

基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地地黄叶的质量

张壹明¹, 张玉梅¹, 刘仟禧¹, 王凤娇¹, 刘梦云^{1,2,3*}, 康乐^{1,2,3}, 曹彦刚^{1,2,3}, 冯卫生^{1,2,3}, 李凯^{1,2,3}, 李红伟^{1,2,3*}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046
2. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046
3. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 建立不同产地地黄 *R. glutinosa* 叶的指纹图谱及多成分含量测定方法, 结合化学模式识别法评价不同产地地黄叶的质量。 **方法** 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)建立地黄叶高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱并分析相似度, 同时通过对照品指认化学成分并进行定量测定。通过 Origin 2025、IBM SPSS Statistics 27.0 和 SIMCA 14.1 软件进行聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)及正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 对地黄叶饮片进行质量评价, 筛选差异性标志物。 **结果** 建立了不同产地地黄叶 HPLC 指纹图谱, 共标定了 19 个共有色谱峰, 指认出 13 个成分; 23 批样品相似度在 0.879~0.997; 聚类热图分析将 23 批地黄叶分为 2 类; PCA 提取了 5 个主成分, 其方差累积贡献率为 83.545%, 且结果显示河南产地的地黄叶质量最优; OPLS-DA 筛选出梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素 4 个质量差异标志物, 4 种成分的质量分数分别为 25.474~61.784 mg/g、11.633~47.462 mg/g、0.096~0.848 mg/g、0.100~1.268 mg/g。 **结论** 建立的地黄叶 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法简单、准确、重复性好, 能系统地反映不同产地的地黄叶样品差异, 可为其质量控制提供参考。

关键词: 地黄; HPLC; 指纹图谱; 梓醇; 毛蕊花糖苷; 木犀草素; 芹菜素; 化学模式识别; 质量评价; 化学计量学

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4835-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.025

Quality evaluation of *Rehmannia glutinosa* leaves from various origins by HPLC fingerprinting and multi-component quantification combined with chemometric analysis

ZHANG Yiming¹, ZHANG Yumei¹, LIU Qianxi¹, WANG Fengjiao¹, LIU Mengyun^{1,2,3}, KANG Le^{1,2,3}, CAO Yangang^{1,2,3}, FENG Weisheng^{1,2,3}, LI Kai^{1,2,3}, LI Hongwei^{1,2,3}

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Zhengzhou 450046, China
3. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To establish a fingerprinting method and multi-component quantification approach for *Rehmannia glutinosa* leaves from different geographical origins, and to evaluate the quality of these samples using chemometric analysis. **Methods** The HPLC fingerprint of *R. glutinosa* leaves was developed and analyzed for similarity using the Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (Version 2012.130723). Chemical constituents were identified and quantified by comparison with reference standards. Hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed using Origin 2025, IBM SPSS Statistics 27.0, and SIMCA 14.1 software to evaluate the quality of *R. glutinosa* leaves samples and screen for differential markers. **Results** A characteristic HPLC fingerprint of *R. glutinosa*

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)项目(242301420021); 河南省杰出青年科学基金资助项目(252300421028); 河南省高校科技创新团队支持计划(26IRTSTHN018)

作者简介: 张壹明, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制机制及饮片标准化。E-mail: 15956438411@163.com

*通信作者: 刘梦云, 博士, 从事中药炮制机制及质量标准研究。Email: liumengyun218@163.com

李红伟, 博士, 副教授, 从事中药炮制机制及饮片标准化研究。E-mail: lhw20091068@sina.com

leaves from different origins was developed. In this fingerprint, 19 common peaks were calibrated, and 13 components were unequivocally identified using reference standards. The similarity evaluation of the 23 batches yielded results ranging from 0.879 to 0.997. The cluster heatmap analysis demonstrated a clear classification, dividing the samples into two groups. Principal component analysis (PCA) yielded five principal components with a cumulative variance contribution rate of 83.545%, and the score plot revealed that samples originating from Henan province clustered separately, suggesting their superior quality. Subsequently, OPLS-DA was employed, which successfully screened four compounds-catalpol, acteoside, luteolin, and apigenin-as critical markers for quality discrimination. The quantitative analysis showed that the contents of these markers were 25.474—61.784 mg/g, 11.633—47.462 mg/g, 0.096—0.848 mg/g, and 0.100—1.268 mg/g, respectively. **Conclusion** The developed method, integrating HPLC fingerprinting and multi-component assay, proved to be simple, accurate, and reproducible. It can systematically reflect the differences among samples of *R. glutinosa* leaves from different producing areas, thereby providing a reference for their quality control.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch.; HPLC; fingerprint; catalpol; acteoside; luteolin; apigenin; chemometric analysis; quality evaluation; chemometrics

地黄叶为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥叶, 2022 版《河南省中药饮片炮制规范》明确记载其药性和功能主治: “甘、淡, 寒。归心、肝、肾经。益气养阴, 补肾, 活血。用于少气乏力、面色无华、口干舌燥、气阴两虚证。外用于恶疮、手足癣”^[1]。临床常用于治疗属气阴两虚证慢性肾小球肾炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) 及糖尿病肾病^[2]。现代研究表明, 地黄叶中有效活性成分有环烯醚萜、苯乙醇、紫罗兰酮、黄酮及有机酸等类型化学成分, 具有改善肾功能、抗糖尿病、降血糖、抗氧化、抗菌、防治皮肤病、降血压等药理作用^[3]。

