

UHPLC 特征图谱结合多组分含量评价首乌藤饮片的质量

周亚楠, 孙茜, 白洁, 刘永利* (河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立首乌藤的 UHPLC 特征图谱, 测定 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚的含量。结合聚类分析法(CA)和主成分分析法(PCA)对首乌藤饮片的质量进行研究。方法 色谱柱: Shiseido C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 2.7 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm。运用 SPSS 20.0 软件进行 PCA 和 CA 分析。结果 特征图谱确立 6 个特征峰, 40 批首乌藤的相似度为 0.655~0.998; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素及大黄素甲醚含量分别为 0.01~1.96, 0.02~3.15 和 0.01~1.48 mg·g⁻¹。PCA 和 CA 结果将首乌藤饮片分为 3 类, 反映了不同批次首乌藤饮片的质量特征。结论 UHPLC 特征图谱和多组分含量结合 PCA 和 CA 可以对首乌藤饮片的质量进行客观、有效的评价。

关键词: 首乌藤; 特征图谱; 聚类分析(CA); 主成分分析(PCA); 质量评价

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)08-1203-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.08.019

引用本文: 周亚楠, 孙茜, 白洁, 等. UHPLC 特征图谱结合多组分含量评价首乌藤饮片的质量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(8): 1203-1207.

Quality Evaluation of Polygoni Multiflori Caulis by UHPLC Specific Chromatogram and Multi-Component Quantitative Analysis

ZHOU Yanan, SUN Han, BAI Jie, LIU Yongli* (Hebei Institute for Drug Control; Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the UHPLC specific chromatogram and determine 2,3,5,4-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-*O*- β -D-glucoside, rheum emodin and rheochrysidin of Polygoni Multiflori Caulis. To evaluate the quality of Polygoni Multiflori Caulis based on principal component analysis(PCA) and cluster analysis(CA). **METHODS** UHPLC analysis was performed on a shiseido C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 2.7 μ m). The mobile phase was composed of 0.1% phosphoric acid and acetonitrile with gradient elution. And the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm. The SPSS 20.0 software was used for PCA and CA analysis. **RESULTS** The method for specific chromatogram was established six characteristic peaks. The similarities of 40 batches of Polygoni Multiflori Caulis were 0.655–0.998. The content of 2,3,5,4-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-*O*- β -D-glucoside, rheum emodin, rheochrysidin in different batches ranged from 0.01 to 1.96 mg·g⁻¹, from 0.02 to 3.15 mg·g⁻¹, and from 0.01 to 1.48 mg·g⁻¹. PCA and CA results showed that all of Polygoni Multiflori Caulis were classified into 3 categories, and reflected the quality characteristics of different batches. **CONCLUSION** The UHPLC specific chromatogram coupled with PCA and CA can objectively and effectively assess the quality of Polygoni Multiflori Caulis.

KEY WORDS: Polygoni Multiflori Caulis; specific chromatogram; principle component analysis(PCA); cluster analysis(CA); quality evaluation

首乌藤来源于蓼科植物何首乌的干燥藤茎, 秋、冬二季采割, 除去残叶, 捆成把, 干燥, 具有养血安神、祛风通络的功效。始载于苏颂的《图经本草》, 又名夜交藤, 现收载于中国药典 2015 年版一部。首乌藤的主要化学成分为大黄素及大黄素甲醚等蒽醌类和二苯乙烯苷类^[1-2], 目前市场上首乌藤饮片的质量参差不齐, 有关首乌藤的研究尚报道较少。本试验收集了 40 批首乌藤饮片进行研究, 采用 UHPLC 建立了首乌藤的特征图谱,

同时对 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素及大黄素甲醚 3 个组分进行含量测定, 并应用 SPSS 20.0 软件对数据结果进行聚类分析和主成分分析, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行相似度分析, 为更好地评价其质量提供依据。

1 试药与仪器

U3000 超高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司), 配备 PDA 检测器; 纯水仪(美国 Millipore 公司);

作者简介: 周亚楠, 女, 主管药师 Tel: (0311)85212007 E-mail: 172774170@qq.com

(0311)89892091 E-mail: liuyogli2008@126.com

*通信作者: 刘永利, 男, 硕士, 主任药师 Tel:

