

## 地黄 HPLC 指纹图谱及梓醇含量测定的研究

盛秋双, 杜润宝, 卢娜, 邓彦宏

吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062

**摘要:**目的 采用 HPLC 色谱法建立地黄指纹图谱, 优化梓醇含量的测定方法, 为地黄药材质量标准的提升提供依据。方法 选用 Atlantis T3-特色硅胶 C<sub>18</sub> 色谱柱, 流动相为 0.1%磷酸水-乙腈, 检测波长为 203 nm, 体积流量 1.0 mL/mL, 柱温为 35 °C, 梓醇为对照峰, 建立 20 批地黄指纹图谱。采用指纹图谱相似度评价软件进行数据评价, 同法测定 20 批地黄中梓醇的含量。结果 所建立的标准对照指纹图谱, 20 批地黄的相似度均在 0.917 以上, 20 批地黄中梓醇质量分数均在 0.2% 以上。结论 建立的地黄 HPLC 指纹图谱测定方法, 重复性、精密度和稳定性良好, 梓醇含量测定符合要求, 可有效避免《中国药典》2015 年版收载方法检测时糖类物质的干扰, 为提升地黄药材质量评价水平提供科学参考。

**关键词:** 地黄; HPLC; 梓醇; 指纹图谱; 相似度

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-5060-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.031

## HPLC fingerprint and catalpol content determination of *Rehmannia glutinosa*

SHENG Qiu-shuang, DU Run-bao, LU Na, DENG Yan-hong

College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China

**Abstract: Objective** The fingerprint of *Rehmannia glutinosa* was established by HPLC to provide scientific basis for improving the quality of *R. glutinosa*. **Methods** The characteristic silicagel C<sub>18</sub> column-Atlantis T3 was used, and the mobile phase was 0.1% phosphate water and acetonitrile by gradient elution. Absorption wavelength was 203 nm, and flow rate was 1.0 mL/mL with column temperature of 35 °C. Setting catalpol as the control peak, 20 batches of *R. glutinosa* fingerprint was established. Fingerprint similarity evaluation software was used for data evaluation and determining the catalpol content of 20 batches of *R. glutinosa*. **Results** The standard contrast chromatographic fingerprint similarity of 20 batches *R. glutinosa* reached above 0.917. The 20 batches catalpol content was above 0.2%. **Conclusion** The established fingerprint chromatography was proved that it had good precision, stability, and repeatability. The catalpol content determination met requirement which can avoid interference of saccharide compared with China Pharmacopoeia method and provide scientific reference for improving the quality of *R. glutinosa*.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa* Libosch.; HPLC; catalpol; fingerprint; similarity

地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 用药<sup>[1-3]</sup>历史久远,《神农本草经》中为上品。《中国药典》中收载的复方制剂,地黄用药频率高达 25% 以上,故对地黄药材的道地性进行深入的质量研究及控制尤为重要。地黄药理功能研究报道较多,近年对地黄药材指纹图谱的研究也有报道,多见于药材提取部位给药后,动物血清样品的指纹图谱<sup>[4-6]</sup>。也有报道<sup>[7-9]</sup>对地黄药材进行 HPLC 指纹图谱建立的研究,但对药材及指纹图谱的建立未作系统研究,且应用普通的 C<sub>18</sub> 柱,分离度及专属性均未达到理想要求。在此基础上,本研究针对地黄药材及饮片,通过对不同影响因素的考察,

采用特色硅胶 C<sub>18</sub> (Atlantis T3) 色谱柱,建立了地黄及饮片的指纹图谱,相似度达到 0.9 以上,优化地黄中梓醇含量的测定方法,避免《中国药典》2015 年版收载方法测定时糖类物质的干扰,为地黄的质量控制及评价体系的建立提供参考。

### 1 仪器及试剂

#### 1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司; KQ-250DB 数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; Atlantis T3 柱,美国 Waters 公司; SQP 电子天平 (十万分之一),德国赛多利斯公司。