地黄叶基原植物地黄的生态适应性较强, 基于引种驯化, 现全国各地均有种植, 然而由于不同地域气候、土壤成分、栽种环境技术存在差异^[4-5], 各地地黄叶质量多有不均。目前地黄叶虽收录于炮制规范中, 却缺少含量测定项, 由于地黄叶化学成分丰富, 仅靠传统鉴别项很难系统反映地黄叶的质量, 难以准确控制其质量。HPLC 特征指纹图谱以其独特的特征性和高度的整体性, 与中药多成分协同作用的特征相吻合, 已成为现代中药材质量控制的常用方法^[6], 本实验拟对 23 批不同产地的地黄叶药材进行 HPLC 指纹图谱研究, 并同时测定梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素的含量, 旨在通过多指标、多成分含量测定, 以更精确、更科学的方法综合评价地黄叶的质量; 此外, 运用相似度评价分析、聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 对地黄叶进行综合评价, 旨在找出对其质量影响较

大的关键性成分, 建立更全面的地黄叶质量评价方法, 为其质量控制提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

114B 型摇摆式粉碎机 (瑞安市永历制药机械有限公司); Sartorius BT25S 型十万分之一电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); CTO-20A 型高效液相色谱仪 (岛津仪器有限公司); FA21043 型万分之一电子分析天平 (上海越平科学仪器有限公司); 优普超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司); KQ-500DV 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料

1.2.1 药材 23 批地黄叶药材样品, 编号分别为 S1~S23, 见表 1, 经河南中医药大学李凯教授鉴定为玄参科植物地黄 *R. glutinosa* Libosch 的干燥叶。将所得样品粉碎过 3 号筛, 干燥保存备用。

1.2.2 试剂 甲醇 (色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 磷酸 (色谱纯, 成都市科隆化学有限公司); 水为双蒸水; 京尼平苷酸 (批号 AF7111702)、异毛蕊花糖苷 (批号 AF8032801)、红景天苷 (批号 AF8011012)、地黄苷 A (批号 AF8031304)、梓醇 (批号 AF7110704)、芹菜素 (批号 AB7061813)、地黄苷 D (批号 AF8031302), 成都埃法生物科技有限公司产品; 对照品木犀草素 (批号 S08GB160295) 购于上海源叶生物科技有限公司, 毛蕊花糖苷 (批号 TYPC-6KMR) 购于中国食品药品检定研究院; 米花团苷 A、焦地黄苯乙醇 A1、金圣草素、地黄苷为实验室自制。所有对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液制备 精密称取地黄叶粉 0.5 g,

表1 地黄叶样品信息

Table 1 Information of *R. glutinosa* leaves samples

样品编号	产地信息	采收时间	样品编号	产地信息	采收时间
S1	河南焦作	2025-09	S13	山西运城	2025-09
S2	河南焦作	2025-09	S14	山西运城	2025-09
S3	河南焦作	2025-09	S15	山西临汾	2025-09
S4	河南郑州	2025-10	S16	山西临汾	2025-09
S5	河南郑州	2025-10	S17	山西临汾	2025-09
S6	河南郑州	2025-10	S18	山东滨州	2025-09
S7	河南郑州	2025-10	S19	山东滨州	2025-09
S8	河南焦作	2025-10	S20	山东滨州	2025-09
S9	河南焦作	2025-10	S21	陕西汉中	2025-09
S10	河南焦作	2025-10	S22	陕西汉中	2025-09
S11	河南郑州	2024-10	S23	陕西汉中	2025-09
S12	山西运城	2025-09			

置具塞锥形瓶中，精密加入 90% 甲醇 20.0 mL，密塞，称定质量，超声提取 30 min，放冷，再用 90% 甲醇补足减失的质量，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.2 混合对照品溶液制备 取梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、京尼平苷酸、红景天苷、焦地黄苯乙醇 A1、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、米花团苷 A、地黄苷、木犀草素、芹菜素和金圣草素对照品适量，加 90% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，得单一对照品溶液，再分别精密量取适量单一对照品溶液适量，加 90% 甲醇稀释至 2 mL 量瓶中，得到质量浓度分别为 20.45、42.3、20.15、21.25、32.6、43.45、42.3、32.75、21.85、13.25、23.25、43.15、27.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液，备用。

2.2 地黄叶指纹图谱的建立及相似度评价

2.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse XBD-C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)，流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸水 (B)，检测波长 204 nm，梯度洗脱 (0~1 min, 0.5%~0.1% A; 1~18 min, 0.1%~0.3% A; 18~19 min, 0.3%~3.5% A; 19~24.3 min, 3.5%~6.5% A; 24.3~29.3 min, 6.5%~12.0% A; 29.3~34.3 min, 12.0%~15.0% A; 34.3~35 min, 15.0% A; 35~47 min, 15.0%~20.0% A; 47~52 min, 20.0%~30.0% A; 52~63 min, 30.0% A; 63~70 min, 30.0%~40.0% A; 70~75 min, 40.0%~100.0% A)，柱温 31 $^{\circ}\text{C}$ ，体积流量 0.8 mL/min，进样量 5.0 μL 。

2.2.2 参照峰的选择 在图谱中，毛蕊花糖苷 (12 号峰) 峰形较好、含量较高，且有较好的稳定性，故选择毛蕊花糖苷色谱峰作为参照峰，进行计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。

2.2.3 精密度试验 取同一批供试品溶液 (S1)，按

“2.2.1” 项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。以毛蕊花糖苷 (12 号峰) 为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.01%，相对峰面积的 RSD 小于 2.29%，表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液 (S1)，按“2.2.1” 项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、18、24 h 进样测定，记录色谱图。以毛蕊花糖苷 (12 号峰) 为参照峰，计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.07%，相对峰面积的 RSD 小于 2.94%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批地黄叶样品 (S1) 6 份，按“2.1.1” 项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1” 项下色谱条件测定分析，记录色谱图。以毛蕊花糖苷 (12 号峰) 为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.47%，相对峰面积的 RSD 小于 3.52%，表明方法重复性良好。

