

HPLC 双波长切换法同时测定不同产地玄参中哈巴苷与哈巴俄苷的含量

王雨璇¹, 孙庆妹¹, 王琼晓¹, 沈晓霞^{1,2}, 邱宝胜¹, 秦路平^{1,2*}, 朱波^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江杭州310053; 2. 浙江中医药大学松阳研究院, 浙江丽水323400)

摘要: 目的 建立HPLC双波长切换法同时测定玄参中哈巴苷、哈巴俄苷的含量, 比较不同产地玄参间的差异, 对玄参质量进行评价。方法 玄参50%甲醇提取物的分析采用Symmetry C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.03%磷酸, 梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;柱温35℃;检测波长210、280 nm。采用SPSS 27.0软件进行方差、聚类和相关性分析。结果 哈巴苷、哈巴俄苷在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9996$), 平均加样回收率101.20%、97.97%, RSD 1.63%、0.99%。产自四川成都市彭州市的玄参哈巴苷含量、哈巴苷和哈巴俄苷总量最高, 产自河南宋河镇张庄的玄参哈巴俄苷含量最高。聚类分析将19个产地的玄参样品分为4类。哈巴苷含量与经纬度呈负相关, 与海拔呈正相关。哈巴俄苷含量与经纬度呈正相关, 与海拔呈负相关。结论 该方法简便、准确, 可用于玄参的质量控制。不同产地玄参的哈巴苷、哈巴俄苷及其总量存在差异。

关键词: 玄参; 含量测定; 聚类分析; 相关性; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-2063-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.055

玄参, 别名元参、黑参、浙玄参, 为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根。主产于浙江、湖南、湖北、陕西、四川等省, 是著名道地药材“浙八味”之一, 味甘、苦、咸, 性微寒, 归经为肺、胃、肾经, 具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结的功效, 可用于治疗热入营血、温毒发斑、热病伤阴、舌绛烦渴、津伤便秘、骨蒸劳嗽、目赤、咽痛、白喉、瘰疬、痈肿疮毒等症^[1-2]。玄参含有糖类、有机酸类、苯丙素苷类、环烯醚萜苷类等成分^[3-4], 具有舒张血管、抗心肌纤维化、抗氧化、保肝等作用^[2]。

目前, 关于玄参药材的研究多集中在制备工艺、化学成分^[5]和药理作用^[6-7]上, 关于不同产地玄参有效成分含量测定的报道较少。哈巴苷和哈巴俄苷含量测定波长常用的有210^[8-9]、278^[10-11]、280 nm^[12-13]。哈巴苷、哈巴俄苷在2020年版《中国药典》中被收录为玄参的质控成分。现代研究表明, 哈巴苷具有抗氧化及保护细胞免受损伤的作用^[14], 还可以通过降低神经细胞凋亡, 对急性脑缺血有保护作用^[15]; 哈巴俄苷对炎症性关节炎引发的局部症状和全身性骨侵蚀有积极作用^[16]。目前, 市售玄参大多为栽培品, 种植过程管理不规范、产地采收加工缺乏统一标准等问题使得不同批玄参有较大的质量差异且安全水平低, 无法满足“优质、稳定、可控”的要求^[17]。同时, 玄参栽培

区域南北跨度大, 不同产地经纬度、海拔、土壤等立地条件不同, 也导致所产玄参药材质量存在较大差异, 影响玄参临床用药。因此, 本实验采用双波长切换HPLC法测定19个产地的玄参中哈巴苷、哈巴俄苷的含量, 考察产地哈巴苷、哈巴俄苷含量及其总量与生境因子的相关性, 并进行聚类分析, 以期为玄参药材的质量评价提供更全面的依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters e2695型高效液相色谱仪、Symmetry C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters 2998 PDA Detector检测器(美国Waters公司); KQ-300DV型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 超纯水仪(德国默克公司); DHG-9080A电热鼓风干燥箱(上海哈伟实业有限公司); CPA225D型电子分析天平(德国赛多利斯公司); SUS304粉碎机(杭州泥宿科技有限公司)。

1.2 试剂 哈巴苷(批号B20481)、哈巴俄苷(批号B20480)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。甲醇、乙腈(色谱纯, 美国天地公司); 磷酸(色谱纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材 19批玄参由浙江中医药大学张巧艳教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 详细信息见表1。

收稿日期: 2022-11-21

基金项目: 浙江省重点研发项目(2021C04029)

