DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.02.023

基于化学成分及抗氧化活性的正常地黄与线虫病感染地黄质量特征差异性分析

刘寒笑[1,2],张威[3],职素青[4],张宝[2],刘庆普[2],雷敬卫[2],张娟[2],谢彩侠[1,2]
(1.河南中医药大学豫药全产业链研发河南省协同创新中心,河南 郑州 450046;
2.河南中医药大学河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心,河南 郑州 450046;
3.郑州卫生健康职业学院,河南 郑州 450122;4.焦作市九如怀药非遗研修院,河南 焦作 454350)

摘要:目的 研究线虫病感染对地黄质量的影响,为地黄质量控制及线虫病感染地黄的资源合理利用提供依据。方法 利用高效液相色谱法(High performance liquid chromatography,HPLC)、高效液相色谱-蒸发光散射检测器(High performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection,HPLC-ELSD)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone,PMP)柱前衍生化法、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl,DPPH)抗氧化法结合SPSS 27、SIMCA 14.1等软件系统分析正常地黄与不同程度线虫病感染地黄中环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、游离单糖、寡糖、多糖含量及单糖组成和抗氧化活性的特征。结果 极重度感染地黄与正常地黄、中度感染地黄、重度感染地黄的化学质量特征存在明显差异,可被分为两类,地黄苷A、肉苁蓉苷A、益母草苷、羟基酪醇、蔗糖、葡萄糖、梓醇、地黄苷D、水苏糖、多糖为主要差异性成分;当样品质量浓度>0.8 mg·mL^{-1}时,极重度感染地黄的抗氧化活性明显低于其他3种地黄,梓醇、松果菊苷、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、果糖、水苏糖、多糖与DPPH自由基清除率呈现较强的正相关或负相关。结论 线虫病感染对地黄的外观性状及质量特征均产生了一定影响,其中环烯醚萜苷类与糖类为正常地黄与线虫病感染地黄的主要差异性物质。

关键词:地黄;线虫病;高效液相色谱法;柱前衍生化法;抗氧化
中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)02-0124-11

基金项目:国家自然科学基金项目(82073952,82104331)
作者简介:刘寒笑(1998-),女,河南鹿邑人,硕士在读,研究方向:中药质量控制。
通讯作者:张娟(1982-),女,河南周口人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药分析方法。E-mail:zj19820305@163.com。
谢彩侠(1977-),女,河南南阳人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药质量控制。E-mail:nanyang.xcx@163.com。

[20] 李颖,徐咏梅,葛楠,等. 益气健脾扶正祛邪方对结直肠癌术后患者胃肠功能恢复及免疫功能、预后的影响[J]. 四川中医,2023,41(12):131-134.
[21] 赵东进,李军徽. 结直肠癌术后肝郁脾虚证应用疏木培土方对肠道微生态及免疫功能的影响[J]. 实用中医药杂志,2023,39(1):123-125.
[22] 林恩珍,林毅,甘平,等. 补中益气汤对结直肠癌术后化疗脾胃气虚患者免疫功能的影响[J]. 中国医药指南,2023,21(25):127-130.
[23] 刘铸源,罗菊元,陆洋,等. 以肿瘤治疗为例探讨中医药传统理论在现代中药纳米制剂中的应用[J]. 中国中药杂志,2023,48(6):1455-1462.
[24] 王丽,郝海宁,薛蓉,等. 经皮穴位电刺激联合参苓白术散在胃肠肿瘤全麻术后患者中的应用效果[J]. 临床医学研究与实践,2023,8(3):115-117.
[25] 马永利,李镜辉,姚学清. 参苓白术散辅助化疗治疗结直肠癌疗效和安全性的Meta分析[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2022,43(5):532-546.
[26] 谢天阳,卢灿省. 参苓白术散合肾气丸加味方联合美沙拉嗪栓对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎的疗效观察[J]. 中医药临床杂志,2023,35(11):2212-2216.
[27] 李铭莹,林霖,王岩,等. 人参皂苷抗肿瘤机制及其纳米药物递送系统的研究进展[J]. 中草药,2024,55(2):688-696.
[28] 汪猛,邱文超,秦凯健. 白术、莪术药对抗肿瘤作用的网络药理学及临床意义分析[J]. 中医药导报,2022,28(8):45-54,75.
[29] 谭钤文,邹存超,侯春英,等. 茯苓液体发酵及活性产物抗肿瘤机制研究进展[J]. 食品与发酵工业,2024,50(14):385-392.
[30] 杨妮,曹鹏,陈景. 从中药材料学角度研究莲子心抗肿瘤药效物质基础[J]. 中华中医药杂志,2024,39(5):2430-2433.
[31] 杨必乾,何昱洁,何慧明,等. 甘草中三萜皂苷类成分抗肿瘤及联合抗肿瘤机制研究进展[J]. 中医药导报,2024,30(1):106-110,116.
[32] 马玮玮,尉家森,王锦,等. miR-150-5p靶向TP53对结直肠癌细胞侵袭和增殖的影响[J]. 现代生物医学进展,2023,23(5):824-829,854.
[33] 卢广英,邢训颜,王嘉昀,等. 经典名方参苓白术散的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志,2022,47(19):5171-5181.
[34] 章玲艳,吴会晨,汪飞,等. 参苓白术散加减对结直肠癌患者化疗后骨髓抑制和免疫功能的影响[J]. 陕西中医,2023,44(8):1086-1089.
[35] 付宜拥,闫海良,高龙潭. 参苓白术散辅助FOLFOX6化疗治疗中晚期结直肠癌临床观察[J]. 中医药临床杂志,2022,34(12):2359-2362.