KQ-500KDE 超声仪(昆山市超声仪器有限公司); AE163 电子天平(Mettler 公司)。

大黄素(批号: 110756-200110; 纯度: 100%)、大黄素甲醚(批号: 1170858-200610; 纯度: 99.1%)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号: 110844-201411; 纯度: 95.4%)均由中国食品药品检定研究院提供; 甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Merck 公司, 批号分别为 1821407609, JA036930); 其余试剂为分析纯。样品: 首乌藤饮片 40 批, 收集于各零售企业及饮片生产企业。40 批首乌藤饮片经河北省药品检验研究院段吉平教授鉴定为正品, 部分样品标本保存于河北省药品检验研究院标本室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shiseido C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2.7 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 10%→30%A; 10~18 min, 30%→55%A; 18~23 min, 55%A; 23~30 min, 55%→65%A); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 进样量: 2 μ L。检测波长: 254 nm。按上述色谱条件进行测定, 以大黄素计算理论板数>5 000, 分离度>1.5。对照品溶液及供试品溶液的色谱图见图 1。

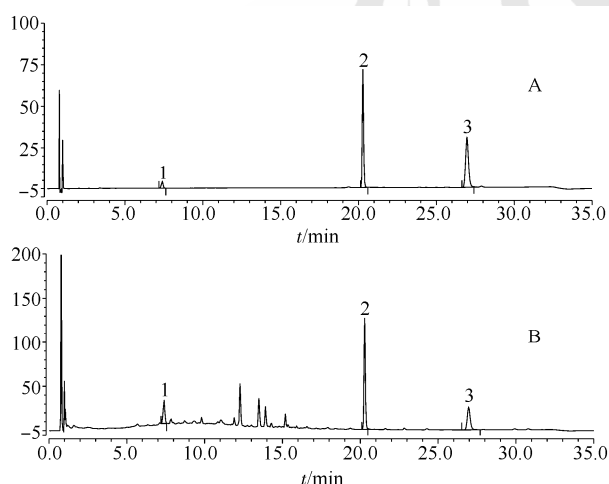


图 1 对照品及样品 UHPLC 色谱图

A-混合对照品; B-首乌藤样品; 1-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷; 2-大黄素; 3-大黄素甲醚。

Fig. 1 UHPLC chromatograms of mixed standards and sample
A-mixed standards; B-sample; 1-2,3,5,4'-tetrahydroxy diphenylethylene-2-*O*- β -D-glucoside; 2-rheum emodin; 3-rheochrysidin.

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素及大黄素

甲醚对照品适量, 分别加甲醇适量溶解并稀释制成含 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷 0.060 44 mg·mL⁻¹、大黄素 0.016 49 mg·mL⁻¹、大黄素甲醚 0.016 19 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 4 号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞棕色锥形瓶中, 避光操作, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)20 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得, 测定结果以干燥品计算含量。

2.3 含量测定

2.3.1 线性关系考察 分别精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素及大黄素甲醚对照品适量, 配制成系列浓度的对照品溶液, 分别吸取 2 μ L, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。以进样量(*X*, μ g)为横坐标, 对照品峰面积(*Y*)为纵坐标, 绘制标准曲线。结果 3 个成分线性关系良好, 回归方程、相关系数和线性范围见表 1。

表 1 3 种成分的回归方程和线性范围

Tab. 1 Regression equation, linear range of three composition

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ μ g
2,3,5,4'-四羟基二 苯 乙 烯 -2- <i>O</i> - β -D- 葡萄糖苷	$Y=0.007\ 2X-0.005\ 3$	0.999 6	0.036~0.604
大黄素	$Y=136.38X-0.011\ 9$	1.000 0	0.008 2~0.549 5
大黄素甲醚	$Y=136.23X-0.111\ 8$	1.000 0	0.010 8~0.269 8

2.3.2 重复性试验 取首乌藤样品(批号为 20141773), 平行 2 份, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 精密吸取供试品溶液各 2 μ L, 进行测定, 记录峰面积, 计算含量。结果 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素及大黄素甲醚平均含量(*n*=9)分别为 6.46, 2.47, 1.11 mg·g⁻¹, RSD 分别为 2.8%, 2.3%, 1.9%。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 1, 3, 6, 15, 24 h 进样测定, 结果 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素及大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 1.4%, 0.7%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 加样回收试验 取已知含量的样品(批号为

20141773)粉末 0.25 g, 共 9 份, 精密称定, 精密加入混合对照品溶液(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 0.033 2, 0.066 6, 0.099 7 mg·mL⁻¹; 大黄素 0.013 74, 0.027 48, 0.041 22 mg·mL⁻¹; 大黄素甲醚 0.005 39, 0.010 79, 0.01619 mg·mL⁻¹)25 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算平均回收率。结果 3 种成分平均回收率($n=9$)分别为 100.2%, 98.2%, 101.3%; RSD 分别为 2.9%, 1.7%, 2.3%。