收稿日期: 2019-08-03

作者简介: 盛秋双,女,硕士,研究方向药物分析、药剂学。Tel: 15584477342 E-mail: shengqiushuang@163.com

\*通信作者 邓彦宏,男,讲师,研究方向兽医药理学、兽药安全性评价。Tel: 15043017131 E-mail: 124274539@qq.com

## 1.2 试药及试剂

梓醇(批号 110808-201711)购于中国食品药品检定研究院,质量分数大于 98%;乙腈(色谱级)、甲醇(分析级)购于康科德有限公司;磷酸(分析级)、无水乙醇(分析级)恒兴有限公司试剂;10 批(S1~S10)地黄药材(产自广西、陕西、重庆、四川、河北、山西、浙江、福建、云南、江苏)及 10 批(Y1~Y10)地黄饮片(批号 19001、19002、19003、19004、19005、19006、19007、19008、19009、19010)均购自苟花堂国药股份有限公司,由吉林大学动物医学学院邓彦宏讲师鉴定为地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.。

## 2 方法与结果

### 2.1 地黄指纹图谱的建立

**2.1.1 对照品溶液的制备** 用流动相溶解 10 mg 梓醇对照品,定溶于 10 mL 量瓶中,此溶液中梓醇的质量浓度为 1 mg/mL,储存备用。精密称量 10 mg 梓醇对照品,流动相 0.1%磷酸溶解,稀释,配制储备液终质量浓度 1 mg/mL,备用。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 将 1.0 g 地黄药材(或饮片)粉末,过 40 目筛,放入 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 50 mL 甲醇,振荡,置入超声仪器中溶解 40 min,滤过,取 10 mL 滤液,吹干,流动相 0.1%磷酸溶解,移至量瓶(10 mL)中,用 0.1%磷酸水定容至刻度,即得。

**2.1.3 色谱条件** Agilent Technologies 1100 series 色谱柱: Waters Atlantis T3-特色硅胶 C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm),设定柱温 35 ℃;紫外吸收波长 203 nm;进样量 20 μL;流动相 0.1%磷酸水(A)-乙腈(B);体积流量 1.0 mL/min。以梓醇峰积分为参照,塔板数不低于 3 000。流动相梯度洗脱程序: 0~10 min, 100% A; 10~30 min, 100%~98% A; 30~32 min, 98%~95% A; 32~37 min, 95%~93% A; 37~47 min, 93%~83% A; 47~52 min, 88%~84% A; 52~80 min, 84%~75% A; 80~85 min, 75%~70% A。

**2.1.4 精密度试验** 参照“2.1.2”项方法制备供试品溶液(批号 19001)对地黄溶液进行自动持续进样( $n=6$ ),共有色谱峰的相对保留时间( $t_R$ )值的 RSD 在 0.16%~0.34%,峰面积的 RSD 在 1.27%~3.50%。

**2.1.5 重复性试验** 参照“2.1.2”项方法制备 6 份地黄样品自动进样测试,通过计算,发现各共有峰的相对保留时间的 RSD 值均不大于 1.35%,峰面积的 RSD 值均不大于 4.83%,因此可以看出,该测试方

法的重复性较好,结果可信。

**2.1.6 稳定性试验** 参照“2.1.2”项方法制备供试品溶液,分别于不同的时间(0、2、4、6、8、10、12 h)对样品进行进样检测。通过对得到的结果进行计算,发现不同时间样品的共有色谱峰面积的 RSD 在 0.31%~2.60%,因此可以得出,在 12 h 内,样品溶液的稳定性较好。

**2.1.7 地黄指纹图谱的建立** 分别取地黄药材、饮片各 10 批,样品溶液的配制方法同“2.1.2”项,色谱条件同“2.1.3”项,对 20 批次地黄的指纹图谱,进行系统评价,按照平均数法,色谱图见图 1、2,对照图谱见图 3,得出每批样品的相似度,由表 1 结果可以看出,相似度均在 0.917 以上,因此规定相似度大于 0.9 即合格。20 批样品指纹图谱,保