Difference of Quality Characteristics Between Normal and Nematode Infected Dihuang (Rehmanniae Radix) Based on Chemical Composition and Antioxidant Activity

LIU Hanxiao[1,2], ZHANG Wei[3], ZHI Suqing[4], ZHANG Bao[2], LIU Qingpu[2], LEI Jingwei[2], ZHANG Juan[2], XIE Caixia[1,2]

(1. Henan University of Chinese Medicine/Henan Province Collaborative Innovation Center for The Whole Industry Chain Research and Development of Yu-Yao, Zhengzhou 450046, Henan, China;
2. Henan University of Chinese Medicine/Henan Provincial Engineering Technology Research Center for Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China;
3. Zhengzhou Health Vocational College, Zhengzhou 450122, Henan, China;
4. Jiaozuo Jiuru Huai-Yao Intangible Cultural Heritage Research Institute, Jiaozuo 454350, Henan, China)

Abstract: *Objective* To study the influence of nematode infection on the quality of Dihuang (Rehmanniae Radix), and to provide the basis for the quality control of Dihuang (Rehmanniae Radix) and the rational utilization of resources of Dihuang (Rehmanniae Radix) infected by nematode. *Methods* High Performance Liquid Chromatography (HPLC), High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detection (HPLC-ELSD), 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioxidant method combined with SPSS 27 and SIMCA 14.1 were used to systematically analyze the characteristics of iridoid glycosides, phenylethanol glycosides, free monosaccharides, oligosaccharides, polysaccharides, monosaccharide composition and antioxidant activity in normal Dihuang (Rehmanniae Radix) with different degrees of nematode infection. *Results* There were significant differences in the chemical quality characteristics of extremely severely infected Dihuang (Rehmanniae Radix), which could be divided into two categories. Rehmanniae A, Cistanche A, oliberoside, hydroxytyrosol, sucrose, glucose, catalcatalol, Rehmanniae D, stacitose and polysaccharide were the main differentiating components. When the sample concentration was more than 0.8 mg·mL^{-1}, the antioxidant activity of extremely severely infected Dihuang (Rehmanniae Radix) was significantly lower than that of the other three Dihuang (Rehmanniae Radix). Catalpol, echinoside, verbascoside, isocitroside, fructose, stachyose and polysaccharide showed a strong positive or negative correlation with DPPH free radical scavenging rate. *Conclusions* Nematode infection has a certain effect on the appearance and quality characteristics of Dihuang (Rehmanniae Radix), and iridoid glycosides and saccharides are the main difference substances between normal Dihuang (Rehmanniae Radix) and nematode infected Dihuang (Rehmanniae Radix).

Keywords: Dihuang (Rehmanniae Radix); nematode diseases; high performance liquid chromatography; pre-column derivatization method; antioxidation

地黄为玄参科地黄属(*Rehmannia glutinosa Libosch*)多年生草本植物地黄的新鲜或干燥块根,性寒,味甘、苦,归心、肝、肾经,具有清热凉血、养阴生津之功效[1]。现代药理学研究表明,地黄中含有的环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类及糖类等活性成分[2],具有抗病毒[3]、抗氧化[4]、抗肿瘤[1]、保肝利胆[5]、抗炎抗菌等多种药理活性[6]。地黄药用历史悠久,始载于《神农本草经》,被列为上品[7],与山药、牛膝、菊花并称为"四大怀药",为传统的道地药材,其道地产区在古怀庆府(今河南焦作一带)[8]。作为我国常用的大宗药材之一,地黄已在道地产区实现了大规模的人工种植,但在种植过程中会出现根结线虫病等病虫害。根结线虫病是一种常见的土传病害,地黄感染线虫病后其植株部分表现为生长不良、矮化、叶色变浅以至发黄,块根部分表现为根部畸形,表面形成不规则凸起,须根增多[9-10],这与连作地黄植株及块根部分所表现的性状相一致[11]。文献报道焦作市武陟县怀地黄线虫病发病率达70%,减产约80%[12],线虫病感染后的地黄块根变细,难以形成正常药材应用于临床,因此,地黄感染线虫病后块根不能正常膨大是造成地黄产量及质量下降的一个主要原因。线虫病感染地黄后不仅影响其生长,还可能还影响其代谢产物的合成,但目前对线虫病感染地黄的研究多集中于线虫病的种类鉴定及其防治,对地黄感染线虫病后植株生长发育与块根性状方面的研究较少,并且关于线虫感染对地黄中苷类、糖类等主要药效成分特征及药理活性影响的研究也未见报道。因此本研究以正常地黄与不同程度线虫病感染地黄为研究对象,通过分析正常地黄与不同程度线虫病感染地黄中环烯醚萜苷、苯乙醇苷、寡糖、多糖等化学成分及抗氧化活性的变化特征,并利用多元统计学分析综合评价其质量特征的差异,为地黄的质量控制及线虫病感染地黄的资源利用提供理论参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国沃特世科技公司),ME204E万分之一电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司),HQ-700DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),移液枪(赛默飞世尔科技有限公司),电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业世纪仪器有限公司),二两装高速中药粉碎机(浙江瑞安市永历制药机械有限公司),MS105DU十万分之一天平(奥豪斯仪器有限公司),电子恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司),ELSD 2000ES蒸发光散射检测器[美国奥泰科技(中国)有限公司],Evolution 260 Bio紫外-可见分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司),石英比色皿(宜兴市银星分析

