

不同产地烈香杜鹃的质量评价

曹 盼¹, 张樱山^{2*}, 魏学明², 王秉鹏², 潘慧清¹, 褚延斌²

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中药现代制药工程研究院, 甘肃 兰州 730010)

摘要: **目的** 对不同产地烈香杜鹃进行质量评价。**方法** HPLC 法测定金丝桃苷含量, 采用中药指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 对 12 批样品进行相似度评价及共有峰确认, SPSS22.0 软件进行聚类分析和主成分分析, DPS9.01 软件进行灰色关联度分析。**结果** 金丝桃苷在 24.60~81.99 μg/mL 范围内线性关系良好 ($r=1.000\ 0$), 平均加样回收率 91.51%~96.69%, RSD 1.47%。12 批样品指纹图谱中有 15 个共有峰, 相似度均大于 0.85。12 批样品聚为 4 类; 4 个主成分可反映原变量 86.976% 的信息; S9 得分最高, 其次为 S12、S3、S4、S6, S1、S10 最低; S3、S4、S6 关联度最高, S2、S7 次之, S10、S12 最低。**结论** 该方法简便可靠, 专属性强, 可为评价烈香杜鹃质量提供科学依据。

关键词: 烈香杜鹃; 产地; HPLC 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 灰色关联度分析

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)01-0306-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.059

烈香杜鹃为杜鹃花科植物烈香杜鹃 *Rhododendron anthopogonoides* Maxim. 的干燥花和叶^[1], 又名小叶枇杷、白香柴、黄花杜鹃^[2], 其味甘、涩, 性平, 具有清热消肿和补肾功效, 藏医常用于治疗培根病、肺病、脾胃虚寒、消化不良、水土不服等症状^[3], 为藏药“达里”的来源植物之一^[4], 主要含有黄酮类、挥发油、香豆素、萜类等化学成分^[5-9], 黄酮类尤其丰富, 具有抗炎、镇咳、平喘、祛痰、抑菌、降压及心血管系统方面的药理作用^[10-11], 主要分布于西藏、四川、甘肃等地^[12]。中药质量控制须考虑“药材源头-制剂工艺-制药装备-中药制剂”全过程, 形成全程可追溯、可测量且质量可反馈的“整体、辩证、动态、全程”多要素的质量观^[13], 制定合理的药材质量标准是保证药材质量的基础, 是患者用药安全、有效的关键基础^[14], 也是药材有效检验的依据^[15]。

HPLC 指纹图谱具专属性强、稳定性和重复性好等特点^[16], 能全面呈现药材专属图谱。本实验通过测定金丝桃苷含量并建立 HPLC 指纹图谱以期更全面的控制烈香杜鹃药材质量, 并结合 SPSS 聚类分析、主成分分析^[17]和灰色关联度分析及选择具有代表性的指标成分评价不同产地烈香杜鹃质量, 为控制烈香杜鹃药材质量提供进一步参考。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695 型高效液相色谱仪、Waters 2424 型蒸发光散射检测器 (美国 Waters 公司); XS205-DU 型电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); DZF-6050 型真空干燥箱 (巩义市予华仪器有限责任公司); HWS26 型电热恒温水浴锅 (上海恒科科技发展有限公司)。

1.2 试剂与药物 金丝桃苷对照品 (批号 111521-201909, 纯度 94.9%) 购自中国食品药品检定研究院。HPLC 用试剂为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材 12 批药材分别采自拉萨 (S1)、夏河藏医院 (S2)、青海 (S3)、青海药市 (S4)、日多 (S5)、榆中 (S6)、小昭寺 (S7)、黄河药市 1 (S8)、黄河药市 2 (S9)、昌都 (S10)、甘南 1 (S11)、甘南 2 (S12), 经甘肃中医药大学晋玲教授鉴定为烈香杜鹃 *Rhododendron anthopogonoides* Maxim. 的干燥花和叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 参考文献 [18-20] 报道。Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 10%~31% A; 10~39 min, 31% A; 39~56 min, 31%~42% A; 56~70 min, 42%~49% A; 70~71 min, 49%~10% A; 71~86 min, 10% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷对照品 4.32 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇制成质量浓度为 163.99 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备 取药材粉末约 1.0 g, 精密称定, 置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 30 min, 冷却, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液, 依次稀释至 24.60、32.80、41.00、49.20、57.40、81.99 μg/mL,