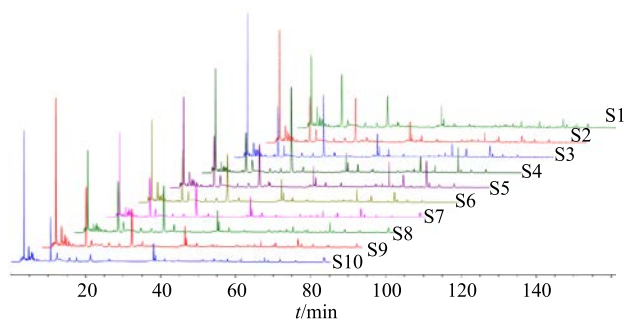


图 1 10 批地黄药材相应的指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches of *R. glutinosa*

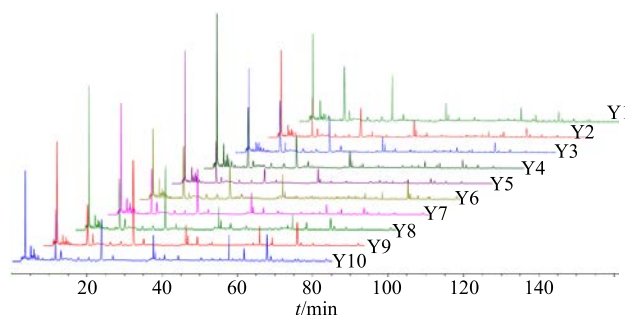


图 2 10 批地黄饮片相应的指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 10 batches of *R. glutinosa* slices

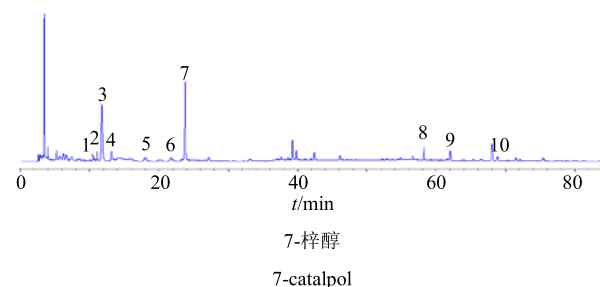


图 3 对照指纹图谱

Fig. 3 Catalpol as reference peak

表 1 相似度结果

Table 1 Similarity results

| 药材编号 | 相似度   | 饮片编号 | 相似度   |
|------|-------|------|-------|
| S1   | 0.981 | Y1   | 0.982 |
| S2   | 0.998 | Y2   | 0.993 |
| S3   | 0.989 | Y3   | 0.987 |
| S4   | 0.931 | Y4   | 0.926 |
| S5   | 0.988 | Y5   | 0.975 |
| S6   | 1.000 | Y6   | 0.998 |
| S7   | 0.999 | Y7   | 0.997 |
| S8   | 0.997 | Y8   | 0.996 |
| S9   | 0.981 | Y9   | 0.974 |
| S10  | 0.917 | Y10  | 0.934 |

留时间居中的为梓醇，分离度良好，并且梓醇是地黄主要成分之一，所以选择梓醇作为参照峰。

## 2.2 地黄中梓醇含量测定

根据国内外化学研究情况，地黄中梓醇的含量最高，因此选择梓醇作为指标性成分进行含量测定。由于梓醇极性较大，用普通的  $C_{18}$  柱测定时，糖类成分干扰较大，选用 Waters T3 特性  $C_{18}$  色谱柱进行了优化。

**2.2.1 色谱条件** 色谱条件同“2.1.3”项。以梓醇峰为参照进行积分计算，理论塔板数不低于 3 000。

**2.2.2 对照品溶液的配制** 将 10 mg 梓醇对照品（质量分数>98%）溶于 8 mL 流动相中，用 10 mL 量瓶定容，得到终质量浓度 1 mg/mL 的对照品溶液，分别精确量取不同体积的（0.01、0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 mL）上述备用对照品溶液于容量瓶中，用流动相 0.1%磷酸稀释定容，最终得到质量浓度分别为 5、40、80、120、160、200  $\mu\text{g/mL}$  系列对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 采用具塞锥形瓶配制样品。用分析天平称取地黄药材或饮片粉末 0.5 g，加入 50 mL 甲醇后用力振荡，于超声仪中超声 15 min，滤过，取 10 mL 滤液于量瓶中（10 mL）吹干，流动相溶解并定容至刻度，用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过后备用。