实验器件厂)。

1.2 试剂

梓醇、羟基酪醇、2′-乙酰毛蕊花糖苷、红景天苷、松果菊苷、异类叶升麻苷(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-20042110、MUST-21052802、MUST-17031504、MUST-21080414、MUST-17030701、MUST-17041816,纯度均≥98%);地黄苷 D、地黄苷 A、毛蕊花糖苷(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为 wkq21043009、wkq19010908、150513,纯度均≥98%);益母草苷(乐美天医药德思特生物,批号为 DSTDY016301,纯度≥98%);肉苁蓉苷 A(成都德思特生物技术有限公司,DST180105-051,纯度≥98%);D(+)-葡萄糖、D-果糖、D-鼠李糖,蔗糖、蜜二糖、水苏糖、D-棉籽糖、毛蕊花糖、甘露三糖(HPLC≥98%,上海源叶生物科技有限公司);D-甘露糖、D-半乳糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、D-阿拉伯糖(HPLC≥97%,上海易恩化学技术有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 样品

本实验所用样品采自河南道地产区相同种植地的正常地黄与不同程度线虫病感染地黄的块根,根据地黄感染线虫病的严重程度将地黄分为正常、中度感染、重度感染和极重度感染 4 种级别,每种级别分别采 4 批样品,见表 1,样品经河南中医药大学董诚明教授鉴定为玄参科植物地黄 *R. glutinosa* Libosch. 的新鲜块根。4 种地黄的块根及横切面特征见插页Ⅻ图 1,显示与正常地黄相比,中度线虫病感染地黄的表面有少许不规则瘤状凸起,横切面变化不明显;重度感染地黄的不规则瘤状凸起增多,横切面木质部具有轻微纤维化;极重度感染地黄的块根几乎不膨大,表面布满瘤状凸起,须根增多,横切面木质部纤维化明显。

将上述地黄样品洗净擦干后切片,65 ℃烘干,打粉,过 65 目筛,备用。

表 1 地黄样品信息

编号	样品信息	编号	样品信息
S1	正常地黄 1-1	S9	重度感染地黄 3-1
S2	正常地黄 1-2	S10	重度感染地黄 3-2
S3	正常地黄 1-3	S11	重度感染地黄 3-3
S4	正常地黄 1-4	S12	重度感染地黄 3-4
S5	中度感染地黄 2-1	S13	极重度感染地黄 4-1
S6	中度感染地黄 2-2	S14	极重度感染地黄 4-2
S7	中度感染地黄 2-3	S15	极重感染地黄度 4-3
S8	中度感染地黄 2-4	S16	极重度感染地黄 4-4

2 方法

2.1 环烯醚萜苷类及苯乙醇苷类成分含量测定

2.1.1 色谱条件 采用 Venusil XBP C_{18}(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;流动相 0.01% 醋酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~5 min,3% B,5~25 min,3%~5% B,25~50 min,5%~15% B,50~70 min,15%~22% B,70~80 min,22%~28% B);流速 1 mL·min^{-1};柱温 30 ℃;检测波长 205 nm;进样量 20 μL。样品及对照品 HPLC 图见插页Ⅻ图 2。

2.1.2 供试品溶液的制备 取地黄样品粉末 1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 50 mL 甲醇溶解,超声处理 1 h,冷却至室温后,补足失重,摇匀过滤,取续滤液 20 mL 于蒸发皿中,65 ℃水浴浓缩至近干,残渣加入流动相溶解,并定容到 10 mL 容量瓶中,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 取梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、羟基酪醇、益母草苷、红景天苷、松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、2′-乙酰毛蕊花糖苷等对照品适量,分别置于 5 mL 的容量瓶中,色谱甲醇溶解并定容至刻度,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得。