作者简介: 王雨璇(2002—), 女, 研究方向为中药材质量评价。E-mail: 202012210403001@zcmu.edu.cn

*通信作者: 秦路平(1966—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源及品质评价。E-mail: lqjin@zcmu.edu.cn

朱波(1986—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为植物内生菌。E-mail: zhubo@zcmu.edu.cn

表1 样品信息

批号	产地	经度/(°)	纬度/(°)	海拔/m
S1	安徽高大庄	115.77	33.97	40
S2	安徽宋庄	115.60	33.96	42
S3	安徽耿楼村	116.06	33.79	35
S4	安徽王店子	115.79	33.96	46
S5	重庆南川区	107.11	29.16	592
S6	湖北绿葱坡镇香家垭村	110.27	30.85	1437
S7	湖北水布垭镇八斗坪村	110.32	30.50	1409
S8	湖北野三关镇庙坪村	110.23	30.66	1268
S9	陕西旬阳市甘溪镇	109.27	32.88	254
S10	陕西旬阳市铜钱关镇	109.56	32.65	760
S11	山东淄博市齐鲁国际塑化城	118.28	36.83	58
S12	四川成都市彭州市	103.97	31.00	590
S13	河南马铺镇小朱庄	115.34	34.00	45
S14	河南宋河镇张庄	115.62	34.05	48
S15	湖南龙山县大安乡	109.68	29.54	1074
S16	河南南阳市方城县	113.02	33.26	153
S17	四川雅安市	102.81	30.37	1200
S18	浙江大盘镇潭下村	120.62	28.99	480
S19	浙江省种质资源圃	120.46	29.06	460

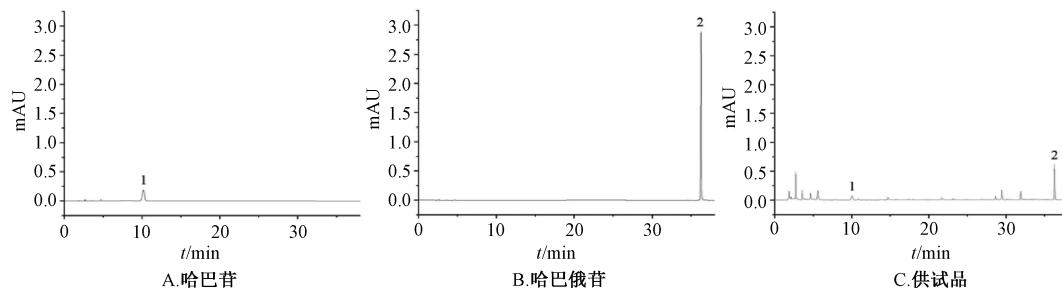


图1 各成分HPLC色谱图

2.3 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下哈巴苷、哈巴俄昔对照品溶液适量，分别加入纯甲醇稀释0、2、4、8、16、32倍和0、2、4、8、16、32、64、128、256、512倍，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Symmetry C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.03%磷酸(B),梯度洗脱(0~8 min, 5% A; 8~20 min, 5%~16% A; 20~28 min, 16%~24% A; 28~38 min, 24%~44% A; 38~39 min, 44%~5% A; 39~44 min, 5% A);体积流量1.0 mL/min;柱温35 °C;检测波长210 nm(0~19 min)、280 nm(19~44 min);进样量10 μL。各成分HPLC色谱图见图1,可知各成分分离度良好。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密量取哈巴苷、哈巴俄昔对照品适量,加入50%甲醇,制成质量浓度分别为1.56、0.9 mg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 称取玄参粉末(过3号筛)0.5 g,精密称定,精密加入50%甲醇10 mL,摇匀,称定质量,浸泡1 h,超声处理(300 W, 40 kHz)45 min,放凉,再次称定质量,50%甲醇补足减失质量,摇匀,取上清液,12 000 r/min离心5 min,0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y)进行回归,并S/N=10时的质量浓度为定量限,S/N=3时的质量浓度为检测限,结果见表2,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	定量限/(mg·mL ⁻¹)	检测限/(mg·mL ⁻¹)
哈巴苷	$Y = 3205637.16X - 22906.46$	0.9999	0.0488~1.5600	0.04660	0.01398
哈巴俄昔	$Y = 23747022.29X + 38772.56$	0.9996	0.0018~0.9000	0.00147	0.00044

2.4 精密度试验 分别吸取“2.2.1”项下哈巴苷、哈巴俄昔对照品溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定6次,测得哈巴苷、哈巴俄昔峰面积RSD分别为0.53%、0.22%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取玄参(S18)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,于0、2、4、8、16、24 h在“2.1”项色谱条件下进样测定,测得哈巴苷、哈巴俄昔峰面积RSD分别为0.31%、0.65%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验 取玄参(S18)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,每份0.5 g,在“2.1”项色谱条件下进样测定,测得哈巴苷、哈巴俄昔峰面积RSD