收稿日期: 2020-02-16

基金项目: 甘肃省科技重大专项 (17ZD2FA014)

作者简介: 曹 盼 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药制药工艺研究。E-mail: 1922669815@qq.com

* 通信作者: 张樱山 (1974—), 女, 高级工程师, 硕士生导师, 从事中藏药开发与质量研究。Tel: (0931) 8558448, E-mail: 124053360@qq.com

在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，得方程为 $Y=27\,273.04X+30\,964.16$ ($r=1.000\,0$)，在 24.60~81.99 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密称取药材 1.0 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得金丝桃苷峰面积 RSD 为 0.19%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密称取药材 1.0 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、18、24 h 在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定，测得金丝桃苷峰面积 RSD 为 0.35%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取药材 1.0 g，平行 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”色谱条件下各进样 10 μL 测定，测得金丝桃苷峰面积 RSD 为 1.04%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取金丝桃苷含量已知的药材 12 份，每份约 0.2 g，精密称定，按 50%、100%、150% 水平加入对照品溶液，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得金丝桃苷平均加样回收率为 91.51%~96.69%，RSD 为 1.47%。

2.9 样品含量测定 取 12 批样品适量，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，平行 3 份，计算金丝桃苷含量，结果见表 1。由此可知，甘南 1 (S11) 中金丝桃苷含量最高，其次是青海 (S3)、青海药市 (S4)、榆中 (S6)，昌都 (S10) 最低，可能是产地不同，海拔、土壤、气候等生态条件差异，采集时间不一所致。

表 1 金丝桃苷含量测定结果

编号	产地	金丝桃苷/%
S1	拉萨	0.41
S2	夏河藏医院	0.41
S3	青海	0.69
S4	青海药市	0.72
S5	日多	0.32
S6	榆中	0.71
S7	小昭寺	0.55
S8	黄河药市 1	0.63
S9	黄河药市 2	0.31
S10	昌都	0.25
S11	甘南 1	1.05
S12	甘南 2	0.47

2.10 特征图谱方法学考察

2.10.1 精密度试验 精密称取药材 (S1) 1.0 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，以 10 号峰 (金丝桃苷) 为参照，测得 15 个共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.53%，相对峰面积 RSD 均小于 4.28%，表明该方法精密度良好。

2.10.2 稳定性试验 精密称取药材 (S1) 1.0 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，室温下于 0、2、4、8、

12、18、24 h 在“2.1”色谱条件下进样测定，以 10 号峰 (金丝桃苷) 为参照，测得 15 个共有峰相对保留时间 RSD 均小于 2.16%，相对峰面积 RSD 均小于 5.13%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10.3 重复性试验 精密称取药材 (S1) 1.0 g，共 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”色谱条件下进样测定，以 10 号峰 (金丝桃苷) 为参照，测得 15 个共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.19%，相对峰面积 RSD 均小于 5.06%，表明该方法重复性良好。

2.11 HPLC 指纹图谱建立

2.11.1 图谱生成 取 12 批样品，每批 1.0 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版) 生成图谱，见图 1，相似度分别为 0.925、0.957、0.976、0.976、0.934、0.957、0.891、0.981、0.956、0.867、0.951、0.966，表明不同产地之间药材所含成分差异较小，质量稳定性良好，而且对照指纹图谱具有较好的一致性；小昭寺 (S7)、昌都 (S10) 相似度相对较低，可能由于产地、自然环境、采集时间存在差异，导致其所含成分含量有所不同。

