmacy College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of *Rehmannia glutinosa* to provide a reliable method for scientific evaluation and the effective control of its quality. **Method:** The fingerprints were obtained on a Dikma Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the gradient elution solvent system composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 35 °C, and the detection wavelength was set at 240 nm. **Result:** Thirteen common peaks were selected as the fingerprint peaks and the fingerprints were also evaluated by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint with the correlation coefficient above 0.99. **Conclusion:** This method with good precision and reproducibility is reliable for the quality control of *R. glutinosa*.

[Key words] *Rehmannia glutinosa*; HPLC; fingerprint; cluster analysis

地黄系玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根^[1]。秋季采挖, 除去芦头、须根及泥沙, 鲜用; 或将地黄缓缓烘焙至约八成干。前者习称“鲜地黄”, 后者习称“生地黄”。地黄药性甘、苦、寒, 归心、肝、肾经, 功用清热生津、凉血、止血。现代研究表明地黄具有抗炎、降糖、增强免疫、滋阴、保护胃黏膜、抑制肺纤维化^[2-6]等方面的作用。地黄全国各地均有栽培, 但素以河南产道地药材怀地黄质量好、品质佳, 历史悠

久, 现代研究亦表明怀地黄品质优于其他地黄^[7]。

由于中药化学成分的复杂多样性, 因此任何单一成分含量高低均不能准确完整的评价该中药质量, 而以指纹图谱作为中药提取物及其制剂的控制方法, 已成为目前国际共识^[8]。本研究利用高效液相色谱法, 建立了怀地黄的指纹图谱分析方法, 对不同产地、不同品种怀地黄进行了研究, 初步建立客观评价和控制怀地黄药材质量的技术标准。

1 材料

Waters2695 型高效液相色谱仪配备 2995PDA 检测器 (美国 Waters 公司), METTLER AE240 型电子分析天平 (瑞士 METTLER 公司), SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂)。

色谱甲醇 (天津四友), 色谱乙腈 (美国 TIDEA

[收稿日期] 20130508 (009)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目 (2011BAI06B00)

[第一作者] 王彦志, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 13673654931, E-mail: wangyzlb@yahoo. cn

[通讯作者] * 杨云, 教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0371-65680605, E-mail: yyun@china. com. cn

公司),双蒸水(自制),其他试剂均为分析纯;梓醇(批号 110808-200508)、桃叶珊瑚苷(批号 111761-200601)均购自中国药品生物制品检定所,地黄苷 A、地黄苷 D 均由河南中医研究院提供,HPLC 归一化法测定纯度 >98%。

分别从焦作市温县、武陟县以及孟州市采集了怀地黄样本 13 批,所有样品经由本院生药教研室董诚明教授鉴定,为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的块根。样品信息见表 1。

表 1 怀地黄样品信息

No.	品种	产地	生长方式
1	85-5	温县宛西制药怀药生产基地	栽培
2	生津一号	温县宛西制药怀药生产基地	栽培
3	山西种	温县宛西制药怀药生产基地	栽培
4	沁怀一号	温县宛西制药怀药生产基地	栽培
5	红薯王	温县宛西制药怀药生产基地	栽培
6	北京 3 号	温县宛西制药怀药生产基地	栽培
7	北京 3 号	孟州市化工镇高桥村	栽培
8	北京 3 号	孟州市化工镇刘庄村	栽培
9	北京 3 号	孟州市化工镇许庄村	栽培
10	怀丰号	武陟县大封镇大司马村	栽培
11	北京 3 号	武陟县大封镇东岩村	栽培
12	沁怀 1 号	武陟县大封镇大司马村	栽培
13	北京 3 号	温县南张光镇朱家庄	栽培

2 方法与结果

2.1 色谱条件 DikmaDiamonsilC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), PDA 检测器, 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 6 min, 0% A; 6 ~ 12 min, 0% ~ 3% A; 12 ~ 20 min, 3% ~ 6% A; 20 ~ 25 min, 6% ~ 10% A; 25 ~ 34 min, 10% ~ 15% A; 34 ~ 45 min, 15% ~ 25% A; 45 ~ 60 min, 25% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 205 nm, 进样量 30 μL。