2.1.4 方法学考察 (1)线性关系考察:分别精密吸取“2.1.3”项下的对照品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定上述对照品溶液的峰面积,以对照品浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,见表 2。

表 2 环烯醚萜苷及苯乙醇苷类成分线性回归方程

成分	线性回归方程	相关系数 r	线性范围/(mg·mL^{-1})
梓醇	Y=10 875.0X+231.333 0	0.999 6	0.170 0~1.200 0
地黄苷 D	Y=8 617.6X-49.850 0	0.999 9	0.052 0~0.520 0
地黄苷 A	Y=2 575.1X-1.012 3	0.999 3	0.086 0~0.860 0
羟基酪醇	Y=143 300.0X-60.694 0	0.999 5	0.003 6~0.036 0
益母草苷	Y=1 602.3X+55.228 0	0.999 3	0.190 0~0.690 0
红景天苷	Y=26 564.0X+4.580 3	0.999 8	0.001 4~0.008 6
松果菊苷	Y=29 365.0X+9.796 9	0.999 7	0.004 3~0.013 0
肉苁蓉苷 A	Y=4 517.5X+19.676 0	0.999 8	0.048 0~0.190 0
毛蕊花糖苷	Y=6 537.2X-71.722 0	0.999 8	0.086 0~0.860 0
异类叶升麻苷	Y=26 417.0X-24.359 0	0.999 5	0.003 9~0.030 0
2′-乙酰毛蕊花糖苷	Y=49 994.0X-14.960 0	0.999 2	0.001 6~0.016 0

(2)精密度、重复性、稳定性及加样回收试验:取 S1 样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,计算得到梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、羟基酪醇、益母草苷、红景天苷、松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、2′-乙酰毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 均<5%,表明仪器精密度良好。取 S1 样品 6 份,按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,计算得梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、羟基酪醇、益母草苷、红景天苷、松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、2′-乙酰毛蕊花糖苷的平均含量的 RSD 值均<3%,表明该方法重复性较好。取 S1 样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.1.1”项下色谱条件进样,计算得到梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、羟基酪醇、益母草苷、红景天苷、松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、2′-乙酰毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 均<5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。取已知含量 S1 样品 6 份,分别按 1∶1 的比例加入对照品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,测得梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、羟基酪醇、益母草苷、红景天苷、松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、2′-乙酰毛蕊花糖苷的平均回收率及 RSD 值均符合要求,表明方法准确度良好。

2.2 游离单糖及寡糖含量测定

2.2.1 色谱条件 采用 Megassil XB NH_2(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;流动相水-乙腈(25∶75);流速 0.8 mL·min^{-1};柱温 30 ℃;进样量 5 μL。ELSD 参数:气体流量 2.2 L·min^{-1};漂移管温度 85.0 ℃;增益 1。样品及对照品 HPLC 图见插页ⅩⅩⅢ图 3。

2.2.2 供试品溶液的制备 取地黄样品粉末 0.2 g,精密称定,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 色谱甲醇 25 mL,称定重量,超声处理 45 min,冷却至室温后,补足失重,摇匀,4000 r·min^{-1}离心 12 min,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 取 D-果糖、D-葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、水苏糖对照品适量,分别置于 5 mL 容量瓶中,50% 色谱甲醇溶解并定容至刻度,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得。

2.2.4 方法学考察 (1)线性关系考察:分别精密吸取“2.2.3”项下的对照品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件测定上述对照品溶液的峰面积,以对照品浓度的对数为横坐标,峰面积积分值的对数为纵坐标,绘制标准曲线,见表 3。

表 3 游离单糖及寡糖线性回归方程

成分	线性回归方程	相关系数 r	线性范围/(mg·mL^{-1})
果糖	Y = 2.676 2X + 0.197 8	0.999 2	0.057 ~ 0.280
葡萄糖	Y = 1.824 6X + 2.281 9	0.999 2	0.046 ~ 0.270
蔗糖	Y = 1.234 8X + 3.539 6	0.999 8	0.680 ~ 1.700
棉籽糖	Y = 1.145 5X + 3.811 0	0.999 4	0.059 ~ 0.300
水苏糖	Y = 1.128 3X + 3.813 3	0.999 7	0.810 ~ 4.900

(2)精密度、重复性、稳定性及加样回收试验:取 S1 样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,计算得到果糖、葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、水苏糖峰面积的 RSD 均 < 5%,表明仪器精密度良好。取 S1 样品 6 份,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,计算得到果糖、葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、水苏糖的平均含量的 RSD 值均 < 3%,表明该方法重复性较好。取 S1 样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.2.1”项下色谱条件进样,计算得到果糖、葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、水苏糖峰面积的 RSD 均 < 5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。取已知含量 S1 样品 6 份,分别按 1∶1 的比例加入对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,测得果糖、葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、水苏糖的平均回收率及 RSD 值均符合要求,表明方法准确度良好。