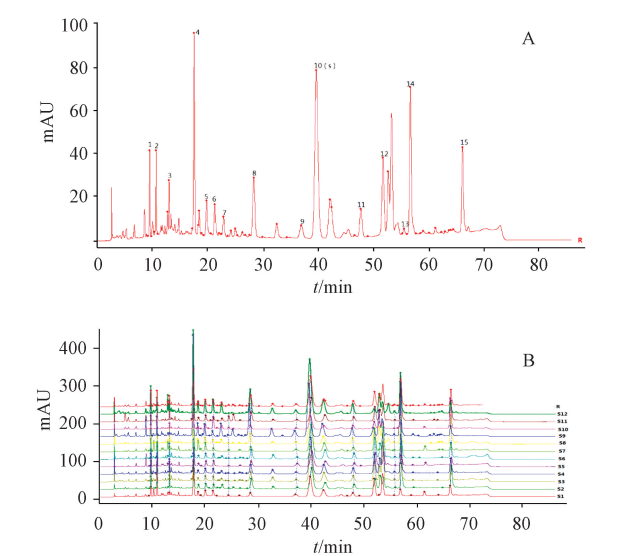


图 1 药材对照指纹图谱 (A)、12 批样品 HPLC 指纹图谱 (B)

通过与对照品比较，指认出 10 号峰为金丝桃苷，由于其峰面积较大，分离度较好，而且所有样品共有，故以其为参照，测得其他色谱峰相对保留时间为 0.09%~1.88%，相对峰面积为 16.31%~178.17%，表明不同产地药材共有成分虽然一致，但其所含成分含量存在差异，可能与产地、生长环境、采集时间等因素有关。

2.11.2 聚类分析 以共有峰峰面积为变量，采用 SPSS 22.0 软件将其标准化，测度为欧氏距离的平方，进行聚类分析，结果见图 2。由此可知，类间距为 10 时，12 批样品可聚为 4 类，S1~S8 为一类，S9、S12 为一类，S10 为一类，S11 为一类，结合金丝桃苷含量可知，S11 质量最优，

S1~S8 良好, S9、S12 较差, S10 最差。

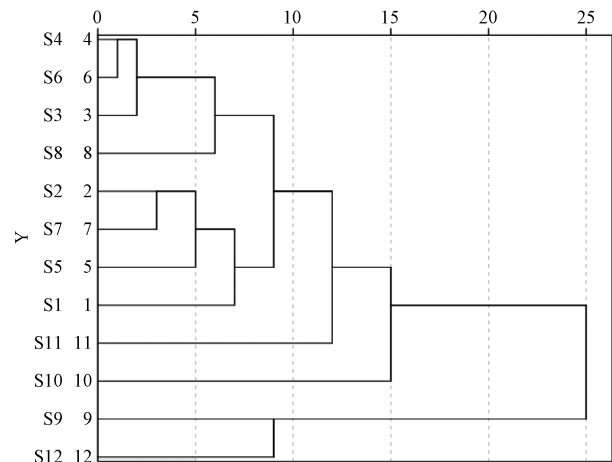


图 2 共有峰面积聚类分析树状图

2.11.3 主成分分析 以共有峰峰面积为变量, 采用 SPSS 22.0 软件进行主成分分析, 结果见表 2。由此可知, 前 4 种主成分累积贡献率为 86.976%, 即能反映药材 86.976% 的信息, 其中第一主成分特征值为 6.816, 贡献率为 45.441%; 第二主成分特征值为 2.826, 贡献率为 18.838%。

表 2 共有峰特征值

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
A1	6.816	45.441	45.441
A2	2.826	18.838	64.279
A3	2.241	14.943	79.222
A4	1.163	7.754	86.976
A5	0.738	4.992	91.898
A6	0.526	3.503	95.401
A7	2.417	2.783	98.184
A8	0.221	1.472	99.656
A9	0.040	0.269	99.925
A10	0.010	0.066	99.991
A11	0.001	0.009	100.000