**2.2.4 专属性** 色谱条件参照“2.2.1”项，分别对梓醇对照品溶液，地黄供试品溶液进样测试，得到色谱图。从色谱图中看出，地黄供试品溶液与梓醇对照品溶液中的梓醇相对保留时间基本相同，供试品溶液色谱图中，梓醇与相邻峰分离度符合要求，该法具有良好的专属性。

**2.2.5 线性关系考察** 精确量取不同体积（0.01、0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 mL）的对照品溶液，

0.1%磷酸稀释，定容，得终质量浓度为 5~200  $\mu\text{g/mL}$  的待测对照品溶液。参照“2.2.1”项下的色谱条件，得到待测品的峰面积，通过对峰面积进行计算，得到梓醇的标准曲线： $Y=6.849\ 0\ X+4.581\ 4$  ( $r^2=0.999\ 8$ )。在 5~200  $\mu\text{g/mL}$ ，梓醇的峰面积和质量浓度之间的线性相关性良好，可以通过标准曲线计算样品中梓醇的含量，其中梓醇检出限为 0.85  $\mu\text{g/mL}$ ，定量限为 2.7  $\mu\text{g/mL}$ 。

**2.2.6 精密度试验** 按照“2.2.3”项制备的供试品溶，进行连续进样检测（ $n=6$ ），计算得出梓醇质量分数的 RSD 为 0.22%，精密度较好。

**2.2.7 重复性试验** 按照“2.2.3”项制备地黄供试品溶液，上样检测后，分析相应的色谱图，分析得出梓醇质量分数的 RSD 值为 2.3%，符合检测要求，检测结果的重复性较好。

**2.2.8 稳定性试验** 按照“2.2.3”项制备的供试品溶液，分别在不同的时间（0、2、4、8、10、12、24 h）取样进行检测，通过对梓醇质量分数进行计算，得到不同时间的梓醇质量分数的 RSD 值为 2.26%，表明样品溶液稳定性良好。

**2.2.9 加样回收率试验** 按照“2.2.3”项方法制备样品溶液，并添加不同比例的梓醇对照品（1:0.5、1:1、1:1.5），得到 3 种浓度的样品溶液，通过计算，得出各浓度的样品溶液回收率在 96.0%~116.0%，RSD 值分别为 0.82%、0.84%、0.95%，准确度良好，符合检测要求。

**2.2.10 地黄饮片、药材的梓醇含量检测结果** 对 10 批地黄饮片、10 批药材分别进行梓醇含量测定，结果见表 2、3。

表 2 地黄饮片梓醇含量

Table 2 Determination of catalpol of *R. glutinosa* slices

| 饮片  | 相对峰面积 | 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 质量分数/%  |
|-----|-------|------------------------------------------|---------|
| Y1  | 394.8 | 57.0                                     | 0.455 9 |
| Y2  | 466.2 | 67.4                                     | 0.538 9 |
| Y3  | 619.0 | 89.7                                     | 0.717 1 |
| Y4  | 957.2 | 139.1                                    | 1.113 3 |
| Y5  | 467.9 | 67.6                                     | 0.541 2 |
| Y6  | 537.6 | 77.8                                     | 0.622 5 |
| Y7  | 434.3 | 62.7                                     | 0.502 1 |
| Y8  | 532.4 | 77.1                                     | 0.616 3 |
| Y9  | 396.5 | 57.2                                     | 0.457 6 |
| Y10 | 192.3 | 27.4                                     | 0.219 4 |