2.3 多糖含量及单糖组成测定

2.3.1 多糖溶液的制备 取地黄样品粉末 0.5 g,精密称定,包裹入 250 目白色细网布中,加入石油醚 50 mL,80 ℃连续回流提取 1.5 h 除脂,残渣挥干溶剂后,加入 80% 乙醇 70 mL,90 ℃连续回流提取 2 h 取出,残渣用无水乙醇冲洗 3 次,残渣挥干溶剂后,加入 100 mL 蒸馏水煎煮 1 h,煎煮后移至 25 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀,备用。

2.3.2 多糖含量测定 精密吸取上述多糖溶液 50 μL,置于具塞试管中,加水至 1 mL,加 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,置 100 ℃水浴中加热 10 min,取出置冰水浴中冷却 3 min,在 490 nm 处测定吸光度。根据样品吸光度结合标准曲线计算地黄样品中多糖含量。

2.3.3 多糖水解液的制备 精密吸取上述多糖溶液 1 mL 于真空水解管中,加入 3.0 mol·L^{-1}的盐酸溶液 0.5 mL,抽出水解管中空气,置 110 ℃烘箱中水解 1 h,取出,冷却至室温,用 3.0 mol·L^{-1}的氢氧化钠溶液调节 pH 值至中性,备用。

2.3.4 对照品溶液的制备 取对照品适量,精密称定,加蒸馏水分别制成含甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖及阿拉伯糖的混合对照品溶液。

2.3.5 单糖衍生化 精密吸取对照品溶液和多糖水解液 400 μL,置 4 mL 离心管中,分别加入 0.5 mol·L^{-1} PMP-甲醇溶液和 0.3 mol·L^{-1}的氢氧化钠溶液各 400 μL,混匀,于 70 ℃下水浴反应 100 min,取出,放至室温,加入 0.3 mol·L^{-1}的盐酸溶液 400 μL,最后加入 2 mL 三氯甲烷溶液,振荡后,弃去下层,重复萃取 3 次,取上层溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,取续滤液,备用。

2.3.6 色谱条件 采用 Venusil XBP C_{18}(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;流动相 0.2 mol·L^{-1}乙酸铵溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min,10% B,2 ~ 5 min,10% ~ 13% B,5 ~ 15 min,13% ~ 17% B,15 ~ 30 min,17% ~ 18% B,30 ~ 50 min,18% ~ 20% B,50 ~ 60 min,20% ~ 37% B);流速 1 mL·min^{-1};柱温 30 ℃;检测波长 250 nm;进样量 10 μL。样品及对照品 HPLC 图见插页ⅩⅩⅢ图 4。

2.3.7 方法学考察 (1)线性关系考察:分别精密吸取“2.3.7”项下的对照品衍生化溶液适量,按照“2.3.6”项下色谱条件测定上述对照品溶液的峰面积,以对照品浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,见表 4。

表 4 单糖线性回归方程

成分	线性回归方程	相关系数 r	线性范围/(mg·mL^{-1})
甘露糖	Y = 74 488.0X - 841.31	0.999 3	0.019 ~ 0.120
鼠李糖	Y = 20 489.0X - 281.30	0.999 6	0.016 ~ 0.098
半乳糖醛酸	Y = 2 450.4X - 71.44	0.999 5	0.041 ~ 0.250
葡萄糖	Y = 16 584.0X - 672.96	0.999 7	0.080 ~ 0.480
半乳糖	Y = 20 512.0X - 352.89	0.999 7	0.039 ~ 0.230
阿拉伯糖	Y = 9 753.2X - 880.06	1.000 0	0.210 ~ 1.200

(2)精密度、重复性、稳定性试验及加样回收试验:取 S1 样品,按“2.3.5”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.6”项下色谱条件连续进样 6 次,计算得到甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 均 < 5%,表明仪器精密度良好。取 S1 样品 6 份,按“2.3.5”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3.6”项下色谱条件进样,计算得到甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖平均含量的 RSD 值均 < 3%,表明该方法重复性较好。取 S1 样品,按“2.3.5”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.3.6”项下色谱条件进样,计算得到甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 均 < 5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。取已知含量 S1 样品 6 份,分别按 1∶1 的比例加入对照品,按“2.3.5”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.6”项下色谱条件进样,测得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的平均回收率及 RSD 值均符合要求,表明方法准确度良好。

2.4 不同程度线虫感染地黄清除 DPPH 自由基活性分析

按照崔锦鹏等[13]的文献方法进行测定,每个样品重复 3 次,结果取其平均值。

3 结果

3.1 正常地黄与线虫病感染地黄中环烯醚萜苷类及苯乙醇苷类成分分析

为比较正常地黄与不同程度线虫病感染地黄中苷类成分

含量差异,按“2.1.4”项下的标准曲线计算 16 批地黄样品中环烯醚萜苷及苯乙醇苷类成分的含量并绘制线图,见插页XXⅣ图 5。结果显示,地黄感染线虫病后,苷类成分的含量发生了一定变化。整体来看,极重度感染地黄中苷类成分总含量降低,其中梓醇、毛蕊花糖苷的含量明显降低,而肉苁蓉苷 A 的含量则明显升高,其余苷类成分的含量变化不明显。