以主成分分析对应的贡献率为权重, 对其得分进行线性加权, 建立综合评价函数为 $Y = 0.522PC_1 + 0.175PC_2 +$

$0.171PC_3 + 0.089PC_4$, 计算综合评分并排序, 结果见表 3。由此可知, S9 综合评分最高, 即质量最优; S1、S10 最低, 即质量最差。

表 3 主成分综合评分和排序

编号	主成分				综合评分	排序
	PC ₁	PC ₂	PC ₃	PC ₄		
S1	-2.058	0.773	-2.201	0.397	-1.280	11
S2	-1.352	1.230	-0.926	0.119	-0.638	9
S3	0.181	1.177	1.983	-1.037	0.547	3
S4	0.183	0.564	1.211	-0.879	0.323	4
S5	-1.741	0.431	-1.512	0.112	-1.082	10
S6	0.086	0.906	1.209	-1.265	0.297	5
S7	-0.351	2.683	-0.827	0.475	0.187	6
S8	-0.366	-1.455	0.860	-0.847	-0.374	7
S9	5.257	0.233	0.204	1.542	2.957	1
S10	-3.286	-3.388	-0.563	-0.177	-2.420	12
S11	-1.527	-1.131	2.276	2.302	-0.401	8
S12	4.974	-2.024	-1.714	-0.741	1.883	2

将共有峰面积数据导入 Simca-p14.1 软件, 得到主成分分析二维分布散点图, 见图 3。由此可知, 不同产地药材聚集在同一片区域中, 与聚类分析结果基本一致。

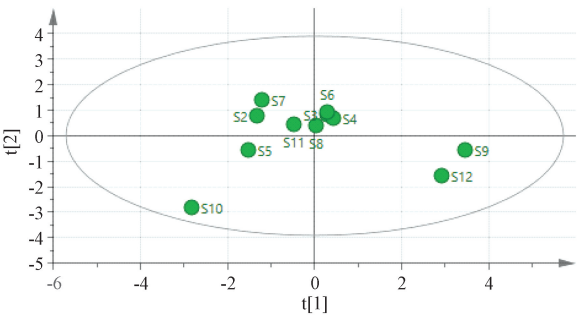


图 3 主成分分析二维分布散点图

2.11.4 灰色关联度分析 将共有峰峰面积导入 DPS 9.01 版软件, 进行整体灰色关联度分析, 数据序列转换方式为均值化, 分辨系数为 0.1, 结果见表 4。由此可知, S3 (青海)、S4 (青海药市)、S6 (榆中) 关联度最高, S10、S12 较低, 表明不同产地药材质量因其所含成分含量不同而有所差异。