2.3.5 样品测定结果 取 40 批首乌藤样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 2 μL, 注入 UHPLC 液相色谱仪测定, 记录色谱图, 计算 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚的含量, 结果见表 2。由表 2 可知, 个别样品中 3 种成分含量均较低, 可能存在不规范生产行为, 也可能是由于炮制不当导致二苯乙烯苷水解或饮片本身质量差所致。

2.4 特征图谱

2.4.1 仪器精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 记录色谱图。以大黄素为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各特征峰相对保留时间的 RSD<0.4%, 特征峰相对峰面积的 RSD<1.3%。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012)”进行评价, 相似度为 0.99, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 1, 3, 6, 15, 24 h 进样测定, 记录色谱图。以大黄素为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各特征峰的相对保留时间 RSD<0.5%, 相对峰面积的 RSD<1.4%, 相似度为 0.98。结果表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品, 平行制备 5 份供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。以大黄素为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各特征峰相对保留时间的 RSD<0.4%, 相对峰面积的 RSD<1.8%, 相似度为 0.99, 表明该方法重复性好。

2.4.4 特征图谱的建立 将 40 批次首乌藤样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行 UHPLC 测定。经分析比较, 确定 6 个特征峰, 通过对照品比对, 峰 1、峰 5、峰 6 分别为 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖

苷、大黄素和大黄素甲醚, 以大黄素峰为参照峰(S), 各特征峰相对保留时间分别为 0.365, 0.606, 0.665, 0.686, 1, 1.331。结果见图 2。

表 2 40 批次首乌藤样品含量和相似度测定结果($n=3$)

Tab. 2 The content and similarity results of 40 batches of sample($n=3$)

编号	相似度	含量		
		大黄素/ mg·g ⁻¹	大黄素甲醚/ mg·g ⁻¹	二苯乙烯苷/ mg·g ⁻¹
1	0.911	0.89	0.41	0.57
2	0.788	2.87	1.36	0.84
3	0.928	1.51	0.74	0.55
4	0.805	3.15	1.48	0.87
5	0.793	2.64	1.19	1.96
6	0.833	0.61	0.25	0.90
7	0.845	1.53	0.76	0.44
8	0.824	2.31	1.22	0.74
9	0.839	0.35	0.18	0.83
10	0.896	1.48	0.69	0.36
11	0.854	0.16	0.08	0.29
12	0.849	0.19	0.09	0.42
13	0.937	0.43	0.24	0.31
14	0.937	0.25	0.11	0.16
15	0.887	0.17	0.07	0.27
16	0.950	0.97	0.51	0.51
17	0.830	0.16	0.06	0.34
18	0.921	0.67	0.49	0.49
19	0.816	0.11	0.06	0.28
20	0.860	0.13	0.08	0.31
21	0.895	0.24	0.11	0.44
22	0.828	0.16	0.09	0.41
23	0.847	0.24	0.13	0.46
24	0.975	0.27	0.15	0.26
25	0.888	0.20	0.11	0.30
26	0.905	0.47	0.23	0.70
27	0.915	0.16	0.09	0.03
28	0.917	0.13	0.07	0.10
29	0.854	0.03	0.02	0.04
30	0.956	0.04	0.03	0.01
31	0.855	0.02	0.01	0.01
32	0.816	0.05	0.03	0.01
33	0.843	0.03	0.02	0.02
34	0.900	0.03	0.02	0.02
35	0.849	0.04	0.02	0.09
36	0.929	0.05	0.03	0.08
37	0.888	0.06	0.03	0.06
38	0.869	0.03	0.02	0.05
39	0.874	0.05	0.04	0.08
40	0.853	0.07	0.04	0.09

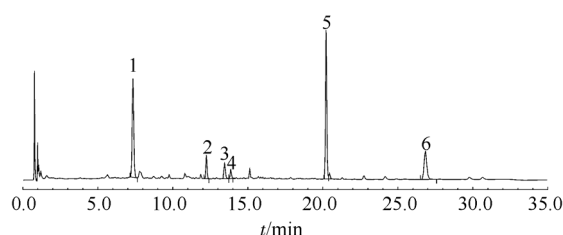


图2 首乌藤 UHPLC 特征图谱

1-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷; 5-大黄素; 6-大黄素甲醚。

Fig. 2 UHPLC chromatogram of Polygoni Multiflori Caulis 1-2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside; 5-rheum emodin; 6-rheochrysidin.