3.2 正常地黄与线虫病感染地黄中游离单糖及寡糖分析

按“2.2.4”项下标准曲线计算 16 批地黄样品中游离单糖及寡糖的含量,绘制堆积图并进行差异性检验,见插页XXⅣ图 6。结果表明,地黄感染线虫病后,游离单糖及寡糖的总含量呈现下降趋势,果糖和水苏糖的含量明显下降,其中水苏糖下降比例达 77.7%,而葡萄糖、蔗糖的含量均明显增加,棉籽糖的含量未发生明显变化。

3.3 正常地黄与线虫病感染地黄中多糖含量及单糖组成分析

3.3.1 多糖含量特征分析 按“2.3.4”项下方法测定正常地黄与不同程度线虫病感染地黄中多糖的含量并绘制柱形图,见插页XXⅣ图 7A。结果表明,与正常地黄、中度线虫病感染地黄及重度线虫病感染地黄相比,极重度线虫病感染地黄的多糖含量出现了明显下降。差异性 T 检验结果显示正常地黄、中度感染地黄、重度感染地黄三者之间的 P 值均 >0.05,而其与极重度感染地黄的 P 值均 <0.01,说明极重度感染地黄与其他 3 种地黄的多糖含量差异有极显著统计学意义,见表 5。

表 5 正常地黄与线虫病感染地黄多糖含量差异性 T 检验

样品	P 值	样品	P 值
正常 vs 中度感染	0.670 3	正常 vs 极重度感染	0.000 0
正常 vs 重度感染	0.170 8	中度感染 vs 极重度感染	0.000 0
中度感染 vs 重度感染	0.369 2	重度感染 vs 极重度感染	0.000 1

3.3.2 单糖组成分析 为进一步分析 16 批地黄样品中多糖的单糖组成差异,将 16 批地黄样品的单糖峰面积进行归一化处理绘制单糖相对百分占比柱形图,见插页XXⅣ图 7B。结果表明,线虫感染对地黄多糖的单糖组成没有影响,但对其含量影响较大,与正常地黄相比,感染线虫病后的地黄多糖中除葡萄糖的相对百分比基本保持不变外,甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸和阿拉伯糖的相对百分比均升高,而半乳糖的相对百分比则下降。

3.4 正常地黄与线虫病感染地黄整体质量特征分析

3.4.1 聚类分析 采用 Origin 2022 软件,以 16 批地黄样品中环烯醚萜苷类及苯乙醇苷类、游离单糖及寡糖、多糖相对含量的均一化值为变量,形成 16×17 阶数据矩阵,采用欧氏距离法绘制聚类热图,见插页XXⅤ图 8,横向代表批次,纵向代表成分,颜色由红到蓝代表含量由低到高。结果表明,16 批地黄样品可分为 2 类,其中 S1~12(正常地黄、中度感染地黄和重度感染地黄)聚为一类,S13~S16(极重度感染地黄)聚为一类。

3.4.2 差异性成分筛选 采用 SIMCA-14.1 软件,以 16 批地黄样品中的环烯醚萜苷类及苯乙醇苷类、游离单糖及寡糖、多糖的相对含量为变量进行主成分分析(Principal components analysis,PCA),PCA 得分图见插页XXⅤ图 9A,显示正常地黄与不同程度感染地黄可分为两类,其中正常地黄、重度感染地黄、中度感染地黄聚为一类,极重度感染地黄聚为一类,该结果与聚类热图分析结果一致。当剔除极重度感染地黄样品,仅对正常地黄、中度感染地黄和重度感染地黄进行 PCA 分析时发现,3 种地黄各自聚为一类,见插页XXⅤ图 9B,说明线虫病感染对地黄的化学成分特征产生了不同程度的影响。

为了排除不同样品组内差异对样品组间差异的干扰,进一步对 16 批地黄化学成分的质量特征进行正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares-discriminant analysis,OPLS-DA),OPLS-DA 结果见插页XXⅤ图 10A,显示极重度感染地黄聚为一类,正常地黄、重度感染地黄、中度感染地黄聚为一类。剔除极重度感染地黄样品,对正常地黄、中度感染地黄和重度感染地黄进行 OPLS-DA 分析发现,3 种地黄也各自聚为一类,见插页XXⅤ图 10B。对所建立的极重度感染地黄与其余 3 种地黄的 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验,见插页XXⅥ图 11A,结果显示置换后的 R2、Q2 值均高于原始的 R2、Q2 值,表明所建模型可靠,未出现过度拟合现象。