表 3 地黄药材梓醇含量

Table 3 Determination of catalpol of *R. glutinosa*

| 药材  | 相对峰面积 | 质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 质量分数/%  |
|-----|-------|-------------------------------------------|---------|
| S1  | 388.6 | 56.1                                      | 0.448 7 |
| S2  | 470.5 | 68.0                                      | 0.543 9 |
| S3  | 618.6 | 89.7                                      | 0.716 7 |
| S4  | 980.2 | 142.4                                     | 1.140 3 |
| S5  | 462.0 | 66.8                                      | 0.534 3 |
| S6  | 548.2 | 79.4                                      | 0.634 9 |
| S7  | 437.8 | 63.3                                      | 0.506 1 |
| S8  | 539.1 | 78.1                                      | 0.624 2 |
| S9  | 388.1 | 56.0                                      | 0.447 9 |
| S10 | 178.6 | 25.4                                      | 0.203 4 |

根据地黄药材、饮片中梓醇含量检测数据,梓醇质量分数最低值为 0.203 4%,故将地黄梓醇含量测定标准限度定为不低于 0.2%。

### 3 讨论

#### 3.1 提取溶剂的考察

精密量取地黄药材 1.0 g,考察不同体积分数的甲醇、乙醇作为溶剂,按照“2.2.1”项色谱条件检测。得出甲醇提取的样品峰较多且峰形较好,基线较平稳,选择甲醇为提取溶剂。

#### 3.2 流动相考察

色谱条件按照“2.1.3”项下检测,取“2.2.3”项下地黄供试品溶液,分别配制流动相乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水。根据色谱图得出乙腈-0.1%磷酸水作为流动相梯度洗脱时,各组分色谱峰分离度良好,基线平稳,最终选定乙腈-0.1%磷酸水为流动相。

#### 3.3 波长考察

色谱条件按照“2.1.3”项下检测,对照品溶液上样,分别在不同波长(203、210、215、280、334 nm)条件下检测,结果发现,在 203 nm 条件下,出现的色谱峰最多,且响应值较好,因此,在本实验中选择 203 nm 为检测波长。

本研究从药材提取方法优化、色谱条件筛选、色谱方法学验证等方面,系统优化了地黄指纹图的 HPLC 测定方法,进一步建立了地黄的特征图谱,通过对 10 批地黄药材和 10 批地黄饮片的检测,通过数据分析,20 批地黄指纹图谱数据的相似程度均在 0.917 以上,经方法学验证,本方法的精密度、稳定性和重复性均符合要求,本研究还进一步优化了地黄中梓醇含量的测定方法,并进行了相关的方法学验证,结果显示专属性、重复性、精密度、回收率均符合要求,有效避免了药典方法梓醇含量检测时糖类物质的干扰,含量测定的准确性得到提升。所以本方法为提升地黄药材质量控制标准提供了参考依据。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 孙月川, 郑桦, 刘静, 等. 地黄多糖粉质量标准研究 [J]. 动物医学进展, 2016, 37(5): 69-73.
- [3] 崔瑛, 房晓娜, 王会霞, 等. 地黄不同炮制品补血作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 20-21.
- [4] Zhang Z, Meng Y, Guo Y, et al. *Rehmannia glutinosa* polysaccharide induces maturation of murine bone marrow derived Dendritic cells (BMDCs) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 54(6): 136-143.
- [5] Huang Y, Jiang C, Hu Y, et al. Immunoenhancement effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on lymphocyte proliferation and dendritic cell [J]. *Carbo Hydr Polym*, 2013, 96(2): 516-521.
- [6] 丁岗, 崔瑛, 盛龙生, 等. 地黄血清药物化学的初步研究 [J]. 中国天然药物, 2003, 1(2): 85-88.
- [7] 崔瑛, 丁岗, 孙曙光, 等. 地黄不同提取部位指纹图谱实验研究 [J]. 河南中医学院学报, 2003, 18(4): 18-19.
- [8] 曾志, 杨东晖, 宋力飞, 等. 高效液相色谱指纹图谱应用于地黄的研究 [J]. 分析化学研究简报, 2003, 31(12): 1485-1488.
- [9] 李建军, 王君, 王莹, 等. 怀地黄 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2014, 42(3): 119-124.