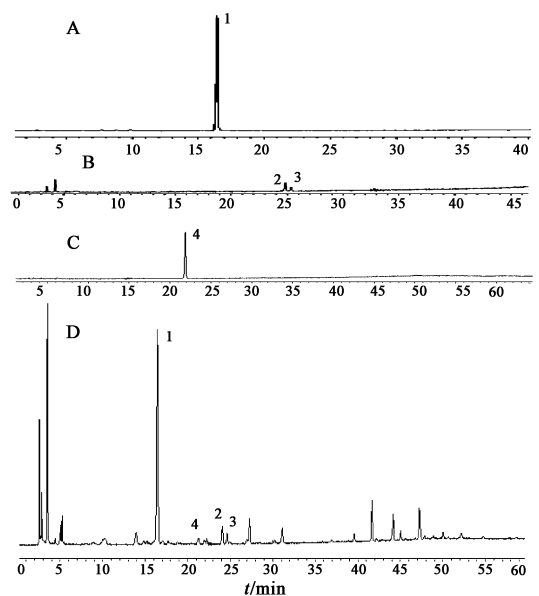
2.2 对照品溶液的制备 取梓醇对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成 1.002 0 g·L⁻¹ 梓醇对照品溶液; 取桃叶珊瑚苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成 0.107 0 g·L⁻¹ 桃叶珊瑚苷对照品溶液; 取地黄苷 A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成 0.064 8 g·L⁻¹ 地黄苷 A 对照品溶液; 取地黄苷 D 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成 0.129 6 g·L⁻¹ 地黄苷 D 对照品溶液, 以上对照品临用前均过 0.22 μm 微孔滤膜。

2.3 供试品溶液制备 取怀地黄样品粉末 1 g, 精

密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密量取并加入 50% 甲醇溶液 100 mL, 称定质量, 超声提取 40 min, 放至室温, 溶剂补足质量, 减压滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 20 mL 置于蒸发皿里, 50 °C 水浴挥干, 残渣以 10% 乙腈溶解并定容至 10 mL 量瓶, 摇匀, 临用前过 0.22 μm 滤膜即得。

2.4 怀地黄 HPLC 指纹图谱的方法学考察

2.4.1 系统适应性试验 分别精密吸取以上对照品溶液和供试品溶液 30 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样, 记录色谱图, 对照品及怀地黄供试品在此色谱条件下的 HPLC 色谱图见图 1。



1. 梓醇; 2. 桃叶珊瑚苷; 3. 地黄苷 D; 4. 地黄苷 A;
A ~ C. 对照品; D. 供试品

图 1 怀地黄样品 HPLC

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 30 μL, 连续进样 5 次, 记录各共有峰保留时间和峰面积, 计算各个共有峰的相对保留时间、相对峰面积以及 RSD, 结果显示相对保留时间 RSD < 3%, 相对峰面积 RSD < 5%, 说明该仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一批供试溶液 30 μL, 分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进行测定, 记算各个共有峰相对保留时间、相对峰面积以及 RSD, 结果显示, 相对保留时间 RSD < 3%, 相对峰面积 RSD < 5%, 说明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批药材样品 5 份, 按照 2.3 项方法进行制备, 连续进样, 计算各个共有峰相的对保留时间、相对峰面积以及 RSD, 结果显示, 相对保留时间 RSD < 3%, 相对峰面积 RSD < 5%, 说明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.5 怀地黄 HPLC 指纹图谱的建立

2.5.1 怀地黄共有峰的确定 测定了 13 批不同品种和产地怀地黄样品,采用 CHROMAP1.5 指纹图谱处理软件对所得图谱进行处理得到指纹图谱共有模式,共获得 13 个共有峰,见图 2,3。其中 7 号峰分离度较好,且保留时间和峰面积均适中,因此选择 7 号峰作为内参比峰。计算各色谱峰对内参比峰的相对保留时间、相对峰面积,结果见表 2,3。

2.5.2 样品的聚类分析 运用 CHROMAP 1.5 对所处理 13 批怀地黄样品进行聚类分析,所有数据经过标准化 normalization 处理,当分类距离为 0.2 时,样品可分为 6 类,结果见图 4,第一类有 9,3,12,10,1,13,11,8,其中有 7 种为农户种植产品,说明这些样品之间有某些内在的联系,关系较为密切;其余 5 批各成一类,其中 4 种为规范化种植基地采集,说明这些样品之间差异较为明显,关系较为疏远。