2.5 质量评价

2.5.1 系统聚类分析 采用 SPSS 20.0 统计软件中系统聚类法中 Ward 法, 选取“平方 Euclidean 距离”作为度量标准, 将所有特征峰的峰面积与 5-大黄素峰面积的比值所得数据进行聚类分析, 结果样品明显分为 3 类, 结果见图 3。其中第 I 类样品含量均符合药典规定, 且直径在 4~7 mm, 切面木部黄白色或淡棕色, 髓部类白色, 味微苦涩, 完全符合药典性状项下描述; 第 II、III 类样品含量不符合药典规定, 其中第 II 类直径都 >7 mm, 第 III 类样品中有些直径 >7 mm 且味淡、无苦涩味, 不符合药典性状项下描述。综上分析, 所建立的首乌藤 UHPLC 特征图谱方法可用于首乌藤药材的质量评价。

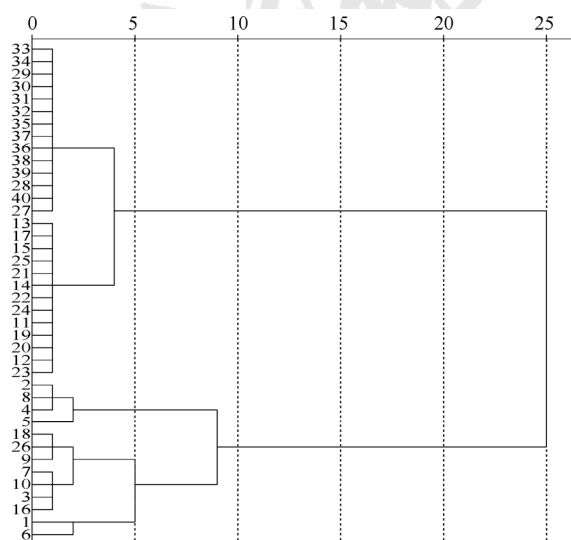


图3 40 批首乌藤聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis result of characteristic chromatograms of 40 batches of Polygoni Multiflori Caulis

2.5.2 主成分分析 将 6 个特征峰的相对最大峰面积(大黄素峰)作为变量, 使用 SPSS 20.0 软件进

行主成分分析, 以特征值 >1 为判断标准, 共提取 2 个主成分, 得到主成分得分图, 见图 4^[3-4]。结果显示 40 批首乌藤样品被分成 3 组, 其分组结果与聚类分析结果基本一致。

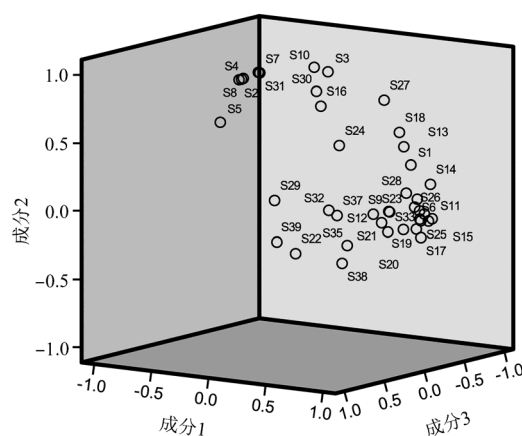


图4 40 批首乌藤主成分分析图

Fig. 4 PCA result of characteristic chromatograms of 40 batches of Polygoni Multiflori Caulis

2.5.3 特征图谱相似度分析 结合聚类分析和主成分分析结果, 选取质量较好的一组和二组建立共有模式。将 13 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版”(2012 版), 选取“时间窗宽度”为 0.10 min, 对照图谱的生成方法为“中位数”, 自动匹配后, 得到“对照图谱”, 继而得到样品与对照图谱的匹配图, 见图 5。再将对照图谱和样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统检验版”(2012 版), 可计算出样品与对照品图谱的相似度数据, 结果见表 2。个别样品由于特征峰峰面积较小, 相似度较低, 存在饮片质量较差的情况。