为了进一步寻找极重度感染地黄与其余 3 种地黄之间的差异性标志化合物,以变量重要性投影值(VIP 值)>1 为标准筛选出化学成分差异的主要标志性成分,得到 10 个差异性成分,见插页XXⅥ图 11B,分别为地黄苷 A、肉苁蓉苷 A、益母草苷、羟基酪醇、蔗糖、葡萄糖、梓醇、地黄苷 D、水苏糖、多糖。

3.5 DPPH 抗氧化活性分析

以 16 批地黄样品的质量浓度为横坐标,以测得清除率平均值为纵坐标,绘制散点图,见插页XXⅥ图 12A。结果表明,各样品清除率线性关系较好,其中重度感染地黄的抗氧化活性最为显著,当质量浓度 <0.8 mg·mL^{-1}时,正常地黄、中度感染地黄和极重度感染地黄的抗氧化活性相差不大,当质量浓度 >0.8 mg·mL^{-1}时,极重度感染地黄的抗氧化活性明显降低。

以 17 个共有成分的相对含量为自变量(X),以 DPPH 自由基测定值为因变量(Y),采用 SPSS 26.0 软件进行 Spearman 相关性分析,并利用 Origin 2022 软件绘制弦图,见插页XXⅥ图 12B。弦图通常用于表示数据集或不同数据组之间的相关性,其线条的粗细表示 2 个数据间相关性,线条越粗,相关性越大。整体来看,16 批地黄样品中多数共有成分仅在高质量浓度下与 DPPH 自由基清除率呈现一定的相关性。当质量浓度 >0.8 mg·mL^{-1}时,梓醇、松果菊苷、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、果糖、水苏糖及多糖与抗氧化活性呈现较强的相关性。

4 讨论

线虫病主要是由根结线虫引起的一种常见土传病害,多发生在 6~7 月,药用植物在生长过程中每年可能遭受到 3~4 次根结线虫的连续侵染[10],发病后主要表现为地上部分茎叶萎黄,植株长势减弱,地下部分块茎瘦小,须根丛生,且病根和根毛上会附着许多白毛状线虫和棕色胞囊[14-16]。本研究发现,地黄在感染线虫病后,根部畸形,表面形成不规则瘤状凸起,块根变细,须根增多,且木质部产生了一定程度的纤维化,这与地黄连作障碍的表现相一致。文献报道,地黄连作时土壤中线虫数量增多,会引发地黄的根腐病、茎腐病等[11,17],而线虫在适宜的条件下会侵染地黄根部并大量繁殖[16],使根部形成瘤状根结来破坏根部组织并吸收营养,从而破坏整个代谢系统[18-19]。除此之外,还有文献报道轮作是防治地黄线虫病的关键措施[20],这与地黄为减轻连作障碍所采取的防治措施相一致。由此说明地黄线虫病与连作障碍之间可能存在着一定

联系,但关于地黄线虫病的具体产生机制与连作障碍之间的相关性还需进一步研究。

地黄作为我国常用的大宗药材,病虫害仍是影响其产量和质量的主要原因之一。本研究通过分析地黄感染线虫病前后化学成分的变化特征,发现地黄感染线虫病后,环烯醚萜苷类及苯乙醇苷类等次生代谢产物的含量均发生了变化,随着感染程度加深,大部分次生代谢产物的含量呈下降趋势。文献报道,植物感染线虫病后,线虫释放出的 β-1,4-内切葡聚糖酶和果胶酸裂解酶会破坏块根植物细胞的细胞壁[21-22],使细胞发生崩解。另外,还有研究发现植物感染线虫病后,根系会发生病变,块根表面生成的根瘤会阻塞次生代谢产物的合成通道[23],黄文坤等[24]研究推测线虫可能会通过莽草酸代谢途径侵染寄主植物,而莽草酸途径是植物和微生物的基本代谢途径[25],因此地黄感染线虫病后引起储存次生代谢产物的细胞受损及合成途径受阻可能是导致块根中次生代谢产物含量下降的重要原因。

糖类是中药中重要的一类活性成分,地黄是糖类成分含量较高的中药材,现代药理研究表明[26-27]地黄中的多糖与其抗氧化及抗衰老活性呈现密切相关性。为了整体评价线虫病感染对地黄化学成分的影响,本研究对线虫病感染地黄中的糖类成分进行分析,发现极重度感染地黄中多糖、果糖和水苏糖含量明显下降,说明地黄感染线虫病后对其块根中糖类成分的影响较大。李璐璐等[28]发现罗汉果在接种南方根结线虫 7 天后其根系中的纤维二糖和海藻糖含量均下降,这与本实验的研究结果相一致;袁炎炎[27]的研究表明生、熟地黄多糖可以在不影响线虫繁殖能力的前提下延长线虫的寿命、促进线虫的生长发育;HOFMANN J 等[29]也检测到药材根系中作为线虫取食部位的巨细胞结构中糖类含量高于正常细胞,上述研究表明糖类成分可能是线虫赖以生存的营养物质,当地黄感染线虫病后,地黄中的糖类成分可能被线虫作为营养物质以保证其正常生长,最终导致感染线虫病后的地黄植株生长不良、块根膨大受阻,梁思维等[30]的研究也证实了土壤线虫通过加强营养循环来影响植物生长、降低根系效率,但地黄对线虫病感染后的响应机制还需要进一步研究。