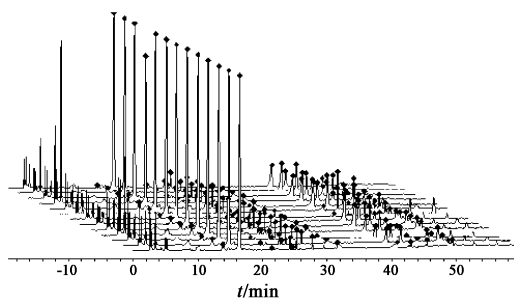


图 2 不同产地、不同品种怀地黄 HPLC 指纹图谱叠

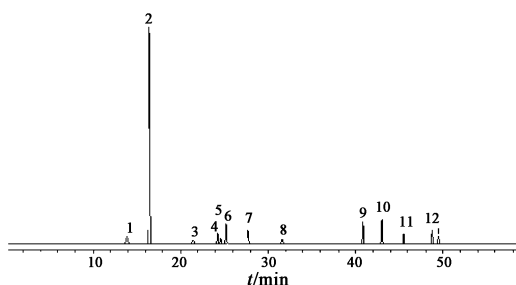


图 3 怀地黄指纹图谱共有模式

表 2 不同品种及产地怀地黄相对保留时间

No.	共有峰编号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.501 7	0.596 9	0.772 6	0.874 2	0.887 5	0.908 3	1.000 0	1.139 6	1.471 2	1.547 7	1.638 4	1.753 1	1.778 8
2	0.501 1	0.597 1	0.773 5	0.874 4	0.887 9	0.910 6	1.000 0	1.137 2	1.471 9	1.547 9	1.636 3	1.752 9	1.776 3
3	0.502 3	0.596 8	0.771 9	0.873 7	0.887 2	0.908 8	1.000 0	1.138 7	1.473 1	1.548 3	1.638 1	1.754 7	1.779 5
4	0.501 9	0.597 2	0.772 8	0.873 1	0.889 3	0.908 1	1.000 0	1.140 6	1.471 5	1.546 6	1.639 1	1.753 9	1.777 3
5	0.502 2	0.596 1	0.772 3	0.873 9	0.885 8	0.907 3	1.000 0	1.138 8	1.472 6	1.547 1	1.638 2	1.752 6	1.778 3
6	0.500 9	0.596 6	0.771 8	0.875 1	0.887 4	0.906 4	1.000 0	1.138 1	1.472 2	1.549 5	1.639 6	1.752 3	1.776 7
7	0.501 4	0.598 2	0.772 2	0.875 5	0.886 9	0.908 4	1.000 0	1.138 4	1.470 9	1.549 1	1.637 8	1.754 9	1.779 1
8	0.502 3	0.597 4	0.773 2	0.873 9	0.887 3	0.908 9	1.000 0	1.139 1	1.471 8	1.547 6	1.636 2	1.750 6	1.774 5
9	0.501 6	0.596 9	0.772 0	0.874 8	0.886 3	0.909 5	1.000 0	1.138 7	1.473 5	1.548 7	1.637 7	1.752 8	1.778 2
10	0.500 4	0.597 7	0.771 6	0.873 7	0.889 6	0.908 5	1.000 0	1.137 9	1.472 3	1.546 2	1.638 0	1.750 9	1.776 2
11	0.501 1	0.596 8	0.773 4	0.873 3	0.887 1	0.907 6	1.000 0	1.138 2	1.473 7	1.549 6	1.636 5	1.753 6	1.779 8
12	0.502 8	0.597 2	0.772 8	0.874 9	0.886 7	0.909 3	1.000 0	1.139 3	1.471 1	1.547 8	1.638 7	1.752 9	1.776 7
13	0.502 5	0.596 3	0.771 7	0.872 8	0.885 2	0.907 7	1.000 0	1.137 5	1.472 9	1.548 6	1.639 4	1.753 4	1.776 6
RSD/%	0.141	0.094	0.085	0.093	0.137	0.118	0.00	0.080	0.062	0.068	0.068	0.071	0.087

2.5.3 指纹图谱相似度计算 本实验采用 CHROMAP 1.5 指纹图谱处理软件对 13 批怀地黄样品进行相似度分析,以所建立的怀地黄指纹图谱共有模式作为参照,利用相关系数法对 13 批样品进行相似度计算,结果见表 4。13 批地黄样品相似度均 >0.99 ,表明这 13 批地黄样品具有良好的相似性。

3 讨论

本实验所用怀地黄样本均来自道地产区,其中

有 6 批为规范化种植基地采集。受制于品种、种植条件等诸多因素的影响,所得各色谱峰中共有峰峰面积均有很大差别,但是各共有峰相对保留时间偏差却极小,由此说明怀地黄所含化学成分具有相似性,而含量具有一定的差异,因而造成图谱间相似度的差异。