2.2.6 HPLC 指纹图谱的建立和相似度评价 取 23 批地黄叶粉末，按照“2.1.1” 项下方法，分别制备 23 批供试品溶液 (S1~S23)，按照“2.2.1” 项下色谱条件进样测定，得到 23 批地黄叶的色谱数据。将 HPLC 数据导入软件中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本)，选择样品 (S1) 作为参照图谱，对 23 批地黄叶色谱图进行多点校正及 Mark 峰匹配，生成指纹图谱及对照图谱 (图 1)，并进行相似度评价。23 批地黄叶色谱图中共指认共有峰 19 个，通过比较供试品溶液与混合对照品溶液图谱 (图 2)，确认峰 1 为梓醇、峰 3 为地黄苷 D、峰 4 为地黄苷 A、峰 6 为京尼平苷酸、峰 7 为红景天苷、峰 11 为焦地黄苯乙醇 A1、峰 12 为毛蕊花糖苷、峰 14 为异毛蕊花糖苷、峰 15 为米花团苷 A、峰 16 为地黄苷、峰 17 为木犀草素、峰 18 为芹

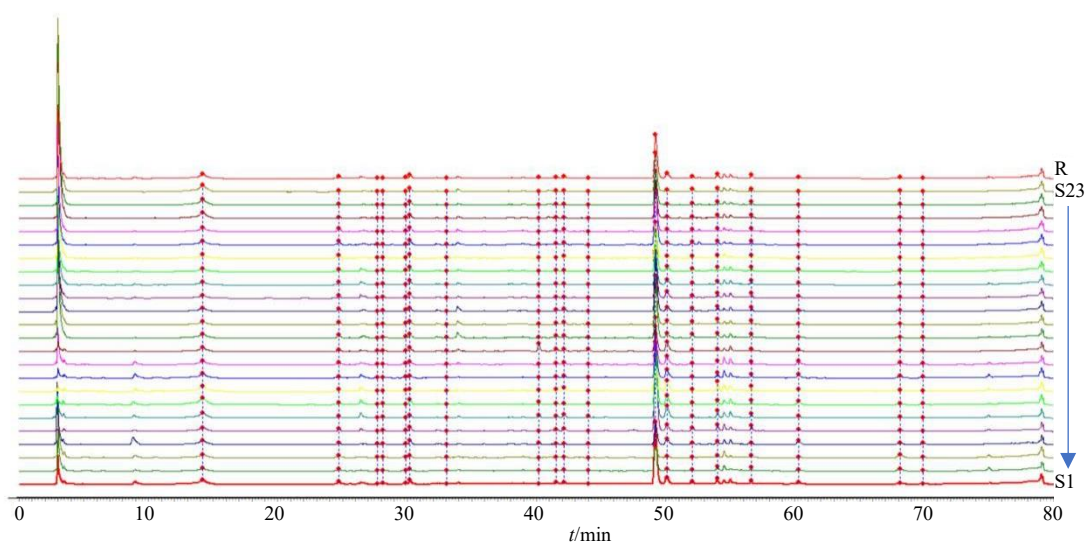
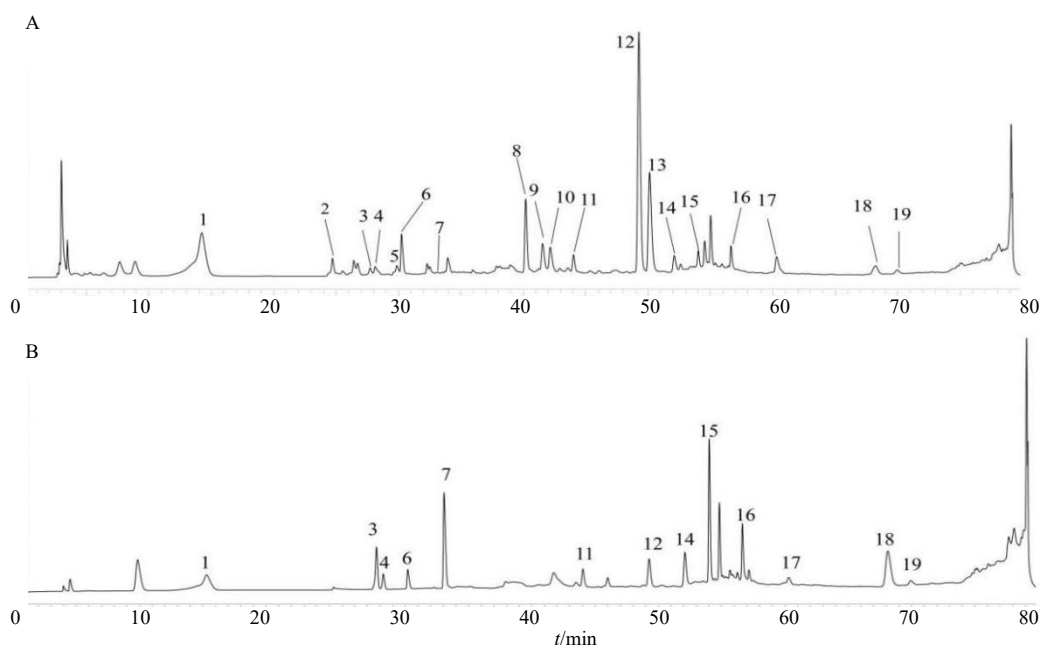


图1 23批次不同产地地黄叶HPLC叠加指纹图谱和对照图谱(R)

Fig. 1 Superimposed HPLC fingerprints and reference chromatogram (R) of 23 batches of *R. glutinosa* leaves from various origins



1-梓醇; 3-地黄苷D; 4-地黄苷A; 6-京尼平苷酸; 7-红景天苷; 11-焦地黄苯乙醇A1; 12-毛蕊花糖苷; 14-异毛蕊花糖苷; 15-米花团苷A; 16-地黄苷; 17-木犀草素; 18-芹菜素; 19-金圣草素。

1-catalpol; 3-rehmannioside D; 4-rehmannioside A; 6-geniposidic acid; 7-salidroside; 11-jiaodihuangphenylethanoid A1; 12-acteoside (verbascoside); 14-isoacteoside; 15-leonoside A; 16-rehmannioside; 17-luteolin; 18-apigenin; 19-chrysoeriol.