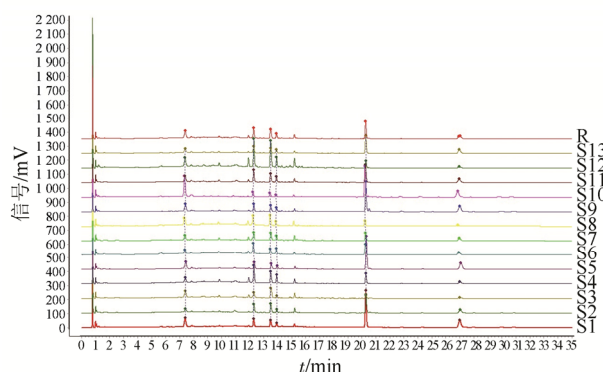


图5 首乌藤对照图谱(R)及部分样品叠加图

Fig. 5 The chromatographic peaks matching result of Polygoni Multiflori Caulis

3 讨论

本实验采用 UHPLC 研究建立了首乌藤的特征图谱及含量测定方法, UHPLC 可以节省分析时间以及流动相的消耗, 快速、简便。同时考察了不同型号色谱柱以及柱温、流速、流动相比例、检测波长等色谱条件的变化, 结果色谱峰均分离较好, 测定结果基本一致, 表明本方法耐用性较好。

中药特征图谱可以通过主要特征峰的面积、比例、吸收峰的强度、相似度等量化指标检测药材及饮片的质量^[5-7]。本实验建立的首乌藤 UHPLC 特征图谱中 6 个共有峰的相对保留时间差异较小, 但相似度存在明显差异, 且各个色谱峰相对峰面积的差异性也较大, 表明首乌藤样品各批次间的整体化学成分具有较好的相似性, 但各色谱峰所代表的化学成分含量有较大差异。可见, 所建立的 UHPLC 特征图谱方法能较好地评价首乌藤的质量。

研究中所做的聚类结果与生药鉴别专家对首乌藤饮片质量进行分级的结果一致, 其分析结果侧重于表征各饮片之间化学成分“量”的差异, 说明聚类分析结果直观地展示了各批次首乌藤饮片的差异性、产地的区分、不同等级、不同规格的鉴定。主成分分析是研究如何将多指标转化为新的既彼此互不相关、具有较强的信息聚集效能的综合指标^[8]。本研究将 40 批首乌藤饮片 6 个共有峰的单位质量峰面积作为变量, 进行的主成分分析结果与聚类分析结果基本一致。聚类分析可以对样品做出初步分组, 而主成分分析又能进一步验证聚类分析结果的准确性, 并对样品的优劣进行初步评价, 为选定具有代表性的饮片提供依据。聚类分析和主成分分析结果显示, 外观性状与中国药典要求一致的饮片聚为 I 类, 且含量和

特征图谱的相似度较好, 而外观性状与中国药典差别较大的饮片聚为 II、III 类, 提示饮片生产企业要严格使用符合药典要求的药材及饮片。

综上所述, 利用 UHPLC 特征图谱相似度及含量测定结果对首乌藤饮片质量进行评价的同时, 联合应用主成分分析和聚类分析对样本做更准确的分类, 可以对特征图谱相似度进行有效的补充, 为首乌藤饮片品质评价和质量标准的完善提供借鉴。

REFERENCES

- [1] 梁妍, 田维熙, 马晓丰. 首乌藤的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(7): 536-538.
- [2] HUI T T, XUE Y M, ZHANG Q L, et al. Studies on chemical constituents from rattan of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2008, 31(8): 1163-1165.
- [3] ZHANG C Y, DONG L, CHEN S L, et al. UPLC fingerprint for quality assessment of ginsenosides of *Ginseng Radix et Rhizoma* [J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2010, 45(10): 1296-1300.
- [4] DONG L, ZHANG C Y, CHEN S L, et al. HPLC-UV-ELSD characteristic figure and chemical pattern recognition of *Panax quinquefolii Radix* [J]. *Acta Pharm Sin*(药理学学报), 2011, 46(2): 198-202.
- [5] ZHANG H Y, XU X F, HUANG Y, et al. Characteristic fingerprint analysis and determination of main components on *andrographis paniculata* extract by UPLC [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2014, 37(6): 1055-1058.
- [6] HUANG Z F, YI J H, CHEN D A, et al. HPLC specific chromatogram of *Radix Aconiti Praeparata* and determination of six ester alkaloids [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2011, 31(2): 217-221.
- [7] 胡汉昆, 刘薇芝, 刘萍, 等. 中药特征图谱技术在中药鉴定中的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(11): 936-938.
- [8] ZHANG L J, LI Y, DAI H R, et al. HPLC fingerprints analysis of processed *Aconitum Sinomontanum* Nakai and determination of the contents of two alkaloids [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(1): 57-62.

收稿日期: 2017-07-11

(本文责编: 李艳芳)