分别为0.24%、0.64%,表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收试验 精密称取同一批各成分含量已知的玄参粉末(过3号筛)适量,精密加入哈巴苷、哈巴俄昔对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液6份,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算回收率,结果见表3。

2.8 含量测定 取19批玄参按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项色谱条件下进样测定,计算含量,结果见图2。19批玄参的哈巴苷和哈巴俄昔含量均大于检测限和定量限。哈巴苷、哈巴俄昔和两者总量具有统计学差异($P < 0.01$)。哈巴苷、哈巴俄昔含量以及两者总量分别为8.9707、3.7003、12.6456 mg/g。产自四川成都市彭州市的玄参(S12)哈巴苷含量最高、产自安徽高大庄的玄参

表3 各成分加样回收试验结果($n=6$)

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
哈巴昔	0.200 1	0.940 5	1.000 0	1.936 5	99.60	101.20	1.63
	0.200 2	0.941 0	1.000 0	1.978 3	103.73		
	0.200 3	0.941 5	1.000 0	1.965 2	102.37		
	0.200 1	0.940 5	1.000 0	1.938 9	99.84		
	0.200 2	0.941 0	1.000 0	1.942 1	100.11		
	0.200 1	0.940 5	1.000 0	1.956 2	101.57		
哈巴俄昔	0.200 1	1.360 3	2.000 0	3.298 3	96.90	97.97	0.99
	0.200 2	1.361 0	2.000 0	3.329 7	98.43		
	0.200 3	1.361 7	2.000 0	3.332 8	98.56		
	0.200 1	1.360 3	2.000 0	3.348 1	99.39		
	0.200 2	1.361 0	2.000 0	3.310 3	97.46		
	0.200 1	1.360 3	2.000 0	3.302 3	97.10		

(S1) 哈巴昔含量最低；产自河南宋河镇张庄的玄参
(S14) 哈巴俄昔含量最高，产自河南南阳市方城县的玄参
(S16) 哈巴俄昔含量最低；哈巴昔与哈巴俄昔总量在5.547 3~20.110 2 mg/g之间，均符合2020年版《中国药典》质量标准。

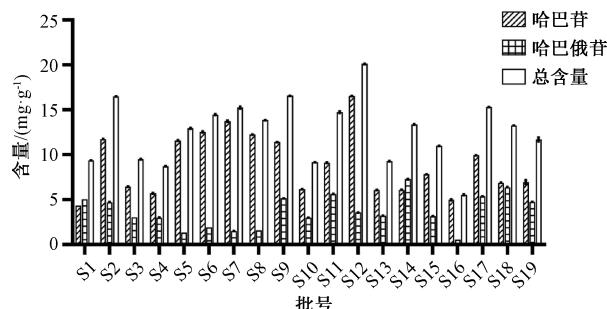


图2 不同产地玄参哈巴昔、哈巴俄昔及其总含量比较

2.9 聚类分析 通过SPSS 27.0软件进行处理，采取组间联接，平方欧式距离测度方法，将19批玄参中的哈巴昔、哈巴俄昔含量及其总量作为变量进行聚类分析，结果见图3。当平均欧式距离为15时，19批玄参可分为4类，安徽高大庄(S1)、安徽耿楼村(S3)、安徽王店子(S4)、陕西旬阳市铜钱关镇(S10)、河南马铺镇小朱庄(S13)、湖南龙山县大安乡(S15)、河南南阳市方城县(S16)、浙江种质资源圃(S19)样品聚为I类，该类群玄参哈巴昔含量最低；安徽宋庄(S2)、陕西旬阳市甘溪镇(S9)、山东淄博区齐鲁国际塑化城(S11)、河南宋河镇张庄(S14)、四川雅安市(S17)、浙江大盘镇潭下村(S18)样品聚为II类，该类群玄参哈巴俄昔含量最高；重庆南川区(S5)、湖北绿葱坡镇香家垭村(S6)、湖北水布垭镇八斗坪村(S7)、湖北野三关镇庙坪村样品(S8)聚为III类；四川成都市彭州市(S12)样品为IV类，该类群玄参哈巴昔、哈巴俄昔总量最高。