图2 地黄叶(A)和混合对照品(B)色谱图

Fig. 2 Chromatographic profiles of *R. glutinosa* leaves sample (A) and mixed reference standards (B)

菜素、峰19为金圣草素。相似度结果(表2)显示, S1~S23的相似度结果在0.879~0.997, S1~S2、S4~S23的相似度均>0.9,表明S3与其他批次存在差异,但整体地黄叶质量相似性良好。

2.3 化学模式识别

2.3.1 HCA 将23批地黄叶样品指纹图谱的19个共有峰峰面积导入Origin 2025软件中,选择聚类方法为ward,距离类型为Manhattan Distance,采用列标准化数据,绘制聚类热图,结果见图3。23批地

表 2 23 批地黄叶相似度评价结果

Table 2 Similarity assessment of 23 batches of *R. glutinosa*

leaves			
编号	相似度	编号	相似度
S1	0.996	S13	0.994
S2	0.987	S14	0.997
S3	0.879	S15	0.994
S4	0.943	S16	0.996
S5	0.981	S17	0.997
S6	0.993	S18	0.995
S7	0.995	S19	0.989
S8	0.994	S20	0.994
S9	0.985	S21	0.979
S10	0.976	S22	0.982
S11	0.939	S23	0.973
S12	0.998		

黄叶样品可被聚为 2 大类，其中 S1~S11（河南省）和 S15~S17（山西省）聚为一类，S12~S14（山西省）、S17~S20（山东省）和 S21~S23（陕西省）聚为一类。由聚类结果可知，山西省与河南省的地黄叶质量较为相似，这可能与河南省和山西省接壤、产地经纬度差较小、环境气候条件相似且采收期基本一致等因素有关。

从聚类热图分析中可见，共有峰 1、3、6、7 代表的化学成分，河南和陕西产地样品成分含量明显高于山西省和山东省；共有峰 12、13、14、16 代表的化学成分，河南和山西产地样品成分含量明显高于山东省和陕西省；共有峰 17~19 代表的化学成分，河南产地样品成分含量明显高于其他 3 产地。此外，23 批地黄叶与 19 个共有峰的聚类有一定关联性，表明不同产地地黄叶可通过所含化学成分的差异进行分类。

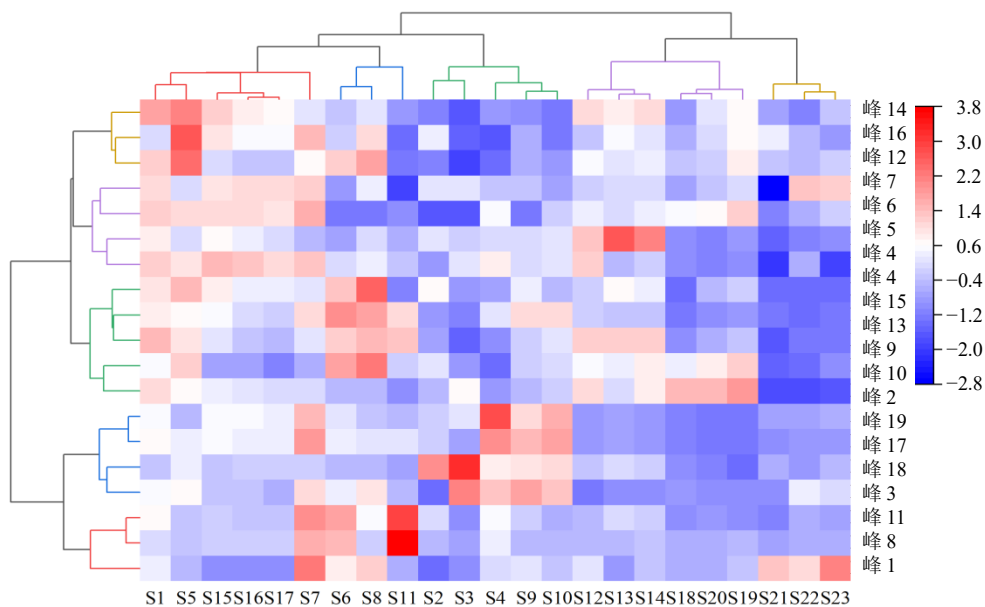


图 3 23 批地黄叶样品聚类热图
Fig. 3 Hierarchical clustering heatmap of 23 batches of *R. glutinosa* leaves

2.3.2 PCA 为了研究不同样本之间的差异性，将 23 批地黄叶 19 个共有峰的峰面积导入 SPSS 27.0 软件，进行 PCA。Bartlett 球形度检验显示 $P < 0.05$ ，说明该数据适于 PCA，以特征值 > 1 的标准进行提取，得 5 个主成分的累积方差贡献率为 83.545%，表明可以代表地黄叶特征图谱 19 个共有色谱峰的大部分信息，结合碎石图（图 4）的突变点，提取 5 个成分进行质量评价，其特征值及贡献率见表 3。