表 4 灰色关联度分析关联系数

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	1.000 0	0.646 9	0.512 8	0.530 8	0.628 2	0.538 5	0.615 2	0.499 3	0.460 2	0.498 1	0.496 3	0.451 1
S2	0.639 6	1.000 0	0.582 5	0.564 1	0.593 3	0.570 8	0.686 9	0.512 3	0.506 6	0.485 9	0.468 5	0.503 5
S3	0.508 5	0.585 3	1.000 0	0.888 7	0.531 6	0.896 6	0.553 1	0.638 8	0.571 4	0.501 8	0.658 1	0.534 6
S4	0.526 3	0.566 4	0.888 5	1.000 0	0.536 1	0.895 5	0.548 2	0.652 8	0.566 4	0.496 7	0.679 0	0.560 1
S5	0.634 7	0.608 8	0.544 1	0.548 8	1.000 0	0.571 5	0.565 3	0.525 2	0.451 7	0.467 8	0.555 5	0.465 8
S6	0.530 9	0.570 3	0.895 0	0.894 1	0.556 1	1.000 0	0.564 4	0.641 4	0.560 2	0.485 3	0.661 0	0.539 9
S7	0.636 8	0.714 5	0.580 2	0.575 5	0.583 2	0.594 2	1.000 0	0.559 6	0.611 1	0.478 5	0.519 1	0.538 0
S8	0.464 1	0.482 0	0.607 3	0.622 9	0.478 1	0.614 3	0.502 6	1.000 0	0.580 8	0.452 4	0.601 7	0.576 5
S9	0.483 5	0.535 8	0.598 4	0.594 6	0.471 3	0.592 1	0.611 5	0.637 5	1.000 0	0.456 5	0.553 0	0.671 7
S10	0.524 5	0.516 7	0.527 3	0.523 4	0.486 6	0.515 2	0.479 3	0.514 3	0.456 7	1.000 0	0.553 1	0.446 0
S11	0.469 3	0.448 1	0.637 9	0.660 4	0.523 0	0.644 8	0.472 0	0.615 0	0.503 4	0.506 4	1.000 0	0.449 1
S12	0.474 8	0.533 4	0.563 2	0.589 0	0.484 5	0.571 6	0.538 8	0.628 8	0.671 9	0.446 0	0.499 7	1.000 0

3 讨论

3.1 HPLC 含量测定 金丝桃苷是烈香杜鹃中黄酮类化合物，含量相对较高，故选择其作为指标成分。分别考察了不同提取溶剂（甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇、50% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇）、提取方法（超声、振荡、回流）、提取时间（15、30、60、90 min）、溶剂量（25、50、75、100 mL）对金丝桃苷含量的影响，发现，以甲醇为溶剂、溶剂量 50 mL、回流提取 30 min 时其含量最高。再进行耐用性试验，包括体积流量（0.9、1.0、1.1 mL/min）、柱温（25 ℃、30 ℃、35 ℃）、流动相（①0 ~ 10 min，9% ~ 30% A；10 ~ 41 min，30% A；41 ~ 58 min，30% ~ 42% A；58 ~ 70 min，42% ~ 49% A；70 ~ 71 min，49% ~ 9% A；71 ~ 86 min，9% A；②0 ~ 10 min，10% ~ 31% A；10 ~ 39 min，31% A；39 ~ 56 min，31% ~ 42% A；56 ~ 70 min，42% ~ 49% A；70 ~ 71 min，49% ~ 10% A；71 ~ 86 min，10% A；③0 ~ 10 min，11% ~ 32% A；10 ~ 39 min，32% A；39 ~ 56 min，32% ~ 42% A；56 ~ 70 min，42% ~ 49% A；70 ~ 71 min，49% ~ 11% A；71 ~ 86 min，11% A）、色谱柱（PLUS1、PLUS2、PLUS3、shimndzu）、流动相 pH（pH2.5、3.0、3.5），结果含量均无明显差异，RSD% 均小于 3.0%，说明该方法耐用性良好，色谱条件稳定可靠，能够有效控制药材质量。但因只测一种成分不具有代表性，故以后可以同时测定多种成分含量，并建立指纹图谱，更能全面控制药材质量，便于临床应用。

3.2 指纹图谱及相关分析 通过 HPLC 指纹图谱对 12 批样品进行质量分析，发现对照指纹图谱共有峰保留时间与各产地烈香杜鹃样品基本吻合，除小昭寺（S7）、昌都（S10）外，其余 10 批相似度均大于 0.92，小昭寺（S7）、昌都（S10）的药材可能因为产地不同、生长环境差异及采摘时间存在差异而导致相似度稍低；15 个共有峰峰面积存在较大差异，说明不同产地烈香杜鹃共有成分虽一致，但含量明显存在差异，这可能与生长环境等气候土壤等因素有关。由于时间及其他条件影响，目前采集的烈香杜鹃样品批次相对较少，后续将增加样品批次，并采用其他技术对各共有峰作进一步确认，建立更明确的指纹图谱模式。