2.10 相关性分析 对不同产地玄参中的哈巴昔、哈巴俄昔及其总量与生境因子进行相关性分析，哈巴昔含量与经度呈负相关，与海拔呈显著正相关，其中哈巴昔与经度相关系数最大，为-0.598。哈巴俄昔含量与经纬度呈正相关，与海拔呈负相关。其中哈巴俄昔与海拔相关系数最大，

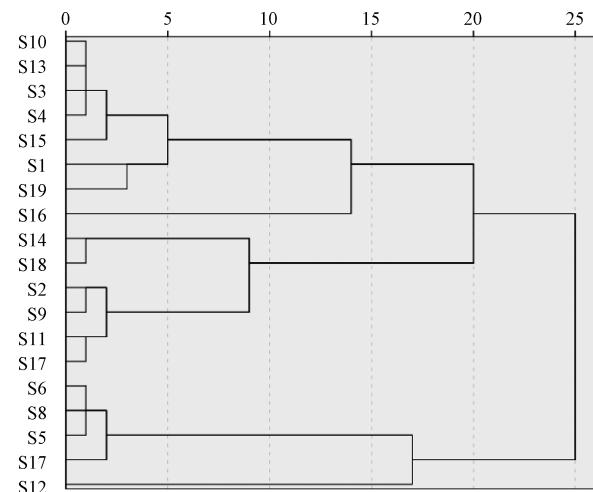


图3 19批玄参样品聚类分析图

为-0.399。哈巴昔、哈巴俄昔总量与经纬度呈负相关，与海拔呈正相关，其中哈巴昔、哈巴俄昔总量与经度相关系数最大，为-0.391。结果见表4。

表4 玄参哈巴昔、哈巴俄昔含量与生境因子间的相关性

项目	哈巴昔	哈巴俄昔	总含量	经度	纬度	海拔
哈巴昔	1.000	-0.230	0.858 **	-0.598 **	-0.343	0.542 *
哈巴俄昔	-0.230	1.000	0.303	0.369	0.229	-0.399
总含量	0.858 **	0.303	1.000	-0.391	-0.215	0.320
经度	-0.598 **	0.369	-0.391	1.000	0.337	-0.583 **
纬度	-0.343	0.229	-0.215	0.337	1.000	-0.683 **
海拔	0.542 *	-0.399	0.320	-0.583 **	-0.683 **	1.000

注：^{*}P<0.05与^{**}P<0.01分别表示存在显著与极显著差异。

3 讨论

本实验采用210、280 nm单波长分别进行含量测定考察时，发现存在基线严重漂移或者出峰较少，玄参中某些化学成分信息特征无法显示等现象。通过切换波长的方法，可除去供试品中目标峰前后不必要的杂峰，实现目标峰较好分离且峰面积稳定。因此，依据哈巴昔与哈巴俄昔的紫外吸收光谱及保留时间，用双波长切换法同时测定哈巴昔、哈巴俄昔的含量，即检测波长为210 nm(0~19 min)、280 nm(19~44 min)。在此条件下，各色谱峰分离效果最佳，峰型较好且基线稳。同时，参考2020版《中国药典》选用

50%甲醇作为提取溶剂，通过考察不同玄参称样量与50%甲醇溶液的料液比（1:20、1:40、1:60、1:80、1:100）对色谱峰的影响，发现料液比为1:20时提取效果最好，故采用料液比为1:20优化提取方法。玄参中的哈巴苷、哈巴俄昔及其总量受烘干温度的影响较大，且玄参干燥的理想温度为60℃^[18]，故采用60℃对玄参鲜品进行烘干。由于超声波提取有效果优、速度快且超声时间较短、温度低等特点，可以使固体物质快速溶解，避免部分药材高温时化学物质容易分解、有效成分损失的问题^[19]，故采用超声提取法。本实验建立的HPLC双波长切换法，操作简便，色谱峰分离效果良好，可为玄参的质量控制提供参考。

分析结果表明，19批玄参中的哈巴苷、哈巴俄昔满足检测限和定量限的要求，哈巴苷、哈巴俄昔含量及两者总含量存在统计学差异（ $P<0.01$ ）。19批玄参可分为4类，其中类群Ⅳ为四川彭州市产玄参（S12），该产地玄参哈巴苷与哈巴俄昔总含量最高。药用植物次生代谢产物的积累受生长环境的影响，如经纬度、海拔等^[20]。结果显示，在本实验经纬度和海拔范围内，哈巴苷含量与经纬度呈负相关，与海拔呈正相关；哈巴俄昔含量与经纬度呈正相关，与海拔呈负相关；哈巴苷与哈巴俄昔总含量与经纬度呈负相关，而与海拔呈正相关。湖北野三关镇庙坪村、湖北水布垭镇八斗坪村、湖北绿葱坡镇香家垭村的海拔分别是1268、1409、1437 m，远高于安徽耿楼村、安徽高大庄、安徽宋庄和安徽王店子，因此，湖北野三关镇庙坪村、湖北水布垭镇八斗坪村、湖北绿葱坡镇香家垭村产哈巴苷的含量高于安徽耿楼村、安徽高大庄、安徽宋庄、安徽王店子产；浙江省种质资源圃、浙江大盘镇潭下村的经度高于四川雅安市、成都市彭州市，因此前者哈巴苷含量低于后者，均与结果一致。