因子载荷矩阵反映了各主成分与 19 个共有峰

即原始变量之间的相关系数，结果见表 4，第 1 主成分主要反映了色谱峰共有峰 2、4（地黄苷 A）、5、9、10、12（毛蕊花糖苷）、13、14（异毛蕊花糖苷）、15（米花团苷 A）、16（地黄苷）的信息，第 2 主成分主要反映了色谱峰 3（地黄苷 D）、8、11（焦地黄苯乙醇 A1）、17（木犀草素）、18（芹菜素）、19（金圣草素）的信息，第 3 主成分主要反映了色谱峰 7（红景天苷）的信息，第 4 主成分主要反映了色谱峰 1（梓醇）的信息，第 5 主成分主要反映

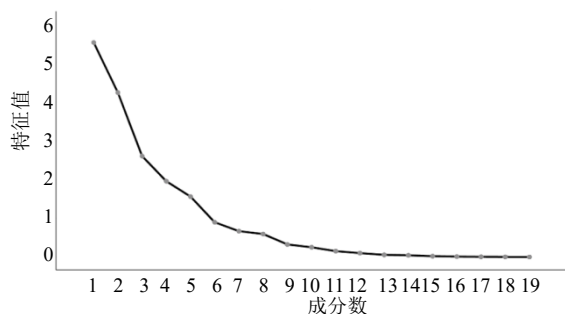


图4 地黄叶 PCA 碎石图

Fig. 4 Scree plot of PCA for *R. glutinosa* leaves

表3 特征值及方差贡献率

Table 3 Eigenvalues and variance contribution rates

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.527	29.091	29.091
2	4.236	22.297	51.388
3	2.600	13.684	65.072
4	1.953	10.278	75.349
5	1.557	8.196	83.545

表4 因子载荷矩阵

Table 4 Factor loading matrix

共有峰	载荷				
	因子1	因子2	因子3	因子4	因子5
1 (梓醇)	-0.052	0.136	-0.434	0.707	0.288
2	0.433	-0.431	0.333	-0.313	-0.200
3 (地黄苷D)	0.022	0.751	0.223	0.189	0.368
4 (地黄苷A)	0.671	0.402	0.458	0.027	-0.220
5	0.495	-0.013	0.378	-0.464	-0.123
6 (京尼平苷酸)	0.454	-0.296	0.366	0.457	0.537
7 (红景天苷)	0.286	-0.043	0.583	0.402	0.043
8	0.231	0.503	-0.620	-0.067	-0.473
9	0.864	0.053	-0.279	-0.297	-0.059
10	0.636	-0.262	-0.335	-0.358	0.353
11 (焦地黄苯乙醇A1)	0.427	0.569	-0.540	-0.042	-0.324
12 (毛蕊花糖苷)	0.767	-0.385	-0.208	0.312	0.304
13	0.727	0.577	-0.276	-0.048	0.099
14 (异毛蕊花糖苷)	0.777	-0.455	0.176	0.174	-0.154
15 (米花团苷A)	0.837	0.055	0.049	-0.153	0.430
16 (地黄苷)	0.623	-0.410	0.031	0.309	0.235
17 (木犀草素)	0.326	0.848	0.186	0.195	-0.026
18 (芹菜素)	-0.206	0.502	0.501	-0.436	0.345
19 (金圣草素)	0.102	0.859	0.344	0.184	-0.049

了色谱峰 6 (京尼平苷酸) 的信息, 这些成分是影响地黄叶药材质量的重要因素。

通过 SPSS 27.0 软件将 23 批地黄叶共有峰面积进行标准化处理, 结合主成分特征值和因子得分, 计算 23 批样品的主成分得分, 最终得到各样品的综合得分并进行排序, 结果见表 5。从表 5 中可以看出排名最高的 3 个名次为 S5、S7~S8 (河南), 排名最低的 3 个名次为 S3~S4 (河南)、S21 (陕西), 说明在这 23 批地黄叶中, 河南产地的样品质量较为复杂。

2.3.3 OPLS-DA 为了更好地体现不同样本之间的差异, 选出对样本具有较大贡献率的成分, 将 23 批地黄叶的 19 个共有峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中, 以峰面积为变量, 进行 OPLS-DA, 结果如图 5 所示, 河南产地的样品 S1~S11 主要分布于第 1、4 象限靠近 X 轴的位置, S12~S17 均位于第 1、2 象限距离较近聚为一类, 山东和陕西的样品各自分布在第 2 和第 3 象限并聚为一类, 河南与山西的样

品虽分布在 3 个象限里, 但两者整体距离相对较近, 这一结果与聚类热图分析结果基本一致。OPLS-DA 模型中累积解释能力参数 $R^2_X(\text{cum})$ 为 0.952,

$R^2_Y(\text{cum})$ 为 0.858, 预测能力参数 $Q^2(\text{cum})$ 为 0.753 > 0.5, 表明所建模型稳定可靠^[7]。根据此模型可得变量重要性投影 (variable importance for projection,

表 5 23 批地黄叶的主成分得分和排序

Table 5 Scores and ranking of principal components for 23 batches of *R. glutinosa* leaves