从聚类分析和相似度分析的结果可以看出,所采集地黄样本之间具有良好的相似性,但这种相似性又可以具体的表述为规范化种植基地种植品种的

表 3 不同品种及产地怀地黄相对峰面积

No.	共有峰编号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.317 9	21.598 7	0.382 0	0.589 3	0.260 2	1.150 5	1.000 0	0.196 2	1.403 4	1.065 2	0.459 0	0.755 0	0.256 5
2	0.722 8	18.882 7	0.278 3	0.418 3	0.127 2	0.717 6	1.000 0	0.343 8	1.775 5	1.972 7	0.782 5	1.608 3	0.120 2
3	0.529 2	20.005 4	0.336 1	0.703 8	0.190 8	1.045 1	1.000 0	0.402 9	1.303 4	1.641 4	0.624 7	0.795 4	0.185 5
4	1.131 1	14.339 5	0.452 6	1.093 4	0.624 9	1.214 9	1.000 0	0.440 8	1.832 0	1.370 2	0.470 0	2.026 1	0.521 5
5	0.934 0	22.029 9	0.685 7	1.592 2	0.418 4	1.963 6	1.000 0	0.564 5	2.110 9	2.621 7	0.873 1	1.869 5	0.913 2
6	0.532 7	17.054 0	0.306 8	0.565 8	0.446 4	0.932 4	1.000 0	0.307 9	0.271 0	2.267 0	1.703 3	0.547 9	0.929 8
7	0.538 0	18.542 1	0.340 2	0.570 1	0.671 4	0.300 1	1.000 0	0.728 9	0.459 3	0.949 2	0.885 2	0.614 7	0.603 1
8	0.898 3	22.698 0	0.158 0	1.142 8	0.247 7	1.685 5	1.000 0	0.403 1	2.343 8	1.654 0	0.511 8	0.759 8	0.366 4
9	0.858 6	17.339 5	0.134 4	0.647 8	0.371 5	1.258 2	1.000 0	0.236 4	1.204 3	1.206 5	0.319 7	0.841 6	0.581 9
10	0.858 9	14.147 1	0.329 6	0.633 2	0.272 6	1.062 9	1.000 0	0.305 5	0.668 6	0.838 7	0.189 1	0.496 5	0.305 8
11	0.411 4	14.104 8	0.233 6	0.535 3	0.168 4	0.950 7	1.000 0	0.257 1	0.379 9	0.561 0	0.131 2	0.387 7	0.322 3
12	0.586 8	13.954 6	0.396 4	0.664 5	0.247 4	1.127 9	1.000 0	0.260 3	0.733 8	0.802 6	0.196 7	0.840 4	0.354 4
13	0.682 4	15.297 5	0.178 9	0.815 8	0.246 1	1.197 5	1.000 0	0.329 7	0.367 7	0.258 1	0.339 7	0.336 1	0.373 1
RSD/%	33.76	18.14	44.68	42.31	51.13	36.09	0.00	39.81	62.68	51.85	73.37	60.88	56.31

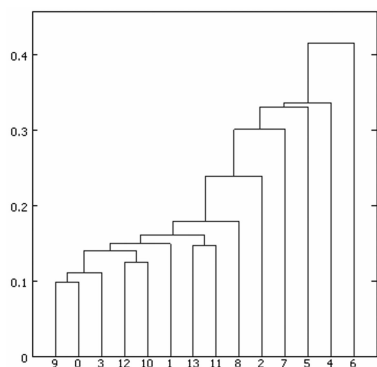


图 4 不同产地怀地黄样品聚类分析

表 4 不同产地怀地黄样品相似度

No.	相关系数	No.	相关系数
1	0.999 6	8	0.998 4
2	0.997 1	9	0.999 6
3	0.999 6	10	0.999 0
4	0.995 2	11	0.998 9
5	0.997 8	12	0.999 2
6	0.993 0	13	0.997 2
7	0.996 6	共有模式图谱	1

品种之间差距不是很明显;而规范化种植基地由于种植条件,自然环境具有一致性,其主要差异就体现在品种方面。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:115.

[2] 崔瑛,王君明,冯志毅,等. 地黄对家兔阴虚热盛证型发热的解热作用[J]. 河南中医,2007,27(1):31.

[3] 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.

[4] 李威,杨宁辉,崔英,等. 地黄不同炮制品对阴虚模型小鼠血浆 cAMP、cGMP 影响的实验研究.[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(9):1982.

[5] 王竹立,李林,叶美红,等. 干地黄对胃粘膜的快速保护作用及其机制[J]. 中国中西医结合脾胃杂志,2000,8(5):265.

[6] 刘力,唐岚,徐德生,等. 生地黄酒对大鼠肺间质成纤维细胞 I、III 型胶原表达的作用[J]. 中成药,2008,30(2):175.

[7] 都恒青,李赵曦,刘根成. 地黄的质量研究[J]. 中国中药杂志,1992,17(6):327.

[8] 彭川丛,梁英娇. 中药指纹图谱研究进展[J]. 实用中医药杂志,2010,26(11):810.

[责任编辑 顾雪竹]