2020年版《中国药典》中规定玄参按干燥品计算，所含哈巴苷和哈巴俄昔的总量不能低于0.45%^[1]，从测定的19批样品来看，其哈巴苷和哈巴俄昔的总量均符合规定，但不同产地玄参含量存在显著差异，玄参中有效成分含量积累受经纬度、海拔等因素影响。从本实验结果看，为了促进玄参哈巴苷与哈巴俄昔总含量积累，应该选择在低经度、高海拔区域栽培玄参。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：122-123.
- [2] 李翎熙，陈迪路，周小江. 玄参化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物分析预测 [J]. 中成药，2020，42(9)：2417-2426.
- [3] 刘鹏，祝琳琳，靖淑瑾，等. 中药玄参中的2个新生物碱[J]. 药学学报，2022，57(3)：750-756.
- [4] 马清娟. 泽泻和玄参的化学成分及生物活性研究 [D]. 沈阳：东北大学，2018.
- [5] 刘年珍，赵碧清，钱群刚，等. 玄参化学成分的研究 [J]. 中成药，2019，41(3)：576-579.
- [6] 周梦楠，刘鹏，靖淑瑾，等. 玄参的化学成分及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中国中药杂志，2022，47(1)：111-121.
- [7] 霍玉峰，詹志来，王怀立，等. 中药玄参中化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55(14)：1207-1214.
- [8] 卞晓霞，罗跃娥，闫利华. 一测多评法同步测定玄参药材中两种环烯醚萜类成分的含量 [J]. 天津中医药大学学报，2014，33(2)：98-100.
- [9] 孙福仁，李军山，高晗，等. 玄参饮片含量测定及指纹图谱研究 [J]. 海峡药学，2018，30(5)：20-23.
- [10] 毛群芳，钟湘云，褚思恩，等. HPLC法测定清热解毒口服液中哈巴俄昔的含量 [J]. 广州化工，2020，48(18)：82-83.
- [11] 王长琴. 中药玄参中哈巴俄昔和肉桂酸的高效液相色谱法测定 [J]. 北方药学，2016，13(12)：3-4.
- [12] 丁家昱，车珂，申丽莎，等. 高效液相色谱法测定养阴合剂中哈巴俄昔含量 [J]. 中国药业，2020，29(15)：82-84.
- [13] 曾友保，王丽丽，莫爱玲. 天王补心丸中哈巴俄昔与肉桂酸的含量测定 [J]. 中国药师，2020，23(12)：2483-2485.
- [14] 吴源，高鹏，李海涛. 哈巴苷通过抑制miR-1246表达对LPS诱导的人牙周膜细胞损伤的影响 [J]. 中国免疫学杂志，2021，37(17)：2099-2103.
- [15] 周炳文，楼烨亮，钟晓明，等. 哈巴苷对急性脑缺血小鼠神经细胞及caspase非依赖性凋亡通路的影响 [J]. 中国药理学通报，2017，33(12)：1754-1761.
- [16] Kim J Y, Cheon Y H, Ahn S J, et al. Harpagoside attenuates local bone Erosion and systemic osteoporosis in collagen-induced arthritis in mice [J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1)：214.
- [17] 闫丹，江敏瑜，王云红，等. 一测多评法在玄参药材质量控制中的应用 [J]. 中草药，2018，49(20)：4892-4898.
- [18] 罗敏，谭秋生，罗舜，等. 干燥温度和“发汗”时间对玄参指标成分的影响 [J]. 时珍国医国药，2021，32(12)：2923-2925.
- [19] 徐雨生，袁定阳，刘玲，等. 茯苓HPLC指纹图谱的建立及三萜酸含量测定 [J]. 湖北农业科学，2022，61(15)：199-203.
- [20] 丁逸雪，徐继校，吴威，等. HPLC法同时测定白术中4种倍半萜 [J]. 中成药，2020，42(4)：927-931.