参考文献

[1] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1772-1784.
[2] 耿晓桐. 地黄化学成分及药理作用的研究进展[J]. 黑龙江科学, 2022, 13(24): 51-53.
[3] 崔锦鹏, 耿晓桐, 张宝, 等. 地黄中环烯醚萜苷类成分在根际土壤中的分布特征研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(10): 2492-2497.
[4] LIU W, YIN D X, ZHANG T, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activity of *Rehmannia glutinosa* from different production locations[J]. Chem Biodivers, 2020, 17(8): 341.
[5] 周丽, 徐金娣, 毛茜, 等. 地黄加工炮制研究新进展及展望[J]. 中药材, 2016, 39(5): 1184-1190.
[6] PUNGITORE C R, AYUB M J, BORKOWSKI E J, et al. Inhibition of taq DNA polymerase by catalpol[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004, 50(6): 767-772.
[7] 朱珏, 朱香梅, 石雨荷, 等. 地黄的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中药材, 2022, 45(5): 1273-1281.
[8] 周博, 焦永吉, 文艺, 等. 河南省怀地黄根结线虫病发生分布与种类鉴定[J]. 中国植保导刊, 2020, 40(10): 9-15.
[9] 李辉, 岳洪. 地黄主要病害的综合防治[J]. 特种经济动植物, 2000, 3(5): 38.
[10] 林丽飞, 邓裕亮, 江楠, 等. 我国药用植物根结线虫病的分布与危害[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(6): 666-669.
[11] 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.
[12] 甘贤友, 周国顺, 袁桂荣. 四大怀药病害的诊断鉴定[J]. 河南职技师院学报, 1990, 18(2): 27-31.
[13] 崔锦鹏, 耿晓桐, 程梦娟, 等. 基于指纹图谱及抗氧化活性考察不同杀青方法地黄叶的质量特征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23): 197-204.
[14] 牛翠连. 地黄常见病虫害发生及防治技术[J]. 农村实用技术, 2020(5): 72.
[15] 乔卿梅, 程茂高, 王新民. 不同药剂处理对地黄胞囊线虫病的防效研究[J]. 河南科学, 2009, 27(1): 43-46.
[16] 刘阳, 李长洋, 姚志浩, 等. 作物根结线虫病化学防治研究进展[J]. 农药学学报, 2024, 26(1): 8-22.
[17] 张亚琴, 陈雨, 雷飞益, 等. 药用植物化感自毒作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1946-1956.
[18] 韩冰洁,张立君,张建君. 作物根结线虫病防治研究进展[J]. 长江蔬菜,2021(22):44-48.
[19] XIANG N, LAWRENCE K S, KLOEPPER J W, et al. Biological control of *Meloidogyne* incognita by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton[J]. Plant Dis, 2017, 101(5): 774-784.
[20] 王太霞. 怀地黄块根的发育与有效成分的积累关系及其道地性形成机制的研究[D]. 西安: 西北大学, 2004.
[21] 于洪岩. 温度胁迫对北方根结线虫及与番茄互作相关基因影响研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
[22] 刘奇志, 李娜, 王丽, 等. 南方根结线虫侵染黄瓜幼根组织病理学观察[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(4): 51-56.
[23] 王柱华, 王文鹏, 吴文涛, 等. 根结线虫不同侵染程度对三七生物量及皂苷含量的影响[J]. 中药材, 2021, 44(6): 1293-1298.
[24] 黄文坤, 彭德良, 贺文婷. 植物寄生线虫分支酸变位酶基因的研究进展[J]. 植物病理学报, 2009, 39(2): 113-117.
[25] STRACK D. Phenolic Metabolism[M]. Academic Press, 1997: 387-416.
[26] 薛淑娟, 车奇涛, 陈随清. 基于"成分-颜色"关联分析地黄药材的质量及体外活性评价[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(11): 2791-2796.
[27] 袁炎炎. 基于秀丽隐杆线虫模型的生、熟地黄多糖抗衰老作用及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
[28] 李璐璐, 韦文琼, 程颖, 等. 南方根结线虫侵染下罗汉果代谢组学研究[J]. 生物学杂志, 2020, 37(1): 63-66.
[29] HOFMANN J, ELASHRY A E, ANWAR S, et al. Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism[J]. Plant J, 2010, 62(6): 1058-1071.
[30] 梁思维, 刘笑彤, 李英滨, 等. 我国土壤线虫生态研究新进展[J]. 应用生态学报, 2024, 35(8): 2282-2290.