编号	得分					综合得分	排名
	因子1	因子2	因子3	因子4	因子5		
S1	1.499	0.232	2.731	2.794	3.196	1.499	4
S2	-2.578	1.505	-1.273	-4.471	-2.644	-2.578	20
S3	-5.031	-1.952	-4.222	3.701	-2.750	-5.031	22
S4	-1.388	-0.985	-6.770	-5.596	-7.989	-1.388	23
S5	1.445	0.985	3.160	1.336	3.100	1.445	2
S6	1.052	1.465	1.616	-0.603	2.607	1.052	6
S7	1.808	2.723	2.111	0.980	0.536	1.808	1
S8	1.656	3.956	1.380	-0.452	-0.787	1.656	3
S9	0.451	-0.332	0.160	1.743	-0.039	0.451	12
S10	-1.550	-0.913	-2.298	1.572	-1.461	-1.550	18
S11	2.008	-2.455	0.027	-2.183	-2.615	2.008	15
S12	0.665	-1.038	1.140	2.782	2.514	0.665	10
S13	0.306	-0.957	3.843	3.476	4.909	0.306	5
S14	2.135	-0.796	1.942	-1.340	2.583	2.135	9
S15	0.451	-2.565	1.191	0.648	0.813	0.451	13
S16	0.650	1.413	1.373	-0.893	2.372	0.650	8
S17	0.425	1.486	0.787	-1.992	1.523	0.425	11
S18	-0.224	-0.978	-0.713	1.871	-0.787	-0.224	14
S19	1.368	-0.068	1.180	2.996	1.118	1.368	7
S20	-1.886	-0.870	-2.099	1.829	-1.117	-1.886	19
S21	-1.095	-0.310	-3.760	-2.750	-3.383	-1.095	21
S22	-1.593	-0.308	0.080	-2.087	0.854	-1.593	16
S23	-0.572	0.762	-1.585	-3.361	-2.552	-0.572	17

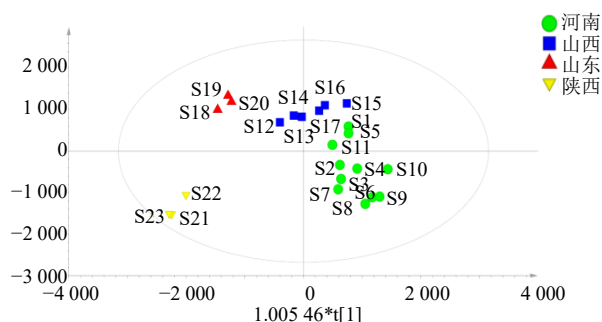


图 5 23 批地黄叶 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA scores of 23 batches of *R. glutinosa* leaves

VIP) 值得分图 (图 6), 以结果显示中 VIP 值 > 1 的标准筛选差异性成分, 按照影响大小排序依次为峰 12、13、1、2、10, 表明这 5 个成分在批次中差异较大。

2.4 地黄叶 HPLC 多成分含量测定

峰 1 (梓醇)、峰 12 (毛蕊花糖苷)、峰 17 (木犀草素) 和峰 18 (芹菜素) 为地黄叶的主要功效成

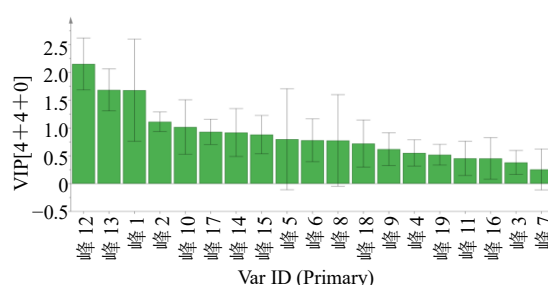


图 6 23 批地黄叶 VIP 得分图

Fig. 6 VIP scores plot of 23 batches of *R. glutinosa* leaves

分, 且经 VIP 值筛选被确定为主要差异性成分。结合课题组前期实验研究, 选择这 4 个成分作为定量指标, 以进一步评价这 23 批地黄叶的质量。

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素对照品适量, 加 90% 甲醇制备梓醇质量浓度为 2 040 μg/mL、毛蕊花糖苷质量浓度为 1 290 μg/mL、木犀草素质量浓度为 145 μg/mL、芹菜素质量浓度为 132.5 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 同“2.1.1”项。

2.4.3 色谱条件 同“2.2.1”项色谱条件。

2.4.4 线性关系考察 取“2.4.1”项下混合对照品溶液，使用倍比稀释法制成系列浓度的混合对

照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品溶液质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线，结果见表 6。

表 6 地黄叶标志性成分含量测定的线性关系考察

Table 6 Linear regression analysis of marker components in *R. glutinosa* leaves

成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
梓醇	$Y=3\ 942.6 X+13\ 826$	0.999 8	31.88~2 040.00
毛蕊花糖苷	$Y=16\ 547 X+334\ 995$	0.999 0	40.31~1 290.00
木犀草素	$Y=42\ 599 X+139\ 498$	0.999 5	2.27~145.00
芹菜素	$Y=36\ 650 X+90\ 728$	0.999 7	2.07~132.50

2.4.5 精密度试验 取“2.4.1”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积，计算得梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素峰面积的 RSD 分别为 2.59%、2.07%、2.12%、2.25%。

2.4.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液 (S1)，按“2.2.1”项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、18、24 h 进样测定，计算得梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素峰面积的 RSD 分别为 1.04%、0.45%、1.82%、1.22%。

2.4.7 重复性试验 取同一批地黄叶样品 6 份 (S1)，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件测定分析，计算得梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素峰面积的 RSD 分别为 1.10%、0.44%、1.63%、1.36%。

2.4.8 加样回收率试验 取 6 份已知成分含量的地黄叶样品 (S1) 0.5 g，精密称定，分别加入与样品中成分含量近似相等的对照品，按“2.1.1”项下制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得到梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素的平均加样回收率分别为 99.90%、102.63%、101.86%、99.78%，RSD 分别为 3.12%、3.48%、1.91%、2.66%。