运用 SPSS 22.0 软件对 12 批药材进行聚类分析，将其分为 4 类；通过主成分分析，降维提取了 4 个主成分，能够反映 86.976% 的信息。但相似度评价、聚类分析、主成分分析的结果不一致，其原因可能是烈香杜鹃成分复杂，产地环境不一，相似度评价时特征峰校正不全面，导致一些信息缺失，所以各产地相似度较高；主成分分析分析中只提取了特征值大于 1 的四个主成分，但特征值小于 1 的其他成分仍存在影响，所以结果有偏差。通过灰色关联度分析，从整体上考察了 12 个产地烈香杜鹃之间的相关性，发现 S3、S4、S6 关联度最高，S2、S7 次之，S10、S12 较低。

参考文献：

[1] 李明珠. 烈香杜鹃质量标准提高研究[D]. 兰州：兰州大学，2015.

[2] 顾地周，陆 爽，巴春影，等. 烈香杜鹃的离体培养和高效植株再生[J]. 植物生理学报，2012，48(4)：381-385.

[3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准——藏药（第一册）[S]. 北京：中国科技医药出版社，1995：78-79.

[4] 李雪峰，金慧子，陈 刚，等. 藏药达里的化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2008，20(6)：1125-1128.

[5] 戴胜军，陈若芸，于德泉. 烈香杜鹃中的黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志，2004，29(1)：48-51.

[6] 马雪梅. 烈香杜鹃、双翎草化学成分的研究[D]. 兰州：西北师范大学，2004.

[7] Zheng S Z, Ma X M, Que S, *et al.* Chemical constituents of *Rhododendron anthopogonoides* Maxim. [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2003, 15(5): 387-389.

[8] 董钰明，唐兴文，张树江，等. 烈香杜鹃叶挥发油化学成分的 GC/MS 研究[J]. 兰州医学院学报，2003，29(3)：15-16；32.

[9] 张 继，马君义，杨永利，等. 烈香杜鹃挥发性成分的分析研究[J]. 中草药，2003，34(4)：19-20.

[10] 张娟红，王 荣，贾正平，等. 藏药烈香杜鹃研究概况[J]. 中国中医药信息杂志，2012，19(8)：104-107.

[11] 彭 瑶，曾 嵘，吴尚洁，等. 一测多评法测定藏族药烈香杜鹃中 5 种黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志，2021，46(9)：2229-2236.

[12] 张 蕾，张 旭，巨福星，等. 三种藏药材的鉴定研究[J]. 中兽医医药杂志，2017，36(2)：55-56.

[13] 伍振峰，林瑞华，王学成，等. 基于中药制药工程质量观的质量控制模式研究[J/OL]. 中国中药杂志; 1-9 [2021-10-29]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20210915.601>.

[14] 刘先琼，陈科力. 关于控制中药饮片质量标准的思考[J]. 湖北中医药大学学报，2014，16(4)：43-44.

[15] 农金沙. 中成药质量标准的研究[J]. 现代医学与健康研究电子杂志，2018，2(4)：20；23.

[16] 徐 妍，杨华蕊，杨永寿，等. 中药指纹图谱研究现状及展望[J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18(76)：91-94.

[17] 许有诚，赵 庄，卢日刚，等. 主成分分析在中药质量分析及质量评价中的应用进展[J]. 大众科技，2021，23(8)：37-41.

[18] 罗兴平，杨玲霞，魏亚军. HPLC 法测定烈香杜鹃不同药用部位中的 4 种黄酮类成分[J]. 中成药，2015，37(9)：1977-1980.

[19] 王 欢，薛 敬，卢永昌，等. HPLC 同时测定烈香杜鹃中的 4 种有效成分[J]. 华西药学杂志，2011，26(3)：282-283.

[20] 刘志勤. 藏药十六味杜鹃花丸中烈香杜鹃的定性、定量分析方法研究[J]. 中成药，2010，32(11)：2019-2021.