2.4.9 样品含量测定 精密称取 23 批地黄叶粉末，按照“2.1.1”项下制备供试品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定分析，根据线性方程计算梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素的含量，结果 (表 7) 显示，梓醇质量分数在 25.474~61.784 mg/g，平均值为 38.881 mg/g；毛蕊花糖苷质量分数在 11.633~47.462 mg/g，平均值为 24.812 mg/g；木犀草素质量分数在 0.096~0.848 mg/g，平均值为 0.301 mg/g；芹菜素质量分数在 0.100~1.268 mg/g，平均

值为 0.409 mg/g，其中梓醇为陕西产地平均质量分数最高，毛蕊花糖苷为山西产地平均质量分数最高，木犀草素和芹菜素均为河南产地平均质量分数最高。将 23 批地黄叶 4 个差异性成分 (梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素) 的含量导入 Graphpad Prism (10.1.2) 软件中，进行单因素方差分析，含量测定结果见图 8，由图可以看到毛蕊花糖苷含量差异性较小，而梓醇、木犀草素和芹菜素在不同产地之间存在显著差异。故基于本研究结果，可将梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素 4 种指标成分作为评价地黄叶质量差异潜在的标志成分。

3 讨论

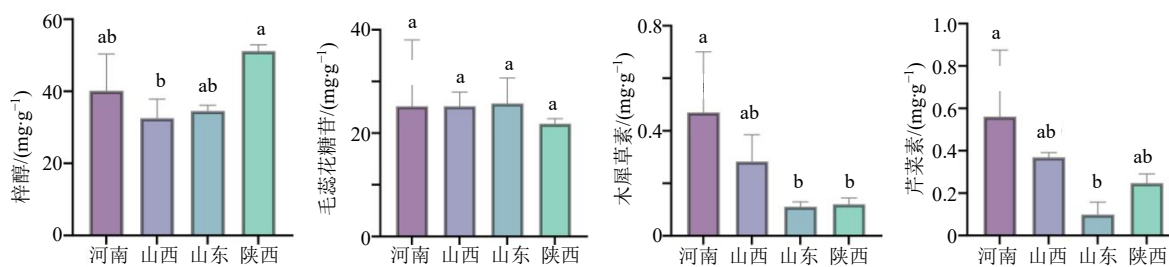
实验前期考察了不同提取溶剂 (100% 甲醇、90% 甲醇、80% 甲醇、70% 甲醇、60% 甲醇、90% 乙醇、水)，不同超声提取时间 (10、30 min)，结果发现使用 90% 甲醇超声提取 30 min 时出峰数量较多且峰分离度较好。为了使指纹图谱信息丰富，提高峰值响应、稳定性及灵敏度，实验分别考察了不同流动相 (乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸水、甲醇-0.1% 甲磷酸水、甲醇-水)、不同体积流量 (0.6、0.8、1.0 mL/min)、不同柱温和不同波长等条件下各色谱图的基线、色谱峰数量、分离度和响应值，结果表明，采用 Eclipse XBD-C₁₈ 色谱柱、流动相为乙腈-0.1% 磷酸水、体积流量 0.8 mL/min、柱温 31 °C、波长 204 nm 时，流动相基线平稳、峰形良好、信息量大、响应值高，且分离效果好，能够满足分析要求。

中药指纹图谱可反映样品中化学成分信息，结合化学模式识别可对样品中共有峰的差异性进行分析。23 批地黄叶样品指纹图谱的相似度为 0.879~0.997，说明不同产地地黄叶的化学成分基

表 7 23 批地黄叶 4 个成分含量测定结果

Table 7 Quantitative results of four marker components in 23 batches of *R. glutinosa* leaves

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	梓醇	毛蕊花糖苷	木犀草素	芹菜素		梓醇	毛蕊花糖苷	木犀草素	芹菜素
S1	41.657	35.164	0.417	0.355	S13	30.801	26.377	0.163	0.407
S2	25.474	13.259	0.180	0.933	S14	36.319	27.747	0.223	0.383
S3	29.080	15.805	0.106	1.268	S15	28.806	24.327	0.408	0.343
S4	39.752	11.633	0.848	0.585	S16	29.063	22.187	0.357	0.360
S5	35.003	47.462	0.279	0.474	S17	28.873	21.998	0.353	0.365
S6	46.987	34.711	0.462	0.315	S18	33.691	22.131	0.111	0.157
S7	61.784	30.450	0.179	0.377	S19	36.373	31.408	0.092	0.040
S8	50.521	40.893	0.331	0.308	S20	33.695	23.566	0.130	0.100
S9	41.282	18.870	0.682	0.642	S21	52.929	21.381	0.096	0.243
S10	36.141	15.969	0.728	0.687	S22	49.421	21.130	0.144	0.204
S11	33.853	12.814	0.309	0.219	S23	51.175	22.966	0.121	0.292
S12	41.572	28.431	0.193	0.350					



不同标记字母的数据表示它们之间存在显著差异, $P < 0.05$ 。

Different superscript letters denote significant differences ($P < 0.05$).

图 8 4 个指标成分含量测定柱形图

Fig. 8 Bar chart of content determination for four marker components.

本相似, 为了进一步区分不同产地地黄叶的差异, 采用化学模式识别对 23 批地黄叶样品的共有峰进行聚类热图分析。聚类热图结果显示, 23 批地黄叶样品聚为 2 大类, 其中河南省和山西省聚为一类, 山西省、山东省和陕西省聚为一类; 产于陕西省和河南省的地黄叶样品中环烯醚萜类成分(峰 1、峰 3、峰 4、峰 6)含量较高; 产于河南省和山西省的样品中苯乙醇苷类成分(峰 11、峰 12、峰 14、峰 14、峰 15、峰 16)含量较高; 产于河南省的样品中黄酮类成分(峰 17、峰 18、峰 19)含量较高。虽然河南地黄叶各类成分的平均质量分数不显著, 但整体化学成分含量比较均衡且丰富, 推测原因为, 地黄喜温耐旱, 适宜生长在光照充足的环境中, 温县、武陟等地区地势平坦, 土壤多为黄河冲积形成的沙壤土, 土质疏松, 光照充足, 气候温和, 天然的气候条件正适合地黄的生长^[8-9]。OPLS-DA 结果显示, 23 批地黄叶样品山西与河南接近, 山东与陕

西的样品各自聚为一类, 与聚类热图分类结果基本一致, 经 VIP 值分析筛选共得到 5 个差异性成分, 依次为共有峰 12 (毛蕊花糖苷)、共有峰 13、共有峰 1 (梓醇)、共有峰 2、共有峰 10, 目前峰 13、2 和 10 的化学成分尚未可知, 有待后续进一步研究指认。

含量测定结果表明梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素的含量在不同产地间存在显著差异, 梓醇含量为陕西产地较高, 河南产地次之; 毛蕊花糖苷为山西含量较高, 河南产地的含量也较为接近; 木犀草素和芹菜素的含量均为河南产地的最高, 且远高于其他产地, 该统计结果与 PCA 及 OPLS-DA 结论一致, 整体来看, 河南产地地黄叶中各成分含量均处于较高水平, 山西产地的样品质量与之较为接近。上述成分是影响地黄叶质量的重要因素, 研究表明, 环烯醚萜类和苯乙醇类化合物能够协同增效, 梓醇和毛蕊花糖苷均能够降血糖^[10-11]、抗骨质

疏松^[12-13]、抗炎^[14-15]，是地黄叶治疗 CGN、糖尿病肾病和保护肾功能的重要活性成分；而木犀草素和芹菜素均可抗菌、抗炎^[3, 16]，结合毛蕊花糖苷促进皮肤伤口修复^[17]，从现代药理学角度佐证了地黄叶“治恶疮，手足癬”的传统功效。

综上所述，本研究建立了地黄叶 HPLC 指纹图谱，结合化学模式识别分析对不同产地地黄叶质量进行评价，得到影响地黄叶各批次间的显著性差异成分，并基于该方法同时测定了地黄叶中梓醇、毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素 4 种指标成分的含量，有效补充了关于不同产地地黄叶有效成分分析方向的空缺。所建立方法可系统性反映地黄叶中主要成分的特征，方法简便、准确、重复性好，可为地黄叶药材整体质量评价和质量控制提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 河南省药品监督管理局. 河南省中药饮片炮制规范 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2022: 282.
- [2] 郭敏, 杜跃亮, 林静. 地黄叶总苷胶囊治疗糖尿病肾病的随机对照研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(9): 67-71.
- [3] 张壹明, 闫洪建, 李三原, 等. 地黄叶化学成分、药理作用与药性和功能主治的关联性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2026, 44(5): 148-153.
- [4] 程梦娟, 耿晓桐, 张宝, 等. 不同种质怀地黄生育期根际土壤挥发性有机物变化分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2022, 50(10): 87-96.
- [5] 郭晨宁, 李晶晶, 杨灏, 等. 涝渍胁迫对地黄生理生化特性及活性成分的影响 [J]. 江苏农业科学, 2025, 53(11): 118-126.
- [6] 刘仟禧, 刘梦云, 曹素芹, 等. 基于指纹图谱、化学计量学及熵权 TOPSIS-GRA 融合模型法评价不同产地大青叶的质量 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 2148-2157.
- [7] 朱静平, 刘梦云, 贾梦雪, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地小茴香饮片质量 [J]. 中草药, 2024, 55(24): 8564-8573.
- [8] 罗梦香, 张森, 周旺, 等. 地黄连作障碍研究进展 [J]. 河南农业大学学报, 2024, 58(1): 15-22.
- [9] 田梦平, 杜权, 谢小龙, 等. 地黄资源化学研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(9): 22-24.
- [10] Ren L, Xu Y P, Qin G J, *et al.* Effects of water extracts of *Rehmannia glutinosa* on antioxidant system of Nrf2 in paraquat-induced insulin resistance diabetic rat model [J]. *Exp Ther Med*, 2017; 14(6): 5847-5850.
- [11] Li X Y, Liu Z L, He Z X, *et al.* Acteoside protects podocyte against apoptosis through regulating AKT/GSK-3 β signaling pathway in db/db mice [J]. *BMC Endocr Disord*, 2023, 23(1): 230.
- [12] Zhu Y, Wang Y M, Jia Y C, *et al.* Catalpol promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 37.
- [13] Li S M, Cui Y J, Li M, *et al.* Acteoside derived from *Cistanche* improves glucocorticoid-induced osteoporosis by activating PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *J Investig Surg*, 2023, 36(1): 2154578.
- [14] Zhang H, Wu Z M, Yang Y P, *et al.* Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF- κ B signaling [J]. *J Zhejiang Univ SCIENCE B*, 2019, 20(10): 816-827.
- [15] Wang J, Ma C H, Wang S M. Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF- κ B pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 285(2): 128-135.
- [16] 王晶晶, 倪睿, 李紫薇, 等. 负载木犀草素纳米粒的壳聚糖/海藻酸钠水凝胶伤口敷料研究 [J]. 中国药理学杂志, 2025, 60(8): 856-865.
- [17] Si N, Kanazawa H, Okuyama K, *et al.* Involvement of catechols in acteoside in the activation of promatrix metalloproteinase-2 and membrane type-1-matrix metalloproteinase expression via a phosphatidylinositol-3-kinase pathway in human dermal fibroblasts [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(10): 1530-1536.

[责任编辑 时圣明]